

Isolierung, Reinigung und Expression zentraler Enzyme der Biosynthese des pflanzlichen Antiarrhythmikums Ajmalin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

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

vorgelegt von
Gerald v. Schumann

Mainz
2003

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2003

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG	1
1 <i>RAUVOLFIA SERPENTINA</i> – EINE INDISCHE MEDIZINALPFLANZE IM WANDEL DER ZEIT .	1
2 ALKALOIDBIOSYNTHESEN – UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER AJMALIN- BILDUNG IN <i>RAUVOLFIA SERPENTINA</i>	5
3 REDUKTASEN	9
4 AUFGABENSTELLUNG	12
II MATERIAL	14
1 BIOLOGISCHES MATERIAL	14
1.1 <i>Pflanzen</i>	14
1.2 <i>Pflanzenzellkulturen</i>	14
1.3 <i>Bakterienstämme</i>	15
2 KULTURMEDIEN	16
2.1 <i>Medien für die Pflanzenzellkultur</i>	16
2.2 <i>Bakterienmedien</i>	16
3 PUFFERLÖSUNGEN	17
4 FERTIGSÄULEN, SÄULENMATERIAL	19
5 VEKTOREN	20
6 RADIOISOTOPE	21
7 „KITS“ FÜR ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTIONEN UND FÜR DIE MOLEKULARBIOLO- GIE	21
8 ENZYME, MARKER, NUKLEOTIDE	22
9 CHEMIKALIEN & ZUBEHÖR	23
10 GERÄTE.....	25
III METHODEN	29
1 REINIGUNG UND ANALYTIK VON PROTEINEN.....	29
1.1 <i>Gewinnung von Proteinrohextrakten aus pflanzlichen Zellsuspensionskul- turen</i>	29
1.2 <i>Herstellung von Proteinrohextrakten mittels Bakterienzellaufschluß</i>	30

1.3 Konzentrierung von Enzymlösungen mit Einwegkonzentratoren.....	30
1.4 Entsalzen und Umpuffern von Enzymlösungen	31
1.4.1 Dialyse.....	31
1.4.2 Verwendung einer Entsalzungssäule.....	32
1.5 Reinigung und Trennung von Enzymen durch Chromatographie.....	32
1.5.1 Anionenaustauschchromatographie	33
1.5.1.1 SOURCE 30Q	33
1.5.1.2 DEAE-Sepharose – Fast Flow.....	33
1.5.1.3 Mono Q	34
1.5.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC).....	34
1.5.2.1 SOURCE 15Phe	35
1.5.2.2 Phenyl-Sepharose CL- 4B.....	35
1.5.3 Hydroxylapatit-Chromatographie	35
1.5.4 Affinitätschromatographie	36
1.5.4.1 2',5'-ADP-Sepharose 4B	36
1.5.4.2 HiTrap Blue HP.....	36
1.5.4.3 Ni-NTA Agarose/Ni-NTA Superflow.....	36
1.5.5 Größenausschlußchromatographie	37
1.5.5.1 Sephacryl S-100 HR.....	37
1.5.5.2 Superdex 75.....	37
1.5.5.3 Sephadex G 25	38
1.5.6 Chromatofokussierung	38
1.6 Gelelektrophoretische Verfahren	39
1.6.1 SDS-PAGE.....	39
1.6.2 Basische Nativ-Elektrophorese	41
1.6.3 Kombinierte SDS-PAGE/BNE	42
1.6.4 „Western-Blotting“.....	43
1.6.5 Färbemethoden	44
1.6.5.1 Coomassie-Färbung.....	44
1.6.5.2 Silberfärbung.....	44
1.6.5.3 Ponceau S-Färbung	45
1.6.6 Bestimmung der ungefähren Menge und Größe von Proteinen in Gelen ...	46
1.7 Gehaltsbestimmungen von Proteinlösungen	47
1.8 Bestimmung der Enzymaktivität	47
2 CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	49
2.1 Dünnschichtchromatographie.....	49
2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	49
2.3 Kernresonanzspektroskopie	51
2.4 Massenspektrometrie.....	51

2.5 UV/VIS-Spektroskopie	51
3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	52
3.1 Gewinnung von Nukleinsäuren.....	52
3.1.1 Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen.....	52
3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA	52
3.1.3 Isolierung von Poly(A) ⁺ -mRNA.....	53
3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA	54
3.1.4.1 Minipräparation („Quicktest“) von Plasmid-DNA	54
3.1.4.2 Minipräparation (hochrein) von Plasmid-DNA.....	55
3.1.5 Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenzellen.....	55
3.2 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen	55
3.2.1 Aufreinigung und Fällung von RNA bei der RACE-cDNA-Herstellung...	56
3.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen.....	56
3.4 Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	57
3.5 Enzymkatalysierte Modifikationen von Nukleinsäuren.....	58
3.5.1 Reverse Transkription.....	58
3.5.1.1 cDNA-Synthese mit <i>M-MuLV</i> Reverse Transkriptase.....	58
3.5.1.2 RACE-cDNA-Synthese	58
3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	59
3.5.2.1 Hotstart PCR.....	60
3.5.2.2 Touch-Down PCR	60
3.5.2.3 Nested PCR.....	60
3.5.3 Ligation.....	61
3.5.3.1 Ligation von DNA	61
3.5.3.2 Ligation von Oligonukleotiden an RNA.....	61
3.5.4 Restriktion/Fragmentierung von DNA	62
3.5.5 Dephosphorylierung von RNA 5'-Enden durch CIP	62
3.5.6 Abspalten der 5' Cap-Struktur durch TAP	63
3.5.7 Radioaktive Markierung von DNA.....	64
3.5.7.1 Markierung mittels „Oligolabeling“	64
3.5.7.2 Aufreinigen radioaktiver Sonden.....	64
3.6 Screenen einer <i>Rauvolfia</i> cDNA-Bank.....	65
3.6.1 Ausplattieren der cDNA-Bank.....	65
3.6.2 „Colony-Blotting“ auf geladene Nylonmembranen	65
3.6.3 Selektion und Isolierung positiver Klone	67
3.6.4 Konstruktion eines <i>pBlueskript</i> Phagemids durch „ <i>in-vivo</i> -Excision“ aus dem Uni-ZAP XR Vektor	68
3.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren.....	69
3.7.1 Analytische und präparative Agarosegele	69
3.7.2 Denaturierende Agarosegele.....	69

3.8 Präparation kompetenter Bakterien.....	70
3.9 Transformation kompetenter Zellen.....	70
4 ENZYMATISCHE PRODUKTION VON 2 β -(R)-1.2-DIHYDROVOMILENIN UND 17-O-ACETYL-NORAJMALIN	71
5 GENUTZTE INTERNETSEITEN FÜR DATENBANKRECHERCHEN	72
IV ERGEBNISSE.....	73
1 FORSCHUNGSSTAND ZU BEGINN DER DISSERTATION.....	73
2 PROTEINREINIGUNG.....	75
2.1 Aufbau eines Enzymtests mit anschließender Detektion des Umsatzes.....	75
2.2 Reinigung der Vomilenin Reduktase	76
2.2.1 Isolierung löslicher Proteine aus Pflanzenzellsuspensionskulturen.....	76
2.2.2 Ionenaustauschchromatographie	77
2.2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	79
2.2.4 Affinitätschromatographie	80
2.2.5 Gelelektrophoretischer Nachweis des Reinigungserfolges	82
2.2.6 Weitere Reinigungsversuche.....	83
2.2.7 Stabilisierungsversuche.....	85
2.3 Reinigung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase	87
2.3.1 Gewinnung löslicher Proteine durch Pflanzenzellaufschluß.....	87
2.3.2 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q.....	87
2.3.3 Hydroxylapatit-Chromatographie	88
2.3.4 Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B	89
2.3.5 Anionenaustausch an DEAE-Sepharose – Fast Flow	90
2.3.6 Anionenaustausch mit MonoQ.....	92
2.3.7 Gelelektrophoretischer Nachweis des Reinigungserfolges	93
2.4 Proteolytische Spaltung mit anschließender Peptidsequenzierung	96
2.4.1 Vomilenin Reduktase-Sequenzen	96
2.4.2 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Sequenzen.....	97
2.5 Datenbanksuchen zum Auffinden homologer Sequenzen.....	97
3 CHARAKTERISIERUNG DER VOMILENIN- UND DER 1.2-DIHYDROVOMILENIN REDUKTASE.....	100
3.1 pH-Optima.....	100
3.1.1 pH-Abhängigkeit des Vomilenin-Umsatzes.....	100
3.1.2 pH-Optimum der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	102
3.2 Bestimmung der Temperatur-Optima der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase	103

3.3 Test auf Glykosylierungen der Vomilenin- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase mittels Enzym-Immunoassay.....	105
3.4 Molekulargewichtsbestimmung	106
3.5 Co-Substratspezifität.....	108
3.6 Substratspezifitäten.....	109
3.7 Metallionenabhängigkeit	110
3.8 Taxonomische Verbreitung.....	112
3.9 Verlauf der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Produktion in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer einer <i>R. serpentina</i> Zellsuspensionskultur.....	113
4 MOLEKULARBIOLOGISCHER TEIL.....	115
4.1 "Reverse genetics" am Beispiel der Vomilenin Reduktase	116
4.1.1 Primerentwicklung.....	116
4.1.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	117
4.1.3 PCR mit degenerierten Primern.....	118
4.1.4 Subklonierung der erhaltenen cDNA-Fragmente in <i>pGEM-T easy</i>	122
4.1.5 Sequenzierung positiver Klone der 40- und 43 kDa-Bande	123
4.1.6 Durchmusterung einer cDNA-Bank (40 kDa-Bande)	126
4.1.6.1 "In-vivo-Excision" isolierter, positiver Klone	127
4.1.6.2 Sequenzierung.....	128
4.1.7 RACE-PCR (43 kDa-Bande).....	130
4.2 Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase: von den Peptidfragmenten zur cDNA	135
4.2.1 PCR mit degenerierten Primern.....	135
4.2.2 Reamplifizierungs-PCR.....	137
4.2.3 Sequenzierung der Klone 5 und 10.....	139
4.2.4 RACE-PCR.....	141
4.2.5 PCR mit genomischer DNA	144
4.3 Expressionsstrategien	146
4.3.1 Umklonierung der cDNA der 40 kDa-Bande	148
4.3.2 Abstimmen der codierenden cDNA der 43 kDa-Bande auf den <i>pQE 60</i> -Vektor	151
4.3.3 Einbau der 48 kDa-cDNA in das Expressionsplasmid <i>pQE 70</i>	155
5 EXPRESSIONSVERSUCHE	158
5.1 Expressionsergebnisse.....	160
5.1.1 cDNA der 40 kDa-Bande.....	161
5.1.2 cDNA der 43 kDa-Bande Race 2.....	162

6 ALKALOID-SYNTHESEN	166
6.1 Enzymatische Produktion von 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin	166
6.2 Chemische Synthese der Alkaloide Perakin, Raucaffrinolin, 2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenin und 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin	167
6.2.1 Derivatisierung des Vomilenins zu Perakin	167
6.2.2 Reduktion von Perakin zu Raucaffrinolin	168
6.2.3 Chemische Synthese des 2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenins	168
V DISKUSSION	169
1 PROTEINREINIGUNG / TRENNUNG DER REDUKTASEAKTIVITÄTEN	169
2 MOLEKULARBIOLOGIE	173
2.1 Isolierung der für die 40-, 43- und 48-kDa-Bande codierenden cDNA	173
2.2 Sequenzvergleiche / konservierte Bereiche	177
2.3 Expressionsversuche	182
3 EIGENSCHAFTEN DER VOMILENIN- UND 1.2-DIHYDROVOMILENIN REDUKTASE	189
4 AUSBLICK	192
VI ZUSAMMENFASSUNG	194
VII ANHANG	197
1 ANALYTISCHE DATEN	197
1.1 UV-Spektren	197
1.1.1 UV-Spektrum von Vomilenin	197
1.1.2 UV-Spektrum von 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin	198
1.1.3 UV-Spektrum von 17-O-Acetylnorajmalin	198
1.2 HPLC-Chromatogramme und Massenspektren	199
1.3 NMR-Spektren	213
1.3.1 Vollständiges ¹ H-NMR-Spektrum von 17-O-Acetylnorajmalin	213
1.3.2 Teilbereiche des ¹ H-NMR-Spektrums des 17-O-Acetylnorajmalins	213
2 EINTEILUNG DER OXIDOREDUKTASEN NACH NC-IUBMB	215
3 SEQUENZEN	216
3.1 Sequenzen der 43 kDa-Bande	216
3.1.1 Vollständige cDNA des 43 kDa RACE 1-Klons	216

3.1.2 Vollständige cDNA des 43 kDa RACE 2-Klons	218
3.2 Vollständige cDNA des 48 kDa-Klons.....	220
VIII LITERATURVERZEICHNIS	222
VERÖFFENTLICHUNGEN	233
DANKSAGUNG..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
LEBENS LAUF.....	234

Abkürzungen

% (m/V)	Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung)	DMF	Dimethylformamid
% (V/V)	Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung)	DMSO	Dimethylsulfoxid
x g	x-fache Erdbeschleunigung	dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C, G, T)
A	Adenin	DTT	Dithiotreitol
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm	<i>E</i>	<i>Escherichia</i>
AAAE	Acetylajmalin Acetylerase	<i>Eco</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AMV-RT	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i> -Reverse Transkriptase	EtOH	Ethanol
ANAMT	Acetylnorajmalin Methyltransferase	eV	Elektronenvolt
APS	Ammoniumpersulfat	FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
AS	Aminosäure	FM	Fließmittel
<i>Bgl</i>	<i>Bacillus globigii</i>	FMN	Flavin-mononukleotid
BNE	Basische Nativ-Elektrophorese	G	Guanin
bp	Basenpaare	GC	Gaschromatographie
Bq	Becquerel	GDH	Geissoschizin Dehydrogenase
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)	HA	Hydroxylapatit
C	Cytosin	HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
CAD	Cinnamoylalkohol Dehydrogenase, Zimtalkohol Dehydrogenase	HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Ci	Curie (1 Ci = 3.7 × 10 ¹⁰ Zerfälle/Sekunde [Bq])	IEP	Isoelektrischer Punkt
cfu	colony forming units	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
CIP	Calf Intestinal Phosphatase	kat	Katal, Enzymaktivität (Umsatz von 1 Mol Substrat pro Sekunde)
Da	Dalton	kb	Kilo-Basen
DAB	Deutsches Arzneibuch	kbp	Kilo-Basenpaare
DC	Dünnschichtchromatographie	kDa	Kilo-Dalton (rel.Molekülmasse von Enzymen)
DEAE-	Diethylaminoethyl-	KP _i	Kaliumphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LDR	Long Chain Dehydrogenase/Reductase, langkettige Dehydrogenase/Reduktase
DHVR	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase		

LMW	Molekulargewichtsmarker für Proteine	RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
log	Logarithmus	<i>R</i>	<i>Rauvolfia</i>
Lux	Beleuchtungsstärke	R _f	rel. Laufstrecke
M	Molare Konzentration	RNR	Ribonukleotid Reduktasen
M ⁺	Molekülionenpeak	RP	Reversed Phase
MDR	Medium Chain Dehydrogenase/Reductase, mittelkettige Dehydrogenase/ Reduktase	R _t	Retentionszeit
		RT	Reverse Transkriptase
		SAH	S-adenosylhomocystein
		SBE	Sarpagin Brückenenzym
MeOH	Methanol	SDR	Short Chain Dehydrogenase /Reductase, kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
min	Minute		
ml	Milliliter		
mM	millimolar	SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>M-MuLV</i>	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase</i>		
RT			
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure	s	Sekunde
		SG	Strictosidin Glucosidase
MS	Massenspektrometrie	<i>Sph</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
MSH	β-Mercaptoethanol		
MTD	Mannitol Dehydrogenase	SS	Strictosidin Synthase
MW	Molecular Weight / Molekulargewicht	T	Thymin
		TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
m/z	Verhältnis Masse/Ladung		
NADH	Reduziertes Nicotinamidadeninucleotid	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
+H ⁺			
NADPH + H ⁺	Reduziertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>Nco</i>	<i>Nocardia corallina</i>		
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz (Kernresonanz)	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
OD	Optische Dichte	U	Unit (1U = 16.67 nkat)
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)	Upm	Umdrehungen pro Minute
		UV	Ultraviolett
Pa	Pascal	VH	Vinorin Hydroxylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	1.2-VomH ₂	1.2-Dihydrovomilenin
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)	Vom	Vomilenin
		VR	Vomilenin Reduktase
PEG	Polyethylenglycol	VS	Vinorin Synthase
pfu	plaque forming units	VT	Volumenteil
P _i	Phosphat	W	Watt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	ZKBS	Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit
PNAE	Polyneuridinaldehyd Esterase		

Aminosäurecode

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 <i>Rauvolfia serpentina</i> in Blüte am Naturstandort.	1
Abb. 2 Geographische Verbreitung ausgewählter <i>Rauvolfia</i> -Arten nach LEMLI (1957).	2
Abb. 3 Wurzelmaterial von <i>R. serpentina</i>	3
Abb. 4 Ajmalinbiosynthese in <i>Rauvolfia</i>	8
Abb. 5 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes über das Zwischenprodukt Norajmalin zum Ajmalin nach STÖCKIGT et al. (1983).....	73
Abb. 6 Mögliche Wege der Reduktion des Vomilenins zu 17-O-Acetylnorajmalin nach POLZ (Dissertation, 1989).....	74
Abb. 7 HPLC-Lauf nach Inkubation des Rohextraktes.....	77
Abb. 8 SOURCE 30Q-Graph. Gezeigt ist das Elutionsprofil der Vomilenin Reduktase an S 30Q bei einem linearen KCl-Gradienten von 0 – 0.2 M.....	78
Abb. 9 SOURCE 15Phe Chromatogramm der Vomilenin Reduktase.	79
Abb. 10 Elutionsprofil der Vomilenin Reduktase an 2',5'-ADP-Sepharose 4B. .	81
Abb. 11 SDS-PAGE der angereicherten Proteinfractionen der Vomilenin Reduktase nach 2',5'-ADP-Sepharose.....	83
Abb. 12 Elutionsprofil der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase an S 30Q. Man erkennt deutlich das sich überschneidende Elutionsmuster der beiden Reduktasen	88
Abb. 13 Elutionsprofil der Hydroxylapatit Säule für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	89
Abb. 14 2',5'-ADP-Sepharose 4B Chromatographie. Im linken Teil der UV-Kurve ist der große Proteinpeak zu erkennen, der von den 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Fraktionen abgetrennt wurde.....	90
Abb. 15 Elutionsmuster an DEAE-Sepharose – Fast Flow.	91
Abb. 16 MonoQ Chromatographie der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung.....	92
Abb. 17 Aktivitätsmuster der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen nach MonoQ im Vergleich mit dem dazugehörigen SDS-Gel.....	94

Abb. 18 HPLC-Chromatogramme: A – HPLC-Lauf nach Nativ-Gelelektrophorese, B – 1.2-Dihydrovomileninreduktion (1) zu 17-O-Acetylnorajmalin (2) als Positivkontrolle, C – Reine Substratlösung (1.2-Dihydrovomilenin, R_t 4.72 min).	95
Abb. 19 pH-Abhängigkeit der Vomilenin Reduktase-Aktivität. Das Optimum liegt zwischen pH 5.8 und 6.2.	101
Abb. 20 Korrelation pH-Wert – relative Aktivität der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	103
Abb. 21 Temperatur-Optimum der Vomilenin Reduktase.	104
Abb. 22 Temperaturabhängige Aktivität der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase	104
Abb. 23 Molekulargewichtsbestimmung für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase an Superdex 75.....	107
Abb. 24 Molekulargewichtsbestimmung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase im SDS-Gel. Aufgetragen ist der R_f -Wert der Markerproteine gegen das Molekulargewicht. Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase besitzt einem R_f -Wert von 0.34. Dies entspricht einer Größe von 48 kDa.	108
Abb. 25 Rekonstitution der Vomilenin Reduktase-Aktivität nach Zugabe von Metallionen. Zuvor wurde die Reduktase-Fraktion mit EDTA behandelt, was zum kompletten Verlust der Vomilenin Reduktase-Aktivität führte.	111
Abb. 26 Zeitlicher Verlauf der 17-O-Acetylnorajmalin-Produktion in <i>Rauvolfia serpentina</i> Zellen als indirektes Maß für die Expression der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	114
Abb. 27 Denaturierendes Agarosegel einer RNA-Isolierung aus <i>R. serpentina</i> Zellsuspensionskulturen.....	117
Abb. 28 Agarosegel-Photos nach erfolgter PCR zur Amplifizierung eines cDNA-Stücks der Vomilenin Reduktase.....	120
Abb. 29 1.5 %iges Agarosegel einer <i>pGEM-T easy</i> -Isolierung, verdaut mit <i>EcoR</i> I. In den Gelphotos sind die Fragmente in Höhe von 100 + 200 bp bei der 43 kDa-Bande sowie das 660 bp große Fragment der 40 kDa-Bande deutlich wiederzufinden. M: Marker (Smart Ladder). Bahnen 1 - 6: Restriktionsverdau der Plasmid-Minipräparationen von verschiedenen 43 kDa-Klonen. Bahnen 7 und 8: 40 kDa-Klone. Die mit "x" markierten Banden wurden eluiert und weiterbearbeitet.	123
Abb. 30 Sequenzen (5' → 3') verschiedener Klone der 40 kDa- und 43 kDa-Bande.	124
Abb. 31 Röntgenfilme mit positiven Spots der Vomilenin Reduktase (40 kDa).. ..	126

Abb. 32 Vollständige cDNA-Nukleotidsequenz (5' → 3') der 40 kDa-Bande...	128
Abb. 33 Agarosegel (1.5 %ig) nach Amplifizierung des 3'- bzw. 5'-Endes des 43 kDa RACE 1- und 43 kDa RACE 2-Klons.....	132
Abb. 34 Agarosegel (1.2 %ig) nach Verdau verschiedener RACE 1 und 2 Klone mit <i>EcoR</i> I.	133
Abb. 35 Agarosegel (1.5 %ig) nach PCR. Bahnen 1 und 3 – 8: Positive Klone mit 5'-cDNA der 43 kDa RACE 2-Sequenz.....	134
Abb. 36 Agarosegel (1.5 %ig) nach PCR mit degenerierten Primern zur Vervielfältigung eines cDNA-Stücks der 48 kDa-Bande.....	137
Abb. 37 Agarosegel (1.5 %ig) mit Proben der Reamplifizierungs-PCR zur Vervielfältigung eines cDNA-Stücks der 48 kDa-Bande.....	138
Abb. 38 Agarosegel (1.5 %ig) nach Restriktionsverdau einer Plasmid-Minipräparation des PCR-Fragments der 48 kDa-Bande mit <i>EcoR</i> I.....	138
Abb. 39 Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der 48 kDa-Bande nach PCR mit degenerierten Primern.....	141
Abb. 40 Agarosegel (1 %ig) nach RACE-PCR. Man sieht die gezielte Vervielfältigung des 5'-Endes der 48 kDa-cDNA in Bahn 4 mit etwa 600 bp und die Amplifikation des 3'-Endes, ebenfalls ca. 600 bp groß, in Bahn 9.	143
Abb. 41 Agarosegel (1.5 %ig) nach <i>EcoR</i> I-Verdau einer Plasmid-Minipräparation. Die der Bahnen 1 + 2 zugrunde liegenden Klone enthalten das 600 bp-Insert des 5'-Endes der 48 kDa-cDNA. Bahnen 3 + 4 zeigen das ausgeschnittene 600 bp-Fragment des 3'-Endes der 48 kDa-cDNA.	144
Abb. 42 Agarosegel (1 %ig) nach PCR mit genomischer DNA. Ziel war es, den Genabschnitt aufzufinden, der für die 48 kDa-Bande codiert.....	145
Abb. 43 Agarosegel (1 %ig) nach Reamplifizierung der genomischen DNA-Banden aus Abb. 42.....	146
Abb. 44 Schematischer Aufbau des <i>pSE 280</i> -Plasmids.	149
Abb. 45 Vektorkarte des <i>pQE 60</i> -Plasmids zur Veranschaulichung der Klonierungsstrategie.....	152
Abb. 46 Durch Einbringen eines Stop-Codons unmittelbar vor die <i>Bgl</i> II-Schnittstelle des <i>pQE 60</i> -Vektors, wird ein Ablesen des (His) ₆ -tags verhindert..	154
Abb. 47 Aufbau des <i>pQE 70</i> -Vektors. Im linearisierten Ausschnitt sind die Schnittstellen für die Umklonierung angegeben.....	155
Abb. 48 Agarosegel (1 %ig) nach erfolgter PCR zur Einführung der <i>Bgl</i> II- und der <i>Sph</i> I-Schnittstelle in die Vollängenklon-cDNA der 48 kDa-Bande.. ..	157

Abb. 49 SDS-Gel eines Rohextraktes nach Induktion der Expression eines 48 kDa-Klons mit 0.6 mM IPTG bei 20 °C.	160
Abb. 50 Reduktion des Zimtaldehyds über die Zwischenstufe Zimtalkohol zu Dihydrozimtalkohol.	162
Abb. 51 HPLC-Chromatogramme eines Perakinassays.	163
Abb. 52 Korrelation zwischen der NADPH-abhängigen Reduktion des Perakins und dem nach SDS-Gel erhaltenen Proteinmuster.	164
Abb. 53 MS-Spektrum der durch Perakinreduktion erhaltenen Substanz.	165
Abb. 54 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes durch die aus <i>Rauvolfia serpentina</i> -Zellsuspensionskulturen aufgereinigte Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	171
Abb. 55 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Alkohol Dehydrogenasen mit den durch die klonierten cDNA's der 40-, 43- und 48-kDa-Bande determinierten Sequenzen der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	178
Abb. 56 Phylogenetischer Baum, in Form eines durchschnittlichen Abstandsbaumes, der miteinander verglichenen Dehydrogenasen/Reduktasen und den klonierten Sequenzen der 40-, 43- und 48 kDa-Bande.	179
Abb. 57 Aminosäuresequenzvergleich der klonierten cDNA's der 40-, 43- und 48 kDa-Bande.	180
Abb. 58 Vomilenin als zentrales Alkaloid in der Ajmalinbiosynthese. Angegeben sind die verschiedenen Reaktionswege des Vomilenins unter besonderer Berücksichtigung der zur Vomileninreduktion analogen Hydrierungen im Biosyntheseweg des Ajmalins.	186
Abb. 59 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes durch die aus <i>Rauvolfia serpentina</i> -Zellsuspensionskulturen aufgereinigte Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	194

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Pharmakologie verschiedener Indolalkaloide aus <i>Rauvolfia</i>	4
Tab. 2 Die Reinigungstabelle bietet eine Zusammenfassung über die einzelnen Schritte zur Anreicherung der Vomilenin Reduktase aus <i>Rauvolfia serpentina</i> Zellsuspensionskulturen.....	82
Tab. 3 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Lebensdauer/Aktivität der Vomilenin Reduktase.....	86
Tab. 4 Reinigungstabelle – Übersicht über die Arbeitsschritte und Eckdaten der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung aus <i>Rauvolfia serpentina</i> Zellsuspensionskulturen.	93
Tab. 5 Aminosäuresequenzen der Vomilenin Reduktase.	96
Tab. 6 Aminosäuresequenzen der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	97
Tab. 7 Sequenzvergleiche von den erhaltenen Peptidfragmenten der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase mit Sequenzen verschiedener anderer Proteine aus Datenbanken.	98
Tab. 8 Gegenüberstellung von pH-Sollwerten und gemessenen pH-Istwerten bei der Bestimmung des pH-Optimums der Vomilenin Reduktase.....	101
Tab. 9 Gegenüberstellung von pH-Sollwerten und gemessenen pH-Istwerten bei der Bestimmung des pH-Optimums der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	102
Tab. 10 Co-Substrat-Abhängigkeit der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	109
Tab. 11 Substratakzeptanz der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	110
Tab. 12 Taxonomische Verbreitung der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.....	113
Tab. 13 Gegenüberstellung berechneter und experimentell bestimmter Molekulargewichte für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.	146
Tab. 14 Induktions- und Temperaturbedingte Umsatzrate des Zimtaldehyds zu Dihydrozimtalkohol durch das codierte Protein des Vollängenklons 4 der 40 kDa-Bande.....	161
Tab. 15 Homologien der klonierten cDNA's der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase auf Aminosäureebene in Prozent.....	175

I Einleitung

1 *Rauwolfia serpentina* – eine indische Medizinalpflanze im Wandel der Zeit

Die älteste, zutreffende Beschreibung der *Rauwolfia* findet sich in der Materia Medica des Portugiesen Garcia da Orta (1490/99 – 1570). Seit diesem Zeitpunkt wurden zahlreiche *Rauwolfia*-Arten beschrieben.

Die Bezeichnung der Pflanze geht auf den Botaniker Plumier zurück, der herausragende Naturforscher, in dem Fall den Augsburger Arzt Leonhart Rauwolf (1540 – 1596) dadurch ehrte, daß er Pflanzen nach ihnen benannte (KERSTEIN, 1957).

Nach einigen Irritationen bezüglich der Schreibweise *Rauwolfia* versus *Rauvolfia*, sollte letzterer nach den Regeln und Empfehlungen für die Nomenklatur von Pflanzen Vorrang gegeben werden, da Linné in der ersten Ausgabe der Genera Plantarum (1737) und später in der Species Plantarum (1753) die Schreibweise der Gattung von Plumier mit *Rauvolfia* (Abb. 1) übernommen hatte (ESDORN UND SCHMITZ, 1956).



Abb. 1 *Rauwolfia serpentina* in Blüte am Naturstandort.

Plumier wiederum diente als Namensgeber einer der drei Unterfamilien der Apocynaceae / Hundsgiftgewächse, den Plumerioideae, denen auch *Rauvolfia* angehört. Diese artenreiche Arzneipflanze wurde erst in der Mitte des 20. Jahrhunderts (1947) durch Pichon klassifiziert. Seine Einteilung, zusammengefasst mit der weiteren Überarbeitung von Woodson und Rao, reduzierte die zwischenzeitlich über 175 Arten des Index Kewensis auf 86, gegliedert in 13 Sektionen (LEMLI, 1957). Vor allem vier dieser milchsaffführenden, tropischen Arten (Abb. 2) haben bis heute eine wichtige medizinische Bedeutung erlangt:

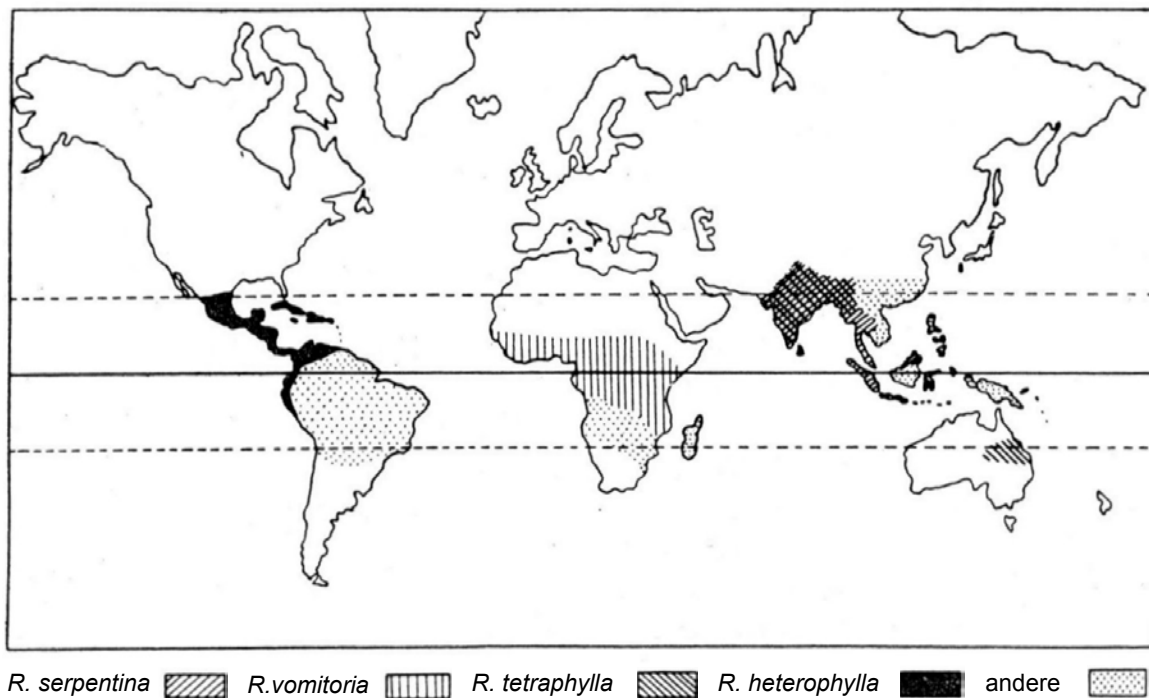
R. serpentina (L.) Benth. ex Kurz,

R. vomitoria (Afz.),

R. canescens (L.) = *R. tetraphylla* (L.) = *R. nitida* (Jacq.) und

R. heterophylla (Willd.).

Abb. 2 Geographische Verbreitung ausgewählter *Rauvolfia*-Arten nach LEMLI (1957).



Die geographische Verbreitung zeigt eindeutig, daß *R. serpentina*, die indische Schlangenzwurzel, fast ausschließlich in Indien beheimatet ist. Man findet sie aber auch in Pakistan, Ceylon, Thailand, Sumatra, Java und Burma. Hier bildet sie 30 cm bis 1 m hohe, immergrüne Sträucher, mit 20 – 40 cm langen, pharmazeutisch genutzten Wurzeln (WICHTEL, 2002), die nach dem Indian

Pharmaceutical Codex von 1953 einen 0.8 bis 1.3 %igen Gehalt an Gesamtalkaloiden aufweisen (Abb. 3).

Diese Gehaltsangaben decken sich auch mit den heutigen Erkenntnissen von 1 – 2 % an Alkaloiden nach HÄNSEL (1994), sowie dem vom DAB verlangten Mindestwert von 1 % berechnet als Reserpin. Der Gehalt an Ajmalin beträgt lediglich 0.1 %.



Abb. 3 Wurzelmaterial von *R. serpentina*.

Die Zusammensetzung des Alkaloidspektrums ist sehr komplex und führte dementsprechend bei der Einnahme zu einer vielfältigen Wirkungsweise. Erst nach der Isolierung und Identifizierung der ersten Reinalkaloide, dem Ajmalin und Serpentin durch SIDDIQUI UND SIDDIQUI (1931,1932 und 1935), sowie dem Reserpin durch MÜLLER, SCHLITTLER UND BEIN (1952), war es in den fünfziger Jahren möglich geworden, substanzbezogene, pharmakologische Wirkungen zu ermitteln (KRONEBERG, 1957).

Die folgende Tabelle faßt einige Wirkungsmechanismen von *Rauwolfia*-Alkaloiden zusammen, gestaffelt nach Alkaloidtyp:

Tab. 1 Pharmakologie verschiedener Indolalkaloide aus *Rauwolfia*.

Alkaloidtyp	Indolalkaloid	Wirkungsweise	Literatur
Yohimban	Corynanthin	α_1 -Rezeptorblockade	ACHELIS UND KRONEBERG (1955)
	Rescinnamin = Reserpinin	Antisymphotonikum, (antihypertensiv und sedativ)	KRONEBERG (1954), CRANSTON et al. (1961)
	Reserpin	Antisymphotonikum, (antihypertensiv und sedativ)	RINALDI UND HIMWICH (1955), MALHOTRA UND PRASAD (1962)
	Yohimbin	α_2 -Rezeptorblockade (Aphrodisiakum)	ACHELIS UND KRONEBERG (1955), HOFMANN (1954)
Heteroyohimban	Ajmalicin = Raubasin	vasodilatatorisch und antihypertensiv	KRONEBERG (1958)
	Serpentin	α -Rezeptorblockade (antihypertensiv)	BRODIE et al. (1956)
Sarpagan	Sarpagin = Raupin	α -Rezeptorblockade (antihypertensiv)	ACHELIS UND KRONEBERG (1953)
Ajmalan	Ajmalin	Antiarrhythmikum der Klasse I (a/c), Natriumkanalblockade	KLEINSORGE (1959), MUTSCHLER et al. (2001), SCHÜTZ (1998)

Die Tabelle zeigt ein kleines Spektrum an Alkaloiden, deren Vorkommen sich z.T. sehr spezifisch auf *Rauwolfia* beschränkt. Dementsprechend wird deutlich, daß bei einem prozentualen Anteil von 0.1 % Ajmalin in der Pflanze enorme Pflanzenquellen erschlossen werden mußten, um den schnell ansteigenden Bedarf an diesem Antiarrhythmikum zu decken. Da *Rauwolfia* zudem sehr langsam wächst und die Kultivierungsproblematik in Südasien zu einem absoluten Engpaß führte – Exportverbot von 1953 durch die indische Regierung – wurde die industrielle Kultivierung nach Afrika verlegt (*R. vomitoria*).

Rauwolfia stellt darüberhinaus ein attraktives Beispiel moderner Naturstoffforschung dar, um auch Gewebe- und Zellsysteme als zusätzliche

Alkaloidquelle zu erschließen. Als erstes standen Untersuchungen von Kalluskulturen an, um deren biosynthetische Leistung herauszufinden (SAHU, 1979; STÖCKIGT et al., 1981 und PAWELKA UND STÖCKIGT, 1983). Dabei konnte die Bildung von Serpentin und Ajmalin durch TUKHATASINOV et al. (1977) und OHTA UND YATAZAWA (1979) in Zellkulturen erfolgreich nachgewiesen werden. Der Vorteil der Zellsuspensionskulturen ist in der kurzen Wachstumszeit zu sehen, die es ermöglicht große Mengen an Zellmaterial zu erhalten. Jedoch war anfangs die Ausbeute an sekundären Pflanzenstoffen aus Zellkulturen generell sehr gering, wie auch die Beispiele Atropin aus *Atropa belladonna*, Chinin aus *Cinchona ledgeriana*, Codein und Morphin aus *Papaver somniferum* und Digoxin aus *Digitalis*-Arten (KREIS UND REINHARD, 1989) belegen. Das führte zu einer weiteren Optimierung der Kulturbedingungen, sowie zu einer Selektion von besonders ertragreichen Zelllinien, was schon 1984 durch DEUS-NEUMANN UND ZENK an *Catharanthus*-Kulturen erfolgreich durchgeführt worden war.

Die Folgezeit kann wohl als revolutionär für die Untersuchung und für das Verständnis von Biosyntheseleistungen im Bereich des Sekundärstoffwechsels angesehen werden. Die anfänglichen Untersuchungen auf dem Gebiet der Flavonoide und Lignine durch HALBROCK UND GRISEBACH (1975 und 1979), der Chinolizidinalkaloide durch WINK UND HARTMANN (1982) sowie der Heteroyohimbanalkaloide durch STÖCKIGT (1980), sind in der Zwischenzeit so weit fortgeschritten, daß der größte Teil der entsprechenden Biosynthesewege bis heute aufgeklärt werden konnte. Ebenfalls ist die Bildung verschiedener Benzophenanthridine und Benzylisochinoline (Alkaloid biosynthesis I auf der Internetseite www.cbs.umn.edu/asirc/biosynthetic_pathways/), der Pyrrolizidinalkaloide (HARTMANN UND OBER, 2000), der Tropanalkaloide (ROTHER, 2002) und der Alkaloide des Ajmalan- und Sarpagan-Typs (STÖCKIGT, 1995) weitestgehend auf molekularer Ebene charakterisiert.

2 Alkaloidbiosynthesen – unter besonderer Berücksichtigung der Ajmalinbildung in *Rauvolfia serpentina*

In der Vergangenheit wurde viel über die physiologische Bedeutung der Alkaloide spekuliert. Man kam schließlich überein, daß diese sehr komplex

gebauten Moleküle dem Selbstschutz – z.B. der Feindabwehr bei Verletzung der Pflanze – dienen (HARTMANN, 1996).

Im Gegensatz zu der schnellen Entdeckung der pharmakologisch-medizinischen Eigenschaften von Alkaloiden (I.1), rückten deren Entstehung und Regulation erst geraume Zeit später in den Mittelpunkt des Interesses.

Die meisten Alkaloide (~ 50 % der ca. 12 000 Alkaloide) sind dabei auf zentrale Vorstufen wie Strictosidin, 1.3-Dihydroxy-N-methylacridon, Norcoclaurin und Homospermidin zurückzuführen, die wiederum aus einer Amin- und Aldehydkomponente aufgebaut sind.

Verknüpfungen der Aldehyde und Amine werden durch Synthesen katalysiert. In den oben genannten Beispielen sind dies:

- die Strictosidinsynthase (**SS**; EC 4.3.3.2), die bisher aus *Rauvolfia serpentina* und *Catharanthus roseus* isoliert und kloniert wurde (TREIMER UND ZENK, 1979; KUTCHAN et al., 1988 und KUTCHAN 1989),
- die Acridonsynthesen I und II (LUKACIN et al., 1999 und SCHRÖDER, 2000),
- die von SAMANANI und FACCHINI (2002) gereinigte und charakterisierte Norcoclaurinsynthase (EC 4.2.1.78) und
- die Homospermidinsynthase (EC 2.5.1.44), kloniert aus *Senecio vernalis* (OBER UND HARTMANN, 1999).

Letztere bildet aus Putrescin und Spermidin die biosynthetische Vorstufe der hoch lebertoxischen Pyrrolizidinalkaloide (BRÜCKMANN, 2002).

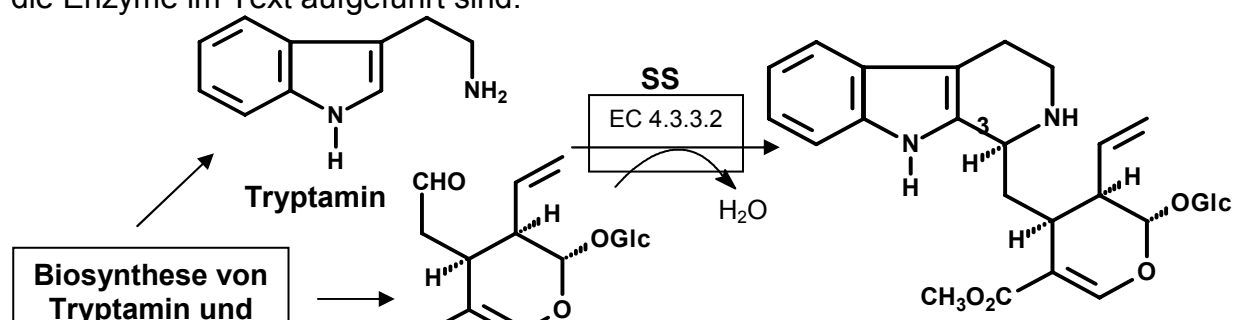
Im Gegensatz dazu bildet Tryptamin, das Decarboxylierungsprodukt der Aminosäure Tryptophan, mit Secologanin die Vorstufen des Strictosidins. Dies nimmt seinerseits eine zentrale Stellung in der Bildung von über 2000 monoterpenoiden Indolalkaloiden ein (STÖCKIGT UND ZENK, 1977; RUEFFER et al., 1978 und NAGAKURA et al., 1979).

Das Abspalten des Zuckers wird durch die erstmals aus *Catharanthus* isolierte Strictosidin- β -D-Glucosidase (**SG**; EC 3.2.1.105) katalysiert. Dabei entsteht ein sehr reaktiver Dialdehyd, der sich unmittelbar in das Corynanthean-, Iboga- oder Aspidosperma-Grundgerüst umlagert. Das entsprechende Enzym aus *R. serpentina* wurde 2002 durch GERASIMENKO et al. molekular charakterisiert und aktiv heterolog exprimiert.

Die wahrscheinlich spontane Umlagerung des Strictosidin-Aglykons liefert das Ausgangsprodukt 4.21-Didehydrogeissoschizin, das in einer NADPH-

abhängigen Reduktion zu Geissoschizin umgesetzt wird. Katalysiert wird diese Reaktion nach PFITZNER UND STÖCKIGT (1982) durch die Geissoschizin Dehydrogenase (**GDH**; EC 1.3.1.36). Es folgen nun verschiedene, nur zum Teil aufgeklärte Schritte. Dazu zählen die Bildung des Sarpagan-Grundgerüsts durch das Sarpagan Brückenzym (**SBE**; SCHMIDT UND STÖCKIGT, 1995), die Umwandlung des Polyneuridinaldehyds durch die im Jahr 2000 durch DOGRU et al. exprimierte Polyneuridinaldehyd Esterase (**PNAE**; EC 3.1.1.78), die Acetyl-CoA abhängige Vinorinsynthese (**VS**; PFITZNER et al., 1986) und schließlich die Hydroxylierung des Vinorins zum Vomilenin durch die CYP 450 Vinorinhydroxylase (**VH**; FALKENHAGEN et al., 1995). Diese wird auch als Vinorin 21-Monooxygenase (EC 1.14.13.75) bezeichnet. Ausgehend vom Vomilenin sind es nur noch vier Reaktionsschritte bis zur Bildung des Ajmalins. Die erste der zwei NADPH-abhängigen Reduktionen wird durch die Vomilenin Reduktase (**VR**; EC 1.5.1.32) katalysiert (VON SCHUMANN et al., 2002). Das dabei entstehende 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin wird unmittelbar durch die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (**DHVR**; EC 1.3.1.73) zum 17-O-Acetylnorajmalin reduziert (GAO et al., 2002). Das heißt, 1.2-Dihydrovomilenin akkumuliert nicht in größeren Mengen und ist somit nicht im Pflanzenmaterial nachweisbar. Die letzten zwei Stufen des Hauptbiosynthesewegs sind bezüglich ihrer Reihenfolge noch ungeklärt. Nach den durch POLZ (1987) ermittelten K_M -Werten und Substratspezifitäten sollte das Acetylnorajmalin mit 100 % relativer Aktivität das eigentliche Substrat der Acetylerase darstellen. Mit nur etwas geringerer Aktivität (84 % rel. Aktivität) wurde auch 2 β -(*R*)-17-O-Acetylnorajmalin umgesetzt. Da diese Werte sehr dicht beieinander liegen und Acetyljmalin bei Alkaloidisolierungen aus *Rauvolfia serpentina* eindeutig durch PFITZNER (1984) nachgewiesen werden konnte – Norajmalin hingegen nicht – gebe ich der Variante: „zuerst Methylierung durch eine membrangebundene N-Methyltransferase (**ANAMT**) und dann Abspaltung der Acetyleinheit durch die entsprechende Esterase (**AAAE**)“ den Vorrang.

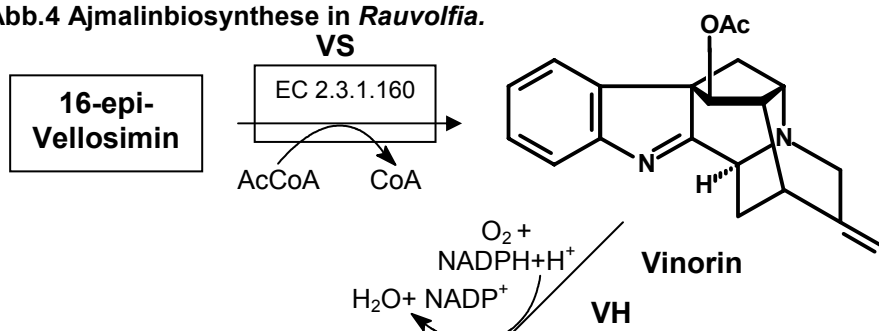
Die schematische Darstellung der Ajmalinbiosynthese ist auf den folgenden zwei Seiten wiedergegeben, wobei die von mir verwendeten Abkürzungen für die Enzyme im Text aufgeführt sind.



Polyneuridinaldehyd

PNAE

Abb.4 Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia*.



Acetyljmalin

Ajmalin

Abb. 4 Vollständige Ajmalinbiosynthese ausgehend von Tryptamin und Secologanin mit allen beteiligten Enzymen, deren EC-Nummern und den benötigten Cofaktoren. Schwarz umrandet sind die beiden Reduktionen vom Vomilenin zum 17-O-Acetylnorajmalin, die in dieser Arbeit noch näher charakterisiert werden.

3 Reduktasen

Der immense Wissenszuwachs auf dem Gebiet der Molekularbiologie in den letzten Jahren führte zu einer explosionsartigen Entwicklung im Bereich der Genforschung: nicht nur, daß Gensequenzen ganzer Genome (*Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Plasmodium falciparum*, *Helicobacter pylori* etc.) unter anderem auch über das Internet zur Verfügung gestellt (z.B.: www.genome.ad.jp/kegg/catalog/org_list.html) und Datenbanken für Proteinsequenzen und auch Nukleotidsequenzen angelegt wurden, nein, immer mehr rücken Sequenz-Wirkungsbeziehungen in den Mittelpunkt. Man möchte etwas über die Funktion der Enzyme und Gene erfahren, um später gezielter die Stoffwechselgeschehnisse studieren und auch modulieren zu können. Dabei spielen Signaltransduktionswege eine entscheidende Rolle. Doch dies ist erst dann möglich, wenn die genaue Funktion der Enzyme bekannt ist.

Die enorm schnell anwachsende Zahl an bekannten Enzymen wird dabei nach der jeweiligen Funktion in die Gruppe der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen oder Ligasen eingeordnet. Die Oxidoreduktasen, zu denen auch die Untergruppe der Reduktasen gehört, bilden die wohl am breitesten gefächerte Gruppe mit über 20 Untergruppen. (Aufteilung nach NC-IUBMB, 1999, siehe VII.2).

Sehr deutlich wird dies am Beispiel der körpereigenen Arzneistoffmetabolisierung, die sich in Phase I- und II- Metabolisierung aufteilt. In Phase I finden vor allem Oxidationen und Reduktionen statt, die durch Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen, Aminoxidasen, Cytochrom P450 Enzyme und Nitro- bzw. Azoreduktasen katalysiert werden. In Kombination mit der Phase II-Metabolisierung (Transferasen) werden Arzneistoffe systematisch hydrophilisiert, um die renale Ausscheidung zu verstärken (TREDGER UND STOLL, 2002). Es ist biochemisch gesehen völlig unmöglich, daß nur ein Enzym sämtliche dem Körper zugeführten Stoffe zu verstoffwechseln vermag, und so ist es nicht verwunderlich, daß mittlerweile über 57 Isoformen allein bei den menschlichen Cytochrom P450 Enzymen bekannt sind (NELSON, 2002).

Doch nicht nur bei der Xenobiotikaverstoffwechslung, sondern auch bei körpereigenen katabolen und anabolen Prozessen spielen die Reduktasen eine gewichtige Rolle, wie zum Beispiel die 5- α -Reduktase. Dieses am Hormonhaushalt beteiligte Enzym konvertiert Testosteron in das physiologisch wesentlich aktivere Dihydrotestosteron, das zur Entstehung und dem

Fortschreiten der benignen Prostatahyperplasie (BPH) beiträgt. Nach der Aufklärung der Funktion des Enzyms war man in der Lage, gezielt Medikamente – die 5- α -Reduktasehemmer, z.B. Finasterid, Epristerid und Dutasterid – gegen die BPH zu entwickeln (SUN ZU-YUE et al., 1999).

Ebenfalls in den Hormonhaushalt eingreifend - nur an wesentlich früherer Stelle - wirkt die Hydroxymethyl-glutaryl-CoA-Reduktase, die 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA zu Mevalonat reduziert. Damit nimmt sie eine Schlüsselstellung in der Cholesterolsynthese ein und reguliert somit auch die vom Cholesterol ausgehende Bildung von Glucocorticoiden, Mineralocorticoiden und Androgenen. Auch hier wurde auf der Basis dieses Wissens mit Lovastatin als kompetitivem Hemmer der HMG-CoA-Reduktase, gewonnen aus dem Bodenpilz *Aspergillus terreus*, ein erfolgreiches Therapieschema im Rahmen der Hypercholesterinämie entwickelt.

Auch für die DNA-Neusynthese und DNA-Reparatur werden Reduktasen benötigt, die die Umwandlung der Purin- und Pyrimidinbasen in Desoxynukleotide katalysieren (STUBBE et al., 2001). Hier bieten die beteiligten Ribonukleotid Reduktasen einen guten Angriffspunkt für Pharmaka, in dem Fall für potentielle Cytostatika. Die Unterteilung der Ribonukleotid Reduktasen erfolgt in drei Klassen, denen allen der radikalische Reaktionsmechanismus zugrunde liegt. Lediglich die Cofaktoren zur Radikalerzeugung unterscheiden sich. Klasse I benötigt Sauerstoff zur Radikalerzeugung, Klasse II nutzt Adenosylcobalamin und Klasse III ist von S-Adenosylmethionin und einer Eisen-Schwefel-Gruppierung abhängig. Durch neuere dreidimensionale Strukturaufklärungen durch TORRENTS et al. (2002) ist es gelungen, die divergente Evolution der Ribonukleotid Reduktasen nachzuweisen und die Klasse III als gemeinsame Vorstufe aller Ribonukleotid Reduktasen zu determinieren.

Neben den Cofaktoren zur Radikalerzeugung sind die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH für eine Vielzahl von Reduktionen essentiell. Wie schon in Abb. 4 (Biosyntheseweg) gezeigt, sind im Bereich der Ajmalinbiosynthese vier NADPH-abhängige Reaktionen lokalisiert. Auch die Tropanalkaloide werden am entscheidenden Punkt, dem Tropinon, durch zwei weitere Enzyme, den Tropinon Reduktasen I + II, in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Tropin beziehungsweise Pseudotropin reduziert (KOELEN UND GROSS, 1982; DRÄGER et

al., 1988). Beide Reduktasen gehören zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR), die mehr als 3000 Vertreter aufweist und sich durch charakteristische Sequenz-Motive auszeichnet (JORNVALL et al., 1999). Basierend auf der N-terminalen Bindungsregion für NADPH bzw. NADH erfolgt die neuere Einteilung in die klassischen SDR's, die NADPH bevorzugen und die erweiterten SDR's, die vorwiegend NADH als Cosubstrat nutzen (KALLBERG et al., 2002).

Daneben finden sich auch mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR), die zur Großfamilie der MDR's gezählt werden und bislang in acht Unterfamilien klassifiziert werden: Dimere Alkohol Dehydrogenasen (ADH's, ursprünglich in Tieren/Pflanzen entdeckt), Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen (CAD's, ursprünglich in Pflanzen entdeckt) und tetramere Alkohol Dehydrogenasen aus Hefen. Weitere drei Klassen, die der Zellatmung zugeordnet werden, sind Acetyl-CoA Reduktasen, Fettsäure Synthasen und Leukotrien-B₄-Dehydrogenasen. Die letzten zwei Familien, die Polyol Dehydrogenasen und die Chinon Reduktasen, sind auch dieser Großfamilie zugeordnet. Bezüglich ihrer Sequenzen sind sie aber sehr variabel (NORDLING et al., 2002).

Als abschließendes Beispiel für eine langkettige Dehydrogenase/Reduktase (LDR) kann die Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase aus *Cryptococcus neoformans* angeführt werden, die im Jahr 2000 durch SUVARNA isoliert und kloniert wurde. Das 148 kDa große tetramere Enzym katalysiert die NAD⁺-abhängige Oxidation des Mannitol-1-phosphats zu Fructose-6-phosphat. Verschiedene andere Mannitol-Dehydrogenasen aus Bakterien, Pilzen und auch aus dem Protozoen *E. tenella* sind jedoch wesentlich kürzer und gehören demnach nicht in die LDR-Familie. Auch Sequenzvergleiche der exprimierten cDNA der Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase aus *Cryptococcus neoformans* mit anderen Mannitol Dehydrogenasen ergab lediglich eine Übereinstimmung von 43 – 47 %, was verdeutlicht, wie schwer es ist, Aussagen über die Klassifizierung von Enzymen oder gar Sequenzhomologien zu treffen.

4 Aufgabenstellung

Zur detaillierten Aufklärung der Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia serpentina*, vor allem zur Entschlüsselung der Reihenfolge verschiedener enzymkatalysierter Schritte, bedarf es noch der Reinigung bzw. Anreicherung einzelner Enzyme mit anschließender Charakterisierung.

Aufgrund dessen stand die Reduktion von Vomilenin zu 17-O-Acetylnorajmalin in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt. In früheren Untersuchungen zu diesem Teil des Ajmalinbiosynthesewegs konnte nur ein Zwischenprodukt, das 1.2-Dihydrovomilenin, massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Es mußte also zuerst geprüft werden, ob lediglich eine oder aber zwei Reduktasen an der Bildung von 1.2-Dihydrovomilenin aus Vomilenin und der weiteren Reduktion zum 17-O-Acetylnorajmalin beteiligt sind. Um dies zu erreichen, sollten Proteinreinigungen mit der Intention durchgeführt werden, Enzymfraktionen zu erhalten, bei denen die Reduktaseaktivitäten voneinander getrennt vorlagen. Im Idealfall sollten die Fraktionen soweit aufgereinigt werden, daß einer bestimmten Proteinbande auf dem SDS-Gel die entsprechende Enzymaktivität der zu reinigenden Reduktase zugeordnet werden könnte. Das wiederum würde die Sequenzierung des Proteins ermöglichen. Über „reverse-genetics“ sollte dann die für das Enzym codierende cDNA und damit die Primärstruktur des Proteins determiniert werden.

Davon ausgehend könnte man die cDNA heterolog exprimieren, was im Falle einer aktiven Expression den letztendlichen Beweis für die Übereinstimmung der sequenzierten Proteinbande mit der Funktion des Proteins erbringen würde. Ebenfalls wäre somit die Möglichkeit eröffnet, große Mengen an homogenem Enzym zu generieren, um tiefere biochemische Untersuchungen zur umfassenden Charakterisierung des Enzyms durchführen zu können.

II Material

Warenrechtlich oder urheberrechtlich geschützte Namen oder Produkte werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht besonders gekennzeichnet.

1 Biologisches Material

1.1 Pflanzen

Für genomische DNA-Isolierungen wurden die jungen, frischen Blätter von *Rauvolfia serpentina* (L.) BENTHAM ex KURZ abgezogen und direkt verarbeitet (III.3.1.5). Die Pflanzen entstammten aus der Sammlung des botanischen Gartens der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und waren zwischen drei und neun Monaten alt. Die Kultivierung erfolgte in einem Terrarium bei einer Beleuchtung mit 230 W/m^2 , einer steten Luftfeuchte von 80 – 90 % und ca. 22 °C.

1.2 Pflanzenzellkulturen

Alle in meiner Arbeit verwendeten Pflanzenzellsuspensionskulturen entstammen der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Mainz. Viele der ihnen vorangegangenen Kalli wurden vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München übernommen, oder in Mainz neu angelegt. Von mir wurden vorwiegend Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia serpentina* (L.) BENTHAM ex KURZ zur Proteingewinnung herangezogen. Ein Aufschluß von Zellsuspensionskulturen anderer Pflanzenzelllinien wurde vor allem zu Vergleichszwecken durchgeführt.

Die Kultivierung der Pflanzenzellen erfolgte - ausgehend vom Kallus - zunächst in verschlossenen 300 ml Erlenmeyerkolben mit etwa 40 ml LS-Medium (LINSMAIER UND SKOOG, 1965) bei 23 – 28 °C, diffusem Dauerlicht (~ 600 Lux) und unter ständigem Schütteln auf Rotationsschüttlern (100 Upm). Nach sieben Tagen Wachstum war genügend Zellmaterial vorhanden, um die Zellen in 80 – 100 ml Nährmedium, ebenfalls im 300 ml Erlenmeyerkolben, zu überführen. Weitere

sieben Tage später wurden die Zellsuspensionen in einen 1 Liter Erlenmeyerkolben überimpft, der 200 ml frisches LS-Medium enthielt. Die Flaschenhalse wurden zum Schutz vor Kontaminationen vor dem Überimpfen mit 70 %igem Isopropanol eingesprüht und anschließend über einer offenen Flamme in einer Sterilwerkbank abgeflammt.

Unter „Ernten“ der Zellen versteht man das Abtrennen der Pflanzenzellen vom Flüssigmedium mit anschließender Schockgefrierung. Dieser Schritt ist für Enzympräparationen sowie für DNA- und RNA-Isolierungen aus der Pflanzenzelle notwendig. Das Abtrennen erfolgte unter Vakuum, das über eine Saugflasche an einen Büchnertrichter angelegt wurde. Die Zellen wurden dabei von einem Polyamidnetz mit der Maschenweite von 60 µm zurückgehalten, vereinigt und direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nicht unmittelbar weiterverwendete Zellen wurden - in Kunststoffbeuteln verschweißt - bei – 24 °C gelagert.

1.3 Bakterienstämme

Bei allen verwendeten Bakterien handelt es sich um Sicherheitsstämme, die nach den Einstufungen der ZKBS zur Verwendung in gentechnischen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 zugelassen sind.

Die folgenden Sicherheitsstämme, die alle auf *Escherichia coli* zurückzuführen sind, wurden von mir verwendet:

- M15 [*pREP4*]: *E. coli* K12 (Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺)
- SOLR: e14⁻(McrA⁻) Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *sbC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' *proAB lacI^qZΔM15*] Su⁻*
- Top10F': F'*{lacI^q Tn10 (Tet^R)}**mcrA Δ(mrr - hsd RMS - mcr BC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nup*

-XL1-Blue MRF': $\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1$
supE 44thi-1 recA1 gyrA96 relAI lac
 [F' *proABlacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

Die Lagerung der Bakterien über längere Zeiträume erfolgte in glycerolhaltigem Medium (15 %ig) bei – 80 °C.

2 Kulturmedien

Die Medien wurden vor Gebrauch sterilisiert. Dies erfolgte mit gesättigtem Wasserdampf (2 bar, 121 °C) für 30 min. Hitzelabile Komponenten mußten separat mit Hilfe eines Sterilfilters mit der Porengröße 0.22 µm sterilfiltriert und dann dem erkalteten Nährmedium zugesetzt werden.

2.1 Medien für die Pflanzenzellkultur

LS-Medium:

Für das Anziehen von Pflanzenzellen wurde LS-Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) verwendet. Es wurden zusätzlich 2.4-Dichlorphenoxyessigsäure und 1-Naphthyl-essigsäure in einer Konzentration von 1×10^{-6} mol/l für die Herstellung des Mediums verwendet. Der pH-Wert von 6.0 wurde abschließend mit NaOH eingestellt.

2.2 Bakterienmedien

Medium	Bestandteile im Flüssigmedium	Zugabe für Kulturplatten	Zugabe für Top-Agarose	pH-Wert
LB	1.0 % Trypton 1.0 % NaCl 0.5 % Hefe-Extrakt	1.5 % Agar		7.0

NZY	1.0 % NZ Amin (Casein Hydrolysat) 0.5 % Hefe-Extrakt 0.5 % NaCl 0.2 % MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.5 % Agar	0.7 % Agarose	7.5
Super Broth	3.5 % Trypton 2.0 % Hefe-Extrakt 0.5 % NaCl			7.5
2 × YT	1.6 % Trypton 1.0 % Hefe-Extrakt 1.0 % NaCl			7.5

3 Pufferlösungen

Um langwierige Pufferherstellungen mit den entsprechenden Sterilisationsprozessen (Autoklavieren, Sterilfiltration) zu umgehen, wurden die Puffer meist in zehnfach höherer Konzentration angefertigt. Bei Bedarf wurden sie entsprechend verdünnt. Die Einstellung des pH-Wertes der Lösungen erfolgte dabei mit NaOH oder HCl.

KP₁-Puffer wurden durch Mischen von 1 M KH₂PO₄- und 1 M K₂HPO₄-Stamm-lösung hergestellt, wobei sich der pH-Wert durch das Mischungsverhältnis der beiden Lösungen ergab. Anschließend wurde auf die entsprechende Molarität verdünnt.

Citrat/Phosphat-Puffer wurden aus 0.5 M Citronensäurestammlösung (**A**) und 1M Na₂HPO₄-Stammlösung (**B**) nach folgendem Schema hergestellt:

pH-Wert	3.6	4.0	4.4	5.0	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	7.0	7.4	7.8
A [ml]	13.5	12.2	11.1	9.70	8.85	8.40	7.91	7.37	6.78	6.15	3.53	1.83	0.85
]	6	9	8										
B [ml]	6.44	7.71	8.82	10.3	11.1	11.6	12.0	12.6	13.2	13.8	16.4	18.1	19.1
]				0	5	0	9	3	2	5	7	7	5

Puffer	Bestandteile (1x)	pH-Wert
Church	0.5 M NaP _i 1 mM EDTA 7 % (m/V) SDS 1 % (m/V) BSA	7.2
MOPS	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA	7.0
PBS	50 mM KP _i 0.15 M NaCl	6.5
SCED	1 M Sorbitol 10 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA 10 mM DTT	7.5
SM	50 mM Tris-HCL 100 mM NaCl 0.2 % (m/V) MgSO ₄ 0.01 % (m/V) Gelatine	7.5
SSC	0.15 M NaCl 30 mM Natriumcitrat	7.0
SSPE	0.19 M NaCl 0.01M NaP _i 0.001 M EDTA	7.7
STE	10 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10 mM EDTA	8.0
TAE	40 mM Tris-Acetate 1 mM EDTA	8.0
TBS	0.05 M Tris-HCl 0.15 M NaCl	7.5
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	7.5
TLE	0.2 M Tris-HCl 0.1 M LiCl 5 mM EDTA	8.2

4 Fertigsäulen, Säulenmaterial

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	<p><u>Anionenaustauscher:</u> DEAE-Sepharose - Fast Flow XK 16/20, SOURCE 30Q XK 50/20, MonoQ HR 5/5</p> <p><u>Hydrophobe Interaktion:</u> SOURCE 15Phe XK 16/20, Phenyl-Sepharose Cl-4B XK 26/40</p> <p><u>Größenausschluß:</u> Sephacryl S100 HR HiPrep 16/60, Superdex 75 HR 10/30, G 25 C 26/40, HiTrap Desalting (1.6 × 2.5 cm)</p> <p><u>Affinitätschromatographie:</u> 2',5'-ADP-Sepharose 4B XK 16/20, HiTrap Blue HP (1.6 × 2.5 cm)</p> <p><u>Chromatofokussierung:</u> MonoP HR 5/20</p>
BioRad (München)	<p>Macro-Prep Ceramic Hydroxylapatite (Typ I) gepackt in einer XK 16/20 Säule von Pharmacia</p> <p><u>Anionenaustauscher:</u> DEAE-Sepharose fast-flow HR 30/15</p>
Quiagen (Hilden)	<p>Ni-NTA Agarose, Ni-NTA Superflow gepackt in einer HR 10/10 Säule von Pharmacia</p>

5 Vektoren

Vektor	Verwendung
<p><i>pGEM-T</i> sowie <i>pGEM-T easy</i> Vector System I (Promega, Mannheim)</p>	<p>Diese offenen Vektoren dienen zur Subklonierung der durch PCR erhaltenen DNA-Fragmente. <i>pGEM-T (easy)</i> war hierzu besonders gut geeignet, da er am 3'-Ende einen Thymidin-Überhang besitzt, an den sich die durch <i>Taq</i>-Polymerase erzeugten DNA-Sequenzen mit Adenin-Überhang direkt einligieren ließen. Zudem handelt es sich um high-copy-Plasmide, d.h. man hat innerhalb kürzester Zeit große Mengen für diverse Arbeitsschritte zur Verfügung. Vermitteln Ampicillin-Resistenz.</p>
<p><i>pSE 280</i> (Invitrogen, Karlsruhe)</p>	<p>Dieses <i>pKK233-2</i> Derivat wurde zur aktiven Expression von Enzymen in <i>E. coli</i> verwendet. Durch den starken <i>trp-lac</i>-Promotor, der durch IPTG induzierbar ist, können gezielt größere Mengen an Enzym verfügbar gemacht werden. Vermittelt Ampicillin-Resistenz.</p>
<p><i>pBluescript S/K(+/-)</i></p>	<p>Es handelt sich hierbei um ein 2958 bp großes Fragment, das sich vom <i>pUC19</i>-Vektor ableitet. Es entstand durch "<i>in-vivo</i>-Excision" aus dem λZAP-Phagen, der die cDNA-Bank bildet. Vermittelt Ampicillin-Resistenz.</p>
<p><i>pQE 60</i> und <i>pQE 70</i> (Qiagen, Hilden)</p>	<p><i>pQE 60</i> und <i>pQE 70</i> (ATG Vektoren) sind low-copy-Plasmide, die der Familie der pDS-Plasmide angehören. Sie ermöglichen die Expression von (His)₆-tag-Enzymen, die dann über Ni-NTA-Säulen gereinigt wurden. Vermitteln beide Ampicillin-Resistenz.</p>

6 Radioisotope

Zur Markierung von DNA-Sonden wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP mit einer spezifischen Aktivität von 3 000 Ci/mmol von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet.

7 „Kits“ für Antigen-Antikörper-Reaktionen und für die Molekularbiologie

Kit	Hersteller/Lieferant	Verwendung
Advantage, cDNA PCR Kit	BD CLONTECH (Heidelberg)	Vervielfältigung von cDNA-Fragmenten mittels PCR
DIG Glycan Detection Kit	Roche Bioproducts (Mannheim)	Nachweis glykosylierter Proteine
DNeasy Plant Maxi Kit	Qiagen (Hilden)	DNA-Isolierung aus Pflanzenzellen
GeneRacer (Version B)	Invitrogen BV (Groningen/NL)	Dient der Herstellung von Voll-längen-Klonen (3' bzw. 5' Ende)
NucleoSpin Extract	Macherey & Nagel (Düren)	Elution von DNA aus Agarose-Gelen
Oligotex mRNA	Qiagen (Hilden)	Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA-Präparationen
Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden)	Durch Reverse Transkriptase wurde mRNA in cDNA umgeschrieben
peQ GOLD RNAPure	peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	Isolierung von Gesamt-RNA aus der Pflanzenzelle
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen (Hilden), Macherey & Nagel (Düren)	Gewinnung hochreiner Plasmid-präparationen für Sequenzierung
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung radioaktiver Sonden, zur Minimierung unspezifischer Hintergrundstrahlung
Random Primer DNA Labeling Kit	Invitrogen (Karlsruhe)	Radioaktive Markierung von Sonden

8 Enzyme, Marker, Nukleotide

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	LMW Marker Kit (14 000 - 97 000 Da)
BD Clontech (Heidelberg)	Advantage DNA-Polymerase
Eurogentec (Seraing/Belgien)	Smart Ladder 200
Invitrogen (Karlsruhe)	Large Fragment of DNA-Polymerase I, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, <i>AMV</i> Reverse Transkriptase,
MWG (Ebersberg)	Modifizierte und unmodifizierte Oligonucleotide
New England BioLabs (Frankfurt, Main)	<i>M-MuLV</i> Reverse Transkriptase, Lambda Marker, RNA-Ladder, Restriktionsenzyme, <i>Vent</i> -Polymerase
Promega (Mannheim)	dNTP's, T_4 DNA-Ligase, <i>Taq</i> -DNA- Polymerase
Stratagene (Heidelberg)	<i>Pfu</i> -Turbo DNA-Polymerase
Sigma (Deisenhofen)	Lysozym, RNase A

9 Chemikalien & Zubehör

Hersteller/Lieferant	Produkte
Aldrich (Taufkirchen)	Deuterierte Lösungsmittel, trans-Zimtalkohol
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	CleanGel Fertiggele, Polybuffer 74, Nylonmembranen Hybond N ⁺
Amicon (Witten)	Microcon-, Centricon- und Centriprep-Konzentratoren (YM-10)
AppliChem (Darmstadt)	Antibiotika und Feinchemikalien v.a. für Molekular Biologie, sowie LowEEO Agarose, NADH, NADPH, FAD
Biozym (Hess. Oldendorf)	PCR-Gefäße, Reaktionsgefäße
Fresenius (Bad Homburg)	Ampuwa (Wasser für die Molekularbiologie)
Filtron (Karlstein)	Konzentratoren
Fischer Scientific (Schwerte)	Falkon-Röhrchen
ICN (Eschwege)	SDS
Intermedica (Klein-Winternheim)	Halbmikroküvetten
Life Technologies (Eggenstein)	Hefe-Extrakt, Pepton, Agar
Macherey-Nagel (Düren)	Blotting-Paper: MN 827B und MN 440B

Merck (Darmstadt)	Acetonitril und MeOH für die HPLC, Dichlormethan, Feinchemikalien, DC-Platten, Lagerboxen für Eppendorf-Caps, Greiner-Röhrchen
Nalgene (Hamburg)	Sterile Kultur- und Zentrifugenröhrchen
Otto Aldag (Hamburg)	NZ Amin
Roth (Karlsruhe)	Zimtaldehyd, Dihydrozimtaldehyd, Trypton
Sarstedt (Nümbrecht)	Pipettenspitzen
Satorius (Göttingen)	Nitrocellulose-Filter 0.45 µm
Schleicher & Schüll (Dassel)	Rundfilter Protran 0.45 µm
Serva (Heidelberg)	Nitrocellulosemembranen NC 0.45 µm Porendurchmesser, Servapor Dialysehschläuche mit 9, 16 und 29 mm Ø; Coomassie Brillant Blue G-250/R-250
Sigma (München)	Feinchemikalien
Prof. Dr. J. Stöckigt (Mainz)	Sämtliche verwendete Alkaloide, v. a.: Vomilenin, 2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenin, 2 β -(R)-17-O-Acetylnorajmalin u.v.m.

10 Geräte

Nutzung	Geräte, Ausstattung und Herkunft
Agarosegel-Dokumentation	<ul style="list-style-type: none"> - UV-Transilluminator / 302 nm (Bachofer, Reutlingen) - Polaroidkamera MP 4+, Modell 44-16 (KemaKeur, Niederlande); mit Polaroidfilm: Polapan 667 (Polaroid, Cambridge/USA)
Bakterienzellaufschluß	Sonotrode Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlin)
Computergestützte Dokumentation	Flachbettscanner Highscan, Highscreen
Elektrophorese und Protein-Blotting	<p>Horizontalelektrophoresekammern:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LKB 2117 Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkl. NovaBlot-Einsatz und Film-Remover für Westernblot, - BlueMarine 100 und 200 (Serva, Heidelberg) und - COMPHOR Midi Elektrophoresekammer; <p>Vertikalelektrophoresekammer: SE 600 Hoefer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg); Kühlung: Kryo-Thermostat 350 (Haake, Berlin); Netzgeräte: PowerPac 3000 (BioRad, München), E835 und E844 (Consort, Turnhout/Belgien)</p>
Entwicklung radioaktiver Filme	Entwicklermaschine RG II, FPM-3800 AD (FujiFilm, Düsseldorf) mit Film BioMax (Kodak, New York/USA)

Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6 (Fa. Christ, Osterode), mit Vakuumpumpe von AEG: Typ ADEB71N4R3
Geigerzähler	Kontaminationsmonitor LB 1210B (Berthold Technologies GmbH und Co. KG, Bad Wildbad)
HPLC-Untersuchungen	Merck-Hitachi-System (Darmstadt): <ul style="list-style-type: none">- Integrator D-2500- Autosampler AS-2500- UV/VIS-Detektor L-4250- Pumpe L-6500- Säule: LiChrospher 60 RP select B (5µm), 250mm- Vorsäule: Select B
Mixen	Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Kelheim)
MS	Massenspektrometer Modell MAT 44 S (Finnigan, Bremen)
NMR	ARX 400 sowie AVANCE 800 (Bruker, Rheinstetten)
OD-Bestimmung	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
pH-Einstellung	pH-Meter 537 und DIGI 500 (WTW, Weilheim), 761 Calmatic (Bacherhofer, Reutlingen)
Proteinreinigung	a.) Reinigung mit Peristaltikpumpen: <ul style="list-style-type: none">- IPC-Pumpe (ISMATEC, Basel/Schweiz)- UV/VIS-Detektor: 2158 UVICORD SD (LKB BROMMA, Schweden)- Fraktionenkollektor: 2070 ULTRORAC II (LKB BROMMA, Schweden)- Schreiber: REC 102 (Pharmacia LKB, Freiburg)

	<p>b.) Reinigung mit Äkta-Explorer: System von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bestehend aus:</p> <ul style="list-style-type: none">- 2 Pumpen P-900- Durchflußzellen mit 22 µl und 88 µl Volumen zur Messung von Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit- UV/VIS-Monitor UV-900- Betrieb der Anlage erfolgte im MaxiColdLab-Kühlschrank (LKB, Schweden) bei 4 °C- Steuerung, Kontrolle und Auswertung wurde mit einem Pentium 133-MHz PC Compac durchgeführt (Software: UNICORN Control System; Betriebssystem OS/2 Warp, IBM),- Drucker: HP Deskjet 690 C
Pflanzenzellaufschluß	Ultraturrax TP 18/10 (IKA, Stauffen), Universal- mühle M20 (IKA, Stauffen)
Reinstwasser	Seralpur PRO 90 CN (Seral, Ransbach- Baumbach)
Steriles Arbeiten	Laminar-Flow-Box (Fröbel Labortechnik, Lin- dau), NU 440 - 400E (Zapf, Sarstedt)
Temperieren	<ul style="list-style-type: none">- Pyrogene Thermocycler (thermo-DUX, Wertheim) sowie Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg)- Schüttelinkubatoren 1083 und 3032 (GFL, Burgwedel)- Thermomixer 5437 (Eppendorf, Ham- burg)

	<ul style="list-style-type: none">- Hybridisierungsöfen Compactline OV4 (Biometra, Göttingen)- Wasserbad F20 HC (Julabo, Seelbach)- Brutschrank (Mettler, Schwabach)- Thermoshake (Gerhardt, Bonn)
Ultraschallwasserbad	SONOREX RK 510 S (Bandelin, Berlin)
UV-Spektroskopie	Lamda 2-Spektrometer, (Perkin-Elmer, Überlingen)
UV-Crosslinking	UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, Heidelberg)
Zentrifugieren	<ul style="list-style-type: none">- Kühlzentrifuge J2-21, Rotoren JA 10, JA 18.1, JA 20 und JA 30.50 (Beckmann, München)- Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S und RC5B, Rotoren GS-3 und SS-34 (DuPont, Bad Homburg)- Kühlzentrifuge Z 320K (Hermle, Gosheim)- Kühlzentrifuge Universal 16/16 R sowie Rotanta/RP (Hettich, Tuttlingen)- Tischzentrifuge Biofuge 15, Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße (Heraeus/Sepatech, Osterode)

III Methoden

1 Reinigung und Analytik von Proteinen

Voranehend ist zu sagen, daß sämtliche Arbeiten bei 4 °C durchgeführt wurden und daß darauf geachtet wurde, die Arbeitsschritte zeitlich zu optimieren, um bestmögliche Ausbeuten an aktivem Enzym zu erhalten.

Für sämtliche Präparationen wurde Seralwasser (II.9) verwendet.

1.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Mengen schockgefrorenes Zellkulturgewebe (II.1.2) aufgeschlossen.

Dabei wurde das Gewicht an Zellmaterial immer mit dem gleichen Volumen an Aufschlußpuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 mit 20 mM MSH) versetzt und ca. 30 - 40 min in einer Wanne mit lauwarmem Wasser (~ 35 °C) unter mehrmaligem Umrühren aufgetaut. Danach wurde die eisfreie Zellsuspension 2.5 min lang mit dem Ultra Turrax homogenisiert und anschließend 30 min unter ständigem Rühren im Kühlraum belassen. Die darauffolgende Zentrifugation (10 000 x g, 4 °C, 30 min) diente der Abtrennung von Zellfragmenten. Der so erhaltene Proteinrohextrakt konnte einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung zugeführt werden, bei der erstmals unerwünschte lösliche Proteine abgetrennt wurden. Dazu wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 40 % in die Proteinlösung gegeben, unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst und dann für 30 min im Kühlraum ruhen gelassen. Die Trennung des Präzipitats erfolgte bei 10 000 x g (4 °C) 30 min lang. Jetzt wurde erneut Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 60 % der verbleibenden Enzymlösung zugefügt und gelöst. Nach einer Stunde konnte die gefällte Proteinfraction (40 – 60 %) durch Zentrifugation (10 000 x g, 30 min) von der überstehenden Lösung separiert werden. Danach wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge Puffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.8 mit 2.5 mM MSH) resuspendiert und zum Entsalzen über Nacht gegen 10 l Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 mit 2.5 mM MSH) dialy-

siert. Das Dialysat konnte am nächsten Morgen säulenchromatographisch weiter aufgereinigt werden.

1.2 Herstellung von Proteinrohextrakten mittels Bakterienzellaufschluß

Hierzu wurden 6 ml einer Über-Nacht-Kultur zu 100 ml entsprechendem Selektionsmedium (in einem Weithalskolben) pipettiert und bis zu einer OD_{600} von 0.5 bis 0.7 bei 37 °C kultiviert. Nun erfolgte die Induktion der Expression mit IPTG unterschiedlicher Konzentration (0.3 mM bis 1 mM Endkonzentration) und bei verschiedenen Temperaturen, um optimale „Proteinausbeuten“ für die einzelnen Klone zu ermitteln. Die Kultivierungsdauer wurde ebenfalls variiert.

Nach erfolgreichem Wachstum wurden die Zellen bei 5 000 x g (4 °C) 10 min lang abzentrifugiert, der Überstand autoklaviert und das Bakterienpellet mit einem Milliliter Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Der Lysepuffer bestand aus 50 mM KP_i -Puffer (pH 6.8) und 20 mM Mercaptoethanol, dem erst unmittelbar vor Verwendung Lysozym in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt wurde.

Die so erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden für 30 min auf Eis gelagert und dann mittels Ultraschall (3 x 10 s bei 70 %, d.h. 7 s Ultraschall und 3 s Pause, sowie 65 % der maximalen Geräteleistung) aufgeschlossen. Erneute Zentrifugation (12 000 x g, 30 min, 4 °C) diente zur Abtrennung von Zellwandfragmenten. Der daraus resultierende, klare Überstand konnte für Aktivitätstests herangezogen werden.

1.3 Konzentrierung von Enzymlösungen mit Einwegkonzentratoren

Neben der Fällungsreaktion mit Ammoniumsulfat gibt es auch andere Methoden zur Konzentrierung von Proteinlösungen. Dieser Schritt des Konzentrierens wurde zum Teil zwischen den einzelnen säulenchromatographischen Verfahren durchgeführt. Vor allem aber war er nicht zu umgehen, sobald das Volumen der aufzutragenden Lösung das maximal mögliche Ladevolumen der Säule überschritt.

Das Einengen der Enzymlösung erfolgte hierbei mittels Konzentratoren, die sich hinsichtlich der Porengröße ihrer Membranen als auch des Fassungsvermögens unterschieden. Für größere Mengen (bis zu 15 ml) wurden *Centriprep*-Konzentratoren verwendet, die in der Lage waren, das Enzymvolumen auf ca. 500 µl einzuengen. Zentrifugation erfolgte dabei im GSA-Rotor bei 3 000 x g zwei Stunden lang. Anschließend wurde der Durchfluß auf Proteinfreiheit geprüft.

Bis zu 2 ml Enzymlösung konnten mit *Centricon YM-10* Konzentratoren bei 5 000 x g und einer Zentrifugationszeit von 1.5 h auf ca. 25 µl eingengt werden, was einer 80-fachen Konzentration entspricht. Die oben erwähnte Testung auf Proteine im Filtrat entfiel, da nur Proteine mit einem Molekulargewicht über 10 kDa von der Membran zurückgehalten wurden.

Volumina bis 500 µl wurden in *Microcon-10* Konzentratoren eingengt, die eine Reduktion der Enzymlösung auf etwa 10 µl ermöglichten. Die Zentrifugation wurde im Festwinkelrotor bei 10 000 x g durchgeführt. Nach 30 - 40 min konnte das Konzentrat weiterbearbeitet werden. Da hier ebenfalls nur Proteine über 10 kDa von der Membran zurückgehalten wurden, entfiel der Test auf Proteinfreiheit des Filtrats.

Bei allen verwendeten Konzentratoren galt es zu beachten, daß das Eluieren der Proteine von der Membran bei sehr geringen Geschwindigkeiten (ca. 300 – 1 000 x g) durchgeführt wurde.

Die verwendeten Einwegkonzentratoren sind Produkte der Firma Amicon und wurden mehrfach benutzt. Dabei hat es sich bewährt, die gebrauchten Filtrationseinheiten mit Seralwasser zu spülen, auf Proteinfreiheit zu testen und in 0.01 %iger Natriumazid-Lösung zu lagern.

1.4 Entsalzen und Umpuffern von Enzymlösungen

Sehr oft war es notwendig, Puffer von Säule zu Säule hinsichtlich der Art oder der Konzentration des Salzes sowie des pH-Wertes zu ändern.

1.4.1 Dialyse

Wie schon angesprochen (III.1.1) wurde nach der Ammoniumsulfatfällung eine Dialyse über Nacht durchgeführt. Der Durchmesser des Dialyseschlauchs

richtete sich dabei nach der Menge der Enzymlösung und variierte von 16 mm bis 29 mm. Vor dem Befüllen wurde der Schlauch mit Reinstwasser befeuchtet und ausgespült. Die Entsalzung erfolgte gegen 10 l Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 mit 2.5 mM MSH).

1.4.2 Verwendung einer Entsalzungssäule

Ein schnelles und einfaches Verfahren zum Umpuffern bietet die Entsalzungssäule, die mit Sephadex G 25 (III.1.5.5.3) gepackt war. Dazu wurde die Säule mit dem Puffer, der den Startbedingungen der nächsten chromatographischen Trennung entsprach, etwa eine halbe Stunde lang äquilibriert.

1.5 Reinigung und Trennung von Enzymen durch Chromatographie

Die Proteinreinigung erfolgte meist mit herkömmlichen Methoden, d.h. die Enzymlösung wurde mit Peristaltikpumpen auf die Säule aufgetragen. Nachfolgend angeschlossen waren ein UV-Detektor, Schreiber und ein Fraktionenkollektor (II.9). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß mit einem recht niedrigen Systemdruck gearbeitet werden kann. Dadurch wird ein Zerbersten der Säulen unwahrscheinlicher. Wesentlich wichtiger ist jedoch, daß das Säulenmaterial nicht zu stark gepreßt wird und so die gute Trennleistung erhalten bleibt. Gerade bei der Größenausschlußchromatographie ist dies ein entscheidender Faktor.

Die zweite genutzte Trennmethode stellt die Arbeit mit dem Äkta-Explorer (II.9) dar. Im Gegensatz zu dem zuvor genannten System mit Peristaltikpumpen herrscht hier ein hoher Systemdruck, was den positiven Effekt geringerer Totvolumina erklärt.

Bei der Trennung wurden die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Enzyme wie Affinität, Molekülgröße und Ladung ausgenutzt. Die Wahl, Äkta-Explorer oder das herkömmliche System zu verwenden, richtete sich dabei nach verwendeter Säule, dem Säulenmaterial, maximaler Druckbelastung und damit auch nach der erwünschten Flußrate.

Ein weiterer entscheidender Faktor war die stete Regeneration der Säulen nach Herstellerangaben, die vor jeder erneuten Proteinreinigung durchgeführt wurde. Bei längerfristiger Lagerung wurden die Säulen mit 20 %igem EtOH äquilibriert.

1.5.1 Anionenaustauschchromatographie

Das Trennprinzip beruht auf Wechselwirkung von negativen Ladungen der Eiweiße mit positiv geladenen funktionellen Gruppen, die an der Gelmatrix der Säule fixiert sind. Die Stärke der Adhäsion und die Frage, ob die Proteine überhaupt an das Säulenmaterial binden, ist vom pH-Wert der Proteinlösung sowie von der Ionenstärke des Puffers abhängig.

1.5.1.1 SOURCE 30Q

Die Matrix dieses stark basischen Anionenaustauschermaterials wird aus miteinander verknüpften Polystyren- und Divinylbenzeneinheiten gebildet. Die daraus resultierenden Kügelchen besitzen einen Durchmesser von 30 μm . Als funktionelle Gruppen fungieren kovalent gebundene Ammoniumkationen. Aufgrund der Porosität des Polymers werden hohe Flußraten bei niedrigem Systemdruck ermöglicht. Dies ist ideal zum Auftragen großer Volumina an Enzymlösung auf die Säule innerhalb kurzer Zeit. Zusammen mit der hohen Proteinbindekapazität von SOURCE 30Q befürwortet dies den Einsatz zu Beginn der Reinigung. Grundsätzlich können alle Puffer im Bereich von pH 2 - 12 verwendet werden. Der Einsatz von Tris-HCl Puffer ist jedoch günstiger als Phosphat Puffer, da durch die einfach negativ geladenen Chloridanionen eine geringere Bindung an die Gelmatrix zu erwarten ist als durch zweifach negativ geladene Hydrogenphosphatanionen.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 12 cm, Volumen 235.5 ml

1.5.1.2 DEAE-Sepharose – Fast Flow

DEAE-Sepharose als Säulenmaterial ist im Gegensatz zu SOURCE 30Q und MonoQ - beide mit quartären Ammoniumgruppen versehen - ein schwach basischer Anionenaustauscher, dessen Affinitätswirkung durch die

DiEthylAminoEthylgruppen hervorgerufen wird. Diese sind hierbei mit Agaroseeinheiten (\varnothing 45 - 165 μm) als Matrix verknüpft. Die Proteinbindekapazität ist mit 100 mg Protein pro ml gequollenem Säulenmaterial recht hoch.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 20 cm, Volumen 40.2 ml

1.5.1.3 Mono Q

Normalerweise wird die MonoQ HR 5/5 Säule vom Hersteller fertig gepackt geliefert. Aber auch hier war ein erneutes Befüllen der Säule aufgrund der starken Verfärbungen des alten Materials erforderlich. Die Schwierigkeiten lagen darin, daß sich die extrem feinen, hydrophilen Harzpartikelchen von etwa 10 μm Durchmesser sehr schlecht von der Flüssigkeit trennen ließen und daß zum Packen der Säule ein sehr hoher Druck notwendig war. Die maximale Bindekapazität der Säule liegt bei 30 bis 50 mg Protein und ist damit nur zur Feinreinigung, gegen Ende der Isolierung, einsetzbar.

Wie auch bei SOURCE 30Q sind Tetraalkylammoniumgruppen für die Trennung verantwortlich und damit fällt Mono Q ebenfalls in die Gruppe der stark basischen Anionenaustauscher.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 5 cm, Volumen 1 ml

1.5.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Diese Separationsmethode ist auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und dem Enzym zurückzuführen. Da bei löslichen Enzymen ein stark ausgebildeter Hydratmantel vorliegt, der die Löslichkeit des Proteins erst ermöglicht, wird dem Protein durch Zugabe von Salzen, in meinem Fall Ammoniumsulfat, die Hydrathülle entzogen, um ausreichend hydrophobe Bereiche zu schaffen. Somit kann das Enzym an die entsprechende Matrix binden und anschließend mit einer abfallenden Konzentration an Ammoniumsulfat im Elutionspuffer wieder von der Säule gewaschen werden. Ionische Ladungen im Molekül können bei dieser Trennmethode vernachlässigt werden.

1.5.2.1 SOURCE 15Phe

Die Matrix, hier ebenfalls SOURCE, besteht aus kugelförmigen, porösen und monodispersen Teilchen von 15 µm Durchmesser, die aus Divinylbenzen und Polystyrol bestehen. Um hydrophobe Eigenschaften der Säule zu erreichen, sind Phenylreste an die Matrix gebunden. Die Porosität des Materials erlaubt höhere Flußraten bei einer Proteinbindekapazität von ca. 25 mg Protein pro ml gequollene Gelmatrix.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 10 cm, Volumen 20 ml

1.5.2.2 Phenyl-Sepharose CL- 4B

Die Phenylgruppen sind auch hier wieder kovalent an das Trägermaterial – Agarosekügelchen mit einem \varnothing von 45 – 165 µm – gebunden. Die Proteinbindekapazität liegt mit 15 - 20 mg/ml Gelbett geringfügig niedriger als bei SOURCE 15Phe.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 30 cm, Volumen 159.3 ml

1.5.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Verwendet wurde eine Macro-Prep Ceramic HA Säule (Typ I), die Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ als Füllmaterial besitzt. Dieses Material ist durch globuläre, grobporige Partikel mit einem \varnothing von 20 µm charakterisiert. Durch das hohe Bindungsvermögen für Proteine kann der Einsatz zu Beginn der Reinigung oder aber aufgrund der guten Trennleistung auch am Ende der Enzymisolierung erfolgen.

Bis jetzt ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Trennung auf Ionenaustauschchromatographie, HIC oder einer Mischung aus beidem zurückzuführen ist.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 13.5 cm, Volumen 27.1 ml

1.5.4 Affinitätschromatographie

Ziel der Affinitätschromatographie ist es, bestimmte Strukturen, die das Enzym möglichst spezifisch bindet, kovalent an eine Matrix zu heften und so das Enzym aus einer Proteinlösung selektiv abzutrennen.

1.5.4.1 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Das ADP als Strukturanalogon zu $\text{NADP}^+/\text{NADPH}_2$ ist kovalent mit Agaroseeinheiten verbunden, die in der Lage sind etwa 0.4 mg Protein/ml Säulenmaterial zu binden. Hierbei werden alle Enzyme erfasst, die Affinität zu ADP, NADP^+ und NADPH_2 aufweisen.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 7.2 cm, Volumen 14.5 ml

1.5.4.2 HiTrap Blue HP

Diese sehr stark vernetzte Agarose (6 %ig) ist mit dem Farbstoff Cibacron Blue F3G-A verknüpft. Das Material mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 34 μm ist aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ besonders gut für die Reinigung von $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -abhängigen Enzymen geeignet. Bei Säulen mit 5 ml Volumen sind höhere Flußraten (bis 20 ml/min) möglich.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 2.5 cm, Volumen 5 ml

1.5.4.3 Ni-NTA Agarose/Ni-NTA Superflow

Bei diesem Affinitätsmaterial liegen die Nickelionen über einen Chelatkomplex mit NTA (Nitrilo-Triacetic-Acid) an Agarose gebunden vor (CROWE et al., 1994; HOCHULI et al., 1987). Die Nickelionen - alternativ können nach RAMAGE et al. (2002) auch Kobalt- oder Zinkionen eingesetzt werden - besitzen eine hohe Affinität zur Aminosäure Histidin. Aufgrund dessen wird dieses Verfahren überwiegend zur Aufreinigung von Enzymen ausgenutzt, die über molekularbiologische Methoden mit einem Histidin-tag versehen worden sind.

Dieser Histidinrest umfaßt in der Regel 6 - 10 Histidine und kann wahlweise mit dem N- oder C-Terminus verknüpft sein.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 1.3 cm, Volumen 4 ml

1.5.5 Größenausschlußchromatographie

Grundlage dieser Chromatographie ist das unterschiedliche Diffusionsverhalten von den zu trennenden Teilchen in das mit Poren durchsetzte Säulenmaterial. Dies hängt unmittelbar mit der Größe der Teilchen zusammen. Dabei können z.B. kleinere Proteine aber auch andere niedermolekulare Stoffe wie Salze und Alkaloide nicht nur tiefer in die Poren eindringen, sondern auch wesentlich öfter in die Matrixpartikel diffundieren. Daraus resultiert letztlich eine längere Retentionszeit als bei größeren Proteinen, die unbeeinträchtigt an den Säulenpartikeln vorbeifließen. Die Trennung erfolgt also nach Molekülgröße. Besonders wichtig ist es, daß bei der Gelfiltration unter Luftausschluß gearbeitet wird, da sonst die Trennleistung stark abnimmt.

1.5.5.1 Sephacryl S-100 HR

Das sehr stabile Material wird durch Allyldextran und N,N'-Methylenbisacrylamid gebildet und zeichnet sich dadurch aus, daß nur minimal unspezifische Bindungen mit Proteinen ausgebildet werden. Diese unspezifischen Affinitäten können durch Wahl eines geeigneten Puffersystems (50 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.3) noch herabgesetzt werden. Der optimale Trennbereich liegt bei Sephacryl S-100 HR zwischen 1 000 und 50 000 Dalton.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 60 cm, Volumen 120.6 ml

1.5.5.2 Superdex 75

Die Grundstruktur des Säulenmaterials basiert auf vernetzten Agarose- und Dextraneinheiten mit 13 µm Durchmesser. Da nur ganz geringe Volumina aufgetragen werden können, geht eine Konzentrierung der Proteinlösung

(III.1.3) der eigentlichen Trennung voraus. Die Separation ist bis zu einem Molekulargewicht von 50 000 Dalton optimal.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 30 cm, Volumen 23.6 ml

1.5.5.3 Sephadex G 25

Dieses feinporöse Gel ermöglicht die Trennung von Teilchen zwischen 100 und 5 000 Dalton. Aufgrund dessen ist das Material geradezu prädestiniert, Salze oder andere niedermolekulare Stoffe (z.B. Alkaloide) von der Proteinlösung abzutrennen.

Zum Entsalzen kleinerer Volumina (bis 1.2 ml) wurde eine HiTrap Desalting Säule mit 5 ml Bettvolumen verwendet.

Größere Volumina, die entsalzt oder umgepuffert werden sollten, wurden auf eine Säule mit knapp 200 ml Bettvolumen gegeben.

1.5.6 Chromatofokussierung

Auch bei diesem Säulenmaterial handelt es sich um einen schwach basischen Anionenaustauscher, der in einer fertig gepackten MonoP HR 5/20 Säule zur Anwendung kam. Das Trennprinzip ist hierbei jedoch nicht der Anionenaustausch, sondern die Abnahme des pH-Wertes im Elutionspuffer durch verschiedene, unterschiedlich geladene, oligomere Ampholyte. Solange die Enzyme negativ geladen sind, können sie an das Säulenmaterial binden. Wird der pH-Wert in die Nähe des IEP'es verschoben, sind die Proteine nach außen hin ungeladen, werden nicht mehr vom Säulenmaterial fixiert und somit eluiert.

Da Proteine im Bereich des IEP'es recht instabil sind und oftmals Konformationsänderungen - einhergehend mit Aktivitätsverlust - auftreten, wurde in die Auffanggefäße ein Puffer mit optimalem pH für das jeweilige Enzym vorgelegt.

Zur Lagerung wurde die Säule zuerst mit 10 ml 0.1 M Natriumsulfat-Lösung, dann mit 10 ml Seral-Wasser und abschließend mit 20 %igem EtOH gespült.

Vor erneuter Inbetriebnahme mußte zuerst 1 ml 5 M NaOH aufgegeben und die Säule mit Startpuffer äquilibriert werden.

Säulenmaße (II.4), Gelbetthöhe 20 cm, Volumen 4 ml

1.6 Gelelektrophoretische Verfahren

1.6.1 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese dient zur Überprüfung von Reinheit und von Proteinkonzentrationen in bestimmten Enzymfraktionen während und am Ende der Proteinreinigung. Das Prinzip der Trennung von Proteinen unterschiedlicher Molekülgröße mittels SDS-PAGE (SHAPIRO et al., 1967) beruht dabei auf der proportionalen Anlagerung von SDS an die Eiweiße. SDS lagert sich als anionischer Emulgator mit dem hydrophoben Teil in die Aminosäurekette ein, wodurch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des Proteins aufgehoben werden. Gleichzeitig rufen die aus den Mizellen des Aminosäure-SDS-Komplexes herausragenden Carboxylfunktionen eine zur Molekülgröße proportionale negative Ladung hervor, aufgrund derer die gelelektrophoretische Trennung von der Kathode zur Anode erfolgen kann.

Durch Zugabe von MSH als reduzierende Schwefelverbindung werden noch bestehende Disulfidbrücken aufgebrochen, so daß Proteine, deren Untereinheiten über Disulfidbrücken zusammengehalten werden, in die einzelnen Fragmente zerfallen.

Diese Tatsache ist entscheidend bei der Bestimmung der relativen Molekülgröße aufgrund der Laufstrecke bzw. des R_f -Wertes (III.1.6.5). Besteht ein Protein aus mehreren Untereinheiten, so setzt sich das Molekulargewicht aus der Summe der Fragmente zusammen.

Das Anfertigen der Gele mit anschließender Elektrophorese erfolgte in einer Vertikalelektrophoreseapparatur (II.9). Dabei wurde zuerst das engmaschigere Trenngel zwischen die Glasplatten (26.5 × 14.5 cm mit 1.5 mm Abstandhalter) eingefüllt und auspolymerisiert, anschließend wurde das weitmaschige

Sammelgel präpariert. Für die Herstellung des diskontinuierlichen Trennsystems (LAEMMLI, 1970) wurden folgende Lösungen verwendet:

Acrylamid-Stammlösung:

29.2 % (m/V) Acrylamid
0.8 % (m/V) Bis-Acrylamid

Laufpuffer:

50 mM Tris
0.2 M Glycin
0.15 % (m/V) SDS

Trenngellösung für ein 11 %iges Gel:

11.0 ml Acrylamid-Stammlösung
7.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
11.2 ml Wasser
150 µl 20 %ige SDS-Lösung
20 µl TEMED
150 µl 10 %ige APS-Lösung

Sammelgellösung für ein 5 %iges Gel:

1.25 ml Acrylamid-Stammlösung
1.85 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
4.25 ml Wasser
37.5 µl 20 %ige SDS-Lösung
5 µl TEMED
100 µl 10 %ige APS-Lösung

Trenngellösung für ein 8 %iges Gel:

8.0 ml Acrylamid-Stammlösung
7.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
14.0 ml Wasser
150 µl 20 %ige SDS-Lösung
20 µl TEMED
300 µl 10 %ige APS-Lösung

2 fach Probenpuffer:

0.2 M Tris-HCl, pH 6.8
40 % (V/V) Glycerol
20 % (V/V) MSH
8 % (m/V) SDS
0.02 % (m/V) Bromphenolblau

Zuerst wurde die Trenngellösung (60 ml für zwei Gelplatten) hergestellt. Nach Zugabe der letzten Komponente, der APS-Lösung als Starter der radikalischen Polymerisation, mußte die Weiterverarbeitung sehr zügig erfolgen. Die Gellösung wurde dabei etwa 10 cm hoch zwischen die Glasplatten gegossen. Nun wurde mit Wasser überschichtet, um die Oberfläche des Gels zu glätten und die durch das SDS hervorgerufenen Luftblasen zu zerstören. Ebenfalls sollte die Polymerisation unter absolutem Ausschluß von Luftsauerstoff ablaufen. Sauerstoff als Biradikal seinerseits ist in der Lage die radikalische Polymerisation effektiv zu behindern oder zumindest zu verzögern, indem es Radikale aus der Gellösung abfängt.

Nach einer Polymerisationszeit von etwa 30 min wurde das Wasser entfernt, die Kämme für 15 Proben eingebracht und anschließend die Sammelgellösung (15 ml für zwei Gele) bis zur Oberkannte der Glasplatten eingefüllt. Nach weiteren 30 min konnten die Kämme entfernt und die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen hineinpipettiert werden. Zur Probenvorbereitung wurden 75 µl Proteinlösung mit 75 µl Probenpuffer und 10 µl Glycerol für 7 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 18 000 x g.

Die Platten mit Gel und Proben wurden in den Elektrophoresetank überführt, mit Laufpuffer vorsichtig überschichtet und anschließend im Kühlschrank über Nacht laufen gelassen. Als Laufbedingungen hat sich bei einem 11 %igen Gel eine Stromstärke von 20 mA für 12 Stunden bewährt. Der Lauf war beendet, als die Bromphenolblau-Front fast das Ende des Gels erreicht hatte.

1.6.2 Basische Nativ-Elektrophorese

Ziel dieser Art von Elektrophorese war es, die Proteine nach ihrer Molekülgröße und Eigenladung in dem diskontinuierlichen Elektrophoresesystem (ORNSTEIN, 1964) aufzutrennen und dabei die Enzymaktivität zu erhalten. Durch Abwesenheit von SDS kann dies auch in vielen Fällen erreicht werden. Weiterhin ist es wichtig, daß die Gele frei von Acrylamidmonomeren, APS und TEMED sind. Deshalb wurden vorgewaschene und getrocknete Polyacrylamid-Fertigelge (Cleangel, Pharmacia) verwendet, die auf einer Folie mit einer Stärke von 0.5 mm aufpolymerisiert waren. Die Gele mußten vor Gebrauch auf die entsprechende Größe zugeschnitten werden und danach ca. 1 Stunde in entsprechendem Puffer rehydratisiert werden. Die Größe richtete sich nach der Anzahl benötigter Probestaschen (max. 24 Stück). Die Probestaschen befanden sich in der Sammelgelzone mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5 Prozent und konnten ein Probenvolumen von 17 µl aufnehmen. Die Trenngelzone wies eine Konzentration von 10 % Acrylamid auf.

Rehydratisierungspuffer:

0.375 M Tris-HCl, pH 8.9

0.01% (m/V) Natriumazid

0.005 % (m/V) Bromphenolblau

Anodenpuffer :

0.175 M Tris-HCl, pH 8.9

0.01 % (m/V) Natriumazid

Kathodenpuffer :

0.567 M Glycin

0.01 % (m/V) Natriumazid

Nach der vollständigen Rehydratisierung des Gels wurde es luftblasenfrei auf die Kühlplatte (4 °C) der Horizontalelektrophorese-Apparatur (II.9) aufgebracht. Zwei Filterpapierstreifen wurden auf die Breite des Gels zugeschnitten und der eine mit Anoden- der andere mit Kathodenpuffer getränkt, etwas überlappend, auf das Gel gelegt.

Danach wurden die Proben, ohne sie wie bei der SDS-Gelelektrophorese beschrieben, zu erhitzen, mit jeweils 17 µl max. Ladevolumen in die Probenaschen pipettiert. Als Startbedingungen für ein Gel mit 12 Proben wurden für die ersten 10 min eine Stromstärke von 9 mA (300 V/5 W) gewählt, danach wurde die Stromstärke auf 25 mA (900 V/15 W) erhöht. Die Bromphenolblaufront hatte das Anodenende nach ca. 1.5 Stunden erreicht und damit war der Lauf beendet.

Zur Weiterbearbeitung wurde das Gel in drei Bereiche aufgeteilt. Eine Laufbahn wurde abgetrennt und mit Coomassie angefärbt, um zu sehen wo die Enzyme in dem Gel lokalisiert sind. Ein zweiter Bereich wurde in etwa 5 mm breite Streifen geschnitten und mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die zerkleinerten Gelbanden einem Aktivitätstest unterzogen. Der dritte Bereich wurde ebenfalls in 5 mm breite Stücke aufgeteilt, mit 50 µl 0.01 M Tris-HCl, pH 7.8 extrahiert und weiterführend mittels SDS-PAGE untersucht.

1.6.3 Kombinierte SDS-PAGE/BNE

Wie schon bei der BNE (III.1.6.2) angesprochen, wurden Gelstücke für die SDS-PAGE weiterverwendet. Isolierte Proteinbanden des Nativgels wurden dabei nochmals mit der SDS-PAGE aufgetrennt, um eine sichere Zuweisung zu einer Proteinbande der ursprünglichen Enzymlösung im denaturierenden Gel treffen zu können.

1.6.4 „Western-Blotting“

Bei diesem Elektrotransfer werden die nach SDS-PAGE (III.1.6.1) größenfraktionierten Proteinbanden aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran (II.9) mit 0.45 µm Porendurchmesser übertragen (TOWBIN et al., 1979).

Die Nitrocellulosemembran und die Filterpapiere (II.9) werden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Das Gel wird kurz mit Seral-Wasser abgewaschen und dann für 10 min mit Transferpuffer äquilibriert. Die Membran ihrerseits wird zuerst eine Minute in Methanol gewaschen und danach für 20 min in Transferpuffer äquilibriert.

Nun kann die Trans-Unit aufgebaut werden:

Ganz unten befindet sich die mit Seral-Wasser abgesättigte Anoden-Graphitplatte, darüber zwei luftblasenfreie Lagen in Transferpuffer getränktes Blotting-Paper M&N 440B, die äquilibrierte Membran und dann das SDS-Gel. Den Abschluß bildet wiederum Blotting-Paper von M&N (1 × 440 B und 1 × 827 B), auf das die mit Seral-Wasser gesättigte Kathoden-Graphitplatte aufgelegt wird. Der Elektrotransfer erfolgt nun mit einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² Gel über 1 h 15 min hinweg in einer Horizontalgelelektrophoresekammer (II.10).

Anschließend können die so an der Membran immobilisierten Enzyme einem Glycosylierungstest mit dem DIG Glycan Detection Kit (II.7) unterzogen werden.

Transferpuffer:

39 mM Glycin

48 mM Tris-HCL

0.0375 % (m/V) SDS

20 % (V/V) MeOH

80 % (V/V) Seral-H₂O

1.6.5 Färbemethoden

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine in den Gelen erfolgte die Detektion mittels Färbetechniken. Die Wahl der Färbemethode richtete sich nach der zu erwartenden Proteinmenge/Bande bzw. der Empfindlichkeit der Methode. Für den unteren Nanogrammbereich an Proteinen wurde Silberfärbung, für den mittleren Nanogrammbereich die Coomassie-Färbung verwendet.

1.6.5.1 Coomassie-Färbung

Wie schon oben erwähnt, wurde für die Detektion von Proteinmengen im Bereich von 0.1 - 0.3 µg/Bande die Coomassie-Färbung (MEYERS UND LAMBERTS, 1965) genutzt. Dabei wurden SDS- wie auch Nativgele ca. 35 min in die Färbelösung gelegt und mit 500 Upm in einer Wanne geschwenkt. Der Entfärbeprozess dauerte bis zu 8 Stunden an, wenn mit kalter Entfärbelösung gearbeitet wurde. Wurde der Wasseranteil der Entfärbelösung jedoch stark erhitzt (ca. 60 °C) konnte die Zeit der Entfärbung auf 4 - 5 Stunden reduziert werden. Beendet war die Entfärbung, wenn sich die stark gefärbten Proteinbanden von dem fast vollständig entfärbten Hintergrund deutlich abhoben. Anschließend wurden die Gele mit einer transparenten Stützschiicht versehen, in Klarsichtfolie eingeschweißt und bei 4 °C – 6 °C gelagert bzw. der Sequenzierung zugeführt.

Färbelösung:

0.25 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R-250
9 % (V/V) Essigsäure
45 % (V/V) Methanol
46 % (V/V) Wasser

Entfärbelösung:

10 % (V/V) Essigsäure
30 % (V/V) Ethanol
60 % (V/V) Wasser

1.6.5.2 Silberfärbung

Zur Erfassung von 1 – 30 ng Protein/Bande wurde eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN UND DERNICK (1985) durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten abgelöst und mit Seral-

Wasser (II.9) gewaschen. Danach erfolgte ein 2 × 30 min langes Schütteln mit 500 ml Fixierlösung, gefolgt von einem 60 minütigen Schwenken mit der Inkubationslösung, ebenfalls 500 ml. Hierauf wurden drei Waschschrirte mit Seral-Wasser für jeweils 10 min durchgeführt. Jetzt waren die Gele soweit präpariert, daß sie mit 300 ml Silberlösung inkubiert werden konnten (20 min). Nach kurzem, gründlichen Abspülen mit Seral-Wasser wurden die Gele in 300 ml Entwicklerlösung eingebracht und solange darin belassen, bis sich deutliche Proteinbanden hervorhoben ohne jedoch den Hintergrund anzufärben. Zu beachten war dabei, daß die Gele oftmals noch nachdunkelten. Die Färbereaktion konnte durch Zugabe einer Stopplösung beendet werden. Wie auch nach der Coomassie-Färbung wurden die Gele in transparente Folie eingeschweißt und im Kühlschrank gelagert.

Fixierlösung:

10 % (V/V) Essigsäure
30 % (V/V) Ethanol
60 % (V/V) Seral-H₂O

Inkubationslösung:

30 % (V/V) Ethanol
6.8 % (m/V) Natriumacetat
0.125 % (m/V) Glutardialdehyd
0.2 % (m/V) Natriumthiosulfat × 5 H₂O
70 % (V/V) Seral-H₂O

Silberlösung:

0.2 % (m/V) Silbernitrat
0.01% (m/V) Formaldehyd
100 % (V/V) Seral-H₂O

Entwicklerlösung:

2.5 % (m/V) Natriumcarbonat
0.02% (m/V) Formaldehyd
100 % (V/V) Seral-H₂O

Stopplösung:

10 % (V/V) Essigsäure
30 % (V/V) Methanol
60 % (V/V) Seral-H₂O

1.6.5.3 Ponceau S-Färbung

Die Ponceau S-Färbung nach SALINOVICH UND MONTELARO (1986) wurde eingesetzt, um eine einfache und schnelle Anfärbung der Proteine im Bereich

von 250 – 500 ng zu erzielen. Im Gegensatz zu Coomassie Blau oder der Silberfärbung kann der rötliche Farbstoff sehr leicht ausgewaschen werden und stört somit nachfolgende, spezifische Reaktionen – wie Antigen-Antikörper-Färbungen – nicht. Er ist somit ideal zur Überprüfung geeignet, ob sich nach einem Elektrotransfer die Proteine auch wirklich auf der Nitrocellulosemembran befinden oder nicht (III.1.6.6).

Die Färbung erfolgte dabei mit einer 0.2 %igen Ponceau S-Lösung (m/V) in 3 %iger Essigsäure (m/V).

1.6.6 Bestimmung der ungefähren Menge und Größe von Proteinen in Gelen

Bei jeder SDS-Gelelektrophorese wurde eine bestimmte Menge eines Markergemisches (LMW, Pharmacia) mit aufgetragen, dessen Komponenten hinsichtlich der Art (Bezeichnung, Organismus, Molekulargewicht) und Menge bekannt waren. Anhand der Intensität der Färbung von Proteinbanden in der Markerlaufbahn ließ sich annähernd die Proteinmenge der anderen Banden auf dem Gel abschätzen.

Um die Molekülgröße zu bestimmen, lässt man ein Standard-Markergemisch mitlaufen und ermittelt eine Kalibrierkurve für das Gel. Diese ergibt sich aus linearer Beziehung zwischen dem Logarithmus der rel. Molekülmasse und dem dazugehörigen R_f -Wert (Laufstrecke Protein - Laufstrecke Bromphenolblau) des Proteins. Als Standard-Marker wurde das LMW-Calibration-Kit (II.8) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

- Phosphorylase b (Hasenmuskel), MW 97 000, 67 μ g
- Albumin (Rinderblut), MW 66 000, 83 μ g
- Ovalbumin (Hühnerei), MW 45 000, 147 μ g
- Carboanhydrase (Rindererythrocyten), MW 30 000, 83 μ g
- Trypsininhibitor (Sojabohne), MW 20 100, 80 μ g
- α -Milcheiweiß (Rindermilch), MW 14 400, 116 μ g

Für einen Lauf wurden 8 μ l der Markerstammlösung mit 50 μ l Seral-H₂O sowie 50 μ l Probenpuffer (III.1.6.1) und 10 μ l Glycerol versetzt, bei 95 °C für 7 min inkubiert und dann 2 min lang bei 18 000 x g abzentrifugiert.

1.7 Gehaltsbestimmungen von Proteinlösungen

Die Quantifizierung von Proteinmengen in Enzympräparationen erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Die benötigte Eichkurve wurde mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 1 µg/ml – 100 µg/ml erstellt. Jeweils 10 µl der Standardproteinlösung wurden dazu mit 90 µl Seral-H₂O (II.9) versetzt, gut gemischt und mit 900 µl BRADFORD-Reagenz 5 mal umgeschwenkt. Danach erfolgte direkt die Messung (II.9). Als Nullabgleich dienten 100 µl Seral-H₂O mit 900 µl BRADFORD-Reagenz. Der Mittelwert von drei Messungen der verschiedenen Standardproteinlösungen ging in die Eichgerade ein.

Die Messung von Proteinlösungen unbekannter Konzentration erfolgte analog. Dabei wurde lediglich beachtet, daß die gemessene Lösung eine Konzentration zwischen 15 µg Eiweiß/ml und 35 µg Eiweiß/ml aufwies, sich also im linearen Bereich der Eichgerade befand. War dies nicht der Fall, mussten stärker konzentrierte Lösungen eingesetzt oder entsprechend verdünnt werden.

BRADFORD-Reagenz:

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 50 ml Ethanol (96 %ig) und 100 ml Phosphorsäure (85 %ig) gelöst, anschließend mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C bis 6 °C im Kühlschrank.

1.8 Bestimmung der Enzymaktivität

Der Test zur Messung der Enzymaktivität sollte verschiedene Merkmale aufweisen. Er hat reproduzierbar und schnell durchführbar zu sein. Ebenso soll er eine gute Trennleistung bezüglich des Ausgangsstoffs und des Endprodukts der enzymatischen Reaktion aufweisen. Alle Faktoren wurden in zwei Assays mit **einem** Reaktionsschritt und in einem weiteren, **gekoppelten** Assay, verwirklicht. Zuerst wurde eine bestimmte Enzymmenge, die sich nach der Art des Enzyms sowie dem Reinigungsgrad bzw. der Proteinkonzentration richtete, mit Cofaktoren, Puffer, Substrat und Seralwasser versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C und 500 Upm über einen bestimmten Zeitraum, der auch wieder von dem zu testenden Enzym abhing.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Methanol gestoppt, kurz gevortext und die präzipitierten Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 18 000 x g abgetrennt. Der klare Überstand wurde dann in der HPLC (III.2.2)

aufgetrennt und detektiert. Im folgenden sind die drei verwendeten Enzymassays beschrieben:

Assay für Vomilenin Reduktase (200 μ l Endvolumen):

Stammlösungen	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
20 mM NADPH ₂ (18.2 mg/ml H ₂ O)	20 μ l	2 mM
0.5 M KP _i , pH 7.0	20 μ l	50 mM
5.65 mM Vomilenin (2 mg/ml MeOH)	5 μ l	0.14 mM
Vomilenin Reduktase: Aktivität je nach Reinigungsstufe	155 μ l	

Assay für 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (50 μ l Endvolumen):

Stammlösungen	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
20 mM NADPH ₂ (18.2 mg/ml H ₂ O)	5 μ l	2 mM
0.5 M KP _i , pH 7.0	5 μ l	50 mM
4 mM 1.2-Dihydrovomilenin (1.4 mg/ml MeOH)	5 μ l	0.4 mM
1.2-Dihydrovomilenin Reduktase: Aktivität je nach Reinigungsstufe	15 - 25 μ l	
Seral-H ₂ O	ad 50.0 μ l	

Gekoppelter Assay mit Vomilenin Reduktase **und** 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (200 μ l Endvolumen):

Stammlösungen	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
20 mM NADPH ₂ (18.2 mg/ml H ₂ O)	20 μ l	2 mM
0.5 M KP _i , pH 7.0	20 μ l	50 mM
5.65 mM Vomilenin (2 mg/ml MeOH)	5 μ l	0.14 mM
Vomilenin Reduktase	140 μ l	13.8 nkat
1.2-Dihydrovomilenin Reduktase: Aktivität je nach Reinigungsstufe	15 μ l	

2 Chromatographische und spektroskopische Methoden

2.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung von Alkaloiden mittels DC wurde die Eigenschaft der Absorption der Indolalkaloide bei 254 nm ausgenutzt. Dabei wurden die DC-Fertigplatten vom Typ Kieselgel 60 F₂₅₄ mit einer Schichtdicke von 0.2 mm (Merck) auf die benötigte Größe zugeschnitten, mit dem Fön oder im Trockenschrank bei 120 °C für 5 min aktiviert, sodann die Alkaloidlösung bandenförmig aufgetragen und mit dem jeweiligen FM entwickelt. Die anschließende Detektion erfolgte zuerst unter UV₂₅₄, wobei Indolalkaloide Fluoreszenzlöschung zeigen. Dann wurde ein kleiner Teil der DC-Platte mit einer 5 %igen (m/V) AmmoniumCer(IV)sulfat-Lösung in 85 %iger Phosphorsäure besprüht und unter UV_{254/365} betrachtet. Folgende FM kamen zur Anwendung:

FM 1: Chloroform/Methanol/Ammoniak 25 %ig	(88/12/1.0)
FM 2: Chloroform/Methanol/Ammoniak 25 %ig	(80/20/0.4)
FM 3: Ethylacetat/Methanol/Wasser/Ammoniak 25 %ig	(70/20/10/0.2)
FM 4: Chloroform/Methanol/Diethylamin	(80/16/1.6)
FM 5: Chloroform/Cyclohexan/Diethylamin	(60/30/10)

2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Wie schon unter III.1.8 angesprochen, sollte ein schneller, effektiver Test zur Messung der Enzymaktivität aufgebaut werden. Als bewährtes Testsystem für qualitative- und quantitative Messungen des Substratumsatzes in der zu untersuchenden Enzymlösung, sowie für die Bestimmung der Reinheit isolierter Alkaloide, wurde die HPLC eingesetzt. Diese bietet den Vorteil, innerhalb kürzester Zeit ein großes Spektrum an Proben auf Enzymaktivität testen zu können und festzustellen, wie hoch die Aktivität in den einzelnen Fraktionen ist. Die Aktivität wurde dabei durch Absorption der Alkaloide bei UV₂₅₀ sowie UV₂₆₀ mit anschließender automatischer Integration der Peakflächen bestimmt. Für die Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten und die Pflege des Systems war es wichtig, filtrierte und entgaste Puffer zu verwenden, und die Säule (ca. 30 min)

vor der Testung zu äquilibrieren. Eventuelle Salzrückstände wurden durch einen abschließenden Waschschrift mit Acetonitril/Seral-H₂O (50/50) nach der Messung entfernt.

Nach erfolgter enzymatischer Umsetzung der Substrate Vomilenin und 1.2-Dihydrovomilenin wurde vorwiegend ein System zur Trennung und Quantifizierung von Vomilenin (R_t 3.4 min), 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin (R_t 4.6 min) und 17-O-Acetylnorajmalin (R_t 5.2 min) verwendet:

Programm 1:

Trennsäule: LiChrospher 60
 RP-Select B (250 × 4 mm)
 Vorsäule: RP-Select B (4 × 4 mm)
 Inj.-Volumen: 40 μ l (- 400 μ l)
 Fließmittel A: Acetonitril
 Fließmittel B: 25 mM K₂HPO₄ +
 0.45 % H₃PO₄ (85 %ig)
 Flußrate: 1.68 ml/min
 Detektion: 250 nm/260 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0.0	28	72
4.0	30	70
6.0	35	65
6.1	28	72
10.0	28	72

Weiterhin konnten - nach Verlängerung des letzten Schrittes auf 15 min - Zimt-aldehyd (R_t 9.2 min), Zimtalkohol (R_t 6.7 min), Dihydrozimtaldehyd (R_t 6.2 min) und Dihydrozimtalkohol (R_t 5.6 min) mit diesem System getrennt werden.

Die Trennung der Ajmalanalkaloide 17-O-Acetylnorajmalin (R_t 8.4 min), Norajmalin (R_t 6.3 min), 17-O-Acetyljmalin (R_t 9.4 min) und Ajmalin (R_t 7.5 min) gelang nach folgender Trennmethode:

Programm 2:

Trennsäule: LiChrospher 60
 RP-Select B (250 × 4 mm)
 Vorsäule: RP-Select B (4 × 4 mm)
 Inj.-Volumen: 40 μ l
 Fließmittel A: Acetonitril
 Fließmittel B: Seral-H₂O/pH 2.3 mit
 H₃PO₄ (85 %ig) eingestellt
 Flußrate: 1.5 ml/min
 Detektion: 250 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0.0	10	90
8.0	80	20
11.0	80	20
11.5	10	90
15.0	10	90

2.3 Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR-Messungen wie auch ¹³C-NMR-Messungen wurden an 400 MHz und 800 MHz Kernresonanzspektrometern durchgeführt.

Die zu untersuchenden Proben mit 200 – 500 µg zu analysierender Substanz wurden über DC aufgetrennt, der entsprechende Fleck von der DC-Platte abgekratzt und das Alkaloid aus dem Kieselgel eluiert (III.2.4). Das Eluat wurde unmittelbar in ein NMR-Röhrchen überführt und das Lösungsmittel durch Begasung mit N₂ entfernt. Daraufhin folgte eine zweitägige Gefriertrocknung (II.9). Die nun vollständig getrocknete Probe wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen, im Exsiccator gelagert und erst direkt vor der Messung mit 500 – 600 µl deuteriertem Chloroform oder deuteriertem Pyridin rückgelöst und der spektroskopischen Messung zugeführt.

2.4 Massenspektrometrie

Die Aufnahme von Massenspektren erfolgte mittels Elektronenstoß-Ionisation bei 70 eV. Dabei wurden die zuvor über DC aufgetrennten Stoffe, hauptsächlich Indolalkaloide, samt Kieselgel von der DC-Platte abgekratzt und in eine blaue Eppendorf-Spitze, die am verjüngten Teil mit Watte verschlossen war, überführt. Die Elution der Alkaloide erfolgte mit etwa 250 µl Dichlormethan/Methanol (7/3). Das Lösungsmittel wurde mit Inertgas (N₂) entfernt und die resultierenden Reinalkaloide in etwas Dichlormethan - der Konzentration entsprechend - aufgenommen. 5 µl der Lösung wurden in einen Aluminiumtiegel eingebracht, getrocknet und über Direkteinlaß zwischen 100 °C und 320 °C, bei einer Ionenquellentemperatur von 200 °C, verdampft.

2.5 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren von Vomilenin und 2β-(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin wurden unter Verwendung von Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 220 nm – 350 nm und Methanol als Lösungsmittel mit dem Lambda 2 Spektrometer (II.9) aufgezeichnet. Desweiteren wurden der NADPH- und NADH-Verbrauch enzymkatalysierter Reduktionen bei 340 nm mitverfolgt und Enzymkonzentrationen (III.1.7) anhand einer Standardkurve bei 595 nm ermittelt. Die OD₆₀₀ von Bakterienlösungen wurde mit dem Eppendorf Biophotometer (II.9) bestimmt.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Gewinnung von Nukleinsäuren

3.1.1 Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde bei der RNA-Präparation mit TLE-Puffer äquilibriertes Phenol und bei DNA-Präparationen mit TE-Puffer gesättigtes Phenol (pH > 7.8) verwendet.

Nachdem das gleiche Volumen äquilibriertes Phenol der Nukleinsäurelösung zugegeben und gemischt wurde, erfolgte das Abzentrifugieren (5 min, 18 000 × g) der denaturierten Proteine. Die wässrige Phase konnte jetzt mit dem gleichen Teil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) ausgezogen werden. Zum Abschluß wurde nochmals mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) nach derselben Methode extrahiert.

TE-/TLE-gesättigtes Phenol:

Farbloses, solubiliertes Phenol wurde mit 0.1 % Hydroxychinolin versetzt und zweimal mit einem VT 1 M Tris-HCl Puffer (pH 8.0) extrahiert. Das neutralisierte Phenol wurde dann mit einem VT TE- oder TLE-Puffer versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Ausgehend von 5 g schockgefrorenem *R. serpentina* Zellkulturgewebe (II.1.2) – zum Teil auch frischem Blattmaterial, ebenfalls kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren – wurde die RNA mit Lithiumchlorid nach der Vorschrift von AUSUBEL et al. (1994) gefällt. Endogene Ribonukleasen wurden dabei durch den SDS-Anteil im Aufschlußpuffer inhibiert. Neuere Methoden, wie auch in dem von mir genutzten peQ GOLD RNAPure Kit (II.7) verwenden meist Guanidiniumsalze (ULRICH et al., 1977), die noch stärkere RNase inaktivierende, zellaufbrechende und solubilisierende Eigenschaften haben.

Bei der Lithiumchlorid-Fällung wird das gefrorene Material in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zerstoßen, zuerst in 15 ml TLE-Puffer (mit 1 % SDS) suspendiert und dann mit 5 ml TLE-äquilibriertem Phenol

versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte durch 10 sekundenlanges Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax (II.10). Nach Zugabe von 5 ml Chloroform wurde die Suspension erneut homogenisiert und zur Verbesserung des Zellaufbruchs für 20 min auf 50 °C erhitzt. Ein Entfernen der Zelltrümmer erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 8 000 × g.

Die resultierende wässrige Lösung wurde solange mit je 5 ml TLE-gesättigtem Phenol und Chloroform extrahiert und abzentrifugiert, bis an der Grenzfläche kein Protein mehr präzipitierte. Als letzter Reinigungsschritt wurden 10 ml Chloroform zupipettiert und nochmals abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde bei 4 °C über Nacht mit 5 ml 8 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und somit die RNA ausgefällt.

Nach Zentrifugation (20 min, 15 000 × g, 4 °C) und anschließendem Waschen des Niederschlags mit 1 ml 2 M Lithiumchlorid-Lösung wurde erneut für 5 min bei 12 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das so gereinigte Pellet wurde in 600 µl sterilem Seral-Wasser aufgenommen, ein weiteres Mal mit 200 µl 8 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und die RNA bei 4 °C präzipitiert. Nach zwei Stunden wurde die RNA abzentrifugiert (20 min, 12 000 × g, 4 °C) und in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert.

Es folgten eine Ethanol-Fällung (III.3.2) sowie eine Reinheits- und Gehaltsbestimmung (III.3.4).

3.1.3 Isolierung von Poly(A)⁺-mRNA

Als Grundlage zur selektiven Aufreinigung von Poly (A)⁺-mRNA diene die Gesamt-RNA Isolierung (III.3.1.2). Die Durchführung erfolgte mit dem Oligotex mRNA Kit, das auf folgendem Prinzip beruht:

Intakte eukaryotische mRNA hebt sich durch seine posttranskriptionalen Veränderungen – 5' Cap-Struktur und den ca. 20 bis 250 bp langen Poly-(Adenosinnukleotid)-Schwanz am 3'-Ende – von rRNA, 5 S RNA, 5.8 S RNA und tRNA ab. Dieser Poly-(A)-Schwanz ermöglicht die selektive Isolierung von mRNA durch Affinitätschromatographie an Oligo-(dT)-Cellulose.

3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

3.1.4.1 Minipräparation („Quicktest“) von Plasmid-DNA

Diese Variante stellt eine relativ zügige und im Verhältnis zur hochreinen Plasmidisolierung (III.3.1.4.2) sehr kostengünstige Alternative dar, Plasmide aufzureinigen.

Für die Durchführung nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) wurden 4 ml antibiotikahaltige Bakterienkulturen der zu testenden Klonen angelegt und etwa 14 Stunden bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Bei low-copy Plasmiden wurde die Inkubationszeit bis zu 16 Stunden ausgedehnt.

2 ml der frischen Kulturen wurden für 5 min bei 11 000 × g abzentrifugiert, der Überstand autoklaviert und das Pellet mit 125 µl Resuspendierungspuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA/pH 8.0, 25 mM Tris-HCl/pH 8.0) geschüttelt bis keine Zellklumpen mehr zu erkennen waren. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension zur vollständigen Zellyse mit 270 µl SDS/NaOH (1 %/0.2 M) versetzt, 5 mal geschüttelt und erneut 5 min bei Raumtemperatur belassen. Die Fällung der Proteine erfolgte nach Zugabe von 200 µl kaltem 3 M Kaliumacetat-Puffer (pH 5.5) 5 min lang bei 4 °C. Dann konnten die präzipitierten Proteine zusammen mit den Zellfragmenten abzentrifugiert werden (14 000 × g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde nun abgezogen und in ein neues 1.5 ml Cap überführt, um mit 600 µl kaltem Isopropanol die Nucleinsäuren auszufällen und anschließend abzuzentrifugieren (14 000 × g, 20 min, 4 °C). Der Niederschlag wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen bevor er erneut für 10 min bei 4 °C und 14 000 × g zentrifugiert wurde. Es erfolgte Dekantierung des Ethanols, Reste wurden mit der Pipette abgezogen und das Pellet 5 min lang bei 45 °C getrocknet, um den Ethanol gänzlich zu entfernen. Zum Resuspendieren des Plasmid-Pellets (ca. 5 µg Plasmid-DNA) diente eine nach SAMBROOK et al. (2001) hergestellte RNase A Lösung¹.

¹ RNase A zu 10 mg/ml in 0.01 M Natriumacetat Puffer (pH 5.2) lösen, für 15 min auf 100 °C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen und dann 0.1 VT 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7.4) zugeben und mischen.

3.1.4.2 Minipräparation (hochrein) von Plasmid-DNA

Hierzu wurde eine 15 ml Über-Nacht-Kultur mit der Rotanta/RP-Kühlzentrifuge (II.10) bei $4\,000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde nach Herstellervorschrift mit dem M&N NucleoSpin Plasmid Kit (II.7) über entsprechende kleine Säulen aufgereinigt. Die Elution erfolgte jedoch entgegen des Protokolls mit 50 μ l Ampuwa anstatt mit Puffer.

Diese Art der Plasmidgewinnung kam nur zur Anwendung, wenn hochreine DNA für Sequenzierungsreaktionen benötigt wurde oder aber Vektorpräparationen anstanden. Die Sequenzierungen nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER et al., 1977) wurden von der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt.

3.1.5 Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenzellen

Als Extraktionsmaterial standen frische Blätter aus selbst kultivierten *R. serpentina* Pflanzen sowie aus Suspensionskulturen gewonnene Pflanzenzellen zur Verfügung. Es wurde jeweils 1 g Material in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Das dabei entstehende sehr feine Zellpulver wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit dem DNeasy Plant Maxi Kit (II.7) weiterbearbeitet. Die genomische DNA wurde mit insgesamt 1.2 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen und sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Zum Präzipitieren von Nukleinsäuren wurde das Medium mit 0.1 VT 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.0) leicht sauer eingestellt – Grundvoraussetzung dafür, daß Nukleinsäuren in die organische Phase übergehen - und anschließend die DNA bzw. RNA mit einem VT Isopropanol oder 2.5 VT Ethanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über eine Stunde hinweg gefällt.

Nach Zentrifugation ($14\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min) konnte das erhaltene Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet 5 min lang bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Thermomixer (II.10) getrocknet und in Ampuwa – alternativ in TE-Puffer – aufgenommen.

3.2.1 Aufreinigung und Fällung von RNA bei der RACE-cDNA-Herstellung

Die RNA-Ansätze mußten zwischen den einzelnen enzymatischen Umwandlungsreaktionen immer wieder aufgereinigt werden, um unerwünschte Folgereaktionen zu unterbinden. Die dadurch hervorgerufene Volumenvergrößerung des Ansatzes konnte sodann mit einer Fällungsreaktion rückgängig gemacht werden.

Die jeweils 10 µl großen Reaktionsansätze (III.3.5.3.2; III.3.5.5 und III.3.5.6) wurden mit 90 µl DEPC-Wasser und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, stark gevortext (30 sec.) und dann bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase (~ 100 µl) wurde abgezogen und mit 2 µl einer Muskel-Glykogen Lösung (10 mg/ml DEPC-H₂O) sowie 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) gemischt.

Das Ausfällen der RNA erfolgte durch Zusatz von 200 µl EtOH (95 %ig), unterstützt durch 10 minütiges Kaltstellen bei – 80 °C.

Nach 20 min Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette abgezogen, verworfen und das aus der Fällung resultierende Pellet mit 500 µl EtOH (75 %ig) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 2 min, max. Geschwindigkeit) wurde der EtOH gänzlich entfernt und das Pellet für wenige Minuten luftgetrocknet.

Nach der Ligationsreaktion (III.3.5.3.2) wurde das Pellet in 13 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Anschließend an die Dephosphorylierungsreaktion (III.3.5.5) erfolgte die Aufnahme des Pellets in 7 µl DEPC-H₂O. Das RNA-Pellet resultierend aus der 5' Cap Struktur Abspaltung (III.3.5.6) wurde in 6 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

3.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Für eine optimale Trennung von DNA-Stücken, welche die Grundlage für eine selektive Elution von Banden aus dem Gel darstellt, ist der Vernetzungsgrad des Agarose-Gels entscheidend. Als Anhaltspunkt gilt: Fragmente > 1 000 bp: 1 %iges Gel; Fragmente < 1 000 bp: 1.5 %iges Gel. Wenn eine gute Trennung in Einzelbanden vorlag, wurden die DNA-Stücke mit einem sterilen Skalpell so knapp wie möglich ausgeschnitten und mit dem dreifachen Gewicht an NT 1

Puffer versetzt. Weiterhin wurde so verfahren, wie es im Protokoll des M&N NucleoSpin Extract Kits (II.7) beschrieben steht.

Die Elution der DNA von der Säule erfolgte auch hier, entgegen der Vorschrift, mit 25 µl Ampuwa.

3.4 Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Fast immer wurde die Konzentration an PCR-Fragmenten direkt im Gel anhand eines Markergemisches - mit einer definierten Zusammensetzung hinsichtlich Größe und Konzentration der Einzelbanden - abgeschätzt.

Nach Gelextraktionen, DNA-Isolierungen, RNA-Isolierungen und Plasmidpräparationen wurde die Konzentration über UV-spektrophotometrische Bestimmung bei 260 nm am Eppendorf Biophotometer (II.10) ermittelt. Die Konzentrationsbestimmungen sind nur dann zuverlässig, wenn zuvor der pH-Wert der Lösung auf 7.5 eingestellt wird (WILLFINGER et al., 1997).

Dabei gilt folgendes: $OD_{260} = 1$ entspricht ca. 50 µg/ml DNA

$OD_{260} = 1$ entspricht ca. 40 µg/ml RNA

Zur Reinheitsprüfung wurde der Quotient zwischen A_{260}/A_{280} , der bei 1.8 liegen sollte, herangezogen.

3.5 Enzymkatalysierte Modifikationen von Nukleinsäuren

3.5.1 Reverse Transkription

3.5.1.1 cDNA-Synthese mit *M-MuLV* Reverse Transkriptase

Bei der copy-DNA-Synthese handelt es sich um ein gezieltes Umschreiben der RNA in DNA durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen.

Dabei wurde zum einen Gesamt-RNA (III.3.1.2), zum anderen auch Poly(A)⁺-mRNA (III.3.1.3) für die reverse Transkription nach folgendem Ansatz eingesetzt:

4 µl	RNA (2.5 µg/µl)
2 µl	dNTP's (5 mM/dNTP)
2 µl	10 × Puffer für <i>M-MuLV</i> RT
1 µl	Oligo d(T)-Primer / alternativ entsprechender revers Primer (10 pmol/µl)
10 µl	Ampuwa

Dieser 19 µl umfassende Ansatz wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Danach wurde das Cap 10 min lang auf 37 °C abgekühlt, bevor 1 µl *M-MuLV* RT, entsprechend 200 U, hinzupipettiert wurde. Die anschließende Inkubation über eine Stunde erfolgte bei 37 °C auf dem Wasserbad.

Um unerwünschte Folgereaktionen - vor allem bei nachgeschalteter PCR - zu unterbinden, wurde die Reverse Transkriptase durch ein abschließendes, fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert.

3.5.1.2 RACE-cDNA-Synthese

Das Ausgangsmaterial lieferte eine Gesamt-RNA-Präparation (III.3.1.2), die durch verschiedene Enzyme verändert wurde (III.3.5.3.2; III.3.5.5 und III.3.5.6). Dies führte dazu, daß aus diesem RNA-Mix selektiv eine vollkommen intakte mRNA, d.h. mit 5'- und 3'-Ende des Gens, durch die nachfolgend beschriebene RT-Reaktion in RACE-cDNA umgeschrieben wurde. Dieser Punkt ist der enorme Vorteil gegenüber dem radioaktiven Durchsuchen einer cDNA-Bank

nach positiven Klonen, das zwar auch erfolgreich verlaufen kann, jedoch keine Vollständigkeit bezüglich der 5'- und 3'-Enden garantiert.

13 µl modifizierte RNA aus III.3.5.3.2 wurden mit 1 µl GeneRacer Oligo dT Primer² (24.1 µM) versetzt. Um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden:

- 1 µl dNTP's (25 mM/dNTP)
- 2 µl 10 × Puffer *AMV*-RT
- 1 µl *AMV*-RT (5 U/µl) und
- 2 µl RNase Inhibitor (10 U/µl)

zu einem Endvolumen von 20 µl dazugegeben. Das Umschreiben der RNA in cDNA durch die *Avian Myeloblastosis Virus* Reverse Transkriptase erfolgte eine Stunde lang bei 42 °C auf dem Wasserbad. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 95 °C (5 min) inaktiviert und die Reaktion abgestoppt.

Die so erhaltene RACE-cDNA konnte für selektive Amplifikationen von 5'- und 3'-Enden mittels PCR herangezogen werden.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von KARY B. MULLIS (SAIKI et al., 1988) entwickelte Methode stellt eine einfache Möglichkeit dar, DNA exponentiell zu amplifizieren oder aber über eine RT-PCR cDNA zu generieren.

Als Template - das heißt als die zu amplifizierenden DNA- oder RNA-Stücke - wurden von mir DNA, cDNA und Plasmid-DNA eingesetzt. Die Konzentration des Templates sowie die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die verwendeten Temperaturprogramme wurden speziell auf die einzelne Reaktion abgestimmt. Die genauen Angaben sind daher bei den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

Der genutzte Real-Time-Thermocycler (II.10) mit beheizbarem Deckel ermöglichte eine exakte Einhaltung der Zeit-Temperatur-Zyklen und machte ein Überschichten der PCR-Ansätze mit Mineralöl ab einem Volumen von 25 µl überflüssig.

² Dieser Oligo dT Primer besteht aus einem Oligo dT Teil (18 bp) und einem 36 bp langem Bereich, der für den späteren GeneRacer 3'-Primer codiert.

3.5.2.1 Hotstart PCR

Da trotz intensiver Wasserstoffbrückenbindungen ein geringer Teil der DNA einzelsträngig vorliegt, können sich bei der PCR nach Mischen des Ansatzes Primer an die Einzelstränge anlagern. Bei Raumtemperatur erfolgt die Anlagerung sehr unspezifisch. Somit würden in der Zeit, bis der Thermocycler 94 °C erreicht hat, sehr viele unerwünschte Fragmente amplifiziert werden. Um dies zu verhindern, wird der Reaktionsansatz bei der Hotstart-Variante ohne Polymerase für 5 min auf 94 °C erhitzt. Danach erst wird die Polymerase zugegeben.

In allen von mir durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen handelt es sich um Hotstart PCR's.

3.5.2.2 Touch-Down PCR

Bei dieser Art der PCR wird mit einer sehr hohen Annealing-Temperatur begonnen. Diese liegt 5 °C bis 10 °C über dem Schmelzpunkt der Primer und wird schrittweise bis knapp unter die Schmelztemperatur abgesenkt. Diese extrem stringenten Bedingungen ermöglichen eine hochspezifische Vervielfältigung der DNA mit maximaler Ausbeute.

Diese Methode kann nur bei Verwendung von genspezifischen Primern eingesetzt werden und wurde von mir bei allen entsprechenden Reaktionen angewandt.

3.5.2.3 Nested PCR

Hierfür wurden zusätzlich zu einem Primerpaar zwei weitere Primer entwickelt, deren Binderegion innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz des ersten Primerpaares lag. Somit konnte überprüft werden, ob es sich bei dem erhaltenen DNA-Fragment um das richtige handelt.

Die Nested PCR wurde in dieser Arbeit nur bei zuvoriger Verwendung degenerierter Primer, die sich von Aminosäuresequenzen ableiteten, verwendet.

3.5.3 Ligation

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde die aus dem T4 Bakteriophagen stammende T4 DNA Ligase verwendet. Die T4 RNA Ligase kam zur Anheftung von 20 – 30 bp langen Oligonukleotiden an das 5'-Ende der RNA zum Einsatz.

3.5.3.1 Ligation von DNA

Ansatz zur Ligation überhängender DNA-Enden für 16 h bei 16 °C:

- 1 - 7 µl zu ligierende DNA (0.01 - 0.1 µg)
- 1 µl Vektor (25 – 50 ng/µl)
- 1µl 10 × Puffer für T4 DNA Ligase
- 1µl T4 DNA Ligase (3 WeissUnits/µl)

Alternativ wurden Ligationen mit 5 µl 2 × Puffer T4 DNA Ligase bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt. Dementsprechend konnten maximal 3 µl einzuligierende DNA dem Ansatz zugefügt werden. Die Ligationsdauer wurde dabei auf 4 Stunden reduziert.

Ansatz zur Ligation stumpfer Enden bei 14 °C über 24 h:

- 1 - 7 µl zu ligierende DNA (0.1 – 1.0 µg)
- 1 µl Vektor (25 – 250 ng/µl)
- 1µl 10 × Puffer für T4 DNA Ligase
- 1µl T4 DNA Ligase (3 WeissUnits/µl)

3.5.3.2 Ligation von Oligonukleotiden an RNA

Das Anligieren von Oligonukleotiden an die RNA erfolgte im Anschluß an das in III.3.5.5 beschriebene Dephosphorylieren und dem Abspalten der 5' Cap Struktur (III.3.5.6). Dabei wurden zu 6 µl RNA 250 ng lyophilisiertes Oligonukleotid zupipettiert, gemischt und 2 min lang auf 70 °C erhitzt.

Nach dem Abkühlen auf Eis wurden:

- 1 µl 10 × Puffer für T4 RNA Ligase
- 1 µl ATP (10 mM)
- 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl) und
- 1 µl T4 RNA Ligase (5 U/µl)

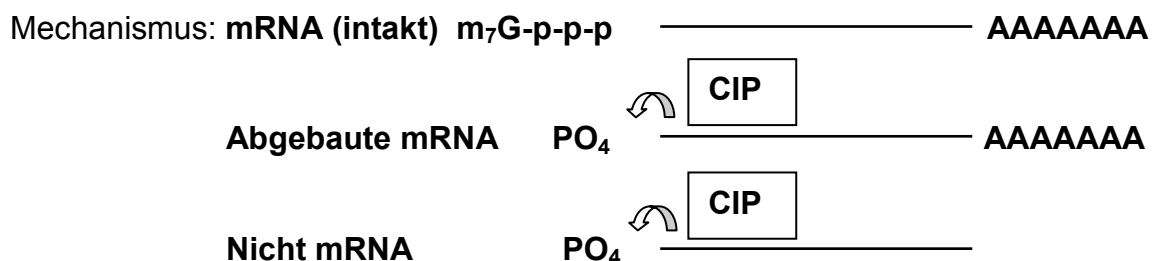
zugegeben und die Reaktion für eine Stunde bei 37 °C auf dem Wasserbad belassen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung und Fällung der modifizierten RNA nach III.3.2.1.

3.5.4 Restriktion/Fragmentierung von DNA

Das Schneiden von DNA erfolgte in der Regel in 10 – 20 µl umfassenden Ansätzen. Dabei wurden die Nukleinsäuren mit einem Enzym oder einem Enzymgemisch verdaut. Eingesetzt wurde ein auf die Reaktion optimal abgestimmter 10 × Puffer, zum Teil in Kombination mit BSA, um eventuelle *Staraktivitäten* zu unterdrücken. Um 1 µg DNA zu verdauen, wurden dem Ansatz 1 – 3 U von jedem Enzym zugegeben und anschließend eine Stunde lang bei dem angegebenen Temperaturoptimum auf dem Wasserbad inkubiert.

3.5.5 Dephosphorylierung von RNA 5'-Enden durch CIP

Eingesetzt wurden 5 µg RNA (entsprechend 2.5 µl), die durch die Calf Intestinal Phosphatase dephosphoryliert werden sollten.



Die intakte mRNA bleibt dabei unverändert, da das 5'-Ende durch eine Cap Struktur geschützt ist (ALBERTS et al., 1986 und PERRY, 1981). Bei nicht intakter mRNA, bei der die Cap Struktur fehlt, sowie bei allen anderen RNA's (diese sind

nativ ohne Cap Struktur und ohne Poly-(A)-Schwanz) wird am 5'-Ende durch die CIP der Phosphatrest abgespalten.

Dazu wurde der nachstehende Reaktionsansatz (10 µl) kurz gemischt und dann zentrifugiert, bevor er eine Stunde bei 50 °C inkubiert wurde.

2.5 µl RNA (5 µg)
 1 µl 10 × Puffer CIP
 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl)
 1 µl CIP (10 U/µl)
 4.5 µl DEPC-Wasser

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugiert, auf Eis gekühlt und einer Aufreinigung mit anschließender Fällung analog III.3.2.1 unterzogen. Die so erhaltenen 7 µl dephosphorylierte RNA wurden der TAP zur Abspaltung der 5' Cap-Struktur (III.3.5.6) zugeführt.

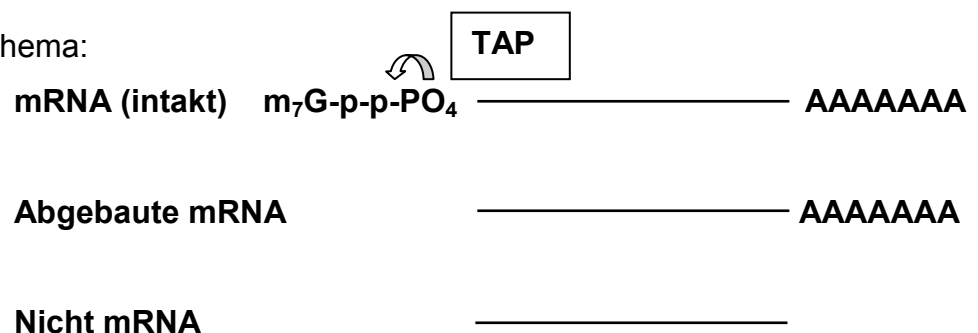
3.5.6 Abspalten der 5' Cap-Struktur durch TAP

Auf Eis wurde die nachstehende Abspaltungsreaktion angesetzt:

7 µl dephosphorylierte RNA (III.3.5.5)
 1 µl 10 × Puffer TAP
 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl)
 1 µl TAP (0.5 U/µl)

Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde kurz zentrifugiert und eine Aufreinigung mit nachgeschalteter Fällung, wie in III.3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Das dabei entstehende RNA-Pellet wurde in 6 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Reaktionsschema:



3.5.7 Radioaktive Markierung von DNA

3.5.7.1 Markierung mittels „Oligolabeling“

Das von FEINBERG UND VOGELSTEIN (1983) entwickelte Verfahren zur Gewinnung von DNA-Fragmenten mit hoher spezifischer Aktivität beruht auf dem Einsatz kurzer Oligonukleotide mit sechs bp Länge. Diese sehr unspezifischen Sequenzen binden ca. alle 100 bp an die Matrize und dienen als Startpunkt für die nachfolgende DNA-Neusynthese durch das Klenow-Fragment (KLENOW UND HENNINGSEN, 1970).

Die zu markierende DNA (~ 25 ng) wurde zuerst für 5 min auf 95 °C in einem Schraubdeckel-Gefäß erhitzt und direkt in einen Eisblock überführt. Der größte Teil der DNA bleibt dadurch einzelsträngig. Nun wird die DNA mit

2 µl dGTP
2 µl dTTP
2 µl dCTP
15 µl Random Primer Puffer
5 µl [α ³²P]-dATP (50 µCi)
1 µl Klenow Fragment und
Ampuwa ad 50.0 µl versetzt.

Die DNA-Synthese erfolgte bis zur Zugabe von 5 µl Stoppuffer – 1 h 10 min lang – bei 25 °C.

Bis auf das radioaktive dATP (II.6) sind alle Komponenten dem Random Primer Labeling Kit (II.7) entnommen.

3.5.7.2 Aufreinigen radioaktiver Sonden

Direkt nach dem „Oligolabeling“ (III.3.5.7.1) wurden die generierten, radioaktiven Sonden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (II.7) aufgereinigt, um den unspezifischen Hintergrund an Radioaktivität, ausgelöst durch kurzkettige Nukleotide, zu minimieren. Die Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Es resultierten 50 µl hoch aufgereinigter, radioaktiver DNA.

3.6 Screenen einer *Rauvolfia* cDNA-Bank

Die bereits im Arbeitskreis durch Dr. H. Warzecha etablierte *Rauvolfia serpentina* cDNA-Bank wurde mit dem ZAP-cDNA Synthesis Kit von Stratagene (Heidelberg) hergestellt.

3.6.1 Ausplattieren der cDNA-Bank

Zur Amplifizierung der in Phagen verpackten cDNA-Bank wurden neu kultivierte XL1-Blue MRF' Bakterien (BULLOCK et al., 1987) benötigt. Als Ausgangsmaterial dienten XL1-Blue MRF'-Dauerkulturen (Lagerung bei – 80 °C), die auf LB-Tetracyclin Platten (12.5 µg Tetracyclin/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C angezogen wurden. Eine davon isolierte Kolonie konnte dann in 35 ml LB-Medium (II.2) - mit 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O und 0.2 % (m/V) Maltose – bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.7 kultiviert werden. Die Zellen wurden 10 min lang bei 1 000 × g abzentrifugiert und zur Lagerung bei 4 °C in 5 ml 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion mit den Phagen erfolgte die Resuspendierung zu einer OD₆₀₀ von 0.5 in 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O. In der Zwischenzeit wurden 4 NZY-Platten (II.2) á 142 mm Durchmesser im Brutschrank vorgewärmt und eine Verdünnungsreihe der in SM-Puffer gelagerten cDNA-Bank angesetzt. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit SM-Puffer im folgenden Verhältnis: 1:100, 1:40, 1:20 und 1:13. Jeweils 1 µl dieser Phagenbank-Verdünnung wurde mit 600 µl XL1-Blue MRF'-Zellen (OD₆₀₀ = 0.5) in einem 15 ml Falkon Röhrchen vermischt und 15 min lang bei 37 °C und 50 Upm inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 7 ml 50 °C heißer NZY-TopAgarose (II.2). Es wurde intensiv gevortext und dann direkt ausplattiert. Nach etwa einer halben Stunde war die Masse abgekühlt und erhärtet, so daß die Platten zur Inkubation über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank überführt werden konnten.

3.6.2 "Colony-Blotting" auf geladene Nylonmembranen

Der Transfer von Kolonien auf eine Membran erfolgte sowohl von der Kulturplatte der 1:13 Verdünnung als auch von der 20 fach verdünnten, ausplattierten Phagenbank (III.3.6.1.). Nur bei diesen Platten waren mehr als

30 000 pfu zu erkennen. Dazu wurden aus einer Hybond N⁺-Membranrolle zwei runde Membranen (Durchmesser < 142 mm) ausgeschnitten und durch markante Einschnitte am Rand besonders gekennzeichnet.

Um zu verhindern, daß die leicht erwärmte TopAgarose an den Membranen haften bleibt, mußten die bei 37 °C inkubierten Kulturplatten zuerst für etwa 2 h im Kühlschrank aufbewahrt werden. Dann wurden die passend zugeschnittenen Membranen mit Hilfe von Pinzetten auf die zu blottenden Kolonien luftblasenfrei aufgelegt und dort für 2 min belassen. Während dieser Zeit wurde auf der Plattenrückseite der Umriß der Membran, einschließlich aller Markierungen, exakt nachgezeichnet.

Danach wurde die Membran mit einer Pinzette abgezogen und für 2 min fixiert, 5 min neutralisiert und zum Abschluß 30 s lang gewaschen. Die einzelnen Schritte erfolgten in jeweils 250 ml der entsprechenden Lösung.

Fixierlösung	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH		2 min
Neutralisationslösung	1.5 M NaCl 0.5 M Tris-HCl	pH = 8.0	5 min
Waschlösung	0.2 M Tris-HCl 2 × SSC	pH = 7.0	30 s

Die gewaschenen Membranen wurden mit der Phagenseite nach oben auf 3 MM Whatman Papier luftgetrocknet (~ 30 min) und anschließend nochmals 2 h bei 80 °C im Trockenschrank belassen. Um sicher zu gehen, daß die Verknüpfung der DNA mit der Membran dem anschließenden, stark mechanisch belastenden Vorgang stand hält, wurden die Membranen zwei Mal 30 s lang einem UV-Crosslinking unterzogen (UV Stratalinker (II.10), 120 000 µJ/sec).

Die so vorbereiteten Membranen wurden kurz mit 6 × SSC-Puffer befeuchtet und dann mit der Phagenseite nach innen auf eine sterilisierte Glaspipette aufgewickelt. Nach Befüllen der Hybridisierungsröhre mit 50 – 100 µl Church-Puffer/cm² Filterfläche (CHURCH UND GILBERT, 1984) wurden die Membranen in der Röhre wieder von der Glaspipette abgerollt, so daß die Phagenseite in das Röhreninnere zeigte. Die sich nun über zwei Stunden erstreckende Prähybridisierung wurde bei 62 °C und 20 Upm im Biometra Hybridisierungssofen (II.10) durchgeführt.

In der Zwischenzeit wurde die radioaktive Sonde analog III.3.5.7.1 hergestellt und anschließend nach III.3.5.7.2 aufgereinigt. Die daraus erhaltenen 50 µl an aufgereinigter, [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP-markierter Sonde wurden zur Denaturierung erneut für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Sonde in die Mitte der Röhre, in den zwischenzeitlich erneuerten Church-Puffer (mit 50 µl Puffer/cm² Filterfläche), einpipettiert und über Nacht bei 62 °C und 20 Upm hybridisiert.

Bevor nun die Membranen in die Autoradiographiekassette eingebracht werden konnten, mußten sie zuerst mit 50 ml kaltem, 0.1 % (m/V) SDS enthaltendem 2 × SSC-Puffer geschwenkt werden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung 4 × 15 min lang mit je 15 ml 0.1 % (m/V) SDS enthaltendem 0.5 × SSC-Puffer bei 56 °C, 58 °C, 60 °C und 62 °C. Abschließend wurde noch einmal mit 15 ml 0.1 % (m/V) SDS enthaltendem 0.1 × SSC-Puffer bei 62 °C gewaschen. Die Membranen wurden nun luftblasenfrei auf mit Frischhaltefolie bezogenes 3 MM Whatman Papier aufgelegt (mit Phagenseite vom Whatman Papier weg) und nochmals - ohne Luftblasen zu erzeugen - mit Frischhaltefolie umwickelt.

Unter Rotlicht wurde zuerst die Membran in eine Autoradiographiekassette überführt. Sodann wurde ein Kodak-Film BioMax-MS aufgelegt und die Neo-Lab Universal Verstärkerfolie, mit der glatten Seite dem Film zugewandt, eingebracht. Aufgrund des Einsatzes einer Verstärkerfolie (SWANSTROM UND SHANK, 1978) konnte die Entwicklung bei – 80 °C je nach Strahlungsintensität auf 24 h bis 3 Tage beschränkt werden.

3.6.3 Selektion und Isolierung positiver Klone

Die Ränder der Membranen wurden auf den entwickelten Filmen nachgezeichnet und anhand der charakteristischen „Zählung“ paßgenau auf die Rückseite der Kulturplatten angelegt. Dadurch war es möglich, die Färbung auf dem Film bestimmten „Plaques“ auf der Platte zuzuordnen. Diese wurden dann mit blauen Cut Tips ausgestochen und mit 1 ml SM-Puffer/20 µl Chloroform gut geschüttelt. Die neuen Phagenstocklösungen wurden zur Durchführung eines zweiten Screenings analog III.3.6.1 anstelle der dort eingesetzten cDNA-Bank verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.6.4 Konstruktion eines *pBlueskript* Phagemids durch „*in-vivo-Excision*“ aus dem Uni-ZAP XR Vektor

Das *pBlueskript* Phagemid ist ein Konstrukt, das durch Proteine des f1 Bakteriophagen aus dem Uni-ZAP XR Vektor entstanden ist. Ermöglicht wird die Bildung des Phagemids durch das getrennte Einfügen eines Replikationsstartpunktes (f1 origin) und einer Stopsequenz für den f1 Bakteriophagen in den Lambda Vektor (DOTTO et al., 1984). Nach gleichzeitigem Infizieren von *E. coli* Stämmen mit dem Lambda Vektor und dem f1 Bakteriophagen ist dieser in der Lage, mit Hilfe seiner Polymerase die DNA zwischen dem f1 origin und der Stopsequenz zu amplifizieren. Ein zweites Enzym des f1 Bakteriophagen sorgt für die erneute Rezirkulation.

Das Phagemid enthält dabei ein Insert, in diesem Fall die gewünschte cDNA, eine Ampicillinresistenz sowie ein ColE1 origin und den f1 (+/-) Replikationsursprung. Somit ist gewährleistet, daß dieses *pBlueskript* SK (+/-) Phagemid mit 2958 bp nach Aufnahme in *E. coli* Stämme auch amplifiziert wird. Für die *in-vivo-Excision* wurden frische XL1-Blue MRF' Zellen und SOLR Zellen in LB-Medium bei 30 °C und mit 200 Upm herangezogen. Zusätzlich benötigen die XL1-Blue MRF' Zellen einen Zusatz von 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0.2 % (m/V) Maltose. Die über Nacht kultivierten Bakterien wurden abzentrifugiert (1 000 × g, 10 min) und mit 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zu einer $\text{OD}_{600} = 1$ resuspendiert.

In einem 15 ml Falcon Röhrchen wurden 200 µl der resuspendierten XL1-Blue MRF' Zellen mit 250 µl der nach dem zweiten Screening erhaltenen Phagenstocklösung und 1 µl ExAssist Helfer Phage (f1 Bakteriophage mit mehr als 1×10^6 pfu/µl) versetzt und für 15 min bei 37 °C und 50 Upm inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium erfolgte erneute Inkubation (37 °C, 200 Upm, 3 - 4 Stunden). Um das reine Phagemid zu erhalten, wurden die XL1-Blue MRF' Zellen für 20 min auf 65 – 70 °C erhitzt und anschließend für 15 min bei 1 000 × g abzentrifugiert.

Der das Phagemid enthaltende Überstand wurde abgezogen und in ein neues Falconröhrchen überführt. Von jeder der auf diese Weise erhaltenen Phagemidlösung wurden zwei Ansätze zur Weiterbearbeitung präpariert. Jeweils 10 µl und 100 µl der Phagemidlösungen wurden mit 200 µl SOLR Zellen

der $OD_{600} = 1$ versetzt und 15 min lang bei 37 °C inkubiert (120 Upm). Jeweils 200 µl der angesetzten Inkubationen wurden auf vorgewärmte, Ampicillin-haltige LB-Platten (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank angezogen.

3.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren

3.7.1 Analytische und präparative Agarosegele

Zur Auftrennung und weiteren Bearbeitung von DNA wurden abhängig von der erwarteten Größe der Nukleinsäuren 0.7 – 1.5 %ige Agarosegele angefertigt. Die Agarose wurde mit 1 × TAE-Puffer kurz aufgeköcht und auf ca. 55 °C abgekühlt. Nach Zusatz von ~ 4 µl einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung zu 100 ml Gellösung, wurde diese in die Elektrophoresewanne gegossen und aushärten gelassen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE, als 10 × Probenpuffer eine Mischung aus 0.25 % Bromphenolblau und 30 % Glycerol in Wasser. Die Auftrennung erfolgte bei ~ 1 V/cm² so lange, bis die Bromphenolblau-Front etwa 2/3 der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Das Sichtbarmachen der Banden erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm, bei gleichzeitiger Aufnahme mit der Polaroidkamera MP 4+ auf einen Polapan 667 Film (Il.10).

3.7.2 Denaturierende Agarosegele

Die Trennung und Untersuchung von RNA anhand von Formaldehyd-Gelen mußte unter absolutem Ausschluß von RNasen stattfinden. Dementsprechend wurden alle Geräte, die mit den Proben in Berührung kamen, zuerst mit SDS-Lösung, dann mit 3 %iger H₂O₂-Lösung und abschließend mit Methanol ausgewaschen. Die Trocknung erfolgte an der Luft. Alle Puffer wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 % Agarose in 0.1 VT 10 × MOPS-Puffer und 0.75 VT Wasser aufgeköcht, nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit 0.15 VT Formaldehyd (37 %ig) versetzt und in eine Gelwanne gegossen. RNA wurde vor

dem Auftragen mit Probenpuffer³ versetzt und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Als Laufpuffer diente 1 × MOPS-Puffer.

3.8 Präparation kompetenter Bakterien

Kompetente Zellen, die zur Transformation mit Plasmiden dienten, wurden als Stock hergestellt und aliquotiert bei – 80 °C gelagert (HANAHAH, 1985).

Die Herstellung erfolgte, indem eine einzelne Bakterienkolonie von der Kulturplatte isoliert wurde und anschließend in 100 ml entsprechendem LB-Medium (evtl. mit Antibiotikazusatz) bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0.6 angezogen wurde. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Aufteilung in zwei Falconröhrchen mit anschließender Zentrifugation (1 000 × g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abgezogen und das resultierende Pellet vorsichtig mit je 15 ml Tfb I - Puffer resuspendiert. Nach 90 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut bei 1 000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in je 2 ml eiskaltem Tfb II - Puffer aufgenommen. Das extrem vorsichtige Resuspendieren im eiskalten Wasserbad sollte dabei 30 min nicht überschreiten. Zum Abschluß wurden die Zellen mit Cut-Tips zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Tfb I: 100 mM RbCl	Tfb II: 75 mM CaCl ₂
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM KOAc	10 mM MOPS
10 mM CaCl ₂	15 % (V/V) Glycerol
15 % (V/V) Glycerol	auf pH 6.8 mit KOH
auf pH 5.8 mit HOAc eingestellt	eingestellt

3.9 Transformation kompetenter Zellen

Für Transformationen wurden entweder Verdünnungen der jeweiligen Plasmidlösung (1 ng – 100 ng) eingesetzt oder der komplette Ligationsansatz (10 µl) verwendet. Dazu wurden die kompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und jeweils 50 µl mit Cut-Tips auf die vorgekühlte, zu

³ 60.0 µl Formamid, 20.0 µl 10 × MOPS-Puffer, 32.5 µl Formaldehyd (37 %ig), 12.5 µl Wasser, 12.5 µl Ethidiumbromidlösung (1 %ig), 10.0 µl Glycerol und 10.0 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

transformierende Lösung pipettiert. Nach halbstündiger Inkubation auf Eis wurden die Gefäße für 90 s auf 37 °C erwärmt (Wasserbad) und wiederum für 2 min auf Eis belassen.

Zum Anwachsen der Zellen wurden pro Ansatz 450 µl LB-Medium (Luria-Bertani) ohne Antibiotikazusatz hinzugegeben und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde nun auf vorgewärmte LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

4 Enzymatische Produktion von 2β-(R)-1.2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin

Zur 2β-(R)-1.2-Dihydrovomilenin-Synthese wurde ein Ansatz mit 310 µl Vomilenin Reduktase-Lösung (IV.2.2.2), 10 µl Vomilenin (14.13 mM), 40 µl 0.5 M KP_i -Puffer (pH 7.0) und 40 µl $NADPH_2$ (20 mM) pipettiert. Insgesamt wurden 120 dieser Assays in 2 ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet und für 4 h bei 30 °C und 550 Upm inkubiert. Danach wurden jeweils 2 Ansätze vereint und mit NH_3 (konz.) auf pH 9.0 eingestellt. Somit konnten die im Alkalischen lipophilen Alkaloide mit 800 µl Ethylacetat ausgezogen werden. Dazu wurde pro Reaktionsgefäß etwa 30 s lang gemischt und hernach für 5 min bei 14 000 × g zentrifugiert. Die obere, organische Phase war von der unteren, wässrigen Phase durch eine denaturierte Proteinschicht getrennt und konnte problemlos abgezogen werden. Die Extraktion mit Ethylacetat wurde erneut unter denselben Bedingungen wiederholt und die erhaltenen, organischen Phasen vereint. Nach Abrotieren des Lösungsmittels, blieb ein gelber, öliger Film zurück, der in $CHCl_3/MeOH$ (8:2) aufgenommen und dünnschichtchromatographisch (FM 1) aufgetrennt wurde.

5 Genutzte Internetseiten für Datenbankrecherchen

Zur Analyse und Bearbeitung von Protein- und Nukleinsäuresequenzen wurden die folgenden Server, Datenbanken und Programme im *World Wide Web* genutzt:

- **ExPasy** (Expert Protein Analysis System), Bioinformatikinstitut in Genf
 - **ExPasy-ENZYME**: zur Enzymklassifizierung nach BAIROCH (2000); www.expasy.org/enzyme/
 - **ExPasy-Translate tool**: zur Umschreibung von DNA in den Aminosäure-Code; us.expasy.org/tools/dna.html
 - **ExPasy-PROSITE**: um Voraussagen von Proteinfamilienzugehörigkeit und Domänen geben zu können (FALQUET et al., 2002; BUCHER und BAIROCH, 1994); www.expasy.org/prosite/
 - **ExPasy SWISS-PROT**-Datenbank: als Proteindatenbank für Sequenzvergleiche und Berechnung von Proteineigenschaften (MW, IEP) nach BOECKMANN et al., 2003; www.ebi.ac.uk/swissprot

- **ClustalW**: Paarweiser Sequenzvergleich mehrerer DNA- oder Aminosäurestücke nach THOMPSON et al. (1994); www.ebi.ac.uk/clustalw/

- **SignalP**: Lokalisation von Signalsequenzen in Peptiden (NIELSEN et al., 1999); www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

- **NCBI**: Auffinden homologer Sequenzen in der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (ALTSCHUL et al., 1990); www.ncbi.nlm.nih.gov/

- **FASTA**: für DNA- und Proteinsequenz Homologie-Suchen (PEARSON und LIPMAN, 1988); www.ebi.ac.uk/fasta33/

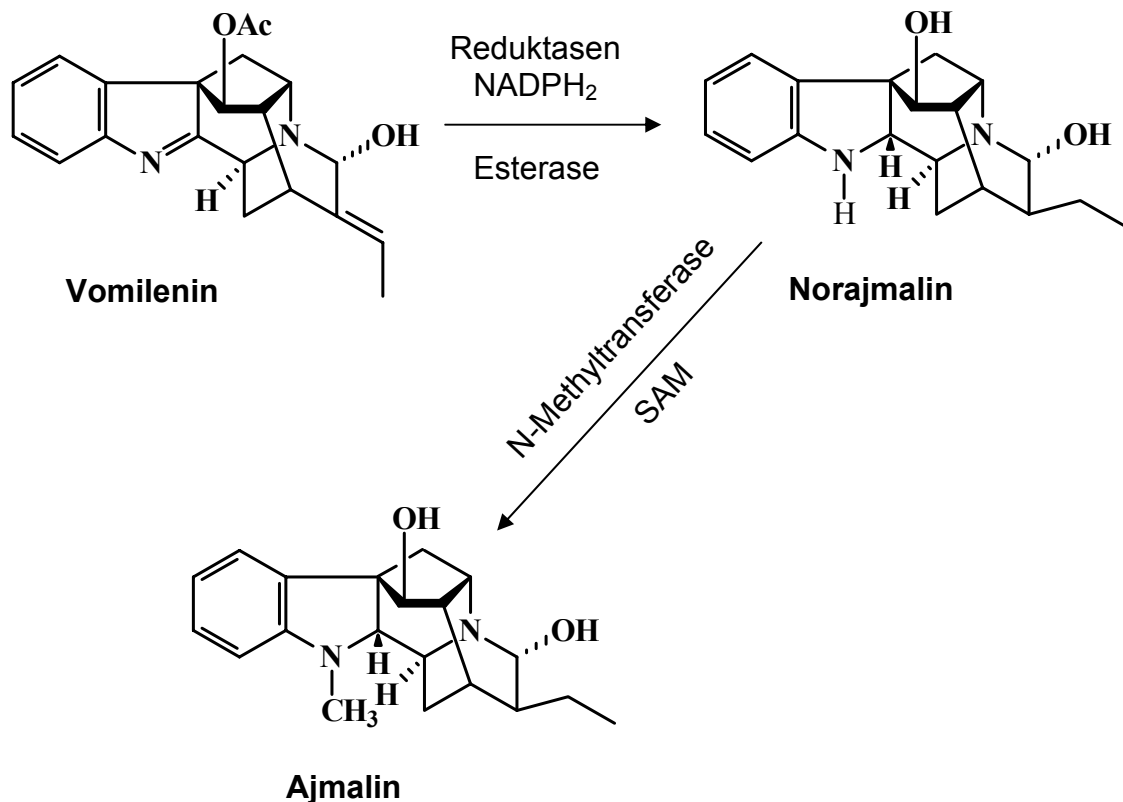
IV Ergebnisse

1 Forschungsstand zu Beginn der Dissertation

Die Reduktion des Vomilenins im Verlauf der Ajmalinbiosynthese wurde erstmals von STÖCKIGT et al. (1983) erwähnt. Bei Versuchen, das Vomilenin in Gegenwart von NADPH_2 und Enzymrohextrakten umzusetzen, akkumulierte Norajmalin. Bei einem Gegenversuch ohne NADPH_2 fand keinerlei Reaktion statt, so daß daraus gefolgert wurde, daß NADPH -abhängige Reduktase(n) sowie eine Esterase an den Schritten beteiligt sind. Über die Reihenfolge und die Anzahl der involvierten Enzyme konnte jedoch keine Aussage getroffen werden.

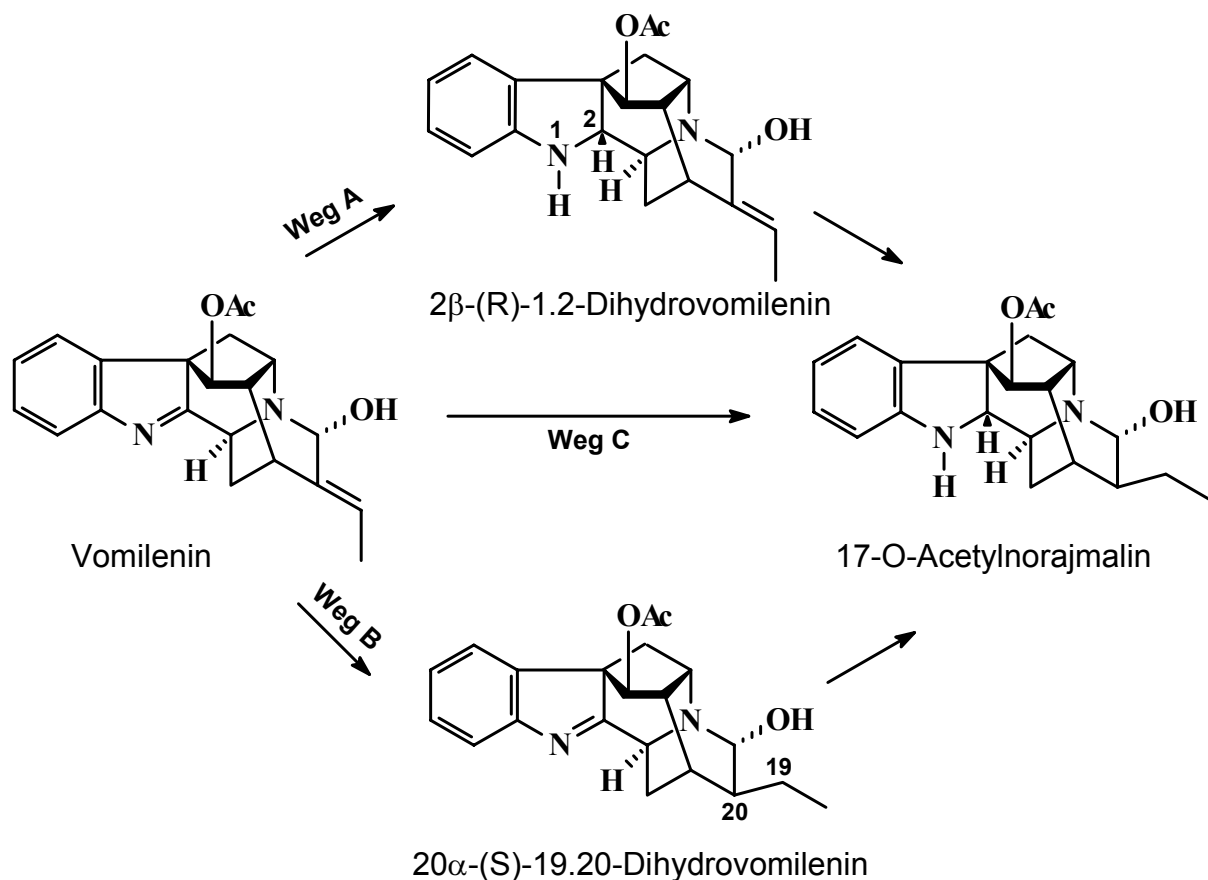
In der Folgezeit befaßte sich POLZ (Dissertation, 1989) auf der Grundlage des von PFITZNER (Dissertation, 1984) beschriebenen Schemas sehr eingehend mit der Reduktion des Vomilenins.

Abb.5 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes über das Zwischenprodukt Norajmalin zum Ajmalin nach STÖCKIGT et al. (1983).



Polz versuchte zuerst die Abtrennung der Esteraseaktivitäten in einem zellfreien Ansatz zu erzielen und somit das Vomilenin zu 17-O-Acetylnorajmalin umzusetzen. Er erhielt Enzymfraktionen, in deren Umsatz ausschließlich das acetylierte Zwischenprodukt nachzuweisen war. Zur Identifizierung des 17-O-Acetylnorajmalins dienten DC-Untersuchungen, UV-Spektroskopie, MS und H^1 -NMR-Untersuchungen. Darauf aufbauend sollte die nähere Charakterisierung der Reduktionen nach dem folgenden Schema angegangen werden.

Abb.6 Mögliche Wege der Reduktion des Vomilenins zu 17-O-Acetylnorajmalin nach POLZ (Dissertation, 1989).



Deshalb galt es nun die essentielle Frage zu klären, ob lediglich *ein* Enzym (Weg C) oder aber *mehrere* Enzyme (Wege A + B) an den Reduktionen beteiligt sind. Weiterhin sollte geklärt werden, ob zuerst die Indolenin-Doppelbindung und dann die Seitenkette aufhydriert wird (Weg A) bzw. die umgekehrte Reihenfolge die tatsächlichen Reduktionsschritte darstellen (Weg B).

Neben der geringen Expression der involvierten Reduktase(n) in den Pflanzenzellkulturen stellte die – zumindest in vitro – hohe Instabilität der

Reduktase(n) einen erschwerenden Faktor für die Proteinreinigung dar. Dennoch konnte POLZ in Experimenten, die zwei bis maximal drei Reinigungsschritte umfaßten, die Existenz von 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin über DC und MS nachweisen, wobei die Alkaloidausbeute an 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin sehr gering ausfiel. Daraufhin konnte man zwar die Reduktion der Indolenin-Doppelbindung als ersten Schritt oder als bevorzugte Reaktion ansehen, da aber die Separation zweier Reduktasen nicht erreicht werden konnte, war eine abschließende Aussage über den Mechanismus und die beteiligten Enzyme nicht möglich.

2 Proteinreinigung

2.1 Aufbau eines Enzymtests mit anschließender Detektion des Umsatzes

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von Enzymrohextrakten ein Assay aufgebaut, um schnell qualitative und quantitative Aussagen über die Aktivität der zu testenden Enzymlösung treffen zu können. Die optimierten Inkubationsbedingungen sowie die Zusammensetzung der Assays für die Vomilenin Reduktase wie auch für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase sind unter III.1.8 beschrieben. Bei der anschließenden Trennung der anfallenden Alkaloide wurde auf das bewährte System der HPLC zurückgegriffen. Als geeignetes Trennsystem, das Vomilenin, 2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenin, 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin zu trennen vermag (Chromatogramme siehe VII.1.2), wurde nachfolgender Zeit-Gradientverlauf verwendet:

A: Acetonitril

B: 25mM K₂HPO₄ mit
85 %iger H₃PO₄ auf
pH 2.3 eingestellt

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0.0	28	72
4.0	30	70
6.0	35	65
6.1	28	72
10.0	28	72

2.2 Reinigung der Vomilenin Reduktase

2.2.1 Isolierung löslicher Proteine aus Pflanzensuspensionskulturen

Die Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus *R. serpentina* Zellsuspensionskulturen erfolgte nach der unter III.1.1 beschriebenen Methode. Dabei kamen "frische" Zellen, eingefrorenes Zellgewebe sowie lyophilisierte Zellen zum Einsatz. Während die gemessenen Enzymaktivitäten im Rohextrakt der frischen und eingefrorenen Zellen kaum Unterschiede aufwiesen, zeichnete sich bei den gefriergetrockneten Zellen ein deutlicher Aktivitätsverlust ab. Aufgrund dessen wurde auf die weitere Verwendung von gefriergetrocknetem Material verzichtet und nur noch schockgefrorene Zellen für die Reinigung eingesetzt. Letztere hatten gegenüber den Frischzellen den Vorteil, mit vergleichbarer Aktivität und ohne Vorarbeiten verfügbar zu sein und waren somit aus versuchstechnischen Gründen besser geeignet.

Im optimierten Reinigungsprotokoll wurden ausgehend von 1.2 kg schockgefrorenen *R. serpentina* Zellen (der Zelllinie T₃₀) 1950 ml Enzymrohextrakt gewonnen. Die Proteinkonzentration betrug 1.2 mg/ml, so daß insgesamt 2340 mg Protein enthalten waren. Ausgehend von dieser Enzympräparation wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung vorgenommen, die Fremdproteine – vor allem mikrosomale Enzyme – abtrennen sollte und zugleich der Konzentrierung diene. Die im Bereich von 40 – 60 % Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration ausfallenden Proteine wurden mit 250 ml 10 mM Tris-Puffer mit 2.5 mM MSH (pH 7.8) resuspendiert. Die anschließende Dialyse erfolgte gegen 10 L des Resuspendierungspuffers in einem Dialyseschlauch mit 29 mm Ø über Nacht. Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach dem Entsalzen ergab einen Wert von 3.46 mg/ml, was 865 mg Gesamtprotein entspricht.

Um die Aktivität im Rohextrakt und nach erfolgter Ammoniumsulfat-Fällung zu bestimmen, wurde eine Inkubation mit anschließender HPLC-Auftrennung (Abb. 7) angefertigt.

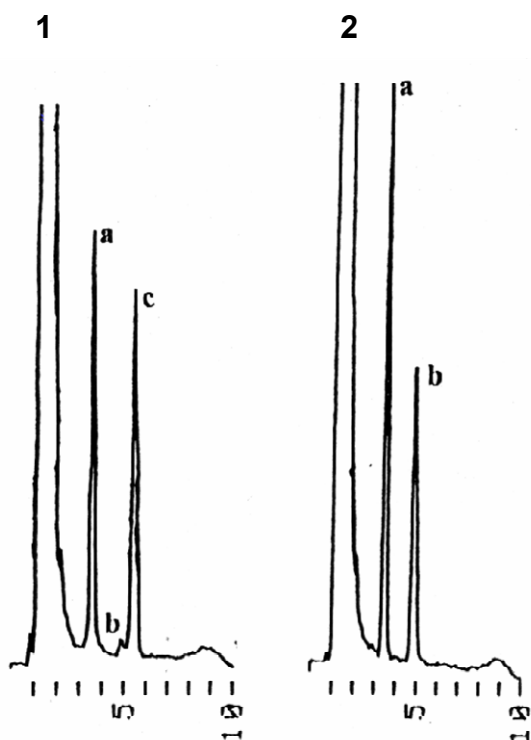


Abb. 7 HPLC-Lauf nach Inkubation des Rohextraktes, sowie nach erfolgter Ammoniumsulfatfällung (1). Vomilenin ist mit (a), 1.2-Dihydrovomilenin mit (b) und 17-O-Acetylnorajmalin mit (c) gekennzeichnet. Beide Reduktasen können auf dieser Reinigungsstufe nicht voneinander getrennt werden und somit akkumuliert das Endprodukt 17-O-Acetylnorajmalin (c). Das zweite Chromatogramm (2) zeigt eine Inkubation einer SOURCE 30Q-Fraktion (IV.2.2.2) in der die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase von der Vomilenin Reduktase abgetrennt werden konnte. Daraus ergibt sich, daß die Reaktion auf der Stufe des 1.2-Dihydrovomilenins (b) stehen bleibt und dieses akkumuliert.

Wie man auf dem ersten HPLC-Chromatogramm (1) erkennen kann, ist Vomilenin (a) zu 1.2-Dihydrovomilenin (b) und weiterhin zu 17-O-Acetylnorajmalin (c) reduziert worden. Da im Rohextrakt und im Bereich der Ammoniumsulfatfällung keine Trennung der Reduktasen erzielt werden kann, ist die Bestimmung der Enzymaktivität auf diesen Reinigungsstufen unmöglich.

2.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Die über Nacht dialysierte Enzymlösung wurde für 30 min bei $10\,000 \times g$ und $4\,^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Somit wurden präzipitierte Bestandteile, die eventuell zu einem Verschuß der Säule führen konnten, abgetrennt. In der Zwischenzeit wurde die zuvor regenerierte⁴ SOURCE 30Q Säule mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) äquilibriert. Die verwendete Säule ermöglicht aufgrund der Maße eine recht hohe Flußrate und in Kombination mit der hohen Proteinbindekapazität des S 30Q-Materials ergibt sich eine ideale Möglichkeit zur Auftrennung großer Enzymvolumina, die gerade zu Beginn der Proteinreinigung anfallen. Im Fall der Vomilenin Reduktase waren 250 ml Enzymlösung vorhanden, die mit einer

⁴ Regenerationsbedingungen: - 300 ml 2M NaCl

- 300 ml 1M NaOH

- Äquilibrieren mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)

Flußrate von 6 ml/min auf die Säule geladen wurden. Vor der Elution wurden alle nicht an die Matrix bindenden Enzyme mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) von der Säule gewaschen und sodann ein linearer Gradient über 500 ml, beginnend mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) bis 0.2 M KCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), angelegt. Die Flußrate betrug ebenfalls 6 ml/min und die Fraktionen wurden zu je 12 ml aufgefangen, wobei sich die gemessene Vomilenin Reduktase Aktivität über einen sehr weiten Bereich von 0.05 M KCl bis 0.2 M KCl erstreckte. Das Trennprogramm war jedoch so optimiert, daß die Vomilenin Reduktase unter diesen Bedingungen von der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase getrennt werden konnte. Die sechs aktivsten Fraktionen (Nr. 31 - 36) im Bereich von 0.1 M KCl, mit einer Gesamtaktivität von 248.3 nkat, wurden vereint. Daraus resultierten 73 ml Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 1.36 mg/ml. Ein typisches HPLC-Chromatogramm der weiterbearbeiteten Fraktionen ist in Abb. 8 gezeigt.

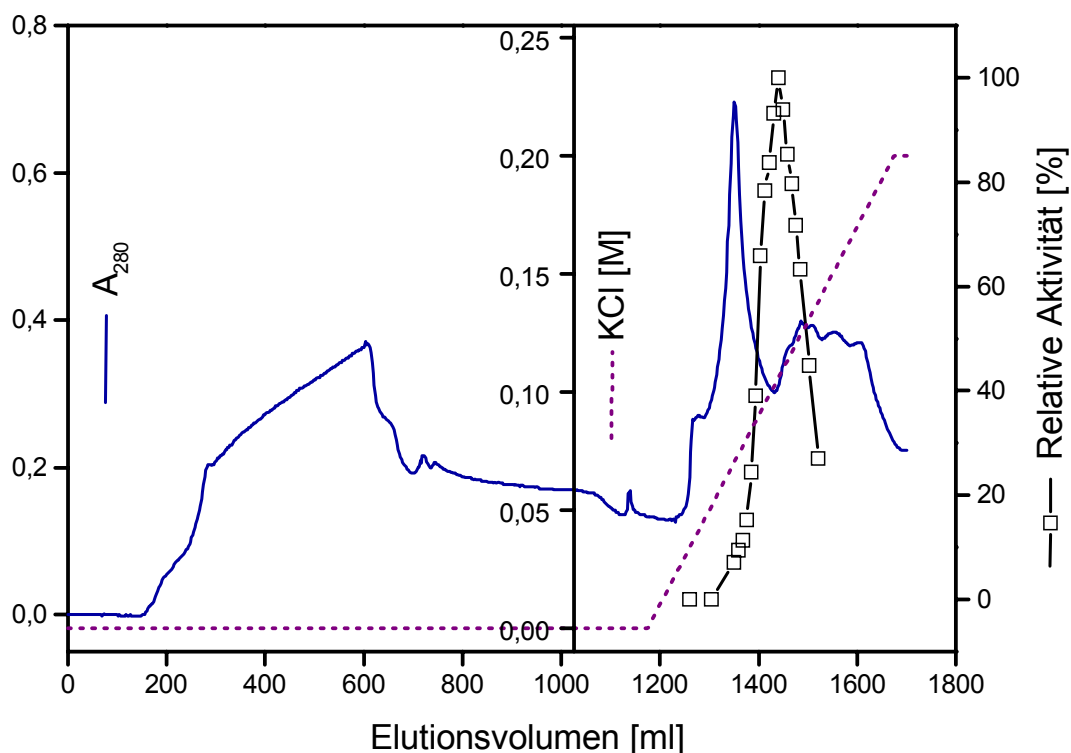


Abb. 8 SOURCE 30Q Graph. Gezeigt ist das Elutionsprofil der Vomilenin Reduktase an S 30Q bei einem linearen KCl-Gradienten von 0 – 0.2 M. Flußrate: 6 ml/min. Das Fraktionsvolumen betrug 12 ml.

2.2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Um die vereinten Fraktionen von S 30Q über eine Hydrophobe Interaktions-Chromatographiesäule auftrennen zu können, mußte den Proteinen zuerst die Hydrathülle entzogen werden. Durch diesen Schritt wurde die Lipophilie der Proteine erhöht, die somit mit den Phenylresten der SOURCE 15Phe-Säule (XK 16/20; Gelbetthöhe 10 cm) interagieren konnten. Darauf basierend wurden die 73 ml Enzymlösung mit demselben Volumen an 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung in 60 mM Tris-HCl (pH 7.3) versetzt und dabei ausfallende Enzyme abzentrifugiert ($10\,000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min). In der Zwischenzeit wurde die zuvor regenerierte⁵ S 15Phe-Säule mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer in 30 mM Tris-HCl (pH 7.3) und einer Flußrate von 2 ml/min äquilibriert.

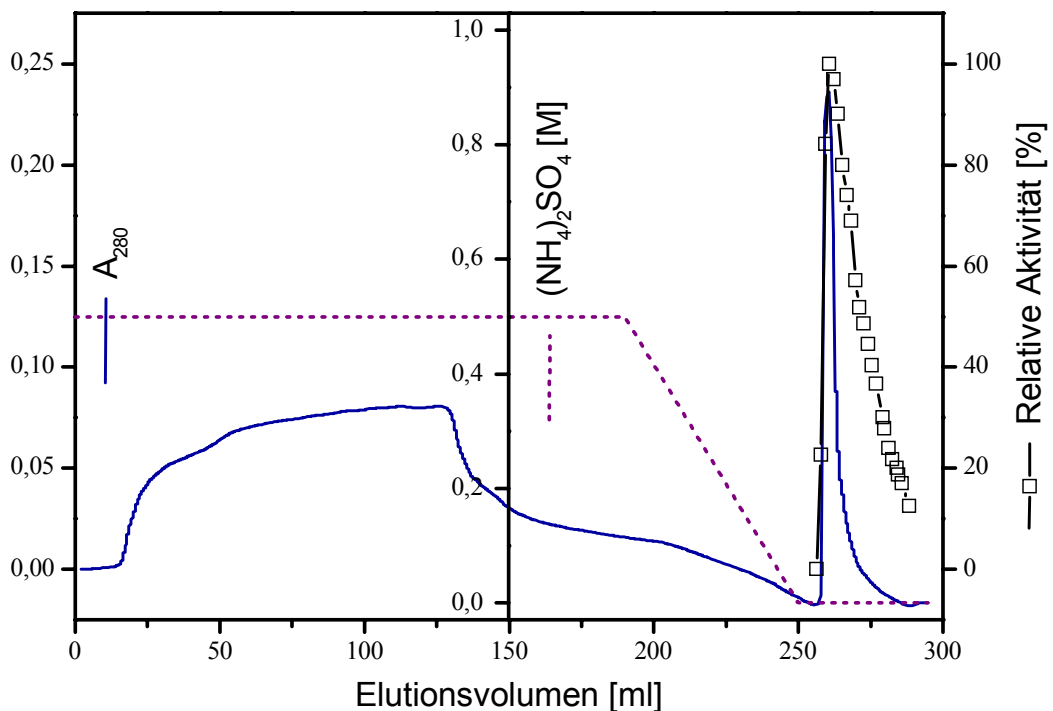


Abb. 9 SOURCE 15Phe Chromatogramm. Die Trennung wurde mit einer Flußrate von 2.2 ml/min durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen zu 1 ml aufgefangen. Als Elutionspuffer wurde ein bis auf reinen Tris-HCl-Puffer absteigender, linearer Gradient, beginnend mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewählt.

⁵ Regenerationsbedingungen: - 75 ml 30 %iger Isopropanol
 - 20 ml 1 M NaOH
 - 60 ml Seral-H₂O

Der klare Überstand der Ammoniumsulfat gepufferten Enzymlösung wurde nach erfolgter Zentrifugation mit einer Flußrate von 2.2 ml/min aufgegeben. Diese Flußrate wurde auch bei dem anschließenden Waschprozeß mit 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer in 30 mM Tris-HCl (pH 7.3) sowie der Elution beibehalten. Als Elutionsbedingungen wurde ein linearer Gradient (60 ml) mit absteigender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration bis 30 mM Tris-HCl (pH 7.3) gewählt. Das gesamte Elutionsprofil ist in Abb. 9 dargestellt. Sehr überraschend war die Erkenntnis, daß sich die Vomilenin Reduktase bei diesen Konditionen noch auf der Säule befand und erst mit reinem Seral- H_2O von der Säule eluiert werden konnte. Zur Stabilisierung der zu 0.75 ml aufgefangenen Fraktionen wurden direkt je 100 μl 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7.3) zupipettiert.

Die Fraktionen 2 bis 17 wurden weiterbearbeitet und die daraus resultierenden 13.5 ml Enzymlösung wurden mit einer Proteinkonzentration von 2.97 mg und einer Aktivität von 130 nkat auf eine Sephadex G 25-Säule aufgetragen.

Dieser Zwischenschritt wurde benötigt, um die Enzymlösung auf die Startkonditionen (10 mM Tris-HCl, pH 7.3) der nächsten Säule einzustellen. Die 40 cm lange Entsalzungssäule besitzt bei einer Füllhöhe von 37 cm und einem Durchmesser von 2.6 cm ein Gelbettvolumen von 196 ml. Die über die G 25-Säule separierte, UV_{250} absorbierende Fraktion (Flußrate 3 ml/min) wurde aufgefangen und über 2',5'-ADP-Sepharose 4B weiter aufgearbeitet.

2.2.4 Affinitätschromatographie

Das Material 2',5'-ADP-Sepharose 4B wurde vor dem Start der Reinigung regeneriert⁶ und äquilibriert, um während der Reinigung einen zügigen Arbeitsablauf zu gewährleisten. Dementsprechend mußte die XK 16/20 Säule mit einem Gelbettvolumen von 14.5 ml kurz vor Gebrauch nur noch ca. 30 min mit Äquilibrierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.3) gespült werden. Die Flußrate lag durchgehend bei 1 ml/min und wurde zur Elution auf 1.5 ml/min gesteigert. Da die lineare Variante der Elution bei dieser Säule lediglich eine Verdünnung, jedoch keine weitere Trennung der Enzyme aufwies, wurde im Gegensatz zu

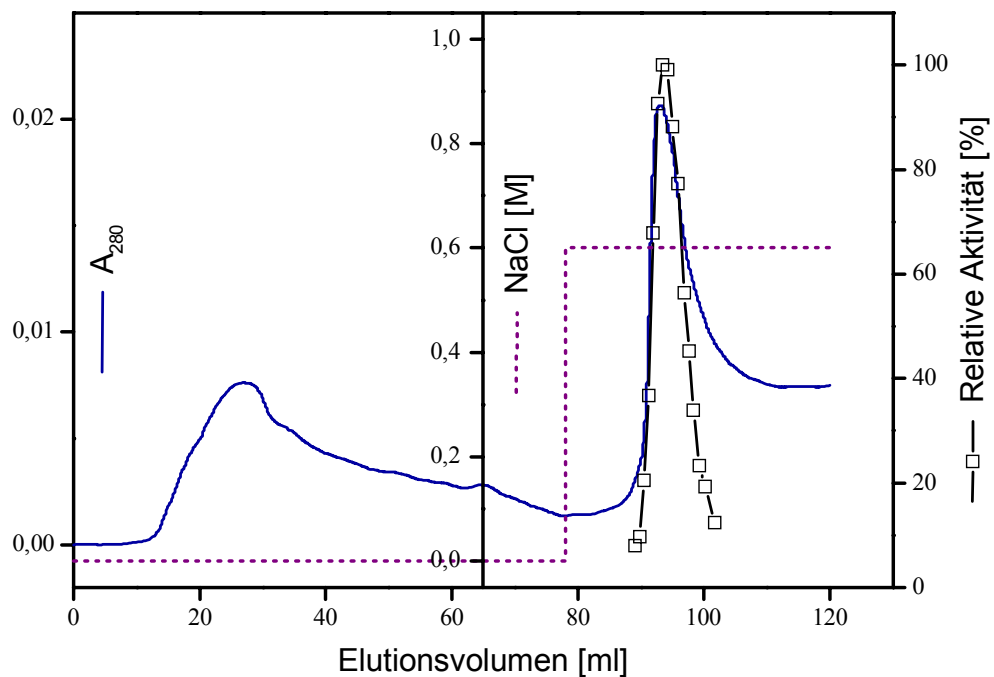
⁶ Regenerationsbedingungen: - 45 ml 2 M NaCl

- 45 ml 0.1 M NaAc + 0.5 M NaCl (pH 4.5)

- 45 ml 0.1 M Tris-HCl + 0.5 M NaCl (pH 8.5)

den vorangegangenen Chromatographieschritten mit einem Stufengradienten von 0.6 M NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) eluiert (Abb. 10). Die aufgefangenen 30 Fraktionen hatten ein Volumen von je 1.1 ml mit der höchsten Aktivität in Fraktion Nummer 14.

Abb. 10 Elutionsprofil der Vomilenin Reduktase an 2',5'-ADP-Sepharose 4B. Die Flußrate wurde während der Elution mittels Stufengradienten auf 1.5 ml/min erhöht. Das Auffangvolumen betrug ca. 1.1 ml/Fraktion.



Nach Vereinigung der 13 aktivsten Fraktionen wurden 14.3 ml Enzymlösung (1.1 mg Protein, 56.7 nkat Gesamtaktivität) erhalten, die abschließend über eine Sephadex G 25-Säule auf 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) umgepuffert wurden und einer Trennung an DEAE-Sepharose unterzogen wurde. Da dieser letzte Trennungsschritt nicht weiter zum Reinigungserfolg beitrug, sind die Elutionsdiagramme nicht aufgeführt sowie die Daten in der abschließenden Reinigungstabelle nicht erfasst.

Tab. 2 Die Reinigungstabelle bietet eine Zusammenfassung über die einzelnen Schritte zur Anreicherung der Vomilenin Reduktase aus *Rauvolfia serpentina* Zellsuspensionskulturen.

Reinigungs-schritt	Volumen [ml]	Proteinmenge [mg]	Aktivität [pkat]	spez.Aktivität [pkat/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [x-fach]
Rohextrakt	1950.0	2347.1	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a
Dialysat	250.0	865.2	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a
S 30Q	73.0	99.3	248.3	2.5	100.0	1.0
S 15Phe	13.5	2.9	130.0	44.8	52.4	18.0
2',5'-ADP-Sepharose 4B	14.3	1.1	56.7	51.5	22.8	20.6

2.2.5 Gelelektrophoretischer Nachweis des Reinigungserfolges

Vor und nach jeder Reinigungsstufe wurden etwa 1.5 ml Enzymlösung abgenommen, um die Proteinkonzentration (III.1.7) und die Aktivität (III.1.8; IV.2.1) der Lösung zu bestimmen. Zusätzlich wurde von den entnommenen Proben ein SDS-Gel (III.1.6.1) angefertigt, daß in Korrelation mit dem Aktivitätsverlauf Aufschluß über den Reinigungserfolg geben sollte.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der ADP-Fractionen 8 bis 19 zeigte es sich, daß nach erfolgter Coomassie-Färbung (III.1.6.5.1) nur noch drei Hauptproteinbanden auf dem Gel (Abb. 11) zu erkennen waren. Eine Bande über 45 kDa, die nach dem Aktivitätsverlauf als potentielle Vomilenin Reduktase ausgeschlossen werden konnte und zwei Banden unterhalb 45 kDa – ca. 43 kDa und 40 kDa – die beide als gesuchtes Enzym in Frage kamen.

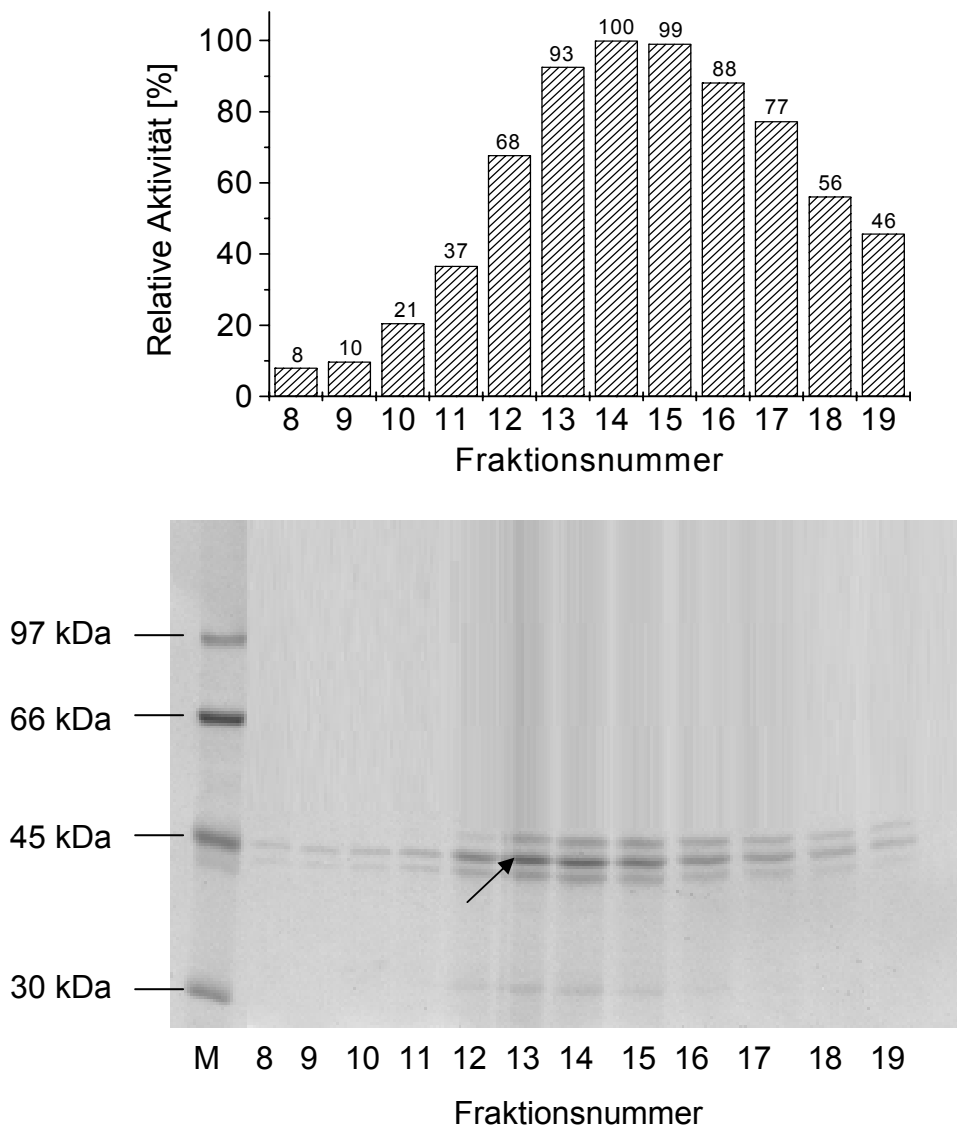


Abb. 11 SDS-PAGE der angereicherten Proteinfraktionen nach 2',5'-ADP-Sepharose. M: Markerproteingemisch (LMW), 8 – 19: Fraktionen nach 2',5'-ADP-Sepharose 4B. Die Vomilenin Reduktase ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Das Säulendiagramm gibt die relative Aktivität der entsprechenden Fraktionen 8 – 19 wieder.

2.2.6 Weitere Reinigungsversuche

Um die Frage zu klären, welche der Proteinbanden die Vomilenin Reduktase darstellt, sollte eine erneute Reinigung durchgeführt werden, bei der 2 kg *R. serpentina* Zellkulturgewebe der Linie T₃₀ aufgeschlossen wurden. Alle Schritte bis zur Elution von der S 30Q-Säule erfolgten exakt nach dem in IV.2.2.1 und IV.2.2.2 beschriebenen Protokoll. Die dabei nach S 30Q erhaltenen

aktiven Fraktionen (Nr. 32 – 74) im Bereich von 0.1 bis 0.2 M KP_i wurden vereint und mit $(NH_4)_2SO_4$ bis 50 % Sättigungskonzentration versetzt. Nach einstündiger Fällung der Proteine bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation bei $10\,000 \times g$ und 4 °C für 30 min. Das resultierende Pellet wurde mit 35 ml 10 mM KP_i -Puffer (pH 7.0) resuspendiert und nicht gelöste Bestandteile abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgezogen und über eine zuvor mit 10 mM KP_i -Puffer (pH 7.0) äquilibrierte Sephadex G 25-Säule (III.1.5.5.3) geleitet (4 ml/min).

Die somit auf die Startkonditionen der nächsten Säule äquilibrierte Enzymfraktion wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine Hydroxylapatit Säule aufgetragen. Auch hier wurde die 20 cm lange und 1.6 cm im Durchmesser fassende Säule (Füllhöhe 13.5 cm) vor dem Aufbringen der Enzymlösung regeneriert⁷ und äquilibriert. Die Flußrate wurde während des Waschprozesses - mit 10 mM KP_i -Puffer (pH 7.0) - und während der Elution auf 2 ml/min gesteigert. Als Elutionsbedingungen stellte sich ein linearer Gradient von 10 mM KP_i (pH 7.0) auf 0.4 M KP_i über ein Volumen von 80 ml als gutes Trennsystem heraus. Die zu etwa 1 ml aufgefangenen Fraktionen wurden wieder auf ihre Reduktase-Aktivität hin untersucht, die 50 aktivsten Fraktionen vereint und anschließend erneut über eine Sephadex G 25-Säule auf 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) umgepuffert (Flußrate 4 ml/min).

Als Affinitätschromatographie sollte dieses Mal eine HiTrap Blue Säule mit einer Gelbetthöhe von 2.5 cm und einem Volumen von 5 ml zum Einsatz kommen. Insgesamt wurden 75 ml Enzymlösung über einen Zeitraum von 150 min auf die Säule aufgebracht, wobei erwartungsgemäß der größte Anteil der Proteine nicht von dem Farbstoffmaterial fixiert wurde. Als Waschpuffer diente der Äquilibrierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.3) in Kombination mit einer Flußrate von 2 ml/min, die über die Elution hinweg konstant blieb. Die Trennung der Proteine vom Farbstoffmaterial erfolgte dann in drei Schritten durch das Anlegen von Stufengradienten: zuerst 30 ml 0.2 M KCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.3), danach 30 ml 1 M KCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) sowie zum Abschluß 1.5 M KCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.3).

⁷ Regenerationsbedingungen: - 90 ml 1.5 M KCl

- Äquilibrieren mit 10 mM KP_i -Puffer pH 7.0

Dabei konnten zwei UV-aktive Fraktionen erhalten werden. Nach erfolgter Inkubation und anschließender SDS-PAGE blieb festzustellen, daß beide Proteinpeaks Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität aufwiesen und der Reinigungserfolg insgesamt viel schlechter ausfiel als bei der zuvor beschriebenen, optimierten Proteinreinigung (VI.2.2.1 - VI.2.2.5). Da über die bisher zum Einsatz gekommenen Säulen bzw. Trennmethoden keine weitere Aufreinigung der Vomilenin Reduktase zu erwarten war, sollte ein Nativ-Gel in Kombination mit einem Aktivitätstest und anschließender SDS-PAGE Aufschluß über die Zuordnung der Vomilenin Reduktase zu einer Proteinbande geben. Zusätzlich wurde mit der verbleibenden Proteinlösung eine Gelfiltration an Sephacryl S-100 HR und Superdex 75 durchgeführt, um das Molekulargewicht der Vomilenin Reduktase (VI.3.5) zu bestimmen.

Das Nativ-Gel wurde nach der in III.1.6.2 beschriebenen Methode angefertigt. Dabei wurden je 17 µl Probe, die aus dem Einkonzentrieren der Fraktionen 34 bis 45 nach HiTrap Blue resultierten, in die Geltaschen aufgetragen. Zwei der Bahnen wurden mit Coomassie angefärbt, vier weitere wurden aufgrund des gefärbten Proteinmusters der ersten beiden Bahnen in entsprechende Streifen geschnitten, so daß möglichst nur eine Proteinbande pro Streifen enthalten war. Die Streifen wurden einerseits einem Aktivitätstest unterzogen und andererseits gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da Vomilenin Reduktase-Aktivität in keiner Fraktion nachzuweisen war, konnte auch auf diesem Weg eine eindeutige Zuordnung der Funktion des Enzyms zur entsprechenden Proteinbande nicht erzielt werden.

2.2.7 Stabilisierungsversuche

Eine von POLZ (Dissertation, 1989) beschriebene hohe Instabilität der Vomilenin Reduktase und die sehr unbeständige, geringe Expression des Enzyms in den Pflanzenzellkulturen erschwerte die Enzymreinigung ungemein. Daher wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Stabilität der Vomilenin Reduktase überprüft, um gegebenenfalls die - mit drei Tagen äußerst kurze - Lebensdauer des Enzyms etwas zu verlängern.

Dazu wurden je 5 µl Stocklösung der in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen mit je 495 µl vorgereinigter Enzymlösung versetzt, gemischt und bei 4 °C

aufbewahrt. Nach zwei Tagen wurden 155 µl der vorbehandelten Enzymlösung mit 20 µl KPI-Puffer (0.5 M, pH 7.0), 20 µl NADPH_2 (20 mM) und 5 µl Vomilenin (2 mg/ml) 2 Stunden lang bei 30 °C inkubiert. Die weitere Auftrennung der Inkubationsansätze über HPLC zur Bestimmung der relativen Aktivität erfolgte nach III.2.2.

Tab. 3 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Lebensdauer/Aktivität der Vomilenin Reduktase.

Substanz	Endkonzentration im Stabilisierungsansatz	Relative Aktivität [%]
Glycerol	15 %	5.1
Ascorbinsäure	15 mM	30.8
MSH	2.5 mM	141.3
MSH	4 mM	17.7
MSH	40 mM	0
$\text{NADPH} + \text{H}^+$	2 mM	20.5
FMN	3 µM	100.4
FAD	2 µM	102.8
ZnCl_2	2 mM	105.6
Chaps	0.5 %	102.8
Chaps / FMN	0.5 % / 3 µM	76.1
Chaps / FAD	0.5 % / 2 µM	74.5
FMN / FAD	3 µM / 2 µM	100.6
EDTA	1 mM	83.9
EDTA	5 mM	72.0
EDTA	10 mM	68.7
Triton X-100	0.1 %	84.0
H_2O / Kontrolle		100.0

2.3 Reinigung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase

2.3.1 Gewinnung löslicher Proteine durch Pflanzenzellaufschluß

Die Gewinnung des Enzymrohextraktes, die Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Resuspendierung des Proteinpellets und Dialyse über Nacht sowie die Aufarbeitung für den ersten säulenchromatographischen Schritt erfolgten anhand des in IV.2.2.1 beschriebenen Protokolls unter Verwendung von 1.1 kg schockgefrorenem *R. serpentina* Zellkulturgewebe. Die dabei ermittelten Daten sind der Reinigungstabelle IV.2.3.6 zu entnehmen.

2.3.2 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q

Unter den gleichen Bedingungen und Verwendung derselben Säule - Maße, Gelbetthöhe etc. in IV.2.2.2 angegeben - wurden die 300 ml dialysierte Enzymlösung auf die S 30Q-Säule aufgetragen (Abb. 12) und nicht bindende Bestandteile mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) von der Säule gewaschen. Nach erfolgter Elution mittels linearem Gradienten von 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) bis 0.2 M KCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) über 500 ml wurden die 6 aktivsten Fraktionen im Bereich von 0.14 – 0.16 M KCl weiterbearbeitet. Die insgesamt 60 ml umfassende Proteinlösung - mit einer Gesamtaktivität von 10.7 nkat - wurde über eine G 25-Säule entsalzt und auf 10 mM KP_i (pH 7.0) umgepuffert. Während, wie schon unter IV.2.2.1 beschrieben, eine Abtrennung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase von der Vomilenin Reduktase nach S 30Q erzielt werden konnte (im Bereich von 0.05 M KCl bis ca. 0.14 M KCl), konnten jedoch keine Enzymfraktionen erhalten werden, die nur 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase enthielten. Das lag darin begründet, daß die Elution der Vomilenin Reduktase im Bereich von 0.05 M – 0.2 M KCl erfolgte, wohingegen die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase über einen Bereich von 0.13 bis 0.2 M KCl eluierte und sich somit die Elutionsmuster, wie in Abb. 12 dargestellt, überschneiden.

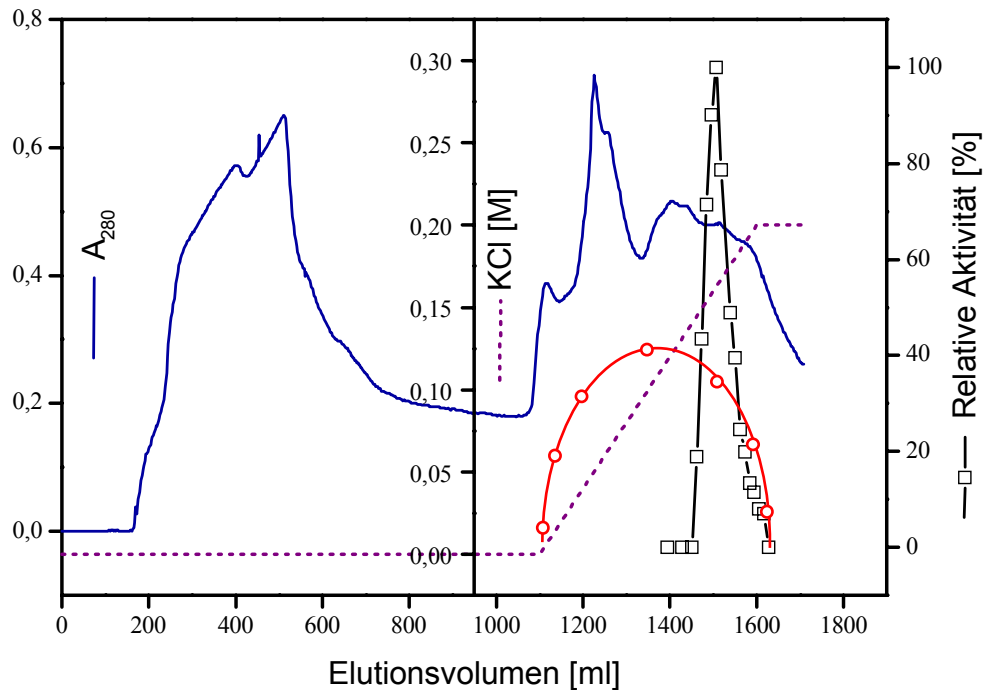


Abb. 12 Elutionsprofil der 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase an S 30Q. Man erkennt deutlich das sich überschneidende Elutionsmuster der beiden Reduktasen: —○— schematischer Aktivitätsverlauf der Vomilenin Reduktase; —□— Aktivitätsverlauf der 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase.

2.3.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung wurde die UV-aktive Fraktion (72 ml) mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine Hydroxylapatit Säule (III.1.5.3; VI.2.2.6) aufgegeben. Nicht gebundene Proteine wurden mit Puffer ausgewaschen und die fixierten Proteine mit einem ansteigenden Gradienten (0.01 – 0.2 M KP_i) eluiert. 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase Aktivität war im Bereich von 50 mM bis 85 mM nachweisbar, wobei das Maximum bei 65 mM lag. Die vereinigten Fraktionen hatten ein Volumen von 18.3 ml mit einer spezifischen Aktivität von 771.7 pkat/mg bei einem Gesamtproteingehalt von 12.7 mg. Die Anreicherung auf dieser Reinigungsstufe betrug 22.5 fach mit einer Ausbeute von 20.9 %.

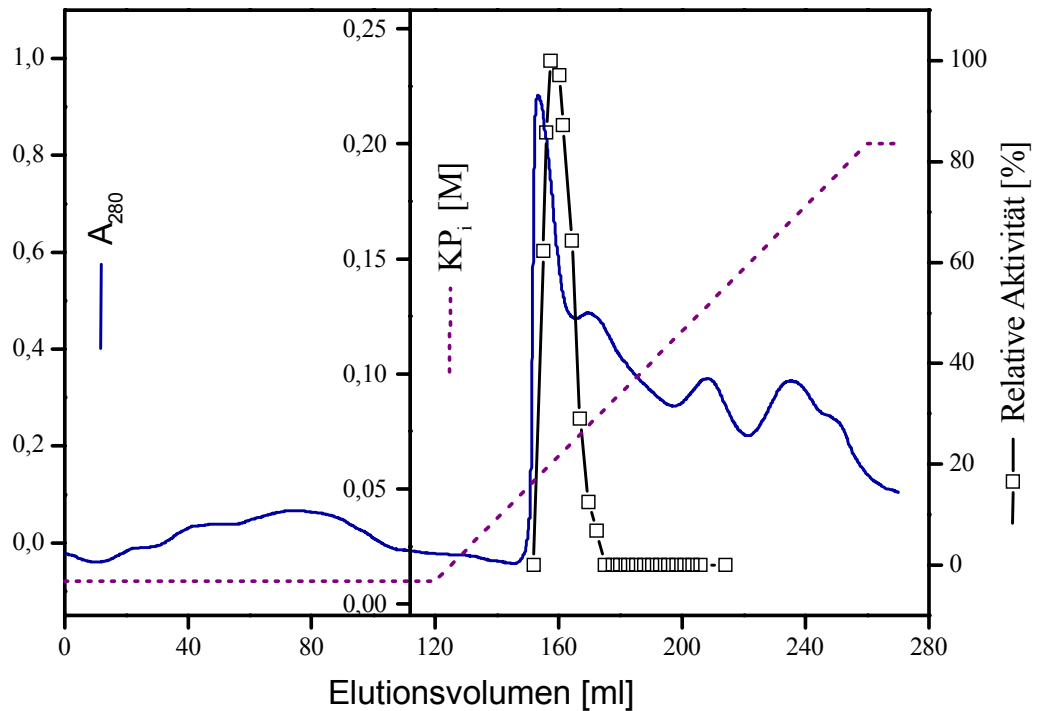


Abb. 13 Elutionsprofil der Hydroxylapatit Säule für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase. Der 140 ml umfassende, lineare Gradient auf 0.2 M KP_1 erzielte eine exzellente Trennung. Bei einer Flußrate von 2 ml/min wurden Proteinfraktionen zu 1.7 ml aufgefangenen. Die höchste 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität war bei 50 mM bis 85 mM KP_1 zu detektieren.

2.3.4 Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Die selektive Bindung von Reduktasen an das 2',5'-ADP-Sepharosematerial trug auch schon bei der Vomilenin Reduktase-Anreicherung wesentlich zum Reinigungserfolg bei. Daher sollte diese Trennmethode auch in diesem Fall zum Einsatz kommen.

Vor der eigentlichen Separation mußten die 13 aktivsten Fraktionen mit je 1.4 ml über eine G 25-Säule gepumpt und auf 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) eingestellt werden. Danach erfolgte das Auftragen auf die 2',5'-ADP-Sepharose Säule (IV.2.2.4) mit einer Flußrate von 1 ml/min.

Nach dem Auswaschen nicht gebundener Proteine konnte mit einem relativ kleinen Verlust an 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase eine über 3-fache Anreicherung erzielt werden. Dazu wurden die Proteine mit unveränderter Flußrate und mit einem Stufengradienten von 0 – 1 M NaCl in Fraktionen zu 1.3 ml aufgefangen. Die spezifische Aktivität konnte in dem Fraktionenpool,

bestehend aus den Fraktionen 8 - 15 (siehe Graphik 14), auf 2143.4 pkat/mg gesteigert werden.

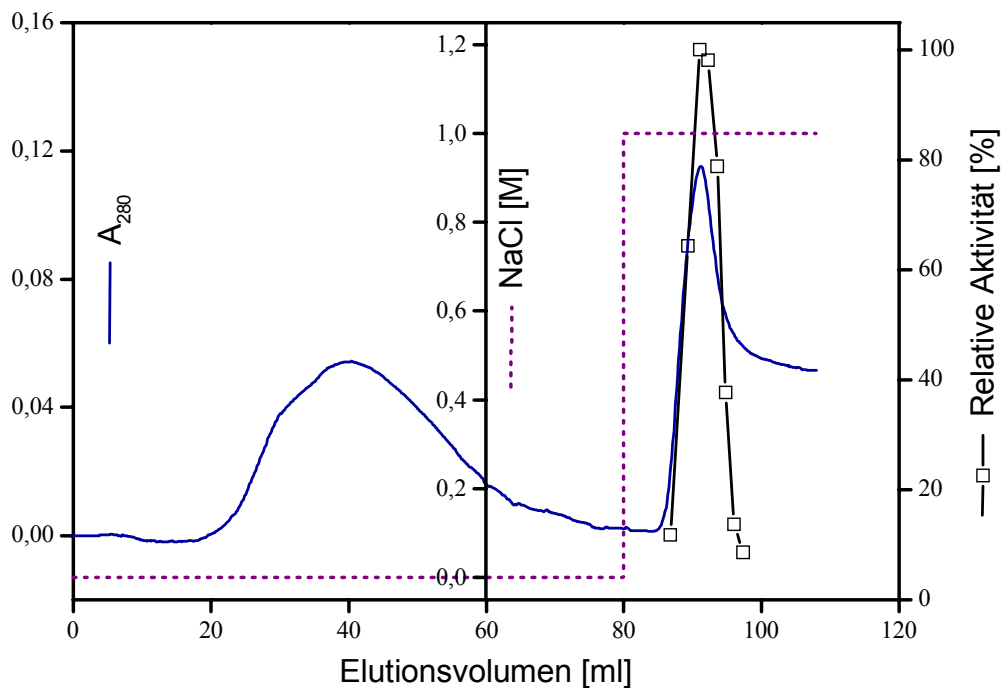


Abb. 14 2',5'-ADP-Sepharose 4B Chromatographie. Im linken Teil der UV-Kurve ist der große Proteinpeak zu erkennen, der von den 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen abgetrennt wurde. Auch hier zeigte sich wieder die gute Trennleistung des ADP-Sepharose Materials.

2.3.5 Anionenaustausch an DEAE-Sepharose – Fast Flow

Durch den Einsatz von 1 M NaCl als Elutionskonditionen bei der vorangegangenen Affinitätschromatographie war zur Vorbereitung der Probenaufgabe auf die DEAE-Sepharose Säule ein erneuter G 25-Lauf nötig. Als Startbedingung für den schwachen Anionenaustauscher wurde 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) gewählt. Dementsprechend wurde die Sephadex G 25-Matrix sowie die DEAE-Sepharose-Matrix⁸ vor dem Lauf mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) äquilibriert. Die nach G 25 erhaltenen 17 ml Proteinlösung wurden in 14 min auf die DEAE-Sepharose aufgebracht (Säulenmaße und Füllhöhe II.4; III.1.5.1.2).

⁸ Regenerationsbedingungen: - 75 ml 30 %iger Isopropanol
 - 75 ml 1M NaOH
 - 150 ml 2M NaCl

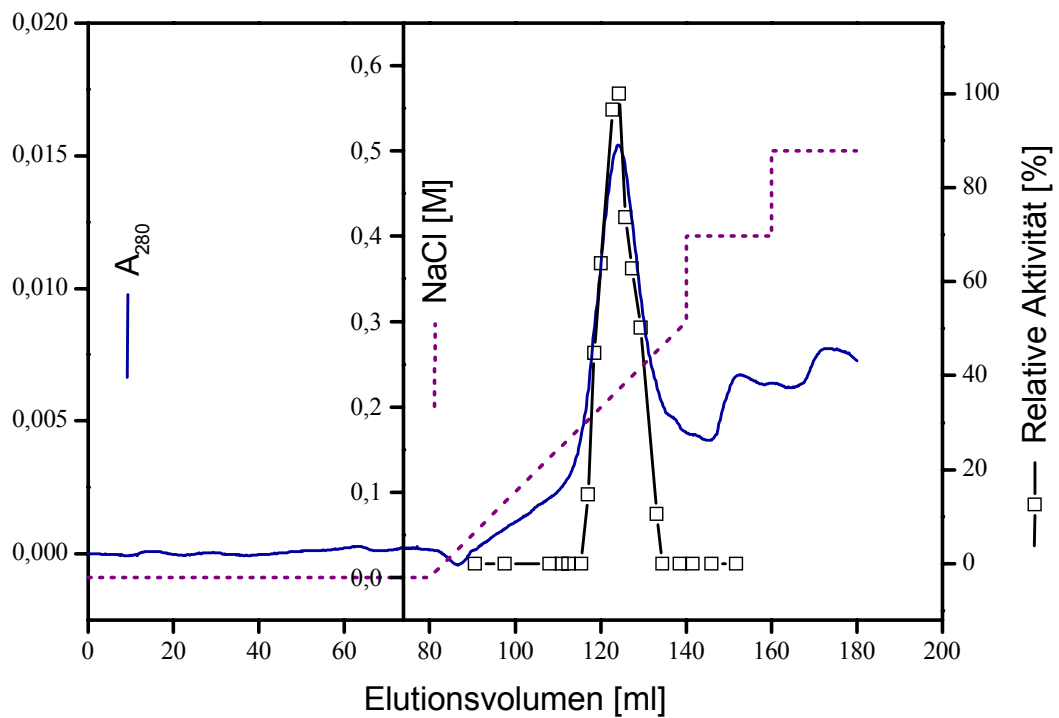


Abb. 15 Elutionsmuster an DEAE-Sepharose – Fast Flow. Beginnend mit einem linearen Gradienten von 0 – 0.3 M NaCl konnte der erste große Proteinpeak erhalten werden. Die beiden nachfolgenden Stufengradienten von 0.3 M auf 0.4 M NaCl und schließlich von 0.4 auf 0.5 M NaCl dienten lediglich der Abtrennung von Fremdproteinen. Eluiert wurde mit einer Flußrate von 1.2 ml/min. Das Fraktionsvolumen betrug etwa 0.5 ml.

Nach dem Waschprozeß wurde mit 1.2 ml/min eluiert. Zum Einsatz kam dabei ein dreifach aufgeteilter Gradient. Beginnend linear von 0 – 0.3 M NaCl ansteigend und dann gefolgt von zwei Stufengradienten von 0.3 – 0.4 M NaCl und 0.4 – 0.5 M NaCl. Nach Inkubation aller aufgefangenen Fraktionen zeigte es sich, daß die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Aktivität im Hauptpeak (0.12 – 0.3 M NaCl) lokalisiert war. Lediglich kleinere Proteinfractionen im Bereich von 0.3 bis 0.5 M NaCl konnten abgetrennt werden. Ein von den aktiven Fraktionen angefertigtes SDS-Gel lieferte noch keine zufriedenstellende Ergebnisse. Somit wurden alle aktiven Fraktionen vereint. Die daraus resultierenden 6 ml mit einer Proteinkonzentration von 0.3 mg/ml wurden einer Entsalzung über G 25 unterzogen um dann einen abschließenden Reinigungsschritt durchzuführen.

2.3.6 Anionenaustausch mit MonoQ

Die Wahl, welches Säulenmaterial zum sogenannten "final polishing" eingesetzt werden sollte, fiel auf den starken Anionenaustauscher MonoQ, der durch das Äkta Explorer-System gesteuert zum Einsatz kam. Die Proteinlösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) äquilibrierte MonoQ Säule über einen Zeitraum von 25 min aufgebracht, gefolgt von 20 ml Puffer, der ebenfalls mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte mit einem Gradientenprogramm (20 ml, 0 – 0.5 M KCl), wobei Fraktionen mit 0.6 ml Volumen aufgefangen wurden. Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Aktivität verließ nach einem Elutionsvolumen von 9.2 bis 14 ml die Säule. Das Maximum der Enzymaktivität korrespondierte mit einer KCl-Konzentration von 0.28 M.

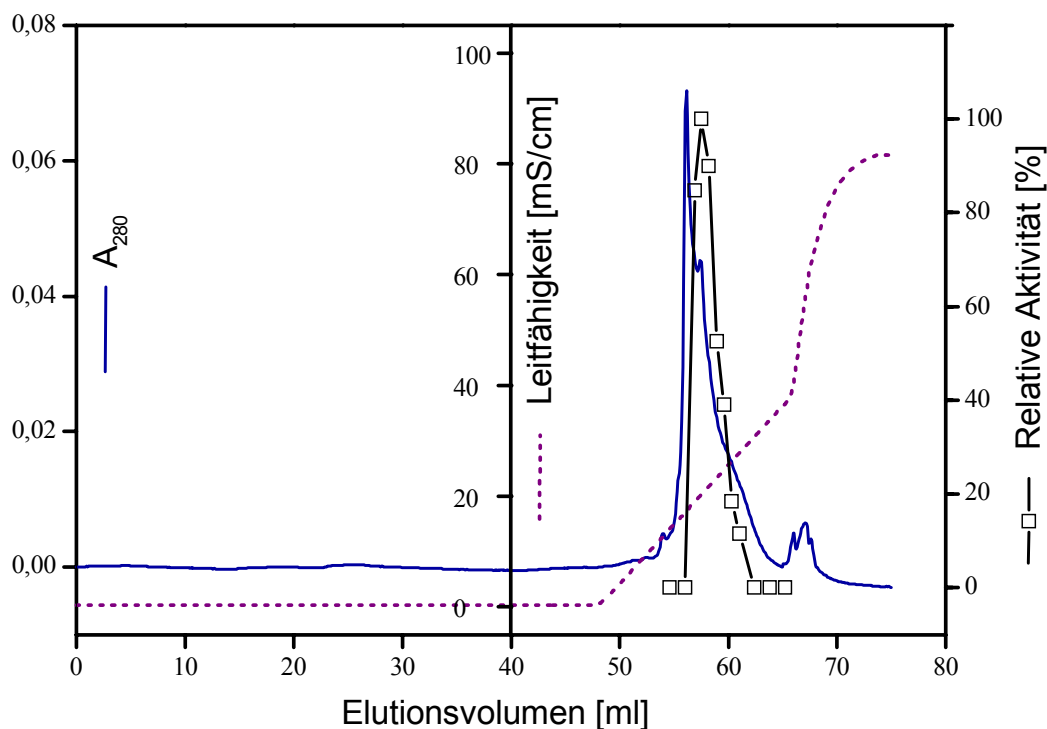


Abb. 16 MonoQ Chromatographie der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung. Die zu 0.6 ml aufgefangenen Fraktion wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min erhalten.

Bei diesem abschließenden Schritt konnte eine 200-fache Anreicherung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase erzielt werden, was einer spezifischen Aktivität von 6860 pkat/mg Protein entsprach.

Alle wichtigen Daten der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung sind abschließend noch einmal in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4 Reinigungstabelle – Übersicht über die Arbeitsschritte und Eckdaten der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung aus *Rauvolfia serpentina* Zellsuspensionskulturen.

Reinigungs-schritt	Volumen [ml]	Proteinmenge [mg]	Aktivität [nkat]	spez.Aktivität [pkat/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [x-fach]
Rohextrakt	1930.0	1371.6	47.0	34.3	100	1.0
Dialysat	300.0	555.0	42.8	77.1	91.1	2.2
S 30Q	60.0	58.5	10.7	182.8	22.8	5.3
Hydroxylapatit	18.3	12.7	9.8	771.7	20.9	22.5
2',5'-ADP-Sepharose 4B	10.2	2.9	6.2	2143.4	13.2	62.5
DEAE-Sepharose	6.0	1.8	4.8	2660.0	10.2	77.6
MonoQ	4.8	0.4	2.7	6860.0	5.8	200.0

2.3.7 Gelelektrophoretischer Nachweis des Reinigungserfolges

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden je 40 µl der nach MonoQ erhaltenen Fraktionen mit 40 µl Probenpuffer für 7 min zur Denaturierung der Proteine auf 95 °C erhitzt. Die Separierung erfolgte in einem 11 %igen Trenngel bei 20 mA. Nach 15 h wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 17). In Relation mit dem Aktivitätsverlauf (Abb. 17) der einzelnen Fraktionen konnte die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase eindeutig identifiziert werden. Durch den abrupten Anstieg des Substratumsatzes in Fraktion 21 (0 auf 90 %), in Kombination mit dem Aktivitätsmaximum in Fraktion 22, kommt nur noch die - mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnete - Proteinbande bei ca. 48 kDa als die gesuchte Reduktase in Frage.

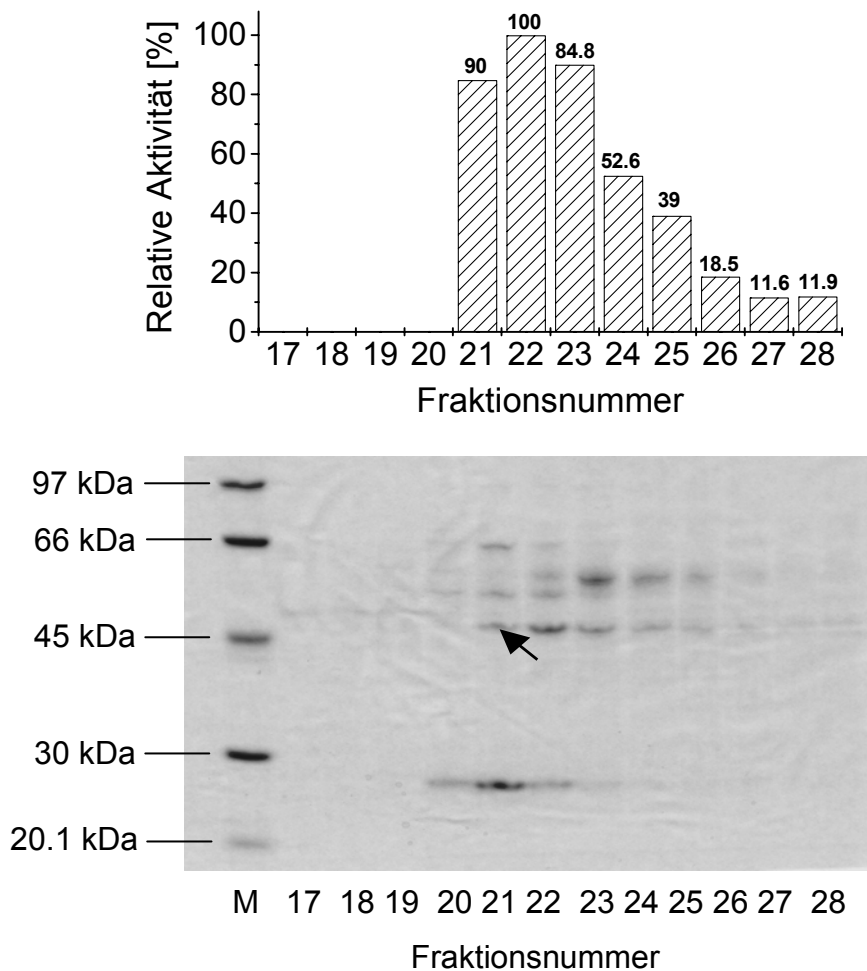
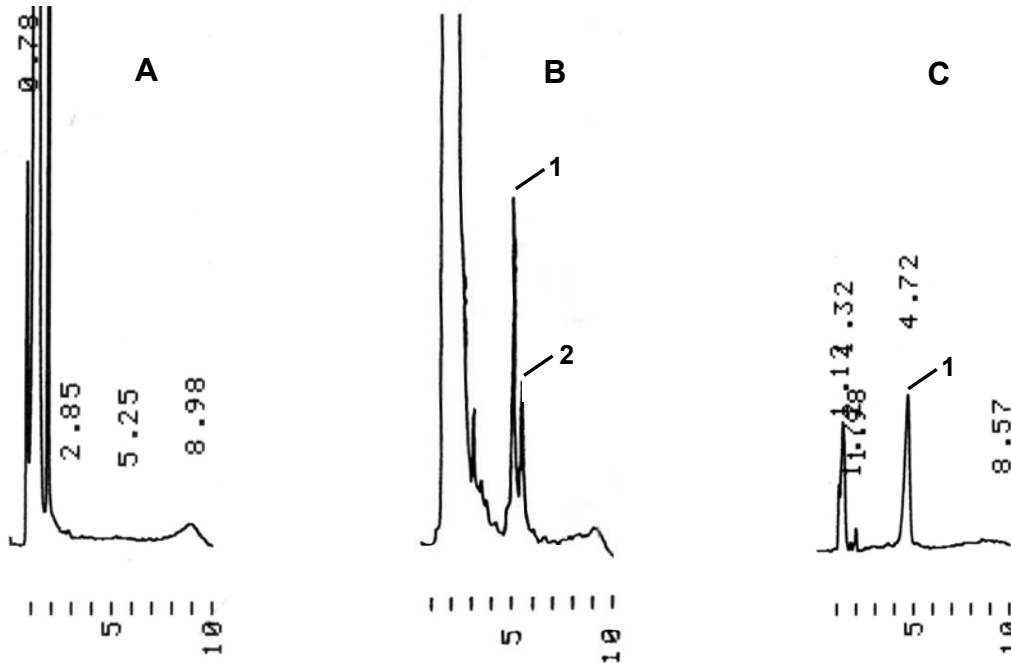


Abb. 17 Aktivitätsmuster der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen nach MonoQ im Vergleich mit dem dazugehörigen SDS-Gel. M: Markerproteingemisch (LMW), 17 – 28: aufgereinigte 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Fractionen nach MonoQ. → Der Pfeil kennzeichnet die bei ca. 48 kDa lokalisierte 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine Nativ-Gelelektrophorese mit Clean Prep Fertiggelen nach III.1.6.2 durchgeführt. Die dabei eingesetzten 17 µl Proteinlösung stammten aus der MonoQ Chromatographie und wurden bei 25 mA und 4 °C für etwa 90 min im elektrischen Feld getrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in kleine Streifen geschnitten und in Reaktionsgefäße mit folgendem Ansatz überführt: 155 µl Seral-H₂O, 20 µl 0.5 M KP_i (pH 7.0), 20 µl 20 mM NADPH₂ und 5 µl 4 mM 1.2-Dihydrovomilenin-Lösung. Die anschließende, 9 h lange Inkubation erfolgte unter leichtem Schütteln (500 Upm) bei 30 °C. Hinterher wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl MeOH gestoppt, die denaturierten Proteine abzentrifugiert und der Überstand zur HPLC-Analyse verwendet (Abb. 18a).

Abb. 18 HPLC-Chromatogramme: A – HPLC-Lauf nach Nativ-Gelelektrophorese, B – 1.2-Dihydrovomileninreduktion (1) zu 17-O-Acetylnorajmalin (2) als Positivkontrolle, C – Reine Substratlösung (1.2-Dihydrovomilenin, R_f : 4.72 min).



Das erhaltene Chromatogramm wies keine Spuren des Eduktes 1.2-Dihydrovomilenin auf, gleichzeitig blieb aber auch der Produkt-Peak (17-O-Acetylnorajmalin) aus, ohne daß zusätzliche Peaks auftraten. Im Vergleich dazu ist in Abb. 18b ein HPLC-Chromatogramm zu sehen, bei dem 1.2-Dihydrovomilenin durch eine aufgereinigte 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fraktion selektiv zu 17-O-Acetylnorajmalin umgesetzt wird.

Um der Frage nachzugehen, warum der 1.2-Dihydrovomilenin-Peak fehlt, wurde zunächst die reine Substratlösung überprüft und mit der HPLC analysiert: der 1.2-Dihydrovomilenin-Peak war bei einer R_f von 4.72 min mit einer, der Konzentration entsprechenden Intensität vorhanden (Abb. 18c).

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß sich die Substratlösung nicht zersetzt hatte, lag die Vermutung nahe, daß das Substrat vom Polyacrylamidgel adsorbiert wird. In der Folge wurden nun einige Extraktionsversuche - unter anderem mit Tetrahydrofuran und Dioxan - durchgeführt, ohne jedoch den gewünschten Erfolg zu erbringen.

Um aber die "Adsorptionstheorie" zu verfestigen, wurde ein Gelstück **ohne** Proteine einer - wie oben angegebenen - Inkubation unterzogen. Dieser wurde auf gleiche Weise weiter aufgearbeitet und der so erhaltene Überstand mittels

HPLC aufgetrennt. Das resultierende Chromatogramm glich dem der inkubierten MonoQ-Probe nach Nativ-Gelelektrophorese (Abb. 18a).

2.4 Proteolytische Spaltung mit anschließender Peptidsequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Lottspeich, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, angesetzt.

Dazu sind die aufgereinigten Proteinbanden der Vomilenin- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (IV.2.2.5 und IV.2.3.7) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten worden. Die Gelstücke konnten dann – wie schon bei CLEVELAND et al. (1977) beschrieben – direkt mit der Endoproteinase LysC versetzt werden, so daß die enthaltenen Proteine hinter jeder Aminosäure Lysin gespalten wurden. Die somit entstandenen Peptid-Fragmente wurden dann aus dem Gel eluiert, über HPLC getrennt und anschließend sequenziert.

2.4.1 Vomilenin Reduktase-Sequenzen

Für die Vomilenin Reduktase kamen nach dem in IV.2.2.5 beschriebenen SDS-Gel zwei Proteinbanden als potentielle Reduktase in Frage. Daher wurden beide Banden, zum einen die ca. 40 kDa große Bande, zum anderen die etwa 43 kDa große Bande sequenziert. Es konnte die Aminosäureabfolge von 4 Peptidstücken erfolgreich ermittelt werden. Tabelle 5 gibt die entsprechenden Sequenzen wieder.

In der Folge werden die Bezeichnungen 40 kDa-Bande und 43 kDa-Bande synonym zur Vomilenin Reduktase verwendet.

Bandenzugehörigkeit	Länge [AS]	Aminosäureabfolge
40 kDa-Bande	18	(K)AYGVAARDSSGVLSPFK
	11	(L)AINHLGADAF
43 kDa-Bande	11	(K)VLYCGICHSD
	12	YPIVPGHEIVGV

Tab. 5 Aminosäuresequenzen der Vomilenin Reduktase. Der Verdau erfolgte mit Endoproteinase LysC wobei die Aminosäuren im Einbuchstaben-Code angegeben sind. Unsichere Aminosäuren stehen in der Klammer.

2.4.2 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Sequenzen

Das SDS-Gel der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (IV.2.3.7) zeigte eindeutig nur eine Proteinbande bei 48 kDa, die 100 %ig mit dem Aktivitätsverlauf der getesteten Fraktionen übereinstimmte. Daraufhin wurde diese Bande sequenziert. Die erhaltenen Peptidsequenzen sind dabei in Tabelle 6 aufgeführt. Die Bezeichnung 48 kDa-Bande wird im weiteren Verlauf synonym zu 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase verwendet.

Sequenzierte Proteinbande	Länge [AS]	Aminosäureabfolge
48 kDa-Bande	9	SPEEQHPVK
	11	SVVSTIGGSTK
	8	FVFRFPEK
	13	(A)Y(G)WAARDSSGIL

Tab. 6 Aminosäuresequenzen der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase im Einbuchstaben-Code. Die nach Verdau mit Endoproteinase LysC erhaltenen unsicheren Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

2.5 Datenbanksuchen zum Auffinden homologer Sequenzen

Ziel der Datenbanksuche war es, zu den in Tab. 5 und 6 aufgeführten Aminosäuresequenzen homologe Sequenzstücke anderer schon bekannter und vielleicht schon charakterisierter und klassifizierter Proteine zu finden. Damit könnte man, im Falle hoher Homologien, die Lage der einzelnen Aminosäurestücke im Protein feststellen. Aus dem Hinweis, welche Peptidfragmente mehr zum N- bzw. C-Terminus tendieren, kann man Schlüsse daraus ziehen, welche Aminosäuresequenzen zunächst für die Bildung entsprechender, degenerierter Forward- bzw. Reverse-Primer herangezogen werden sollten. Ebenfalls kann dadurch die erwartete Größe des durch PCR zu amplifizierenden cDNA-Stücks abgeschätzt werden.

Die Suche nach Homologien für die Aminosäuresequenzen beider Reduktasen wurde mit NCBI, FASTA und ExPASy (III.4) durchgeführt. Die Tabelle 7 führt die erhaltenen Ergebnisse auf, wobei die Bezeichnung "Probable" oder "Putative" auf die noch ausstehende Charakterisierung des Enzyms abzielt. Die

Angabe einer Funktion beruht in diesen Fällen nur auf Homologieähnlichkeiten und ist noch nicht bestätigt worden.

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		(K) AYGVAARDSSGVLSPFK	absolut	[%]	absolut	[%]	
AG	12	KAFGWAAARDTTGLLSPFK	29	13/18	72	17/18	94
FxA	10	KASGWAARDSSGVLSPF	26	15/17	88	15/17	88
AT	8	EAFGLAAKDNSGVLSPF	24	12/17	70	17/17	100

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		(L) AINHLGADAF	absolut	[%]	absolut	[%]	
AT 1	223	AINHLGADSF	232	9/10	90	10/10	100
BN/BO	32	AINRLGADSF	41	8/10	80	9/10	90

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		(K) VLYCGICHSD	absolut	[%]	absolut	[%]	
FxA 1	41	KVLYCGICHSD	51	11/11	100	11/11	100
MC	44	KVLYCGICHSD	54	11/11	100	11/11	100

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		YPIVPGHEIVGV	absolut	[%]	absolut	[%]	
AG	66	YPIVPGHEIVGV	77	12/12	100	12/12	100
LP	60	YPIVPGHEIVGV	71	12/12	100	12/12	100
TM	52	YPIVPGHEIVGV	63	11/12	91	12/12	100

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		SPEEQHPVK	absolut	[%]	absolut	[%]	
PT	4	SPEEHPVK	12	8/9	88	9/9	100

Enzym	Sequenzvergleich für:		Identische AS		Positive AS		
		WAARDSSGIL	absolut	[%]	absolut	[%]	
FxA	14	WAARDSSGVL	23	9/10	90	10/10	100
OS	13	WAARDPSGIL	22	9/10	90	9/10	90

Tab. 7 Sequenzvergleiche von den erhaltenen Peptidfragmenten der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase mit Sequenzen verschiedener anderer Proteine aus Datenbanken. Legende nächste Seite.

Legende zu Tabelle 7:

In der Tabelle 7 wurde zu den Peptidstücken der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (IV.2.4.1 und IV.2.4.2) Ausschnitte der gefundenen Sequenzhomologien aufgeführt. Dabei sind Aminosäuren im Einbuchstaben-Code wiedergegeben und unsichere Aminosäuren in Klammern gestellt. Bei 6 Fragmenten konnten homologe Bereiche anderer Proteine aufgefunden werden. Zu den beiden Peptidfragmenten: SVVSTIGGSTK und FVFRFPEK der 48 kDa-Bande konnten keine ähnlichen Sequenzen gefunden werden; ebenso nicht bei folgender Aminosäureabfolge: (A)Y(G)WAARDSSGIL (48 kDa-Bande). Erst nach Weglassen der ersten drei Aminosäuren, unter denen sich zwei unsichere befanden, war die Suche erfolgreich. Absolut identische Bereiche sind in der Tabelle grau unterlegt. Um dies nochmal in Zahlen zu verdeutlichen ist der absolute und prozentuale Anteil der Aminosäuren in der Spalte: identische Aminosäuren angegeben. Bei einem Austausch ähnlicher Aminosäuren - Struktur und Ladung ist dabei durchaus vergleichbar - wurde entsprechend grün unterlegt. In der Regel wird damit keine Veränderung von Struktur oder Funktion des Enzyms hervorgerufen. Die Zahlenwerte dazu sind in der Spalte: positive Aminosäuren zu finden. Rot gekennzeichnet sind Aminosäuren mit zur Ursprungssequenz völlig anderen Eigenschaften, so daß die Struktur und Funktion des Proteins deutlich abgewandelt sein kann.

Folgende Proteinsequenzen wurden für den Vergleich herangezogen:

Abkürzung:	Enzym und Herkunftsorganismus:
AT	Probable MTD 2 / CAD (Eli 3-1 oder Eli 3-2) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)
PT	Sinapyl Alkohol Dehydrogenase aus <i>Populus tremuloides</i> (Zitter-Pappel)
AG	MTD aus <i>Apium graveolens</i> (Echter Sellerie)
LP	CAD aus <i>Lolium perenne</i> (Englisches Weidelgras)
TM	Zink enthaltende Alkohol Dehydrogenase aus <i>Therotoga maritima</i> (Bakterium)
FxA	Probable MTD oder CAD aus <i>Fragaria x Ananassa</i> (Erdbeere x Ananas)
MC	CAD (Eli 3) <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (Eiskraut)
BN/BO	CAD aus <i>Brassica napus / Brassica oleracea</i> (Raps, Gemüse Kohl)
AT 1	CAD 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)
OS	Putative CAD aus <i>Oryza sativa</i> (Reis)

3 Charakterisierung der Vomilenin- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase

Für die Bestimmung charakteristischer Eigenschaften eines Enzyms ist es notwendig, hoch aufgereinigte Proteinfractionen aus Pflanzenzellkulturen zu verwenden. Noch besser geeignet wären die aufgereinigten, heterolog aktiv exprimierten Enzyme, deren "tag" unmittelbar vor der Testung abgespalten worden wäre. Da letztere Möglichkeit nicht gegeben war, wurde verstärkt darauf geachtet, einen schnellen, zuverlässigen und reproduzierbaren Enzymtest zu verwenden, um möglichst genaue Resultate zu erzielen. Die Assay-Zusammensetzungen, die Inkubationsbedingungen sowie die Einstellungen für die HPLC-Analyse entsprechen – sofern nicht anders erwähnt – den Standard-Bedingungen (III.1.8; III.2.2)

3.1 pH-Optima

Die Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Vomilenin Reduktase- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reaktion erfolgte unter Einsatz zweier Puffersysteme. Damit konnte der pH-Bereich von 3.6 – 8.8 abgedeckt werden. Mit dem Citrat-Phosphat-Puffer wurden die Ansätze von pH 3.6 – 7.8 eingestellt und von pH 4.8 – 8.8 wurde ein reiner Phosphat-Puffer verwendet. Da der pH-Wert des Puffers durch Mischen der jeweiligen Stammlösungen zustande kam (II.3), wurden pro pH-Wert-Messung 3 Proben und eine Kontrollreaktion angesetzt. In dem dabei erhaltenen "Kontroll"-pH-Wert wurden somit nicht nur Mischungsfehler, sondern auch die pH-Verschiebung durch die Zugabe der schon zuvor gepufferten Enzymlösung berücksichtigt.

3.1.1 pH-Abhängigkeit des Vomilenin-Umsatzes

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Vomilenin-Umsatzes wurden aufgereinigte Vomilenin Reduktase-Fractionen mit einer spezifischen Aktivität von 45 pkat/mg herangezogen. Diese wurden in einem Standard Vomilenin Assay über 1.5 h bei 550 Upm und 30 °C inkubiert, gefolgt von der in III.2.2 beschriebenen HPLC-Auftrennung. Die Unterschiede zwischen den theore-

tischen und den tatsächlichen, gemessenen pH-Werten sind in Tab. 8 wiedergegeben.

Tab. 8 Gegenüberstellung von pH-Sollwerten und gemessenen pH-Istwerten bei der Bestimmung des pH-Optimums der Vomilenin Reduktase.

Citrat-Phosphat-Puffer		Phosphat-Puffer	
pH-Sollwert	pH-Istwert	pH-Sollwert	pH-Istwert
3.6	3.84	4.80	4.73
4.0	4.21	5.00	4.97
4.4	4.63	5.40	5.52
5.0	5.15	5.60	5.81
5.4	5.47	5.80	5.85
5.6	5.68	6.00	6.17
5.8	5.88	6.20	6.25
6.0	6.08	6.40	6.39
6.2	6.28	6.60	6.53
6.4	6.56	7.20	7.18
7.0	7.28	7.60	7.68
7.4	7.77	8.40	8.33
7.8	8.13	8.80	8.96

Die Korrelation zwischen der relativen Aktivität und dem jeweiligen, tatsächlichen pH-Wert im Ansatz zeigt Abb. 19, wobei das detektierte Optimum der Reaktion zwischen pH 5.8 – 6.2 liegt.

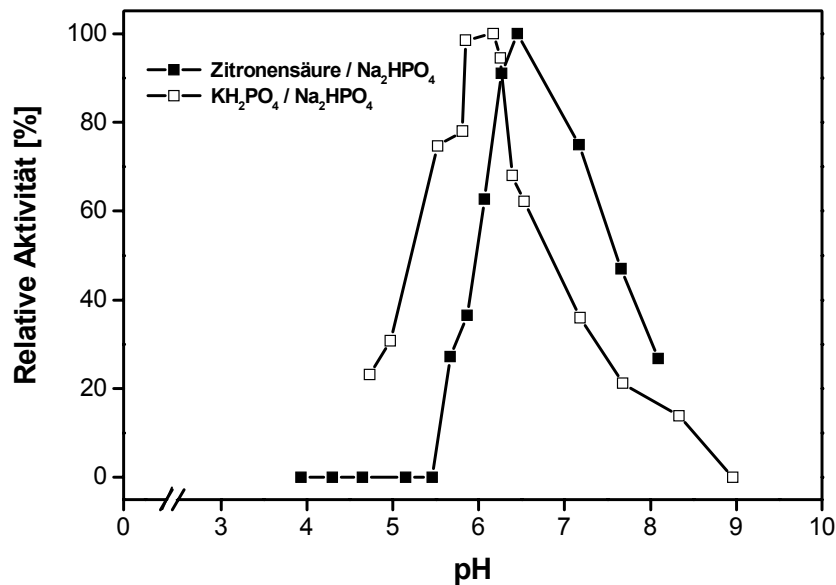


Abb. 19 pH-Abhängigkeit der Vomilenin Reduktase-Aktivität. Das Optimum liegt zwischen pH 5.8 und 6.2.

3.1.2 pH-Optimum der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase

Der Einfluß des pH-Wertes auf die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität wurde durch Inkubation von ca. 60-fach angereicherten Fraktionen in einem 50 µl umfassenden 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Assay (III.1.8) untersucht. Nach 15-minütiger Inkubation bei 30 °C und 550 Upm erfolgte der HPLC-Aufschluß (III.2.2). Es wurden auch hier analog IV.3.1 Kontrollwerte bestimmt, die die pH-Abweichung des Ansatzes vom theoretisch eingestellten pH-Wert des Puffers anzeigen sollten (Tab. 9).

Tab. 9 Gegenüberstellung von pH-Sollwerten und gemessenen pH-Istwerten bei der Bestimmung des pH-Optimums der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Citrat-Phosphat-Puffer		Phosphat-Puffer	
pH-Sollwert	pH-Istwert	pH-Sollwert	pH-Istwert
3.6	3.66	5.10	5.12
4.0	4.04	5.40	5.28
4.4	4.38	5.70	5.44
5.0	4.90	6.00	5.66
5.4	5.22	6.20	5.82
5.6	5.40	6.40	6.08
5.8	5.59	6.60	6.32
6.0	5.78	6.80	6.52
6.2	5.98	7.00	6.74
6.4	6.17	7.40	7.23
6.6	6.34	8.00	7.95
7.0	6.86	8.40	8.24
7.4	7.36	8.60	8.53
7.8	7.87	8.80	8.87

Nach Ermittlung des "Ist-pH-Wertes" im Reaktionsansatz wurde dieser in Abhängigkeit zur gemessenen relativen Aktivität aufgetragen (Abb. 20). Das pH-Optimum der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase liegt demnach bei pH 6.0.

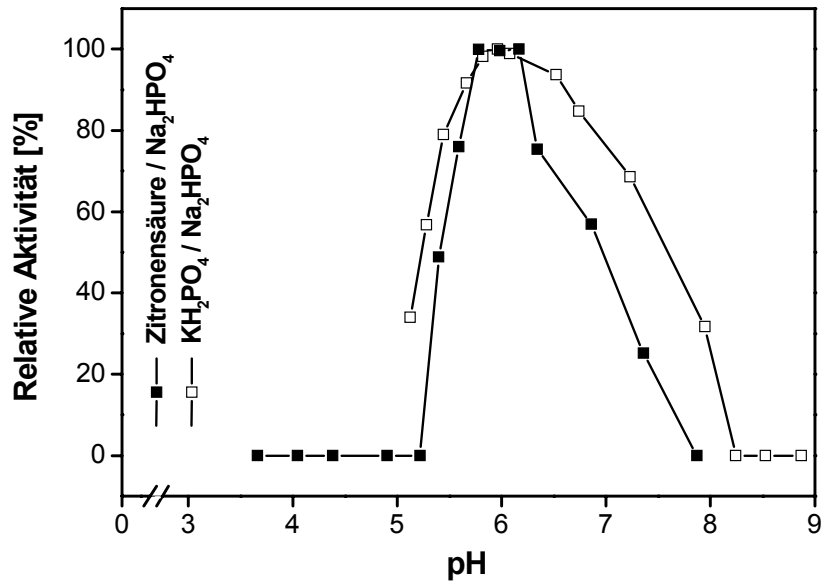


Abb. 20 Korrelation pH-Wert – relative Aktivität der 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase.

3.2 Bestimmung der Temperatur-Optima der Vomilenin- und 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase

Zunächst wurde ein Zellaufschluß mit anschließender SOURCE 30Q Chromatographie (IV.2.2.2 und IV.2.3.2) durchgeführt. Die dadurch angereinigten und voneinander getrennten Reduktase-Aktivitäten wurden in der Folge separat bei Temperaturen von 20 °C bis 80 °C inkubiert.

Der Vomilenin Reduktase-Assay bestand aus: 155 µl Enzymlösung (0.53 pkat), 20 µl 0.5 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6.2), 20 µl NADPH₂ (20mM) und 5 µl Vomilenin (5.65 mM). Nach erfolgter Inkubation über 1 h 40 min konnte der Vomilenin-Umsatz durch HPLC-Untersuchungen ermittelt werden. In Abb. 21 ist die Temperatur-Abhängigkeit des Substratumsatzes durch die Vomilenin Reduktase dargestellt. Das Maximum der Reduktase-Aktivität liegt bei 30 °C. Temperaturen über 45 °C führen zu einer signifikanten Abnahme der Vomilenin-Reduktion. Dies ist ein erneuter Hinweis auf die hohe Empfindlichkeit und Instabilität der Vomilenin Reduktase.

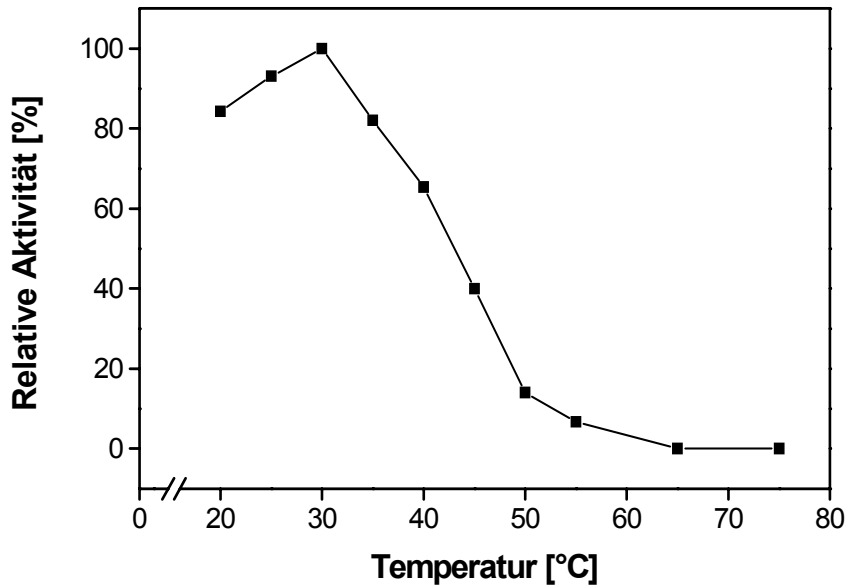


Abb. 21 Temperatur-Optimum der Vomilenin Reduktase.

Der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Assay zur Temperaturoptimum-Bestimmung enthielt 25 μ l Enzymlösung (5.35 pkat), 5 μ l 0.5 M KP_i -Puffer (pH 6.0), 5 μ l NADPH (10 mM), 5 μ l 1.2-Dihydrovomilenin (4 mM) und 5 μ l Seral- H_2O . Inkubiert wurde für 15 min bei 20 °C bis 75 °C.

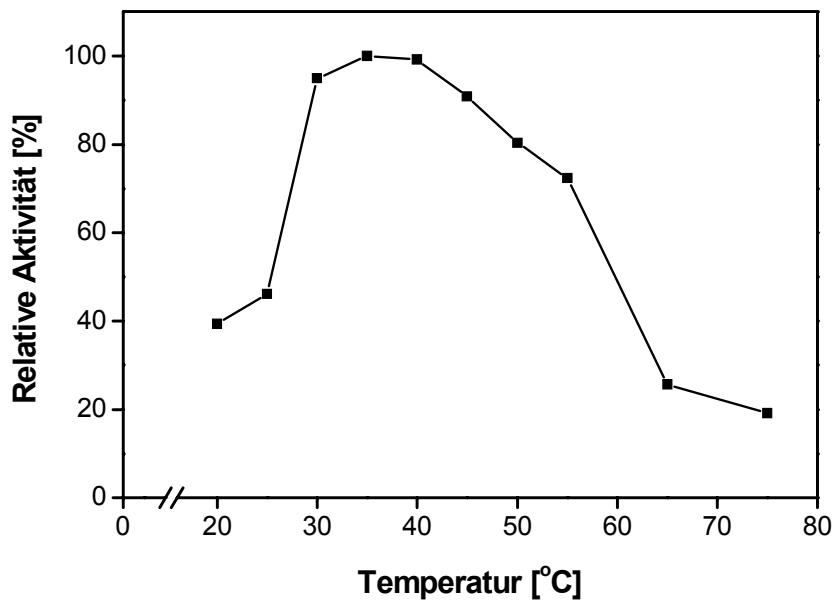


Abb. 22 Temperaturabhängige Aktivität der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Maximale 1.2-Dihydrovomilenin-Umsätze werden bei 35 °C bis 40 °C erzielt. Aber auch bei Temperaturen darüber hinaus ist noch eine bedeutende

1.2-Dihydrovomilenin-Reduktion zu erkennen. Die Reduktase wird erst bei Temperaturen über 55 °C signifikant inaktiviert.

3.3 Test auf Glykosylierungen der Vomilenin- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase mittels Enzym-Immunoassay

Mit dem Enzym-Immunoassay sollte überprüft werden, ob die Reduktasen post-translational verändert – in dem Fall – glykosyliert worden sind. Als Vorarbeit dafür mußten die Reduktasen aus *R. serpentina* Zellsuspensionskulturen aufgereinigt werden. Die Anreicherung erfolgte nach den beschriebenen, optimierten Reinigungsprotokollen (IV.2.2; IV.2.3). Die dabei erhaltenen Proteinfractionen wurden über SDS-PAGE getrennt. Zusätzlich wurden die Standardproteine Creatinase – als Negativkontrolle – und das Glykoprotein Transferrin – als Positivkontrolle – auf zwei separate Bahnen sowie das LMW-Markerproteingemisch (II.8; III.1.6.6) auf eine weitere Bahn aufgetragen. Nach der Elektrophorese diente ein Westernblot (III.1.6.4) der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Die weitere Aufarbeitung des Blots wurde, wie im Herstellerprotokoll des DIG Glycan Detection Kits (II.7) beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden benachbarte Hydroxylgruppen von Zuckern der Glykokonjugate durch schonende Perjodatbehandlung zu Aldehydgruppen aufoxidiert. Das Steroid-Hapten Digoxigenin kann jetzt über einen Spacer, einer Hydrazidgruppe, kovalent an die Aldehydgruppen binden, die somit Digoxigenin-markiert sind. Glykokonjugate werden dann durch Zugabe einer Farbstoffvorstufe mittels Enzym-Immunoassay nachgewiesen. Ebenfalls wird ein digoxigeninspezifischer Antikörper, der seinerseits mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet letztlich einen Phosphatrest der Farbstoffvorstufe ab, wodurch die eigentliche Farbreaktion hervorgerufen wird.

Nach der Durchführung des Tests ergab sich folgendes Bild: die Negativkontrolle zeigte keinerlei Färbung. Bei der Positivkontrolle war eine Bande zu erkennen und die beiden Bahnen der aufgereinigten Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen zeigten wiederum keinerlei Reaktion. Demnach dürften die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase keine Glykoproteine darstellen.

3.4 Molekulargewichtsbestimmung

Für die anstehenden Messungen wurde auf die Methodik der Gelfiltration zurückgegriffen. Bei Annahme einer globulären Struktur der zu trennenden Enzyme sowie gleicher Ladungsdichte ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen, "Wanderungsgeschwindigkeit der Enzyme", und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Um das Problem der Ladungsdichte, bzw. die daraus resultierenden, unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu minimieren, wurde dem Elutionspuffer 0.15 M NaCl zugesetzt. Somit sind die kleinen Abweichungen, die mit dieser Methode bestimmten Molekulargewichte vom realen Molekulargewicht fast ausschließlich auf die Molekülstruktur zurückzuführen. Deshalb werden die für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase erhaltenen Molekulargewichte mit einer Schwankungsbreite von $\pm 5\%$ angegeben. Die Eichung der Gelfiltrationssäulen erfolgte immer am Tag der Molekulargewichtsbestimmung. Als interner Standard wurde eine Mischung aus BSA (67 kDa), Albumin aus Hühnerei (45 kDa), α -Chymotrypsin (25 kDa), Myoglobin (17.8 kDa) und Cytochrom C (12.5 kDa) angesetzt, die dann über die jeweilige Säule aufgetrennt wurde.

Die Hälfte der nach HiTrap Blue Chromatographie (IV.2.2.6) gewonnenen Vomilenin Reduktase-Fractionen wurde unter Verwendung von Microcon-Konzentratoren (III.1.3) bei 4 °C auf 2 ml eingeeengt. Davon wurde 1 ml auf eine vorgeeichte Sephacryl S-100 HR Säule (III.1.5.5.1) mit einer Flußrate von 0.5 ml/min aufgetragen. Zum Eluieren wurde ein 50 mM Tris-HCl-Puffer mit 0.15 M NaCl (pH 7.3) bei gleicher Flußrate verwendet. Das Maximum der eluierten Vomilenin Reduktase-Aktivität korrelierte mit einem Molekulargewicht von 44 kDa ± 5 Prozent.

Der andere *Milliliter* der eingeeengten Vomilenin Reduktase-Lösung wurde über eine Superdex 75 Säule (III.1.5.5.2) getrennt. Die Probenaufgabe und Elution erfolgten mit einer Flußrate von 0.5 ml/min wobei der bei Sephacryl S-100 genannte Elutionspuffer verwendet wurde. Nach Superdex 75 Chromatographie konnte bei einem Maximum an Aktivität nach 11.03 ml Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 42.93 kDa ermittelt werden (Abb. 23).

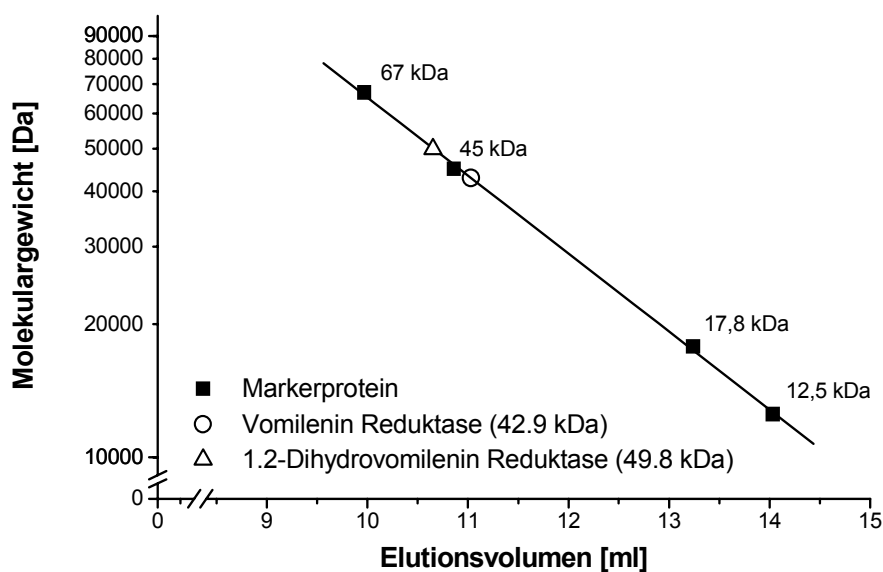


Abb. 23 Molekulargewichtsbestimmung für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase an Superdex 75.

Auch für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase wurde das Molekulargewicht mittels Größenausschlußchromatographie bestimmt. Dazu wurden nach dem o.g. Protokoll (IV.2.3) über 4 säulenchromatographische Schritte ca. 80-fach angereicherte 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen erhalten. Von diesen Proteinlösungen wurden 2 ml der aktivsten Fractionen mit Microcon-Konzentratoren (III.1.3) auf 140 μ l eingengt. Die Probenaufgabe sowie die Elution mit 50 mM Tris-HCl und 0.15 M NaCl (pH7.3) wurden mit einer Flußrate von 0.5 ml/min durchgeführt. Aufgefangen wurden Fractionen zu 0.25 ml. Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktion zu 17-O-Acetylnorajmalin war nach einem Elutionsvolumen von 10.65 ml am stärksten. Unter Einbeziehung der Eichgeraden ergibt dies ein Molekulargewicht von 49.8 kDa \pm 5 % (Abb. 23).

Das Molekulargewicht eines Proteins läßt sich auch nach Auftrennung im SDS-Gel bestimmen. Dazu wird die Proteingröße in Relation zur im Gel migrierten Strecke bzw. dem R_f -Wert gesetzt. Abb. 24 zeigt das im SDS-Gel ermittelte Molekulargewicht der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase bei 48 kDa.

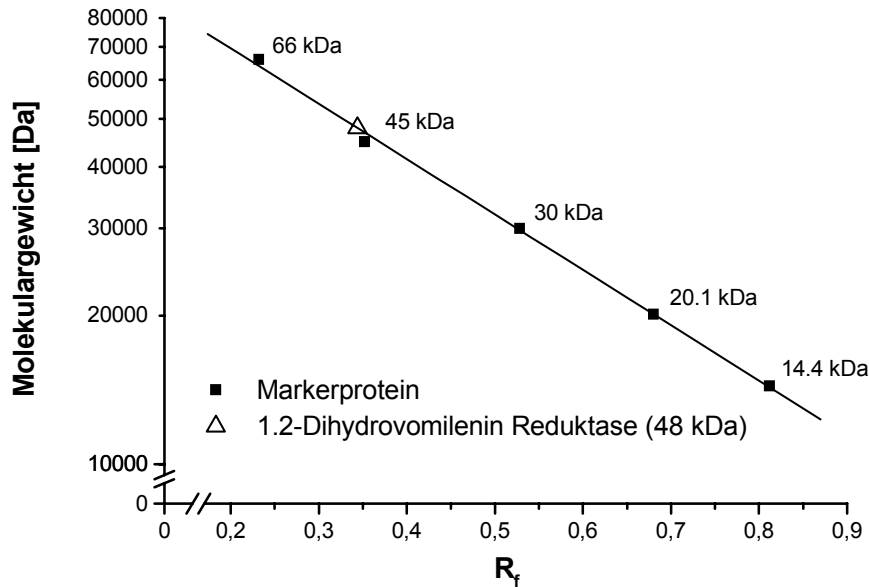


Abb. 24 Molekulargewichtsbestimmung der 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase im SDS-Gel. Aufgetragen ist der R_f-Wert der Markerproteine gegen das Molekulargewicht. Die 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase besitzt einem R_f-Wert von 0,34. Dies entspricht einer Größe von 48 kDa.

3.5 Co-Substratspezifität

In vorangegangenen Experimenten konnte eine schon von STÖCKIGT et al. (1983) beschriebene NADPH-abhängige Reduktion bestätigt werden. Infolgedessen wurden die unter III.1.8 und III.2.2 beschriebenen Testsysteme aufgebaut, um das an der Reaktion beteiligte Enzym bzw. die beteiligten Enzyme zu untersuchen und die Aktivitäten zu ermitteln. Nach erfolgreicher Trennung der beiden Reduktasen (IV.2.2.1) standen zwei separate Fraktionen zur Verfügung, die jeweils eine Reduktase enthielten. Jetzt konnte geklärt werden, ob die Vomilenin- oder die 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase nur NADPH₂ oder aber auch NADH₂ als Reduktionsäquivalent akzeptieren. Der dafür vorbereitete Inkubationsansatz mit 200 µl Gesamtvolumen enthielt 155 µl Enzymlösung, 20 µl 0,5 M KP_i-Puffer (pH 7,0) und je nach getestetem Enzym 0,14 mM Vomilenin oder 0,4 mM 1,2-Dihydrovomilenin. Zum Schluß wurden den einzelnen Ansätzen 20 µl Cofaktor mit unterschiedlicher Konzentration und dem Kontrollansatz 20 µl Seral-H₂O zugesetzt. Die Inkubation mit anschließender Auswertung wurde standardmäßig durchgeführt. Dabei konnte die NADPH₂-

Abhängigkeit für beide Reduktasen erneut belegt werden und gleichzeitig eine NADH₂-Abhängigkeit ausgeschlossen werden.

Co-Substrat	Vomilenin Reduktase	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase
Endkonz. [mM]	rel. Aktivität [%]	rel. Aktivität [%]
NADPH ₂ 1	100	100
NADPH ₂ 1.5	100	100
NADPH ₂ 2	100	100
NADH ₂ 1	0	0
NADH ₂ 1.5	0	0
NADH ₂ 2	0	0
Kontrolle (H ₂ O)	0	0

Tab. 10 Co-Substrat-Abhängigkeit der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

3.6 Substratspezifitäten

Wie vorangehend beschrieben, konnten auf dem Weg der Vomilenin-Reduktion über das Intermediat 1.2-Dihydrovomilenin und der weiterführenden Reduktion zum 17-O-Acetylnorajmalin zwei beteiligte Reduktasen isoliert und aufgereinigt werden. Die endogenen Substrate der Reduktasen, das Vomilenin und das 1.2-Dihydrovomilenin, unterscheiden sich lediglich durch eine (hydrierte) Doppelbindung im Indolteil des Moleküls. Dies weist auf eine sehr hohe Substratspezifität hin. Um die Frage der Substratakzeptanz weiter zu untersuchen und die Reaktionsabfolge endgültig zu bestätigen, wurden nachstehende Enzympräparationen durchgeführt. Für beide Reduktasen wurde das optimierte Reinigungsprotokoll aus IV.2.2.1 und IV.2.3.1 angewandt und die jeweils nach Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen eingesetzt. Die Inkubationen wurden nach dem in III.1.8 beschriebenen Vomilenin Reduktase-Assay und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Assay durchgeführt. Dabei wurden zu den eigentlichen Substraten der beiden Reduktasen noch verschiedene weitere Substrate (Tab. 11) eingesetzt. Die Endkonzentration aller Substrate im Assay betrug 0.2 mM. Die Ergebnisse nach der HPLC-Analyse sind in

Tabelle 11 zusammengefaßt. Die Strukturformeln der Substrate und weitere analytische Daten finden sich in VII.1.2.

Substrate	Vomilenin Reduktase Relative Aktivität [%]	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Relative Aktivität [%]
Vomilenin	100	0
2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenin	0	0
2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin	0	100
20 α -(S)-19.20-Dihydrovomilenin	0	0
Polyneuridinaldehyd	0	0
Raucaffricin	0	0
Vinorin	0	0

Tab. 11 Substratazeptanz der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Nachdem in minder aufgereinigten Fraktionen der Vomilenin Reduktase ein ca. 30 %iger Umsatz des Vinorins festgestellt werden konnte, war in den hoch aufgereinigten Fraktionen ausschließlich ein Vomilenin-Umsatz detektierbar. Das gleiche gilt für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase, bei der eine selektive Reduktion des 1.2-Dihydrovomilenins zu 17-O-Acetylnorajmalin zu beobachten war. Für beide Reduktasen konnte bis jetzt kein weiteres Substrat gefunden werden.

3.7 Metallionenabhängigkeit

Im Zuge der Co-Faktor- und Substratabhängigkeitsuntersuchungen sollte ebenfalls geklärt werden, ob die Vomilenin Reduktase eine Metallionenabhängigkeit aufweist. Durch die nach S 30Q Chromatographie erhaltenen Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen war eine voneinander unabhängige Bestimmung für die Vomilenin Reduktase gewährleistet. Insgesamt wurden 7 unterschiedliche Salze sowie eine Negativkontrolle, die nur mit EDTA und anschließend nicht mit Metallionen versetzt wurde, getestet. Als Positivkontrolle diente eine nicht mit EDTA vorbehandelt Enzymfraktion. Es wurden jeweils zwei Ansätze pro Reaktion pipettiert, die alle auf eine "Stamm-Inkubation" zurückgingen. In dieser Vorinkubation wurden 1.5 ml Vomilenin

Reduktase mit einer Aktivität von 5.1 pkat mit 100 µl EDTA (25 mM) versetzt, gemischt und 30 min lang bei 25 °C inkubiert. Dabei sollte dem Enzym das vielleicht essentielle Kation entzogen werden. Die Aktivität sollte daraufhin abnehmen oder im Idealfall gar nicht mehr detektierbar sein.

Im Anschluß daran wurden je 75 µl dieser Vorinkubation mit 10 µl NADPH₂ (10 mM), 10 µl 0.5 M KP_i-Puffer (pH 7.0) und 5 µl Vomilenin (1.4 mM) versetzt. Nach Zugabe der entsprechenden Metallionen (2 mM Endkonzentration) wurde geschüttelt und erneut 2 h lang inkubiert. Der Vomilenin-Umsatz wurde dann unter Standardbedingungen mit der HPLC gemessen. Die Abbildung 25 gibt die Rekonstituierten Vomilenin Reduktase-Aktivitäten nach Metallionenzugabe wieder. Am erfolgreichsten verlief die Wiederherstellung der Aktivität mit CoCl₂ und NiSO₄ wobei mit NiSO₄ sogar eine Aktivitätssteigerung auf fast 110 % erzielt werden konnte. Bei Inkubation mit EDTA ohne darauffolgende Metallionenzugabe war ein kompletter Aktivitätsverlust zu verzeichnen.

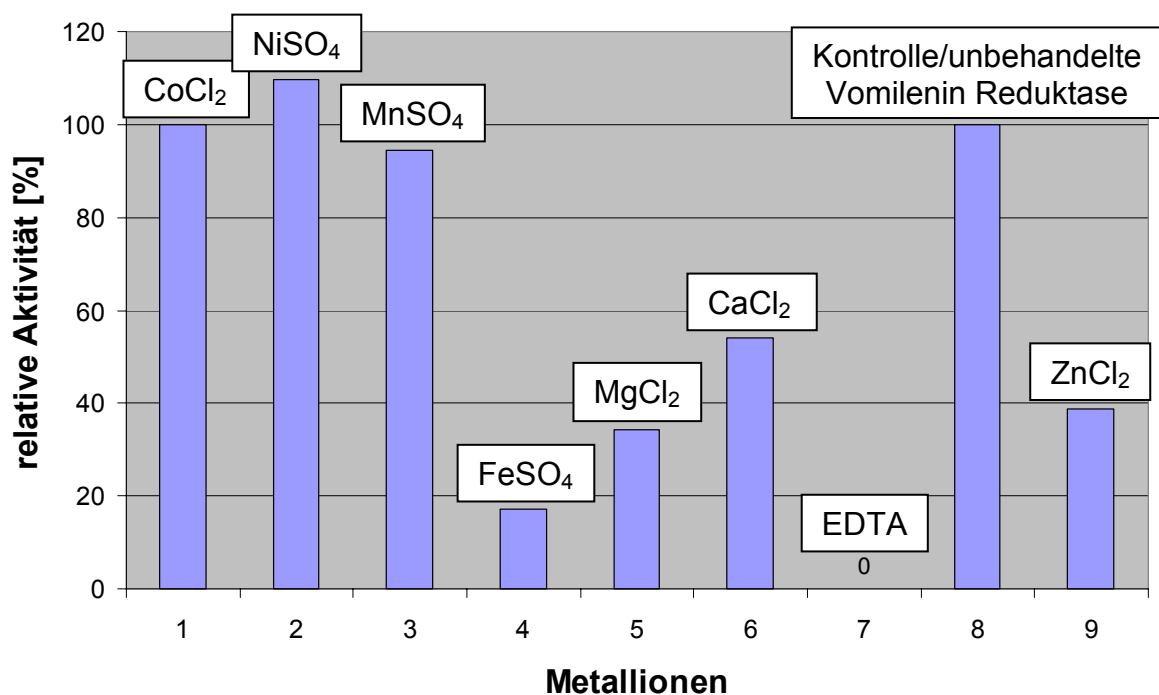


Abb. 25 Rekonstitution der Vomilenin Reduktase-Aktivität nach Zugabe von Metallionen. Zuvor wurde die Reduktase-Fraktion mit EDTA behandelt, was zum kompletten Verlust der Vomilenin Reduktase-Aktivität führte.

3.8 Taxonomische Verbreitung

Wie auch schon die Substratspezifität der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase gezeigt hat, wird von jeder Reduktase selektiv nur ein Alkaloid umgesetzt. Die zu reduzierenden Alkaloide unterscheiden sich nur minimal in der Struktur. Daher liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den involvierten Reduktasen nicht nur um spezifische Enzyme für alkaloidführende Pflanzen handelt, sondern daß hier essentielle Enzyme für die Ajmalinbiosynthese vorliegen, die auf die Gattung *Rauvolfia* beschränkt sind. Um dies zu verfolgen, wurden die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivitäten in verschiedenen *Rauvolfia*-Arten, in alkaloidführenden Pflanzen derselben und auch anderer Familien sowie in einigen weiteren Pflanzen getestet.

Die dafür angesetzten Enzympräparationen gingen alle auf Pflanzenzellsuspensionskulturen zurück, die nach 10 Tagen Wachstum in LS-Medium geerntet wurden (II.1.2). Zur Herstellung der Proteinextrakte wurde das filtrierte und mit flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Gewebe zunächst ca. 30 s gemahlen und danach mit gleicher Menge an Aufschlußpuffer (100 mM Tris-HCl mit 20 mM; pH 8.0) versetzt. Über einen Zeitraum von 20 min wurden die Zellen zuerst bei Raumtemperatur getaut und danach für 30 min bei 4 °C extrahiert (Rotationsschüttler, 700 Upm). Nach 25-minütiger Zentrifugation bei 10 000 × g wurde der Überstand mit 75 % Ammoniumsulfat Sättigungskonzentration (entspricht 516 g/l) versetzt. Nach dem Lösen des Ammoniumsulfats bei RT wurden die Proteine 55 min lang bei 4 °C ausgefällt und anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 10 000 × g abgetrennt. Das Pellet wurde mit 1 ml Puffer (50 mM KP_i und 150 mM NaCl; pH 7.0) resuspendiert und die Suspension für 5 min bei 10 000 × g zentrifugiert. Um den Überstand von gelösten Begleitstoffen, wie z.B. Alkaloiden und anderen niedermolekularen Stoffen zu befreien, wurde dieser auf eine HiTrap Desalting Säule (III.1.5.5.3) geladen und mit 50 mM KP_i -Puffer (pH 7.0) + 150 mM NaCl eluiert. Da durch diesen Zellaufschluß keine Trennung der Reduktasen erfolgte, wurde zur Bestimmung der relativen Reduktase-Aktivität der Anstieg des Endproduktes, 17-O-Acetylnorajmalin, herangezogen. Der Substratumsatz der einzelnen Reduktionsschritte konnte somit nicht erfasst werden.

Pflanzenzellkultur	Familie	Relative Reduktase-Aktivität [%]
<i>Rauvolfia serpentina</i> (BENTH. EX KURZ)	Apocynaceae	+
<i>Rauvolfia chinensis</i> (HEMSL.)	Apocynaceae	-
<i>Rauvolfia mannii</i> (STAPF)	Apocynaceae	+
<i>Rauvolfia mombasiana</i> (STAPF)	Apocynaceae	+
<i>Rauvolfia verticillata</i> (LOUR.)	Apocynaceae	-
<i>Catharanthus roseus</i> (L.)	Apocynaceae	-
<i>Gossypium hirsutum</i> (L.)	Malvaceae	-
<i>Lonicera morowii</i> (L.)	Caprifoliaceae	-
<i>Nicotiana tabacum</i> (L.)	Solanaceae	-
<i>Saponaria officinalis</i> (L.)	Caryophyllaceae	-
<i>Solanum lycopersicum</i> (L.)	Solanaceae	-

Tab. 12 Taxonomische Verbreitung der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist, konnte eine Vomilenin- bzw. 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität nur bei *Rauvolfia*-Arten nachgewiesen werden. *Catharanthus roseus*, ebenfalls eine alkaloidproduzierende Apocynaceae, wies keine Reduktase-Aktivität auf; Pflanzen anderer Familien ebenfalls nicht. Was hingegen sehr auffällig erscheint, ist die ausbleibende 17-O-Acetylnorajmalin-Produktion in *Rauvolfia chinensis* und *Rauvolfia verticillata*. Auch dies könnte wieder ein Hinweis auf die äußerst unbeständige Bildung der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase in *Rauvolfia*-Arten sein.

3.9 Verlauf der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Produktion in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer einer *R. serpentina* Zellsuspensionskultur

Um den günstigsten Zeitpunkt für die Zellernte festzulegen, mußte zunächst der zeitliche Verlauf der Reduktase-Aktivitäten während des Wachstums der Zellen verfolgt werden. Hierzu wurden 3 Erlenmeyerkolben nach 7 Tagen Wachstum in LS-Medium mit insgesamt 480 g Zellmasse miteinander gemischt und abfiltriert.

Je 80 g des filtrierten Zellmaterials wurden dann in einen neuen 1 L Erlenmeyerkolben mit je 200 ml frischem LS-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (II.1.2). Nach 4 Tagen wurde damit begonnen, alle 2 Tage eine Kultur zu ernten und mit flüssigem Stickstoff tiefzufrieren. Somit konnten nach dem 14. Wachstumstag alle tiefgefrorenen Kulturen parallel aufgeschlossen werden. Die Gewinnung des Proteinextraktes mit nachgeschalteter Inkubation und HPLC-Auftrennung wurde nach der in VI.3.8 beschriebenen Methode angefertigt. Dadurch war es auch hier unmöglich, Absolutwerte für die einzelne Reduktase zu bestimmen, da die auf dieser Reinigungsstufe nicht abtrennbare 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase das Zwischenprodukt 1.2-Dihydrovomilenin direkt zu 17-O-Acetylnorajmalin weiterreduzierte. Das Maß der 17-O-Acetylnorajmalin-Produktion wurde letztlich als Marker für die zeitabhängige Bildung der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase in Abbildung 26 herangezogen.

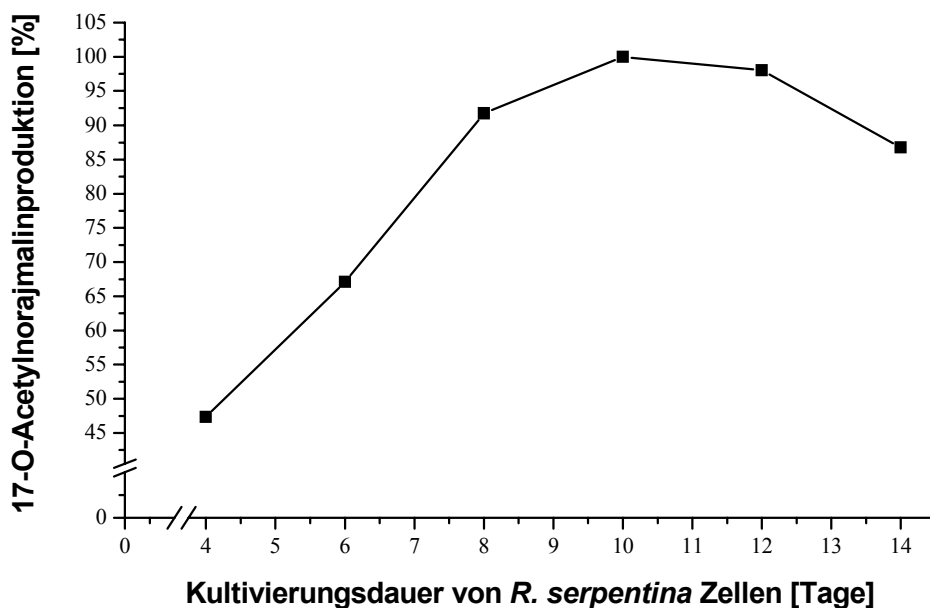


Abb. 26 Zeitlicher Verlauf der 17-O-Acetylnorajmalin-Produktion in *Rauvolfia serpentina* Zellen als indirektes Maß für die Expression der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

4 Molekularbiologischer Teil

Die Peptidsequenzierung (IV.2.4) mit der anschließenden Datenbanksuche und den Sequenzvergleichen (IV.2.5) bildeten die Voraussetzung für die molekularbiologische Arbeit. Aufgrund der hohen, selektiven Homologien zu anderen NADPH-abhängigen Proteinen wie z.B. Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen (CAD), Mannitol Dehydrogenasen (MTD) und einer Sinapylalcohol Dehydrogenase ist zu erwarten, daß es sich bei den sequenzierten Proteinen ebenfalls um NADPH-abhängige Reduktasen / Oxidoreduktasen handelt. Durch die Sequenzvergleiche konnte auch die Position der einzelnen Peptidfragmente ermittelt werden, woraus man wertvolle Hinweise für die Primerentwicklung gewinnt. Davon ausgehend sollten die mehr zum N-Terminus gelegenen Sequenzstücke zur Ableitung von degenerierten Forward-Primern (sense-Primern) dienen und die eher zum C-Terminus tendierenden Peptide als Vorlage für die entsprechenden Reverse-Primer (antisense-Primer) herangezogen werden. Lediglich bei der 40 kDa-Sequenz (L)AINHLGADAF gab es eine große Diskrepanz bezüglich der Lage in der CAD 1 aus *Arabidopsis thaliana* 1 und der CAD aus *Brassica napus/Brassica oleracea* (IV.2.5). Während bei *Arabidopsis thaliana* 1 eine C-terminale Lage (AS 223 – 232) zu erwarten wäre, ist hingegen bei *Brassica napus/Brassica oleracea* eine N-terminale Position (AS 32 – 41) die wahrscheinlichere.

Aus der Kenntnis dessen bieten sich mehrere Vorgehensweisen an. Die zu entwickelnden Primer könnten in der Folge mit *Rauvolfia*-cDNA als Template zur Durchführung einer PCR eingesetzt werden. Weiterhin könnten die aus dem PCR-Ansatz erhaltenen, genspezifischen cDNA-Fragmente als radioaktiv markierte Sonden zum Screenen einer cDNA-Bank ausgenutzt werden. Allein das Wissen um die absolute Nukleotidabfolge der amplifizierten cDNA bietet die Möglichkeit zur Konstruktion genspezifischer Primer. Diese könnten mit einer speziell modifizierten cDNA, der RACE-cDNA (III.3.5.1.2), in einer Polymerase Kettenreaktion zu einer gezielten Vervielfältigung des 5'- und 3'-Endes des gesuchten Gens führen.

Als letzte Möglichkeit ist das Durchsuchen einer *Rauvolfia*-cDNA-Bank allein auf Basis der degenerierten Primer zu erwähnen. Diese Methode würde wahrscheinlich auch zum gewünschten Genprodukt führen. Die zahlreichen,

dabei auftretenden "Falsch-Positiven" Klone würden aber erheblich Mehraufwand an Arbeitszeit und Materialeinsatz erfordern. Aus diesem Grund wurden nur die beiden erstgenannten Methoden, cDNA-Bank Screening mit radioaktiver Sonde und RACE, zur Gewinnung der kompletten Gensequenzen angewandt.

4.1 "Reverse genetics" am Beispiel der Vomilenin Reduktase

Zum Erhalt der Vollängenklone der 40 kDa-Bande und der 43 kDa-Bande wurden unterschiedliche Strategien verfolgt.

Das komplette cDNA-Segment der 40 kDa-Bande sollte durch das oben erwähnte Durchsuchen einer *Rauvolfia* cDNA-Bank anhand einer radioaktiv markierten Sonde gefunden werden. Die RACE-Methode nach CHENCHIK et al. (1996) hingegen sollte als Alternative zum radioaktiven Arbeiten zur Gewinnung des Vollängenklons der 43 kDa-Bande führen. Beiden Techniken ist gemeinsam, daß sie auf ein genspezifisches Template zurückgreifen müssen, welches über PCR erhalten wurde.

4.1.1 Primerentwicklung

Dazu werden zunächst die Peptidfragmente aus IV.2.4.1 in den genetischen Code "übersetzt". Da hierbei mehrere Basentriplets für eine Aminosäure codieren können (degenerierter Code), gibt es einige Übersetzungsmöglichkeiten. Die Gesamtheit der zu synthetisierenden Oligonukleotide bezeichnet man daher als degenerierte Primer. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß die Anzahl an Mischbasen so gering wie möglich war. Zudem sollte ein hoher GC-Anteil enthalten sein, v.a. auch an den Endbereichen. Die Länge von 30 Nukleotiden sollte nicht überschritten werden. Weiterhin richtete sich die Wahl, ob aus der Aminosäureabfolge ein Forward- oder Reverse-Primer abgeleitet wurde, nach den in IV.4 genannten Gesichtspunkten.

Für die 40 kDa-Bande wurden nachstehende Primer entworfen:

40 kDa for: 5' GCI TAY GGI GTI GCI GCI MGI GA 3'
 A Y G V A A R D

40 kDa rev: 5' RAA IGC RTC IGC ICC IAR RTG RTT DAT IGC 3'
 F A D A G L H N I A

Dabei gilt: I = G,A,T,C D = G,A,T Y = C,T M = A,C R = A,G

Aus den sequenzierten Peptiden der 43 kDa-Bande ließen sich diese Primer ableiten:

43 kDa for: 5' GTI YTI TAY TGY GGI ATH TGY C 3'
 V L Y C G I C H

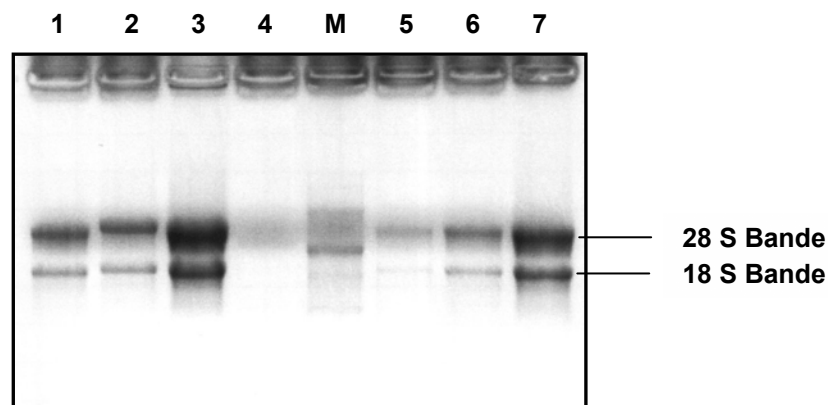
43 kDa rev: 5' AC ICC IAC DAT YTC RTG ICC IGG 3'
 V G V I E H G P

Dabei gilt: I = G,A,T,C D = G,A,T H = A,T,C R = A,G Y = C,T

4.1.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Anfangs wurde Gesamt-RNA aus 6 Tage alten *R. serpentina* Zellsuspensionskulturen nach III.3.1.2 isoliert. Die Abb. 27 zeigt ein denaturierendes Agarosegel (III.3.7.2) einer solchen RNA-Präparation. Die intakte RNA erkennt man an der 18 S und 28 S Untereinheit. Die bei ca. 4.5 kb lokalisierte 28 S Bande sollte etwa doppelt so dick sein wie die 18 S Bande bei etwa 1.9 kb.

Abb. 27 Denaturierendes Agarosegel einer RNA-Isolierung aus *R. serpentina* Zellsuspensionskulturen. 1 – 7: RNA-Proben; M: Marker.



Später erfolgten auch RNA-Präparationen mit Hilfe des peQ GOLD RNA Pure-Kits nach Herstellerangaben. In der daraufhin angesetzten Reaktion (III.3.5.1.1) schrieb die eingesetzte RNA-abhängige DNA-Polymerase unter Verwendung eines Oligo d(T)-Primers oder eines entsprechenden Revers-Primers die RNA in die gewünschte cDNA um. Das am Ende der Reversen Transkription erhaltene RNA-cDNA-Hybrid konnte direkt für die anstehende PCR weiterverwendet werden.

4.1.3 PCR mit degenerierten Primern

Hierbei wurden die im gefriergetrockneten Zustand bezogenen Primer zuerst mit Seral-H₂O gelöst, so daß eine Konzentration von 100 pmol/µl resultierte. Die nachfolgenden Pipettierschemata geben die Reaktionsansätze für die 40 kDa- und 43 kDa-Bande wieder.

40 kDa-Bande:

Probe		1	2	3
Template (cDNA; IV.4.1.2)	1 µl	×	×	×
Primer 40 kDa for (100 pmol/µl)	1 µl	×	×	-
Primer 40 kDa rev (100 pmol/µl)	1 µl	×	-	×
dNTP's (20 mM)	2 µl	×	×	×
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl	×	×	×
Puffer (10×)	5 µl	×	×	×
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl		38 µl	39 µl	39 µl

Für die PCR wurde das Hotstart-Verfahren (III.3.5.2.1) mit dem folgenden Zeit-Temperatur-Programm gewählt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, <i>Taq</i> -Zugabe		
5	94 °C	30 s
	45 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
30	94 °C	30 s
	50 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	5 min

43 kDa-Bande:

Probe		1	2	3	4	5
Template (cDNA; IV.4.1.2)		1 µl	3 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer 43 kDa for (100 pmol/µl)	1 µl	×	×	×	-	-
Primer 43 kDa rev (100 pmol/µl)	1 µl	×	×	-	×	-
dNTP's (40 mM)	1 µl	×	×	×	×	×
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	×	×	×	×	×
Puffer (10×)	5 µl	×	×	×	×	×
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×	×	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl		39 µl	37 µl	40 µl	40 µl	41 µl

Zur Amplifizierung eines Fragmentes wurden folgende Zeit-Temperatur-Zyklen eingesetzt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, <i>Taq</i> -Zugabe		
3	94 °C	30 s
	40 °C	30 s
	72 °C	1 min 15 s
30	94 °C	30 s
	50 °C	30 s
	72 °C	1 min 15 s
1	72 °C	5 min

30 μ l jeder einzelnen PCR-Probe wurden direkt nach Beendigung des letzten Zyklus mit Agarosegel-Probenpuffer versetzt und über ein 1.5%iges Gel (III.3.7.1) getrennt. Die verbleibenden 20 μ l der PCR-Proben wurden eingefroren. In Abb. 28 ist die selektive Amplifizierung eines etwa 660 bp großen Stücks der cDNA der 40 kDa-Bande zu erkennen. Als Marker wurde standardmäßig „Smart Ladder“ (II.8) verwendet. Im Fall der 43 kDa-Bande waren noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt worden. Lediglich in einem Kontrollansatz der nur *einen*, den Revers-Primer, beinhaltetete, konnte ein Fragment bei ca. 1 000 bp erhalten werden. Die Größe des erhaltenen Stücks paßte auch nicht zu der nach den Sequenzvergleichen erwarteten Nukleotidlänge von 105 bp, entsprechend 35 Aminosäuren.

40 kDa-Bande:

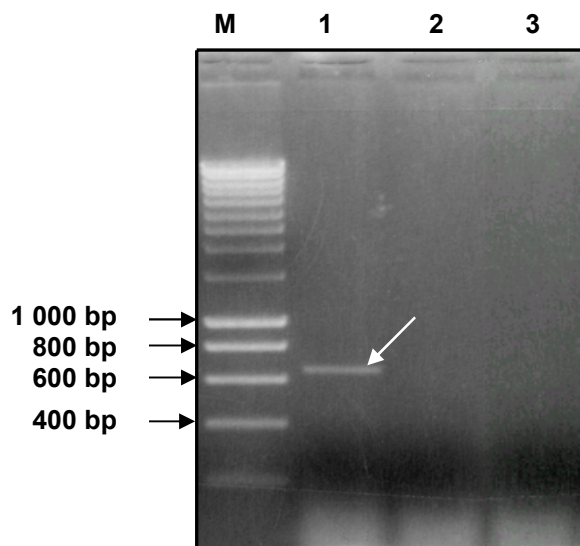
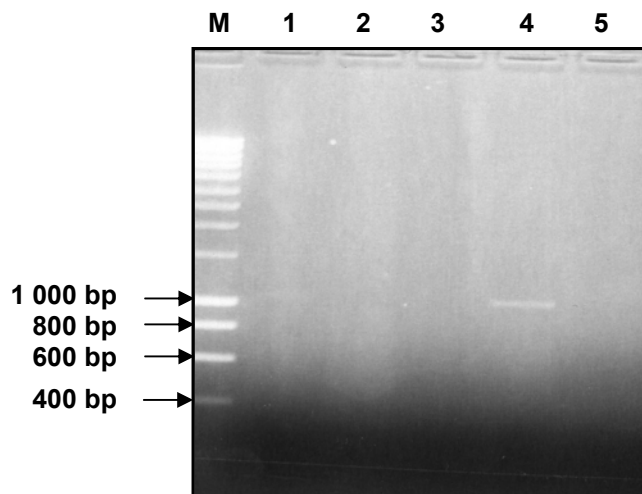


Abb. 28 Agarosegel-Photos nach erfolgreicher PCR zur Amplifizierung eines cDNA-Stücks der Vomilenin Reduktase. Bahn 1: PCR mit Primern 40 kDa for und rev. Bahn 2: PCR mit Primer 40 kDa for. Bahn 3: PCR mit Primer 40 kDa rev. M: Marker. In Bahn 1 ist deutlich die ca. 660 bp große Bande zu erkennen, die in der Folge weiterbearbeitet wurde. In den Laufspuren der Kontrollansätze mit jeweils nur einem Primer ist kein Genstück sichtbar.

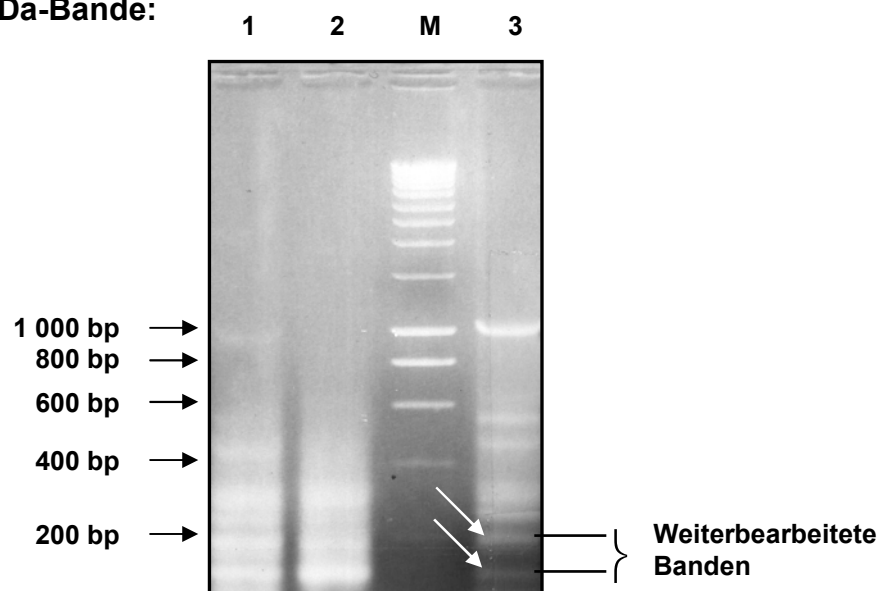
43 kDa-Bande:



Die PCR mit den Primern der 43 kDa-Bande verlief nicht so erfolgreich. M: Marker. Bahn 1 - 5 entsprechen den Probennummern der PCR der 43 kDa-Bande. Es ist nur ein Fragment bei etwa 1 000 bp in einem Kontrollansatz amplifiziert worden.

105 bp sind ein extrem kleines Nukleotidfragment, das selbst bei guter gelelektrophoretischer Trennung nur schwer von unverbrauchten Primern und Primerdimeren abzugrenzen ist. Aufgrund dessen sollte eine modifizierte PCR angesetzt werden, bei welcher statt 1 µl cDNA 1 µl der ersten PCR (Proben 1 + 2) der 43 kDa-Bande als Template eingesetzt wurden. Da hier schon mehrere Genkopien der gesuchten Sequenz vorliegen sollten, ist die Chance einer starken Amplifizierung und damit einer deutlich ausgeprägten Bande auf dem Agarosegel wesentlich höher. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde eine erneute PCR durchgeführt, die dann im Ergebnis dieses Gelphoto lieferte:

43 kDa-Bande:



Gerade in Bahn 3 sind die Ethidiumbromid-gefärbten cDNA-Stücke gut aufgetrennt mit wenig Hintergrund zu erkennen. Sogar im unteren Basenpaarbereich erfolgt eine scharfe Abgrenzung der einzelnen Banden. Die auf Höhe von ca. 100 bp und 200 bp liegenden Banden würden der erwarteten Fragmentgröße entsprechen.

Zur Überprüfung, ob die PCR-Produkte (660 bp – 40 kDa-Bande / 100 + 200 bp – 43 kDa-Bande) auch wirklich Teilbereiche der gesuchten cDNA darstellen, wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract Kit (III.3.3) weiter aufgearbeitet. Um zu gewährleisten, daß es sich wirklich um reale, reproduzierbare Banden handelt, wurden die eluierten Nukleotidstücke in einer Reamplifizierungs-PCR unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der

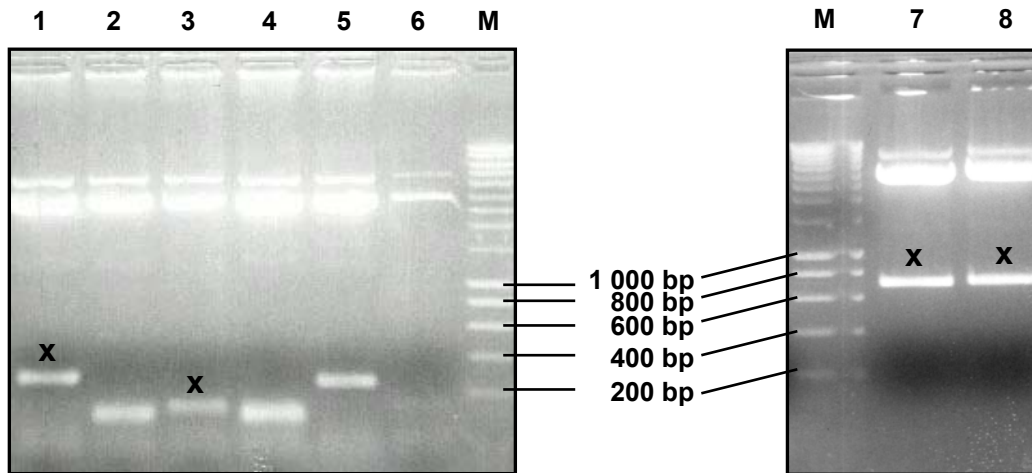
ersten PCR als Template eingesetzt. Dabei konnten alle Banden wiederholt vervielfältigt werden.

4.1.4 Subklonierung der erhaltenen cDNA-Fragmente in *pGEM-T easy*

Zur weiteren Untersuchung war es nötig, soviel cDNA zu produzieren, daß mit dieser eine Sequenzierungsreaktion angesetzt werden konnte. Dafür wurden die eluierten Fragmente, die durch die *Taq*-Polymerase am 3'-Ende mit einem A-Überhang versehen wurden, in das high-copy-Plasmid *pGEM-T easy* einligiert. Der schon vorgeschchnittene Vektor besitzt seinerseits am 3'-Ende ein ungepaartes Thymidin, was nicht nur die direkte Insertion ermöglicht, sondern auch die Religation des Vektors einschränkt. Weitere Vorteile des *pGEM-T easy* sind in der breiten Multiple Cloning Site, der Ampicillin-Resistenz vermittelnden Eigenschaft sowie der schnellen und kostengünstigen Sequenzierung durch Standardprimer (M 13 for/ M 13 rev) zu sehen.

Die Ligation in *pGEM-T easy* und die darauffolgende Transformation in Top10F' wurde nach III.3.5.3.1 und III.3.9 durchgeführt. Nach Inkubation unter Standardbedingungen auf ampicillinhaltigen LB-Platten konnten mehrere Klone isoliert, in Form von Flüssigkulturen angezogen und die enthaltenen Plasmide aufgereinigt werden (III.3.1.4.1). Ein Teil dieser Vektorpräparation wurde einem 1 h langen Restriktionsverdau bei 37 °C (III.3.5.4) mit *EcoR I* (3 U/Ansatz) unterzogen. Dabei wurde das Amplikon mit einem geringfügigen Vektorüberhang wieder aus *pGEM-T easy* herausgetrennt. Der weitere gelelektrophoretische Nachweis zeigte einen über 80 %igen Anteil an positiven Klonen.

Abb. 29 1.5 %iges Agarosegel einer *pGEM-T easy*-Isolierung, verdaut mit *EcoR* I. In den Gelphotos sind die Fragmente in Höhe von 100 + 200 bp bei der 43 kDa-Bande sowie das 660 bp große Fragment der 40 kDa-Bande deutlich wiederzufinden. M: Marker (Smart Ladder). Bahnen 1 - 6: Restriktionsverdau der Plasmid-Minipräparationen von verschiedenen 43 kDa-Klonen. Bahnen 7 und 8: 40 kDa-Klone. Die mit "x" markierten Banden wurden eluiert und weiterbearbeitet.



Eine von den in Abb. 29 markierten Klonen angefertigte, hochreine Plasmid-Minipräparation (III.3.1.4.2) lieferte das notwendige Material zur Sequenzierung, bei der 500 – 600 ng doppelsträngige DNA pro Reaktion benötigt wurde.

4.1.5 Sequenzierung positiver Klone der 40- und 43 kDa-Bande

Die unter Verwendung der Standardprimer M 13 for und M 13 rev nach Didesoxy-Kettenabbruch-Methode gewonnenen Nukleotide wiesen im Chromatogramm der nachfolgenden gelelektrophoretischen Trennung die untenstehenden Sequenzen auf.

Abb. 30 Sequenzen (5' → 3') verschiedener Klone der 40 kDa- und 43 kDa-Bande. Die durch die Triplets determinierten Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code unter der Nukleotidsequenz zu finden. Grau unterlegt sind die zur Ableitung der degenerierten Primer genutzten Peptidbereiche. Nicht zur Primersynthese herangezogene, bekannte Aminosäuren sind in rot angegeben.

Klon 4 der 40 kDa-Bande:

5'	GCC	TAC	GGA	GTG	GCG	GCT	CGT	GAT	TCG	TCT	GGG	GTC	CTT	TCA	CCC	TTC
	A	Y	G	V	A	A	R	D	S	S	G	V	L	S	P	F
AAA	TTC	TCC	CGG	AGG	GCA	ACA	CTT	GAG	GAT	GAT	GTT	AGA	CTC	AAG	GTG	
K	F	S	R	R	A	T	L	E	D	D	V	R	L	K	V	
CTC	TAT	TGT	GGG	TTA	TGT	CAT	ACT	GAC	ATT	CAT	TTC	CTC	AAG	AAT	GAG	
L	Y	C	G	L	C	H	T	D	I	H	F	X	K	N	E	
TGG	GGC	TTT	TCT	ACC	TAC	CCT	TTT	GTA	CCG	GGG	CAT	GAA	GTT	GTA	GGT	
W	G	F	S	T	Y	X	F	V	P	G	H	E	V	V	G	
GAA	GTT	ATA	GAG	GTT	GGT	AGC	AAA	GTT	ACA	AAA	GTC	AAG	GTT	GGG	GAT	
E	V	I	E	V	G	S	K	V	T	K	V	K	V	G	D	
AAA	GTT	GCT	CAT	GGC	GGC	ATT	ATC	GGG	TCA	TGC	CGT	GCA	TGT	GAT	AAT	
K	V	A	H	G	G	I	I	X	S	C	R	A	C	D	N	
TGT	CAT	GCA	GAT	ATG	GAG	AGC	TAT	TGT	CCC	AAA	ATG	GTT	ATG	GCC	CAT	
C	H	A	D	M	E	S	Y	C	P	K	M	V	M	A	H	
GGA	TCT	CCA	AAT	TTT	GAT	GGA	ACC	ATT	ACT	TAT	GGA	GGC	TTT	TCC	AAT	
G	S	P	N	F	D	G	T	I	T	Y	G	G	F	S	N	
GAG	ATG	GTC	GTC	AAT	GAG	CAC	TTT	GTT	ATT	CGT	TAC	CCA	GAG	AAC	CTG	
E	M	V	V	N	E	H	F	V	I	R	Y	P	E	N	L	
CCA	CTT	GCT	GCT	GGT	GCA	CCA	TTG	CTC	TGT	GCT	GGA	ATT	ACA	GTG	TAC	
P	L	A	A	G	A	P	L	L	C	A	G	I	T	V	Y	
AGT	CCA	ATG	AAA	TAC	TAT	GGA	ATT	GCA	AAA	CCT	GGA	AAC	CAC	ATA	GGT	
S	P	M	K	Y	Y	G	I	A	K	P	G	N	H	I	G	
GTT	AAC	GGT	CTT	GGT	GGG	CTG	GGC	CAT	ATG	GCT	GTT	AAA	TTC	GCA	AAG	
V	N	G	L	G	G	L	G	H	M	A	V	K	F	A	K	
GCC	TTG	GGA	GCA	AAA	GTG	ACA	GTC	ATC	AGT	TCA	TCC	GAG	AGC	AAG	AAA	
A	L	G	A	K	V	T	V	I	S	S	S	E	S	K	K	
GAC	GAT	GCT	ATA	AAT	CAT	CTG	GGT	GCA	GAT	GCA	TTT	3'				
D	D	A	I	N	H	L	G	A	D	A	F					

Klon 1 der 43 kDa-Bande:

5'	ACG	CCG	ACG	ATC	TCG	TGG	CCG	GGG	AAT	CAA	GTT	CTT	GCG	GCA	ATG	GCG
	T	P	T	I	S	W	P	G	N	Q	V	L	A	A	M	A
AAG	TCA	CCA	GAA	GTT	GAG	CAT	CCA	GTT	AAG	GCC	TTT	GGA	TGG	GCT	GCT	
K	S	P	E	V	E	H	P	V	K	A	F	G	W	A	A	
AGA	GAC	CCT	GCC	GGG	GTT	CTC	TCC	CCC	TTC	AAT	TTT	TCC	CGA	AGG	GCT	
R	D	P	A	G	V	L	S	P	F	N	F	S	R	R	A	
ACC	GGA	GAG	CAT	GAC	GTG	CAG	TTC	AAA	GTT	TTG	TAT	TGT	GGG	ATC	TGT	
T	G	E	H	D	V	Q	F	K	V	L	Y	C	G	I	C	
CAC	TCT	GAT	CTG	CAC	ATG	ATC	AAG	AAC	GAA	TGG	GGC	TTC	GCC	AAG	TAT	
H	S	D	L	H	M	I	K	N	E	W	G	F	A	K	Y	
CCC	ATC	GTG	CCC	GGC	CAC	GAG	ATC	GTC	GGC	3'						
P	I	V	P	G	H	E	I	V	G							

Klon 3 der 43 kDa-Bande:

5'	CGC	CGA	CGA	TCT	CAT	GGC	CGG	GGA	GAG	CAT	GAC	GTG	CAG	TTC	AAA	GTT
R	R	R	S	H	G	R	G	E	H	D	V	Q	F	K	V	
TTG	TAT	TGT	GGG	ATC	TGT	CAC	TCT	GAT	CTG	CAC	ATG	ATC	AAG	AAC	GAA	
L	Y	C	G	I	C	H	S	D	L	H	M	I	K	N	E	
TGG	TGC	TTC	ACC	AAG	TAT	CCC	ATT	GTG	CCC	GGC	CAT	GAA	ATC	GTC		
W	C	F	T	K	Y	P	I	V	P	G	H	E	I	V		
GGC	3'															
G																

Festzustellen bleibt, daß alle drei Sequenzen einen offenen Leserahmen aufweisen und daß die Primer, zumeist am 5'- und 3'-Ende, vollständig wiederzufinden sind. Das allein ist noch nicht aussagekräftig genug, da durch die angewendeten niedrigen Annealingtemperaturen bei degenerierten Primern oftmals die Primersequenz vorhanden ist, jedoch in Verbindung mit einem unerwünschten cDNA-Klon. Aufgrund dessen wurde die Nukleotidabfolge der Primer so gelegt, daß jeweils zum 3'-Ende hin noch einige Aminosäuren "übrig" blieben, also nicht für die Primersynthese herangezogen wurden. Diese bekannten Aminosäuren mußten somit in den cDNA-Fragmenten im Anschluß an die Primerbereiche ebenfalls vorhanden sein. Da das überall der Fall war, konnte die PCR als erfolgreich angesehen und die Identität der Fragmente bestätigt werden. Davon ausgehend wurde, wie schon oben angesprochen, für

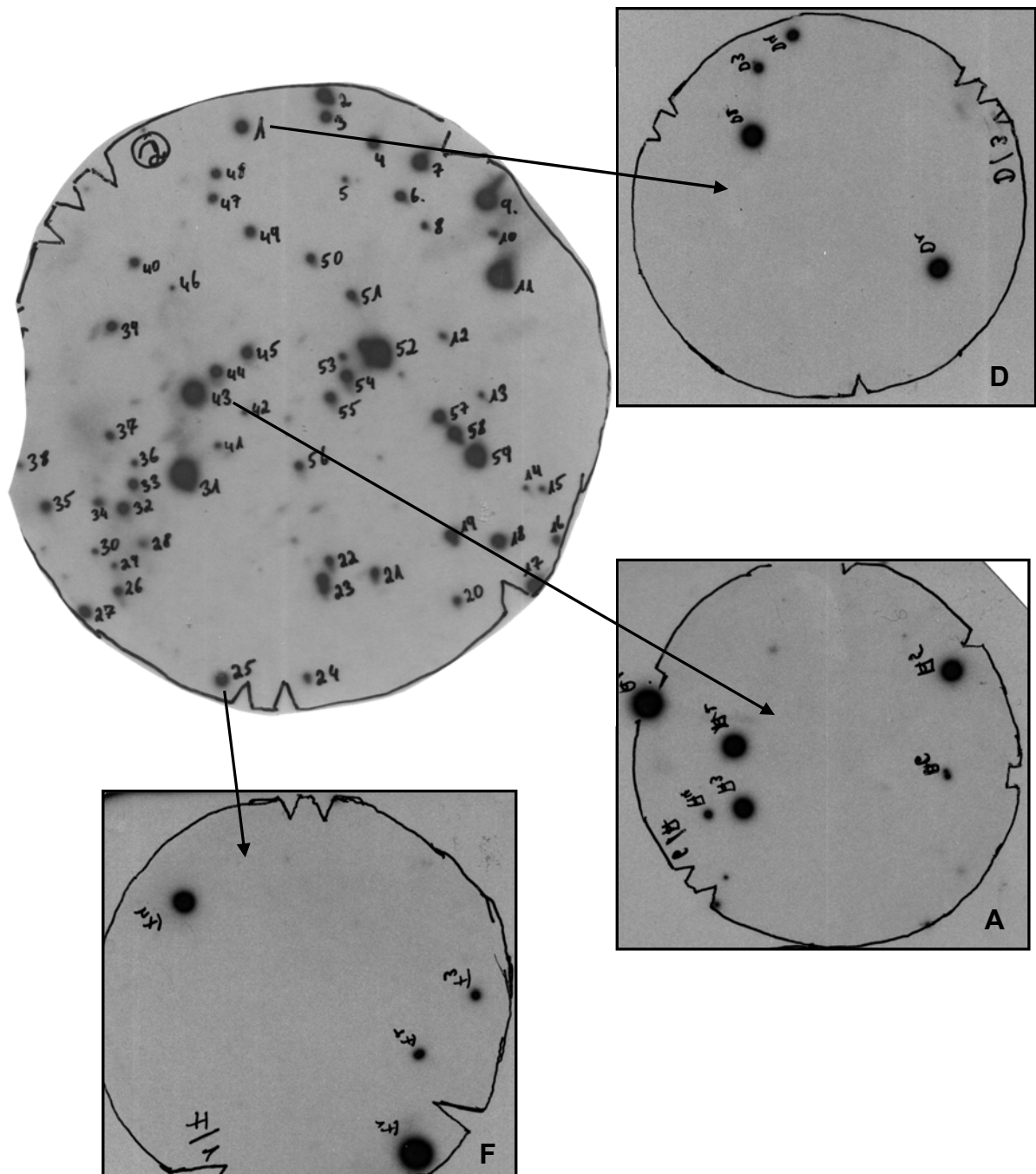
die 40 kDa-Bande das Radioaktiv-Screening einer cDNA-Bank (IV.4.1.6) und für die Klone 1 und 3 der 43 kDa-Bande das RACE-Verfahren (IV.4.1.7) vorbereitet.

4.1.6 Durchmusterung einer cDNA-Bank (40 kDa-Bande)

Hierbei wurde auf die in III.3.6 beschriebene *R. serpentina* cDNA-Bank zurückgegriffen. Nach dem Ausplattieren und Inkubieren auf NZY-Platten (III.3.6.1) konnte der Transfer der Kolonien auf geladene Nylon-Membranen erfolgen (III.3.6.2). Zur Fixierung der DNA an die Membran erfolgte zuerst ein 2 stündiger Trocknungsprozeß bei 80 °C mit anschließendem UV-Crosslinking. In der Zwischenzeit wurde das von der 40 kDa-Bande gewonnene 660 bp-Fragment (IV.4.1.5) über PCR vervielfältigt, um genügend Material zur Sondenherstellung zu produzieren. Für eine radioaktive Markierung nach dem Oligolabeling-Verfahren (III.3.5.7.1) wurden 25 ng DNA eingesetzt, die nach Markierung nochmals aufgereinigt wurden (III.3.5.7.2). Die anschließende Hybridisierung und das Auflegen der Membranen auf die Röntgenfilme, wurde analog III.3.6.2 durchgeführt.

Wie der Abb. 31 zu entnehmen ist, sind nach dem ersten Durchgang allein auf einer Platte 59 mehr oder weniger schwarz gefärbte Bereiche zu erkennen. Von allen Plaques, denen dabei eindeutig eine Schwarzfärbung auf dem Film zugeordnet werden konnte, wurde eine neue Phagenstocklösung angesetzt. Die Klone 1, 18, 25, 31, 43 und 45 wurden in einem zweiten Screening genauer untersucht. Da die Plaqueanzahl hierbei stark herabgesetzt war (50 – 250 Plaques/Platte), konnten NZY-Platten mit 80 mm Durchmesser verwendet werden. Dies ermöglichte zum einen die parallele Bearbeitung von 6 Klonen, zum anderen war die Plaquedichte so gering gewählt, daß eine relativ leichte und sichere Zuordnung von Plaque und Schwarzfärbung nach Auswertung des Röntgenfilms gewährleistet war. Die Abb. 31 zeigt ebenfalls das Ergebnis des zweiten cDNA-Bank Screenings der Platten A (Plaque 43), D (Plaque 1) und F (Plaque 25).

Abb. 31 Röntgenfilme mit positiven Spots der Vomilenin Reduktase (40 kDa-Bande). Die Klone 1, 25 und 43 des ersten Durchgangs (große Platte) ergaben auch im zweiten Screening (die drei kleinen Platten: A, D und F) positive Plaques, die weiterbearbeitet wurden.



4.1.6.1 “In-vivo-Excision“ isolierter, positiver Klone

Nur im Fall der Klone 1, 25 und 43 konnten erneut Schwarzfärbungen auf dem Film (Platten A, D und F; Abb. 31) erhalten werden, die selektiv einem Phagenplaque zugeordnet werden konnten. Ein Teil dieser positiven Plaques wurde aus den Platten ausgeschnitten und die Phagen DNA in das *pBlueskript*-Plasmid nach III.3.6.4 umgewandelt. Die dadurch erhaltenen Plasmide konnten somit kloniert und später sequenziert werden.

4.1.6.2 Sequenzierung

Dafür war es erforderlich, die Größe der cDNA in den erzeugten *pBlueskript*-Plasmiden mit Hilfe einer Minipräparation (III.3.1.4.1) und eines nachgeschalteten Restriktionsverdau zu bestimmen. Als Restriktionsenzyme wurden *EcoR* I und *Xho* I verwendet (III.3.5.4). Erst dann konnte abgeschätzt werden, ob nur ein kleines Fragment der cDNA gefunden wurde oder ob die komplette Sequenz enthalten sein konnte. Bei Klon 1 und 43 wurde zu der etwa 3 kbp großen Vektorbande jeweils ein 1 250 bp großes Fragment erhalten, Klon 25 wies neben der Vektorbande eine ca. 1 350 bp große und 130 bp große Bande auf. Das wiederum legte den Schluß nahe, daß Klon 25 eine interne *EcoR* I- oder *Xho* I-Schnittstelle besitzt und die enthaltene cDNA eine Größe von 1 480 bp hat. Eine nach den Sequenzvergleichen erwartete Größe für die Vomilenin Reduktase liegt bei 340 bis 360 Aminosäuren, entsprechend 1 020 bis 1 080 bp. Auf der Basis dessen konnten alle Klone (1, 25, 43) die komplette cDNA der Vomilenin Reduktase enthalten und wurden dementsprechend alle sequenziert. Da die beiden kürzeren Klone (1 und 43) keine neuen Sequenzen erbrachten und nur Teilbereiche des Klons 25 darstellten, wird auf eine separate Auflistung der Sequenzen verzichtet und nur die längste Sequenz abgebildet (Abb. 32).

Abb. 32 Vollständige cDNA-Nukleotidsequenz (5' → 3') der 40 kDa-Bande. Die daraus resultierende Aminosäureabfolge ist unter dem jeweiligen Basentriplett im Einbuchstaben-Code angegeben. Primerbereiche sind grau unterlegt; sie umsäumen den schon bekannten Sequenzabschnitt nach PCR mit degenerierten Primern (IV.4.1.5).

CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAGCAAAGAAGCTTTTTC

TTCTTTCTTCTCCTTCAATTGCTGATTTCTGTAAGTGTGATTTTCCCGTTTCTCCTTC

ACG

1 ATGGCCGAAAATCACCTGAAGAGGAGCACCCAGTGAAAAGCCTACGGAGTGGCGGCTCGT

M A G K S P E E E H P V K A Y G V A A R 20

61 GATTCGTCTGGGGTCTTTTACCCTTCAAATTCTCCCGAGGGCAACACTTGAGGATGAT

D S S G V L S P F K F S R R A T L E D D 40

121 GTTAGACTCAAGGTGCTCTATTGTGGGTATGTCATACTGACATTCATTTCTCAAGAAT
V R L K V L Y C G L C H T D I H F L K N 60

181 GAGTGGGGCTTTTCTACCTACCCTTTTGTACCGGGGCATGAAGTTGTAGGTGAAGTTATA
E W G F S T Y P F V P G H E V V G E V I 80

241 GAGGTTGGTAGCAAAGTTACAAAAGTCAAGGTTGGGGATAAAGTTGCTCATGGCGGCATT
E V G S K V T K V K V G D K V A H G G I 100

301 ATCGGGTCATGCCGTGCATGTGATAATTGTCATGCAGATATGGAGAGCTATTGTCCCAA
I G S C R A C D N C H A D M E S Y C P K 120

361 ATGGTTATGGCCCATGGATCTCAAATTTTGTGGAACCATTACTTATGGAGGCTTTTCC
M V M A H G S P N F D G T I T Y G G F S 140

421 AATGAGATGGTCGTCAATGAGCACTTTGTTATTTCGTTACCCAGAGAACCTGCCACTTGCT
N E M V V N E H F V I R Y P E N L P L A 160

481 GCTGGTGCACCATTGCTCTGTGCTGGAATTACAGTGTACAGTCCAATGAAATACTATGGA
A G A P L L C A G I T V Y S P M K Y Y G 180

541 ATTGCAAAACCTGGAAACCACATAGGTGTTAACGGTCTTGGTGGGCTGGGCCATATGGCT
I A K P G N H I G V N G L G G L G H M A 200

601 GTTAAATTCGCAAAGGCCCTTGGGAGCAAAGTGACAGTCATCAGTTCATCCGAGAGCAAG
V K F A K A L G A K V T V I S S S E S K 220

661 AAAGACGATGCTATAAATCATCTGGGTGCAGATGCATTTTTACTGAGCAAAAATCCAGAA
K D D A I N H L G A D A F L L S K N P E 240

721 GAACTGCAGGCTGCAACAGGCACGTTGGATGGTATAGTCGATTGTGTTTCTGCTAAACAC
E L Q A A T G T L D G I V D C V S A K H 260

781 CCAATTATCCCATTTGCTTGGTCTACTCAAGTCTCACGGAAAGCTTGTCTGGTTGGGGCA
P I I P L L G L L K S H G K L V L V G A 280

841 CCTGGGGAGCCACTTGAGCTTCACTCTGCCCTTTGCTTATGGGAAGGAAGATGATCGGT
P G E P L E L H S A P L L M G R K M I G 300

```

901 GGAAGTGATGCTGGAGGAATGAAGGAGATTCAAGAAATGGTTGACCTTGCTGCAAAGCAC
    G S D A G G M K E I Q E M V D L A A K H 320

961 AATATCACTGCAGATATCGAGCTTGTTCATGGACAACATCAACACAGTTGTGGAGCGC
    N I T A D I E L V S M D N I N T V V E R 340

1021 CTTGTCAAGGGTGATGTTAGATATCGCTTTGTTGTTGACGTTGCCAACACCTTGAAAGCT
    L V K G D V R Y R F V V D V A N T L K A 360

1081 CCTTAATTCAGCTGTAGAAGGATTTCACTGAGTCTGGCTGTATTTCTTATGTCTGCTTTG
    P Stop 361

1141 CCGAAATAGATTGAGATGTGCTTTGCCTTTTTGTTTCTCCTACGCTGCTGTGCCCTTTTT

1201 GTTTCCTCCTACGCCTATGTGACAGTTGAATTCATCTTCTATGAATAAAATCAGTTTGTTA

1261 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAG

1321 C

```

Die cDNA der 40 kDa-Bande besitzt einen langen Überhang sowohl am 3'-Ende (Poly-A-Schwanz), als auch am 5'-Ende und weist in beiden Bereichen Stop-Codons auf. Zudem ist ein offener Leserahmen vorhanden und alle Primersequenzen konnten wiedergefunden und damit bestätigt werden. Nur bei einer unsicheren Aminosäure mußte eine Korrektur vorgenommen werden. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, daß die nicht codierende, 361 bp große Sequenz eine vollständige cDNA umfaßt.

4.1.7 RACE-PCR (43 kDa-Bande)

Die PCR mit degenerierten Primern führte zu 2 Teilsequenzen (Klon 1 und Klon 3; IV.4.1.5), in der die abgeleiteten Primer aus der Peptid-Mikrosequenzierung der 43 kDa-Bande enthalten waren. In den weiterführenden Experimenten sollte versucht werden, ausgehend von den nahezu identischen Teilsequenzen, die Vollängenklone über RACE-PCR selektiv zu amplifizieren.

Dafür wurden folgende RACE-Primer aus den schon bekannten Nukleotidsequenzen der Klone 1 und 3 ausgewählt und synthetisiert:

Klon 1 (in der Folge als 43 kDa RACE 1 bezeichnet):

43 kDa RACE 1 for: 5' TCA AGA ACG AAT GGG GCT TCG CCA AG 3'

43 kDa RACE 1 rev: 5' CGG GCA CGA TGG GAT ACT TGG CGA AGC C 3'

Klon 3 (in der Folge als 43 kDa RACE 2 bezeichnet):

43 kDa RACE 2 for: 5' GTG CTT CAC CAA GTA TCC CAT TGT GC 3'

43 kDa RACE 2 rev: 5' GCA CAA TGG GAT ACT TGG TGA AGC AC 3'

Um das betreffende 3'- bzw. 5'-Ende der 43 kDa-RACE 1- und der 43 kDa-RACE 2-Sequenz zu erhalten, wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung der RACE-cDNA aus III.3.5.1.2 als Template folgendermaßen angesetzt:

43 kDa-Bande:		RACE 1		RACE 2	
		1	2	3	4
Template (RACE-cDNA)	1 µl	×	×	×	×
GeneRacer 5'-Primer (20 pmol/µl)	1 µl	×	-	×	-
GeneRacer 3'-Primer (20 pmol/µl)	1 µl	-	×	-	×
Primer 43 kDa RACE 1 for (10 pmol/µl)	1 µl	-	×	-	-
Primer 43 kDa RACE 1 rev (10 pmol/µl)	1 µl	×	-	-	-
Primer 43 kDa RACE 2 for (10 pmol/µl)	1 µl	-	-	-	×
Primer 43 kDa RACE 2 rev (10 pmol/µl)	1 µl	-	-	×	-
dNTP's (20 mM)	2 µl	×	×	×	×
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	×	×	×	×
Puffer (10×)	5 µl	×	×	×	×
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl		38 µl	38 µl	38 µl	38 µl

PCR-Programm:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, <i>Taq</i> -Zugabe		
5	94 °C	30 s
	72 °C	1 min 20 s
5	94 °C	30 s
	69 °C	30 s
	72 °C	1 min 20 s
20	94 °C	30 s
	66 °C	30 s
	72 °C	1 min 20 s
1	72 °C	10 min

Auch hier kam wieder eine Hotstart PCR (III.3.5.2.1) zum Einsatz, die in Kombination mit Touch-Down Bedingungen (III.3.5.2.2) hervorragende Ergebnisse lieferte. Das dazugehörige Auftrennen der PCR-Produkte (30 µl pro Probe) über ein 1.5 %iges Agarosegel ergab das in Abb. 33 gezeigte Muster.

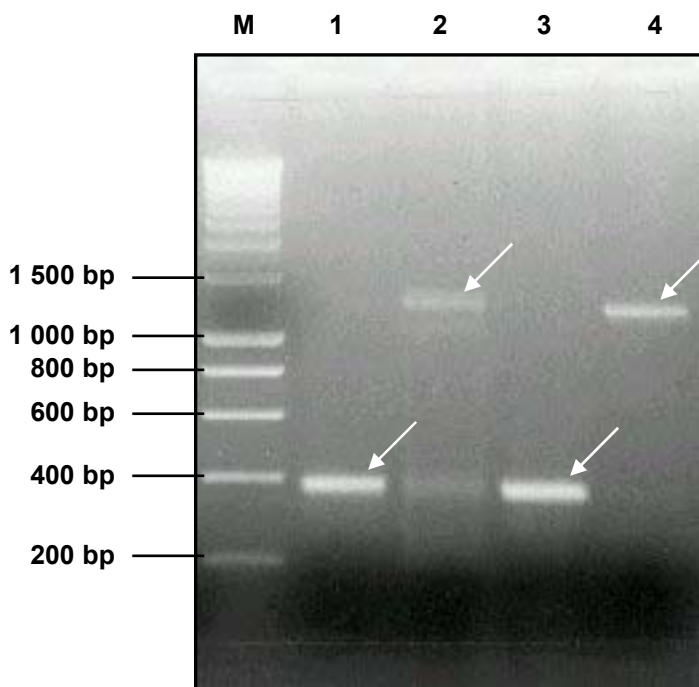


Abb. 33 Agarosegel (1.5 %ig) nach Amplifizierung des 3'- bzw. 5'-Endes des 43 kDa RACE 1- und 43 kDa RACE 2-Klons. M: Marker (Smart Ladder). Bahn 1: ca. 390 bp großes 5'-Ende vom 43 kDa RACE 1-Klon. Bahn 2: 3'-Ende (1300 bp) von 43 kDa RACE 1. Bahn 3 wiederum zeigt das 5'-Ende des 43 kDa RACE 2-Klons und Bahn 4 das dazugehörige 3'-Ende.

Die vier in Abb. 33 gekennzeichneten Banden konnten direkt aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt werden (III.3.3). Auf diese Weise entstanden 25 µl Gelextrakt, wovon ein Teil in *pGEM-T easy* ligiert wurde. Dazu diente ein Standardansatz zur Ligation von "sticky ends" nach III. 3.5.3.1 über 4.5 h bei 24 °C. Die anschließende Transformation (III.3.9) wurde auch hier in Top10F' vorgenommen, da somit eine leichte Aufreinigung der Plasmide nach III.3.1.4.1 gegeben war. Um den Ligations- und Transformationserfolg zu überprüfen, wurden diese Plasmide der isolierten Kolonien einem Restriktionsverdau mit *EcoR I* (3 U/Ansatz) zugeführt. Das Fragmentierungsmuster ist in Abb. 34 zu sehen. Die Bahnen 1 und 2 im Agarosegel (1.2 %ig) zeigen das klonierte 5'-Ende der 43 kDa RACE 1-Sequenz, die Bahnen 3 und 4 das entsprechende 3'-Ende des cDNA-Klons. Dabei ist zu erkennen, daß beim 3'-Ende zwei Klone vorliegen, die sich nur durch wenige Nukleotide unterscheiden. Dementsprechend wurden die Klone der Bahnen 1, 3 und 4 nach hochreiner Plasmid-Minipräparation (III.3.1.4.2) sequenziert. Die Gewinnung positiver Klone von 3'- und 5'-Enden der 43 kDa RACE 2-Sequenz gestaltete sich etwas schwieriger. Das ca. 400 bp große 5'-Ende sollte in den Bahnen 5 und 6 und das klonierte 3'-Ende mit 1 250 bp sollte in den Klonen der Bahnen 7 und 8 zu finden sein.

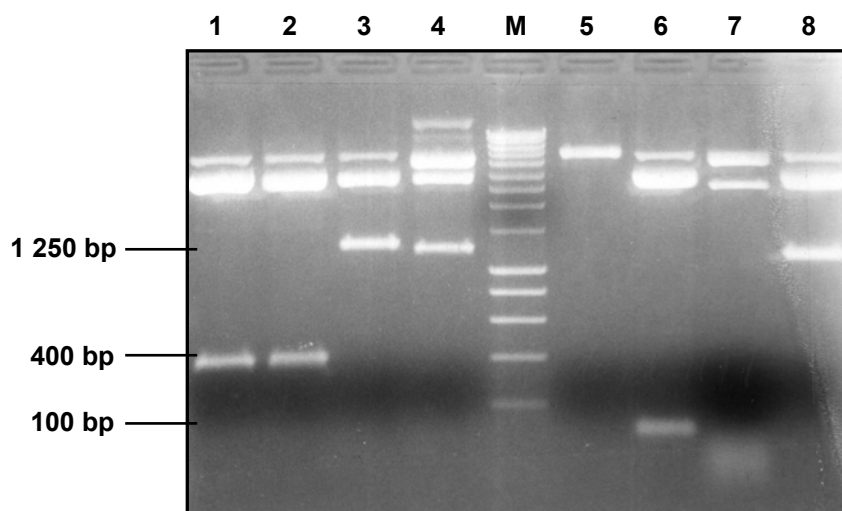


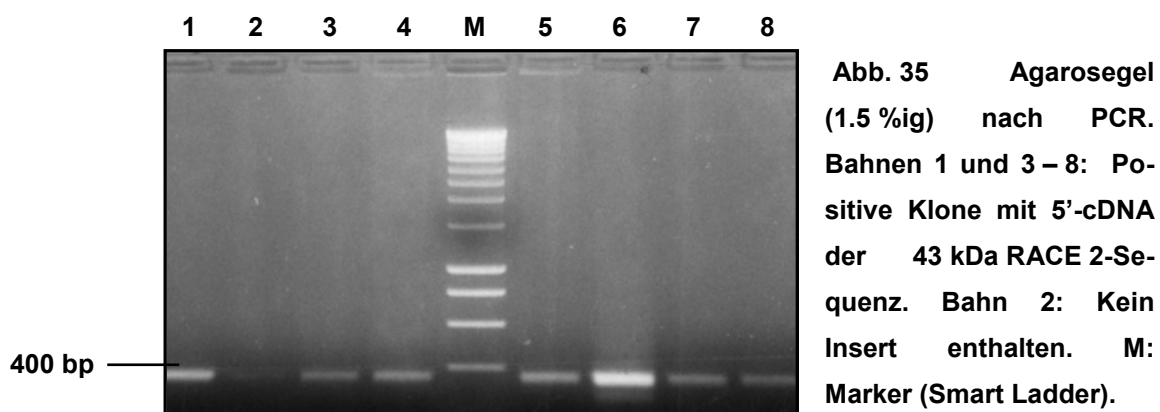
Abb. 34 Agarosegel (1.2 %ig) nach Verdau verschiedener RACE 1 und 2 Klone mit *EcoR I*. Bahnen 1 + 2: Klone mit 5' Ende der 43 kDa RACE 1-Sequenz. Bahnen 3 + 4: Klone mit 3'-Ende der 43 kDa RACE 1-Sequenz. M: Marker. Bahnen 5 – 7: negative Klone. Bahn 8 enthält das gewünschte 43 kDa RACE 2 - 3'-Ende.

Man erkennt deutlich, daß in Bahn 6 etwas aus dem Vektor ausgeschnitten wurde. Jedoch stimmt die Größe des Fragments (100 bp) nicht mit der erwarteten Größe (400 bp) überein. Daraufhin mußten erneut 5'-Klone auf ein enthaltenes Insert von 400 bp getestet werden. Dies erfolgte nicht wie üblich mittels Minipräparation, sondern, wie nachfolgend beschrieben, über PCR.

Bahn 7 beschreibt ebenfalls einen negativen Klon, jedoch ist in Bahn 8 die ausgeschnittene cDNA des 3'-Endes der 43 kDa RACE 2-Sequenz bei ca. 1 250 bp zu sehen.

PCR zum Erhalt des 5'-Endes der 43 kDa RACE 2-Sequenz:

Es wurden 15 µl Ampuwa pro PCR-Cap vorgelegt und jeweils eine isolierte Kolonie darin suspendiert. 10 µl dieser Suspension verblieben für die PCR im Cap, die restlichen 5 µl wurden zum Anziehen einer Flüssigkultur (LB-Ampicillin) abgenommen. Der insgesamt 30 µl umfassende PCR-Ansatz enthielt weiterhin 3 µl 10 × Puffer, 0.6 µl MgCl₂, 1.2 µl dNTP's (20 mM), jeweils 1 µl GeneRacer 5'-Primer (10 pmol/µl) und 1 µl 43 kDa RACE 2 rev-Primer (10 pmol/µl), 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) sowie Ampuwa ad 30.0 µl. Als Zeit-Temperatur-Programm wurde oben angegebenes RACE-PCR-Programm gewählt. Abb. 35 zeigt das Ergebnis 8 getesteter Kolonien nach gelelektrophoretischer Trennung.



Nach dem Erhalt positiver 5'-Klone konnte nun auch die Sequenzierung des 3'-Endes (Bahn 8, Abb. 34) und des 5'-Endes (Bahn 6, Abb. 35) der 43 kDa RACE 2-Sequenz erfolgen.

Die Nukleotidabfolgen der 43 kDa RACE 1- und RACE 2-cDNA sind in zusammengefügter Form (3'- und 5'-Ende) im Anhang (VII.3.1.1; VII.3.1.2) aufgeführt. Ihnen ist gemeinsam, daß im Bereich des 5'-Endes die GeneRacer 5' Primer-Sequenz vorhanden ist und das 3'-Ende mit einem Poly-A-Schwanz abschließt. Weiterhin sind die RACE 1 und RACE 2 spezifischen Primer enthalten und es liegt ein offener Leserahmen vor. Da sowohl die ursprünglichen Aminosäurestücke der Peptid-Mikrosequenzierung der 43 kDa-Bande (IV.2.4.1), als auch die Nukleotidsequenzen nach PCR mit degenerierten Primern (IV.4.1.5) exakt bestätigt werden konnten, kann man davon ausgehen, die gesuchte cDNA kloniert zu haben.

Bei einem direkten Aminosäurevergleich der 43 kDa RACE 1- und der 43 kDa RACE 2-Sequenz mit ClustalW (III.4) ergibt sich eine 94.7 %ige Übereinstimmung (341 identische AS; 346 positive AS), was darauf schließen läßt, daß zwei Isoformen des Enzyms gefunden wurden. Die Homologie auf Nukleotidebene beträgt 95 %.

Die ORF's des 43 kDa RACE-1 Klons und des 43 kDa RACE 2-Klons umfassen beide 1 080 bp, dementsprechend 360 Aminosäuren.

4.2 Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase: von den Peptidfragmenten zur cDNA

4.2.1 PCR mit degenerierten Primern

Um die codierende cDNA der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase finden und klonieren zu können, wurde dieselbe Vorgehensweise angewandt, die auch schon bei der Vomilenin Reduktase (43 kDa-Bande) zum Erfolg geführt hatte. Dazu mußten, ausgehend von den in IV.2.4.2 aufgelisteten Peptidfragmenten, degenerierte Primer entwickelt werden. Aus den abgeleiteten Homologien zu anderen Reduktasen wurden ein Forward- und zwei Reverse-Primer entworfen.

48 kDa for: 5' GCI TAY GGI TGG GCI GCI MGI GA 3'
A Y G W A A R D

48 kDa rev1: 5' TT IAC IGG RTG YTG YTC YTC IGG 3'
K V P H Q E E P

48 kDa rev2: 5' TT IGT RCT ICC ICC DAT IGT IG 3'
 K T S G G I T S

Dabei gilt : I = G,A,T,C D = G,A,T Y = C,T M = A,C R = A,G

Unter Nutzung der nach IV.4.1.2 generierten cDNA konnte dann mit nachstehendem PCR-Ansatz eine codierende Teilsequenz der 48 kDa-Bande amplifiziert werden.

48 kDa-Bande:

Probe		1	2	3	4	5
Template (cDNA; IV.4.1.2)	3 µl	×	×	×	×	×
Primer 48 kDa for (100 pmol/µl)	1 µl	×	-	-	×	×
Primer 48 kDa rev1 (100 pmol/µl)	1 µl	-	×	-	×	-
Primer 48 kDa rev2 (100 pmol/µl)	1 µl	-	-	×	-	×
dNTP's (20 mM)	2 µl	×	×	×	×	×
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	×	×	×	×	×
Puffer (10×)	5 µl	×	×	×	×	×
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×	×	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl		35 µl	35 µl	35 µl	34 µl	34 µl

Die PCR lief nach folgenden Zeit-Temperatur-Zyklen ab:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, Taq-Zugabe		
3	94 °C	30 s
	40 °C	2 min
	72 °C	1 min
30	94 °C	30 s
	50 °C	2 min
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min

Nach Separation der PCR-Proben über ein 1.5 %iges Gel (Abb. 36) blieben die Bahnen der Kontrollen (1 – 3), die jeweils mit nur einem Primer angesetzt

wurden, frei. Dasselbe galt auch für die Bahnen der 4. PCR-Probe, in der der Primer 48 kDa for mit dem Primer 48 kDa rev1 zur Reaktion gebracht werden sollte. Nur die Kombination der Primer 48 kDa for und 48 kDa rev2 (5. Ansatz) führte zum Erhalt zweier Banden. Die 180 bp- und 900 bp großen Stücke wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Gel herausgetrennt und mit dem NucleoSpin Extract Kit (III.3.3) weiterbearbeitet.

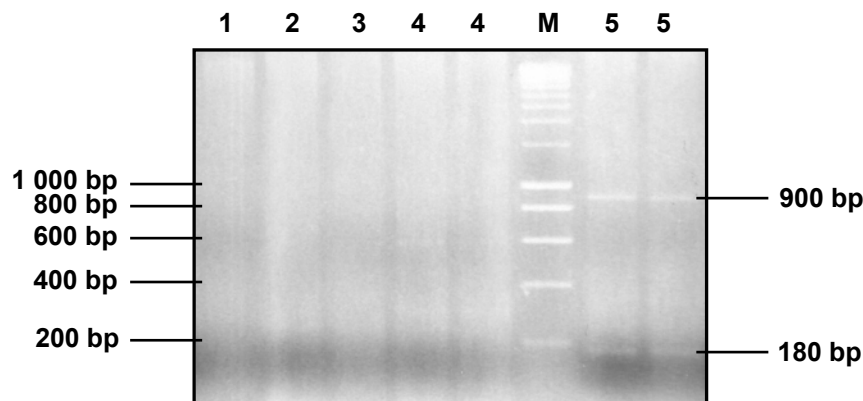


Abb. 36 Agarosegel (1.5 %ig) nach PCR mit degenerierten Primern zur Vervielfältigung eines cDNA-Stücks der 48 kDa-Bande. Bahn 1: nur Primer 48 kDa for. Bahn 2: nur Primer 48 kDa rev1. Bahn 3: nur Primer 48 kDa rev2. Bahnen 4: Kombination von Primer 48 kDa for und Primer 48 kDa rev1. Bahnen 5: Kombination von Primer 48 kDa for und Primer 48 kDa rev2. M: Marker (Smart Ladder). Nur im 5. PCR-Ansatz sind amplifizierte Banden in Höhe von 180 bp und 900 bp zu erkennen.

4.2.2 Reamplifizierungs-PCR

Da die Banden (Abb. 36) nur wenige Nanogramm (ca. 30 ng) der polymerisierten Nukleotide enthielten, wurde mit dem Gelextrakt als Template eine zweite PCR - unter den gleichen Bedingungen wie oben angegeben - gestartet. Primär galt es zu belegen, daß bei der vorangegangenen PCR keine Artefakte produziert wurden. Ein weiterer Vorteil dieser Reamplifizierungs-PCR war aber auch in einer enorm gesteigerten Ausbeute zu sehen, was Abb. 37 verdeutlicht. Darauf aufbauend konnten die Fragmente aus dem Gel eluiert (III.3.3) und die dabei erhaltenen Gelextrakte in *pGEM-T easy* ligiert werden (III.3.5.3.1).

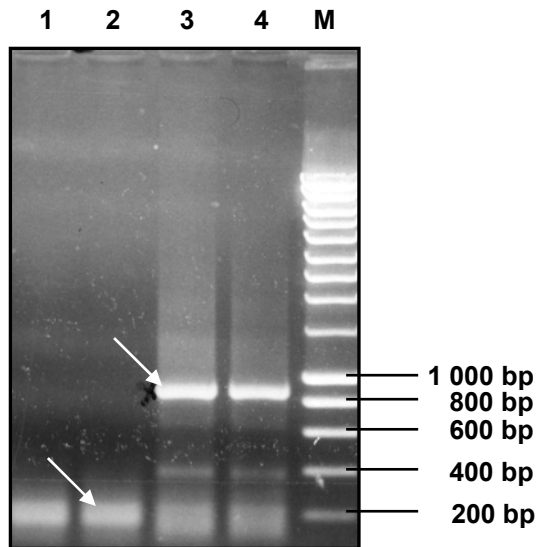


Abb. 37 Agarosegel (1.5 %ig).

Aufgetragen sind die Proben der Reamplifizierungs-PCR der 180 bp- und der 900 bp Bande. Bahnen 1 + 2 zeigen das Ergebnis der PCR bei Einsatz der 180 bp Bande als Template. Bahnen 3 + 4 basieren auf dem Gelextrakt der 900 bp großen Bande als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung. Hierbei ist neben der Hauptbande ein recht starker Hintergrund entstanden.

Die weitere Klonierung (III.3.9) erfolgte zuerst in Top10F'. Von den auf ampicillinhaltigen LB-Platten selektionierten Kolonien wurden einzelne Klone isoliert und mittels Plasmid-Minipräparation (III.1.4.1) der enthaltene Vektor extrahiert. Mit dem anschließenden Verdau (III.3.5.4) sollte auf ein enthaltenes Insert geprüft werden. Als Restriktionsenzym wurde *EcoR* I gewählt, da dies jeweils eine Schnittstelle vor und hinter dem klonierten Insert im *pGEM-T easy* Vektor besitzt. Das herbeigeführte Schnittmuster nach gelelektrophoretischer Trennung ist in Abb. 38 zu finden.

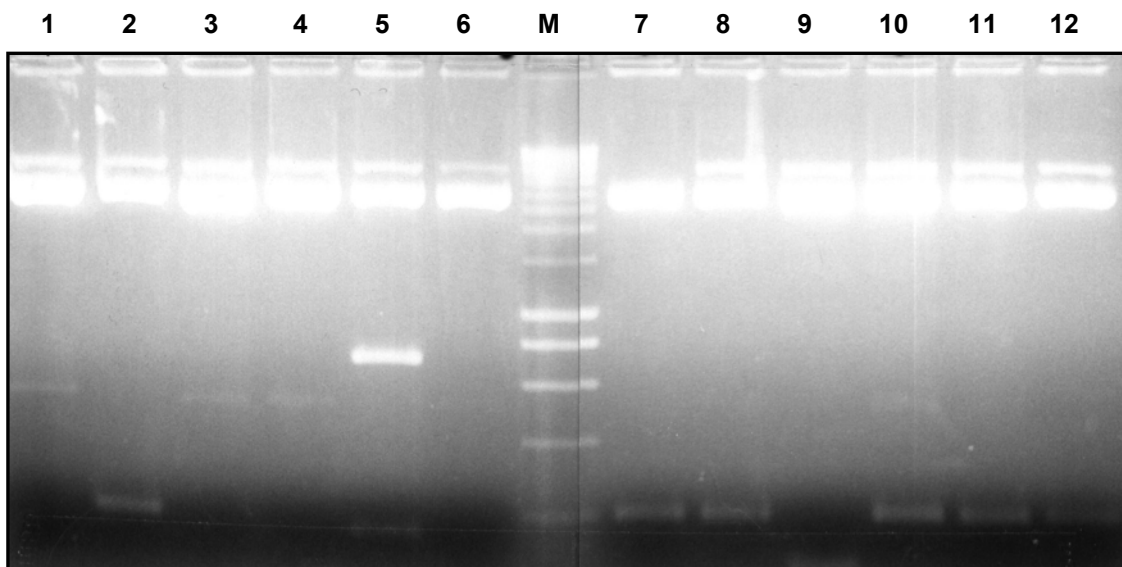


Abb. 38 Agarosegel (1.5 %ig) nach Restriktionsverdau einer Plasmid-Minipräparation mit *EcoR* I. Bahnen 2, 7, 8, 10, 11 und 12 weisen die gesuchte 200 bp-Bande auf. Bahn 5 zeigt eine Bande bei 750 bp und eine bei etwa 150 bp. M: Marker (Smart Ladder).

Viele der getesteten Klone wiesen ein Insert von ca. 200 bp auf, jedoch war kein Klon mit einem 900 bp-Fragment enthalten. Auffällig erscheint Klon 5, der sich vom Fragmentierungsmuster der anderen Klone abhebt. Die etwa 750 bp große und 150 bp große Bande legen den Schluß nahe, daß eine zusätzliche *EcoR* I-Schnittstelle im Insert vorkommt. In diesem Fall sollte sich das nach erfolgter Sequenzierung bestätigen lassen.

4.2.3 Sequenzierung der Klone 5 und 10

Die durch den Restriktionsverdau gefundenen, positiven Kolonien (5 und 10) wurden erneut im ampicillinhaltigen Flüssigmedium angezogen und einer hochreinen Plasmidpräparation nach III.3.1.4.2 unterzogen. Diese wurde im Anschluß zur Sequenzierung verwendet. Mittels der Standardprimer: M 13 for und M 13 rev konnte bei Klon 10 weder die Sequenz der degenerierten Primer noch ein offener Leserahmen gefunden werden. Im Gegensatz dazu wies die nachstehende, für den Klon 5 ermittelte Nukleotidabfolge nicht nur einen ORF von 885 bp auf, sondern enthielt die Sequenzen dreier Peptidfragmente der Mikrosequenzierung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (48 kDa-Bande des SDS-Gels aus IV.2.3.7). Eingerahmt wurde die Sequenz von den beiden eingesetzten, degenerierten Primersequenzen 48 kDa for und 48 kDa rev2. Weiter zur Mitte hin war dann die codierende Sequenz des Peptids: FVFRFPEK lokalisiert. Zusätzlich konnten alle, nicht zur Primersynthese herangezogenen Aminosäuren der Spaltpeptide bestätigt werden. Nachdem auch noch eine interne *EcoR* I-Schnittstelle in der Sequenz auftrat, war die Identität des Stückes (900 bp) bewiesen und es konnte davon ausgegangen werden, einen Teilbereich der cDNA der 48 kDa-Bande amplifiziert zu haben.

Klon 5 der 48 kDa-Bande:

5'	GCG	TAT	GGG	TGG	GCG	GCG	AGG	GAC	TCA	TCT	GGG	ATT	CTT	TCT	CCC	TTC
	A	Y	G	W	A	A	R	D	S	S	G	I	L	S	P	F
	AAG	TTC	TCC	AGA	AGG	GCA	ACA	GGT	GAT	CAT	GAT	GTC	AGA	GTA	AAG	ATT
	K	F	S	R	R	A	T	G	D	H	D	V	R	V	K	I

CTC	TAC	GCT	GGT	GTT	TGT	CAT	TCT	GAC	CTT	CAA	TCT	GCC	AGG	AAT	GAC
L	Y	A	G	V	C	H	S	D	L	Q	S	A	R	N	D
ATG	GGC	TGC	TTT	ACA	TAT	CCT	CTT	GTG	CCC	GGG	TTC	GAG	ACG	GTA	GGC
M	G	C	F	T	Y	P	L	V	P	G	F	E	T	V	G
ATA	GCG	ACT	GAA	GTA	GGA	AGC	AAG	GTC	ACA	AAA	GCG	AGA	GTC	GGC	GAT
I	A	T	E	V	G	S	K	V	T	K	A	R	V	G	D
AAA	GTT	GCA	GTG	GGA	ATC	ATG	GTG	GGA	TCA	TGC	GGC	AAA	TGC	CAC	GAG
K	V	A	V	G	I	M	V	G	S	C	G	K	C	H	E
TGC	GTC	AAT	GAC	CAT	GAA	TGT	TAC	TGC	CCA	GAG	GTG	ATC	ACA	TCT	TAT
C	V	N	D	H	E	C	Y	C	P	E	V	I	T	S	Y
GGT	CGA	ATG	TAC	CAT	GAT	GGA	ACT	CCC	ACT	TAC	GGA	GGT	TTC	TCC	AAT
G	R	M	Y	H	D	G	T	P	T	Y	G	G	F	S	N
GAG	ACA	GTA	GTG	AGT	GAG	AAA	TTC	GTT	TTT	CGT	TTT	CCT	GAA	AAA	CTT
E	T	V	V	S	E	K	F	V	F	R	F	P	E	K	L
CCA	ATG	GCT	GCT	GGT	GCT	CCA	CTG	CTC	AGT	GCT	GGA	GTC	TCT	GTG	TAC
P	M	A	A	G	A	P	L	L	S	A	G	V	S	V	Y
AGT	GCA	ATG	AGA	TTT	TAT	GGC	CTG	GAT	AAG	CCA	GGG	ATG	CAC	CTG	GGA
S	A	M	R	F	Y	G	L	D	K	P	G	M	H	L	G
GTT	GTA	GGG	CTT	GGT	GGA	CTT	GGT	CAT	TTA	GCG	GTC	AAG	TTC	GCC	AAG
V	V	G	L	G	G	L	G	H	L	A	V	K	F	A	K
GCT	TTT	GGG	GTC	AAA	GTC	ACT	GTG	ATT	AGT	ACC	TCT	ACA	AGC	AAG	AAG
A	F	G	V	K	V	T	V	I	S	T	S	T	S	K	K
GAT	GAA	GCT	ATC	AAT	GAT	CTT	GGC	GCT	GAT	GCA	TTC	TTG	GTC	AGT	ACT
D	E	A	I	N	D	L	G	A	D	A	F	L	V	S	T
GAT	GCT	GAA	CAA	ATG	CAG	GCT	GGC	TCT	GGA	ACC	TTG	GAT	GGA	ATT	CTT
D	A	E	Q	M	Q	A	G	S	G	T	L	D	G	I	L

GAC	ACC	GTA	CCT	GTT	GTC	CAT	CCT	ATT	GGG	GCC	CTG	CTA	GGT	CTA	CTG
D	T	V	P	V	V	H	P	I	G	A	L	L	G	L	L
AAG	AAT	CAC	ACG	AAG	CTT	GTA	TTG	GTG	GGA	GCT	ACA	ATG	GGC	TCA	TTT
K	N	H	T	K	L	V	L	V	G	A	T	M	G	S	F
GAG	TTG	CCA	ATT	CTT	CCT	TTA	GGA	GTG	GGT	AGG	AAA	AGT	GTG	GTT	TCC
E	L	P	I	L	P	L	G	V	G	R	K	S	V	V	S
ACC	ATT	GGC	GGC	AGT	ACC	AAA	3'								
T	I	G	G	S	T	K									

Abb. 39 Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der 48 kDa-Bande nach PCR mit degenerierten Primern. Die durch die Nukleotidsequenz codierten Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code unter dem jeweiligen Basentriplett zu finden. Grau unterlegt sind die zur Ableitung der degenerierten Primer genutzten Peptidbereiche. Nicht zur Primersynthese herangezogene, bekannte Aminosäuren sind in rot angegeben.

4.2.4 RACE-PCR

Da nun ein codierender Bereich der 48 kDa-Bande zur Verfügung stand, konnten RACE-Primer entworfen werden, die für diese cDNA spezifisch waren.

48 kDa RACE for: 5' G GCC CTG CTA GGT CTA CTG AAG AAT C 3'
 A L L G L L K N

48 kDa RACE rev: 5' GAC CTT GCT TCC TAC TTC AGT CGC TAT G 3'
 V K S G V E T A I

In Kombination mit dem entsprechenden GeneRacer 3'- bzw. 5'-Primer und der nach III.3.5.1.2 hergestellten RACE-cDNA sollte die Amplifizierung der gesuchten 3'- und 5'-Enden der 48 kDa cDNA erfolgen. Es wurden folgende Ansätze vorbereitet:

		5'-Ende					3'-Ende				
Probe		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Template (RACE-cDNA;III.3.5.1.2)	1 µl	×	×	×	×	-	×	×	×	×	-
GeneRacer 5'-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	-	×	-	×	×	-	-	-	-	-
GeneRacer 3'-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	-	-	-	-	-	-	×	-	×	×
Primer 48 kDa RACE for (10 pmol/µl)	1 µl	-	-	-	-	-	-	-	×	×	×
Primer 48 kDa RACE rev (10 pmol/µl)	1 µl	-	-	×	×	×	-	-	-	-	-
dNTP's (40 mM)	1 µl	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Puffer (10×)	5 µl	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl											

PCR-Programm:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, Taq-Zugabe		
5	94 °C	30 s
	72 °C	1 min
5	94 °C	30 s
	70 °C	30 s
	72 °C	1 min
20	94 °C	30 s
	68 °C	30 s
	72 °C	1 min
1	72 °C	10 min

Nach dem Auftragen und Trennen der PCR-Proben (30 µl) über ein 1 %iges Agarosegel sollte sich herausstellen, daß auch hier wieder optimale Bedingungen sowohl für die Probenzusammensetzung als auch für das Touch-Down/Hotstart- PCR-Programm gewählt wurden. Nur in Probe Nr. 5 (Abb. 40), einem der 8 Kontrollansätze, ist eine unspezifische Bande, evtl. ein Primeraddukt, zu sehen. Ansonsten wurde mit hoher Selektivität das

gewünschte cDNA-Ende amplifiziert. Bahn 4 zeigt das codierende Fragment des 5'-Endes und Bahn 9 das dazugehörige 3'-Ende.

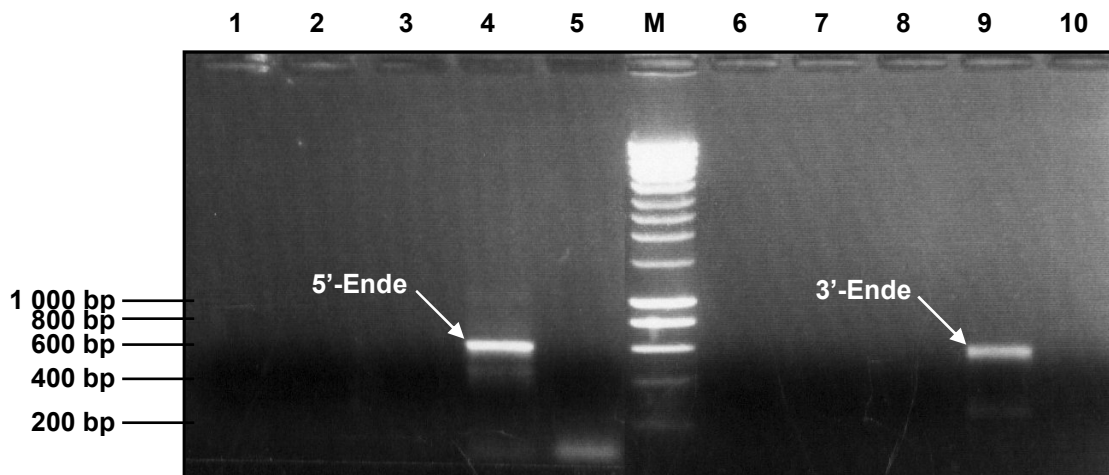


Abb. 40 Agarosegel (1 %ig) nach RACE-PCR. Man sieht die gezielte Vervielfältigung des 5'-Endes der 48 kDa-cDNA in Bahn 4 mit etwa 600 bp und die Amplifikation des 3'-Endes, ebenfalls ca. 600 bp groß, in Bahn 9. In den restlichen Kontrollansätzen sind, bis auf eine unspezifische Bande in Probe 5, keine weiteren PCR-Produkte erkennbar. M: Marker (Smart Ladder).

Die beiden ca. 600 bp großen Fragmente des 5'- und 3'-Endes wurden in der Folge aus dem Gel eluiert, aufgearbeitet (III.3.3), in *pGEM-T easy* ligiert (III.3.5.3.1) und abschließend in Top10F' kloniert (III.3.9). Zur Kontrolle, ob die Nukleotid-Stücke insertiert waren, sollte von den erhaltenen Top10F'-Klonen einige isoliert und in Form einer antibiotikahaltigen Flüssigkultur angezogen werden. Die daraus mittels Minipräparation (III.3.1.4.1) gewonnenen Plasmide wurden mit *EcoR I* verdaut. Als Resultat ergab sich eine Ausbeute von mehr als 60 % an positiven Klonen, die das 5'- bzw. das 3'-Ende im *pGEM-T easy* Vektor enthielten. Jeweils 2 dieser Klone wurden erneut kultiviert, sodann einer hochreinen Minipräparation nach III.3.1.4.2 unterzogen und anschließend einem *EcoR I*-Verdau (Abb. 41) zugeführt. Weiterhin sollten die Plasmidextrakte der Bahnen 2 und 4 sequenziert werden. Die dabei erhaltene, vollständige cDNA der 48 kDa-Bande mit 1 703 bp ist im Anhang VII.3.1.3 aufgelistet.

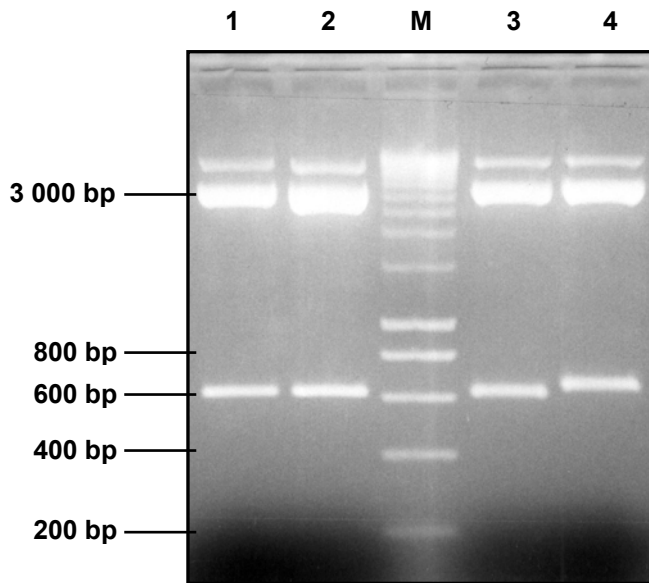


Abb. 41 Agarosegel (1.5 %ig) nach *EcoR* I-Verdau einer Plasmid-Minipräparation. Die der Bahnen 1 + 2 zugrunde liegenden Klone enthalten das 600 bp-Insert des 5'-Endes der 48 kDa-cDNA. Bahnen 3 + 4 zeigen das ausgeschnittene 600 bp-Fragment des 3'-Endes der 48 kDa-cDNA. M: Marker (Smart Ladder).

4.2.5 PCR mit genomischer DNA

Bei der Suche nach der entsprechenden Nukleotidsequenz der 48 kDa-Bande auf genomischer Ebene war es zuerst erforderlich, genomische DNA von *Rauvolfia serpentina* zu isolieren (III.3.1.5). Weiterhin mußten neue, spezifische Primer für das aus den obigen Experimenten erhaltene 3'- und 5'-Ende generiert werden.

48 kDa genDNA for: 5' ATG CGT TTC GCT AAC TTT GAG GGC TCC 3'

48 kDa genDNA rev: 5' GGA CTC AGG TGG AGT TAA GGT GTT GCC GAT 3'

Um sagen zu können, ob das gefragte Gen Introns enthält, wurden folgende 2 Ansätze pipettiert:

Probe		1	2
Template 0.25 µg/µl (genom.DNA; III.3.1.5)	10 µl	×	×
Primer 48 kDa genDNA for (10 pmol/µl)	1 µl	×	×
Primer 48 kDa genDNA rev (10 pmol/µl)	1 µl	×	×
dNTP's (20 mM)	2 µl	×	×
MgCl ₂ (50 mM)		1 µl	2 µl
Puffer (10×)	5 µl	×	×
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	1 µl	×	×
Ampuwa ad 50.0 µl		29 µl	28 µl

Temperatur-Zeit-Programm:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, <i>Taq</i> -Zugabe		
5	94 °C	30 s
	45 °C	1 min 30 s
	72 °C	5 min
30	94 °C	30 s
	55 °C	1 min 30 s
	72 °C	5 min
1	72 °C	10 min

30 µl aus den PCR-Läufen wurden über ein 1 %iges Agarosegel getrennt, wobei im Ansatz mit der höheren MgCl₂-Konzentration einige Banden im Bereich von 1 500 – 2 500 bp entstanden waren. Diese könnten im Falle einer Reproduzierbarkeit eine Aussage über das Größenverhältnis cDNA/genomische DNA der 48 kDa-Bande zulassen.

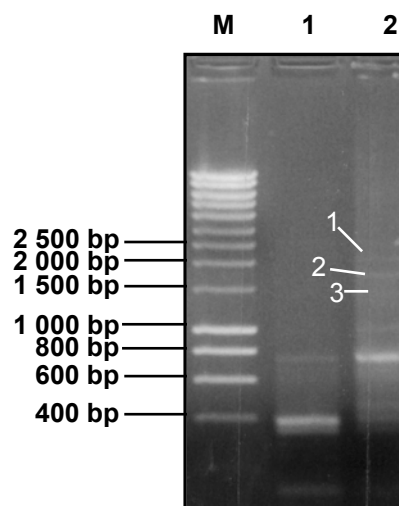


Abb. 42 Agarosegel (1 %ig) nach PCR mit genomischer DNA. Ziel war es, den Genabschnitt aufzufinden, der für die 48 kDa-Bande codiert. Da die cDNA schon 1 239 bp umfaßt, mußte also ein Fragment amplifiziert werden, das mindestens genauso groß ist. Dies ist bei der zweiten PCR-Probe (Bahn 2) gelungen, wobei drei Banden zwischen 1 000 bp und 2 500 bp zu erkennen sind. M: Marker (Smart Ladder).

Zu diesem Zweck wurden die in Abb. 42 mit 1 - 3 nummerierten Banden einzeln aus dem Gel extrahiert und 15 µl des dabei entstandenen Eluats als Template für einen zweiten PCR-Zyklus eingesetzt. Die Nummerierung der PCR-Ansätze beruhte auf der Nummer der ausgeschnittenen Bande aus Abb. 42. Als Resultat zeigte die gelelektrophoretische Trennung (Abb. 43) eine PCR-Bande bei 750 bp und eine bei 1 700 bp in Bahn 1 auf. In Bahn 2 konnte nur die ca. 750 bp große Bande erhalten werden und Bahn 3 zeigte kein nennenswertes Amplikon.

Setzt man das 1 700 bp-Fragment im Vergleich zur Größe der cDNA der 48 kDa-Bande (1 239 bp), sollten nach diesem Resultat ein oder mehrere Introns mit einer Gesamtlänge von etwa 450 – 500 bp in der Gensequenz vorkommen.

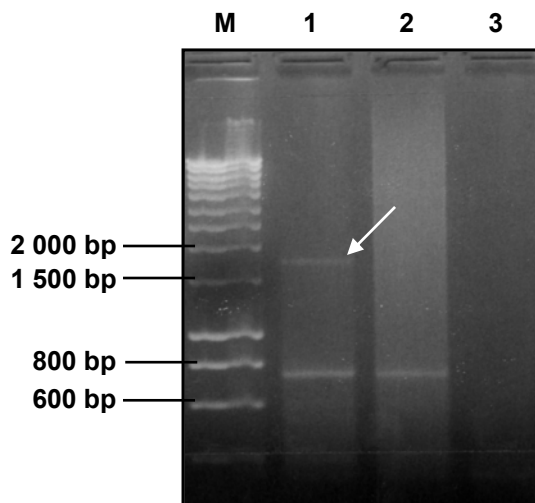


Abb. 43 Agarosegel (1 %ig) nach Reamplifizierung der genomischen DNA-Banden aus Abb. 42. Dabei wurde in Bahn 1 die Bande 1 (s.o.), in Bahn 2 die Bande 2 und in Bahn 3 die 3. Bande als Template eingesetzt. Während Bahn 3 keine erneute Bande aufweist, konnten in Bahnen 1 + 2 Fragmente von ca. 750 bp reamplifiziert werden. In Bahn 1 ist ein weiteres PCR-Produkt bei 1 700 bp zu erkennen, das als codierende Gensequenz in Frage kommt. M: Marker (Smart Ladder).

4.3 Expressionsstrategien

Für alle klonierten cDNA's konnte gezeigt werden, daß sie einen offenen Leserahmen besitzen und daß alle nach der Proteinsequenzierung erlangten Peptidfragmente in der dazugehörigen cDNA wiedergefunden werden konnten. Damit war zumindest bestätigt, daß die identifizierte cDNA für die sequenzierten Proteine codierte. Weitere Internetberechnungen unter Einbeziehung des ExPASy-Servers ergaben die in Tab. 13 angegebenen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte für die erwarteten Proteine der vier ermittelten cDNA's. Diese stimmen nur bedingt mit den schon bekannten, im proteinchemischen Teil dieser Arbeit charakterisierten Molekulargewichten der gereinigten Reduktasen überein.

cDNA-Sequenz	Proteinzugehörigkeit, angereicherte Reduktase (ermitteltes MW)	Berechnetes	
		MW [Da]	IEP [pH]
40 kDa	(40 kDa)	38 472	6.43
43 kDa RACE 1	Vomilenin Reduktase (43 kDa)	38 787	5.95
43 kDa RACE 2		(43 kDa)	38 949
48 kDa	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (48 kDa)	48 063	5.01

Tab. 13 Gegenüberstellung berechneter und experimentell bestimmter Molekulargewichte für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Nun war es wichtig, den Beweis zu erbringen, daß das Translationsprodukt der klonierten cDNA's auch wirklich der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase entsprach. Um dies zu klären, sollten die einzelnen Vollängenklone in einem jeweils speziell ausgesuchten Vektor-Wirt-System zur Expression gebracht und anschließend einem Aktivitätstest unterzogen werden. Ziel bei allen Umklonierungsarbeiten war es, möglichst effizient vorzugehen. Bei der Wahl des Vektorsystems bedeutete dies, daß ein Vektor gefunden werden mußte, in den die gewünschte cDNA ohne großen Aufwand inkloniert werden konnte. Weiterhin sollte die Kontrolle der Expressionsrate ermöglicht und im Falle der aktiven Expression eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie gegeben sein. Als Prämisse galt: Wenn möglich, sollte es sich um ATG-Vektoren handeln, so daß die zu klonierende Sequenz mit dem natürlichen Start-Codon beginnen konnte und damit keine Veränderung der Aminosäureabfolge im N-terminalen Bereich erfolgte. Dafür standen das *pQE 60*- und *pQE 70*-Plasmid in Kombination mit dem *pREP4*-Plasmid zur Verfügung. Letzteres produziert ununterbrochen das Lac-Repressor-Protein, welches die starke Transkriptionsrate des enorm aktiven T5-Promotors unterbindet. Fügt man gezielt IPTG hinzu, wird das Lac-Repressor-Protein durch Bindung an IPTG inaktiviert, so daß die Transkription initiiert wird. Dieser Mechanismus ermöglicht also eine gute Kontrolle der Expression. Zudem ist durch die oben genannten *pQE*-Vektoren eine Veränderung der zu exprimierenden Proteine dahingehend gegeben, daß eine *Bgl* II-Schnittstelle mit anschließender (His)₆-tag-Sequenz gefolgt von Stop-Codons in allen drei Leserahmen an die Stelle des natürlichen C-terminalen Stop-Codons tritt. Damit ist die Aufreinigung über Ni-NTA-Material gewährleistet. Letztlich ist man bei den *pQE*-Plasmiden auch noch in der Lage, durch ein entsprechendes Primer-Design ein Stop-Codon vor die *Bgl* II-Schnittstelle einzufügen. Damit kann das unveränderte Protein, d.h. ohne (His)₆-tag und ohne Veränderung der natürlichen Aminosäuresequenz, translatiert werden.

Im Fall der 43 kDa-cDNA RACE 1 und 2 sowie bei der 48 kDa-cDNA kamen die *pQE 60*- und *pQE 70*-Vektoren zum Einsatz, die weiterführend in M15 [*pREP4*] kloniert wurden.

Das 5'-Ende der zu klonierenden cDNA kann bei ATG-Vektoren, sequenzbedingt, nur in Form einer *Nco* I oder einer *Sph* I-Schnittstelle einligiert

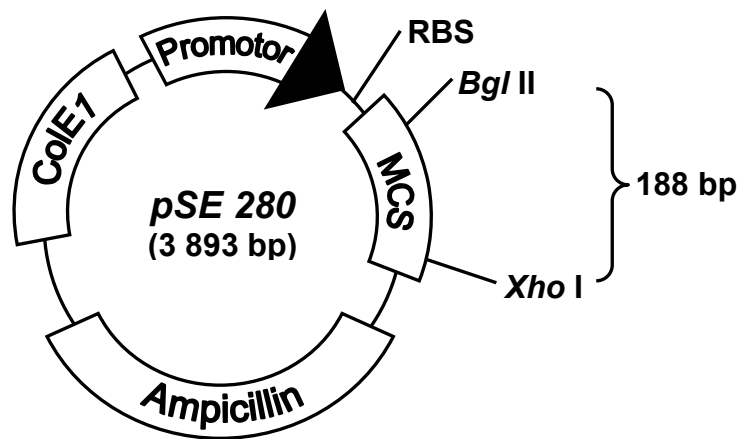
werden. Da in der für die 40 kDa-Bande codierenden cDNA zwei *Nco* I-Schnittstellen nachgewiesen werden konnten und im Falle einer Subklonierung in *pGEM-T easy* eine weitere *Nco* I-Schnittstelle dazukäme, würde sich die Umklonierung in einen *pQE*-Vektor - unter Einbeziehung von Partialverdau - äußerst schwierig gestalten. Daraufhin wurde sich für das *pKK 233-2*-Derivat, dem Expressionsplasmid *pSE 280*, entschieden. Hierbei war ebenfalls die Induktion eines starken *trp-lac*-Promotors durch IPTG gegeben, jedoch mußte auf die Möglichkeit der selektiven Aufreinigung über Affinitätschromatographie verzichtet werden.

4.3.1 Umklonierung der cDNA der 40 kDa-Bande

Nachdem ein geeignetes Expressionssystem (s.o.) gefunden war, konnten die Vorarbeiten für die Umklonierung beginnen. Dazu gehörte das Transformieren (III.3.9) des *pSE 280*-Vektors in Top10F'-Zellen mit anschließender Kultivierung und Plasmid-Minipräparation nach III.3.1.4.2. Die aufgereinigten, zirkulären Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Xho* I in folgendem Ansatz vorgeschritten:

10 µl	<i>pSE 280</i> (ca. 2 µg)
3 µl	NEB-Puffer 3 (10 ×)
3 µl	<i>Xho</i> I (4 U/µl)
3 µl	<i>Bgl</i> II (4 U/µl)
11 µl	Ampuwa

Auf diese Weise wurde der 3 893 bp große Vektor linearisiert, wobei ein Fragment von 188 bp herausgeschnitten wurde. Der auf die Promotorregion folgende Überhang wurde durch *Bgl* II erzeugt, der Überhang zur späteren Ligation des 3'-Endes der 40 kDa-cDNA durch *Xho* I. Eine kurze Übersicht dazu bietet die Abb. 44.

Abb. 44 Schematischer Aufbau des *pSE 280*-Plasmids.

Der Plasmidverdau wurde über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und die Vektorbande bei ca. 3 700 bp aus dem Gel eluiert (III.3.3).

Parallel dazu wurde die zu ligierende cDNA der 40 kDa-Bande modifiziert. Um die komplette codierende Sequenz unverändert übernehmen zu können, wurden Primer mit "Überhang" entworfen, die dafür sorgten, daß am 5'-Ende die *Bgl* II- und am 3'-Ende die *Xho* I-Schnittstelle eingeführt wurde.

Primer 40 kDa *pSE 280* for: 5' CC AGA TCT ATG GCC GGA AAA TCA CC 3'
Bgl II **Start-Codon**

Primer 40 kDa *pSE 280* rev: 5' CTC GAG TTA AGG AGC TTT CAA GGT G 3'
Xho I **Stop-Codon**

Bei der Wahl des zu amplifizierenden Ausgangsmaterials konnte auf zweierlei zurückgegriffen werden. Zum einen diente die Minipräparation des sequenzierten *pBlueskript*-Plasmids von Klon 25 (IV.4.1.6.2) als Template und zum anderen wurde die RACE-cDNA als Matritze eingesetzt.

Die nachfolgend beschriebene Probenzusammensetzung war bis auf die verwendete Advantage-Polymerase (ca. 1 Fehler auf 2 000 bp) standardmäßig. Auf die *Taq*-Polymerase wurde verzichtet, da in dieser PCR die endgültig zu klonierende und zu exprimierende 40 kDa-cDNA geschaffen wurde. Dafür sollte eine Polymerase gewählt werden, die sehr sauber arbeitet und weniger Fehler produziert als die *Taq*-Polymerase, die ca. 1 Fehler auf 500 – 600 bp erzeugt.

Pipettierschema und Temperatur-Zeit-Zyklen der PCR zur Synthese der 40 kDa-cDNA mit den entsprechenden Schnittstellen für den Expressionsvektor:

Template (s.o.)	1 μ l
Primer 40 kDa <i>pSE 280</i> for (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 40 kDa <i>pSE 280</i> rev (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP's (20 mM)	2 μ l
Advantage-Puffer (10 \times)	5 μ l
Advantage-Polymerase	1 μ l
Ampuwa ad 50.0 μ l	39 μ l

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, Advantage-Polymerase-Zugabe		
5	94 °C	30 s
	60 °C	1 min
	72 °C	1 min 30 s

Als PCR-Produkt konnte das erwartete 1 090 bp große cDNA-Stück erhalten werden, daß zur besseren Handhabung nochmals in *pGEM-T easy* subkloniert wurde. Eine aus positiven Klonen angefertigte Minipräparation (III.3.1.4.2) mit anschließender Sequenzierung bestätigte einerseits die Identität des Fragments und andererseits die erfolgreiche Einführung der *Bgl* II- und *Xho* I-Schnittstelle. Nun konnten die aufgereinigten Plasmide, wie auch schon zuvor der *pSE 280*-Vektor mit den entsprechenden Enzymen verdaut werden. Der über 1 h 15 min geführte Restriktionsverdau bei 37 °C enthielt:

4 μ l Plasmidextrakt (ca. 1 μ g)

2 μ l BSA (1 mg/ml)

2 μ l 10 \times Puffer NEB 3

1 μ l *Xho* I (4 U/ μ l)

1 μ l *Bgl* II (4 U/ μ l)

10 μ l Ampuwa

Nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die, aus dem *pGEM-T easy*-Vektor, herausgeschnittenen Banden aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und das erhaltene Gelextrakt (III.3.3) in den vorgeschrittenen *pSE 280-Vektor* ligiert. Abschließend erfolgte eine Transformation (III.3.9) dieses Konstruktes in Top10F'-Bakterien.

Das fertiggestellte Vektor-Wirtssystem stand nun den Expressionsexperimenten zur Verfügung, die der Übersicht halber im Anschluß an die Umklonierungsarbeiten für alle zu testenden cDNA-Klone gemeinsam abgehandelt werden.

4.3.2 Abstimmen der codierenden cDNA der 43 kDa-Bande auf den *pQE 60*-Vektor

Hierbei sollten die beiden cDNA's der Klone 43 kDa RACE 1 und 43 kDa RACE 2 (VII.3.1) mit Schnittstellen für einen ATG-Vektor versehen werden. Dabei kamen die Plasmide *pQE 60* und *pQE 70* in Frage, die sich nur durch die ATG-Schnittstelle unterscheiden. Der *pQE 60*-Vektor hat durch die *Nco* I-Schnittstelle bedingt ein Guanin, das auf die ATG-Sequenz folgt; *pQE 70* hingegen besitzt als erste Base nach dem Start-Codon ein Cytosin, resultierend in einer *Sph* I-Schnittstelle. Da in der zu klonierenden cDNA der 43 kDa-Bande einerseits die Base T (RACE 1-Klon) und andererseits die Base G (RACE 2-Klon) auf die ATG-Sequenz folgte, wurde sich für den *pQE 60*-Vektor entschieden. Dadurch blieb die RACE 2-Sequenz unverändert. Gleichzeitig mußte jedoch eine Änderung der Sequenz des RACE 1-Klons von ATG TCG (Methionin Serin) nach ATG GCG (Methionin Alanin), einhergehend mit der Veränderung einer Aminosäure, in Kauf genommen werden.

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, die beiden Isoformen selektiv über PCR zu amplifizieren. Der Grund dafür ist in der hohen Homologie der Sequenzen im 5'-Bereich zu sehen, die es nicht ermöglicht, entweder unmittelbar am Start-Codon oder noch weiter Richtung 5'-Ende einen spezifischen Primer für eine der beiden Isoformen zu generieren. Die Folge davon war eine aufwendige Testung zahlreicher Klone bis die geforderten Sequenzen mit den neuen Schnittstellen gefunden wurden.

In der ersten PCR wurde mit einem rev-Primern gearbeitet, der die 3'-Sequenz nicht veränderte, was eine (His)₆-tag-Translation auf Proteinebene impliziert.

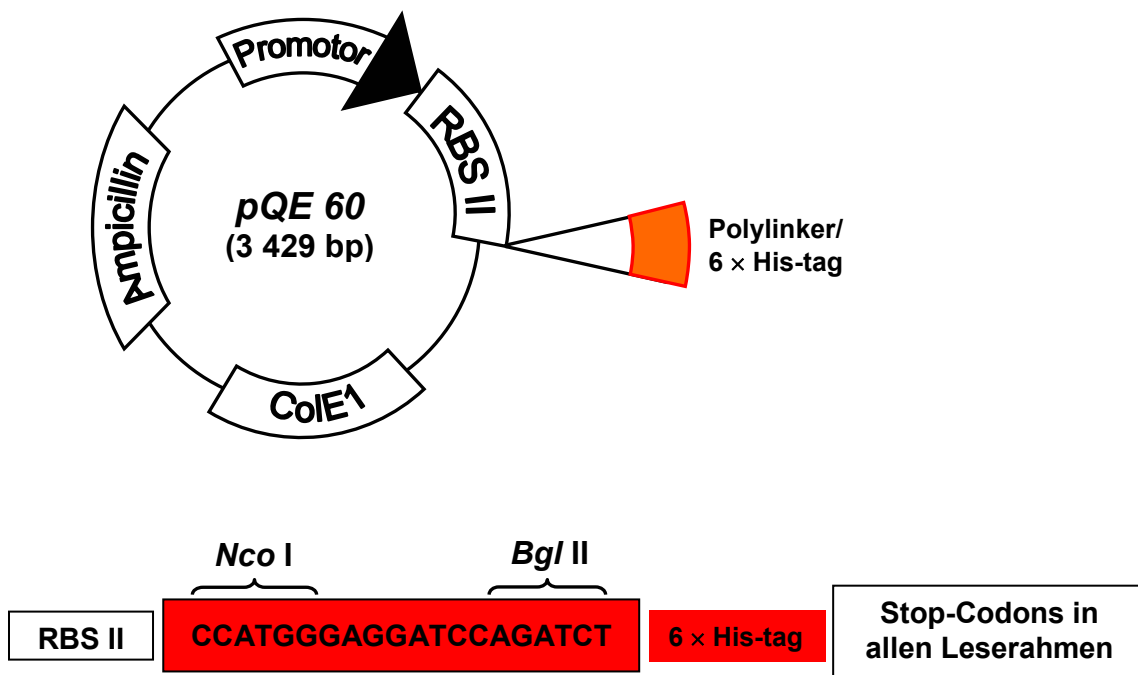
Die nachstehenden Primer wurden für den ersten PCR-Durchgang entworfen:

43 kDa pQE 60 for: 5' CC ATG GCG AAG TCA CCA GAA GTT GAG C 3'
Nco I mit involviertem Start-Codon

43 kDa pQE 60 rev1: 5' AGA TCT GGC AGA TTT CAA TGT GTT ACC 3'
Bgl II

In Abb. 45 ist die Vektorkarte des *pQE 60*-Plasmids schematisch dargestellt. Zusammen mit dem herausgegriffenen, linearisierten Bereich soll die oben erwähnte Klonierungsmethodik nochmal verdeutlicht werden.

Abb. 45 Vektorkarte des *pQE 60*-Plasmids zur Veranschaulichung der Klonierungsstrategie.



Der Ansatz zur Einfügung der *Nco* I-Schnittstelle am N-Terminus und der *Bgl* II-Schnittstelle am C-Terminus der zu translatierenden 43 kDa RACE 1- und RACE 2-Sequenz beinhaltete wieder den Einsatz der Advantage-Polymerase:

Template (RACE cDNA aus III.3.5.1.2)	1 μ l
Primer 43 kDa <i>pQE 60</i> for (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 43 kDa <i>pQE 60</i> rev (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP's (20 mM)	2 μ l
Advantage-Puffer (10 \times)	5 μ l
Advantage-Polymerase	1 μ l
Ampuwa ad 50.0 μ l	39 μ l

Zur Amplifizierung wurden die nachstehenden Temperatur-Zeit-Zyklen in den Thermocycler einprogrammiert:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, Advantage-Polymerase-Zugabe		
5	94 °C	30 s
	48 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
30	94 °C	30 s
	57 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min

Das hierbei erwartete PCR-Produkt von ca. 1 100 bp konnte erfolgreich vervielfältigt werden. Infolgedessen wurden die erhaltenen cDNA-Fragmente in *pGEM-T easy* subkloniert (III.3.5.3.1) und in Top10F' transformiert (III.3.9). Die somit erzeugten Klone konnten dann mittels Minipräparation (III.3.1.4.1) und anschließendem Restriktionsverdau (III.3.5.4) auf die insertierte cDNA überprüft werden. Nachdem auf diese Weise von beiden RACE-Sequenzen Klone gefunden wurden, sollte eine abschließende Sequenzierung die Basenabfolge der cDNA klären.

Die ermittelten positiven Klone wurden erneut kultiviert, einer Plasmid-Präparation (III.3.1.4.2) unterzogen und die somit isolierten und aufgereinigten *pGEM-T easy*-Vektoren mit *Bgl*/II und *Nco* I verdaut. Ebenfalls wurden die aufgereinigten, zuvor in Top10F' angezogenen, *pQE 60*-Plasmide dem gleichen Verdau zugeführt (III.3.5.4). Nach gelelektrophoretischer Trennung wurde die Bande des linearisierten *pQE*-Vektors und die aus dem *pGEM-T easy*-Vektor

herausgeschnittenen, modifizierten 43 kDa-cDNA's aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und anschließend ligiert.

Der dabei neu entstandene Expressionsvektor wurde in vorbereitete M15 [*pREP4*]-Bakterien transformiert (III.3.9), die dann - wie unter IV.5 angegeben - zur Expression angeregt wurden.

Die Klonierung der 43 kDa-cDNA RACE 1- und RACE 2-Sequenz *ohne* (His)₆-tag soll hier nur kurz abgehandelt werden, da die Arbeit mit den oben angegeben Experimenten nahezu identisch ist. Die einzige Änderung besteht darin, daß die Ausgangs-DNA (Template) für die Schnittstellen-PCR auf eine Plasmid-Präparation der oben erhaltenen, separaten Klone der RACE 1 und RACE 2-Sequenz in *pGEM-T easy/Top10F'* zurückgeht. Damit war gesichert, die 43 kDa RACE 1- und RACE 2-Klone selektiv dahingehend zu verändern, daß ein Stop-Codon vor die (His)₆-tag-codierende Sequenz gesetzt wurde (Abb. 46).

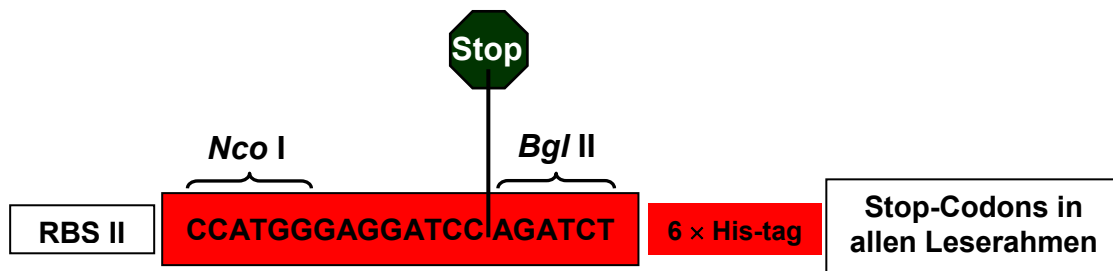


Abb. 46 Durch Einbringen eines Stop-Codons unmittelbar vor die *Bgl II*-Schnittstelle des *pQE 60* Vektors, wird ein Ablesen des (His)₆-tags verhindert.

Um dieses Ziel zu erreichen konnte zwar der oben aufgeführte 43 kDa *pQE 60* for-Primer verwendet werden, aber es mußte ein neuer Reverse-Primer synthetisiert werden:

43 kDa *pQE 60* rev2: 5' AGA TCT CTA GGC AGA TTT CAA TGT GTT ACC 3'
 Bgl II Stop-Codon

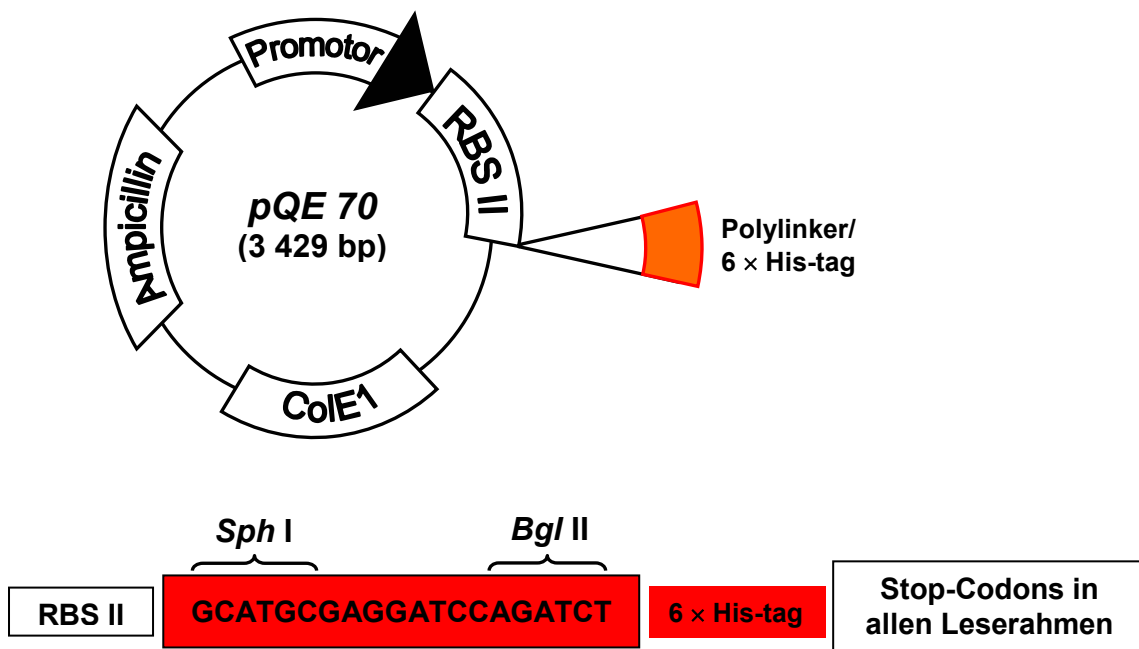
Alle weiteren Experimente wurden analog den obigen Arbeitsschritten durchgeführt. Die letztlich in den *pQE 60*-Vektor umklonierten cDNA's der 43 kDa-Bande *ohne* (His)₆-tag-Sequenz wurden in M15 [*pREP4*]-Bakterien transformiert (III.3.9) und exprimiert (IV.5.1.2).

4.3.3 Einbau der 48 kDa-cDNA in das Expressionsplasmid *pQE 70*

Auch hier wurden dieselben Techniken angewandt, die auch schon bei der Umklonierung der 40- und 43 kDa-cDNA zum Erfolg geführt hatten.

Als Vektorsystem wurde *pQE 70* (Abb. 47) gewählt, da die erste Base hinter dem Start-Codon Cytosin war. Die natürliche Abfolge wurde daher durch die Einführung der benötigten *Sph* I-Schnittstelle nicht verändert.

Abb. 47 Aufbau des *pQE 70*-Vektors. Im linearisierten Ausschnitt sind die Schnittstellen für die Umklonierung angegeben.



Zuerst stand die Primerentwicklung zur Darstellung der *Sph* I- und *Bgl* II-Schnittstelle an. Weiterhin sollten die Primer geeignet sein, später sowohl die Möglichkeit zur Aufreinigung über einen (His)₆-tag, als auch die Expression des unveränderten Proteins zu ermöglichen. Darauf basierend wurden ein 5'-Primer und zwei 3'-Primer entworfen. Der 48 kDa *pQE 70* Stop rev-Primer sollte durch sein vor der *Bgl* II-Schnittstelle eingeführtes Stop-Codon für den Abbruch der Translation sorgen. Damit würde das abgelesene Protein keinen (His)₆-tag aufweisen. Der Primer 48 kDa *pQE 70* (His)₆ rev diente nur der Einbringung der *Bgl* II-Schnittstelle. Da kein Stop-Codon enthalten war, sollte im Falle der Expression ein Protein mit (His)₆-tag entstehen.

48 kDa pQE 70 for: 5' GC ATG CGT TTC GCT AAC TTT GAG GGC 3'
 Sph I mit involviertem Start-Codon

48 kDa pQE 70 Stop rev: 5' AGA TCT TTA GGA CTC AGG TGG AGT TAA GGT 3'
 Bgl II Stop-Codon

48 kDa pQE 70 (His)₆ rev: 5' AGA TCT GGA CTC AGG TGG AGT TAA GGT 3'
 Bgl II

In der nachstehenden PCR wurden die cDNA-Fragmente, in Abhängigkeit von der RACE cDNA als Template und der *Pfu*-Turbo-Polymerase, mit den entsprechenden Schnittstellen generiert.

Probe		1	2
Template (RACE cDNA aus III.3.5.1.2)	1 μl	×	×
Primer 48 kDa pQE 70 for (10 pmol/ μl)	1 μl	×	×
Primer 48 kDa pQE 70 Stop rev (10 pmol/ μl)	1 μl	×	-
Primer 48 kDa pQE 70 (His) ₆ rev (10 pmol/ μl)	1 μl	-	×
dNTP's (40 mM)	1 μl	×	×
<i>Pfu</i> -Turbo-Puffer (10 \times)	5 μl	×	×
<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase	1 μl	×	×
Ampuwa ad 50.0 μl	39 μl	×	×

Da die *Pfu*-Turbo-Polymerase zwar sehr genau arbeitet, jedoch keinen A-Überhang am 3'-Ende erzeugt, der unabdinglich für die Subklonierung der erzeugten PCR-Produkte in *pGEM-T easy* ist, wurde nach dem letzten Amplifikationszyklus nochmals 1 μl *Taq*-Polymerase pro Ansatz zugegeben.

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
Pause, Zugabe der <i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase		
5	94 °C	30 s
	45 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
30	94 °C	30 s
	60 °C	1 min 30 s
	72 °C	2 min
Pause, Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase (1 μl ; 5 U/ μl)		
1	72 °C	10 min

Nach obenstehender PCR konnte in jedem der zwei Ansätze selektiv das erwartete, etwa 1 250 bp große, Amplikon erhalten werden (Abb. 48). Besonders effektiv waren die PCR-Bedingungen für den 48 kDa *pQE 70* (His)₆ rev-Primer. Die Ausbeute ist um 10 – 20 fache höher als bei der PCR-Probe mit dem 48 kDa *pQE 70* Stop rev-Primer. Das hängt unmittelbar mit der Art des Primer-Endes zusammen. Der 48 kDa *pQE 70* (His)₆ rev-Primer besitzt vor den 6 Basen der *Bgl* II-Schnittstelle zwei Guanine, die eine durch Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen eine starke Fixierung des Primers begründen. Im Gegensatz dazu weist der 48 kDa *pQE 70* Stop rev-Primer an der entsprechenden Stelle ein Triplet auf, daß ausschließlich aus den nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildenden Basen Adenin und Thymin besteht. Die Auswirkung der dadurch verminderten Bindefähigkeit, gerade am Primerende, ist in Abb. 48 zu sehen.

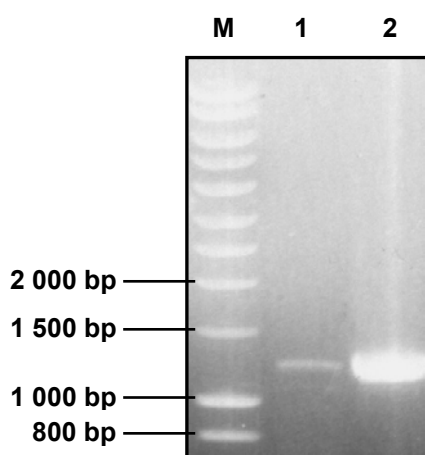


Abb. 48 Agarosegel (1 %ig) nach erfolgter PCR zur Einführung der *Bgl* II- und der *Sph* I-Schnittstelle in die Vollängenklon-cDNA der 48 kDa-Bande. M: Marker (Smart Ladder). Bahn 1 zeigt die cDNA mit enthaltenem Stop-Codon unmittelbar vor der *Bgl* II-Schnittstelle, d.h. bei der späteren Translation wird *kein* (His)₆-tag angefügt. In Bahn 2 ist die cDNA ohne Stop-Codon versehen, so daß bei der Expression des codierten Proteins ein (His)₆-tag am C-Terminus translatiert wird.

Die erhaltenen, modifizierten cDNA-Stücke wurden nach Gelextraktion (III.3.3) in *pGEM-T easy* ligiert (III.3.5.3.1). Im Anschluß daran folgte die Transformation standardmäßig in Top10F'. Nachdem einige - der auf LB-Ampicillin Agarplatten vorselektionierten - Kolonien über eine Plasmid-Minipräparation in Verbindung mit einem *EcoR* I (5 U/μl)-Restriktionsverdau auf ein enthaltenes Insert durchgemustert waren, konnten die positiven Kolonien erneut kultiviert werden. Eine davon angelegte, hochreine Plasmid-Minipräparation wurde zur Überprüfung der Nukleotidabfolge sequenziert und weiterhin mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Sph* I versetzt. Der Verdau wurde 3 h lang bei 37 °C durchgeführt und danach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die hierbei entstandenen, ca. 1 250 bp großen Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten, aufgereinigt und in den mit *Bgl* II und *Sph* I vorgeschrittenen

pQE 70-Vektor ligiert. Dieses Konstrukt wurde zur Expression in kompetente M15 [*pRep4*] eingebracht.

5 Expressionsversuche

In diesem Teil der Arbeit sollte die Identität der gewonnenen und umklonierten cDNA's (IV.4.3) der 40-, 43- und 48 kDa-Bande, also der vermuteten Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase, bewiesen werden. Dazu wurden die vorbereiteten Expressionssysteme nach III.1.2 kultiviert, induziert und aufgeschlossen. Die daraus resultierenden Proteinrohextrakte wurden mehreren Aktivitätstests mit verschiedenen Substraten unterzogen. Wegen eines Kontrollwertes wurde bei Testung eines jeden Klones ein Vergleich mitkultiviert, der aus dem zur Klonierung verwendeten leeren Vektor (ohne Insert) im entsprechenden Wirtsstamm bestand.

Vorwegnehmend ist zu sagen, daß gegen Ende der vorliegenden Arbeit die *Rauvolfia*-Zellsuspensionskulturen die Produktion der Vomilenin Reduktase nahezu gänzlich einstellten. Der Umsatz des Vomilenins durch S 30Q aufgereinigte Proteinfractionen war zwar noch detektierbar, so daß die Proteinreinigungsschritte aus IV.2.2 bestätigt und Fehler bei der Durchführung des Assays ausgeschlossen werden konnten, jedoch war der Substratumsatz so gering, daß nicht genügend 1.2-Dihydrovomilenin für die abschließende Testung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Klone (48 kDa-Bande) produziert werden konnte. Daraufhin wurde versucht, 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin, ausgehend von Vomilenin auf chemischem Wege zu synthetisieren. Wie auch unter IV.6.2.3 beschrieben, war das 2 α -(*S*)-1.2-Dihydrovomilenin relativ leicht zugänglich, da der Angriff der Hydride von der sterisch ungehinderten Seite erfolgte. Um eine gezielte Reduktion der Indolenin-Doppelbindung nach 2 β -(*R*) zu erreichen, wurde nach MEIER (Dissertation, 1992) Lithiumaluminium-tri-tert.-butoxyhydrid eingesetzt, das über eine Komplexbildung mit der Estergruppierung an Kohlenstoffatom 17, die Reduktion von der sterisch gehinderten Seite vornehmen sollte. Immerhin konnte, im Gegensatz zur Reduktion mit NaBH₄, die nur 2 α -(*S*)-1.2-Dihydrovomilenin lieferte, ein kleiner Prozentsatz an 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin erhalten werden. Die Ausbeute (ca. 5 %) stand jedoch in keiner Relation zur eingesetzten Vomileninmenge.

Da somit nicht genügend 1.2-Dihydrovomilenin zur Verfügung stand, mußte auf eine Testung der Klone hinsichtlich der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität verzichtet werden.

Letztlich kamen als Substrate Vomilenin, das strukturisomere Alkaloid Perakin und aufgrund der Sequenzhomologien zu Cinnamoylalkohol- und Mannitol Dehydrogenasen Zimtaldehyd, Dihydrozimtaldehyd und D(-)Fructose zum Einsatz. Dazu wurden die nachstehenden Assays ausgearbeitet, wovon die Vomilenin-, Perakin-, Zimtaldehyd- und Dihydrozimtaldehyd Assays mit dem HPLC-Programm 1 bei 260 nm analysiert wurden. Der D(-)Fructose Assay nach Brünker et al. (1997) wurde mit dem UV-Spektrophotometer durchgeführt, wobei die Absorptionsabnahme durch den NADH₂-Verbrauch bei 340 nm mitverfolgt wurde.

Alle über HPLC zu trennenden Assays wurden zu 200 µl angesetzt, für 45 min bei 35 °C und 550 Upm inkubiert, anschließend durch Zugabe von 200 µl MeOH abgestoppt, abzentrifugiert und 80 µl des klaren Überstandes injiziert.

Vomilenin-Assay:

196.5 µl Enzymlösung (III.1.2)
 1 µl NADPH₂ (20 mM*)
 2.5 µl Vomilenin (2.8 mM*)

Perakin-Assay:

196 µl Enzymlösung (III.1.2)
 1 µl NADPH₂ (20 mM*)
 3 µl Perakin (2.8 mM*)

Zimtaldehyd-Assay:

194 µl Enzymlösung (III.1.2)
 1 µl NADPH₂ (20 mM*)
 5 µl Zimtaldehyd (2.8 mM*)

Dihydrozimtaldehyd-Assay:

189 µl Enzymlösung (III.1.2)
 1 µl NADPH₂ (20 mM*)
 10 µl Dihydrozimtaldehyd (2.8 mM*)

* Angegeben ist jeweils die Konzentration der Stammlösung.

Unmittelbar nach Präparation des D(-)Fructose-Assays wurde in 40 s-Abständen die Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 5 min 40 s mitverfolgt.

D(-)Fructose-Assay:

50 µl	Enzymlösung (III.1.2)	* Angegeben ist jeweils die Konzentration der Stammlösung.
15 µl	NADH ₂ (20 mM*)	
140 µl	0.5 M KP _i (pH 7.0)	
200 µl	Fructose (2 M*)	
ad 1 000 µl	Seral-H ₂ O	

5.1 Expressionsergebnisse

In allen Kontrollen, d.h. in den zum Vergleich angelegten Expressionssystemen mit dem entsprechenden Vektor ohne Insert, war ein unspezifisches Reduktasepotential nachweisbar. Dies äußerte sich in der Reduktion von Zimtaldehyd und auch von Dihydrozimtaldehyd in Gegenwart von NADPH₂. Ebenso fand ein NADH₂-Verbrauch im D(-)Fructose-Test statt.

Um sagen zu können, ob die zu exprimierenden Enzyme am Vomilenin-, Perakin-, Zimtaldehyd-, Dihydrozimtaldehyd- oder D(-)Fructoseumsatz beteiligt sind, bedurfte es also intensiver Expressionsoptimierung. Dies bedeutete eine Kultivierung aller Klone (vorerst ohne einen (His)₆-tag) bei unterschiedlichen Temperaturen und bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Die Abb. 49 zeigt als Beispiel einen über SDS-Gel getrennten Rohextrakt des mit 0.6 mM IPTG zur Expression angeregten 48 kDa-Klons bei 21 °C.

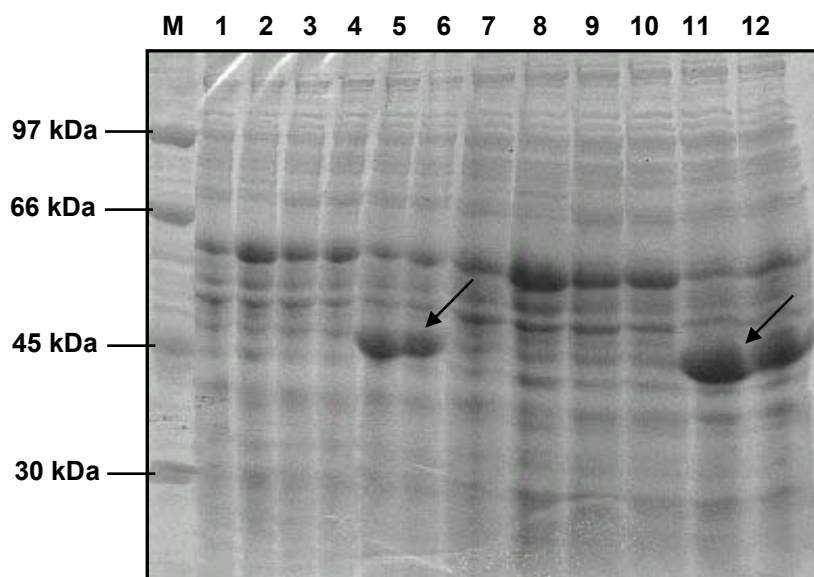


Abb. 49 SDS-Gel eines Rohextraktes nach Induktion der Expression eines 48 kDa-Klons mit 0.6 mM IPTG bei 20 °C. M: Marker. Bahnen 5 + 6 sowie 11 + 12 enthalten den Rohextrakt des induzierten Klons. 1 – 4 sowie 7 – 10 sind Vergleichslösungen.

Wie schon frühere Arbeiten zur Arbutinsynthese (AREND et al., 2001) gezeigt hatten, kam es bei zu hohen Temperaturen und zu hoher IPTG-Konzentration zur Bildung von „Inclusion-bodies“, die trotz verstärkter Expression des Enzyms zu einem Rückgang der messbaren Enzymaktivität führten. Ebenso wurden für die Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen eine verminderte Expression bei höheren Temperaturen beobachtet (SOMSSICH et al., 1996). Bei Kultivierungstemperaturen über 30 °C wurde keine aktive Cinnamoylalkohol Dehydrogenase mehr produziert.

In der Folge wurden also sämtliche Klone bei 23 °C, 30 °C und 37 °C angezogen, wobei die Ansätze vor IPTG-Zugabe aufgeteilt und dann mittels 0 mM, 0.3 mM, 0.6 mM und 1.0 mM IPTG induziert wurden (III.1.2).

Nach Auswertung der Tests bleibt festzuhalten, daß bei keinem der Klone eine Vomileninreduktion nachweisbar war und wie schon angedeutet, alle Klone eine unspezifische Reduktaseaktivität aufwiesen, die sich in NADPH₂- und NADH₂-Verbrauch äußerte. Die Klone der 40 kDa-cDNA und der 43 kDa RACE 2-cDNA zeigten jedoch eine Besonderheit.

5.1.1 cDNA der 40 kDa-Bande

Der Klon 4 der 40 kDa-Bande (IV.4.1.6.2) setzte in Abhängigkeit zur Induktionsrate bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich viel Zimtaldehyd um. Dabei war die zweifache Reduktion zu Dihydrozimtalkohol wesentlich ausgeprägter als in den dazugehörigen Vergleichsansätzen, was auch die Zahlen in Tabelle 14 verdeutlichen.

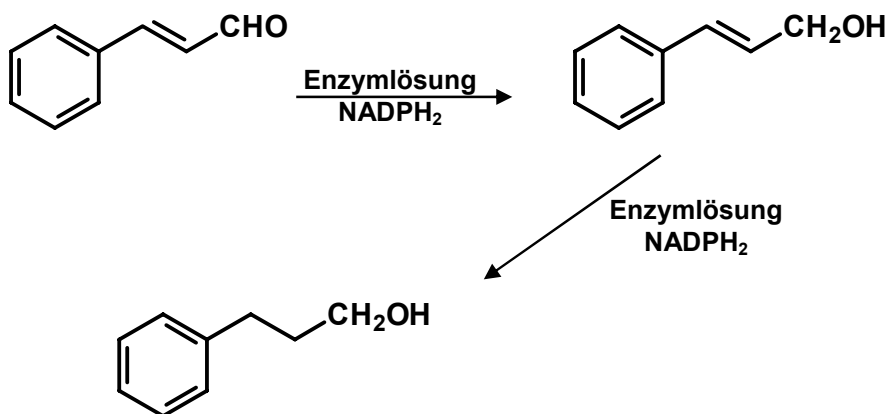
Tab. 14 Induktions- und Temperaturbedingte Umsatzrate des Zimtaldehyds zu Dihydrozimtalkohol durch das codierte Protein des Vollängklons 4 der 40 kDa-Bande.

Induktion mit IPTG [mM]	Relative Umsatzrate in [%] bei		
	23 °C	30 °C	37 °C
0	47.1	33.3	100
0.3	0	43.9	36.9
0.6	100	77.5	32.2
1.0	52.9	100	13.2
Kontrolle	0	0	0

Man kann erkennen, daß bei Kultivierung der Klone bis 30 °C eine Induzierbarkeit besteht, die ihr Optimum bei 0.6 mM IPTG (23 °C) und bei 1.0 mM IPTG (30 °C) besitzt. Wird eine Expression über 30 °C angestrebt, so ist der maximale Zimtaldehydumsatz in den nicht induzierten Klonen zu finden, der dann beständig bis hin zur höchsten Induktionsrate von 1.0 mM IPTG abnimmt. Dies würde der „Inclusion-body“-Theorie entsprechen.

Das Schaubild 50 führt die Reduktion des Zimtaldehyds - über Zimtalkohol als Intermediat – vor Augen.

Abb. 50 Reduktion des Zimtaldehyds über die Zwischenstufe Zimtalkohol zu Dihydrozimtalkohol.



Das Edukt, Zwischenprodukt und Endprodukt der angegebenen Reaktion konnte über DC, HPLC und MS nachgewiesen werden.

5.1.2 cDNA der 43 kDa-Bande Race 2

Die Testung des 43 kDa RACE 2-Klons ohne (His)₆-tag ergab zwar keine Reduktion von Vomilenin, jedoch konnte im HPLC-Chromatogramm eine Abnahme des Perakin-Peaks (R_t 2.51 min) gegenüber dem Kontrollansatz festgestellt werden. Parallel dazu traten, wie in Abb. 51 zu sehen, zwei neue Peaks nach 3.24 und 3.64 min auf, die im Kontrollansatz (Vektor ohne Insert) nicht zu finden waren. Gleichzeitig war das Verhältnis des unverbrauchten NADPH's zu NADP⁺ in der Kontrolle 42 % / 33 %, während sich das Verhältnis im perakinumsetzenden Ansatz genau umdrehte (34 % / 42 %). Dieser NADPH₂-Verbrauch war schon ein Hinweis auf eine Reduktionsreaktion.

Um aber genauer zu überprüfen, auf welche Weise das Perakin umgewandelt wird, wurden zunächst weitere Enzyminkubationen angesetzt. Der Ansatz ohne NADPH₂ zeigte keine Reaktion, genauso wenig wie der Ansatz ohne Enzymlösung. Damit war eine NADPH₂-abhängige Reduktion des Perakins bewiesen.

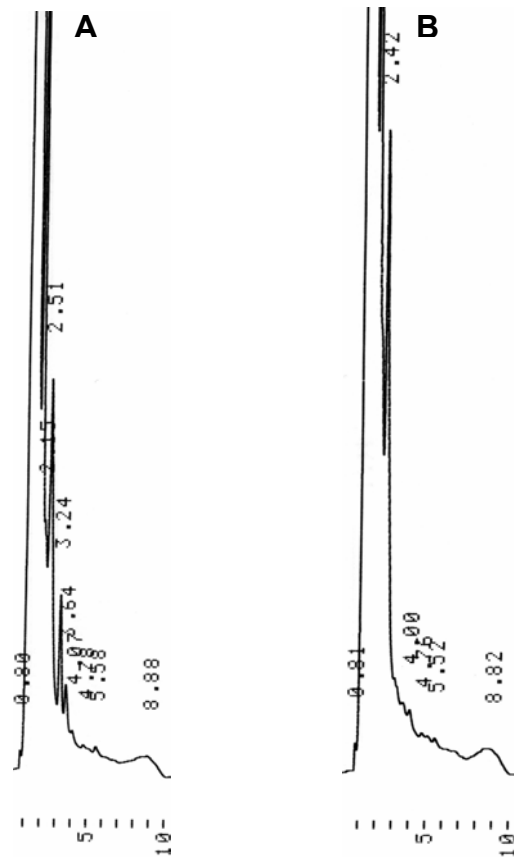


Abb. 51 HPLC-Chromatogramme eines Perakinassays. A: Ansatz mit dem exprimierten Enzym der 43 kDa-Race 2-Sequenz ohne (His)₆-tag. B: Kontrollansatz, *pQE 60* ohne Insert in *M15 [pREP4]*. In Chromatogramm A ist deutlich der Umsatz des Perakins (R_t 2.51 min) zu sehen, der einhergeht mit der Zunahme der Peaks bei R_t 3.24 min und 3.64 min.

Der weitaus schwierigere Teil bestand darin, daß ausgehend von der niedrigen Umsatzrate soviel Produkt generiert werden mußte, daß eine Identifikation dessen über diverse analytische Verfahren erfolgen konnte.

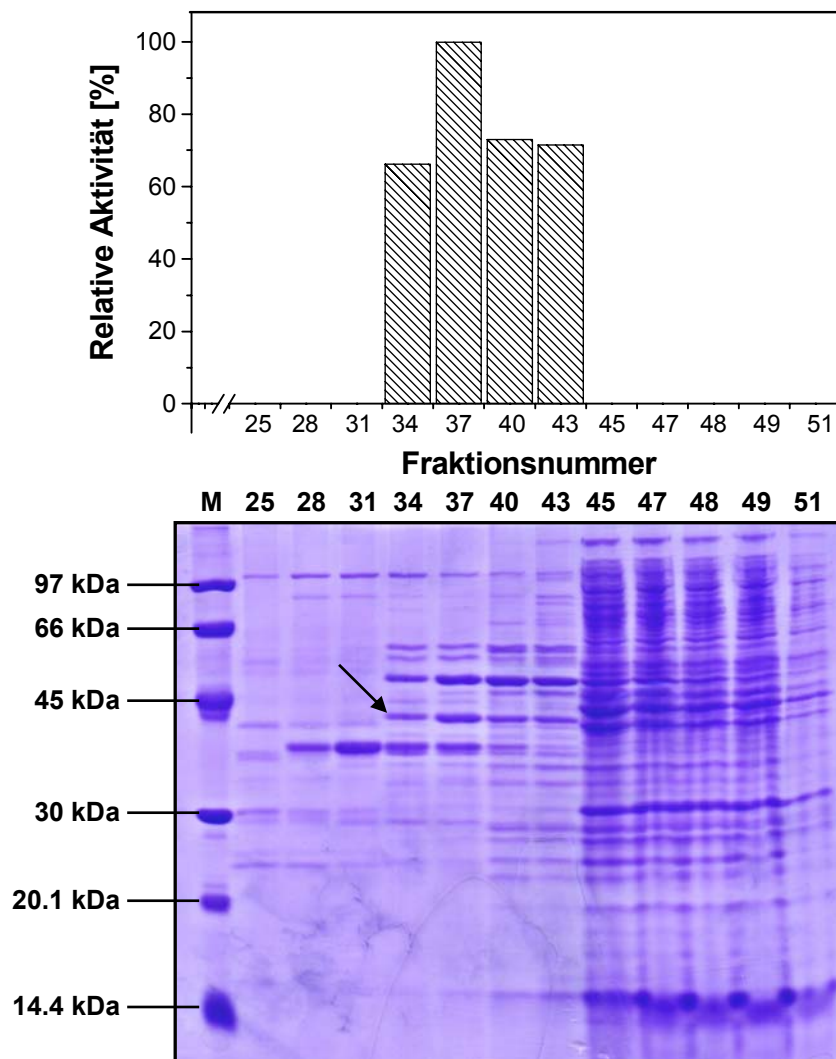
Dahingehend wurde versucht, den Vollängenklon 43 kDa RACE 2 mit (His)₆-tag zur Expression zu bringen, was auch gelang. In angefertigten Proteinrohextrakten war erneut die Umsetzung des Perakins zu beobachten, was die oben erhaltenen Ergebnisse bestätigte. Anschließend sollte der Rohextrakt über Affinitätschromatographie an Ni-NTA aufgereinigt werden.

Überraschenderweise schlug die Reinigung fehl. Nach dem Laden der 25 ml Proteinlösung aus insgesamt 2.5 l Bakterienkultur wurden die nicht an das Säulenmaterial bindenden Proteine über einen Zeitraum von 2 h von der Säule gewaschen. Abschließend wurde mit einem linearen Gradienten (15 ml) zuerst bis 50 mM Imidazol und mit weiteren 15 ml bis 250 mM Imidazol eluiert. Dabei

konnte nur ein sehr kleiner Proteinpeak erzielt werden. Der davon angesetzte Aktivitätstest fiel negativ aus; Umsatz zeigte jedoch die nicht an das Material gebundene Proteinfraction. Dieses Resultat wurde von dem anschließend präparierten SDS-Gel gestützt. Während der „Flow-Through“ eine Bande bei ca. 43 kDa aufwies, war in den gereinigten Fraktionen keine Bande in diesem Bereich erkennbar.

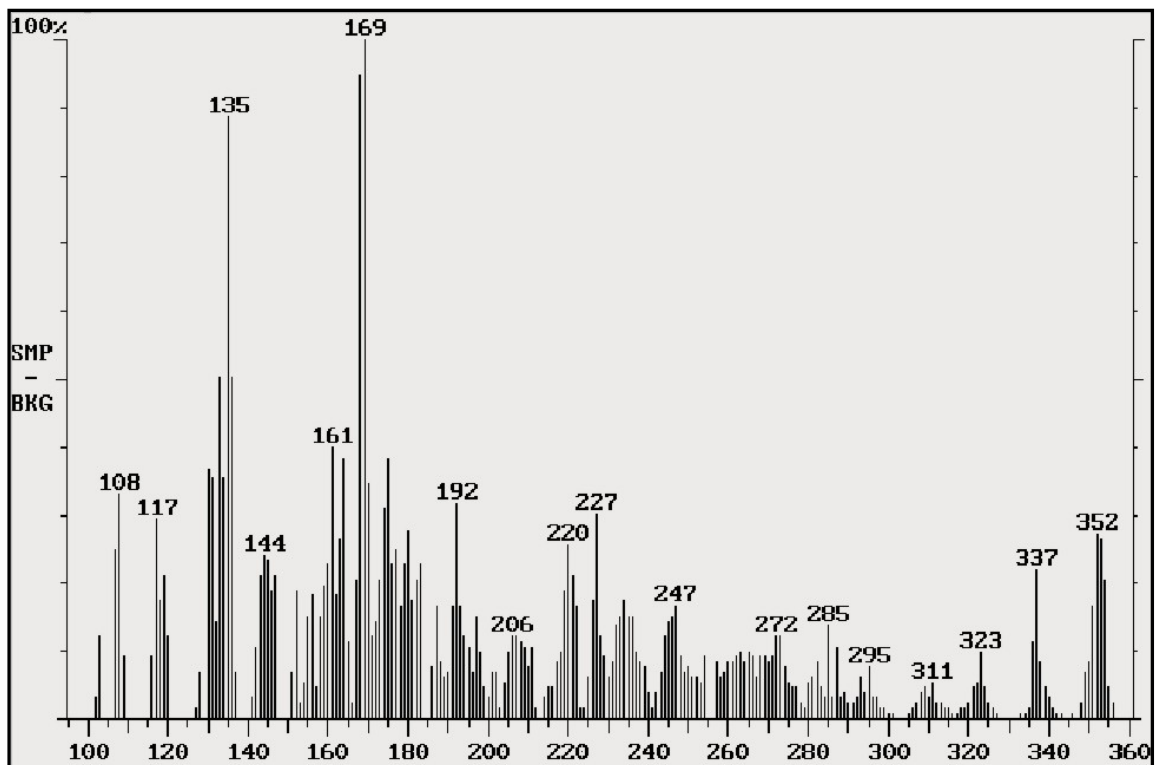
Daraufhin wurden erneut 2.5 l Bakterienkultur von dem 43 kDa RACE 2 Klon angelegt, die nach (III.1.2) aufgeschlossen wurden. Die nachfolgende Proteinreinigung anhand des optimierten Protokolls für die Vomilenin Reduktase (IV.2.2) erbrachte angereicherte Proteinfractionen nach SOURCE 30Q, die Perakin in beschriebener Weise umsetzten. Nach Inkubation und Auftrennung der einzelnen Fraktionen über ein SDS-Gel ergab sich das in Abb. 52 aufgezeigte Muster.

Abb. 52 Korrelation zwischen der NADPH-abhängigen Reduktion des Perakins und dem nach SDS-Gel erhaltenen Proteinmuster des 43 kDa RACE 2-Klons.



Die angereicherten Enzymfraktionen wurden vereint, einer Inkubation mit Perakin unterzogen und abschließend über DC (FM 1) aufgetrennt. Als Alkaloidvergleiche wurden Perakin (R_f 0.5) und Raucaffrinolin (R_f 0.31) mit aufgetragen. Die im Ansatz neu auftretende Substanz (R_f 0.28) lag zwar auf der Höhe des Raucaffrinolins, zeigte aber nach Cersulfat-Detektion die für 1.2-Dihydroindole typische Orangefärbung. Eine Massenspektroskopische Analyse der Substanz ist in Abb. 53 dargestellt.

Abb. 53 MS-Spektrum der durch Perakinreduktion erhaltenen Substanz.



6 Alkaloid-Synthesen

6.1 Enzymatische Produktion von 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin

2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin wurden als Indolalkaloide mit der natürlichen 2 β -(*R*)-Konfiguration durch enzymatischen Umsatz einer Vorstufe nach III.4 gewonnen.

Zur Produktidentifizierung nach erfolgter DC dienten Perakin (R_f 0.5), Raucaffrinolin (R_f 0.31), Vomilenin (R_f 0.59) und 17-O-Acetylnorajmalin (R_f 0.36) als Vergleichssubstanzen. Nach der Betrachtung unter UV_{254} waren in der Probenbahn insgesamt 8 Substanzen mit einer UV-Löschung separiert worden, wovon eine Substanz auf der Höhe des Vomilenin-Vergleichs zu erkennen war. Anschließend wurde die DC mit AmmoniumCer-(IV)-sulfat (III.2.1) besprüht. Dabei konnte visuell eine Orangefärbung der Substanzflecke in Höhe des R_f 0.44 und des R_f 0.23 in der Probe sowie eine orangene Verfärbung des 17-O-Acetylnorajmalin-Vergleichs beobachtet werden. Diese Farbveränderung ist nach COURT und IWU (1980) typisch für Indolalkaloide mit einem Indolinsystem, das im Fall der Ajmalinbiosynthese durch Reduktion des Indolenin-Grundkörpers erhalten wird. Um die Identität der durch die Farbreaktion ermittelten Alkaloide herauszufinden, wurden die Substanzen aus einem noch nicht besprühten Teil der DC ausgekratzt und nach III.2.4 für eine massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet. Die Messung ergab, daß es sich bei der Substanz mit R_f 0.44 um 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin handelte. Zum einen zeigte ein Massenpeak von 352 m/z die Reduktionsreaktion auf, zum anderen wurde der für 2 β -(*R*)-Indolalkaloide spezifische Basispeak bei 169 m/z erhalten. Eine abschließende HPLC-Trennung bestätigte die schon durch die Proteinreinigung bekannte R_t von 4.74 min.

Aus dem MS-Spektrum des DC-Flecks bei R_f 0.23 ging hervor, daß basierend auf dem Basispeak von 169 m/z ein 2 β -(*R*)-Indolalkaloid mit einem Molekulargewicht von 354 vorlag. Aufgrund dessen wäre eine zweifache Reduktion des Vomilenins (MW: 350) z.B. zu 17-O-Acetylnorajmalin denkbar. Dazu würde auch die Orangefärbung nach Cersulfat-Detektion passen. Dem entgegen sprechen jedoch die sehr unterschiedlichen R_f -Werte (17-O-Acetylnorajmalin: R_f 0.36). Ein weiteres

denkbares Reaktionsprodukt aus Vomilenin könnte das 1.2-Dihydroraucaffrinolin sein, das ebenfalls 354 als Molekulargewicht besitzt. Dazu müsste sich Vomilenin zuerst zu Perakin umlagern und in der Folge zweifach reduziert werden. Daraus würde Raucaffrinolin entstehen, das weiterreduziert würde zu 2 β -(*R*)-1.2-Dihydro-raucaffrinolin. Dieser Theorie wurde nicht weiter nachgegangen. Was jedoch dafür sprechen würde ist der Nachweis des Raucaffrinolins in der Probe mit HPLC und MS. Weiterhin konnte auch Vinorin mit einem R_f von 0.7 über HPLC und MS identifiziert werden. Die entsprechenden analytischen Daten aller hier erwähnten, nachgewiesenen Alkaloide sind im Anhang (VII.1.2) zu finden.

Die 17-O-Acetylnorajmalin-Synthese erfolgte nach dem in III.1.8 aufgeführten Assay für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase. Die weitere Aufarbeitung wurde analog dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zur analytischen Untersuchung des Endproduktes der Reduktionsreaktion wurden DC, MS, HPLC und NMR-Spektroskopie herangezogen, die alle die Identität des 17-O-Acetylnorajmalins belegten. Die Spektren und Daten sind in VII.1.2 und VII.1.3 abgebildet.

6.2 Chemische Synthese der Alkaloide Perakin, Raucaffrinolin, 2 α -(*S*)-1.2-Dihydrovomilenin und 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin

6.2.1 Derivatisierung des Vomilenins zu Perakin

Die Umlagerungsreaktion analog einer Vorschrift nach TAYLOR et al. (1962) wurde mit 20 mg Vomilenin als Ausgangsstoff angesetzt. Zusammen mit 150 μ l Eisessig wurde das Alkaloid in eine Pasteurpipette eingeschmolzen und für 25 min im Trockenschrank auf 120 °C erhitzt. Nach Abkühlen konnte der Ansatz mit 500 μ l Seral-Wasser verdünnt und mit NaHCO₃ auf pH 7.5 eingestellt werden. Das Ausschütteln des entstandenen Perakins erfolgte mit Dichlormethan. Nach abschließender DC-, MS- und HPLC-Analyse (VII.1.2) konnte eine Ausbeute von über 90 % Perakin festgestellt werden. Als zusätzlicher Nachweis konnte die weitere Reduktion mit NaBH₄ zu Raucaffrinolin (IV.7.2.2) angesehen werden.

6.2.2 Reduktion von Perakin zu Raucaffrinolin

Der Umsatz des in obiger Reaktion hergestellten Perakins zu Raucaffrinolin erfolgte im neutralen Milieu. Somit wurde einer Esterhydrolyse in Position 17 vorgebeugt und die Doppelbindung im Indolenin-Teil wurde nicht mitreduziert. Zum Einsatz kamen 0.1 ml einer methanolischen Perakinlösung, die mit 0.5 ml eines 1 M K_2P_i -Puffers (pH 7.0) versetzt wurden. Danach erfolgte die 5 minütige Reduktion mit NaBH_4 im Überschuß (ca. 10-fach). Nach Extraktion mit Methylenechlorid wurde die organische Phase über DC und HPLC getrennt. Die gemessenen Retentionszeiten und R_f -Werte (VII.1.2) stimmten mit denen der Vergleichssubstanz überein. Weiterhin wurde von der Probe ein MS-Spektrum (VII.1.2) aufgenommen, das ein Molekulargewicht von 352 und zusätzlich die 2β -(*R*)-Konfiguration durch das Fragmentierungsmuster bestätigte.

6.2.3 Chemische Synthese des 2α -(*S*)-1.2-Dihydrovomilenins

Ausgehend von 0.9 mg Vomilenin, gelöst in 200 μl Dichlormethan, erfolgte die Reduktion mit NaBH_4 im Überschuß. Dabei wird die wesentlich reaktivere Indolenin-Doppelbindung reduziert. Die Doppelbindung in Position 19.20 dagegen bleibt erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurden 250 μl MeOH zugefügt und die Probe über DC (FM 2) aufgetrennt. Als Referenzsubstanzen fungierten Vomilenin (R_f 0.59) und 2β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin (R_f 0.45). Der in der Probe neu auftretende Fleck lag bei einem R_f von 0.25. Ein Teil dieses Flecks wurde, wie unter III.2.4 beschrieben, von der DC eluiert und einer MS-Messung zugeführt. Die verbleibende Substanz auf der DC wurde dann mit Cersulfat besprüht und verfärbte sich orange. Zusammen mit den Ergebnissen des MS-Spektrums (Molekulargewicht von 352) war damit eine Reduktion des Indolenins zum Indolin bewiesen. Zwar konnte durch den niedrigen R_f -Wert ausgeschlossen werden, daß 2β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin entstanden war, jedoch mußte die absolute Konfiguration an C 2 erst noch ermittelt werden. Hier half das MS-Spektrum (VII.1.2) wieder weiter. Statt eines Basispeaks von 169 m/z war ein Basispeak von 185 m/z vorhanden. Dieses veränderte Fragmentierungsmuster ließ sich nur auf eine 2α -(*S*)-Konfiguration zurückführen, die für andere Indolalkaloide auch schon bei GORMAN et al. (1963) erwähnt wurde.

V Diskussion

1 Proteinreinigung / Trennung der Reduktaseaktivitäten

Basierend auf den vorangegangenen Arbeiten von PFITZNER und POLZ (Dissertationen, 1984 und 1989) auf dem Gebiet der Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia serpentina* sollte in der vorliegenden Dissertation die Umsetzung des Vomilenins zu 17-O-Acetylnorajmalin genauer untersucht werden.

Zur Aufdeckung und Charakterisierung der einzelnen Reduktionsschritte wurde sich nicht mehr reiner phytochemischer Untersuchungsmethoden bedient, wie es noch bei COURT (1983) der Fall war; sondern es wurde auf die von Stöckigt in den 80iger Jahren eingeführte und stetig weiterentwickelte Methodik der „zellfreien Umsätze“ zurückgegriffen, bei denen die aus Pflanzensuspensionskulturen gewonnenen Proteinlösungen im Vordergrund stehen.

Bisher konnten zahlreiche, an der Ajmalinbildung beteiligte Enzyme aus *Rauvolfia serpentina* isoliert, aufgereinigt und deren Funktion geklärt werden (Strictosidin Synthase: STÖCKIGT, 1979; Strictosidin Glucosidase: GERASIMENKO et al., 2002; Geissoschizin Dehydrogenase: PFITZNER und STÖCKIGT, 1982; Sarpagin Brückenenzym: SCHMIDT et al., 1995; Polyneuridinaldehyd Esterase: PFITZNER und STÖCKIGT, 1983; Vinorin Synthase: PFITZNER et al., 1986; 2 β -(R)-17-O-Acetyljmalan Acetylerase: POLZ et al., 1987; Vinorin Hydroxylase: FALKENHAGEN et al., 1995).

Eine der wenigen, nicht entschlüsselten Reaktionen im Hauptweg der Ajmalinbiosynthese stellt die Vomileninreduktion dar. Schon POLZ beschäftigte sich mit der zentralen Fragestellung, ob die beiden Doppelbindungen des Vomilenins in Position 1.2 und 19.20 lediglich durch eine oder aber durch zwei verschiedene Reduktasen hydriert werden. Er konnte jedoch die verschiedenen Reduktaseaktivitäten nicht voneinander trennen, so daß er vermutete, daß nur ein Enzym an der Umsetzung beteiligt sei. Desweiteren beschrieb POLZ eine hohe Instabilität des Enzyms, die eine Aufreinigung aus den Zellsuspensionskulturen so sehr erschwerte, daß er nicht mehr als 2 – 3 Reinigungsschritte mit den Proteinlösungen durchführen konnte.

Daran orientierend stellten sich primär 2 Aufgabenstellungen für die Ausarbeitung einer Proteinreinigung. Zum einen sollte eine zeitliche Optimierung der

nacheinander durchzuführenden Schritte erfolgen, die beinhaltete, daß sämtliche, in der aktuellen Reinigung zum Einsatz kommenden Säulen zuvor mit dem regenerierten Säulenmaterial befüllt und äquilibriert waren. Ziel war es, innerhalb kürzester Zeit eine hohe Anzahl an Trennstufen zu erreichen. Ebenso sollte an einem Schema gearbeitet werden, das es ermöglichte, die Reduktaseaktivitäten zum frühestmöglichen Zeitpunkt der Reinigung voneinander zu trennen. Dies sollte eine weitestgehend unabhängige Reinigung und Charakterisierung der Enzyme gewährleisten.

Verwirklicht wurde dies in den Reinigungsprotokollen für die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (IV.2.2 und IV.2.3).

Der erstmalige Hinweis, daß es sich um 2 verschiedene Reduktasen handeln könnte, bot sich nach Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q. Über einen sehr langen und flachen KCl-Gradienten (500 ml auf 0.2 M KCl) blieb die NADPH₂-abhängige Reduktion in einem Bereich von 0.05 M bis ca. 0.12 M KCl auf der Stufe des Intermediats stehen. Das Zwischenprodukt konnte später über verschiedene analytische Methoden (VII.1.2) als 2β-(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin identifiziert werden. Ab einer Konzentration von 0.12 M KCl fand eine zweifache Reduktion des Vomilenins zu 17-O-Acetylnorajmalin statt. Dieses Phänomen konnte nur damit erklärt werden, daß ein hochspezifisches, Vomilenin-reduzierendes Enzym im Bereich von 0.05 M bis 0.2 M KCl eluiert wurde. Ab einer Konzentration von 0.12 M KCl mußten die Proteinfractionen also zusätzlich ein zweites Enzym, das 2β-(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin hydrierte, enthalten.

Daraufhin wurden die Reduktasen nach ihren Substraten als Vomilenin Reduktase (EC.1.5.1.32) und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (EC.1.3.1.73) bezeichnet.

In der Folge wurde nun an einem Trennschema zur Erlangung einer nur die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Aktivität enthaltenden Proteinfraction gearbeitet. Auch dieses Ziel konnte erreicht werden, indem die Chromatographie an SOURCE 15Phenyl und Hydroxylapatit verfeinert wurde. In beiden Fällen wurde zuerst die 1.2-Dihydrovomilenin- und danach die Vomilenin Reduktase eluiert. Im Fall der SOURCE 15Phenyl-Säule erstreckten sich die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen über einen Pufferbereich von 0.35 M bis 0.1 M (NH₄)₂SO₄. Die Vomilenin Reduktase band so fest an das Säulenmaterial, daß

eine Elution nur mit reinem Seral-Wasser erfolgreich war. Bei der Chromatographie über Hydroxylapatit lieferte ein linearer Gradient von 0.01 M – 0.2 M KP_i (pH 7.0) eine gute Trennung.

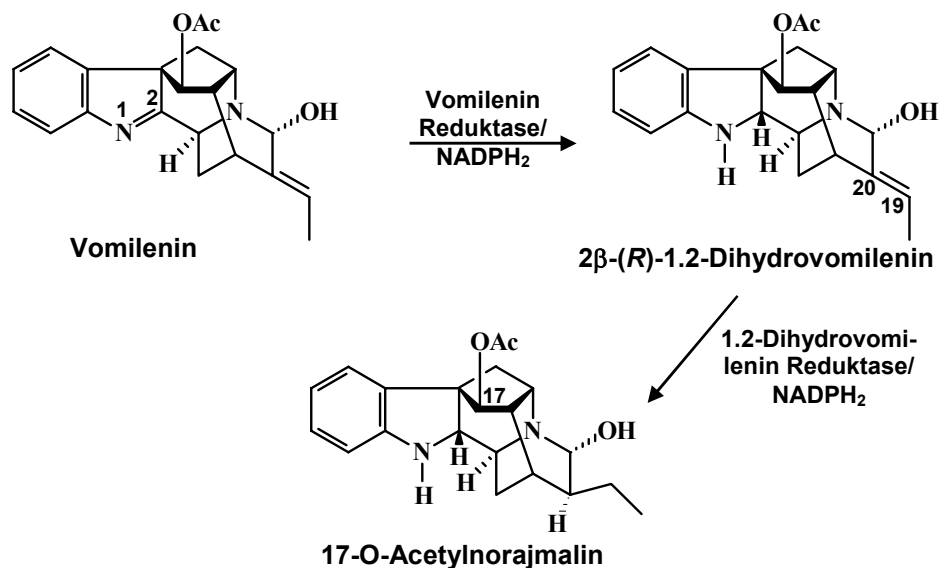


Abb. 54 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes durch die aus *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen aufgereinigte Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Nachdem zwar die Möglichkeit eröffnet war, die Reduktasen gezielt voneinander abzutrennen, stand immer noch die von POLZ (Dissertation, 1989) angegebene Instabilität der Enzymlösung im Raum. Von mir hierzu angestellte, weiterführende Untersuchungen ergaben, daß eine Differenzierung zwischen Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase erfolgen mußte. Enzymfraktionen der Vomilenin Reduktase wiesen einen gänzlichen Aktivitätsverlust nach 3 Tagen ab Beginn der Reinigung auf. Dabei spielte es keine Rolle, ob frisches Zellmaterial oder tiefgefrorene Zellen aufgeschlossen wurden. Im Gegensatz dazu blieben 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Fractionen je nach Reinigungsstufe über einen Zeitraum von 10 - 14 Tagen stabil. Dies ermöglichte eine intensivere Reinigung und Untersuchung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase im Gegensatz zur Vomilenin Reduktase.

Letztere wurde im Zuge der Stabilitätsuntersuchungen (IV.2.2.7) zahlreichen Tests unterzogen, die ergaben, daß Antioxidantien wie Ascorbinsäure (15 mM) und MSH (4 mM; 40 mM) in hoher Konzentration die relative Aktivität deutlich herabsetzten und zum Teil das Enzym gänzlich inhibierten. 2.5 mM MSH

hingegen führte zu einer Steigerung der relativen Aktivität auf 141 %. Aus diesem Grund wurde ab diesem Zeitpunkt bei jeder Reinigung von Beginn an MSH (Endkonzentration: 2.5 mM) zugesetzt. Desweiteren fällt auf, daß EDTA konzentrationsabhängig die Enzymaktivität hemmt. Setzt man dies in Beziehung zu der geringfügigen Aktivitätserhöhung durch $ZnCl_2$, könnte eine Metallionenabhängigkeit für die Vomilenin Reduktase bestehen.

Der Frage einer potentiellen Metallionenabhängigkeit sollte in einer neuen Testreihe (IV.3.7) nachgegangen werden. Es stellte sich heraus, daß der nur mit EDTA-behandelte Kontrollansatz vollständig inaktiv war und eine Rekonstitution der Vomilenin Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Metallionen eintrat. Während bei $FeSO_4$, $MgCl_2$ und $ZnCl_2$ die wiederhergestellte Aktivität unter 50 % lag, konnte bei $NiSO_4$ sogar eine Aktivitätssteigerung auf fast 110 % erzielt werden. Auf diese Weise konnte eine signifikante Metallionenabhängigkeit für die Vomilenin Reduktase bewiesen werden.

Da das Problem des Aktivitätsverlustes der Vomilenin Reduktase nicht endgültig gelöst werden konnte, wurde ein Reinigungsprotokoll (IV.2.2) entwickelt, das innerhalb von 2.5 Tagen alle wesentlichen Schritte - vom Tauprozess des eingefrorenen Gewebes über 3 säulenchromatographische Trennschritte bis hin zur abschließenden gelelektrophoretischen Kontrolle des Reinigungserfolgs - beinhaltet. Als Abschluß dieser ausgearbeiteten Proteinreinigung konnte ein SDS-Gel erhalten werden, das lediglich drei Hauptproteinbanden enthielt. In Korrelation mit dem dazu angefertigten Aktivitätsverlauf konnte die Bande über 45 kDa als in Frage kommende Vomilenin Reduktase ausgeschlossen werden. Eine differenzierte Beurteilung der Proteine bei 40 kDa und 43 kDa konnte nicht erfolgen. Außer der aktiven Expression der für die 40- und 43 kDa-Bande codierenden cDNA bot allein die Basische Nativ-Elektrophorese die Möglichkeit der eindeutigen Identifizierung der Vomilenin Reduktase im SDS-Gel. Aufgrund des Aktivitätsverlustes der Vomilenin Reduktase nach der gelelektrophoretischen Trennung führten auch diese Versuche (IV.2.2.6) nicht weiter, so daß eine Sequenzierung beider Proteinbanden (40- und 43 kDa) durchgeführt werden mußte.

Die Reinigung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase bis hin zur Sequenzierung lieferte eindeutige Ergebnisse. Das unter IV.2.3 beschriebene Verfahren führte zu einer 200-fach angereicherten 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase, die anhand

des Aktivitätsverlaufs exakt mit dem Bandenverlauf der 48 kDa-Bande nach SDS-Gelelektrophorese übereinstimmte. In der Folge wurde auch das Protein der 48 kDa-Bande einem tryptischen Verdau unterworfen.

2 Molekularbiologie

2.1 Isolierung der für die 40-,43- und 48-kDa-Bande codierenden cDNA

Die durch Mikrosequenzierung der 40-, 43- und 48 kDa-Bande erhaltenen 8 Spaltpeptide mit 9 bis 18 Aminosäuren dienten als Basis für alle weiteren molekularbiologischen Arbeiten.

Zuerst wurden verschiedene Datenbanken anhand der ermittelten Peptidsequenzen durchsucht, um homologe Sequenzen aufzufinden. Sofern zu einem Spaltpeptid eine ähnliche Sequenz gefunden wurde, gehörte sie einer Cinnamoylalkohol-, Sinapylalkohol- oder Mannitol Dehydrogenase mit einer Homologie von 70 – 100 % an. Zu anderen Enzymen wurden keine homologen Bereiche gefunden. Die Ähnlichkeit der Peptidfragmente zu Oxidoreduktasen wurde durchaus als positiv gewertet, zumal die Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase ebenfalls in diese Enzymklasse eingereiht werden.

Weiterhin fielen die von SUVARNA et al. (2000), BRILL et al. (1999) und HIBINO et al. (1993) beschriebenen Zinkabhängigkeiten für die Cinnamoylalkohol- und Mannitol Dehydrogenasen auf, die zumindest analog für die Vomilenin Reduktase (metallionenabhängig) die hohen Homologien - zumindest in Teilbereichen - erklären würden.

Um nun mittels der erhaltenen Sequenzen an die komplette cDNA zu gelangen, wurde für die 40 kDa-Bande ein Durchmuster einer *Rauvolfia*-cDNA-Bank mit einer erzeugten, radioaktiven Sonde angelegt. Diese Methode wurde in der Vergangenheit schon vielfach erfolgreich angewandt, so auch zur Klonierung der Raucaffricin Glucosidase (WARZECHA et al., 2000), die durch Abspaltung der Glucose Raucaffricin zu Vomilenin hydrolysiert.

Die Gewinnung der für die 43- und 48 kDa-Bande codierenden cDNA sollte über RACE-PCR erfolgen. Beiden Techniken liegt die Kenntnis einer kurzen Nukleotidabfolge für die jeweilige cDNA zugrunde. Dieses spezifische Nukleotidstück wurde durch RT-PCR mit degenerierten Primern erzeugt.

Während die RT-PCR mit den entworfenen Primern für die 43- und 48-kDa-Bande sehr schnell zu den gewünschten cDNA-Stücken führte, war die Primerentwicklung mit nachgeschalteter PCR für die 40-kDa-Bande nicht so erfolgreich.

Dies lag vor allem in der ersten Sequenz für den 40 kDa Forward-Primer begründet:

```
5' GCI TAY GGI GTI GCI GCI MGI GAY WSI WSI GG 3'
   A  Y  G  V  A  A  R  D  S  S
```

Da es sich um einen degenerierten Primer handelte, waren sehr viele Mischbasen enthalten. Auffällig war vor allem der Bereich des 3'-Endes in dem zwei hintereinandergeschaltete Serine die Sequenz WSI WSI bedingten. Zusammen mit der Ableitung der Nukleotidsequenz der Aminosäure Asparaginsäure (D) resultierten drei Tripletts mit 7 aneinanderhängenden Mischbasen (grau unterlegt, s.o.). Um den sehr unspezifischen Teil des Primers zu vermeiden, bot sich nur die Möglichkeit, das 3'-Ende zu verkürzen. Somit wurden die letzten 9 Basen weggelassen, wobei sich folgender Forward-Primer ergab:

```
5' GCI TAY GGI GTI GCI GCI MGI GA 3'
   A  Y  G  V  A  A  R
```

Dieses veränderte, „nur verkürzte“ Oligonukleotid erwies sich bei verschiedenen PCR-Durchgängen zur Amplifizierung des gewünschten cDNA-Fragments der 40 kDa-Bande als geeignet. Wie schon bei dem unter IV.4.3.3 angegebenen Beispiel, wird die Bedeutung der Primerentwicklung auch hier wieder unterstrichen.

Das Identifizieren der Vollängenklone zum einen anhand der Durchmusterung einer cDNA-Bank und zum anderen durch RACE-PCR verlief in beiden Fällen problemlos. Bewertend ist jedoch zu sagen, daß die RACE-PCR nach CHENCHIK et al. (1996) die wesentlich elegantere Methode darstellt. Nicht nur, daß auf den Einsatz von radioaktivem Material verzichtet werden kann, sondern die Garantie der Vollständigkeit der amplifizierten cDNA bezüglich der 5'- und 3'-Enden zeichnet diese Technik besonders aus.

Die Unvollständigkeit der Vollängenklone am 5'-Ende bei der Durchmusterung von cDNA-Banken ist wohl der größte Nachteil dieser Methode, wie auch das Beispiel der Klonierung einer NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Reduktase aus *Rauvolfia serpentina* durch RUPPERT (Dissertation, 2001) belegt. Hierbei wurden bei mehrfachen Versuchen vier Klone isoliert, die jeweils ein vollständiges 3'-Ende besaßen, denen aber am 5'-Ende unterschiedlich große Sequenzabschnitte fehlten. Erst nach Einsatz der RACE-PCR gelang es RUPPERT, die gesamte Cytochrom P450 Reduktase cDNA-Sequenz zu ermitteln.

Die für die 40-, 43- und 48-kDa-Bande identifizierten cDNA-Sequenzen können wie folgt eingeteilt werden, wobei für die 43 kDa-Bande zwei Isoformen gefunden (43 kDa RACE 1 und 43 kDa RACE 2) und weiterbearbeitet wurden:

Proteinbande auf SDS-Gel	Vermutete Proteinzugehörigkeit	Komplette cDNA-Sequenz [bp]	Codierender Bereich [bp/AS]
40 kDa	Vomilenin Reduktase	1 444	1 083/361
43 kDa (1)	Vomilenin Reduktase	1 549	1 080/360
43 kDa (2)	Vomilenin Reduktase	1 479	1 080/360
48 kDa	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase	1 669	1 239/413

Die erhaltenen cDNA's und Aminosäuresequenzen wurden eingehend untereinander verglichen (Abb. 57) sowie mittels Datenbankberechnungen tiefergehend untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Klone 43 kDa RACE 1 und 43 kDa RACE 2 eine Übereinstimmung von 96 % auf Aminosäureebene besitzen, was unterstreicht, das Isoformen vorliegen. Die nachstehende Tabelle gibt die prozentuale Homologie der einzelnen Klone untereinander wieder:

Tab. 15 Homologien der klonierten cDNA's der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase auf Aminosäureebene in Prozent.

Klone	40 kDa	43 kDa RACE 1	43 kDa RACE 2	48 kDa
40 kDa	X	65 %	66 %	63 %
43 kDa RACE 1	65 %	X	96 %	63 %
43 kDa RACE 2	66 %	96 %	X	63 %
48 kDa	63 %	63 %	63 %	X

Ebenfalls fällt die Länge des codierenden Bereichs der 40- und 43-kDa-Bande ins Auge. Das nach SDS-Gel (IV.2.2.5) untersuchte, ca. 3 kDa kleinere 40 kDa-Protein besitzt sogar eine Aminosäure mehr, als das 43 kDa-Protein. Die über den ExPASy-Server berechneten Molekulargewichte (IV.4.3) ergaben ein MW von 38 472 für die 40 kDa-Bande, 38 787 für die 43 kDa RACE 1-Bande und 38 949 für die 43 kDa RACE 2-Bande. Demnach wäre eine gelelektrophoretische Trennung der 40- und 43 kDa-Bande nicht möglich gewesen.

Die berechneten Molekulargewichte der Aminosäuresequenzen standen fest, so daß das unterschiedliche Wanderungsverhalten im Gel nur durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden konnte. Diese Vermutung wird durch die parallel zur Sequenzierung durchgeführte matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisation (MALDI) der Proteine gestützt. Hierbei können Molekülmassen bis 300 kDa mit einer Genauigkeit von bis zu $\pm 0.1\%$ und einer Empfindlichkeit im picomolaren Bereich bestimmt werden (KARAS und BAHR, 1990). Wie schon von COTTER (1992) beschrieben, können anhand von Abweichungen der gemessenen und berechneten Molekulargewichte Aussagen über die posttranslationalen Modifikationen getroffen werden.

Die MALDI-Untersuchungen ergaben, daß die ermittelte Masse der sequenzierten 40 kDa-Bande entsprach. Bei der 43 kDa-Bande konnte die Masse nicht bestätigt werden. Dies würde für eine nachträgliche Veränderung des Enzyms in der Pflanze/Zellkultur sprechen, was für die aktive, heterologe Expression eine deutliche Erschwernis darstellt.

Weiterhin trägt die Bestimmung des Molekulargewichtes der Vomilenin Reduktase von 42.9 kDa, ermittelt durch Größenausschlußchromatographie (IV.3.4), zu der Annahme bei, daß das Enzym posttranslational verändert wird.

Nicht in dieses Schema passen die negativen Ergebnisse der Zuckerdetektion (IV.3.3), bei der keinerlei Glycosylierungen der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase nachgewiesen werden konnten. Da die Empfindlichkeit des Tests jedoch sehr stark von der Zuckerart und dem zu detektierenden Glycoprotein abhängt, sollte diesem keine exklusive Bedeutung zugemessen werden.

2.2 Sequenzvergleiche / konservierte Bereiche

Wie auch schon die oben aufgezeigten kurzen Peptidfragmente der Mikrosequenzierung der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase Homologien zu Cinnamoyl- und Mannitol Dehydrogenasen aufwiesen, zeigten die abschließend erhaltenen Vollängenklone der 40-, 43- und 48-kDa-Bande hohe Ähnlichkeiten zu den Oxidoreduktasen, insbesondere zu den Cinnamoylalkohol-, Sinapylalkohol- und den Mannitol Dehydrogenasen. Bei den unten aufgeführten Sequenzvergleichen wurden die Aminosäuresequenzen zweier Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen, zweier Mannitol Dehydrogenasen, einer Sinapylalkohol Dehydrogenase und aller Vollängenklone der 40-, 43- und 48 kDa-Bande übereinandergelegt und verglichen (Abb. 55). Mit einem Sternchen unterlegt sind identische Aminosäuren; der Doppelpunkt steht für einen konservierten Austausch und der Punkt für einen halbkonservierten Austausch. Rot gekennzeichnet sind die an der Zink-Bindung beteiligten Aminosäuren. Potentielle, an der Bindung des Co-Faktors (NADPH₂) beteiligte Aminosäuren sind blau hervorgehoben.

Die Homologien der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase zu den anderen Dehydrogenasen/Reduktasen belief sich dabei auf 48 % bis 76 %.

In der umseitig folgenden Abbildung wurden 9 Sequenzen verglichen. Die verwendeten Abkürzungen stehen für:

Abkürzung	Enzym und Herkunftsorganismus
48 kDa	vermutete 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>
43 kDa RACE 1	vermutete Vomilenin Reduktase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>
43 kDa RACE 2	vermutete Vomilenin Reduktase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>
40 kDa	wahrscheinliche Cinnamoylalkohol Dehydrogenase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>
MC CADEli3	Cinnamoylalkohol Dehydrogenase (Eli 3) aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
FxA	Probable Cinnamoylalkohol- oder Mannitol Dehydrogenase aus <i>Fragaria × Ananassa</i>
PT	Sinapylalkohol Dehydrogenase aus <i>Populus tremuloides</i>
OS	Mannitol Dehydrogenase aus <i>Oryza sativa</i>
MS	Mannitol Dehydrogenase aus <i>Medicago sativa</i>

Abb. 55 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Alkohol Dehydrogenasen mit den durch die klonierten cDNA's der 40-, 43- und 48-kDa-Bande determinierten Sequenzen der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Ein konservierter Austausch ist durch einen Doppelpunkt markiert und ein halbkonservierter Austausch wird durch einen Punkt angezeigt. Rote Aminosäuren sind wahrscheinlich an der Zinkbindung der Enzyme beteiligt und blaue Aminosäuren könnten an der Fixierung von NAD(P) beteiligt sein.

48kDa	MRFANFEQSNYYCIDTTPYSSSALCMCMIIISFSNHYFVISFSPFSRPFVEMAGKSPEEQH	60
43kDaRace1	-----MAKSPEVEH	9
43kDaRace2	-----MAKSPEVEH	9
40kDa	-----MAGKSPEEEH	10
MCCADEli3	-----MANSAPENVH	10
FxA	-----MSIEQEH	7
PT	-----MSKSPEEEH	9
OS	-----MEQQ	4
MS	-----MAKSPETEL	9
48kDa	PVKAYGWAARDSSGILSPFKFSRRATGDHDVVRVKILYAGVCHSDLQSARNDMGCFTYPLV	120
43kDaRace1	PVKAFGWAARDPAGVLSPFNFSRRATGEHDVQFKVLYCGICHSDLHMIKNEWGFAKYPIV	69
43kDaRace2	PVKAFGWAARDPAGVLSPFNFSRRATGEHDVQFKVLYCGICHSDLHMIKNEWCFKTYPIV	69
40kDa	PVKAYGWAARDSSGVLSPFKFSRRATLEDDVRLKVLVYCGLCHTDIHFLLKNEWGFSTYPFV	70
MCCADEli3	PQKAFGWAARDTSGTLSPLKFSRRATGEQDVTFKVLYCGICHSDLHYIKNEWGNAVYPAI	70
FxA	PNKASGWAARDSSGVLSPFNFSRRETGEKDVFMFKVLYCGICHSDHMHVKNWGFSTYPLV	67
PT	PVKAFGWAARDQSGHLSPFNFSRRATGEEDVRFKVLVYCGVCHSDLHSIKNDWGFMSYPLV	69
OS	PKMVTGWAARDANGLLSPFSYPLRAGDEEDVVKILFCGICHSDLSTIKNEWGNAKYPVV	64
MS	PLKAFGWAARDTSGTLSPFHFSRRENGDDVSVKILVYCGVCHSDLHLLKNDWGFSTYPVV	69
	* . * **** * ***: .: * . :. ** .*: :. *:***: * :*: ** :	
48kDa	PGFETVGIATEVGSKVTKARVGDVAVGIMVGSCKGCHCEVNDHECYCPEVITSYGRMYH	180
43kDaRace1	PGHEIVGEVTEVGSKVEKFKVGVGCLVGSCKRCDMCSNDLENYCPGQIFTYSAAYT	129
43kDaRace2	PGHEIVGEVTEVGSKVEKFKVGVGCLVGSCKRCDMCSNDLENYCPGQILTYSATYT	129
40kDa	PGHEVVGEVIEVGSKVTKVKVGDVVAHGGIIGSCRACDNCHADMESYCPKMVMAGHSPNF	130
MCCADEli3	PGHEIVGVVTEVGNKVNFKVGDVGVCMVGSCKRSCENHLENYCPKMILTYGSTYY	130
FxA	PGHEIVGEVTEVGSKVKFKVGDVGVGCI VGSCKRSCENCTDHELYCPKQILTYGANY	127
PT	PGHEIVGEVTEVGSKVKVNVGDVGVGCLVGAHSCESCANDLENYCPKMILTYASTYH	129
OS	PGHEIVGVVAEVGSSVARFAAGDTVGVGYIASTCRACANCRDGFENYCPGLVPSFNAAALP	124
MS	PGHEIVGVVTKVGINVKKFRVGDVGVGVIVESCQTCENCNQDLEQYCPKPVFTYNSP-Y	128
	.* ** . : . * . . *: * . * : :* * * * ** . : : .	
48kDa	DGTPTYGGFSNETVVSSEKVFVFRFPEK-----LPMAAGAPLLSAGVSVYSAMRFYGLDKP	234
43kDaRace1	DGTTTYGGYSNLMVADEHCVIRWPEN-----LPMDIGAPLLCAGITTYSPRLRYFGLDKP	183
43kDaRace2	DGTTTYGGYSNLMVADEHFVIRWPEN-----LPMDIGAPLLCAGITTYSPRLRYFGLDKP	183
40kDa	DGTITYGGFSNEMVVEHFVIRYPEN-----LPLAAGAPLLCAGITVYSPMKYYGIAPK	184
MCCADEli3	DGTLTYGGYSDIMVVEEHFAVRI PDN-----MALDATAPLLCAGVTVYSPKHFELDKP	184
FxA	DGTTTYGGCSDIMVAHEHFVVRIPDN-----LPLDGAAPLLCAGITTYSPRLRYFGLDKP	181
PT	DGTTTYGGYSDHMVAHERYIIRFPDN-----MPLDGGAPLLCAGITVYSPKLYFGLDEP	183
OS	DGATVHGGFSELAVVNQRVYVRI PGGGGGASAPLDRAPLLCAGVTVYCPMRRGLDRP	184
MS	KGTRTYGGYSDFVVVHQRYVYVFPDN-----LPLDAGAPLLCAGITVYSPMKYYGMTEP	182
	.*: :** *: * .: .: * .: ****.***:*.***: : *	
48kDa	GMHLGVVGLGGLGHLAVKFAKAFGVKVTVISTSTSKKDEAINDLGADAFVLS TDAEQMQA	294
43kDaRace1	GTHVGVVGLGGLGHVALMFAKAFGAKVTVISTSESKKQEAIEKLGADAFVLS LDPEQMQA	243
43kDaRace2	GTHVGVVGLGGLGHVGVKFAKAFGAKVTVISTSESKKQEAIEKLGADAFVLS RDPEQMQA	243
40kDa	GNHIGVNLGGLGHMAVKFAKALGAKVTVISTSESKKDDAINHLGADAFLLSKNPEELQA	244
MCCADEli3	GLHIGVVGLGGLGHMAVKFGKAFGAKVTVISTSPNKKDEAVNRLGADSFVVSREPEQMQS	244
FxA	GMHGVVGLGGLGHVAVKFAKAMGVKVTVISTSPKKEEALKHLGADSFVLS RDQDHMQA	241
PT	GKHIGVGLGGLGHVAVKFAKAFGSKVTVISTSPSKKEEALKNFGADSFVLS RDQEQMQA	243
OS	GVHLGVALGGLGHLAVKFGKAFGVKVTVISTSPWKEAEVERLGADAFLLSTNAEQMQA	244
MS	GKHLGVALGGLGHVAIKFGKAFGLKVTVISTSPNKE TEAIDKLGADSFVLS KDPEKMQA	242
	* * *: *****: .: * .*: * *****: * * : :* . :***: * :* : : : :	

NAD(P)-Binderegion

```

48kDa      GSGTLDGIIDTVPVVHPIGALLGLLKNHCLKLVLVGATMGSEFELPILPLGVG----- 345
43kDaRace1 AAGSVDGIIDTVSAVHPVMPVLVNLKSHGKLIILVGAPEKPLELPVFPVLLVG----- 294
43kDaRace2 AAGSMDGIIDTVSAVHPVMPVLVNLKSHGKLIILVGAPEKPLELPVFPVLLVG----- 294
40kDa      ATGTLDGIVDCVSAKHPIIPLLGLLKSHGKLIILVVGAPGEPELELHSAPLLMG----- 295
MCCADEli3  AMGTLDDGIIDTVSAAHPLPLPLGLLKSQGMIMVGVDPDKPLELPVFPVLLQG----- 295
FxA       AIGTMDGIIDTVSAQHPLPLPLIGLLKSHGKLVMMVGAPEKPLELPVFPVLLMG----- 292
PT        AAGTLDDGIIDTVSAVHPLPLPLFGLLKSHGKLIILVGAPEKPLELPVFPVLLMG----- 294
OS        AAGTMDGIIDTVSAVHDLTPLITLLRTHGQLVVPVGS PGKPVQLALYPLQSGPSPVGPRIID 304
MS        AMGTM DYI IDTISAHSLMPLLGLLKLNGKLVTVGLPSKPLELSVFPVLAG----- 293
          . : : * * * : . . * : . * . * * : : : * * . . : * . * *

48kDa      -----RKS SVSTIGGSTKETQEMLDFAAEHDITANVEVIPMDYIN 385
43kDaRace1 -----RRIIAGSAIGGLKETQEMIDFAAKNNILPDVELIPMDYVN 334
43kDaRace2 -----RRIIAGSAIGGLKETQEMIDFAAKNNILPDVELIPMDYVN 334
40kDa      -----RKMIGGSDAGGMKEIQEMVDLAAKHNITADIELVSMNDIN 335
MCCADEli3  -----RKILAGSCIGGMKETQEMIDFAAKHDIKSDIEVVPMDYVN 335
FxA       -----RKMVAGSGIGMMETQEMIDFAAKHNITADIEVIPIDYLN 332
PT        -----RKIVAGSGIGGMKETQEMIDFAAKHNITADIEVISTDYLN 334
OS        WAGGPIRARWAVLMVCDVADGKSVAGSMIGMRDTQEMVDFAVEHGVAEVEVIGMEDVN 364
MS        -----RKLIGGSGNIGGMKETQEMLDFCGKHNITADIELIKMHEIN 333
          : : . : * . : * * * : * . : : : : * * : . : *

48kDa      TAMERIEKRDVRYRFVIDIGNTLTPPE-- 412
43kDaRace1 TAMERLLKADV KYRFVIDIGNTLKSA-- 360
43kDaRace2 TAMERLLKADV KYRFVIDLGNTLKSA-- 360
40kDa      TVVERLVKGDVRYRFVVDVANTLKAP-- 361
MCCADEli3  TAMERLLKGDVRYRFVIDVANTLKAE-- 361
FxA       TAMERLVKADV KYRFVIDIGNTLKASS-- 359
PT        TAMERLAKNDVRYRFVIDVGNTLAATKP 362
OS        GAMERLQKGDVRYRFVIDVANTMARAR-- 391
MS        TAMERLHKADV KYRFVIDVANSFSSL-- 359
          . : * * : * * * * * : * . : :

```

Die über den ClustalW-Vergleich erhaltenen Erkenntnisse bezüglich des Verwandtschaftsgrades lassen sich auch durch phylogenetische Bäume darstellen (Abb. 56).

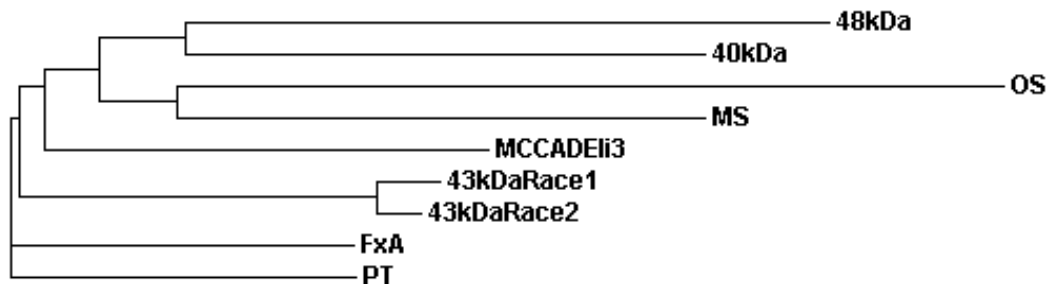


Abb. 56 Phylogenetischer Baum, in Form eines durchschnittlichen Abstandsbaumes, der miteinander verglichenen Dehydrogenasen/Reduktasen und den klonierten Sequenzen der 40-, 43- und 48 kDa-Bande.

Um die enorm hohe Sequenzidentität der klonierten cDNA's der 40-, 43- und 48 kDa-Bande untereinander hervorzuheben, wurde nochmals eine gezielte Gegenüberstellung dieser Sequenzen vorgenommen, die in Abb. 57 zu sehen ist. Türkis unterlegt sind die nach Mikrosequenzierung bekannten Peptidstücke

der einzelnen Proteinbanden. Rot gekennzeichnet sind die an der Zink-Bindung beteiligten Aminosäuren. Potentielle, an der Bindung des Co-Faktors (NADPH₂) beteiligte Aminosäuren sind blau hervorgehoben.

48kDa	MRFANFEGSNYCIDTTPYSSSALCMCMIIISFSNHYFVISFSPFSRFRVEMAGKSPEEQH	60
43kDaRace1	-----MA KSPEVEH	9
43kDaRace2	-----MA KSPEVEH	9
40kDa4	-----MAGKSPEEEH	10
	.**** :*	
48kDa	PVKAYGWAARDSSGILSPFKFSRRATGDHDVVRVKILYAGVCHSDLQSARNDMGCFTYPLV	120
43kDaRace1	PVKAFGWAARDPAGVLSPFNFSSRRATGEHDVQFKVLYCGICHSDLHMIKNEWGFAKYPIV	69
43kDaRace2	PVKAFGWAARDPAGVLSPFNFSSRRATGEHDVQFKVLYCGICHSDLHMIKNEWCFTKYPIV	69
40kDa4	PVKAYGWAARDSSGVLSPFKFSRRATLEDDVRLKVLVYCGLCHTDIHFLKNEWGFSTYPFV	70
	****:* ****. :*:****:***** :.**:*.**:*.**:*: :* : .**:*	
48kDa	PGHEIVGIEVTEVGSVKVTKARVGDKVAVGIMVGSCKGCHECVNDHECYCPEVITSYGRMYH	180
43kDaRace1	PGHEIVGIEVTEVGSVKVEKFKVGEKVGCLVGSCKRCDMCSNDLENYCPGQIFTYSAAYT	129
43kDaRace2	PGHEIVGIEVTEVGSVKVEKFKVGDKVGCLVGSCKRCDMCSNDLENYCPGQILTYSATYT	129
40kDa4	PGHEVVGEVIEVGSVKVTKVKGDKVAHGIIIGSCRACDNCHADMESYCPKMVMAHGSPNF	130
	.* ** . *** * :**:* * ::** * . * * * ** : :.	
48kDa	DGTPTFYGGFSNETVSEKVFVRFPEKLPMAAGAPILSAGVSVYSAMRFYGLDKPGMHLGV	240
43kDaRace1	DGTPTFYGGYSNLMVADEHCVIRWPENLPMDIGAPILCAGITTYSPRLYFGLDKPGTHVGV	189
43kDaRace2	DGTPTFYGGYSNLMVADEHFVIRWPENLPMDIGAPILCAGITTYSPRLYFGLDKPGTHVGV	189
40kDa4	DGTPTFYGGFSNEMVVNEHFVIRYPENLPLAAGAPILCAGITVYSPMKYGIKPGNHIGV	190
	*** ****:* * .*: :*:**:*: *****.**:*.**:*.**:*: *** **:	
	GXGXG als NAD(P)Konsensus-Sequenz für mittelkettige Dehydrogenasen	
48kDa	VGLGGLGHVAVKFAKAFCAKVTVISTSTSKKDEAINDLGADAFVSLDPEQMAGSGTLD	300
43kDaRace1	VGLGGLGHVALMFAKAFCAKVTVISTSESCKQEAIEKLGADAFVSLDPEQMAGSVD	249
43kDaRace2	VGLGGLGHVGVKFAKAFCAKVTVISTSESCKQEAIEKLGADAFVSLDPEQMAGSMD	249
40kDa4	NGLGGLGHMAVKFAKALCAKVTVISSSESCKDDAINHLGADAFLLSKNPEELQATGTLD	250
	*****: .: ****:* *****:* ***:**:* *****:* :*:**:*:***:	
48kDa	GILDTPVVPVHPIGALLGLLKNHTKLVLVGATMGSEFELPILPLGVGRKSVVSTIGGSTKET	360
43kDaRace1	GIIDTVSAVHPVMPVLNLLKSHGKLIILVGAPEKPLELPVFPPLVGRRIIAGSAIGGLKET	309
43kDaRace2	GIIDTVSAVHPVMPVLNLLKSHGKLIILVGAPEKPLELPVFPPLVGRRIIAGSAIGGLKET	309
40kDa4	GIVDCVSAKHPIIPLLGLLKSHGKLVLVGAPGEPELHSAPLLGRKMIIGSSDAGGMKEI	310
	:* *.. **: .*:.* **:*:* .:** ** **:*: : .: * **	
48kDa	QEMLDFAAEHDITANVEVIMPDIYNTAMERIEKRDVRYRFVIDIGNTLTPPE	412
43kDaRace1	QEMIDFAAKNNILPDVELIMPDIYNTAMERLLKADVKYRFVIDIGNTLKSA-	360
43kDaRace2	QEMIDFAAKNNILPDVELIMPDIYNTAMERLLKADVKYRFVIDIGNTLKSA-	360
40kDa4	QEMVDLAAKHNTADIELVSMNINTVVERLVKGDVRYRFVVDVANTLKAP-	361
	::*:*. :*:**:* **:***:* * **:***:*:*.**:*.	

Abb. 57 Aminosäuresequenzvergleich der klonierten cDNA's der 40-, 43- und 48 kDa-Bande aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina*. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Ein konservierter Austausch ist durch einen Doppelpunkt markiert und ein halbkonservierter Austausch wird durch einen Punkt angezeigt. Türkis unterlegt sind die nach Mikrosequenzierung bekannten Peptidstücke der einzelnen Proteinbanden. Rote Aminosäuren sind wahrscheinlich an der Zinkbindung der Enzyme beteiligt und blaue Aminosäuren könnten an der Fixierung von NAD(P) beteiligt sein.

Festzuhalten bleibt, daß sämtliche Peptidfragmente der Mikrosequenzierung in den klonierten cDNA's wiedergefunden wurden. Mit Ausnahme *einer* unsicheren Aminosäure aus der Sequenzierungsreaktion sind alle unsicheren Aminosäuren bestätigt worden. Da nach WATSON (1993) 15 bis 16 aneinanderhängende Nukleotide einmalig in einer eukaryotischen cDNA sind, kann davon ausgegangen werden, die gesuchten Sequenzen isoliert bzw. eine Isoform dessen kloniert zu haben.

Weitere Datenbankaufträge zur Lokalisation bestimmter Motive und Domänen ergaben bezüglich der Zinkbindung Übereinstimmungen zu Zink enthaltenden Alkohol Dehydrogenasen. Die für die Bindung des Zinks in Frage kommenden Aminosäuren sind in den Abb. 55 und 57 rot angegeben. Es sind dies u.a. die in der Sequenz gehäuft vorkommenden und nah beieinander liegenden Cysteine und Histidine sowie ein Phenylalanin. Desweiteren wurde ein Bereich gefunden, der typisch für Cytochrom C ist und Aminosäuren, die potentiell an der NAD-Bindung beteiligt sind (blau markierte Aminosäuren). Bisher wurden zwei Konsensus-Sequenzen für die NAD-Bindung diskutiert. Das Motiv für kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR-Familie) nach NEIDLE et al. (1992) lautet G-X-X-X-G-X-G. Dagegen soll für mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR-Familie) folgende Sequenz für die NAD-Bindung verantwortlich sein G-X-G-X-X-G (WIERENGA et al., 1985). Letzteres Motiv trifft auch auf die in dieser Arbeit klonierten Sequenzen zu.

Als letzten Punkt zum Thema Sequenzhomologien sollte man die Länge der Cinnamoylalkohol-, Mannitol- und Sinapylalkohol Dehydrogenasen betrachten. Auffällig ist, daß alle Sequenzen etwa 360 AS umfassen (358 AS bis 363 AS). Dies trifft auch für die cDNA's der 40 kDa-Bande (361 AS) und der 43 kDa-Bande mit 360 AS zu. Die AS-Sequenz der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase besitzt mit 413 AS ca. 50 Aminosäuren mehr als alle anderen Proteine und fällt damit deutlich aus dem Muster. Dies könnte damit zusammenhängen, daß eine andere Substratspezifität vorliegt (1.2-Dihydrovomilenin Reduktion). Es wäre auch denkbar, daß erst das vierte Methionin (Position 51) im ORF das eigentliche „Startmethionin“ darstellt. Dies würde weiterhin eine posttranslationale Veränderung des Proteins - wie schon für die Proteine der 43 kDa RACE 1- und RACE 2-Klone beschrieben - bedeuten.

2.3 Expressionsversuche

Wie auch schon unter IV.3 angedeutet, mußten sämtliche Klone für diese Experimente speziell modifiziert werden. Durch die Entwicklung der entsprechenden Primer konnten bei der 40- und 48 kDa-Bande gezielt die Schnittstellen (z.T. mit Stop-Codon) für die gewählten Expressionsvektoren eingefügt werden.

Dieser Schritt gestaltete sich für die cDNA der 43 kDa-Bande äußerst schwierig. Wie bereits geschildert, handelt es sich bei den erhaltenen RACE 1- und RACE 2-Sequenzen um Isoformen, die zu über 95 % identisch sind. So auch in dem Bereich des Start-Codons. Eine Überlegung war es, einen Forward-Primer zu entwickeln, der weiter in Richtung 5'-Ende spezifisch bindet, und der es damit ermöglicht einen Klon selektiv zu amplifizieren. Diese amplifizierte und weiterhin klonierte cDNA könnte dann wiederum als Template für eine gezielte Vervielfältigung eines RACE-Klons ab dem Start-Codon dienen. Diese Strategie mußte jedoch auch verworfen werden, da sogar der nicht zu translatierende Bereich des 5'-Endes beider RACE-Klone zu homolog war. Daher mußte sich darauf beschränkt werden, zahlreiche Klone durchzumustern, um so an die modifizierte cDNA der 43 kDa RACE 1 und RACE 2-Sequenz zu gelangen.

Ein weiteres Hindernis bei der Umklonierung der 43 kDa RACE 1 cDNA lag in der zu generierenden Nukleotidabfolge für den Expressionsvektor *pQE 60*. Um die natürliche Startsequenz beizubehalten und gleichzeitig eine Aufreinigungsmöglichkeit des zu exprimierenden Enzyms über Affinitätschromatographie zu haben, wurde sich für einen sogenannten ATG-Vektor entschieden. Die ATG-Vektoren unterscheiden sich nur durch die Schnittstelle am Start-Codon:

pQE 60: CC ATG G (*Nco* I-Schnittstelle)

pQE 70: GC ATG C (*Sph* I-Schnittstelle)

Da bisher nur diese beiden Restriktionsenzyme mit der ATG-Sequenz bekannt sind, und man dadurch auf die auf ATG folgenden Basen G und C beschränkt ist, konnte bei Verwendung des *pQE 60*-Vektors die 43 kDa RACE 2-Sequenz unverändert eingebaut werden. Die 43 kDa RACE 1-cDNA mußte jedoch dahingehend abgewandelt werden, daß ATG TCG (Methionin Serin) in ATG GCG (Methionin Alanin) mit dem Resultat umgewandelt wurde, daß auch eine

Aminosäure verändert wurde. Der Austausch von Serin nach Alanin könnte auch Auswirkung auf die Aktivität des zu exprimierenden Enzyms haben.

Nachdem es gelang, alle Vollängenklone der 40-, 43- und 48 kDa-Bande in die unter IV.4.3 genannten Expressionssysteme mit und ohne (His)₆-tag einzubringen (alle unverändert bis auf den 43 kDa RACE 1-Klon) wurden zuerst die Klone ohne tag kultiviert, aufgeschlossen und auf Aktivität getestet (IV.5).

Nach Einsatz von Vomilenin und Perakin als strukturisomeres Alkaloid sowie Zimtaldehyd, Dihydrozimtaldehyd und D(-)Fructose konnten verschiedene Aussagen getroffen werden. Zum einen, daß Vomilenin von keinem Klon umgesetzt wurde. Dies kann viele Ursachen haben. Es könnte sich bei den aufgereinigten und sequenzierten Proteinen aus den Pflanzenzellsuspensionskulturen um Fremdproteine gehandelt haben. Dadurch wäre die Aminosäureabfolge der Peptidfragmente eine Falsche und in der Folge würden sich alle molekularbiologische Arbeiten auf dieses Fremdprotein beziehen.

Diese These trifft auf cDNA der 40 kDa-Bande zu. Das durch die 40 kDa-cDNA codierte Enzym setzte unterhalb einer Temperatur von 30 °C in Abhängigkeit von der Induktionsrate mit IPTG unterschiedlich viel Zimtaldehyd zu Dihydrozimtalkohol um. Über 30 °C war, wie für die Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen üblich (Somssich et al., 1996), kaum noch Aktivität nachweisbar. Dies liegt in der Bildung von „Inclusion-bodies“ begründet. Die Bildung dieser Präzipitate scheint auch im Falle des translatierten 40 kDa-Proteins angezeigt, da bei höheren Temperaturen in Kombination mit höheren IPTG-Konzentrationen die meßbare Zimtaldehydreduktion bis auf null abnimmt. Ebenso stimmt die Größe von 361 AS (38 472 Da) mit denen der Cinnamoylalkohol Dehydrogenasen überein und die Masse wurde mit MALDI bestätigt (V.2.1 und V.2.2).

Neben der Möglichkeit, ein falsches Protein gereinigt zu haben, könnte es sich bei der klonierten cDNA auch um eine Isoform handeln. Dabei wären unterschiedliche Aktivitäten zu erwarten. Die 43 kDa-cDNA weist zumindest zwei von mir nachgewiesene Isoformen auf. Es wären durchaus noch weitere denkbar.

Ein zweiter Punkt, der bei der Bearbeitung der 48 kDa-Bande ins Auge fällt, ist die große Diskrepanz zwischen dem über SDS-Gel ermittelten und über Größenausschlußchromatographie bestätigtem Molekulargewicht der Vomilenin

Reduktase von 42.9 kDa und dem berechneten MW nach Identifizierung der 43 kDa-cDNA von 38 787 Da (RACE 1-Klon) bzw. 38 949 Da (RACE 2-Klon). Dies spricht eindeutig für eine posttranslationale Modifikation des Proteins. Ob diese durch *E. coli* durchgeführt wird oder nicht kann nicht beurteilt werden, da die Expressionsrate des 43 kDa-Proteins nicht festzustellen ist. Es sind zwar Banden des entsprechenden Molekulargewichtes auf dem SDS-Gel zu erkennen, die aber auch im Vergleichsansatz (Vektor ohne Insert) auftraten. Die Konzentration dieser Proteinbande konnte durch IPTG-Zugabe nicht gesteigert und somit nicht überexprimiert werden, wie es zum Beispiel für das 48 kDa-Protein gezeigt werden konnte. Da selbst nach (His)₆-tag-Reinigung keine Bande bei 43 kDa (plus ca. 1 kDa für den (His)₆-tag) nachgewiesen werden konnte, wirft dies erneut Fragen auf. Wurde das richtige cDNA-Segment in den Vektor eingebracht? Dies kann nach erneut durchgeführter Sequenzierung eindeutig mit „ja“ beantwortet werden. Weiterhin könnte die Struktur des Proteins den N-terminalen (His)₆-tag so umfassen, daß dieser nicht mehr frei zugänglich wäre und damit die Aufreinigung verhindert würde. Klarheit würde die Umklonierung des „tags“ an den C-terminus des Proteins bringen. Ebenfalls könnte ein Expressionssystem verwendet werden, das auf einer anderen Aufreinigung des exprimierten Enzyms beruht. Das Anheften eines (His)₆-tags mit einer „self-cleavage-site“ konnte durch HEFNER (Dissertation, 2002) erfolgreich für die Arbutinsynthase kloniert werden. Ein anderer tag - in Form einer Chitin-Bindedomäne - wurde durch GERASIMENKO et al. (2002) für die Strictosidin Glucosidase, isoliert aus *R. serpentina*, verwendet.

Letztlich müsste noch am Nachweis der Expression gearbeitet werden. Die in CYP450 Enzymen häufig vorkommenden Arginin-Codons AGG und AGA führen gerade in Kombination (Arginin-Tandems, SPANJAARD et al., 1990; BRINKMANN et al., 1989) oftmals zu einer Leserahmenverschiebung in *E. coli* und damit zu einer verminderten Expression des gewünschten Proteins. Dies ist auf die seltenen tRNA's für AGG und AGA in *E. coli* zurückzuführen. Die Folgen der Leserahmenverschiebung sind das Translatieren unterschiedlich langer, z.T. sehr veränderter Proteine, die mit der ursprünglichen Funktion nichts mehr gemeinsam haben müssen.

In allen der von mir klonierten cDNA's sind solche Arginin-Tandems mit den schlecht zu translatierenden Triplets vorhanden - teilweise sogar mehrere pro

Sequenz. Daher wurden die im Expressionsvektor befindlichen Klone in Top10F'- und JM109-Bakterienstämme transformiert, in die zuvor ein Hilfsplasmid (*pSBET*) nach SCHENK et al. (1995) eingebracht wurde. Dieses Plasmid enthält das *argU*-Gen, welches für die seltene tRNA (AGG, AGA) codiert. Als Ergebnis wurde ein verändertes Bild auf dem SDS-Gel dahingehend erwartet, daß diffuse Banden kleiner als 43 kDa abnehmen und die Bande bei 43 kDa verstärkt werden sollte. Nach gelelektrophoretischer Trennung war jedoch kein Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten zu erkennen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die verminderte Expression andere Ursachen haben muß, die bis jetzt noch nicht geklärt sind.

Eine Überexpression konnte hingegen für die 48 kDa-cDNA (Abb. 49) erzielt werden. Die für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase codierenden Klone konnten jedoch noch nicht abschließend auf Aktivität getestet werden, da nicht genügend Substrat, 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin, zur Verfügung stand. Sämtliches 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin wurde von Beginn an durch enzymatische Reduktion von Vomilenin hergestellt, da chemische Reduktionsversuche des Vomilenins (IV.6) zum überwiegenden Prozentsatz die „falsche 2 α -(*S*)-Konfiguration“ ergaben.

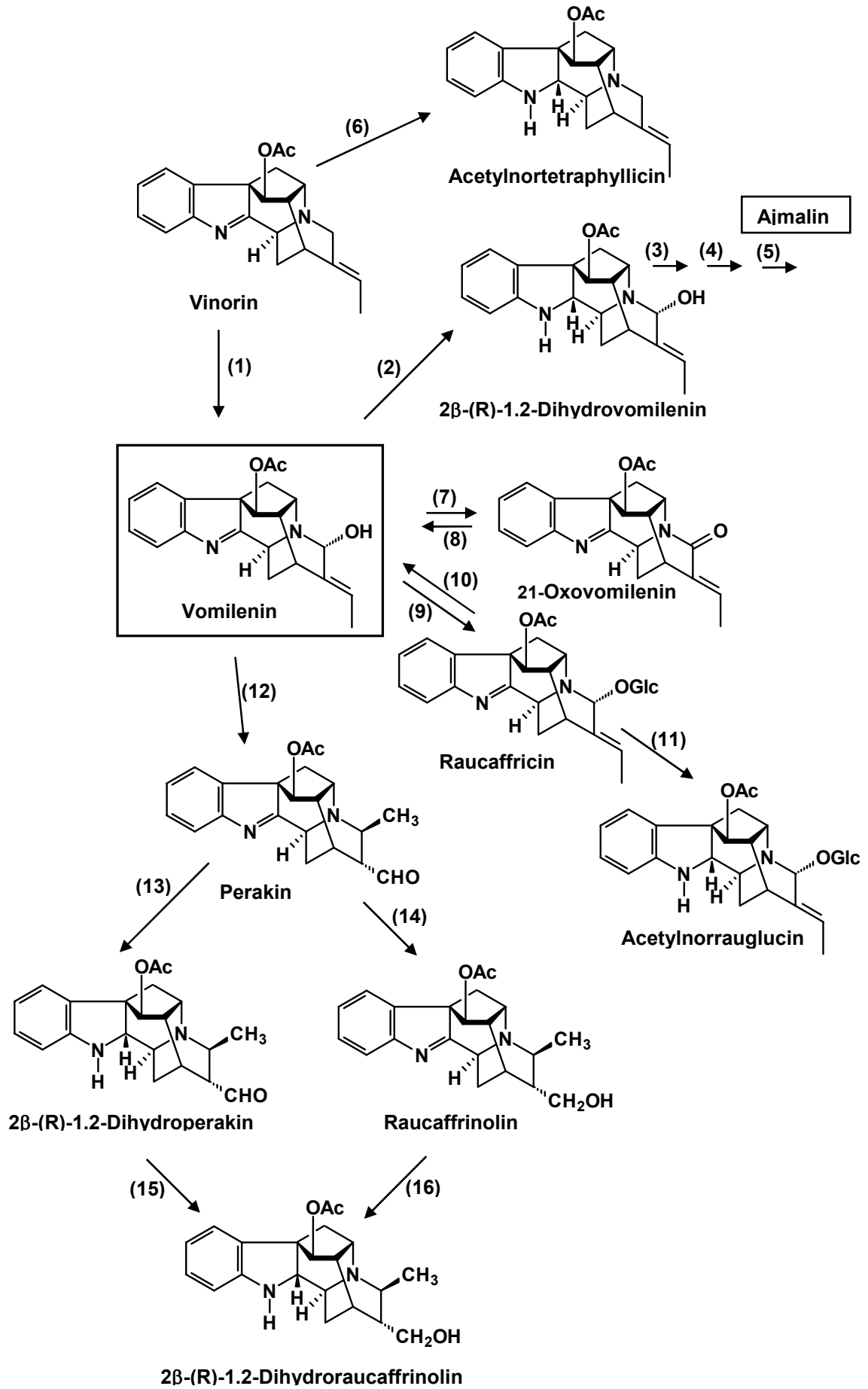
Bis Frühjahr 2002 konnte erfolgreich Vomilenin Reduktase aus RsM- und T₃₀-Zellsuspensionskulturen isoliert und immer wieder neues 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin produziert werden. Doch seit Oktober 2002 reduzierten die Zellsuspensionskulturen die Produktion der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase auf ca. 1 % der zu Beginn dieser Arbeit vorhandenen Expressionsrate. Eine ausreichende 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Produktion war nicht mehr gewährleistet. Daraufhin wurden erneut alle in Kultur befindlichen *Rauvolfia*-Arten auf Vomilenin Reduktase-Aktivität hin geprüft: ohne Erfolg. Dabei konnte die schon 1981 durch STÖCKIGT et al. getroffene Beobachtung der Anhäufung des Vomilenins als Hauptalkaloid in den Zellkulturen erneut bestätigt werden. Mit einer Konzentration von 56.9 mg Vomilenin pro Liter Zellkultur lag die Produktion um fast 33 % höher als die des Ajmalins. Dies deckte sich mit den in der vorliegenden Arbeit und durch POLZ (Dissertation, 1989) ermittelten Ergebnissen zur Enzymaktivität der Vomilenin Reduktase. Während für andere Enzyme des Ajmalinbiosynthesewegs wie z.B. der Polyneuridinaldehyd Esterase etwa 250 nkat/l Kultur gewonnen werden

konnten, wurden für die Vomilenin Reduktase lediglich 0.25 nkat/l isoliert. Das erklärt die enorme Akkumulation des Vomilenins in den Zellsuspensionskulturen sowie seine hohe Umwandlungsrate in das 21 β -(D)-Glucosid Raucaffricin. Um in Zukunft eine gesteigerte Ajmalin-Produktion in den Zellkulturen zu erzielen, müssten die Vomilenin- und die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase überexprimiert werden. Nur so könnte der „Engpaß“ auf dem Weg zur Ajmalinbildung überbrückt werden. An der Regulation der Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia*-Zellkulturen spielen also die hier bearbeiteten Reduktasen eine eminente Rolle.

Die alleinige Hemmung der Vomilenin Glucosyltransferase bzw. der Überexpression der Raucaffricin Glucosidase würde zwar die Raucaffricinkonzentration herabsetzen, was in einer noch höheren Vomileninkonzentration resultieren würde. Da zur Zeit aber Vomilenin schon im Überschuß vorhanden ist, hätte dies sicherlich keine Auswirkung auf die Ajmalinbildung.

In der Abb. 58 sind die verschiedenen Reaktionswege des Vomilenins mit entsprechenden Regulationsmöglichkeiten aufgezeigt, wobei insbesondere zur Vomileninreduktion analoge Hydrierungen der Indolenin-Doppelbindung mitberücksichtigt werden.

Abb. 58 Vomilenin als zentrales Alkaloid in der Ajmalinbiosynthese. Umseitig angegeben sind die verschiedenen Reaktionswege des Vomilenins unter besonderer Berücksichtigung der zur Vomileninreduktion analogen Hydrierungen im Biosyntheseweg des Ajmalins. Die geringe Expression der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase in den Pflanzenzellsuspensionskulturen erschwert nicht nur die Reinigung aus den Zellen, sondern ist auch der Grund für die Akkumulation von Vomilenin und Raucaffricin im Biosyntheseweg. Um eine stärkere Ajmalinproduktion zu erzeugen, müßten die Gene der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase überexprimiert werden. (1) Vinorin Hydroxylase. (2) Vomilenin Reduktase. (3) 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase. (4) Acetylnorajmalin Methyltransferase. (5) Acetylajmalin Acetylerase. (6) Von Polz angenommene Vomilenin Reduktase, konnte von mir jedoch widerlegt werden. Enzym noch nicht bekannt. (7) und (8) Vomilenin Oxidoreduktase. (9) Vomilenin Glucosyltransferase. (10) Raucaffricin Glucosidase. (11) Hydrierung der Indolenin-Doppelbindung analog zur Vomileninreduktion, Enzym nicht bekannt. (12) Saure Umlagerung des Vomilenins, evtl. auch enzymatisch. (13) Hydrierung der Indolenin-Doppelbindung analog zur Vomileninreduktion, Klon 43 kDa RACE 2 - evtl. Isoform der Vomilenin Reduktase. (14) Perakin Reduktase. (15) evtl. Perakin Reduktase – nicht endgültig geklärt. (16) Hydrierung der Indolenin-Doppelbindung analog zur Vomileninreduktion, Klon 43 kDa RACE 2 - evtl. Isoform der Vomilenin Reduktase; Reaktion noch nicht endgültig geklärt.



Die Umsetzung von Perakin - als Strukturisomeres Alkaloid des Vomilenins - fand nur durch das translatierte Protein der 43 kDa RACE 2-cDNA statt. In den entsprechenden Kontroll-Stämmen, die den *pQE 60* Vektor ohne Insert entielten, war keine Abnahme des Perakinpeaks feststellbar. Bei der nachgewiesenen NADPH-abhängigen Reaktion (IV.5.1.2) wurden rund 40 % des Perakins reduziert. In der Abb. 58 werden die in Frage kommenden Reduktionsreaktionen mit Strukturformeln verdeutlicht. Denkbar ist die schon früher zum Teil untersuchte Reduktion des Perakins zu Raucaffrinolin durch die Perakin Reduktase. Ebenfalls würde die Reduktion der Indolenin-Doppelbindung des Perakins in Frage kommen, wobei 1.2-Dihydroperakin entstehen würde. Letztlich wäre auch eine Kombination beider Reduktionsreaktionen zum 1.2-Dihydroraucaffrinolin denkbar.

Ausgehend von den HPLC-Ergebnissen, die einen neuen Produktpeak bei einer R_t von 3.24 min bzw. 3.64 min erbrachten, sollte ein Stoff entstehen, der unpolarer als Perakin ist. Wenn man sich die Reduktion des Vomilenins zu 2β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin vor Augen hält, verschiebt sich die Retentionszeit in der HPLC von 3.57 min nach 4.74 min. Dabei wird aus Vomilenin ebenfalls das unpolarere 2β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin gebildet. Daher wäre es wahrscheinlicher, daß die Indolenin-Doppelbindung anstatt des Aldehyds reduziert würde.

Eine Reduktion des Aldehyds zu Raucaffrinolin mit einer alkoholischen Gruppierung an C 21 würde aufgrund der resultierenden, höheren Polarität eine frühere Retentionszeit an einer RP-Säule bedingen.

Die DC-Untersuchung der reduzierten Substanz spricht nach Orangefärbung durch Cersulfat-Detektion auch für eine Reduktion der Indolenin-Doppelbindung. Nach abschließender MS-Untersuchung (IV.5.1.2) bleibt festzuhalten, daß eine einfache Reduktion, das heißt Einführung von zwei Protonen in das Molekül, zugrunde liegt. Ausgehend von Perakin mit einem MW von 350 wurde ein Stoff mit MW 352 gebildet, der einen Basispeak bei 168 aufweist. Dieser Basispeak ist ein charakteristisches Zeichen für alle 2β -(*R*)-konfigurierten Indolalkaloide. Insgesamt erinnert das Zerfallsmuster an Raucaffrinolin (bzw. an 2β -(*R*)-1.2-Dihydroraucaffrinolin), jedoch passen die Fragmente bei Masse 337 und 323 nicht dazu. Die Differenz zum Massenpeak von 352 würde einer aldehydischen Abgangsgruppe entsprechen. Raucaffrinolin weist in diesem Bereich die zwei

Protonen schwerere alkoholische Gruppe auf, resultierend in Massen von 335 und 321.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich folgern, daß ein Enzym exprimiert wurde, welches in der Lage ist, Perakin im Indoleninring zu reduzieren. Dies würde eine zur Vomileninreduktion analoge Reaktion bedeuten.

Um die Reaktion eindeutig einem exprimierten Enzym zuordnen zu können, sollte das Protein über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Versuche, das mit einem (His)₆-tag versehene Enzym über Ni-NTA aufzureinigen, schlug - wie schon oben angedeutet - fehl.

Daher wurde eine Proteinreinigung, orientierend am Protokoll der Vomilenin Reduktase, durchgeführt. Bei der Annahme, es handele sich um eine Isoform der Vomilenin Reduktase, die eventuell in der Lage sei, das strukturisomere Perakin zu reduzieren, sollte eine Reinigung unter denselben Bedingungen erfolgreich sein. Dies bewahrheitete sich auch dahingehend, daß ein zum Aktivitätsverlauf der Perakinreduktion passender Verlauf einer Proteinbande bei 43 kDa auf dem SDS-Gel (Abb. 52) erhalten werden konnte.

3 Eigenschaften der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase

Der endgültige Beweis der indirekt belegten Reaktionsabfolge der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomileninreduktion wurde durch die Testung der Substratakzeptanz (IV.3.6) angereicherter und isolierter Enzymlösungen der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase erbracht.

Dabei konnte gezeigt werden, daß die Vomilenin Reduktase selektiv Vomilenin zu 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin umsetzt und die Reaktion auf dieser Stufe stehen bleibt. Die Testung der Vomilenin Reduktase auf 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Umsatz sowie auf Reduktion des Diastereomers 2 α -(*S*)-1.2-Dihydrovomilenin fielen negativ aus. Da auch 20 α -(*S*)-19.20-Dihydrovomilenin, Raucassicin und Vinorin nicht akzeptiert wurden läßt sich daraus folgendes ableiten: Die Vomilenin Reduktase ist ein hochspezifisches Enzym aus dem Ajmalinbiosyntheseweg. Es erfolgt lediglich eine Reduktion, wenn eine **freie** Hydroxyl-

gruppe an C 21 vorhanden ist und die Doppelbindung in Position 19.20 nicht hydriert vorliegt.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase erzielt, wobei nur 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin zu 17-O-Acetylnorajmalin reduziert wurde. Alle anderen getesteten Substanzen wurden nicht verändert. Hieraus lassen sich präzise Angaben über die Substratbeschaffenheit ableiten. Zum einen muß die Indolenin-Doppelbindung schon hydriert sein und eine 2 β -(*R*)-Konfiguration aufweisen. Da die Indolenin-Doppelbindung in keinem Fall durch die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase hydriert wird und alle Substrate mit vorhandener Indolenin-Doppelbindung nicht akzeptiert werden ist allein dadurch die Reaktionsabfolge festgelegt.

Experimente zur Co-Substrat-Abhängigkeit unterstrichen die hohe Spezifität der beiden Reduktasen dahingehend, das nur in Gegenwart von NADPH₂ eine enzymatische Reaktion zu beobachten war. Im Gegensatz dazu blieben die Reduktionen mit NADH₂ aus.

Wie auch zahlreiche andere Eigenschaften der Reduktasen (Molekulargewichtsbestimmung über Größenausschlußchromatographie, Instabilität, Substratakzeptanz usw.) konnte die Bestimmung der Temperatur- und pH-Optima (IV.3.1 und IV.3.2) die Präsenz **zweier** Reduktasen belegen.

Das Temperatur-Optimum der Vomilenin Reduktase lag bei 30 °C. Bei höheren Temperaturen nahm die Aktivität extrem schnell ab und bei 55 °C war die Vomilenin Reduktase praktisch inaktiv. Im Gegensatz dazu wurde für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase ein Optimum bei ca. 38 °C bestimmt. Sogar bei 55 °C wies die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase noch über 70 % ihrer ursprünglichen Aktivität auf. Diese hohe Temperaturstabilität der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase ist auffallend, wird aber dadurch relativiert, daß in der Vergangenheit auch schon für einige andere - ebenfalls aus *Rauvolfia serpentina* isolierte - Enzyme ein hohes Temperaturoptimum von 50 °C beschrieben wurde. Als Beispiele hierfür können die Vomilenin Glucosyltransferase (RUYTER und STÖCKIGT, 1991), die Strictosidin Glucosidase (GERASIMENKO et al., 2002) sowie die Arbutin Synthase (HEFNER et al., 2002) angeführt werden. Die Ursache einer so enormen Temperatur-Unempfindlichkeit der Enzyme ist noch nicht bekannt. Bemerkenswert ist jedoch die Häufigkeit des Auftretens bei *Rauvolfia*.

Während das pH-Optimum der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase genau bei pH 6 lokalisiert war, erstreckte sich das Optimum der Vomilenin Reduktase von pH 5.8 bis 6.2. Dies sind Optima, die eine eindeutige Lokalisation in der Zelle nicht zulassen. Das Vorkommen könnte sich sowohl auf das Cytosol, als auch auf die Vakuole erstrecken. Dies bedürfte noch weiterer Untersuchungen.

Auch die hohe Instabilität - besonders der Vomilenin Reduktase - und die Ursache dafür bedürfen noch eingehender Untersuchung. Entscheidend ist wohl, daß den beiden an der Ajmalinbiosynthese beteiligten Reduktasen, Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase, eine signifikante Bedeutung in Bezug auf die Regulation des Biosynthesewegs zukommt. Deutlich wird dies in der kurzen Lebensdauer v.a. der Vomilenin Reduktase, was immer ein Zeichen schneller Hoch- und Runter-Regulation im Bereich des Sekundärstoffwechsels ist. Damit wird die zeitnahe Anpassung des Stoffwechsels der Pflanze an verschiedene Lebensbedingungen gewährleistet. Die unbeständige Alkaloidproduktion wurde schon von DEUS-NEUMANN und ZENK (1984) für die Zellkulturen der ebenfalls zu den Apocynaceen gehörende Pflanze – *Catharanthus roseus* – beschrieben.

Zusätzlich ist eine Bestätigung der Regulationstheorie in der hohen Substratspezifität und der geringen Expressionsrate der Reduktasen zu sehen. Letztere führte zu der schon erwähnten Anhäufung des Vomilenins und des Raucaffricins als Hauptalkaloide der Zellsuspensionskulturen. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde von mir über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren konstant die Expression der beiden Reduktasen beobachtet. Schon zu Beginn dieser Arbeit konnte nicht in allen kultivierten *Rauvolfia*-Zellsuspensionskulturen (IV.3.8) die Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Dies galt in erster Linie für die Arten *Rauvolfia chinensis* und *Rauvolfia verticillata*. Die Bildung der Reduktasen war anfangs am besten in *Rauvolfia serpentina* ausgeprägt. Jedoch sollte beachtet werden das die Expressionsrate insgesamt sehr niedrig anzusetzen war. Dies wird in der Gegenüberstellung der aus *Rauvolfia serpentina* isolierten Enzymaktivität der Reduktasen mit 0.25 nkat/l Kultur und der Polyneuridinaldehyd Esterase mit 250 nkat/l Kultur besonders deutlich.

Ab 2002 nahm dann die Expression der Reduktasen bis auf 10 % des Ausgangswertes ab, was letztendlich zu dem angedeuteten „Engpaß“ (V.2.3) an 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin führte.

4 Ausblick

Das weiter gesteckte Ziel ist in der Isolierung, Aufreinigung und heterologen Expression aller direkt an der Ajmalinbiosynthese beteiligten Enzyme zu sehen. Damit wäre erstmals die Möglichkeit eröffnet, eine komplette *in vitro*-Biosynthese eines hoch komplex strukturierten Naturstoffs durchzuführen. Durch die Ermittlung der Signaltransduktionswege für die codierenden Gene wäre man weiterhin in der Lage, durch Ausschaltung von Nebenwegen und Überexpression der für die Ajmalinproduktion benötigten Enzyme die Bildung des Ajmalins in den Zellkulturen enorm anzuregen.

Ein großer Fortschritt zur verstärkten Ajmalinbildung in den Pflanzenzellsuspensionskulturen würde schon die Überexpression der Vomilenin- und der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase - aus den oben angeführten Gründen - bringen. Um dies zu erreichen müssen die entsprechenden cDNA's der beiden Enzyme identifiziert werden.

Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase betreffend, heißt das: Primär sollte daran gearbeitet werden, die Zellsuspensionskulturen so anzuregen (z.B.: Elicitierung), daß wieder Vomilenin Reduktase in ausreichender Menge exprimiert wird. Letztere ist momentan der einzige Schlüssel zur Gewinnung des 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenins. Parallel dazu sollte an einer chemischen Synthese des 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenins gearbeitet werden. Nach Erhalt des Alkaloids können dann die bisher nicht getesteten Klone der 48 kDa-Bande (1.2-Dihydrovomilenin Reduktase) auf Aktivität geprüft werden. Ebenfalls sollte eine Expressionsoptimierung durchgeführt und eine Expression in einem anderen Organismus überdacht werden. Im Gegensatz zu *E. coli* wären Hefen oder Insektenzellen als eukaryotische Systeme auch zu posttranslationalen Modifikationen fähig.

Die bisher klonierten cDNA-Sequenzen für die Vomilenin Reduktase sind differenziert zu betrachten.

Das durch die 40 kDa-cDNA codierte Enzym zeigt eine Reduktion des Zimtaldehyds. Auch hier sollte eine Umklonierung erfolgen, da die Expression im *pSE 280*-Plasmid nur sehr schwer zu kontrollieren war. Desweiteren konnte das zu exprimierende Enzym durch die Verwendung von *pSE 280* nicht selektiv gereinigt werden.

Auch für den 43 kDa RACE 1- und 43 kDa RACE 2-Klon würden sich andere Expressionsstrategien anbieten. Da der RACE 2-Klon in der Lage war, Perakin zu reduzieren und der RACE 1-Klon nicht, wäre zu überlegen, ob die schnittstellenbedingte Aminosäureänderung des RACE 1-Klons die Ursache dafür ist. Dementsprechend sollten Expressionsvektoren zum Einsatz kommen, die weiterhin die Möglichkeit zur Aufreinigung (z.B.: His-tag, Chitin-Bindedomäne) bieten - bei gleichzeitigem Erhalt der natürlichen Aminosäuresequenz. Für die Weiterbearbeitung des 43 kDa RACE 2-Klon steht die Expressionsoptimierung im Vordergrund. Da auch dieser Klon nicht über den (His)₆-tag zu reinigen war, könnte eine Umklonierung des (His)₆-tags vom C-terminalen Ende zum N-Terminus den gewünschten Erfolg bringen. Auch hier würde die Verwendung einer Chitin-Bindedomäne Sinn machen. Darüber hinaus könnte versucht werden, über PCR weitere Isoformen der 43 kDa-Bande zu identifizieren. Als Grundlage des Primer-Designs sollten die homologen Bereiche der bis jetzt ermittelten Sequenzen herangezogen werden. Letztlich müssen beide Klone der 43 kDa-Bande aufgrund des großen Unterschieds zwischen berechnetem und über Größenausschluß sowie Gelelektrophorese bestimmtem Molekulargewicht in einem eukaryotischen Organismus zur Expression gebracht werden. Nur dadurch können die entsprechenden posttranslationalen Veränderungen erzeugt und damit das unveränderte Protein der 43 kDa-Bande gewonnen werden. Dieses könnte erneut auf Vomileninreduktion getestet werden.

Im Falle der aktiven Expression der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase würden kinetische Untersuchungen sowie Kristallisations- und Mutationsversuche zum Aufbau und zur Funktion der Reduktasen die Experimente zu diesem Teil der Ajmalinbiosynthese abschließen.

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zur lückenlosen Aufklärung der Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia serpentina* die NADPH₂-abhängigen Reduktionsschritte des Alkaloids Vomilenin zu 17-O-Acetylnorajmalin genauer untersucht.

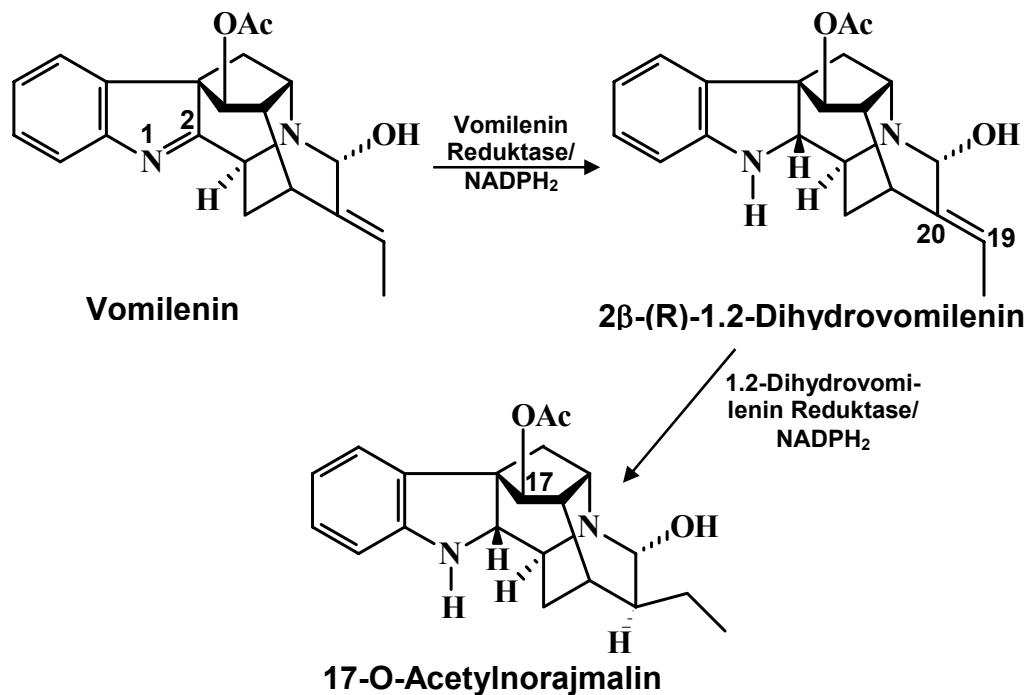


Abb. 59 Schematische Darstellung des Vomileninumsatzes durch die aus *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen aufgereinigte Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase.

Dabei konnte erstmals die in Abb. 59 angegebene Reaktionsreihenfolge klar bewiesen und die daran beteiligten Enzyme aus Pflanzenzellsuspensionskulturen isoliert und hoch angereichert werden.

Die ausgearbeiteten, optimierten Reinigungsprotokolle führen - in wenigen Stufen - gezielt zu den voneinander getrennten Reduktasen. Durch die Trennung der Reduktase-Aktivitäten war erstmals die Basis vorhanden, das Zwischenprodukt anzureichern und mit verschiedenen analytischen Verfahren als 2β-(R)-1.2-Dihydrovomilenin zu identifizieren. Damit waren die beiden Substrate der Reduktasen ermittelt. Die daraufhin vergebene Bezeichnung Vomilenin Reduktase (EC.1.5.1.32) und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase (EC.1.3.1.73) zielt auf das umzusetzende Substrat ab.

Für die Vomilenin Reduktase konnte eine 4-stufige Reinigung über $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, Anionenaustauschchromatographie mit SOURCE 30Q, Hydrophobe Interaktionschromatographie an SOURCE 15Phe und Affinitätschromatographie mit 2',5'-ADP-Sepharose ausgearbeitet werden. Hierbei konnte die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase schon nach dem ersten säulenchromatographischen Schritt (S 30Q) abgetrennt werden. Das am Ende der Proteinreinigung angefertigte SDS-Gel zeigte nur noch 3 Banden, von denen die beiden bei ca. 40- und 43 kDa gelegenen Banden mit dem Aktivitätsverlauf der Vomilenin Reduktase korrelierten. Diese wurden einem partiellen Verdau mit der Endoproteinase LysC unterworfen, wobei jeweils 2 Spaltpeptide erhalten werden konnten.

Die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Reinigung umfaßte 6 Reinigungsschritte mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, SOURCE 30Q-Anionenaustauschchromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie, 2',5'-ADP-Sepharose-Chromatographie, Anionenaustausch an DEAE-Sepharose und abschließenden Anionenaustausch über MonoQ. Die resultierende Proteinfraction wies eine ca. 200-fache Anreicherung an 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase auf. Auch hierbei wurde die nach SDS-Gelelektrophorese als 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase bestimmte Proteinbande (bei ca. 48 kDa) sequenziert. Es konnten vier Peptidfragmente erhalten werden, die ebenso wie die sequenzierten Peptidstücke der 40- und 43 kDa-Bande eine hohe Homologie zu Oxidoreduktasen, im einzelnen zu Cinnamoylalkohol- und Mannitol Dehydrogenasen, aufwiesen.

Die Molekulargewichtsbestimmung für die Vomilenin Reduktase ergab nach Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 ein Gewicht von etwa 43 kDa. Das ebenfalls über Superdex 75 ermittelte Molekulargewicht für die 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase lag bei ca. 49.8 kDa.

Weiterhin wurde eine Metallionenabhängigkeit für die Vomilenin Reduktase aufgezeigt und die Cofaktorspezifität sowie die pH- und Temperatur-Optima für beide Reduktasen bestimmt.

Um die Identität der sequenzierten Proteinbanden zu bestätigen, wurde über „reverse genetics“ die jeweils codierende cDNA ermittelt. Dafür wurden - ausgehend von den Peptidstücken der Mikrosequenzierung - degenerierte Primer entwickelt und über PCR Teilbereiche der cDNA amplifiziert. Diese konnten für eine radioaktive Durchmusterung einer *Rauvolfia* cDNA-Bank

herangezogen werden. Alternativ war allein durch die Kenntnis der spezifischen Nukleotidabfolge die Gewinnung von 5'- und 3'-Ende der Vollängenklone durch RACE-PCR gegeben.

Nach Abschluß dieser Arbeiten konnten für die 40- und 48 kDa-Bande je ein Vollängenklon und für die 43 kDa-Bande 2 Vollängenklone (Isoformen) gefunden werden. Sämtliche Vollängenklone besitzen einen offenen Leserahmen, der durch nicht zu translatierende Bereiche am 5'- und 3'-Ende eingefasst wird. Um die entsprechenden Proteine produzieren zu können, mußten die dafür codierenden cDNA-Bereiche der einzelnen Klone in ein geeignetes Vektor-Wirt-System (Expressionssystem) eingebracht werden.

Nach erfolgreicher Umklonierung wurde die Expression durch IPTG-Zugabe kontrolliert und Proteinrohextrakte aus den Bakterienstämmen isoliert. Als Substrate wurden Vomilenin, das strukturisomere Alkaloid Perakin und - aufgrund der Homologien zu Cinnamoylalkohol- und Mannitol Dehydrogenasen - Zimtaldehyd, Dihydrozimtaldehyd und D(-)Fructose getestet.

In allen *E. coli*-Stämmen konnte ein unspezifisches Reduktionspotential nachgewiesen werden, ohne daß jedoch Vomilenin reduziert wurde. Die Testung der 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase-Klone mußte wegen Substratmangel entfallen.

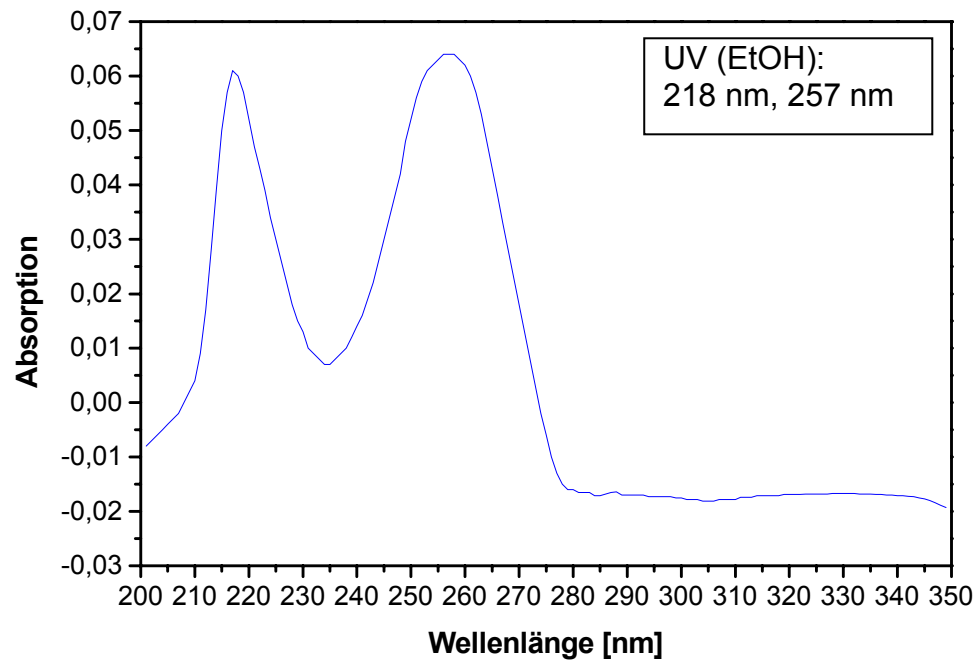
Einem Klon konnte die Reduktion des Zimtaldehyds zugeordnet werden und ein weiterer Klon war in der Lage Perakin zu 1.2-Dihydroperakin zu reduzieren. Da jedoch noch nicht alle Klone getestet werden konnten und sich durch Nutzung anderer Expressionssysteme (posttranslationale Veränderungen) signifikante Veränderungen ergeben können, wird erwartet, die entsprechenden cDNA's der Vomilenin- und 1.2-Dihydrovomilenin Reduktase kloniert zu haben. Es wird lediglich eine Frage der Expressionsoptimierung und damit der Zeit sein, bis eine aktive Expression der beiden Reduktasen erzielt werden kann.

VII Anhang

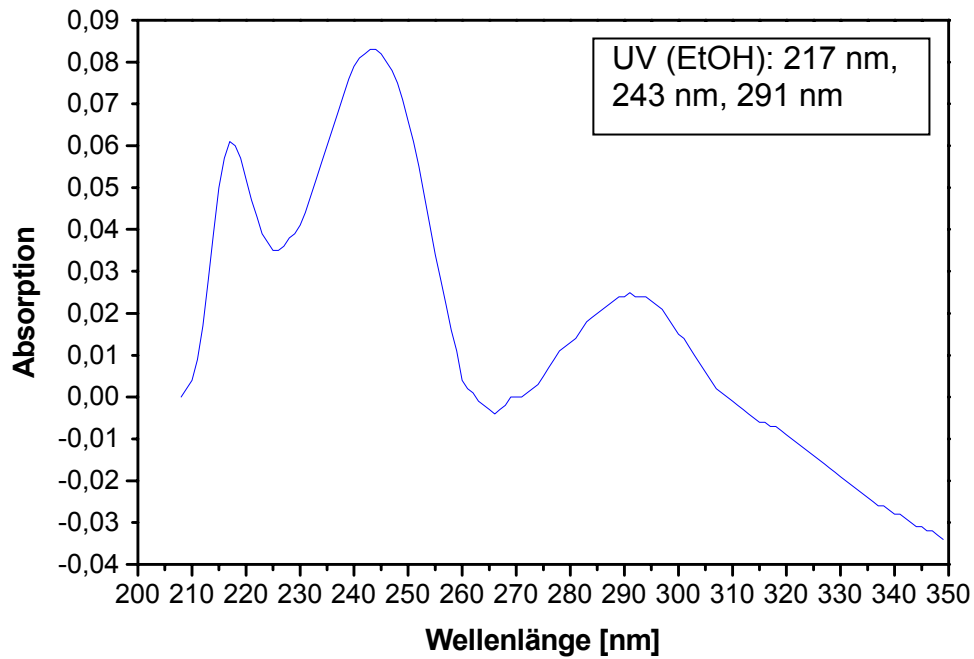
1 Analytische Daten

1.1 UV-Spektren

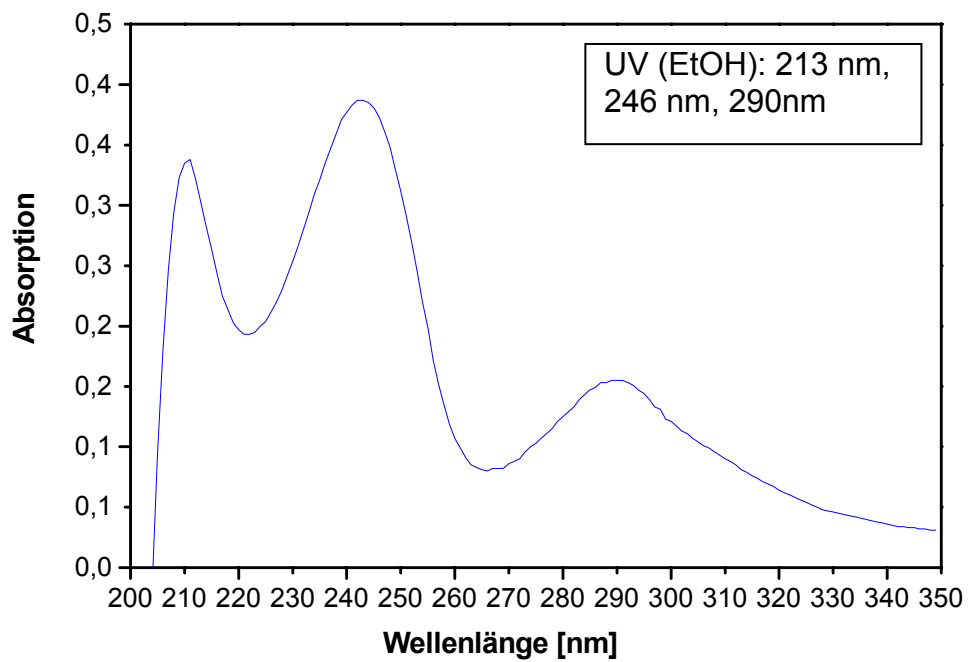
1.1.1 UV-Spektrum von Vomilenin



1.1.2 UV-Spektrum von 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin



1.1.3 UV-Spektrum von 17-O-Acetylnorajmalin



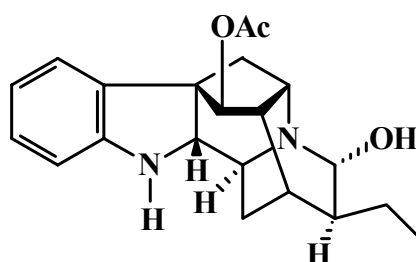
1.2 HPLC-Chromatogramme und Massenspektren

17-O-Acetylnorajmalin

Summenformel: $C_{21}H_{26}N_2O_3$

Molekulargewicht: 354.45

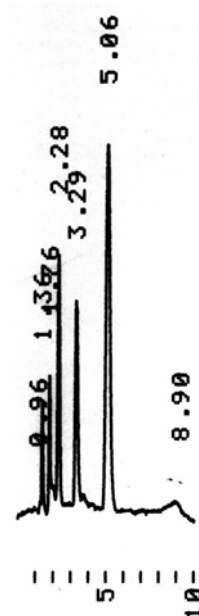
Strukturformel:



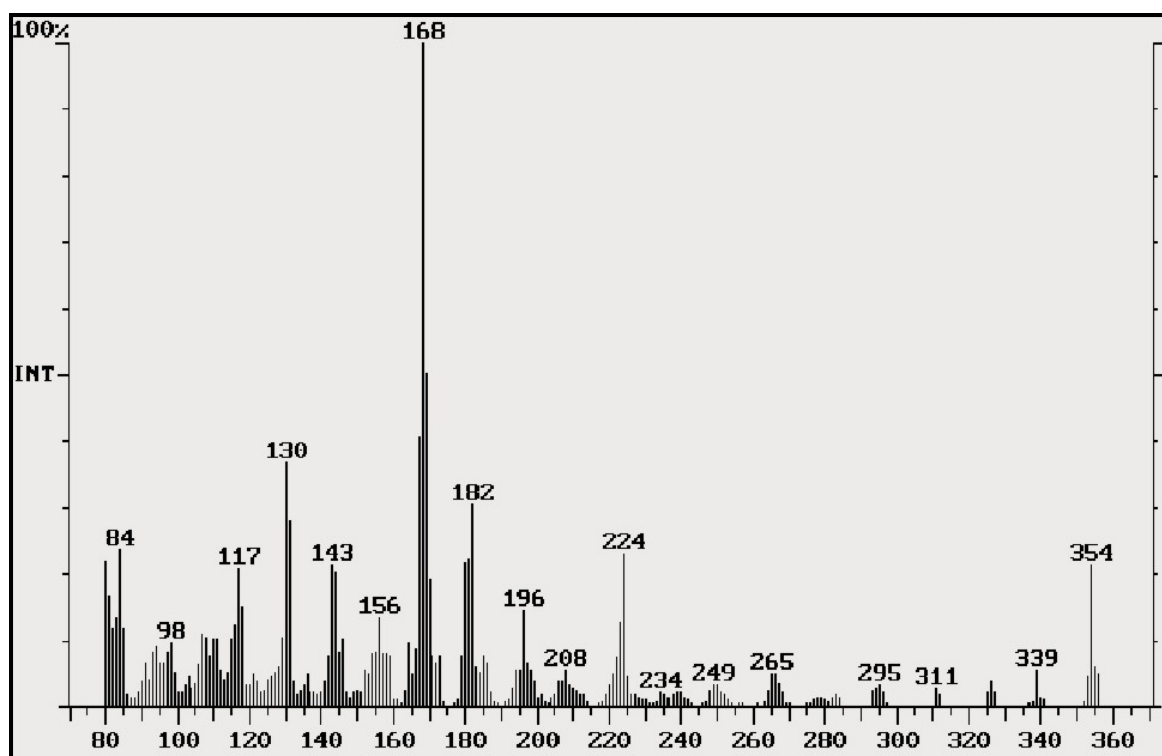
Retentionszeit/HPLC: 5.06 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.36 (FM 1); 0.21 (FM 2);

Cersulfatfärbung orange



EI-MS:

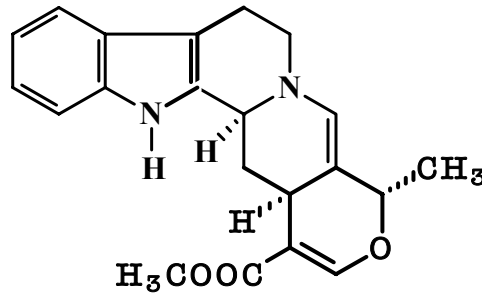


Cathenamin

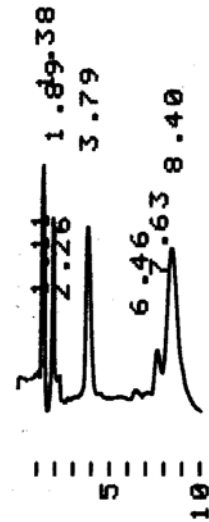
Summenformel: $C_{21}H_{22}N_2O_3$

Molekulargewicht: 350.14

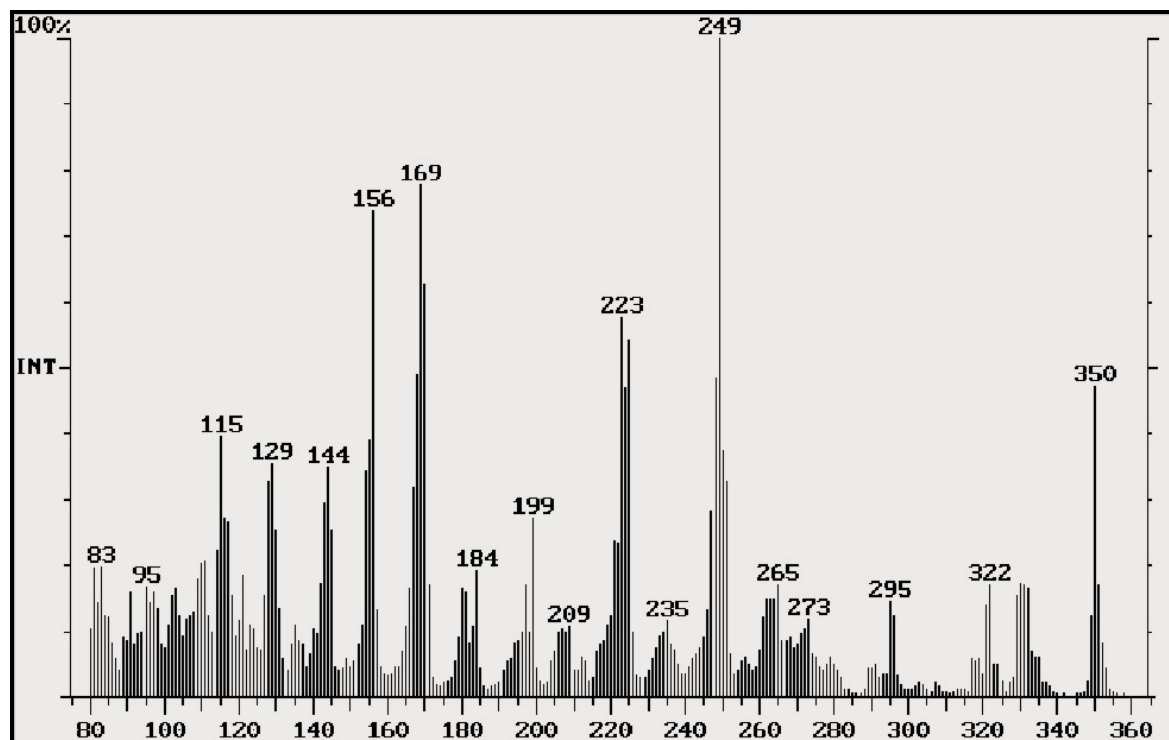
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 8.40 min, Programm 1



EI-MS:

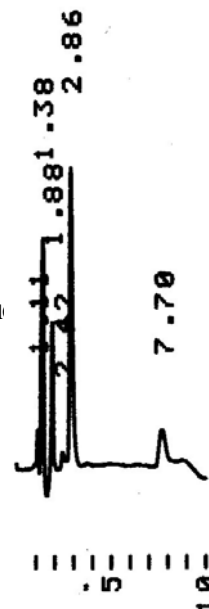
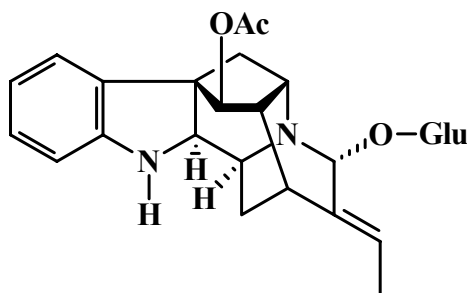


2 α -(S)-1.2-Dihydroraucaffricin

Summenformel: C₂₇H₃₄N₂O₈

Molekulargewicht: 514.24

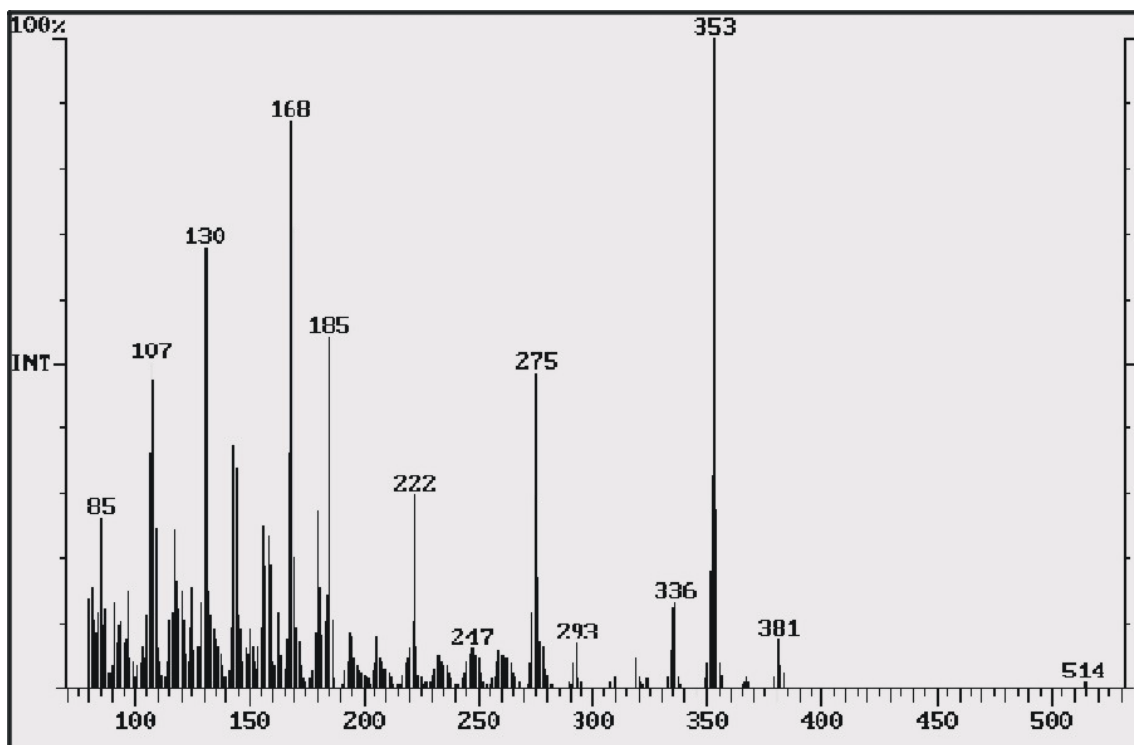
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 2.86 min, Programm 1

R_F-Wert: 0.18 (FM 1)

EI-MS:

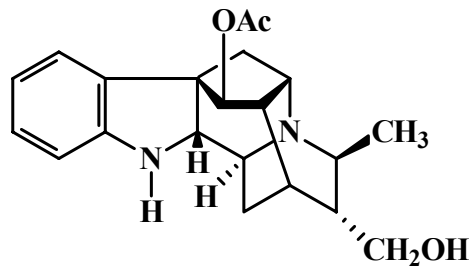


2 β -(*R*)-1.2-Dihydroraucaffrinolin

Summenformel: C₂₁H₂₆N₂O₃

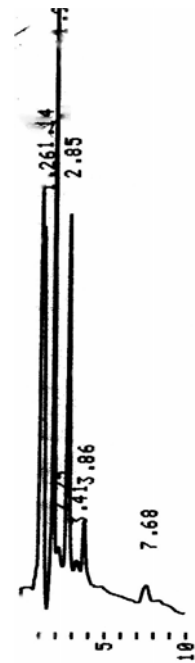
Molekulargewicht: 354.45

Strukturformel:

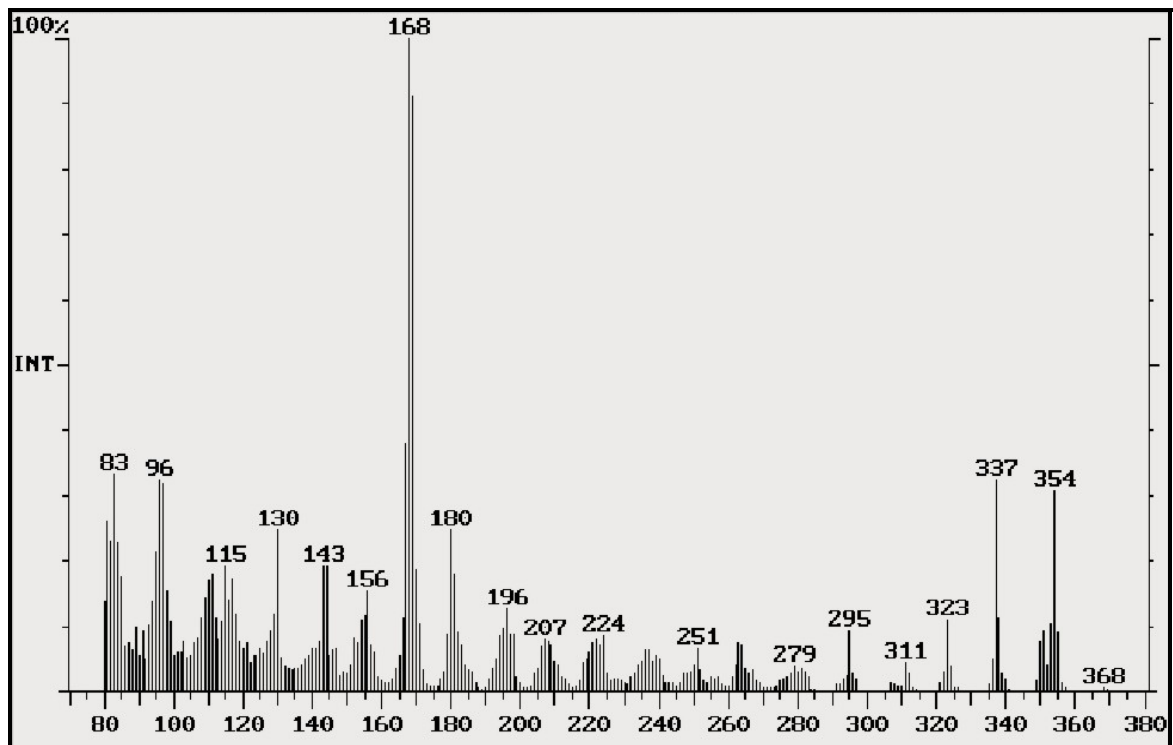


Retentionszeit/HPLC: 3.86 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.17 (FM 1); 0.8 (FM 5)



EI-MS:

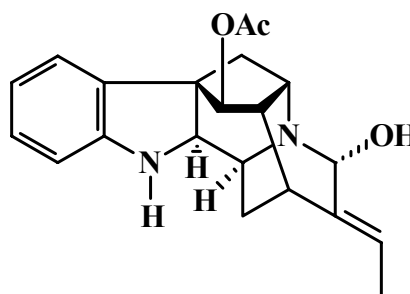


2 α -(S)-1.2-Dihydrovomilenin

Summenformel: C₂₁H₂₄N₂O₃

Molekulargewicht: 352.43

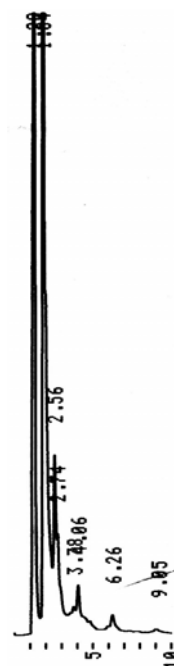
Strukturformel:



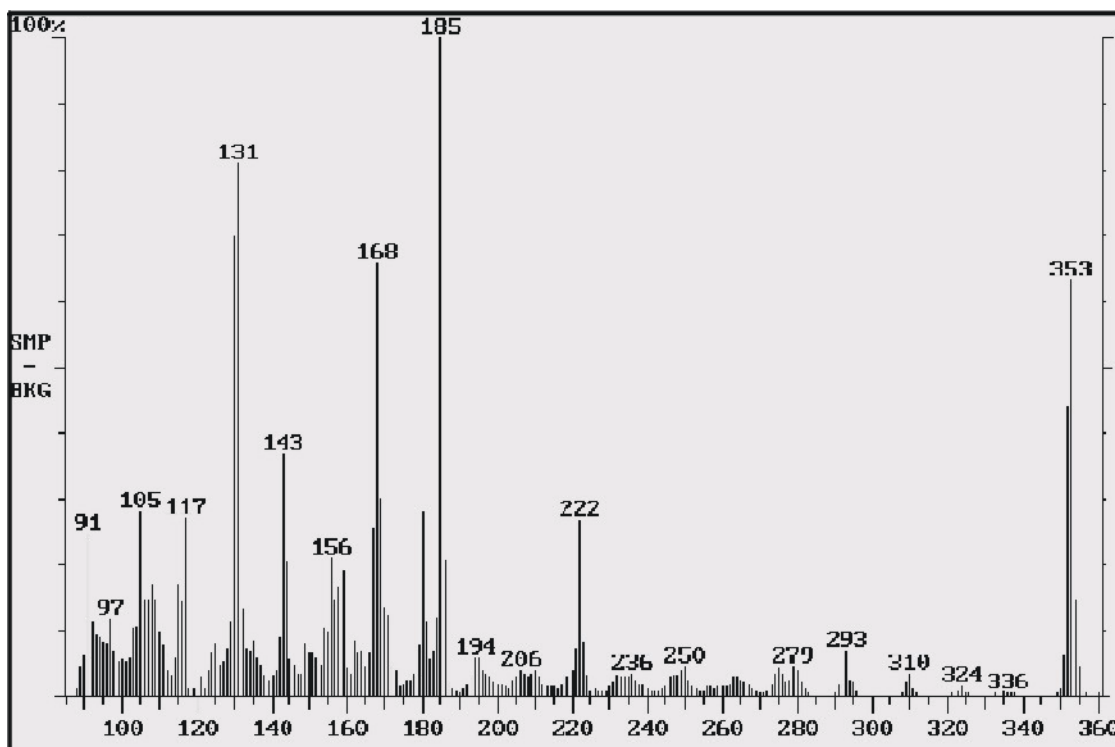
Retentionszeit/HPLC: 4.06 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.25 (FM 2)

Cersulfatfärbung orange



EI-MS:

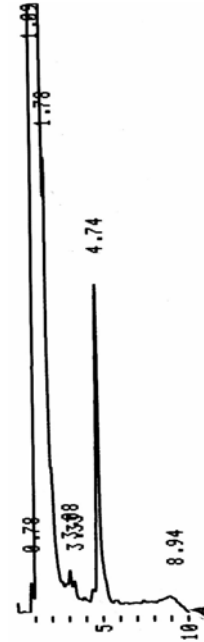
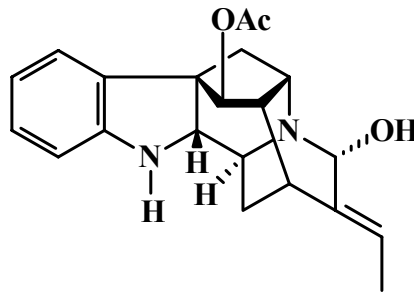


2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin

Summenformel: C₂₁H₂₄N₂O₃

Molekulargewicht: 352.43

Strukturformel:

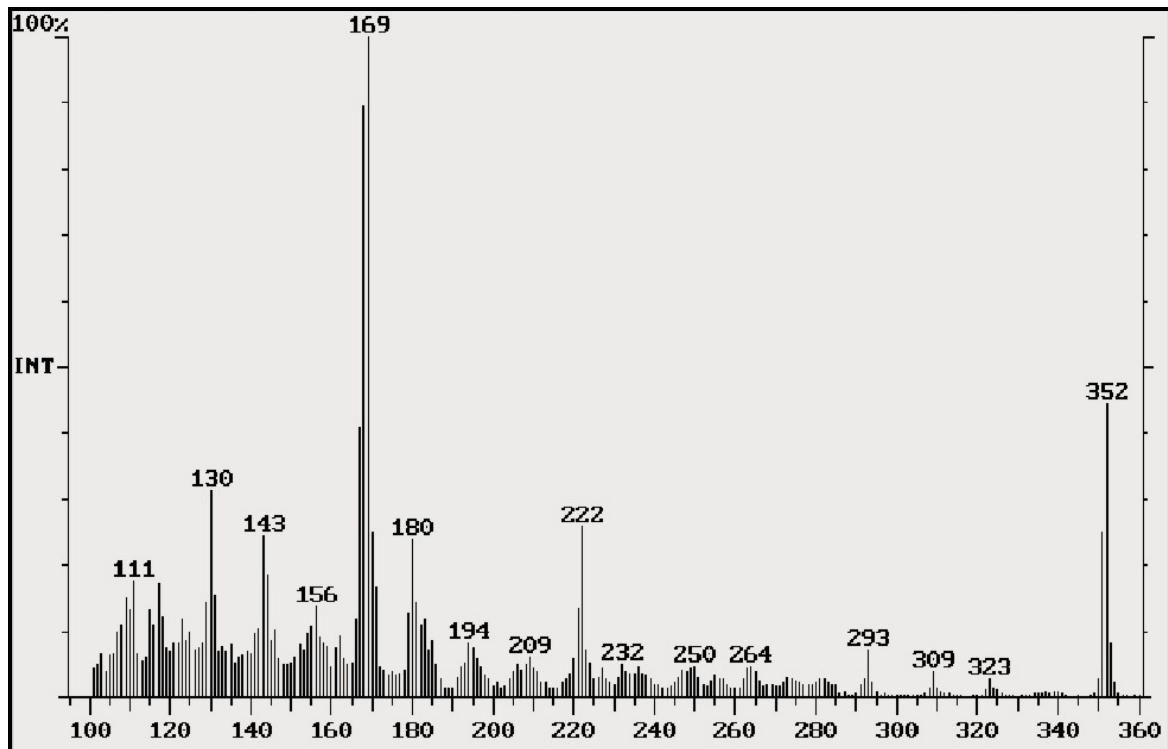


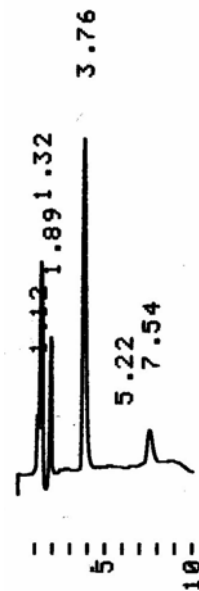
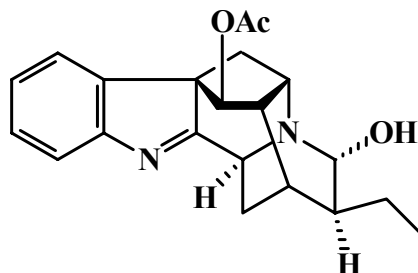
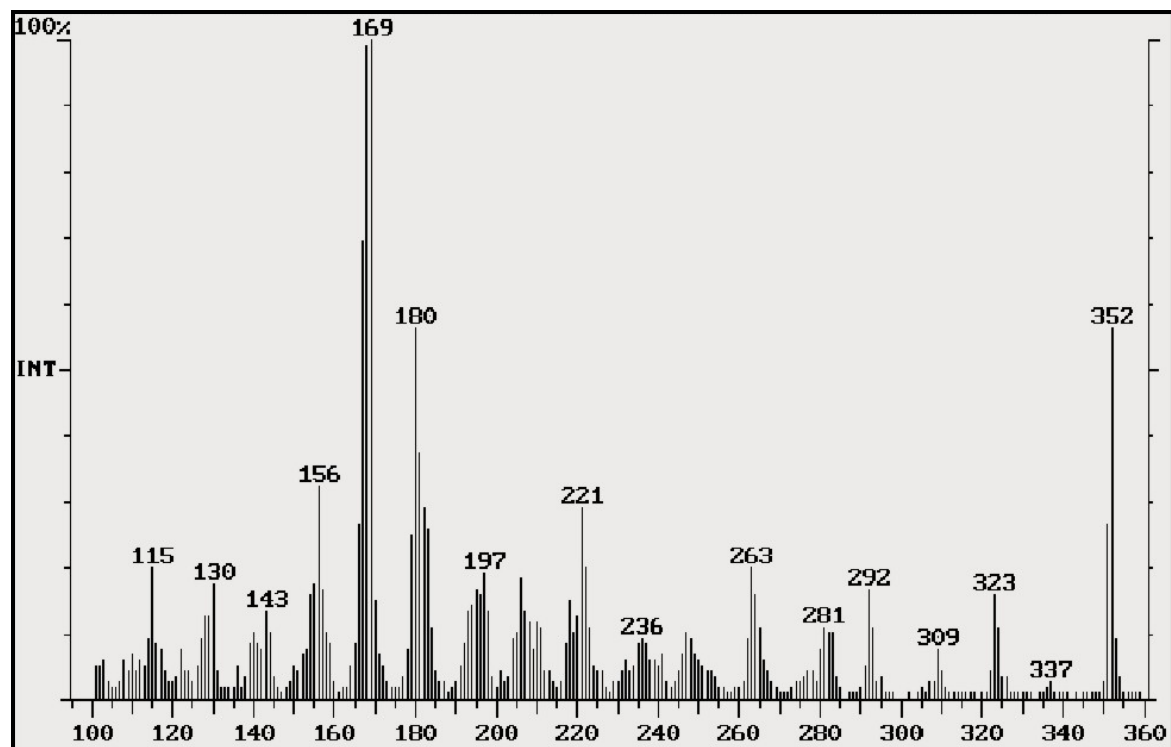
Retentionszeit/HPLC: 4.74 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.45 (FM 2)

Cersulfatfärbung orange

EI-MS:



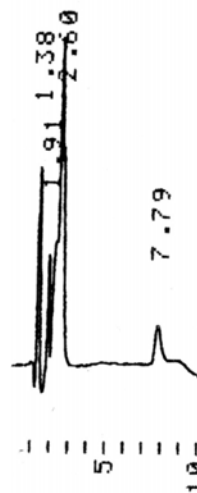
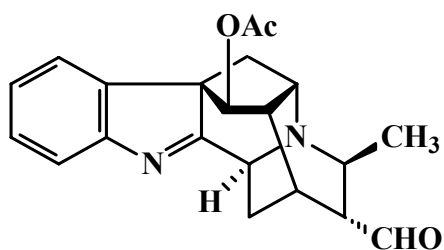
20 α -(S)-19.20-Dihydrovomilenin**Summenformel:** C₂₁H₂₄N₂O₃**Molekulargewicht:** 352.43**Strukturformel:****Retentionszeit/HPLC:** 3.76 min, Programm 1**R_f-Wert:** 0.53 (FM 1)**EI-MS:**

Perakin

Summenformel: $C_{21}H_{22}N_2O_3$

Molekulargewicht: 350.41

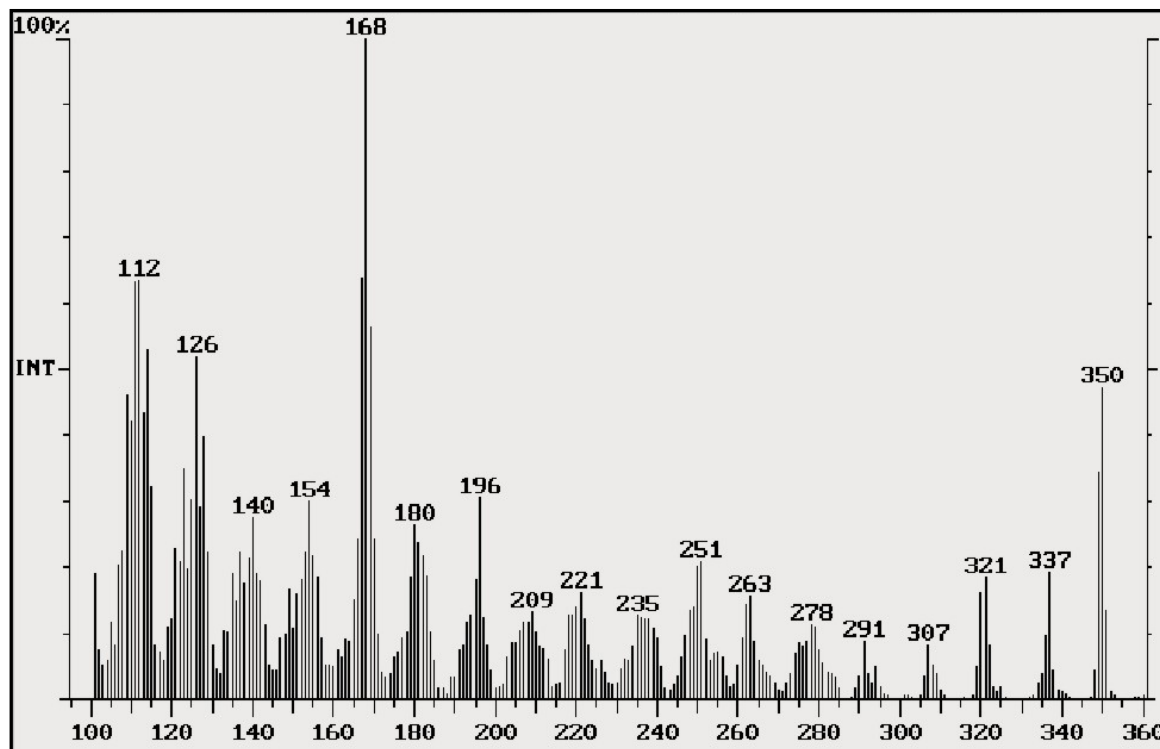
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 2.60 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.5 (FM 1)

EI-MS:

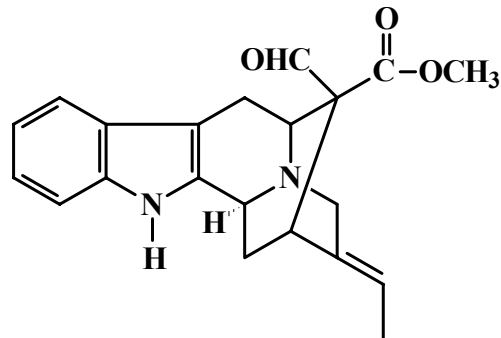


Polyneuridinaldehyd

Summenformel: $C_{21}H_{22}N_2O_3$

Molekulargewicht: 350.41

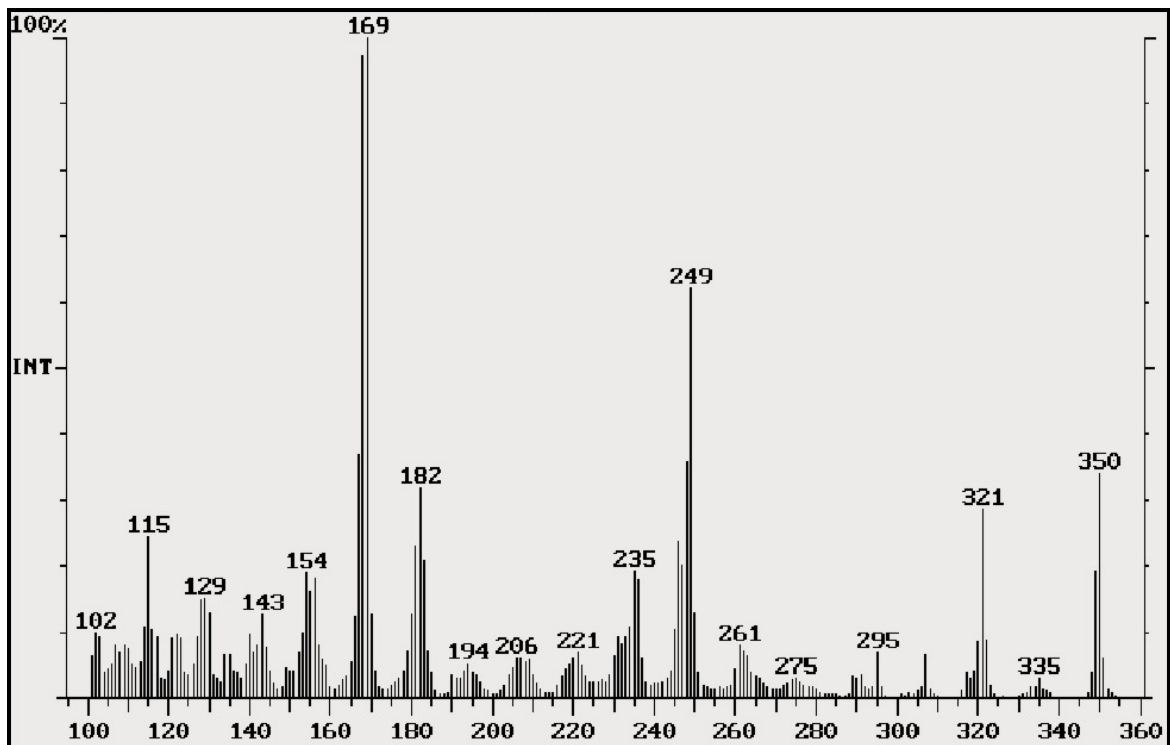
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 3.60 min, Programm 1



EI-MS:

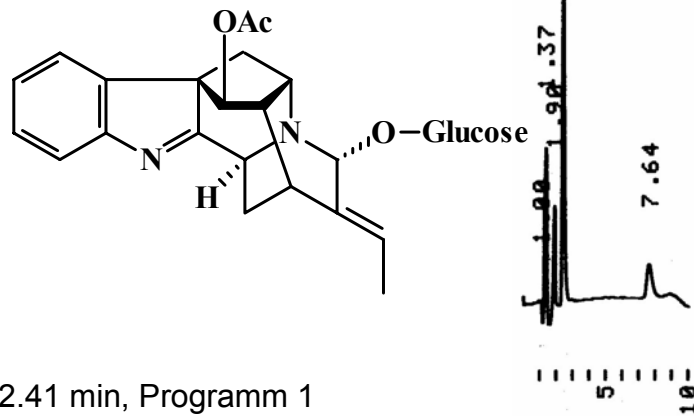


Raucaffricin

Summenformel: $C_{27}H_{32}N_2O_8$

Molekulargewicht: 512.22

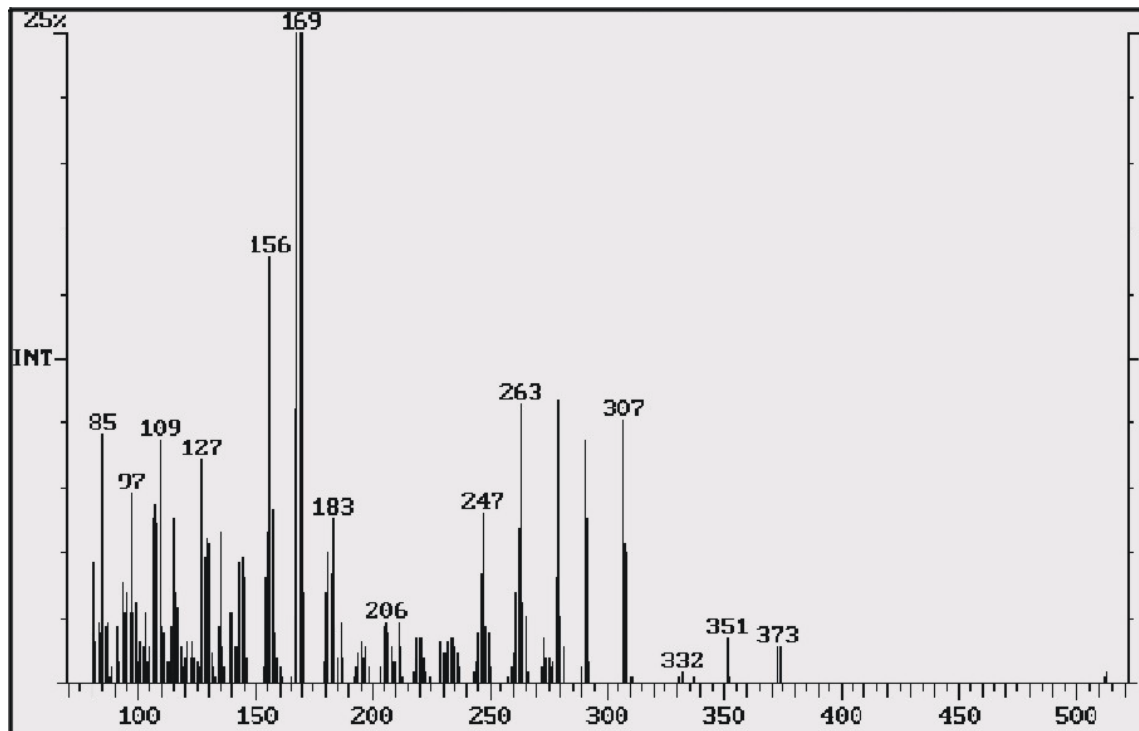
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 2.41 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.27 (FM 1)

EI-MS:

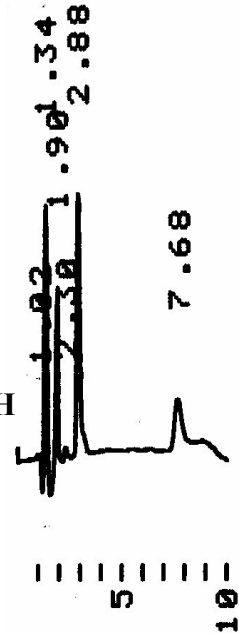
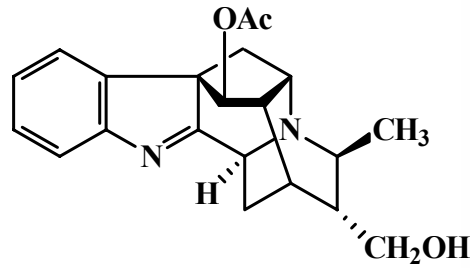


Raucaffrinolin

Summenformel: $C_{21}H_{24}N_2O_3$

Molekulargewicht: 352.43

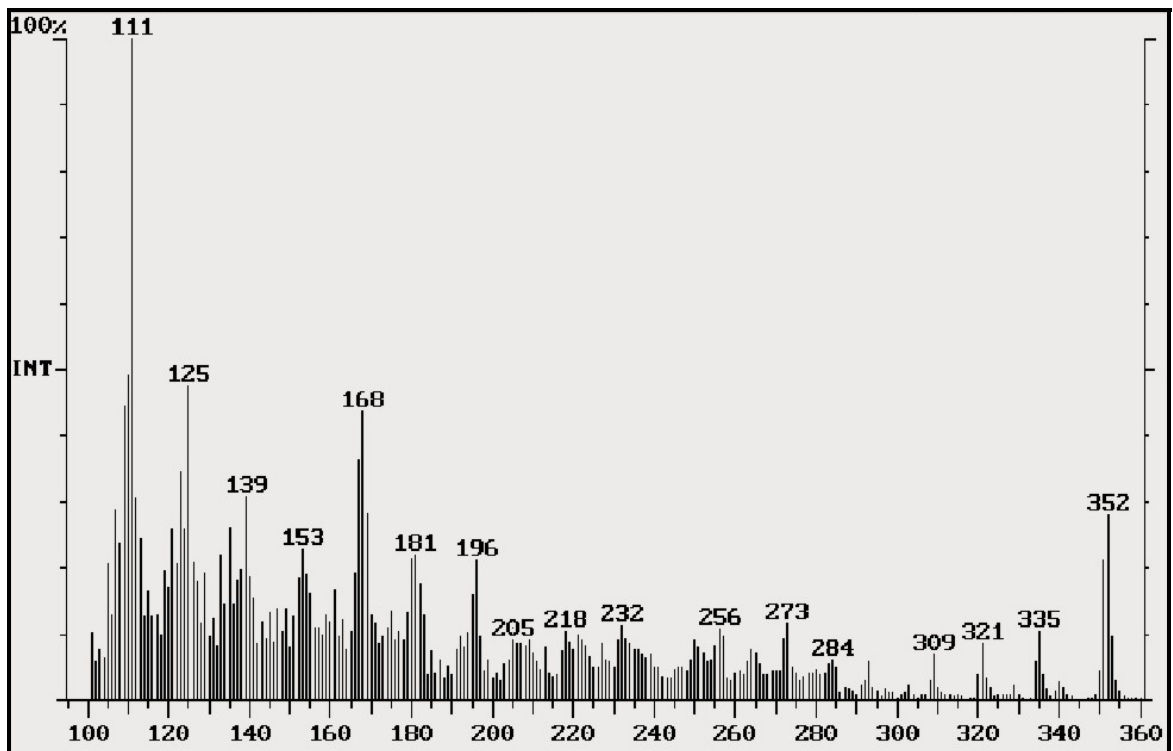
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 2.88 min, Programm 1

R_f -Wert: 0.31 (FM 1); 0.15 (FM 5)

EI-MS:

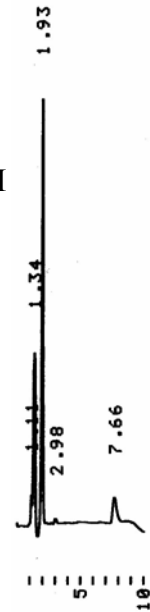
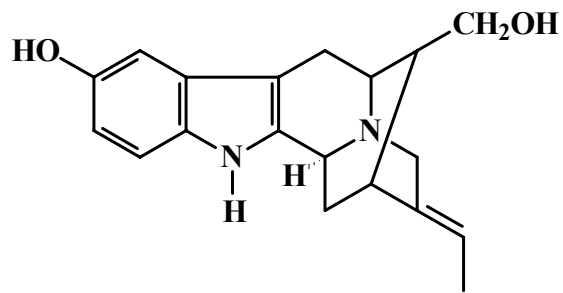


Sarpagin

Summenformel: $C_{19}H_{22}N_2O_2$

Molekulargewicht: 310.14

Strukturformel:

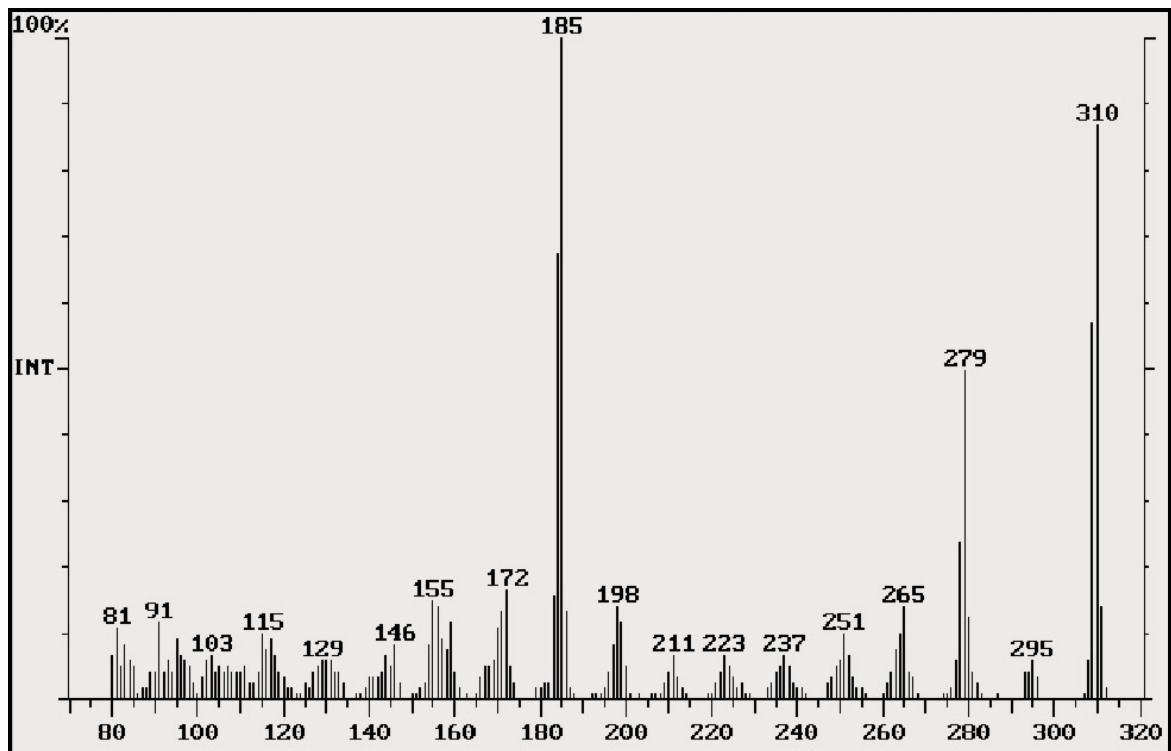


Retentionszeit/HPLC: 1.93 min, Programm

R_f-Wert: 0.1 (FM 1);

Cersulfatfärbung violett

EI-MS:

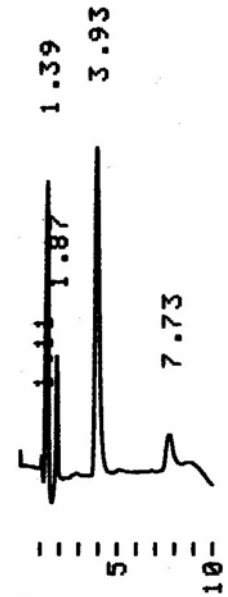
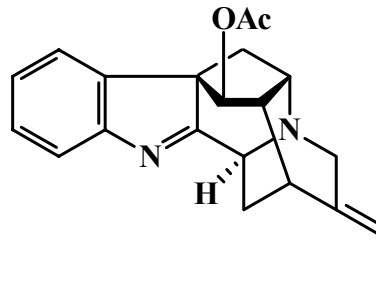


Vinorin

Summenformel: C₂₁H₂₂N₂O₂

Molekulargewicht: 334.41

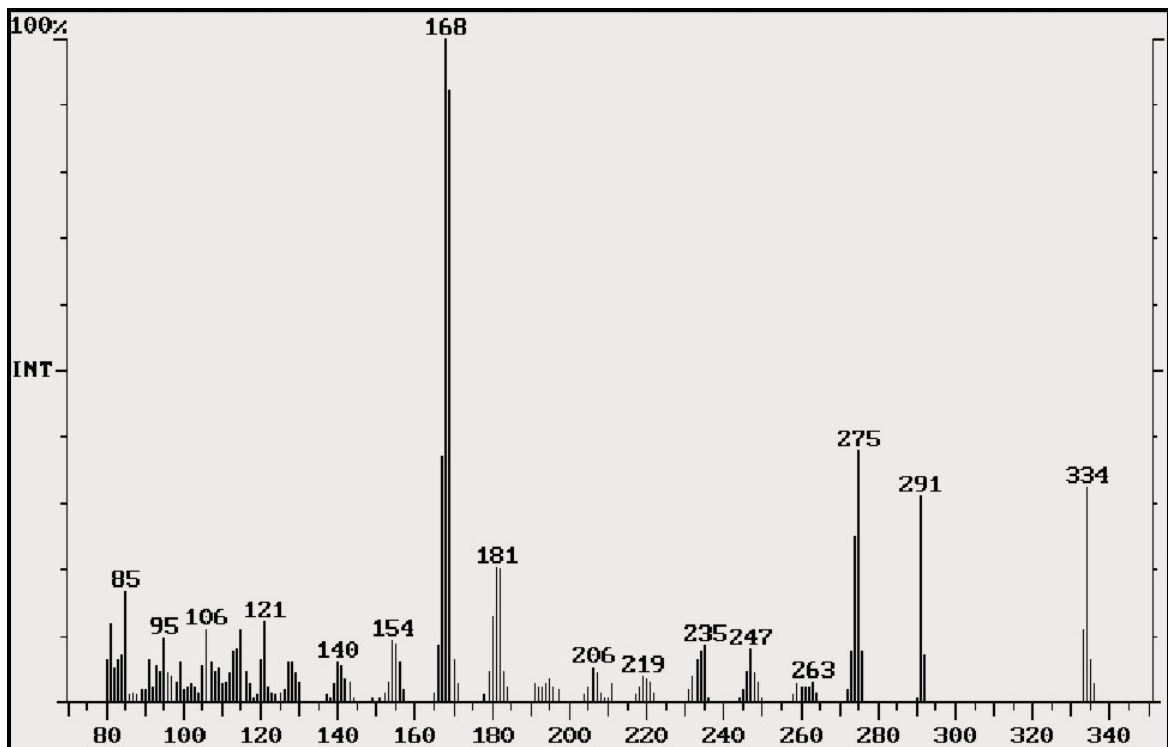
Strukturformel:



Retentionszeit/HPLC: 3.93 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.7 (FM 1); 0.52 (FM 5)

EI-MS:

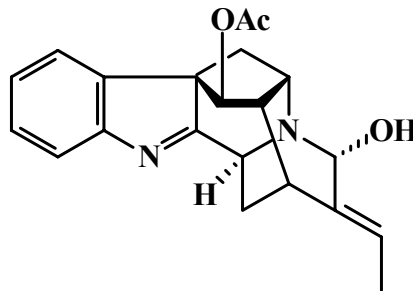


Vomilenin

Summenformel: $C_{21}H_{22}N_2O_3$

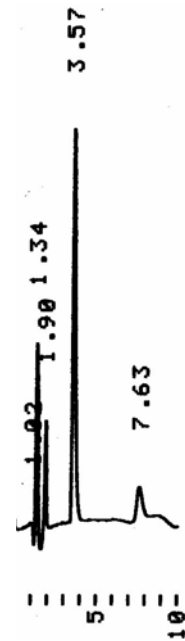
Molekulargewicht: 350.41

Strukturformel:

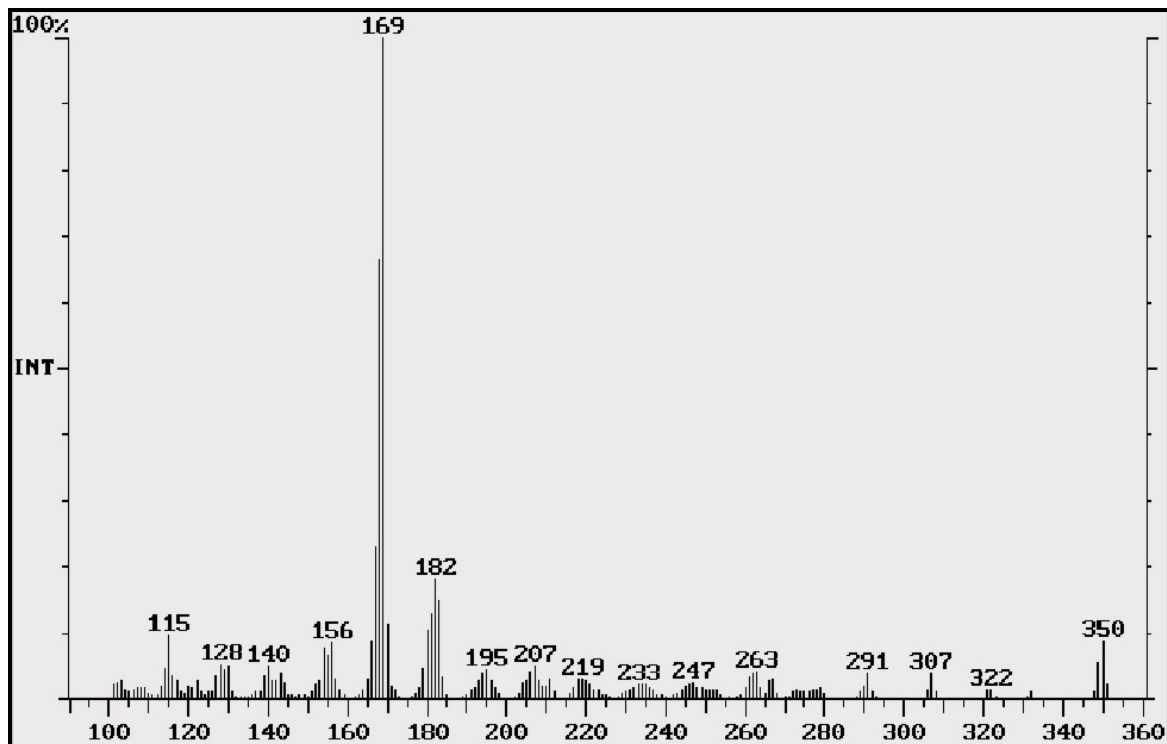


Retentionszeit/HPLC: 3.57 min, Programm 1

R_f-Wert: 0.59 (FM 1)

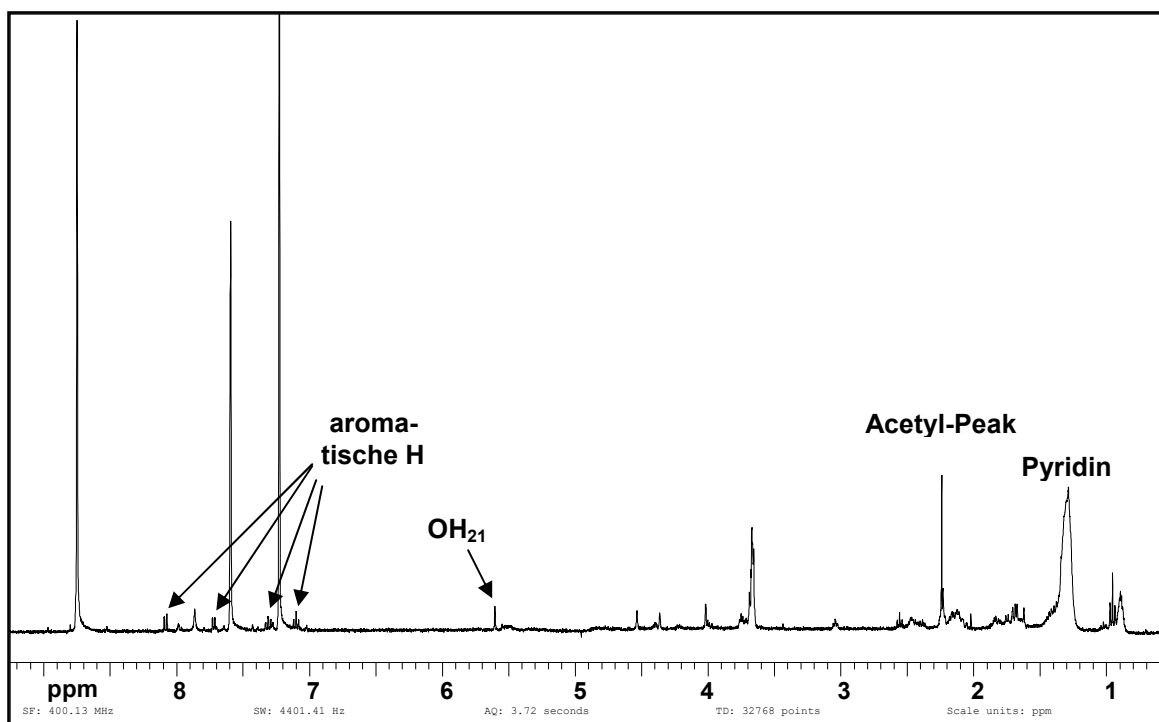


EI-MS:

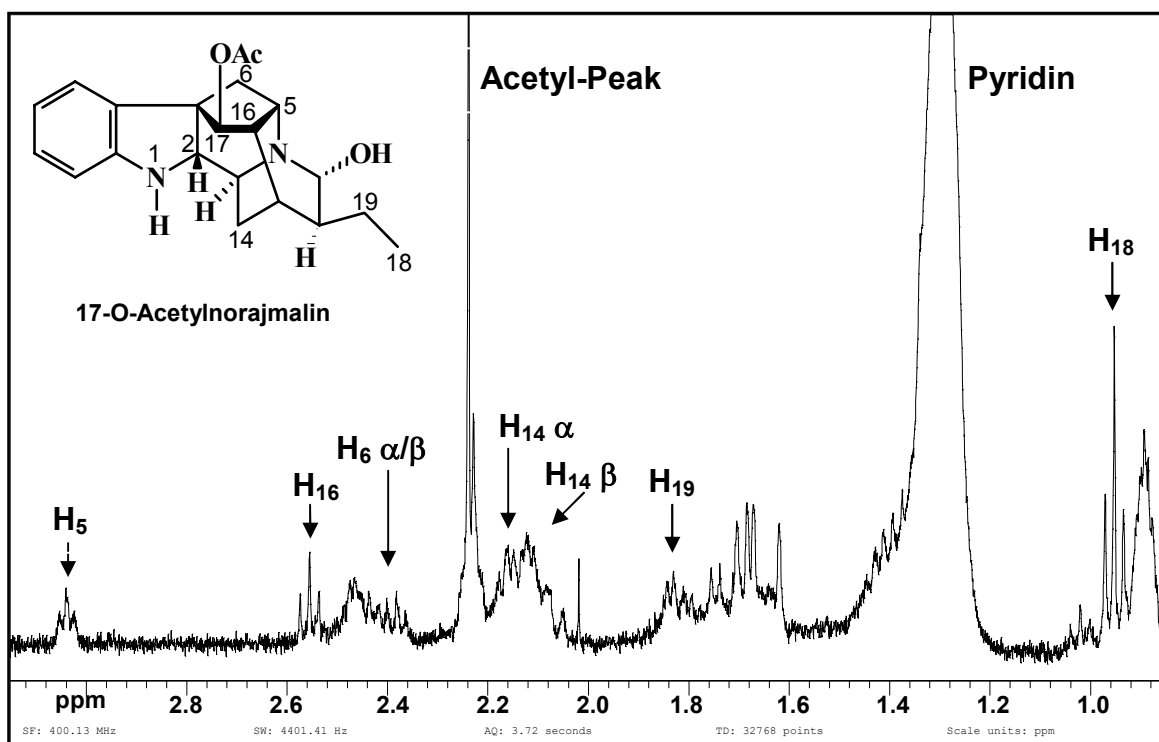


1.3 NMR-Spektren

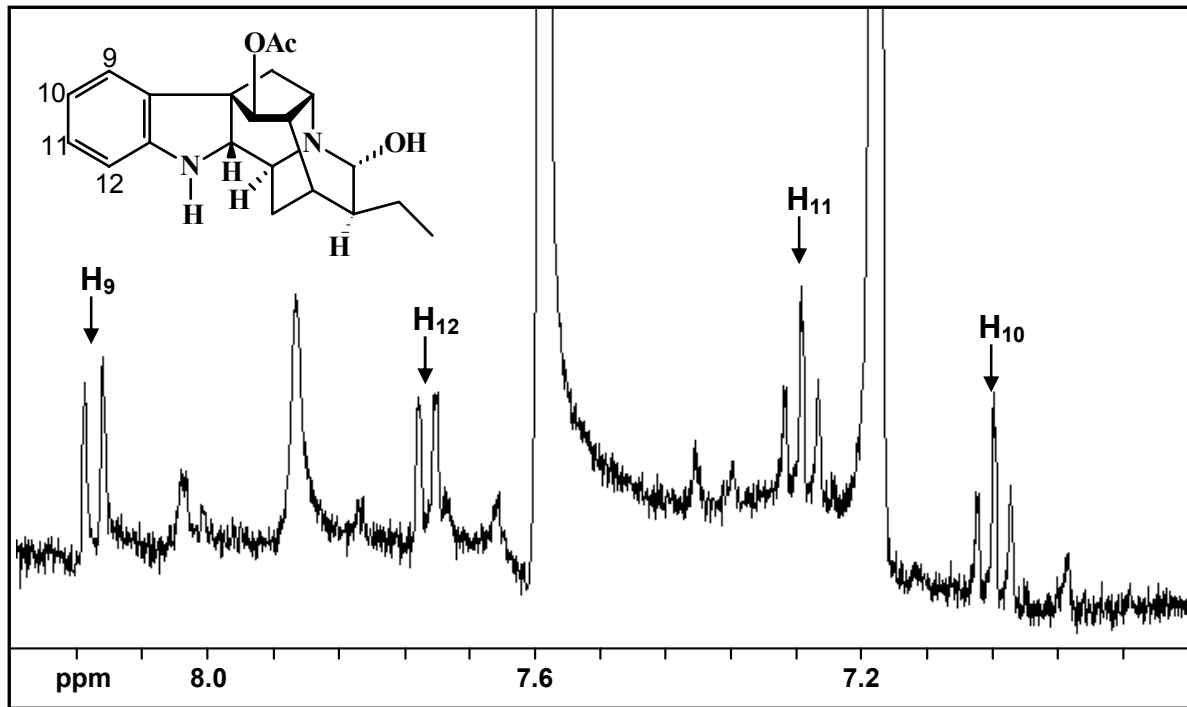
1.3.1 Vollständiges ^1H -NMR-Spektrum von 17-O-Acetylnorajmalin



1.3.2 Teilbereiche des ^1H -NMR-Spektrums des 17-O-Acetylnorajmalins



Hervorgehobener Aromatenbereich des ^1H -NMR-Spektrums des 17-O-Acetylnorajmalins



2 Einteilung der Oxidoreduktasen nach NC-IUBMB

Das "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)" kartiert die Enzyme nach Unterklassen. Alle Oxidoreduktasen bilden die Unterklasse 1, wobei für jedes Enzym nochmals eine Enzym Klassifizierungsnummer (EC - Nummer) erteilt wird.

EC 1	Oxidoreductases
------	-----------------

EC 1.1	Acting on the CH-OH group of donors
EC 1.2	Acting on the aldehyde or oxo group of donors
EC 1.3	Acting on the CH-CH group of donors
EC 1.4	Acting on the CH-NH ₂ group of donors
EC 1.5	Acting on the CH-NH group of donors
EC 1.6	Acting on NADH or NADPH
EC 1.7	Acting on other nitrogenous compounds as donors
EC 1.8	Acting on a sulfur group of donors
EC 1.9	Acting on a heme group of donors
EC 1.10	Acting on diphenols and related substances as donors
EC 1.11	Acting on a peroxide as acceptor
EC 1.12	Acting on hydrogen as donor
EC 1.13	Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen
EC 1.14	Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen
EC 1.15	Acting on superoxide radicals as acceptor
EC 1.16	Oxidising metal ions
EC 1.17	Acting on CH ₂ groups
EC 1.18	Acting on iron-sulfur proteins as donors
EC 1.19	Acting on reduced flavodoxin as donor
EC 1.97	Other Oxidoreductases

3 Sequenzen

3.1 Sequenzen der 43 kDa-Bande

3.1.1 Vollständige cDNA des 43 kDa RACE 1-Klons

Die hier abgebildeten, vollständigen cDNA-Nukleotidsequenzen sind immer in 5' → 3' Richtung angegeben. Die aus ihnen resultierende Aminosäureabfolge ist unter dem jeweiligen Basentriplett im Einbuchstaben-Code angegeben. Grau unterlegt sind sie schon bekannten Sequenzabschnitte nach PCR mit degenerierten Primern. **Weiß auf Schwarz** sind die zur Gewinnung der Vollängklone entwickelten RACE-Primer angegeben.

```

-168 CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAATTCACTACATAATTT
      GGGAGTGTACGTCTGTTGATCGGAGATTGAGATTGTTCTTTTGCTATCTTCGCAGCATTT
      TCTTCCGCAGCCAAAGGCTTCCAGTAGCAGAATCAACTTCTTGCGGCA

1  ATGTCGAAGTCACCAGAAGTTGAGCATCCAGTTAAGGCCTTTGGATGGGCTGCTAGAGAC
      M S K S P E V E H P V K A F G W A A R D 20

61  CCTGCCGGGGTTCTCTCCCCCTTCAATTTTTCCCGGAGGGCTACCGGAGAGCATGACGTG
      P A G V L S P F N F S R R A T G E H D V 40

121 CAGTTCAAAGTTTTGTATTGTGGGATCTGTCACTCTGATCTGCACATGATCAAGAACGAA
      Q F K V L Y C G I C H S D L H M I K N E 60
      |----- Forward-Primer -----|
      |----- Reverse-Primer -----|

181 TGGGGCTTCGCCAAGTATCCCATCGTECCCGGCATGAGATCGTGGGTGAGGTTACGGAG
      W G F A K Y P I V P G H E I V G E V T E 80

241 GTTGGTAGCAAGGTGGAAAAATTC AAGGTCGGGGAAAAAGTAGGAGTGGGTTGCCTGGTA
      V G S K V E K F K V G E K V G V G C L V 100

301 GGATCATGCCGCAAATGTGATATGTGCTCTAATGATCTAGAAAATTACTGTCCTGGACAA
      G S C R K C D M C S N D L E N Y C P G Q 120

361 ATTTTCACATATAGCGCTGCCTACACTGATGGAACCACTACCTATGGAGGCTACTCTAAT
      I F T Y S A A Y T D G T T T Y G G Y S N 140

421 CTCATGATTGCCGATGAACACTGTGTGATTTCGTTGGCCTGAGAATTTGCCTATGGATATT
      L M I A D E H C V I R W P E N L P M D I 160
  
```

481 GCGCTCCTCTGCTTTGTGCTGGAATCACACATACAGTCCATTGAGATACTTTGGACTT
G A P L L C A G I T T Y S P L R Y F G L 180

541 GACAAACCTGGAACACATGTTGGGGTTGTTGGTCTTGGTGGTCTTGGGCATGTAGCATTG
D K P G T H V G V V G L G G L G H V A L 200

601 ATGTTTGCCAAGGCGTTTGGTGCAAAAAGTAACTGTAATAAGCACATCTGAGAGCAAAAAG
M F A K A F G A K V T V I S T S E S K K 220

661 CAGGAAGCCATAGAGAAAGCGGGTGCAGATGCATTCTTGGTCAGTCTCGAACCTGAGCAG
Q E A I E K A G A D A F L V S L E P E Q 240

721 ATGCAGGCTGCAGCTGGCTCTGTGGATGGCATTATCGACACCGTCTCTGCAGTTCACCC
M Q A A A G S V D G I I D T V S A V H P 260

781 GTTATGCCCTGGTAAATTTACTGAAGTCTCATGGCAAGCTTATTCTGGTTGGTGCACCT
V M P L V N L L K S H G K L I L V G A P 280

841 GAAAAGCCACTTGAAC TGCCAGTGTTCCTCCCTTCTCGTTGGGAGGAGAATAATAGCTGGG
E K P L E L P V F P L L V G R R I I A G 300

901 AGTGCTATTGGAGGCTTGAAGGAAACGCAAGAAATGATCGATTTTGCTGCAAAGAACAAC
S A I G G L K E T Q E M I D F A A K N N 320

961 ATTTTGCCGGATGTCGAGCTCATTCCAATGGACTATGTAAACACCGCAATGGAGCGGCTA
I L P D V E L I P M D Y V N T A M E R L 340

1021 CTGAAAGCTGATGTCAAATACAGATTTGTCAATTGACATTGGCAACACATTGAAATCTGCC
L K A D V K Y R F V I D I G N T L K S A 360

1081 TAAGAGATGCTTTGCTATTCAACCAAACTGCCGGTCCGGGGATAGGCCCTTTCTATGTG
STOP

1141 TTTGTTAGCAAGAAGAAGGAAATGTCCGTCATTGGCAGAAGGGTTGCGAATTAGCTTC

1201 GTCTTTGTTTAAAGACGACGAAAATTCGAATTGGTCTTGTATTGTTCCATTGTTATATAC

1261 GAGGCATAACTACATCGTGCTATATTGGTGTAGTTCTATTGCCACACTTGTGCACTGAAA

1321 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCG

1381 TTGACAGC

3.1.2 Vollständige cDNA des 43 kDa RACE 2-Klons

Die hier abgebildeten, vollständigen cDNA-Nukleotidsequenzen sind immer in 5' → 3' Richtung angegeben. Die aus ihnen resultierende Aminosäureabfolge ist unter dem jeweiligen Basentriplett im Einbuchstaben-Code angegeben. Grau unterlegt sind sie schon bekannten Sequenzabschnitte nach PCR mit degenerierten Primern. **Weiß auf Schwarz** sind die zur Gewinnung der Vollängenklone entwickelten RACE-Primer angegeben.

```

-158 CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAACACTACATGAAGTGTAC
      CTCTGTTGATCGGAGATTGAGATTGTTCTTTTCGCTATCTTCGCAACATTTTCCTCCGCAG
      CCAAAGGCTTCCAGTAGCAGAATCAAGTTCTTGCGGCA

  1  ATGGCGAAGTCACCAGAAGTTGAGCATCCAGTTAAGGCCTTTGGATGGGCTGCTAGAGAC
      M A K S P E V E H P V K A F G W A A R D  20

      CCTGCCGGGGTTCTCTCCCCCTTCAATTTTTCCCGAAGGGCTACCGGAGAGCATGACGTG
  61  P A G V L S P F N F S R R A T G E H D V  40

      CAGTTCAAAGTTTTGTATTGTGGGATCTGTCACTCTGATCTGCACATGATCAAGAACGAA
  121  Q F K V L Y C G I C H S D L H M I K N E  60
      Genutzter Sequenzbereich zur Ableitung
      des RACE Forward- und Reverse-Primers
  181  TGGTCTTCCACCAAGTATCCCATTTGTCCTGGGCATGAGATCGTGGGTGAGGTTACGGAG
      W C F T K Y P I V P G H E I V G E V T E  80

      GTTGGTAGCAAGGTGGAAAAATTCAAGGTTGGGGATAAAGTAGGAGTGGGTTGCCTTGTA
  241  V G S K V E K F K V G D K V G V G C L V  100

      GGATCATGCCGCAAATGTGATATGTGCTCTAATGATCTAGAAAATTACTGTCTCTGGACAA
  301  G S C R K C D M C S N D L E N Y C P G Q  120

      ATTCTCACATATAGCGCTACCTACACTGATGGAACCACTACCTATGGAGGCTACTCTAAT
  361  I L T Y S A T Y T D G T T T Y G G Y S N  140

      CTTATGGTTGCCGATGAACACTTCGTGATTTCGTTGGCCTGAGAATTTGCCTATGGATATT
  421  L M V A D E H F V I R W P E N L P M D I  160

      GCGCTCCTCTGCTCTGTGCTGGAATCACAAACATACAGTCCATTGAGATACTTTGGACTT
  481  G A P L L C A G I T T Y S P L R Y F G L  180

```

541 GACAAACCTGGAACACATGTTGGGGTTGTTGGTCTTGGTGGTCTTGGCCATGTAGGAGTG
D K P G T H V G V V G L G G L G H V G V 200

601 AAGTTTGCCAAGGCGTTTGGTGCAAAAGTAACTGTAATGAGCACATCTGAAAGCAAAAAG
K F A K A F G A K V T V M S T S E S K K 220

661 CAGGAAGCCATAGAGAACTTGGTGCAGATGCATTCTTGGTCAGTCGCGACCCTGAGCAG
Q E A I E K L G A D A F L V S R D P E Q 240

721 ATGCAGGCTGCAGCTGGCTCTATGGATGGCATTATCGACACCGTCTCTGCAGTTCACCCT
M Q A A A G S M D G I I D T V S A V H P 260

781 GTTATGCCCCCTGGTAAATTTACTGAAGTCTCATGGCAAGCTTATTCTGGTTGGTGCACCT
V M P L V N L L K S H G K L I L V G A P 280

841 GAAAAGCCACTTGAAC TGCCAGTGTTCCTTCTCGTTGGGAGGAGAATAATAGCTGGG
E K P L E L P V F P L L V G R R I I A G 300

901 AGTGCTATTGGAGGCTTGAAGGAAACGCAAGAAATGATCGATTTTCTGCAAGAACAAC
S A I G G L K E T Q E M I D F A A K N N 320

961 ATTTTGCCGGATGTCGAGCTCATTCCAATGGACTATGTAAACACCGCAATGGAGCGGCTA
I L P D V E L I P M D Y V N T A M E R L 340

1021 CTGAAAGCTGATGTCAAATACAGATTTGTCATTGACCTTGGTAACACATTGAAATCTGCC
L K A D V K Y R F V I D L G N T L K S A 360

1081 TAGGAGATGCTTAGCTATTCAACCAAAACTGCCTGTCCGGTGATAGGCCCTTTCTCTGTG
STOP

1141 TTTTGTAGCGAGAAGAAAAGGAAATGTCTGTCGTTGGCGGAAGAGTTGCGAATTAGCTT

1201 TGTTTTTGTAAAGACGACAAAATTTATGTCCTTGTACATAAGTGGCATAACTATA

1261 TCAGGATATATTGGTGTGTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCATGCCGTT

1321 ACGTAGCGTATCGTTGACAGC

3.2 Vollständige cDNA des 48 kDa-Klons

Die hier abgebildete, vollständige cDNA-Nukleotidsequenz ist in 5' → 3' Richtung angegeben. Die daraus resultierende Aminosäureabfolge steht im Einbuchstaben-Code unter dem jeweiligen Basentriplett. Grau unterlegt sind sie schon bekannten Sequenzabschnitte nach PCR mit degenerierten Primern. **Weiß auf Schwarz** sind die zur Gewinnung der Vollängenklone entwickelten RACE-Primer angegeben.

```

-168 CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAATCAAAGAAAATAAT
      GAACTTCGTCGTACATCAAGTCATCCCCGGAGTCCTCAAAGTTAGCAAAAATTTTTTT
      TTGGTGAATAAGACGCATTATTGTCTTGAATTTAAAAATCAGAACTTTTGTATCTTTCAT
      TACAATTA
1   ATGCGTTTTCGCTAACTTTGAGGGCTCCAATTATTATTGTATTGACACCACTCCTTATTCT
      M R F A N F E G S N Y Y C I D T T P Y S 20

61  TCTTCTGCTCTGTGTATGTGTATGATTATCTCATTCTCAAATCACTACTTTGTGATCAGT
      S S A L C M C M I I S F S N H Y F V I S 40

121 TTTCCCTCATTCTCTCGTTTTGTATTGAAATGGCTGGAAAGTCTCCAGAAGAGCAACAC
      F P S F S R F V F E M A G K S P E E Q H 60

181 CCAGTTAAGGCGTATGGGTGGGCGGCGAGGGACTCATCTGGGATTCTTCTCCCTTCAAG
      P V K A Y G W A A R D S S G I L S P F K 80

241 TTCTCCAGAAGGGCAACAGGTGATCATGATGTCAGAGTAAAGATTCTCTACGCTGGTGTT
      F S R R A T G D H D V R V K I L Y A G V 100

301 TGTCAATTCTGACCTTCAATCTGCCAGGAATGACATGGGCTGCTTTACATATCCTCTTGTG
      C H S D L Q S A R N D M G C F T Y P L V 120

Reverse-Primer RACE
361 CCCGGGTTTCGAGACGGTAGGCATAGCGACTGAAGTAGGAAGCAAGGTCACAAAAGCGAGA
      P G F E T V G I A T E V G S K V T K A R 140

421 GTCGGCGATAAAGTTGCAGTGGGAATCATGGTGGGATCATGCGGCAAATGCCACGAGTGC
      V G D K V A V G I M V G S C G K C H E C 160

481 GTCAATGACCATGAATGTTACTGCCAGAGGTGATCACATCTTATGGTCGAATGTACCAT
      V N D H E C Y C P E V I T S Y G R M Y H 180

541 GATGGAACCTCCACTTACGGAGGTTTCTCCAATGAGACAGTAGTGAGTGAGAAATTCGTT
      D G T P T Y G G F S N E T V V S E K F V 200

```


601 TTTCGTTTTCTGAAAACTTCCAATGGCTGCTGGTGTCCACTGCTCAGTGTGGAGTC
 F R F P E K L P M A A G A P L L S A G V 220

661 TCTGTGTACAGTGCAATGAGATTTTATGGCCTGGATAAGCCAGGGATGCACCTGGGAGTT
 S V Y S A M R F Y G L D K P G M H L G V 240

721 GTAGGGCTTGGTGGACTTGGTCATTTAGCGGTCAAGTTCGCCAAGGCTTTTGGGGTCAAA
 V G L G G L G H L A V K F A K A F G V K 260

781 GTCACTGTGATTAGTACCTCTACAAGCAAGAAGGATGAAGCTATCAATGATCTTGGCGCT
 V T V I S T S T S K K D E A I N D L G A 280

841 GATGCATTCTTGGTCAGTACTGATGCTGAACAAATGCAGGCTGGCTCTGGAACCTTGGAT
 D A F L V S T D A E Q M Q A G S G T L D 300

Forward-Primer RACE

901 GGAATTCTTGACACCGTACCTGTTGTCCATCCTATTGGGGCCCTGCTAGGTCTACTGAAG
 G I L D T V P V V H P I G A L L G L L K 320

961 AATCACACGAAGCTTGTATTGGTGGGAGCTACAATGGGCTCATTGAGTTGCCAATTCTT
 N H T K L V L V G A T M G S F E L P I L 340

1021 CCTTTAGGAGTGGGCAGGAAAAGTGTGGTTTCAACTATTGGAGGAAGTACGAAGGAGACT
 P L G V G R K S V V S T I G G S T K E T 360

1081 CAAGAGATGCTCGATTTTGCAGCAGAACACGATATCACCGCCAATGTTGAGGTTATTCCG
 Q E M L D F A A E H D I T A N V E V I P 380

1141 ATGGACTATATAAATACAGCAATGGAACGCATTGAGAAGCGCGATGTTTCGATATCGATTT
 M D Y I N T A M E R I E K R D V R Y R F 400

1201 GTGATTGACATCGGCAACACCTTAACTCCACCTGAGTCCTAAAGTAGAGATCATAAAGCG
 V I D I G N T L T P P E S STOP 413

1261 TGAGAGAGATCGAGAGATGCAAATAAGACTGTTTCATTCTCTTTCTTTTTTCTTTCCGAG

1321 AGAGAATTAAGAGAGTTTGTATTTGTCTGTGTGTGCCTAAAGTAGCATGATTGTTCT

1381 AAGAACCAAAGATTCTTGGGTACAATTTGAAATAAATAACCCAAATCCTTGAGTTTTCCC

1441 AATGCAAGCAAGATTACACTTTCCTTCTTGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACA

1501 CTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAGC

VIII Literaturverzeichnis

ACHELIS JD, KRONEBERG G. Die Wirkung von Gesamtalkaloiden der *Rauwolfia serpentina* und von Reserpin am Hundebloodruck. *Arzneim.-Forsch.*, 1955; 5: 204 – 208

ACHELIS JD, KRONEBERG G. Neue Alkaloide aus *Rauwolfia serpentina*. *Naturwissenschaften*, 1953; 40: 342 / 625

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Der Zellkern. In: *Molekularbiologie der Zelle*. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Eds.; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1986: 453

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 1990; 215: 403 - 410

AREND J, WARZECHA H, HEFNER T, STÖCKIGT J. Utilizing Genetically Engineered Bacteria to Produce Plant-Specific Glucosides. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001; 76: 126 – 131

AUSUBEL FM. Phenol/SDS Method for Plant RNA Preparation. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Eds.; Volume 1, Greene and Wiley, New York, 1994

BAIROCH A. The Enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res.*, 2000; 28: 304 – 305

BIRNBOIM HC, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1979; 7: 1513 – 1523

BOECKMANN B, BAIROCH A, APWEILER R, BLATTER MC, ESTREICHER A, GASTEIGER E, MARTIN MJ, MICHOD K, O'DONOVAN C, PHAN I, PILBOUT S, SCHNEIDER M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 365 – 370

BRADFORD MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248 – 254

BRILL EM, ABRAHAMS S, HAYES CM, JENKINS CL, WATSON JM. Molecular characterization and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamoyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne. *Plant Mol. Biol.*, 1999; 41: 279 – 291

BRINKMANN U, MATTES RE, BUCKEL P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, 1989; 85: 109 – 114

BRODIE BB, SHORE PA, PLETSCHER A. Serotonin-Releasing Activity Limited to *Rauwolfia* Alkaloids with Tranquilizing Action. *Science*, 1956; 123: 992 – 998

BRÜCKMANN M. Aufnahme und Metabolisierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden durch Ithomiiden sowie Untersuchungen zur enzymatischen Bildung von Salicylaldehyd im Wehrsekret von Chrysomeliden. Dissertation an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2002; 6

BRÜNKER P, ALTENBUCHNER J, KULBE KD, MATTES R. Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1351: 157 – 167

BUCHER P, BAIROCH A. A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. ISMB-94. Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R, Brutlag D, Karp P, Lathrop R, Searls D. Eds; AAAIPress, Menlo Park, 1994: 53 – 61

BULLOCK WO, FERNANDEZ JM, SHORT JM. XL1-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA Escherichia coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection. *BioTechniques*, 1987; 5: 376 – 378

CHENCHIK A, DIACHENKO L, MOQADAM E, TARABYKIN V, LUKYANOV S, SIEBERT PD. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adapter-ligated cDNA. *Biotechniques*, 1996; 21: 526 – 534

CHURCH GM, GILBERT W. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 1991 – 1995

CLEVELAND DW, FISCHER SG, KIRSCHNER MW & LAEMMLI UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 1977; 252: 1102 – 1106

COTTER RJ. Time-of-Flight Mass Spectrometry for Structural Analysis of Biological Molecules. *Anal. Chem.*, 1992; 64: 1027 – 1039

COURT WE, IWU MM. Chromogenic Reactions of *Rauwolfia* Alkaloids after Separation by Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr.*, 1980; 187: 199 – 207

COURT WE. Alkaloid Distribution in Some African *Rauwolfia* Species. *Planta Med.*, 1983; 48: 185-194

CRANSTON WI, JUEL-JENSEN BE, DE J. LEE G. Comparison of the Effects of three *Rauwolfia* Alkaloids in Hypertension. *Brit. Med. J.*, 1961; 1: 950 – 951

CROWE J, DÖBELI H, GENTZ R, HOCHULI E, STÜBER D, HENCO K. 6 × His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.*, 1994; 31: 371 – 387

DEUS-NEUMANN B, ZENK MH. Instability of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Planta Med.*, 1984; 50: 427 – 431

DOGRU E, WARZECHA H, SEIBEL F, HAEBEL S, LOTTSCHEICH F, STÖCKIGT J. The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the α/β hydrolase super family. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 1397 – 1406

DOTTO GP, HORIUCHI K, ZINDER ND. The functional origin of bacteriophage ϕ 1 DNA replication. Its signals and domains. *J. Mol. Biol.*, 1984; 172: 507 – 521

DRÄGER B, HASHIMOTO T, YAMADA Y. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. *Agric. Biol. Chem.*, 1988; 52: 2663 – 2667

ESDORN I, SCHMITZ H. Pharmazeutisch bedeutsame *Rauwolfia*-Arten. *Die Pharmazie* 1956; Heft 1 (11. Jahrgang): 50 – 63

FALKENHAGEN H, POLZ L, TAKAYAMA H, KITAJIMA M, SAKAI S, AIMI N, STÖCKIGT J. Substrate Specificity of Vinorine Hydroxylase, a novel Membrane-bound Key Enzyme of *Rauwolfia* Indole Alkaloid Biosynthesis. *Heterocycles*, 1995; 41: 2683 – 2690

FALKENHAGEN H, STÖCKIGT J. Enzymatic Biosynthesis of Vomilenine, a Key Intermediate of the Ajmaline Pathway, Catalyzed by a Novel Cytochrome P450-Dependent Enzyme from Plant Cell Cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Z. Naturforsch.*, 1995; 50c: 45 – 53

FALQUET L, PAGNI M, BUCHER P, HULO N, SIGRIST CJ, HOFMANN K, BAIROCH A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.*, 2002; 30: 235 – 238

FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.*, 1983; 132: 6 – 13

GAO S, VON SCHUMANN G, STÖCKIGT J. A newly-detected reductase from *Rauwolfia* closes a missing gap in the biosynthesis of the antiarrhythmic alkaloid ajmaline. *Planta Med.*, 2002; 68: 906 – 911

GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, MA X, STÖCKIGT J. Heterologous expression of a *Rauwolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 2204 – 2213

GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, MA X, STÖCKIGT J. Heterologous expression of a *Rauwolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to about 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 2204 – 2213

GORMAN M, BURLINGAME AL, BIEMANN K. Application of Mass Spectrometry to

Structure Problems. The Structure of Quebrachidine. *Tetrahedron Lett.*, 1963; 1: 39 – 46

HAHLBROCK K, GRISEBACH H. Biosynthesis of flavonoids. In: *The flavonoids*. Mabry TJ, Mabry H. Eds.; Chapman and Hall, London, 1975: 866

HAHLBROCK K, GRISEBACH H. Enzymic Controls in Biosynthesis of Lignin and Flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1979; 30: 105 – 130

HANAHAN D. Techniques for Transformation of *E. coli*. In: *DNA Cloning Volume I – A Practical Approach*. Glover DM. Ed.; IRL Press, Oxford – Washington D.C., 1985

HÄNSEL R, HENKLER G. In *Hagers Handbuch*; 5.Auflage, Band 6, 1994: 361 – 384

HARTMANN T, OBER D. Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: *Biosynthesis II Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*. Leeper FJ, Vederas J. Eds.; Top. Curr. Chem., Springer Verlag, Heidelberg, 2000; 209: 207 – 243

HARTMANN T. Diversity and Variability of Plant Secondary Metabolism: a Mechanistic View. *Entomol. Exp. Appl.*, 1996; 80: 177 – 188

HEFNER T, AREND J, WARZECHA H, SIEMS K, STÖCKIGT J. Arbutin Synthase, a Novel Member of the NRD1 β Glycosyltransferase Family, is a Unique Multifunctional Enzyme Converting Various Natural Products and Xenobiotics. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002; 10: 1731 – 1741

HEFNER T. Charakterisierung einer neuen Glucosyltransferase aus *Rauwolfia serpentina*. Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Fachbereich für Chemie und Pharmazie, 2002;

HEUKESHOVEN J, DERNICK R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 1985; 6: 103 – 112

HIBINO T, SHIBATA D, CHEN JQ, HIGUCHI T. "Cinnamoyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata*: cloning of the cDNA and expression of the gene in lignified tissues." *Plant Cell Physiol.*, 1993; 34: 659 – 665

HOCHULI E, DÖBELI H, SCHACHER A. New metal chelate absorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.*, 1987; 411: 177 – 184

HOFMANN A. Die Isolierung weiterer Alkaloide aus *Rauwolfia serpentina* Benth. *Helv. Chim. Acta*, 1954; 37: 849 – 865

JORNVALL H, HOOG JO, PERSSON B. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.*, 1999; 445: 261 – 264

KALLBERG Y, OPPERMAN U, JORNVALL H, PERSSON B. Short-chain

dehydrogenases/ reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. Eur. J. Biochem., 2002; 269: 4409 – 4417

KARAS M, BAHR U. Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules. Trends Anal. Chem., 1990; 9: 321 – 325

KERSTEIN G. Zur Geschichte der *Rauwolfia*. Planta Med., 1957; Heft 5/6 (5. Jahrgang): 131 – 134

KLEINSORGE H. Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des *Rauwolfia*-Alkaloids Ajmalin bei Herzrhythmus-Störungen, insbesondere bei Extrasystolie. Med. Klin., 1959; 54: 409 – 412

KLENOW H, HENNINGSEN I. Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Escherichia coli* B by limited Proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970; 65: 168 – 175

KOELEN KJ, GROSS GG. Partial Purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. Planta Med., 1982; 44: 227 – 230

KREIS W, REINHARD E. The Production of Secondary Metabolites by Plant Cells Cultivated in Bioreactors. Planta Med., 1989; 55: 409 – 416

KRONEBERG G. Pharmakologie der *Rauwolfia*. Planta Med., 1957; Heft 5/6 (5. Jahrgang): 156 – 165

KRONEBERG G. Pharmakologie des *Rauwolfia*-Alkaloids Raubasin (delta-Yohimbin-Ajmalicin). Arch. exp. Path. Pharmacol., 1958; 233: 72 – 97

KRONEBERG G. Reserpinin, ein neues Alkaloid aus *Rauwolfia serpentina* Benth. Naturwissenschaften, 1954; 41: 215

KUTCHAN TM, HAMPP N, LOTTSPEICH F, BEYREUTHER K, ZENK MH. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. FEBS Lett., 1988; 237 (1-2): 40 – 44

KUTCHAN TM. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli*. FEBS Lett., 1989; 257 (1): 127 – 130

LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680 – 685

LEMLI J. Botanik der *Rauwolfia* unter besonderer Berücksichtigung der medizinisch wichtigen Arten. Planta Med., 1957; Heft 5/6 (5. Jahrgang): 135 – 144

LINSMAIER EM, SKOOG F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco

Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 1965; 18: 100 – 127

LUKACIN R, SPRINGOB K, URBANKE C, ERNWEIN C, SCHRÖDER G, SCHRÖDER J, MATERN U. Native acridone synthase I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. *FEBS Lett.*, 1999; 449: 135 – 140

MALHOTRA CL, PRASAD K. Effect of Chlorpromazine and Reserpine on the Catecholamine Content of Different Areas of the Central Nervous System of the Dog. *Brit. Pharmacol.*, 1962; 18: 595 – 599

MEIER A. Synthese von Chlorinen für die Photodynamische Tumortherapie. Dissertation an der Universität Bremen. Fachbereich für Biologie und Chemie, 1992;

MEYERS TS, LAMBERTS BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965; 107: 144 – 145

MÜLLER JM, SCHLITTLER E, BEIN HJ. *Experientia*, 1952; 8: 388

MUTSCHLER E. In: Mutschler Arzneimittelwirkungen; Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Eds.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 8. Auflage, 2001: 542 – 551

NAGAKURA N, RUEFFER M, ZENK MH. The Biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids from strictosidine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1979; 1: 2308 – 2312

NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Supplement. Eur. J. Biochem.*, 1999; 264: 610 – 650

NEIDLE E, HARTNETT C, ORNISTON N, BAIROCH A, REKIK M, HARAYAMA S. Cis-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWVO plasmid xylL gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benD gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Eur. J. Biochem.*, 1992; 204: 113 – 120

NELSON DR. Mining databases for cytochrome P450 genes. *Methods Enzymol.*, 2002; 357: 3 – 15

NIELSEN H, SOREN B, VON HEIJNE G. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.*, 1999; 12: 3 – 9

NORDLING E, JORNVALL H, PERSSON B. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 4267 – 4276

NORDLING E, PERSSON B, JORNVALL H. Differential multiplicity of MDR alcohol

dehydrogenases: enzyme genes in the human genome versus those in organisms initially studied. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 1070 – 1075

OBER D, HARTMANN T. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 14777 – 14782

OHTA S, YATAZAWA M. Growth and alkaloid production in callus tissues of *Rauwolfia serpentina*. *Agric. Biol. Chem.*, 1979; 43: 2297 – 2303

ORNSTEIN L. Disk Elektrophoresis I, Background and Theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964; 121: 321 – 349

PAWELKA KH, STÖCKIGT J. Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Tabernaemontana divaricata* and *Tabernanthe iboga*. *Plant Cell Reports*, 1983; 2: 105 – 107

PEARSON WR, LIPMAN DJ. Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 2444 – 2448

PERRY RP. RNA processing comes of age. *J. Cell Biol.*, 1981; 91: 28 – 38

PFITZNER A, POLZ L, STÖCKIGT J. Properties of Vinorine Synthase – the *Rauwolfia* Enzyme involved in the Formation of the Ajmaline Skeleton. *Z. Naturforsch.*, 1986; 41c: 103 – 114

PFITZNER A, STÖCKIGT J. Characterization of Polyneuridine Aldehyde Esterase, a Key Enzyme in the Biosynthesis of Sarpagine/Ajmaline Type Alkaloids. *Planta Med.*, 1983; 48: 221 – 227

PFITZNER A, STÖCKIGT J. Partial Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 1982; 21: 1585 – 1588

PFITZNER A. Die Biosynthese der *Rauwolfia*-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin. Dissertation an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1984; 43 – 53

POLZ L, SCHÜBEL H, STÖCKIGT J. Characterization of 2 β -(R)-17-O-Acetyljmalan: Acetylerase – a Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia* Alkaloid Ajmaline. *Z. Naturforsch.*, 1987; 42c: 333 – 342

POLZ L. Biosynthese von *Rauwolfia*-Alkaloiden: Vom Vinorin zum Ajmalin. Dissertation an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1989;

RAMAGE P, HEMMING R, MATHIS B, COWAN-JACOB SW, RONDEAU JM, KALLEN J, BLOMMERS MJJ, ZURINI M, RÜDISSE S. Snags with tags: Some observations made with (His)₆-tagged proteins. *Amersham Biosciences*, 2002; *Life Science News* 11

RINALDI F, HIMWICH HE. A Comparison of Effects of Reserpin and some

Barbiturates on the Electrical Activity of Cortical and Subcortical Structures of the Brain of Rabbits. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1955; 61: 27 – 35

ROTHE G. Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* (L.). Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, 2002;

RUEFFER M, NAGAKURA N, ZENK MH. Strictosidine, the common precursor for monoterpenoid indole alkaloids with 3 α and 3 β configuration. Tetrahedron Lett., 1978; 1593 – 1596

RUPPERT M. Cytochrom P450-Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus *Rauwolfia serpentina*. Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Fachbereich für Biologie, 2001;

RUYTER CM, STÖCKIGT J. Enzymatic formation of raucaffricine, the major indole alkaloid of *Rauwolfia serpentina* cell-suspension cultures. Helv. Chim. Acta, 1991; 74: 1707 – 1712

SAHU BN. In “*Rauwolfia serpentina*-Sarpagandha”. Today’s and Tomorrow’s Printers and Publishers, New Dehli, 1979; Vol.I: 326

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science, 1988; 239: 487 – 491

SALINOVICH O, MONTELARO RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 1986; 156: 341 – 347

SAMANANI N, FACCHINI PJ. Purification and Characterization of Norcoclaurine Synthase. J. Biol. Chem., 2002; 277: 33878 – 33883

SAMBROOK J, RUSSEL DW. Molecular Cloning – A Laboratory Manual (Volume 1-3). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANGER F, NICKLEIN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977; 74: 5463 – 5467

SCHENK PM, BAUMANN S, MATTES R, STEINBIß HH. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA Polymerase and rare ^{Arg}tRNAs. Biotechniques, 1995; 19: 196 – 198, 200

SCHMIDT D, STÖCKIGT J. Enzymatic Formation of the Sarpagan-Bridge, a Key Step in Ajmaline Biosynthesis. Planta Med., 1995; 61: 254 – 258

SCHRÖDER J. The family of chalcone synthase-related proteins: functional diversity and evolution. Rec. Adv. Phytochem., 2000; 34: 55 – 89

SCHÜTZ W. In: Pharmakologie und Toxikologie; Forth W, Henschler D, Rummel

W, Starke K. Eds.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 7. Auflage, 1998: 363 – 380

SHAPIRO AL, VIÑUELA E, MAIZEL JV. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1967; 28: 815 – 820

SIDDIQUI S, SIDDIQUI RH. Chemical Examination of the Roots of *Rauwolfia Serpentina* Benth. *J. Indian Chem. Soc.*, 1931; 8: 667 – 681

SIDDIQUI S, SIDDIQUI RH. The Alkaloids of *Rauwolfia Serpentina*, Benth. Part I. *J. Indian Chem. Soc.*, 1932; 9: 539 – 544

SIDDIQUI S, SIDDIQUI RH. The Alkaloids of *Rauwolfia Serpentina*, Benth. Part II. *J. Indian Chem. Soc.*, 1935; 12: 37 – 47

SOMSSICH I, WERNERT P, KIEDROWSKI S, HAHNBROCK K. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 14199 – 14203

SPANJAARD RA, CHEN K, WALKER JR, VAN DUIN J. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to *argU* tRNA and T4 tRNA^{Arg}. *Nucleic Acids Res.*, 1990; 18: 5031 – 5035

STÖCKIGT J, PFITZNER A, FIRL J. Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Plant Cell Reports*, 1981; 1: 36 – 39

STÖCKIGT J, PFITZNER A, KELLER PI. Enzymatic Formation of Ajmaline. *Tetrahedron Lett.*, 1983; 24: 2485 – 2486

STÖCKIGT J, ZENK MH. Isovincoside (strictosidine), the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids. *FEBS Lett.*, 1977; 79: 233 – 237

STÖCKIGT J, ZENK MH. Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1977; 646 – 648

STÖCKIGT J. Biosynthesis in *Rauwolfia serpentina* – Modern Aspects of an old Medicinal Plant. In: *The Alkaloids*. Cordell GA. Ed.; Academic Press, 1995; 47: 115 – 172

STÖCKIGT J. Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine. *Phytochem.*, 1979; 18: 965 – 971

STÖCKIGT J. The biosynthesis of heteroyohimbine-type alkaloids. In: *Indole and biogenetically related alkaloids*. Phillipson JD, Zenk MH. Eds.; Academic Press, London, New York, Toronto, 1980: 113

STUBBE J, GE J, YEE CS. The evolution of ribonucleotide reduction revisited.

Trends Biochem. Sci., 2001; 26: 93 – 99

SUN ZY, XIE H, TU Z. Effects of Finasteride and Epristeride on Steroid 5 α -Reductase Kinetics – a Comparative in *Vitro* Study. Indian Journal of Pharmacology, 1999; 31: 120 – 123

SUVARNA K, BARTISS A, WONG B. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. Microbiology, 2000; 146: 2705 –2713

SWANSTROM R, SHANK PR. X-Ray Intensifying Screens Greatly Enhance the Detection by Autoradiography of the Radioactive Isotopes ³²P and ¹²⁵I. Anal. Biochem., 1978; 86: 184 – 192

TAYLOR WI, FREY AJ, HOFMANN A. Vomilenin und seine Umwandlung in Perakin. Helv. Chim. Acta, 1962; 72: 611 – 614

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 1994; 22: 4673 – 4680

TORRENTS E, ALOY P, GIBERT I, RODRIGUEZ-TRELLES F. Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. J. Mol. Evol., 2002; 55: 138 – 152

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979; 76: 4350 – 4354

TREDGER JM, STOLL S. CYTOCHROMES P450 – their impact on drug treatment. Hospital Pharmacist, 2002; 9: 167 – 173

TREIMER JF, ZENK MH. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in alkaloid formation. Eur. J. Biochem., 1979; 101 (1): 225 – 233

TUKHATASINOV MK, KIRYALOV NP, BUTENKO RG, GRUSHVITSKII IV, GRUREVICH IY, NIKITINA IK. Study of the stem culture of *Rauwolfia serpentina* tissue. Khimya Prirodnykh Soedinenii, 1977; 1:122 - 123

ULRICH A, SHINE J, CHIRGWIN J, PICTET R, TISCHER E, RUTTER W, GOODMAN H. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. Science, 1977; 196: 1313 – 1319

VON SCHUMANN G, GAO S, STÖCKIGT J. Vomilenine reductase – a novel enzyme catalyzing a crucial step in the biosynthesis of the therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline. J. Bioorg. Med. Chem., 2002; 10:1913 – 1918

WARZECHA H, GERASIMENKO I, KUTCHAN TM, STÖCKIGT J. Molecular cloning and

functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 2000; 54: 657 – 666

WATSON JD, GILMAN M, WITKOWSKI J, ZOLLER M. Eds.; *Rekombinierte DNA*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage, 1993

WICHTEL M. In: *Teedrogen und Phytopharmaka*; Wichtel M. Ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 4. Auflage, 2002: 497 – 499

WIERENGA RK, DE MAEYER MCH, HOL WGJ. Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide-binding proteins. *Biochemistry*, 1985; 24: 1346 – 1357

WILLFINGER WW, MACKEY K, CHOMCYNski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 1997; 22: 474 - 476 sowie 478 – 481

WINK M, HARTMANN T. Physiological and biochemical aspects of quinolizidine alkaloid formation in cell suspension cultures. In: *Proceedings of the 5th international congress on plant tissue and cell culture*. Fujiwara A. Ed.; Maruzen, Tokyo, 1982: 333

Veröffentlichungen

Teile der Arbeit wurden bereits publiziert:

Als Artikel:

VON SCHUMANN G, GAO S, STÖCKIGT J. Vomilenine reductase – a novel enzyme catalyzing a crucial step in the biosynthesis of the therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline. J. Bioorg. Med. Chem., 2002; 10:1913 – 1918

GAO S, VON SCHUMANN G, STÖCKIGT J. A newly-detected reductase from *Rauvolfia* closes a missing gap in the biosynthesis of the antiarrhythmic alkaloid ajmaline. Planta Med., 2002; 68: 906 – 911

Als Abstract:

STÖCKIGT J, GAO S, VON SCHUMANN G. Biosynthesis of the Monoterpenoid Indole Alkaloid Ajmalin: Involved novel Reductases. The 4th International Symposium on Frontiers in Protein Chemistry and Biotechnology (SFPCB), Chengde/China 2001; pp. 69 - 72

Auszeichnung der vorliegenden Arbeit mit dem Forschungspreis “Böhringer Ingelheim Stiftung zur Förderung der chemischen, medizinischen und pharmazeutischen Wissenschaft“; (Dissertationsbroschüre 2003 der Johannes Gutenberg-Universität / Mainz)

Als Vortrag:

Präsentation: “Biosynthesis of Ajmaline: Involved reductases“ am 20.08.2001 auf dem 4th International Symposium on Frontiers in Protein Chemistry and Biotechnology (SFPCB), Chengde/China

Präsentation: “Proteinisolierung, Reinigung und Charakterisierung am Beispiel zweier Reduktasen aus *Rauvolfia serpentina*“ am 12.07.2002 im Rahmen der Arbeitskreisvorstellung “Pharmazeutische Biologie“ am Institut für Pharmazie / Johannes Gutenberg-Universität (Mainz)

Lebenslauf

Name Gerald v. Schumann
geboren 29.07.1974 in Mannheim
Eltern Carlheinz v. Schumann und Walburga v. Schumann, geb. Platz

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Mengerschied
1984-1993 Herzog Johann-Gymnasium in Simmern, Abschluß Abitur

Bundeswehr

1993-1994 Grundwehrdienst bei 6./GebjgBtl 233 in Mittenwald, währenddessen U-Lehrgang mit Option ROA. In der Folgezeit: Einzelwehrlübungen
1997 Fähnrichlehrgang in Hammelburg
1998 Ernennung zum Offizier, Leutnant der Reserve (Hannover)
2002 Truppengattungswechsel: Ernennung zum Sanitätsoffizier, Stabsapotheker d.R. (BwZK Koblenz)

Studium

1995 Beginn des Studiums der Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
1999 Abschluß aller scheinpflichtiger Veranstaltungen
2000 2.Staatsexamen und Beginn des Praktischen Jahres in der Moguntia-Apotheke, Mainz
2001 Approbation als Apotheker

Dissertation

Nov. 2000 Beginn der Promotion auf dem Fachgebiet der Pharmazeutischen Biologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Stöckigt, Universität Mainz

Berufstätigkeit

1999/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazie, Universität Mainz
Okt. 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit Lehrauftrag (Drogenuntersuchungen) am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz