

**„Etablierung von Expressionssystemen für Gene  
der Indolalkaloid-Biosynthese unter besonderer  
Berücksichtigung von Cytochrom P450-Enzymen“**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz**

**Apotheker  
Jörn Woll  
geb. in Ottweiler,  
Mainz 2004**

Dauer der Dissertation: Mai 2002 bis Januar 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.05

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>VII</b>
<b>AMINOSÄURECODE .....</b>	<b>X</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Die Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Cytochrom P450-Enzyme .....</b>	<b>8</b>
2.1 NADPH-Cytochrom P450-Reduktase.....	8
2.2 Katalysierte Reaktionen.....	9
2.3 Vorkommen.....	10
2.4 Nomenklatur.....	10
2.5 Lokalisierung in der Zelle.....	11
2.6 Strukturelle Merkmale.....	11
2.7 Identifizierung von Cytochrom P450-Enzymen .....	13
2.8 Expressionssysteme.....	14
<b>3 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>II MATERIAL .....</b>	<b>17</b>
<b>1 Biologisches Material.....</b>	<b>17</b>
1.1 Pflanzen .....	17
1.2 Zellsuspensionskulturen .....	17
1.3 Eukaryotische Zelllinien: Insektenzellen .....	18
<b>2 Bakterien-Stämme .....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	19
2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	19
<b>3 Vektoren .....</b>	<b>20</b>

**II****Inhaltsverzeichnis**

---

<b>4</b>	<b>Virusstämme .....</b>	<b>22</b>
4.1	Baculovirus.....	22
4.2	Tobacco Mosaic Virus (TMV).....	22
<b>5</b>	<b>Sterilisation der Medien .....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Bakterienmedien.....</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>Insektenzellmedien.....</b>	<b>23</b>
7.1	Sf9-Medium.....	23
7.2	T-3160.....	23
<b>8</b>	<b>Puffer.....</b>	<b>24</b>
<b>9</b>	<b>Säulen .....</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologische Arbeiten.....</b>	<b>25</b>
<b>11</b>	<b>Chemikalien und Zubehör.....</b>	<b>26</b>
<b>12</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>27</b>
<b>III</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>30</b>
<b>1</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>30</b>
1.1	Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	30
1.2	Mikrosomen-Isolierung.....	30
1.2.1	Mikrosomen-Isolierung aus pflanzlichen Zellsuspensions-kulturen .....	30
1.2.2	Mikrosomen-Isolierung aus <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	31
1.2.3	Mikrosomen-Isolierung aus Insektenzellkulturen .....	32
1.2.4	Mikrosomen-Isolierung aus Bakterienkulturen .....	32
1.3	Gewinnung von Enzymrohextrakten aus <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	33
1.4	Gewinnung von Enzymrohextrakt aus Bakterienkulturen .....	33
1.5	Affinitätschromatographie an Ni-NTA .....	34
1.6	Umpuffern und/ oder Entsalzen .....	35
1.6.1	Dialyse .....	35
1.6.2	Entsalzen über G25-Säule: Größenausschlusschromatographie .....	35
1.7	Konzentrierung verdünnter Enzymlösungen.....	36
1.8	Elektrophoretische Analysemethoden .....	36
1.8.1	SDS-PAGE .....	36
1.8.1.1	Prinzip .....	36
1.8.1.2	Gelpräparation, Laufbedingungen und apparativer Aufbau.....	37
1.8.1.3	Proteinfärbung .....	38

---

<b>2</b>	<b>Durchgeführte Aktivitätstests</b> .....	<b>40</b>
2.1	„Unbekannte Reduktase“ .....	40
2.1.1	Perakin-Reduktase Aktivitätstest .....	41
2.1.2	Cathenamin-Reduktase Aktivitätstest .....	42
2.1.3	Vomilenin-Reduktase Aktivitätstest .....	43
2.1.4	1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase Aktivitätstest .....	44
2.2	Vinorin-Hydroxylase Aktivitätstest .....	45
2.3	Cinnamoyl-Hydroxylase Aktivitätstest .....	46
2.4	Polyneuridinaldehyd Esterase Aktivitätstest .....	47
<b>3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>48</b>
3.1	Nucleinsäureisolierung .....	48
3.1.1	RNA-Präparation .....	48
3.1.2	DNA-Isolierung .....	48
3.1.2.1	Quick-Präparation .....	48
3.1.2.2	Isolierung reiner Plasmid-DNA .....	48
3.2	Restriktionsverdau .....	49
3.3	Elektrophorese von Nucleinsäuren .....	49
3.3.1	Präparative und analytische Agarosegele .....	49
3.3.2	Denaturierende Agarosegele .....	50
3.4	Isolierung reiner DNA aus Agarosegelen .....	51
3.5	Präzipitation von Nucleinsäuren .....	51
3.6	Gehaltsbestimmung von Nucleinsäuren .....	51
3.7	Dephosphorylierung von mRNA .....	52
3.8	Abspaltung der Cap-Struktur mit Tobacco Acid Phosphatase (TAP) .....	52
3.9	Ligation .....	53
3.9.1	DNA-Ligation .....	53
3.9.2	RNA-Ligation .....	53
3.10	PCR – Polymerase Chain Reaction .....	54
3.10.1	„Hot start“-PCR .....	54
3.10.2	„Touch-Down“-PCR .....	55
3.11	Synthese einer RACE-cDNA-Bank .....	55
3.12	Herstellung kompetenter Organismen .....	56
3.12.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	56
3.12.2	Elektrokompetente Bakterien .....	56
3.12.3	Elektrokompetente Agrobakterien .....	57
3.13	Transformation .....	57
3.13.1	Temperatur-Methode für <i>E. coli</i> -Stämme .....	57
3.13.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> Stämmen .....	58
3.13.3	Elektroporation von Agrobakteriumstamm GV3101 .....	58
3.14	Transposition von Bacmid-DNA und Blau/ Weiß- <i>Screening</i> .....	58
3.15	Einbringung der DNA in den Wirtsorganismus .....	59

3.15.1	Transfektion von Bacmid-DNA in SF9-Zellen und Ernte des Baculovirus aus der transfizierten Zellkultur .....	59
3.15.2	Infiltration der Tobacco Mosaic Virus-Module .....	60
<b>4</b>	<b>Datenbankrecherche, Anwendungen und Online-Tools .....</b>	<b>62</b>
4.1	ExPasy (Expert Protein Analysis System), Bioinformatikinstitut in Genf .....	62
4.1.1	ExPasy-ENZYME .....	62
4.1.2	ExPasy-Translate tool.....	62
4.1.3	PROSITE .....	62
4.1.4	SWISS-PROT-Datenbank .....	62
4.2	ClustalW .....	62
4.3	NCBI.....	63
4.4	FASTA.....	63
4.5	SignalP .....	63
4.6	TargetP .....	63
4.7	auf Cytochrom P450-Enzyme spezialisierte Seiten.....	63
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>64</b>
<b>1</b>	<b>Ermittlung des Volllängenklones des Klons P4 für die Cinnamoyl-Hydroxylase aus <i>Rauvolfia serpentina</i> .....</b>	<b>64</b>
1.1	Strategie zur Ermittlung des P4-Volllängenklons.....	64
1.2	Zwischenklonierungsschritte für die Sequenzanalyse und DNA-Gewinnung.....	67
<b>2</b>	<b>Überexpression von Cytochrom P450-Enzymen in <i>sf9</i>-Insektenzellen .....</b>	<b>69</b>
2.1	Konstruktion des Expressionsvektors mit dem GOI .....	69
2.2	Gewinnung von Bacmid-DNA .....	71
2.3	Gewinnung und Ernte rekombinanter Baculoviren .....	72
2.4	Infektion, Expression, Mikrosomenisolierung und Aktivitätstest .....	75
<b>3</b>	<b>Die „Putative Reduktase“ .....</b>	<b>79</b>
3.1	Homology Cloning.....	79
3.2	Identifizierungsversuche der unbekanntenen Reduktase.....	81
3.2.1	Vorbereitung für Aktivitätstests .....	81
3.2.2	Expression der unbekanntenen putativen Reduktase in M15 <i>E. coli</i> .....	84
<b>4</b>	<b><i>In planta</i> Expression mit Hilfe des rekombinanten Tobacco Mosaic Virus in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....</b>	<b>86</b>
4.1	Innovationen bei der Verwendung des <i>Tobacco Mosaic Virus</i> .....	
	als Expressionsvektor .....	86
4.2	5`-Module .....	87
4.3	3`-Module .....	88
4.3.1	Erster Klonierungsschritt für P2 .....	88

4.3.2	Subklonierung des P450-Klons P2.....	91
4.3.3	Klonierung von P4 in pICH10990 .....	93
4.3.4	Klonierung der Polyneuridinaldehyd Esterase in pICH10990 .....	94
4.4	Transformation und Kultivierung für Infiltration .....	96
4.5	Infiltration und Zusammenbau von 5`- und 3`-Modul in der Pflanze .....	97
4.6	Enzymisolierung.....	98
4.7	Mikrosomen-Isolierung für P2 und P4 mit anschließendem Aktivitätstest.....	99
4.8	Standard-Isolierung mit anschließenden Aktivitätstests .....	100
4.8.1	Ergebnis des Aktivitätstest von P2 und P4.....	100
4.8.2	Ergebnis des Aktivitätstests der Polyneuridinaldehyd Esterase .....	101
4.9	Verifizierung der PNAE über Aktivitätstest mit anschließender .....	
	Massenspektrometrie.....	103
4.10	Expression der Polyneuridinaldehyd Esterase mit dem .....	
	(His)6-tag-Modul pICH11280.....	106
4.10.1	Infiltration von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit PNAE-3`-Modul, pICH11280, pICH14313 sowie Standardisolierung .....	106
4.10.2	Ni-NTA-Reinigung der PNAE-(His)6 mit dem Äkta-Explorer .....	107
4.10.3	Identifizierung der PNAE-(His) <sub>6</sub> durch Aktivitätstest und SDS-PAGE .....	108
<b>V</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>110</b>
<b>1</b>	<b>Die Vinorin-Hydroxylase.....</b>	<b>110</b>
<b>2</b>	<b>Der P450-Volllängenklon P4 – Die Cinnamoyl-Hydroxylase .....</b>	<b>114</b>
2.1	Homologiestudien zum P450-Klon P4 .....	114
2.2	Expression in sf9-Insektenzellen .....	119
2.3	Testung des Klons P4 im Insektenzellsystem .....	121
<b>3</b>	<b>Die putative Reduktase.....</b>	<b>124</b>
3.1	Homologie-Studien zur „Unbekannten Reduktase“ .....	124
3.2	Funktion der „Unbekannten Putativen Reduktase“.....	127
<b>4</b>	<b>In planta Expression mit Hilfe des rekombinanten Tobacco Mosaic Virus in <i>Nicotiana benthamiana</i>.....</b>	<b>130</b>
4.1	Einklonierung der Klone P2 und P4 in das 3`-Modul pICH10990 .....	133
4.2	Testung unterschiedlicher Module mit P2 und P4, Ergebnisse und Schlussfolgerungen .....	135
4.3	Expression von PNAE – das System funktioniert also doch .....	136
<b>5</b>	<b>Ausblick: Zukünftige Strategien zur Expression von Cytochrom P450-Enzymen aus <i>R. serpentina</i> .....</b>	<b>140</b>
	Expression in Hefen.....	142

---

<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>145</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>147</b>
<b>VIII</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>163</b>
<b>1</b>	<b>5´- und 3´-Enden der Cytochrom P450-Klone aus dem Projekt .....</b>	<b>.....</b>
	<b>Homology cloning .....</b>	<b>163</b>
1.1	P450-Klon P7 .....	163
1.2	P450-Klon P12 .....	165
1.3	P450-Klon P13 .....	167
<b>2</b>	<b>Teilsequenzen aus dem Homology Cloning Projekt .....</b>	<b>170</b>
2.1	P6 .....	170
2.2	P8 .....	171
2.3	P9 .....	171
2.4	P10 .....	172
2.5	P11 .....	172
2.6	P14 .....	173
2.7	P15 .....	173
2.8	P16 .....	174
2.9	P17 .....	174
2.10	P18 .....	174
2.11	P19 .....	175
2.12	P20 .....	175
2.13	P21 .....	176
<b>3</b>	<b>Synthetisierte Primer .....</b>	<b>176</b>
3.1	Primer für Einklonierung in pICH10990 .....	176
3.2	Primer für unbekannte putative Reduktase zur Einklonierung in pQE2- Expressionsvektor .....	178
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>179</b>
	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>180</b>



## Abkürzungen

% (m/V)	Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung)
% (V/V)	Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung)
A	Adenin
A280	Absorption bei 280 nm
AAAE	Acetylajmalin Acetylerase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transkriptase
ANAMT	Acetylnorajmalin Methyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bgl	<i>Bacillus globigii</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAD	Cinnamoylalkohol Dehydrogenase, Zimtalkohol Dehydrogenase
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CO	Kohlenstoffmonooxid
CPR	NADPH-Cytochrom P450-Reduktase
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHVR	1.2-Dihydrovomilenin Reduktase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C, G, T)
DTT	Dithiotreitol
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eco	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FM	Fließmittel

**VIII****Abkürzungen**

---

FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GDH	Geissoschizin Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GOI	Gene Of Interest
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hsps	Heat shock proteins (Hitze-Schock-Proteine)
kb	Kilo-Basen
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KPi	Kaliumphosphat
log	Logarithmus
Lux	Beleuchtungsstärke
M	Molare Konzentration
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
M+	Molekülonenpeak
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MSH	$\beta$ -Mercaptoethanol
MW	Molecular Weight / Molekulargewicht
<i>N.b.</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NADPH <sub>2</sub>	Reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Nco	<i>Nocardia corallina</i>
O	Insektenzellmikrosomen ohne Expression von Fremd-DNA
OD	Optische Dichte
OD <sub>x</sub>	Optische Dicht bei x nm gemessen
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
P4	Cytochrom P450-Klon P4
P4+CPR	Isolierte Mikrosomen aus Coexpression von P4 und CPR
P450(s)	Cytochrom P450-Enzym(e)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p-C	para-Coumarsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol

Pi	Phosphat
PNA	Polyneuridinaldehyd
PNAE	Polyneuridinaldehyd Esterase
PSV	Protein Storage Vacuoles
<i>R</i>	<i>Rauvolfia</i>
R(-)His	Unbekannte Reduktase ohne (His) <sub>6</sub> -tag
R(+)His	Unbekannte Reduktase mit (His) <sub>6</sub> -tag
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RBS	Ribosome Binding Site
Rf	rel. Laufstrecke
RP	Reversed Phase
Rpm	Rounds per minute
Rt	Retentionszeit
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SBE	Sarpagine Bridge Enzyme (Sarpagin-Brückenzym)
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SG	Strictosidin Glucosidase
Sph	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
SS	Strictosidin Synthase
T	Thymin
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
TMV	Tobacco mosaic virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
U	Unit (1U = 16.67 nkat)
UV	Ultraviolett
VE	Vellosimin
VH	Vinorin Hydroxylase
Vom	Vomilenin
VR	Vomilenin Reduktase
VS	Vinorin Synthase
VT	Volumenteil
W	Watt
x g	x-fache Erdbeschleunigung
Z	Zimtsäure
ZKBS	Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

## 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

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienstämme .....	19
Tabelle 2: Vektoren .....	20
Tabelle 3: Säulenmaterialien, alphabetisch nach Hersteller .....	25
Tabelle 4: Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologie, alphabetisch nach Produkt.....	25
Tabelle 5: Chemikalien und Zubehör, alphabetisch nach Hersteller .....	26
Tabelle 6: Geräte, alphabetisch nach Gerät .....	27
Tabelle 7: Inkubationsansatz und Assay für Perakin-Reduktase Aktivitätstest .....	41
Tabelle 8: : Inkubationsansatz und Assay für Catheramin-Reduktase Aktivitätstest .....	42
Tabelle 9: Inkubationsansatz und Assay für Vomilenin-Reduktase Aktivitätstest.....	43
Tabelle 10: Inkubationsansatz und Assay für Dihydrovomilenin-Reduktase Aktivitätstest....	44
Tabelle 11: : Inkubationsansatz und Assay für Vinorin-Hydroxylase Aktivitätstest .....	45
Tabelle 12: Inkubationsansatz und Assay für Cinnamoyl-Hydroxylase Aktivitätstest.....	46
Tabelle 13: Inkubationsansatz und Assay für PNA Esterase Aktivitätstest .....	47
Tabelle 14: Konzentration des Agarosegels nach Anzahl der Basenpaare.....	50
Tabelle 15: Infiltrationsschema am Beispiel von P2, P4 und GFP .....	61
Tabelle 16: PCR zur Synthese des ersten 800bp großen Fragmentes von Klon P4 .....	66
Tabelle 17: PCR zur Generierung des zweiten 800bp großen Fragmentes von P4 .....	67
Tabelle 18: PCR-Bedingungen für Klonierung von P450-Klon P4 in pFastBac1 .....	71
Tabelle 19: Inkubationsplan für den Aktivitätstests der Cinnamoyl-Hydroxylase .....	76
Tabelle 20: Volllängenklon der putativen Reduktase.....	80
Tabelle 21: 5´-Primer „R-5´-Ende-NcoI“ zur Einklonierung in pQE60.....	82
Tabelle 22: Zwei 3´-Primer für die Generierung verschiedener Amplifizierungsprodukte der unbekanntenen putativen Reduktase in pQE60.....	83

Tabelle 23: PCR zur Klonierung zweier Reduktase-Klone in pQE60 für Expression in M15	83
Tabelle 24: Kleine Übersicht über Eigenschaften der 5`-Module.....	87
Tabelle 25: forward- und reverse-Primer für Einklonierung von P2 in pICH10990.....	89
Tabelle 26: PCR zur Klonierung von P450-Klon P2 in Expressionsvektor pICH10990.....	90
Tabelle 27: Verdau und Ligation von P2-PCR-Fragment und pICH10990 .....	91
Tabelle 28: forward- und reverse-Primer für Einklonierung von P4 in pICH10990.....	93
Tabelle 29: PCR für Klonierung von P4 in pICH10990 .....	94
Tabelle 30: forward- und reverse-Primer für Einklonierung von PNAE in pICH10990 .....	95
Tabelle 31: PCR für Klonierung von PNAE in pICH10990.....	96
Tabelle 32: Beispiel für einen Inkubationsplan für PNAE-Aktivitätstest.....	101
Tabelle 33: Homologien zu P450-Klon P4 .....	115
Tabelle 34: Homologie zur "Putativen Reduktase" .....	125
Tabelle 35: Übersicht verschiedener Vektoren auf der Basis von Pflanzen-Viren .....	132

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Rauvolfia serpentina</i> (L.) Benth, .....	1
Abbildung 2: Reserpin, Ajmalin, Ajmalicin.....	2
Abbildung 3: Biosyntheseweg des Antiarrhythmikums Ajmalin .....	6
Abbildung 4: Reaktion der Perakin-Reduktase .....	7
Abbildung 5: Reaktion der Cathenamin-Reduktase.....	7
Abbildung 6: 3'-Ende des Klons P4 .....	64
Abbildung 7: RACE-PCR Schema zur Ermittlung des Volllängenktons P4 mit Hilfe der Primer 5'-RACE-P4-1 und 5'-RACE-P4-2 .....	65
Abbildung 8: Volllängenkton P4 .....	68
Abbildung 9: 5'- und 3'-Primer für Einklonierung des P450-Klons P4 in pFASTBAC1.....	70
Abbildung 10: Generierung des rekombinanten Baculovirus und Genexpression mit Bac-To- Bac Expressionssystem .....	74
Abbildung 11: Umsetzung von Zimtsäure zu p-Coumarsäure unter Verbrauch von NADPH <sub>2</sub> und Sauerstoff .....	77
Abbildung 12: HPLC-Ausdrucke der im Text benannten Proben A, B und C .....	78
Abbildung 13: Gelphoto d. PCR-produkte von Reduktase mit (His) <sub>6</sub> -tag und Reduktase ohne (His) <sub>6</sub> -tag.....	84
Abbildung 14: Agarosegel von den Produkten des ersten Klonierungsschrittes des P450- Klons P2 in pICH10990 .....	89
Abbildung 15: Klonierungsschema für den P450-Klon P2 in Expressionsvektor pICH1099092	
Abbildung 16: Restriktionsverdau des P450-Klons P4 und des Zielvektors pICH10990.....	93
Abbildung 17: Agarosegel des PCR-Produktes für die Einklonierung der PNAE in Expressionsvektor pICH10990.....	95
Abbildung 18: Verschmelzung beider Provektoren.....	97
Abbildung 19: Photo eines Blattes mit GFP-Expression nach 11 Tagen mit Infiltrationsstellen und Photo eines Blattes mit Infiltration mit PNAE. ....	99

---

Abbildung 20: Umsetzung von Polyneuridinaldehyd (PNA) zu 16-epi-Vellosimin (VE) unter Abspaltung von MeOH und CO <sub>2</sub> .....	102
Abbildung 21: HPLC-Ausdrucke der enzymatischen Umsetzung der in <i>N. benthamiana</i> überexprimierten PNA Esterase .....	103
Abbildung 22: Massenspektren des Produktes der Umsetzung der PNA Esterase .....	105
Abbildung 23: Chromatogramm einer Ni-NTA-Reinigung der PNAE-(His) <sub>6</sub> .....	107
Abbildung 24: HPLC-Ausdruck der über Ni-NTA gereinigten PNAE-(His) <sub>6</sub> und SDS-PAGE-Foto nach der Silberfärbung .....	109
Abbildung 25: Umsetzung von Vinorin zu Vomilenin durch die Vinorin-Hydroxylase .....	110
Abbildung 26: Alignment der Sequenz des Klons P4 mit weiteren Cinnamoyl-Hydroxylasen anderer Pflanzen .....	116
Abbildung 27: Phylogentischer Baum der Verwandtschaftsverhältnisse der verglichenen Sequenzen.....	118
Abbildung 28: Alignment des gefundenen putativen Reduktase-Klons mit elf weiteren Reduktasen unterschiedlicher Herkunft (vgl. Tabelle 34, S. 125). .....	126
Abbildung 29: Phylogenetische Baum aus den Sequenzen der unbekannt putativen Reduktase und der restlichen damit verglichenen Reduktasen. ....	127
Abbildung 30: Verdeutlichung der Primergestaltung am Beispiel des 3'-Modul-Primers CYP2sac1Xho1-for .....	134



## I Einleitung

Die Natur hat im Fortgang der Evolution eine außerordentliche Mannigfaltigkeit an Organismen geschaffen. In Gestalt von Viren, Bakterien, Pilzen, niederen und höheren Pflanzen, verschiedenartigsten Vertretern im Tierreich und nicht zuletzt im Menschen, begegnet uns das Leben in den unterschiedlichsten Organisations- und Differenzierungsstufen, kurz in einer überwältigenden Formenfülle. Diese Vielfalt reicht vom einzelligen Organismus bis zu den hochdifferenzierten Organismen der Säugetiere. Ich möchte mich in der vorliegenden Dissertation auf die Beleuchtung einer einzigen höheren Pflanze beschränken. *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth., zu deutsch „die indische Schlangenzwurzel“, steht im Mittelpunkt meines Forschungsvorhabens.



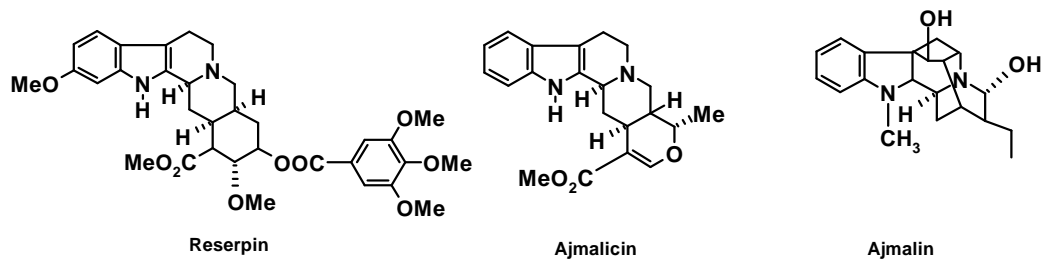
**Abbildung 1: *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth,** bildet 30 cm bis 1 m hohe, immergrüne Sträucher und gehört zu der Familie der Hundsgiftgewächse (lat. *Apocynaceae*) und führt einen weissen Milchsaft. Die Verbreitungsorte sind tropische und subtropische Wälder und Savannen, hauptsächlich Indien. Die Wachstumsdauer bis zur Ernte beträgt etwa sieben Jahre. Die pharmazeutisch genutzten Pflanzenteile stellen die zwischen 20 und 40 cm langen Wurzeln dar. Der Alkaloidgehalt beträgt laut DAB 1% berechnet als Reserpin, mit ca. 0,1% an Ajmalin.

Alle Inhaltsstoffe von Pflanzen lassen sich in zwei Klassen einordnen. Zum einen gibt es die Substrate und Produkte des Primärstoffwechsels. Sie sind hauptsächlich in Reaktionskaskaden involviert, die den Auf- und Abbau von Aminosäuren, Nukleotiden, Lipiden und Kohlenhydraten beschreiben und so die biochemische Grundlage der Zellfunktion bilden. Diese Ebene ist in allen Eukaryonten annähernd gleich oder zumindest sehr ähnlich. Deutliche Unterschiede finden sich zum anderen im Sekundärstoffwechsel. Dieser kann sich von einer zur nächsten Pflanzenfamilie ganz erheblich

unterscheiden. Unterschiedliche Gattungen weisen zum Teil auch ein unterschiedliches Sekundärstoffwechselprofil auf.

Der Sekundärstoffwechsel bringt Substanzen hervor, die aus Produkten und Intermediaten des Primärstoffwechsels synthetisiert werden. Die eigentliche Aufgabe dieser Substanzen in der Pflanze beschränkt sich auf evolutionsbiologische Vorteile wie Fraßschutz, Schutz vor Mikroorganismen, u.a (SCHULER, 1996). Diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe stellen -neben einigen anderen Verbindungen- mit den Alkaloiden die sicherlich wichtigste Substanzklasse. *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth weist ein umfassendes Alkaloidspektrum auf, wobei als die pharmakologisch wichtigsten Alkaloide das Reserpin, das Ajmalin und das Ajmalicin zu nennen sind.

**Abbildung 2: Reserpin, Ajmalin, Ajmalicin**



Reserpin setzt durch Blockade einer Protonenpumpe die Speicherfähigkeit von Noradrenalin und Dopamin in den Vesikeln herab, was seine antihypertonische und neuroleptische Wirkung bedingt (LÜLLMANN H *et al*, 1996). Therapeutisch wird Reserpin nur noch selten eingesetzt, da die Verwendung als Neuroleptikum auf Grund der hohen Dosierung und den damit verbundenen Nebenwirkungen obsolet ist und sich bei der Behandlung der chronischen Hypertonie bei Dauermedikation zentralnervöse Störungen einstellen.

Ajmalicin zeigt bei gleichem Wirkmechanismus eine ebenfalls blutdrucksenkende Wirkung. Ajmalin ist ein potentes Klasse I(a/c) Antiarrhythmikum (MUTSCHLER E *et al*, 2001). Die Bioverfügbarkeit des Ajmalins ist in einer oralen Darreichungsform auf Grund der schlechten Resorption nahezu nicht gegeben. Abhilfe schafft zum einen die Formulierung einer Anwendung zur parenteralen Applikation (Gilurytmal®) und zum anderen die Derivatisierung am tertiären Stickstoff des Bicyclus mit einem Propylrest (Neo-Gilurytmal®).

## 1 Die Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin

Ajmalin weist eine komplexe Struktur auf, wodurch die wahrscheinlich vielstufige und damit wirtschaftlich unrentable Totalsynthese an Bedeutung verliert. Viel wichtiger dagegen ist die Kenntnis der Biosynthese des Ajmalins, denn mit diesem Wissen können gezielt Impulse gesetzt werden. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel die Überexpression eines Schlüsselenzyms, das die Synthese eines wichtigen Präkursors für das gesuchte Alkaloid katalysiert. Dadurch kann das Gleichgewicht innerhalb der Pflanze zu Gunsten des gewünschten Alkaloids verschoben werden. Zum Beispiel hat MILLGATE A *et al* im September diesen Jahres (2004) über eine Mutation von *Papaver somniferum* berichtet, bei der die Morphin-Biosynthese manipuliert wurde. Es akkumulieren die Vorstufen von Morphin, Thebain und Oripavin, was die Forschung bezüglich neuer Opiode und Arzneistoffe gegen die Opiat-Abhängigkeit weiter beflügeln könnte. Eine andere Möglichkeit ist die Verlegung des kompletten oder zumindest von Teilen des Biosyntheseweges aus der Originalpflanze in einen anderen Wirtsorganismus. So kann man im Idealfall durch Verfüttern einfacher Vorstufen die gewünschte Substanz auf einfacherem Wege und in größeren Mengen erlangen.

Die Untersuchung von Vorgängen einer Biosynthesekette auf zellfreier Ebene bringt immer die Verwendung von frischem Zellmaterial mit sich. Der Aufklärung des Biosyntheseweges des Ajmalins aus den *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth Wurzeln stand folglich auch die schwierige Kultivierbarkeit der Pflanze und die lange Wachstumsdauer entgegen. Es musste eine zusätzliche Möglichkeit gefunden werden, in einem größeren Maßstab an die benötigten Frischzellen zu gelangen. 1974 gelang es ZENK aus *Rauvolfia* eine stabile Suspensionszellkultur anzulegen. Die Vorteile der Zellkultur sind die kostengünstige Anzucht von frischem, keimfreiem Zellmaterial innerhalb kurzer Zeit und die geringere Gefahr der Enzyminhibierung und -inaktivierung durch phenolische Substanzen als dies bei der Isolierung aus frischem Pflanzenmaterial der Fall ist (STÖCKIGT J, 1988). Die Etablierung effizienter Zellkulturen hat die Erforschung der Ajmalin-Biosynthese entscheidend beeinflusst. Nun war die Voraussetzung gegeben im zellfreien Medium *in vitro* enzymatische Umsetzungsreaktionen verschiedener Intermediate zu studieren, wobei die Aufklärung der Ajmalin-Biosynthese schon 1977 ihren Anfang hat (STÖCKIGT J UND ZENK M, 1977). Im folgenden schildere ich unter

Berücksichtigung der schon vollständig oder zumindest teilweise aufgeklärten Reaktionsschritte, die Reaktionskaskade, die in Abbildung 3: Biosyntheseweg des Antiarrhythmikums Ajmalin, S. 6 dargestellt ist. Die für die jeweiligen Umsetzungsreaktionen verantwortlichen Enzyme sind in der Abbildung unter der fettgedruckten Abkürzung wieder zu finden, die in Klammern an den entsprechenden Stellen eingefügt sind.

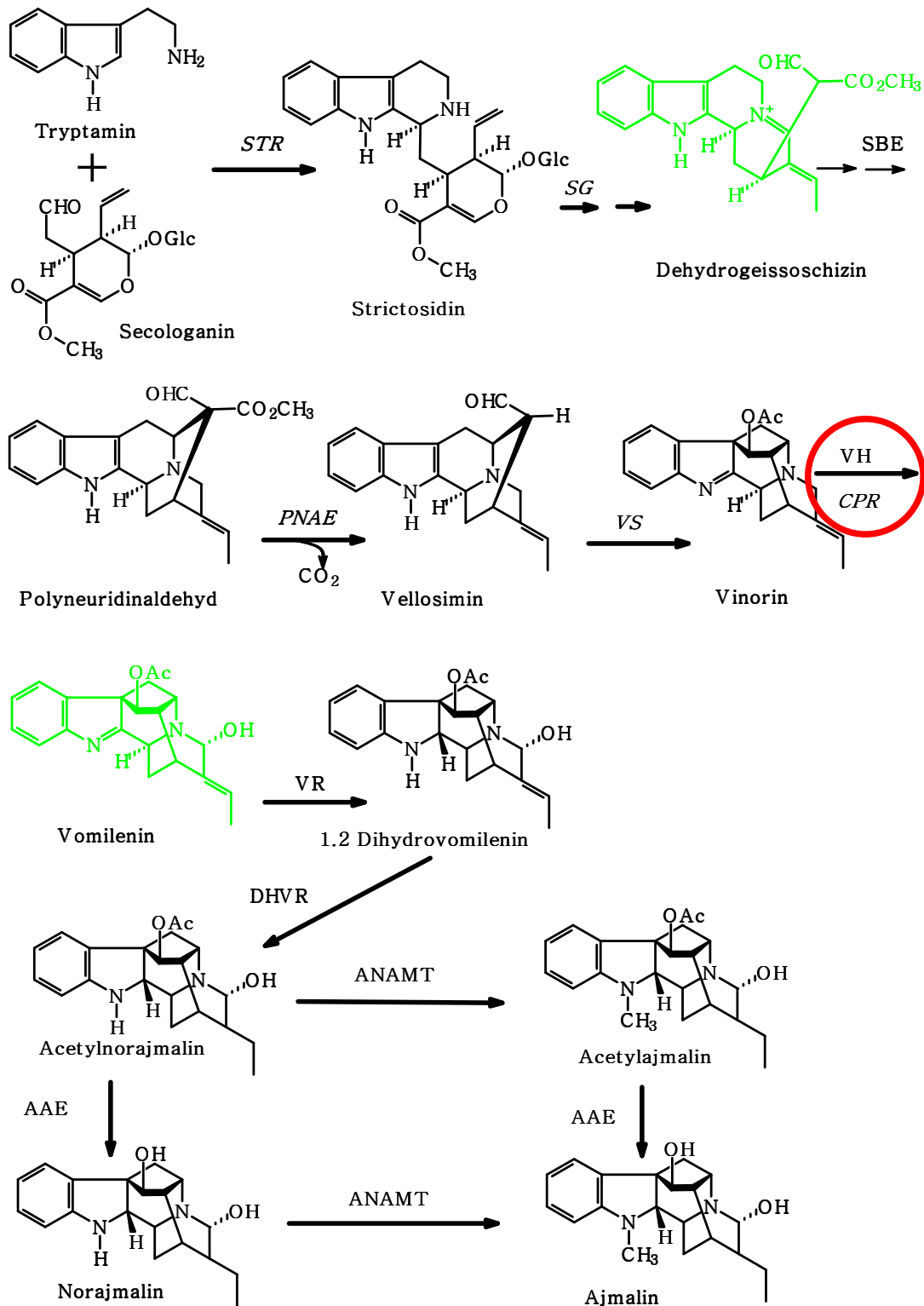
Der erste Schritt ist die Kondensation von Tryptamin, dem Decarboxylierungsprodukt von Tryptophan, und dem Iridoid Secologanin, katalysiert durch die Strictosidin-Synthase (**STR**) (RUEFFER M *et al*, 1978), (NAGAKURA N *et al*, 1979), (KUTCHAN T *et al*, 1988), (PFITZNER A UND ZENK M, 1989), (KUTCHAN T, 1993). Das monoterpenoide Glucosid Strictosidin, das als Vorstufe zu etwa 2000 verschiedenen Alkaloiden dient, verliert seinen Zucker durch die Strictosidin- $\beta$ -Glucosidase (**SG**) (GERASIMENKO I *et al*, 2002). Aus dem Strictosidin-Aglykon entsteht über eine noch nicht vollständig geklärte Reaktion das Dehydrogeissoschizin, welches durch die NADPH-abhängige Geissoschizin-Dehydrogenase zum Geissoschizin umgesetzt wird (PFITZNER A UND STÖCKIGT J, 1982). Die folgende Reaktion von Geissoschizin zum Polyneuridinaldehyd durch das Sarpagan-Brückenzym (**SBE**) (SCHMIDT D UND STÖCKIGT J, 1995) ist nur zum Teil aufgeklärt. Der Polyneuridinaldehyd erfährt die Umwandlung zum instabilen 16-epi-Vellosimin ( $t_{1/2}$ =ca. 20 min, bei pH 7,5) durch die Polyneuridinaldehyd Esterase (**PNAE**) (DOGRU E *et al*, 2000).

Die Acetyl-CoA-abhängige Vinorin-Synthase (**VS**) fügt dadurch dem 16-epi-Vellosimin durch Knüpfung einer neuen C-C-Bindung zwischen C<sub>7</sub> und C<sub>17</sub> einen neuen Cyclus hinzu. Die resultierende hydroxylierte Ajmalan-Gerüststruktur würde auf Grund der sehr hohen Reaktivität spontan wieder zum Sarpagan-Typ unter Spaltung der neu geschaffenen C-C-Bindung rückreagieren, doch die Hydroxygruppe wird durch die Vinorin-Synthase (**VS**) acetyliert, was die Beständigkeit des Produktes Vinorin erhöht (BAYER A, 2003). Dieser Schritt vollzieht die Wandlung des bis dahin vorherrschenden Sarpagan-Gerüsttyps (16-epi-Vellosimin) zum Ajmalan-Typ (Vinorin). Vinorin erfährt die Hydroxylierung an C<sub>21</sub> in einer NADPH-abhängigen, sehr substratspezifischen Reaktion durch die Monooxygenase Vinorin-Hydroxylase (**VH**) zu Vomilenin (FALKENHAGEN H *et al*, 1995) (FALKENHAGEN H UND STÖCKIGT J, 1995). Vomilenin wird nun durch die NADPH-abhängige Vomilenin-Reduktase (**VR**) zu 1,2-Dihydrovomilenin umgesetzt

---

(VON SCHUMANN G *et al*, 2002), welches unmittelbar in einer ebenfalls NADPH-abhängigen Reaktion durch die 1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase (**DHVR**) in 17-O-Acetylnorajmalin umgewandelt wird (GAO S *et al*, 2002). Die Reihenfolge der beiden nun folgenden Reaktionen ist bis dato noch nicht geklärt. Jedenfalls sorgt die Acetyljmalan-Esterase (**AAE**) (POLZ L, 1987) für die Freilegung der Hydroxygruppe am C<sub>17</sub> und eine Acetylnorajmalan-Methyltransferase (**ANAMT**) sorgt für die Methylierung des sekundären Stickstoffs zum Ajmalin.

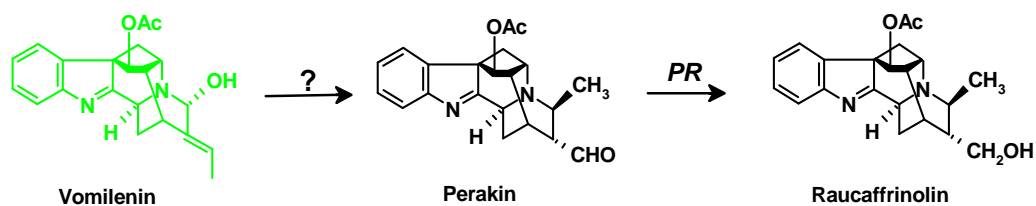
Abbildung 3: Biosyntheseweg des Antiarrhythmikums Ajmalin



Erläuterungen zur Abbildung 3: Biosyntheseweg des Antiarrhythmikums Ajmalin  
 Die Abkürzungen wurden im obigen Text erläutert. *Kursiv* gekennzeichnete Enzyme wurden *heterolog exprimiert*. Die Erforschung des **rot** gekennzeichneten Schrittes dominiert den Verlauf der Arbeit. Die **grün** gekennzeichneten Substanzen stellen Intermediate dar, denen eine Schlüsselposition bezüglich der unten erläuterten Seitenwege zukommt.

Die obige Abbildung zeigt den Biosyntheseweg des Ajmalins. Da durch die Beeinflussung bestimmter Nebenwege oft auch auf den Hauptweg Einfluss genommen werden kann, werden in unserer Arbeitsgruppe auch diese einer näheren Betrachtung unterzogen. Im Verlauf meiner Arbeit hat es sich durch bestimmte Umstände, die ich im Rahmen der Dissertation noch erläutere, ergeben, dass ich auch zwei Reaktionen der diversen Seitenwege etwas näher untersucht habe. Diese Reaktionen finden sich in Abbildung 4, S. 7 und Abbildung 5, S. 7 wieder und werden beide von einer NADPH-abhängigen Reduktase katalysiert. Die Vorstufen aus dem Hauptweg der Ajmalin-Biosynthese sind nochmals in den gleichen Farben wie in der Abbildung 3, S. 6 aufgeführt, um ihren Schnittstellen-Charakter bezüglich der Nebenwege zu unterstreichen und eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

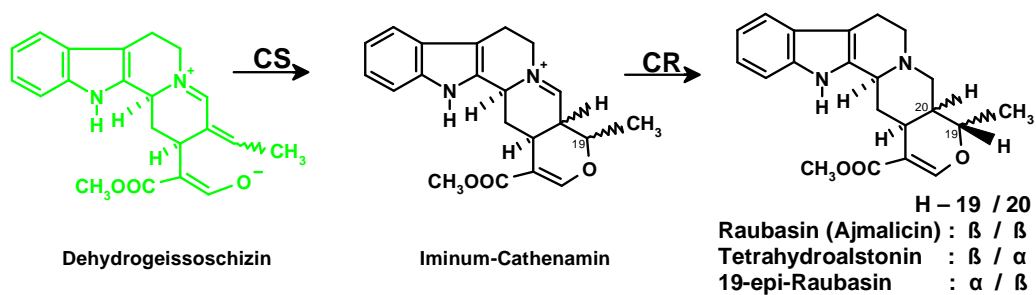
Abbildung 4: Reaktion der Perakin-Reduktase



Erläuterungen: Perakin-Reduktase (**PR**), *kursiv* gekennzeichnete Enzyme wurden *heterolog exprimiert*

Die Perakin-Reduktase wurde kürzlich von ROSENTHAL C heterolog in *E. coli* exprimiert (noch unveröffentlichte Daten).

Abbildung 5: Reaktion der Cathenamin-Reduktase



Erläuterungen: Cathenamin-Synthase (**CS**), Cathenamin-Reduktase (**CR**)

## 2 Cytochrom P450-Enzyme

Vor 46 Jahren wurde das erste Mal über die Existenz eines CO-bindenden Pigments aus isolierten Mikrosomen der Ratten- und Schweineleber berichtet (KLINGENBERG M, 1958) (GARFINKEL D, 1958). 6 Jahre später bestätigten OMURA T und SATO R die Existenz eines solchen Pigments, mit dem Zusatz, dass das gefundene Pigment im reduzierten Zustand CO bindet und daraus eine Absorptionzunahme bei 450 nm resultiert. Das Pigment wurde als Häm-Protein identifiziert. Die allgemein übliche Bezeichnung „P450“ rührt her von „P“ für Pigment und „450“ für den Wellenlängenbereich bei der gemessenen CO-Absorption. Der gewählte spektroskopische Nachweis ist heute immer noch in Gebrauch, jedoch werden in der zukünftigen Forschung immunologisch-spektroskopische Methoden (HUMPHREYS J UND CHAPPLE C, 2004) zunehmend an Bedeutung gewinnen.

### 2.1 NADPH-Cytochrom P450-Reduktase

Elementar für die Funktionsweise der Cytochrom P450-Enzyme als Oxidasen, ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten. Die meisten durch P450s katalysierten Reaktionen in Eukaryonten beginnen mit der Übertragung von Elektronen von NADPH<sub>2</sub> in einem Zwei-Elektronenschritt auf die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) und dann weiter auf das Cytochrom P450-Enzym (VERMILION J *et al*, 1981) (OPRIAN D UND COON M, 1982). Bedingt durch diesen Elektronentransfer bindet das P450 Sauerstoff und bewirkt dessen reduktive Spaltung bei gleichzeitigem Einbau in das Substrat.

Die CPR ist ebenfalls unmittelbar in der Nähe der P450s lokalisiert. Die nötige räumliche Nähe wird durch die Einbindung in die gleiche Membran gewährleistet, in der sich auch das Cytochrom P450-Enzym befindet. Diese Membran-Einbindung vollzieht sich über eine hydrophobe N-terminale Membranbinde-Domäne. Die zweite funktionelle Domäne ist dagegen hydrophiler Natur und ist für die katalytischen Eigenschaften der CPR verantwortlich. Auf ein Proteinmolekül kommt je ein Flavinadenindinukleotid (FAD) und ein Flavinmononukleotid (FMN). FAD stellt den Elektronenakzeptor dar und gibt nach deren Aufnahme die Elektronen an FMN weiter, welches diese einzeln auf das entsprechende Cytochrom P450-



Enzym überträgt. Studien haben gezeigt, dass P450s ein funktionelles Verhältnis von CPR:CYP450 von 1:1 bilden. Trotzdem gibt es viele verschiedene Arten von Cytochrom P450-Enzymen in der Membran und neuere Untersuchungen gehen von einem Verhältnis CYP450:CPR von 10:1 bis 20:1 aus (BACKES W UND KELLEY R, 2003). Diese Annahme impliziert, dass die CPR in der Lage ist, viele verschiedene P450s mit Elektronen zu versorgen.

In der Regel kommt in einer Pflanze nur eine CPR vor, doch wurde auch schon über das Vorkommen von mehreren Isoformen innerhalb einer Pflanze berichtet (MIZUTANI M UND OHTA D, 1998). In dem Hybriden *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* wurden drei unterschiedliche NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen entdeckt (RO DK *et al*, 2002).

## 2.2 Katalysierte Reaktionen

Cytochrom P450-Monooxygenasen sind mischfunktionelle Oxidasen und stellen die strukturell unterschiedlichste und funktionell vielseitigste Familie der Proteine dar. Wie in den Erläuterungen der Abbildung 3, S. 6 kurz angeschnitten, stellt die Erforschung des in dieser Abbildung rot gekennzeichneten Enzymsystems einen Schwerpunkt meiner Arbeit dar. Die dargestellte Hydroxylierungsreaktion wird, wie schon im obigen Text aufzeigt, von der Monooxygenase Vinorin-Hydroxylase, das heißt einem Cytochrom P450-Enzym katalysiert (FALKENHAGEN H UND STÖCKIGT J, 1995). Die Mehrzahl der von P450s katalysierten Reaktionen sind Hydroxylierungen lipohiler Verbindungen. Dennoch können sie auch durchaus andere Aufgaben erfüllen wie Reduktionen, Peroxidationen, Epoxidierungen, Desaminierungen, Desulfurierungen, Dehalogenierungen sowie N-, S- und O-Desalkylierungen.

Beispiele für wichtige Cytochrom P450-Enzyme aus der Alkaloidbiosynthese sind die Taxoid-2 $\alpha$ -Hydroxylase aus *Taxus* (CHAU M UND CROTEAU R, 2004) und die Taxoid-7 $\beta$ -Hydroxylase aus *Taxus* (CHAU M *et al*, 2004). Beide Enzyme sind für die Synthese wichtiger Vorstufen des Mitose-Hemmers Taxol verantwortlich.

Die Cinnamoyl-Hydroxylase hingegen ist ein Enzym aus dem Phenyl-Propanoid-Stoffwechsel. Sie katalysiert die Umsetzung der Zimtsäure zur p-Coumarsäure, womit sie für die Bereitstellung von wichtigen Grundstrukturen

für die Synthese weiterer Phenyl-Propane wie den Ligninen, den Suberinen, den Flavoniden und zahlreicher anderer Phenyl-Propane sorgt. Die erste cDNA von einer Cinnamoyl-Hydroxylase aus der Jerusalem-Artischocke wurde 1993 von TEUTSCH HG *et al* isoliert. Insgesamt wurden bis heute über zwanzig verschiedene Orthologe der Cinnamoyl-Hydroxylase aus verschiedenen Pflanzen geklont. Die jüngste Veröffentlichung beschreibt unter anderem die Klonierung einer Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Arabidopsis thaliana* (DUAN H *et al*, 2004).

### 2.3 Vorkommen

Sowohl in Pflanzen, Tieren, Hefen als auch in Bakterien sind Cytochrom P450-Enzyme identifiziert worden. Bis heute sind 57 humane P450s bekannt; in der Maus wurden 102 P450s identifiziert und im Hund konnten bis dato 54 P450s nachgewiesen werden. Eine weitaus größere Anzahl an P450s ist in den pflanzlichen Vertretern lokalisiert. *Arabidopsis thaliana* weist 273 Gene auf, die für Cytochrom P450-Enzyme codieren, wobei dieses Faktum wahrscheinlich auf Gen-Duplikationen im Verlauf der Evolution zurückzuführen ist (PAQUETTE S *et al*, 2000). In Bakterien sind sogar über 500 Cytochrom P450-Sequenzen bekannt (NELSON D, 2004). Die löslichen P450s aus den Bakterien haben eine Länge von etwa 400 Aminosäuren, während die membrangebundenen P450s zumeist etwa 500 Aminosäuren aufweisen und damit auf ein Molekulargewicht von etwa 54 kDa kommen.

### 2.4 Nomenklatur

Die Einordnung der Cytochrom P450-Enzyme ist an der Bezeichnung des jeweiligen Enzyms abzulesen. CYP steht als Symbol für Cytochrom P450-Enzym, eine folgende Ziffer gibt die Zugehörigkeit zu einer Familie an. Unterfamilien sind durch den darauf folgenden Buchstaben gekennzeichnet und die letzte Ziffer steht für die Isoform. Jede Isoform ist das Produkt eines separaten Gens. Diese Gene können innerhalb einer Unterfamilie beträchtliche Sequenzhomologien aufweisen. Manchmal können DNA-Sequenzen mehr als 95% identisch sein. Ist eine Isoform polymorph und zeigt Unterschiede bezüglich der Substratumsetzung, wird dies durch einen Stern, gefolgt von einer Nummer gekennzeichnet. Zum Beispiel steht die Bezeichnung CYP2D6\*1 für einen „guten Metabolisierer“ der Variante

CYP2D6. Enzym-Polymorphismus ist eine weit verbreitete Eigenschaft der CYP-Superfamilie. Polymorphismen sind vererbbar und der Hauptgrund für inter-individuelle und ethnisch differierende Metabolisierungsraten von Arzneistoffen. Alleine von CYP2D6 sind über 60 Polymorphismen bekannt (TREDGER J, 2002). Die vielen verschiedenen Isoformen der menschlichen Cytochrome CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 sind verantwortlich für den Hauptanteil der Arzneistoffmetabolisierung. Sie sind an der oxidativen Verstoffwechslung von Medikamenten beteiligt, von denen sich mehr als 90% in der klinischen Anwendung befinden (WILLIAMS P *et al*, 2003).

Die gesamte Protein-Superfamilie der P450s weist indessen eine sehr große Verschiedenheit bezüglich der Identitäten ihrer Gensequenzen auf. Es kann bisweilen eine Identität von nur bis zu 20% gegeben sein. Folglich herrscht auch eine große Variabilität bezüglich der Primärsequenz vor. Trotzdem wurde anhand von Kristallstrukturen gezeigt, dass bezüglich der Sekundär- und Tertiärstruktur eine relativ hohe Konservierung besteht (PODUST L *et al*, 2001) (WILLIAMS P *et al*, 2000).

## 2.5 Lokalisierung in der Zelle

In Bakterien sind Cytochrom P450-Enzyme nur als lösliche Enzyme anzutreffen. Ein Beispiel ist CYP176A1 aus *Citrobacter braakii*, im Jahr 2004 von MEHARENNYA Y *et al* kristallisiert und charakterisiert.

In Eukaryonten dagegen liegen sie als membrangebundene Enzyme vor und sind hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien lokalisiert. Dessen ungeachtet gibt es Berichte über Vorkommen von pflanzlichen P450s, die in der Plasmamembran (KJELLBOM P *et al*, 1985) oder der Provacuole (MADYASTHA K *et al*, 1977) lokalisiert sind. Auch die N-terminalen Sequenzen von CYP74 und CYP79B2/3 ähneln stark den Transit-Peptiden für ein Chloroplast-targeting (SONG W *et al*, 1993; HULL A *et al*, 2000).

## 2.6 Strukturelle Merkmale

Molekülstrukturen, die ohne Ausnahme in jedem P450 zu finden sind, sind die stark konservierten Bereiche. Diese Aminosäuren haben wichtige Funktionen bezüglich Struktur, Funktionserhalt und Membraneinbindung.

Die Membraneinbindung des ganzen Proteins erfolgt über einen im Vergleich zum restlichen Molekül kleinen Membrananker. Dieser Membrananker zeichnet sich durch seine Lipophilie aus, wohingegen der restliche Molekülteil nach außen hin einen hydrophilen Charakter aufweist. Durch Modifizierung oder sogar Eliminierung des Ankers kann die Löslichkeit des resultierenden P450 gezielt für Struktur-Studien beeinflusst werden (MAST N *et al*, 2004). Er ist normalerweise als hydrophobe  $\alpha$ -Helix dafür verantwortlich, dass das gesamte Protein in der Membran verankert ist, kann aber auch die Zellfunktion unmittelbar über seine Aminosäureabfolge beeinflussen. Zum Beispiel kommt es in *HepG2*-Zellen, in denen nur der N-terminale Membrananker eines bestimmten Cytochrom P450-Enzyms überexprimiert wurde, zur Induktion von NF $\kappa$ B (SZCZESNA-SKORUPA E *et al*, 2004).

Im Anschluss an den Membrananker kommt ein für membrangebundene P450s typisches Tetrapeptid, die Prolinreiche Sequenz **P-P-G-P**. Sowohl Prolin als auch Glycin sind beides Helix-Brecher. Diese Region wird in der Fachliteratur allgemein als eine Peptidsequenz mit einer „Scharnier“-Funktion angesehen, die für die korrekte Orientierung des Enzyms zur Membran zuständig und wichtig für Häm-Einbindung und Stabilität des Cytochrom-P450-Enzyms ist (SZCZESNA-SKORUPA E *et al*, 1993). Die am stärksten konservierten Bereiche der P450s sind die Häm-Binderegion und die K-Helix. Die Häm-Binderegion (**F-X-X-G-X-X-X-C-X-G** und **P-E-R-F**) liegt etwa 50 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Proteins entfernt und enthält immer Cystein, über das die kovalente Bindung zum Eisen-Atom der Häm-Gruppe hergestellt wird. Die **P-E-R-F**-Region sorgt wahrscheinlich zusammen mit der K-Helix dafür, dass die optimale Konformation der Cystein-Tasche und damit die Assoziation mit der Häm-Gruppe gewährleistet ist (HASEMANN C *et al*, 1995). Sehr wichtig für die katalytische Reaktivität ist die Konsensus-Sequenz **(A/G)(A/G)X(E/D)T(T/S)**. An ihr findet die Sauerstoffbindung und dessen Aktivierung für die folgende Reaktion statt (MORI S *et al*, 2004).

Die Gesamt-Struktur eines P450 weist in der Regel zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf, die sehr konserviert sind. Das erste  $\beta$ -Faltblatt besteht aus fünf Strängen und das zweite aus zwei Strängen. Diese beiden Faltblattstrukturen bilden

einen hydrophoben Kanal, über den das Substrat zum aktiven Zentrum des Enzyms gelangt (GRAHAM S UND PETERSON J, 1999). Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass mehrere Kanäle innerhalb des Moleküls bestehen, die von unterschiedlichen Verbindungen frequentiert werden. So sollen Kanäle nur für Substrat- und/oder Produkt-Verkehr und andere für Sauerstoff oder Wasser zuständig sein (MORI S *et al*, 2004).

Die Aufklärung der 3D-Strukturen von Proteinen wird immer wichtiger. Die Methoden reichen hier von der Röntgenstrukturanalyse von P450s (WILLIAMS P *et al*, 2003) bis hin zu NMR-gestützten 3D-Analysen (WU J *et al*, 2003) (RUAN K *et al*, 2002).

## 2.7 Identifizierung von Cytochrom P450-Enzymen

Die Identifizierung der P450s über den Weg der Proteinreinigung ist aufgrund ihrer Lipophilie und der Einbettung in natürliche Membranen nur schwierig durchzuführen. Es gelingt nur in Einzelfällen, Cytochrom P450-Enzyme in aktiver Form aus pflanzlichem Material oder aus Suspensionszellkulturen zu isolieren und vor allem zu reinigen. Der Versuch von RUPPERT M, die Vinorin-Hydroxylase aus Suspensionszellkulturen von *Rauvolfia* in aktiver Form aufzureinigen, ist nicht gelungen. Daher liegt es nahe, die Aufklärung auf molekularbiologischem Wege anzugehen. Aus den in 2.6, S. 11 ersichtlichen, konservierten Konsensus-Sequenzen können degenerierte Primer synthetisiert werden. Mit ihrer Hilfe kann über den Weg spezieller PCR-Methoden der Vollängenklon ermittelt werden. Im Anschluss daran sollte der gefundene Klon heterolog exprimiert und auf die gesuchte Vinorin-Hydroxylase-Aktivität mittels HPLC-gestütztem Assay und Massenspektrometrie geprüft werden. Im enzymologischen Laboralltag sind die verschiedenen chromatographischen Methoden in Verbindung mit massenspektrometrischer Substanzidentifizierung mittlerweile elementar für die Untersuchung enzymatischer Umsetzungsreaktionen und Inhibitorstudien (UNGER M UND FRANK A, 2004).

Eine weitere aber sehr kostspielige Variante, gesuchte Gene zu erforschen, ist mit Sicherheit die Sequenzierung einer cDNA-Bank nach dem Zufallsprinzip. Zwar hat JENNEWEIN S(a) *et al* 2004 nach eigenen Angaben mehrere wichtige Gene der Taxol-Biosynthese auf diese Weise gefunden,

doch ist das sicherlich nicht die Methode der Wahl, betrachtet man die aktuelle Preissituation für eine Standardsequenzierung.

## 2.8 Expressionssysteme

RUPPERT M hat vier P450-Klone aus *Rauvolfia serpentina* isoliert, jedoch erfolglos versucht in *E. coli* zu exprimieren. Das gibt Grund zur Annahme, dass das gewählte prokaryotische Expressionssystem nicht die optimalen Bedingungen bietet, um die ermittelten CYP-Klone in aktiver Form zu exprimieren. Ein wichtiges Ziel ist es daher, ein Expressionssystem zu finden, mit dem P450-Gene aus *Rauvolfia* aktiv exprimiert werden können. Ein Schritt in diese Richtung könnte die Expression der gesuchten Membranproteine in einem eukaryotischen System darstellen. In diesen Expressionssystemen besteht wahrscheinlich eher als in Bakterien die Chance, dass membrangebundene Exprimite in aktiver Form erhalten werden können.

Ein häufig für die Expression von P450s benutztes System stützt sich auf *Sf9*-Insektenzellen als Wirtssystem und dem Baculovirus als Expressionsvektor und Träger des GOI. Der rekombinante Baculovirus infiziert die Insektenzellen und sorgt neben seiner eigenen Vervielfältigung dafür, dass die Wirtszellen das gewünschte Protein produzieren. Insektenzellen sind in der Lage eine Vielzahl verschiedener P450s zu exprimieren. Schon 1995 exprimierten KRAUS P UND KUTCHAN T ein pflanzliches P450 heterolog in Insektenzellen. Und auch in jüngerer Zeit hat die Zahl der in Insektenzellen exprimierten P450s stetig zugenommen (siehe Diskussion V2.2, S. 119).

Eine weitere attraktive Möglichkeit ist die Überexpression der gesuchten pflanzlichen Proteine in einem pflanzlichen Wirtssystem wie *Nicotiana benthamiana*. Pflanzen können als eine kosteneffektive Alternative zur mikrobiellen Fermentation für die Produktion hoher Ausbeuten an therapeutischen Proteinen und Antikörpern angesehen werden. Zugleich dienen diese Systeme auch dazu, im Labormaßstab in Verbindung mit viralen Systemen die Erforschung gesuchter Proteine zu unterstützen, vielleicht erst zu ermöglichen. Hier ist als pflanzlicher Expressionsvektor zur Zeit der Virus Tobacco Mosaic Virus (TMV) aus der Gruppe der Tobamoviren sehr populär. Modifizierte Formen des TMV wurden benutzt, um

Fusionsproteine mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) herzustellen und so neue subzelluläre Adressen von Proteinen zu identifizieren. Hierbei erkannte man im gleichen Zuge Proteine, die mit Plasmodesmata interagieren (MEDINA-ESCOBAR N *et al*, 2003).

Neueste Ergebnisse zeigen, dass der TMV nicht nur als Expressionsvektor fungieren kann, sondern auch auf ganz andere Art und Weise einsetzbar ist. Der TMV wird in diesem Falle mit einer Modifikation auf dem Coat-Protein versehen. Dieser *Tag* sitzt auf der Protein-Hülle des Virus und ermöglicht so eine Reinigung ähnlich der His-Tag-Affinitätschromatographie, wobei der modifizierte TMV in diesem Falle als die Matrix fungiert (NEGROUK V *et al*, 2004). Ferner dient der TMV vielen Wissenschaftlern als „*tool*“. Mit seiner Hilfe können pathologische Vorgänge in Pflanzenzellen eingehend untersucht werden (CHAERLE L *et al*, 2004) (KURIHARA Y *et al*, 2004).

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Vinorin-Hydroxylase (siehe Abbildung 3: Biosyntheseweg des Antiarrhythmikums Ajmalin, S. 6) zunächst auf der Ebene der Nucleinsäuren und daraus folgend auf der Ebene der Aminosäuren strukturell und funktionell aufzuklären. Im Zuge dessen sollen zwei unterschiedliche eukaryotische Expressionssysteme für Cytochrom P450-Enzyme etabliert werden.

Zunächst soll die Expression in Insektenzellen auf die Gewinnung von rekombinanten, pflanzlichen P450s hin ausgerichtet werden, um P450-Klone auf deren Funktionalität und Identität testen zu können. Die gleiche Zielrichtung soll bei der Etablierung eines pflanzlichen Expressionssystems verfolgt werden. Dieses System soll außerdem ein schnelles *screening* von ermittelten Cytochrom P450-Klonen und anderen Enzymen der Indolalkaloidbiosynthese aus *Rauvolfia serpentina* ermöglichen.

Ich habe versucht, im Rahmen der Einleitung dieser Dissertation einen Einblick in die Hintergründe der Forschung unserer Arbeitsgruppe zu geben und daraus den direkten Bezug zu meinem eigentlichen Forschungsfeld herzuleiten. Überdies soll die Zusammenstellung der Informationen über Cytochrom P450-Enzyme dazu dienen, die Problematik dieser Enzym-Superfamilie zu verdeutlichen, um damit die Notwendigkeit neuer Expressionssysteme zu begründen.

Es folgt nun der Material- und Methodenteil mit wichtigen Hintergrundinformationen für die durchgeführten Experimente. Im Anschluss daran erläutere ich in zeitlich geordneter Reihenfolge die Ergebnisse der Tests und Versuchsreihen und lege dabei auch die Funktionsweise der verschiedenen Expressionssysteme im Detail dar. Am Ende steht die Diskussion der erzielten Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung aktueller Forschungsergebnisse.



---

## II Material

### 1 Biologisches Material

#### 1.1 Pflanzen

Die *Nicotiana benthamiana* (L.) Samen werden zunächst als Lichtkeimer in einem kleinen Gewächshaus bei 25 °C und nahezu 100% Luftfeuchte zum Auskeimen gebracht und bis zu einer Größe von etwa 4-5 cm bei ca. 25 °C und ca. 6000 Lux bei stetiger Feuchtigkeit kultiviert. Nach Erreichen dieser Größe werden die Einzelpflanzen in größere Behältnisse überführt und bis zu einer Größe von etwa 15-20 cm unter analogen Bedingungen kultiviert, um in diesem Stadium bereit für die Infiltration mit *Agrobacterium tumefaciens* zu sein. Die Pflanzen reagieren sehr empfindlich auf Trockenheit und starke Temperaturschwankungen. Daher muss dauerhaft auf relativ konstante Wachstumsbedingungen geachtet werden.

#### 1.2 Zellsuspensionskulturen

Die Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth., Linie T<sub>30</sub>, R.s. 02, R.s. Braunschweig, wurden der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Mainz entnommen. Die T<sub>30</sub>-Linie wurde ursprünglich am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität München (Prof. Dr. M. H. Zenk) aus einer Kalluskultur angelegt. Die übrigen Linien sind am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz aus den jeweiligen Kalluskulturen angelegt worden. Die Zellsuspensionskultur von *Nicotiana tabacum* (L.) wurde ebenfalls am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg-Universität aus Kalluskulturen kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte in keimfreien, mit Schaumgummistopfen verschlossenen 1 Liter Erlenmeyerkolben in 400 ml LS-Kulturmedium (LINSMAIER E UND SKOOG F, 1965) unter Zusatz von  $1 \times 10^{-6}$  mol/l 1-Naphthylessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bei pH 5.7 auf Rotationsschüttlern bei 100 rpm. Die Kulturen werden 24 h pro Tag bei ca. 6000 Lux und durchschnittlich 24°C gehalten. Da sich die Zellmasse innerhalb von sieben Tagen verdoppelt, werden am siebten Tag unter

sterilen Bedingungen 200 ml der Zellmasse entnommen und in die gleiche Menge frisches Medium eingebracht.

Die Zellen der Suspensionskultur wurden mittels Vakuumfiltration durch ein Polyamidnetz (Maschenweite 60  $\mu\text{m}$ ) geerntet und die abfiltrierten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Erfolgte die weitere Verarbeitung nicht unmittelbar im Anschluss, wurde das Pflanzenmaterial in Kunststoffbeuteln verschweißt. Bei Verwendung der Zellen für eine Enzymisolierung/ Mikrosomen-Präparation erfolgt die Lagerung bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bei der Verwendung für eine RNA-Isolierung erfolgt die Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Durch noch zu untersuchende Umstände zeigen unterschiedliche Zelllinien teilweise unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivitäten bestimmter Enzyme. Aus diesem Grund werden unterschiedliche Zelllinien gleicher Ursprungspflanzen im gleichen Wachstumsstadium bei der Ernte vereinigt, um so eine möglichst konstante Enzymausbeute zu gewährleisten. Die erhaltene Mischung wird ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und analog den übrigen Suspensionskulturen behandelt.

### **1.3 Eukaryotische Zelllinien: Insektenzellen**

Zur Herstellung und Vermehrung rekombinanter Baculoviren und zur Überexpression rekombinanter Cytochrom-P450 Enzyme wurde ein System verwendet, das auf der Expression in Insektenzellen beruht. Die Insektenzelllinie sf9 (ATCC CRL-1711) basiert auf *Spodoptera frugiperda* Ovarzellen und ist von Invitrogen (Karlsruhe) zu beziehen. Die Zellen besiedeln den Boden der verwendeten Zellkulturflaschen rasenartig und verdoppeln sich innerhalb von 48 Stunden. Das Überimpfen in neue Zellkulturflaschen erfolgt demnach nach 48 Stunden unter Laminar-Flow-Bedingungen. Zunächst wird das alte Medium mittels Membranpumpe abgesaugt. Die Hälfte einer Kultur vom Boden der Zellkulturflasche wird mit einem Zellschaber abgekratzt und dann mit einer Pipette in die neue Zellkulturflasche überführt, um dort mit neuem Medium versetzt zu werden. Sind die Insektenzellen nur zur Stammerhaltung zu kultivieren, werden 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen verwendet. Sollten die Kulturen für ein bevorstehendes Expressionsexperiment gebraucht werden, so sind 175  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen zu benutzen.

## 2 Bakterien-Stämme

### 2.1 *Escherichia coli* Stämme

Bei allen verwendeten Bakterien handelt es sich um Sicherheitsstämme, die nach den Einstufungen der ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) zur Verwendung in gentechnischen Laboren der S1-Klasse zugelassen sind. Die Kulturen werden in der Regel bei unmittelbarer Verwendung direkt von der LB-Agar-Platte gepickt, um in Flüssigkulturen mit den jeweils notwendigen Bedingungen (Antibiotika, Marker) überimpft und den notwendigen versuchsrelevanten Konditionen (Temperatur, Zeit, rpm) kultiviert zu werden.

**Tabelle 1: Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp
Top10F' ( <i>E. coli</i> )	F' <i>{lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)}</i> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nup</i>
M15[pREP4] ( <i>E. coli</i> )	<i>E. coli</i> K12 (Nal <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup> )
DH10BAC ( <i>E. coli</i> )	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda$ - <i>rpsL</i> <i>nupG/</i> bMON14272/ pMON7124
DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> )	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> -M15 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> , <i>hsdRI7</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> , <i>m<sub>K</sub></i> ) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> -( <i>lacZYAargF</i> ) U169
XL1-Blue MRF' ( <i>E. coli</i> )	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

### 2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Der Stamm *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurde im Rahmen einer Kooperation von Icon Genetics (Halle) übernommen. Dieser Stamm verfügt über eine Rifampicinresistenz, die auf dem modifizierten Ti-Helferplasmid

lokalisiert ist. Die Agrobakterien sind bei 28 °C zu kultivieren statt der bei Bakterien üblichen 37 °C. Dadurch verlängert sich die Wachstumsphase, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht ist.

### 3 Vektoren

Alle genannten Vektoren wurden via Internet über die zugehörigen Hersteller bezogen. Sie werden in der Regel entsalzt und gereinigt geliefert. Die Vektoren der Firma Icon Genetics wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes direkt von Halle nach Mainz überführt.

**Tabelle 2: Vektoren**

pGEM-T Easy (Promega)	Linearisierter Klonierungsvektor mit ca. 3,0 kb; Thymidinüberhang zur einfachen Einklonierung von PCR-Produkt mit Taq Ampicillinresistenz T7, Sp6 RNA-Polymerase-Promotor
pQE60 (Qiagen)	ATG Vektor mit 3,4 kb, Schnittstellen: NcoI, BamHI, BglII lowcopy-Plasmid, der Familie der pDSPlasmide zugehörig, ermöglicht die Expression von C-terminalen (His) <sub>6</sub> -tag- Enzymen und damit die Reinigung über Ni-NTA-Säulen Ampicillinresistenz, IPTG-induzierbar T5
pQE70 (Qiagen)	ATG Vektor mit 3,4 kb, Schnittstellen: SphI, BamHI, BglII lowcopy-Plasmid, der Familie der pDSPlasmide zugehörig ermöglicht die Expression von C-terminalen (His) <sub>6</sub> -tag- Enzymen und damit die Reinigung über Ni-NTA-Säulen Ampicillinresistenz, IPTG-induzierbar T5
pICH10990 (Icon Genetics, Halle)	3'-Modul Expressionsvektor mit ca. 6,4 kb BsaI-Schnittstelle direkt an splicing region AGGT Träger des Gene of interest (GOI) Carbenicillinresistenz

<p>plCH11599 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>3'-Modul Expressionsvektor mit ca. 6,4 kb NcoI-Schnittstelle für Klone die NcoI-Restriktionsschnittstelle am Startcodon aufweisen Träger des GOI Carbenicillinresistenz</p>
<p>plCH7410 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>3'-Modul Expressionsvektor mit ca. 7,1 kb GFP-Träger, Markerfunktion für Status der Expression Carbenicillinresistenz</p>
<p>plCH 8420 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>5'-Modul Expressionsvektor mit ca. 12,6 kb Apoplast-targeting Carbenicillinresistenz</p>
<p>plCH13480 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>5'-Modul Expressionsvektor mit ca. 10,9 kb Apoplast-targeting Kanamycinresistenz</p>
<p>plCH10530 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>5'-Modul Expressionsvektor mit ca. 12,7 kb Chloroplast-targeting Carbenicillinresistenz</p>
<p>plCH10570 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>5'-Modul Expressionsvektor mit ca. 12,5 kb unverändert, d.h. targeting mit GOI-eigener Zielsequenz Carbenicillinresistenz</p>
<p>plCH10881 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>Integrase für Zusammenbau des 3'- und 5'-Modul in Pflanze mit ca. 12,2 kb Rekombinase, Arabidopsis actin 2 Promotor Kanamycinresistenz</p>
<p>plCH14313 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>Integrase für Zusammenbau des 3'- und 5'-Modul in Pflanze mit ca. kb 11 kb Rekombinase, Spm transposase Promotor Kanamycinresistenz</p>
<p>plCH11280 (Icon Genetics, Halle)</p>	<p>5'-Modul Expressionsvektor mit ca. 12,6 kb ermöglicht die Expression von N-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag-Enzymen und damit die Reinigung über Ni-NTA-Säulen Carbenicillinresistenz</p>

pFASTBAC1 (Invitrogen, Karlsruhe)	Expressionsvektor mit 4,8 kb Träger des GOI und Vorstufe des rekombinanten Baculovirus in Form des sogenannten Donorplasmids Polyhedrin Promotor für Expression in sf9-Zellen Mini-Tn7 Ampicillin- und Gentamycinresistenz
---	---

## 4 Virusstämme

Die verwendeten Virusstämme sind modifiziert, um sie als „shuttle“ eines Gens in den gewählten Wirtsorganismus zu benutzen, in dem die eigentliche Überexpression induziert wird. Sie sind nicht infektiös für Vertebraten und können ebenfalls in Laboratorien der S1-Klasse verwendet werden.

### 4.1 Baculovirus

Rekombinante Baculoviren werden als Vektoren genutzt, um Gene in kultivierten Insektenzellen oder Insektenlarven heterolog zu exprimieren. Die zu exprimierenden Gene stehen unter der Kontrolle des Polyhedrin Promotors (*polh*) von *Autographa californica polyhedrosis virus* (AcNPV).

### 4.2 Tobacco Mosaic Virus (TMV)

Der rekombinante Tobacco Mosaic Virus funktioniert ebenfalls als Basis-Vektor für ein zu exprimierendes Gen. Die erforderlichen Module und das Know how für den „Zusammenbau“ der Wirkform des Vektors in der Pflanze konnten im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes bei der Firma Icon Genetics (Halle) nach Mainz in die Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg Universität überführt werden.

## 5 Sterilisation der Medien

Die Sterilisation der Kulturmedien erfolgt entweder durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und gesättigtem Wasserdampf oder durch Sterilfiltration in einer Sterilwerkbank unter Verwendung von Filtern mit 0,22 µm Porengröße.

## 6 Bakterienmedien

LB-Medium, nach Sambrook *et al.*, (1989)

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 1 g/l NaCl, pH 7,0

Bei Kulturplatten erfolgt die Zugabe von 15 g/ Agar.

Antibiotikazusätze:

50 bis 100 µg/ml Ampicillin in H<sub>2</sub>O

50 bis 100 µg/ml Carbenicillin in H<sub>2</sub>O

20 bis 50 µg/ml Rifampicin in DMSO

10 µg/ml Tetracyclin in EtOH

50 µg/ml Kanamycin in H<sub>2</sub>O

7 µg/ml Gentamycin in H<sub>2</sub>O

## 7 Insektenzellmedien

### 7.1 Sf9-Medium

Die Kultivierung der Zellen wurde in sterilen Zellkulturflaschen unter Verwendung eines speziellen sf9-Insektenzellnährmediums (BD Bioscience, Katalognummer 554760) durchgeführt. Es enthält das Antibiotikum Kanamycin, wogegen die sf9-Zellen eine Resistenz besitzen. Es soll die Kontamination mit Fremdorganismen gering halten.

### 7.2 T-3160

Dieses Medium wurde bei der Transfektion (siehe III.3.15.1, S. 59) der Insektenzellen eingesetzt. Es enthält keine Antibiotika und kein FCS. Das Fehlen dieser Substanzen ist wichtig für das Gelingen der Transfektion, da die Insektenzellen bei diesem Vorgang durch Detergenzien strapaziert werden und überflüssige Reize zur Sicherstellung ihres Überlebens vermieden werden sollten.

## 8 Puffer

Die Puffer wurden nach Herstellung durch Autoklavieren oder Sterilfiltration analog den Kulturmedien sterilisiert. Manche Puffer wurden gegebenenfalls in zehnfacher oder fünfzigfacher Konzentration angesetzt, um eine Stammlösung zu erhalten, die bei Bedarf zur gewünschten Lösung mit Seralwasser verdünnt wurde. Einige Puffer mussten ganz frisch angesetzt werden, um der Stabilität der Ingredienzen gerecht zu werden. Der pH-Wert wurde, wenn erforderlich, mit NaOH/ KOH oder HCl/ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ HOAc eingestellt.

MOPS [pH 7,0]	20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
TAE	40 mM Tris/Acetate, 1 mM EDTA [pH 8,0]
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [pH 7,5]
Ni-NTA-Lade-Puffer [pH 8,0]	300 mM NaCl, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Imidazol
Elutions-Puffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 250 mM Imidazol, [pH 8,0]
	Bemerkung: wg. Imidazol frisch ansetzen
Aufschlusspuffer 0 (A0)	300 mM NaCl, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [pH 6,8]
Aufschlusspuffer 1 (A1)	100 mM Tris/HCl, 10 mM KCl, 20 mM MSH [pH 8,5]
Aufschlusspuffer 2 (A2)	100 mM Tris/HCl, 20% (m/V) Saccharose, 10 mM KCl, 20 mM MSH [pH 8,5]
Aufschlusspuffer 3 (A3)	150 mM NaCl, 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [pH 7,2] 10mM EDTA, 10mM EGTA, 1mM PMSF, 0,05% Triton-X-100, Bemerkung: wg. PMSF frisch ansetzen
Aufschlusspuffer 4 (A4)	Ni-NTA-Ladepuffer mit 0.05% Triton-X
Infiltrationspuffer	10 mM MES, 10 mM MgSO <sub>4</sub> [pH 5,5]
Puffer 1-4	Standard-Puffer von NEB für Restriktionsverdau



## 9 Säulen

Tabelle 3: Säulenmaterialien, alphabetisch nach Hersteller

Hersteller	Produkt
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Leersäule: HR 10/ 10
Macherey&Nagel (Düren)	Lichrospher 60 RP select B coloumn
Quiagen (Hilden)	Ni-NTA-Agarose, Ni-NTA Superflow, gepackt
Sigma (Deisenhofen)	G25

## 10 Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 4: Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologie, alphabetisch nach Produkt

Produkt	Firma
Advantage-Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, USA)
Agarose, rein für Molekularbiologie	Peqlab (Erlangen)
dNTP's	Promega (Madison, USA)
Gene Racer Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
Nucleo Spin/ Extract Kit	Macherey&Nagel (Düren)
Peq GOLD RNA pure <sup>TM</sup>	Peqlab (Erlangen)
Pfu Turbo-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
Restriktionsendonukleasen	Gibco (New England Biolabs)
RNase A	Sigma (Deisenhofen)
Smart Ladder	Eurogentec (Seraing, Belgien)
T4-DNA Ligase	Promega (Madison, USA)
Taq DNA-Polymerase	Gibco (New England Biolabs)

## 11 Chemikalien und Zubehör

Tabelle 5: Chemikalien und Zubehör, alphabetisch nach Hersteller

Hersteller/Lieferant	Produkte
Aldrich (Taufkirchen)	trans-Zimtsäure, Carbenicillin, Rifampicin
Amicon (Witten)	Microcon-, Centricon- und Centriprep-Konzentratoren (YM-10)
AppliChem (Darmstadt)	Antibiotika und Feinchemikalien v.a. für Molekulare Biologie, sowie LowEEO Agarose, NADPH
Biozym (Hess. Oldendorf)	PCR-Gefäße, Reaktionsgefäße
Fresenius (Bad Homburg)	Ampuwa (Wasser für die Molekularbiologie)
Fischer Scientific (Schwerte)	Falkon-Röhrchen
ICN (Eschwege)	SDS
Intermedica (Klein-Winternheim)	Halbmikroküvetten
Life Technologies (Eggenstein)	Hefe-Extrakt, Pepton, Agar
Merck (Darmstadt)	Acetonitril und MeOH für die HPLC, Dichlormethan, Feinchemikalien, DC-Platten, Greiner-Röhrchen
Nalgene (Hamburg)	Sterile Kultur- und Zentrifugenröhrchen
Roth (Karlsruhe)	Trypton, Lagerboxen für Eppendorf-Caps
Sarstedt (Nümbrecht)	Pipettenspitzen
Schleicher & Schüll (Dassel)	Rundfilter Protran 0.45 µm
Serva (Heidelberg)	Nitrocellulosemembranen NC 0.45 µm Porendurchmesser, Servapor Dialyseschläuche mit 9, 16 und 29 mm Ø; Coomassie Brilliant Blue G-250/R-250
Sigma (München)	Feinchemikalien

Alkaloidsammlung des Lehrstuhls der Pharmazeutischen Biologie (Mainz)	Sämtliche verwendete Alkaloide, v. a.: Vomilenin, $2\alpha$ -(S)-1.2-Dihydrovomilenin, $2\beta$ -(R)-17-O-Acetylnorajmalin, Velloimin, Polyneuridinaldehyd
---	---

## 12 Geräte

Tabelle 6: Geräte, alphabetisch nach Gerät

Geräte	Ausstattung und Herkunft
Agarosegel-Dokumentation	UV-Transilluminator / 302 nm (Bachhofer, Reutlingen)
Bakterienzellaufschluss	Sonotrode Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlin)
Computergestützte Dokumentation	Flachbettscanner Highscan, Highscreen
Elektrophorese	Horizontalelektrophoresekammern: BlueMarine 100 und 200 (Serva, Heidelberg) und COMPHOR Midi Elektrophoresekammer; 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)
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6 (Fa. Christ, Osterode), mit Vakuumpumpe von AEG: Typ ADEB71N4R3

HPLC-Untersuchungen	<p>Merck-Hitachi-System (Darmstadt):</p> <p>Integrator D-2500</p> <p>Autosampler AS-2500</p> <p>UV/VIS-Detektor L-4250</p> <p>Pumpe L-6500</p> <p>Säule: LiChrospher 60 RP select B (5µm), 250mm</p> <p>Vorsäule: Select B</p>
Mixen	Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim)
MS	Massenspektrometer Modell MAT 44 S (Finnigan, Bremen)
OD-Bestimmung	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
pH-Einstellung	pH-Meter 537 und DIGI 500 (WTW, Weilheim), 761 Calmatic (Bacherhofer, Reutlingen)
Proteinreinigung	<p>a.) Reinigung mit Peristaltikpumpen:</p> <p>IPC-Pumpe (ISMATEC, Basel/Schweiz)</p> <p>UV/VIS-Detektor: 2158 UVICORD SD (LKB BROMMA, Schweden)</p> <p>Schreiber: REC 102 (Pharmacia LKB, Freiburg)</p> <p>b.) Reinigung mit Äkta-Explorer:</p> <p>System von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bestehend aus:</p> <p>2 Pumpen P-900</p> <p>Durchflußzellen mit 22 µl und 88 µl Volumen zur Messung von Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit</p> <p>UV/VIS-Monitor UV-900</p> <p>Betrieb der Anlage erfolgte im MaxiColdLab-Kühlschrank (LKB, Schweden) bei 4 °C</p> <p>Steuerung, Kontrolle und Auswertung wurde mit</p>

	<p>einem Pentium 133-MHz PC Compac durchgeführt (Software: UNICORN Control System; Betriebs- System OS/2 Warp, IBM), Drucker: HP Deskjet 690 C, HP Laser 1300</p>
Pflanzenzell-Aufschluss	Ultraturrax TP 18/10 (IKA, Stauffen)
Reinstwasser	Seralpur PRO 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach)
Steriles Arbeiten	Laminar-Flow-Box (Fröbel Labortechnik, Lindau), NU 440 - 400E (Zapf, Sarstedt), Klinik-Flow-Box
Temperieren	<p>Pyrogene Thermocyclers (thermo-DUX, Wertheim) sowie Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) Schüttelinkubatoren 1083 und 3032 (GFL, Burgwedel) Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg) Wasserbad F20 HC (Julabo, Seelbach) Brutschrank (Mettler, Schwabach) Thermoshake (Gerhardt, Bonn)</p>
Ultraschallwasserbad	SONOREX RK 510 S (Bandelin, Berlin)
UV-Spektroskopie	Lamda 2-Spektrometer, (Perkin-Elmer, Überlingen)
Zentrifugieren	<p>Kühlzentrifuge J2-21, Rotoren JA 10, JA 20 (Beckmann, München) 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)</p>

## III Methoden

### 1 Proteinchemische Methoden

#### 1.1 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Bestimmung von Proteinen wird modifiziert nach BRADFORD M (1976) durchgeführt. Dazu werden 100 µl Proteinlösung in Halbmikroküvetten mit 900 µl Coomassie-Reagenz (MEYERS T UND LAMBERTS B, 1965) vermischt und nach 5 min die Absorption bei 595 nm gegen eine Kontroll-Lösung, welche 100 µl Pufferlösung enthält, gemessen. Eine Eichgerade kann mit BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration erstellt werden. Die Proteinkonzentration der Probenlösung sollte im linearen Bereich von 10-100 µg/ml liegen, um die Genauigkeit der Methode zu gewährleisten.

Coomassie-Reagenz: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 werden in 50 ml Ethanol (96%) und 100 ml Phosphorsäure (85%) gelöst, anschließend mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und filtriert. Die Lösung kann bei 4°C über mehrere Monate stabil gelagert werden.

#### 1.2 Mikrosomen-Isolierung

Die Mikrosomen-Isolierung unterscheidet sich je nach Ursprungsorganismus der zu isolierenden Membranproteine. Allen gemeinsam ist die Kühlung nach dem Zellaufschluss und die Fällung mit MgCl<sub>2</sub>.

##### 1.2.1 Mikrosomen-Isolierung aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Die abfiltrierten und in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Pflanzenzellen aus der Suspensionskultur werden in einer IKA-Universalmühle fein gemahlen und danach in der gleichen Menge Puffer A2 [x ml A2 zu x g Zellmaterial] aufgenommen. Nach dem Auftauen und anschließendem 15 minütigen Rühren bei 4°C wird der Extrakt durch vier Lagen Mull gepresst und das Filtrat 30 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

Die pflanzlichen Mikrosomen werden nach der Vorschrift von DIESPERGER H *et al* (1974) aus dem Rohextrakt gewonnen. Dazu wird unter langsamem Rühren eine  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (1 M) bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugetropft. Nach sechzigminütigem Rühren bei 4°C wird die Probe für eine Stunde bei 4°C und mit  $38.000 \times g$  zentrifugiert. Der Niederschlag wird in möglichst wenig A2 aufgenommen und mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Der Proteingehalt sollte zwischen 5 und 20 mg/ml liegen. Dies wird mit dem Bradford-Test bestätigt.

### 1.2.2 Mikrosomen-Isolierung aus *Nicotiana benthamiana*

Die Blätter von *Nicotiana benthamiana* werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser so fein wie möglich homogenisiert, um danach in der gleichen Menge Puffer A2 [x ml A2 zu x g Zellmaterial] aufgenommen zu werden. Nach dem Auftauen und anschließendem 15 minütigem Rühren bei 4°C presst man den Extrakt ebenfalls durch vier Lagen Mull und zentrifugiert das Filtrat 30 min bei 4°C und 13.000 g. Das Pellet wird verworfen und der Überstand zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

Diese Mikrosomen aus der Pflanze werden nach der Vorschrift von DIESPERGER H *et al.* (1974) aus dem erhaltenen Rohextrakt gewonnen. Zu diesem wird unter langsamem Rühren die  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (1 M) bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugetropft. Nach sechzigminütigem Rühren bei 4°C wird die Probe für eine Stunde bei 4°C und mit  $38.000 \times g$  zentrifugiert. Der Niederschlag wird in möglichst wenig A2, etwa 2 ml, aufgenommen und mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Nun erfolgt nach der Zugabe einer definierten Menge A2 eine zweite Fällung durch die Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  (1M) bis zu einer Endkonzentration von 50 mM, um mitgeschleppte grüne Verunreinigungen zu entfernen.

Nachdem die Probe erneut bei 4 °C 60 Minuten gerührt hat, erfolgt die letzte Zentrifugation bei 4 °C und  $38.000 \times g$ . Das so erhaltene Pellet wurde wesentlich von störenden grünen Substanzen befreit und in etwa 2 ml A2 aufgenommen. Der Proteingehalt sollte wiederum zwischen 5 und 20 mg/ml liegen, was mit dem Bradford-Test bestätigt wurde.

### 1.2.3 Mikrosomen-Isolierung aus Insektenzellkulturen

Die Insektenzellen wurden nach einer Expressionsdauer von 4 Tagen vom Boden der 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst. Die so erhaltene Insektenzellsuspension wird bei 8000 x g und 4 °C für ca. 15 min zentrifugiert. Sollte das Medium nicht klar sein, muss weiter zentrifugiert werden. Der Überstand wird der Überstand nach 3.15.1, S. 59 weiterbehandelt und gelagert. Das erhaltene Pellet wird dann in etwa 5 ml Puffer A2 resuspendiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in mehreren Millilitern Puffer A1 resuspendiert. Die Abwesenheit von Saccharose im Puffer A1 sorgt dafür, dass die Zellen aufgrund des osmotischen Druckes prall gefüllt sind. Dadurch werden sie bei der nun folgenden Bearbeitung mit dem Glashomogenisator sehr leicht zerplatzen und die Mikrosomen leicht frei geben. Man zentrifugiert die erhaltene Suspension erneut bei 5000 x g, 4 °C für ca. 15 min um die Zelltrümmer abzutrennen. Das Pellet wird verworfen und der Überstand mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1M) versetzt, bis eine Konzentration von 50 mM erreicht ist. Man rührt bei 4 °C für 60 min, um die Mikrosomen zu fällen und zentrifugiert dann mit 38000 x g und 4 °C für 60 min. Das erhaltene Pellet wird im Glashomogenisator unter Zusatz von 2 ml A2 homogenisiert. Der Überstand wird verworfen. Auch hier sollte der Proteingehalt wiederum bei 5 bis 20 mg/ml liegen (Bradford-Test).

### 1.2.4 Mikrosomen-Isolierung aus Bakterienkulturen

Auf den jeweiligen Bedarf hin abgestimmt, werden entsprechende Mengen an Bakterienkulturen mit dem Ziel der Aufarbeitung in den entsprechenden Selektionsmedien kultiviert. Die Bakterienkultur sollte eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht haben, wenn die Induktion der Expression mit 0,5 M bis 1 M IPTG erfolgt. Die Expression läuft in der Regel 18 h bei 30 °C. Nach der für die Expression veranschlagten Zeit werden die Bakterien bei 5000g, 4 °C 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit Puffer A1 [x ml A1 zu x g Zellmaterial] resuspendiert und gewaschen. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt mit 5000 x g bei 4 °C für 10 min und die Resuspendierung mit A2 [x ml A2 zu x g Zellmaterial]. Dem Puffer wird unmittelbar vor der Verwendung etwa 1 mg/ml Lysozym zugesetzt, um die



Bakterienzellwände zu zerstören. Die Suspension wird ca. 45 min auf Eis gelagert damit das Lysozym seine Wirkung voll entfalten kann. Anschließend homogenisiert man die erhaltene Bakteriensuspension mittels Ultraschall (3 x 10 Impulse bei 70% der Nennleistung) permanent auf Eis, damit die durch den Ultraschall resultierende Wärme nicht die Enzymaktivität beeinflusst. Das Homogenisat wird zur Abtrennung der Zellrümmen vom eigentlichen Rohextrakt erneut mit 13000 x g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Rohextrakt wird nun der ersten Fällung mit MgCl<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 50 mM unterzogen. Nachdem bei 4 °C 60 min gerührt wurde folgt das Zentrifugieren mit 38.000 x g bei 4 °C für 60 min. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Pellet mit etwa 2 ml Puffer A2 versetzt um dann mittels Glashomogenisator zu einer einheitlichen Proteinlösung verarbeitet zu werden. Der Proteingehalt sollte mit Bradford-Test auf etwa 5 bis 20 mg/ml eingestellt sein.

### **1.3 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus *Nicotiana benthamiana***

Die Blätter von *Nicotiana benthamiana* werden geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit dem Mörser homogenisiert man bestmöglich, um danach das Zellmaterial in der gleichen Menge Puffer A3 [1,5 fach x ml A3 zu x g Zellmaterial] aufzunehmen. Nach dem Auftauen und anschließendem 15 minütigem Homogenisieren bei 4 °C wird bei 5000g, 4 °C, 10 min zentrifugiert. Der immer noch mit grünen Zellbestandteilen durchsetzte Rest wird durch einen herkömmlichen Filter über einen vorgekühlten Filtereinsatz in eine vorgekühlte Nutschflasche vakuumfiltriert. Der Durchfluss wird für 60 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert, um letzte grüne Reste abzutrennen. Das Pellet wird verworfen und der Überstand zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

### **1.4 Gewinnung von Enzymrohextrakt aus Bakterienkulturen**

Die Bakterienkultur mit dem rekombinanten Expressionsvektor sollte eine OD<sub>600</sub> von 0,5 im jeweiligen Selektionsmedium erreicht haben. Nun induziert man die Expression mit 0,1 M bis 1M IPTG, in der Regel folgt dann die Inkubation für 18 h bei 30 °C. Nach visueller Überprüfung der Kultur auf ihre Wachstumsdichte werden die Bakterien bei 5000 x g, 4 °C 10 min lang

zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Pellet sollte sofort weiterbearbeitet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C bis zum Zeitpunkt der Verarbeitung gelagert werden.

Die Weiterverarbeitung des Rohextraktes entscheidet über die Wahl des Aufschlusspuffers. Folgt eine Affinitätschromatographie über Ni-NTA so ist der Ni-NTA-Ladepuffer zu benutzen. Schließt sich jedoch nur ein Aktivitätstest aus dem Rohextrakt an, so wird Puffer A0 (siehe II8, S.24) benutzt. Beiden Puffern gemeinsam ist die unmittelbare Zugabe von Lysozym 1mg/ml. Die Bakteriensuspension wird ca. 45 min bei 4 °C inkubiert und danach 3 x 10 Impulsen bei 70% der Nennleistung des Ultraschallgerätes ausgesetzt. Auch hier ist wieder auf die permanente Kühlung auf 4 °C zu achten. Es schließt sich eine Zentrifugation bei 13.000 x g, 4 °C für 20 min an. Das Pellet wird verworfen und der Überstand stellt den gewünschten Rohextrakt dar.

### 1.5 Affinitätschromatographie an Ni-NTA

Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist die spezifische und reversible Bindung eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Ein chemisch inertes Pseudosubstrat wird an einen Träger über einen Spacer immobilisiert und dient so zur selektiven Separation eines bestimmten Proteins aus einem Gemisch. Voraussetzung für die bioselektive Adsorption ist eine stabile Kopplung des mit dem Protein interagierenden Liganden an der Trägermatrix und die anschließende Aufhebung dieser Bindungen durch geschickte Wahl des Elutionsmittels.

In diesem Falle dient als Matrix Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA), immobilisiert an Agarose (CROWE J *et al*, 1994; HOCHULI E *et al*, 1987). Das Nickel-Kation ist vierfach komplexiert, wobei zwei Bindungen von der Matrix, also der Nitrilotriessigsäure, stammen und zwei Bindungen von zwei Histidin-Molekülen gestellt werden, die Teil der rekombinanten (His)<sub>6</sub>-Kette des heterolog exprimierten zu reinigenden Enzyms sind.

Die Säule *Hr10/10* wird mit der Matrix gepackt und mit Ni-NTA-Ladepuffer oder A4 (siehe II8, S. 24) äquilibriert. Dann wird der Rohextrakt mit etwa 1 ml/min Flussrate auf die Säule geladen. Jetzt folgt der Waschschrift: mittels Gradientenmischer wird eine Imidazolkonzentration von etwa 20 mM erreicht und Verunreinigungen und unspezifisch gebundene Moleküle werden eluiert.

Eine Kontrolle kann über die Beobachtung der UV-Absorptionsänderung erfolgen. Wenn keine Änderung mehr erfolgt, wird mit der Elution des gewünschten Proteins begonnen. Der Gradientenmischer hebt die Imidazolkonzentration schließlich auf 250 mM an. Das hat eine kompetitive Verdrängung des komplexierten rekombinanten Proteins aus der Nickel-Histidin-Bindung zur Folge. Das Eluat wird in 1 ml Schritten aufgefangen und jede Fraktion auf Aktivität geprüft.

## **1.6 Umpuffern und/ oder Entsalzen**

Das aufgereinigte Enzym aus der Ni-NTA-Reinigung kann mittels zweier Möglichkeiten umpuffert oder entsalzt werden. Nach Möglichkeit sollten beide Verfahren bei 4 °C durchgeführt werden um die Stabilität des Enzyms zu gewährleisten.

### **1.6.1 Dialyse**

Die Enzymlösung wird in einen Schlauch mit einem Durchmesser von 16 oder 29 mm und einer Molekulargewichtsausschlussgröße von 12 - 14 kDa gefüllt. Dieser wird in eine Pufferlösung eingebracht, die die gewünschte Zusammensetzung aufweist. Je nach Probe muss eventuell der gewählte Puffer ausgetauscht werden, um eine vollständige Umpufferung zu erreichen.

### **1.6.2 Entsalzen über G25-Säule: Größenausschlusschromatographie**

Die Größenausschlusschromatographie basiert auf dem unterschiedlichen Diffusionsverhalten von Salzen und Proteinen in einer Lösung. Die Matrix der HiTrap Desalting Sephadex G25-Säule weist Poren auf, die nur Molekülen mit bestimmten Partikelgrößen Einlass gewähren (100 bis 5000 Da). Das bedeutet, dass Proteine in diese Poren aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes nicht einwandern können. Salze und sonstige niedermolekulare Substanzen diffundieren tiefer und öfter in die Matrix, womit ihre höhere Retentionszeit begründet ist. Die Säule ist zum Entsalzen von Volumina bis 1,2 ml geeignet und weist ein Bettvolumen von 5 ml auf.

## 1.7 Konzentrierung verdünnter Enzymlösungen

Die Proteinlösung aus der Dialyse oder der Entsalzung mit einer G25-Säule ist im Normalfall relativ stark verdünnt und bedarf deshalb der Konzentrierung, um eine weitere Charakterisierung zum Beispiel über SDS-PAGE zu ermöglichen. Man benutzt zu diesem Zweck Membranen mit definierten Ausschlussgrößen, die mit Hilfe der Zentrifuge innerhalb relativ kurzer Zeit zur Konzentrierung führen.

Volumina > 2 ml werden mit Hilfe von Centripep YM10 (Ausschlussgröße 10 KDa) Einwegkonzentratoren durch Zentrifugation bei 3000 x g auf ein Endvolumen von 100 - 500 µl eingeeengt. Bei Volumina < 2 ml werden Microcon YM10 oder 30 Einwegkonzentratoren bei 10000 x g verwendet.

## 1.8 Elektrophoretische Analysemethoden

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Unterschiedliche Ladungen und Größen der Moleküle begründen eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Daher kann die Elektrophorese zur Auftrennung unterschiedlicher Teilchen verwendet werden. Elektrophoretische Trennungen können in Lösung oder in stabilisierenden Matrices durchgeführt werden. Häufig werden sogenannte Gele als Matrices verwendet.

### 1.8.1 SDS-PAGE

Für Proteine gibt es verschiedene elektrophoretische Verfahren. Unterschiedliche Proteine können auch unterschiedliche Ladungen besitzen. Bei der nativen Elektrophorese werden die nicht vorbehandelten Proteine auf das Gel aufgetragen. Die Schwierigkeit liegt hierbei in der Interpretation der Trennung. Daher ist das gängigste Verfahren die denaturierende SDS-PAGE (PolyAcrylamid-GelElektrophorese) nach SHAPIRO *et al* (1967).

#### 1.8.1.1 Prinzip

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) wird sowohl mit dem zu analysierenden Proteingemisch auf 95 °C erhitzt, als auch der Gelmatrix zugegeben. SDS ist ein ionisches Detergenz, das die Proteine denaturiert und proportional zu ihrem Molekulargewicht an sie bindet. Aufgrund der Emulgatoreigenschaften von SDS kommen sehr viele SDS-Moleküle auf ein Proteinmolekül und

überdecken so die Eigenladung des Proteins. Die Trennung erfolgt also nach der Größe der Proteine und nicht nach deren Ladung. Die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine wird beim anfänglichen Erhitzen durch Spaltung der intramolekularen Wasserstoffbrücken und durch Linearisierung des Moleküls zerstört. Cystin-Disulfidbindungen werden durch die Zugabe des reduzierenden Mercaptoethanol (MSH) gespalten. Die Größe des Proteins wird mit Hilfe eines BSA-Längenstandards bestimmt.

### **1.8.1.2 Gelpräparation, Laufbedingungen und apparativer Aufbau**

Nach Laemmli (LAEMMLI U, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen grobporigen Sammelgel (5 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS) zu einer scharfen Bande konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche feinporige Trenngel (7,5–15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS) ein. Zwischen zwei Glasplatten (16 x 18 cm, Abstand 1.5 mm) wird zunächst die frische Trenngellösung gegossen. Nach deren Auspolymerisieren, was etwa 30min dauert, wird die Sammelgellösung aufgegeben und der Probenkamm für die späteren Probenfächer eingebracht. Nach weiteren 30 min wird die Apparatur gemäß der Beschreibung der Gerätehersteller zusammengesetzt und die Proben werden aufgetragen.

Der durch die Trennung auftretenden Wärme kann man begegnen, indem man die Kammer während des Laufes bei 4 °C im Kühlschrank lagert.

#### 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

#### Laufpuffer:

50 mM Tris

0.2 M Glycin

0.15 % (m/V) SDS

Als Laufbedingungen hat sich bei einem 11 %igen Gel eine Stromstärke von 13 mA für 15 Stunden bewährt. Es ist jedoch auch möglich, ein Gel bei 40 mA in etwa 3 h laufen zu lassen. Möglicherweise ist die Trennung unter diesen Bedingungen nicht ganz so effizient. Der Lauf ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Front fast das Ende des Gels erreicht hat.

### 1.8.1.3 Proteinfärbung

#### 1.8.1.3.1 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die Gele werden 30-60 min in Coomassie (BLAKESLY R UND BOEZI J, 1977) Färbelösung gelegt und anschließend über mehrere Stunden entfärbt (unter mehrmaligem Wechseln der Lösung), bis deutliche Proteinbanden mit geringer Hintergrundfärbung erkennbar werden. Durch diese Färbemethode können noch 0,1 µg Protein pro Bande sichtbar gemacht werden.

Färbelösung:

0,25% (m/V) Coomassie Blue R-250  
45% (V/V) Methanol  
9% (V/V) Essigsäure

Entfärbelösung:

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

Die Gele können in einer 10%-igen Glycerollösung konserviert werden.

#### 1.8.1.3.2 Silberfärbung

Mit der empfindlichen Silberfärbung (HEUKESHOVEN J UND DERNICK R, 1985), (SAMMONS D *et al*, 1981) können noch 0,1 – 1 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden. Bereits Coomassie-gefärbte Gele können ebenfalls für die Silberfärbung verwendet werden.

Fixierlösung:

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

Silberlösung:

0,2% (m/V) Silbernitrat  
0,01% (m/V) Formaldehyd

Inkubationslösung:

30% (V/V) Ethanol  
6,8% (m/V) Natriumacetat  
0,125% (m/V) Glutardialdehyd (25%)  
0,2% (m/V) Natriumthiosulfat × 5 H<sub>2</sub>O

Entwicklerlösung:

2,5% (m/V) Natriumcarbonat  
0,02% (m/V) Formaldehyd

---

<u>Stopplösung:</u> 30% (V/V) Methanol 10% (V/V) Essigsäure	
---	--

Die Zugabe des Formaldehyds, des Glutardialdehyds und des Thiosulfats erfolgt erst unmittelbar vor Verwendung der Lösungen.

Die Gele werden zweimal je 30 min in der Fixierlösung und 60 min in der Inkubationslösung geschwenkt. Anschließend erfolgen drei zehninütige Waschschrirte mit Wasser und eine 20-minütige Inkubation in der Silberlösung. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wird das Gel so lange in die Entwicklerlösung gelegt, bis deutliche Proteinbanden ohne Hintergrund sichtbar werden. Dieser Färbeschritt erfolgt zur Vermeidung von Hintergrund in möglichst dunkler Umgebung mit wenig diffusem Licht. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Gele in die Stopplösung eingetaucht. Nach 10 min werden die Gele mit reinem Wasser gewaschen. Die Lagerung der Gele erfolgt dann ebenfalls in 10%-iger Glycerollösung.

## 2 Durchgeführte Aktivitätstests

Für die Trennung von Edukt und Produkt nach erfolgter enzymatischer Reaktion wird zumeist ein binärer Lösungsmittelgradient verwendet. Die Puffer werden vor ihrer Verwendung filtriert und 30 min im Ultraschallbad unter Vakuum entgast. Die Detektion erfolgt durch Messung der UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge. Die Auswertung wird durch automatische Integration der Peakfläche und Quantifizierung mit internem oder externem Standard vorgenommen. Das Trennprogramm enthält im Allgemeinen einen Wasch- und Äquilibrationsschritt. Die Retentionszeiten können je nach Außentemperatur um bis zu eine Minute voneinander abweichen. Normalerweise sind Trennungen, die im Sommer durchgeführt werden, schlechter zu reproduzieren als Trennungen im Winter.

### 2.1 „Unbekannte Reduktase“

Beim Projekt Homology cloning (siehe IV3.1, S. 79) wurde durch die unspezifische Anlagerung degenerierter Primer, die eigentlich für Teile eines Cytochrom-P450-Klon codieren sollten, ein Vollängenklon gefunden. Dieser Vollängenklon gehört aber nicht zur Klasse der Cytochrom-P450 Enzyme, sondern ist Sequenzvergleichen nach zu urteilen eher bei den löslichen Reduktasen anzusiedeln. Da zu diesem Zeitpunkt noch viele verschiedene Reduktasen im Regelkreis der Ajmalin-Biosynthese unbekannt waren, wurde der Klon auf die folgenden Enzymaktivitäten hin überprüft.



### 2.1.1 Perakin-Reduktase Aktivitätstest

Die Zusammensetzung der Testansätze wird aus untenstehender Tabelle ersichtlich. Es werden ein Puffer, das Cosubstrat, die Enzymlösung und das Substrat zusammen für 120 min bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Die Reaktion wird mit der Zugabe von 200 µl MeOH abgestoppt, die Ansätze für 5 min bei 18000 x g zentrifugiert und die partikelfreie Lösung injiziert. Die genauen Bedingungen für Inkubation und Assay sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Perakin ist bei unten genannten Bedingungen bei etwa 7,26 min und Raucaffricin bei etwa 7,58 min Retentionszeit zu detektieren.

**Tabelle 7: Inkubationsansatz und Assay für Perakin-Reduktase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
Perakin 1 mg/ml EtOH	5 µl
1M KPi [pH 7,5]	10 µl
Perakinreduktase-Testlösung	170 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	15 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)  
Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)  
Inj.-Volumen: 60 µl  
Fließmittel A: Acetonitril  
Fließmittel B: 50 mM KPi-Puffer [pH 2,3]  
Flußrate: 1 ml/ min  
Detektion: 284 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0	20	80
5,0	35	65
8,0	50	50
8,1	75	25
10,0	75	25
10,1	20	80
15	20	80

### 2.1.2 Cathenamin-Reduktase Aktivitätstest

Zunächst wird die isolierte Enzymlösung mit Puffer, Cosubstrat und Substrat versetzt. Die Inkubation bei 35 °C und 500 rpm über 150 min wird gefolgt von der Zugabe von 200 µl Methanol zum Abstoppen der Reaktion. Dann wird kurz gemischt und die präzipitierten Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 14 000 x g abgetrennt. Der partikelfreie Überstand wird dann mittels HPLC aufgetrennt und detektiert. Nach enzymatischer Umsetzung des Cathenamins zu Tetrahydroalstonin wird zur Trennung von Cathenamin ( $R_t$  ~12 min), Tetrahydroalstonin ( $R_t$  3.4 min) und Ajmalicin ( $R_t$  4.6 min) der unten aufgeführte Assay verwendet.

**Tabelle 8: : Inkubationsansatz und Assay für Cathenamin-Reduktase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
Cathenamin 10 mg/ml EtOH	1 µl
1 M KPi [pH 6.5]	10 µl
Cathenaminreduktase-Testlösung	179 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	10 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)  
Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)  
Inj.-Volumen: 60 µl  
Fließmittel A: Acetonitril  
Fließmittel B: 39 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM  
Hexansulfonsäure [pH 3,6]  
Flußrate: variabel, siehe rechts  
Detektion: 280 nm

Zeit [min]	Gradient		flow [ml/ min]
	%A	%B	
0	30	70	1.68
5,5	30	70	1.68
6,0	10	90	1.30
8,0	10	90	1.30
8,2	40	60	1.68
8,5	60	40	1.68
10,5	60	40	1.68
11,0	30	70	1.68
15	30	70	1.68

### 2.1.3 Vomilenin-Reduktase Aktivitätstest

Die zu testende Enzymlösung wird mit Puffer, Cosubstrat und Substrat versetzt und bei 30 °C und 500 rpm für 150 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 200 µl Methanol gestoppt, kurz gemischt und die denaturierten Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 14 000 x g abgetrennt. Der klare Überstand wird mit Hilfe der HPLC aufgetrennt. Nach enzymatischer Umsetzung wird zur Trennung von Vomilenin ( $R_t$  ~3.4 min), 2β-(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin ( $R_t$  ~4.6 min) und 17-O-Acetylnorajmalin ( $R_t$  ~5.2 min) das unten aufgeführte System verwendet. Für die Testung auf Vomilenin-Reduktase-Aktivität kann also das gleiche System verwendet werden wie zur Testung auf 1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase-Aktivität.

**Tabelle 9: Inkubationsansatz und Assay für Vomilenin-Reduktase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
Vomilenin 2 mg/ ml EtOH	2,5 µl
500 mM KPi [pH 7.0]	20 µl
Vomileninreduktase-Testlösung	157,5 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	20 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)  
Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)  
Inj.-Volumen: 40 µl (- 400µl)  
Fließmittel A: Acetonitril  
Fließmittel B: 25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45 %  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %ig)  
Flußrate: 1.68 ml/ min  
Detektion: 250 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0	28	72
4,0	30	70
6,0	35	65
6,1	28	72
10	28	72

### 2.1.4 1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase Aktivitätstest

Die Enzymlösung wird mit Puffer, Cosubstrat und Substrat versetzt. Es folgt die Inkubation bei 30 °C und 500 rpm über einen Zeitraum von 150 min. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 200 µl Methanol gestoppt, kurz gemischt und die präzipitierten Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 14 000 x g abgetrennt. Der partikelfreie Überstand wird mittels HPLC aufgetrennt und detektiert. Nach enzymatischer Umsetzung der Substrate Vomilenin und 1,2-Dihydrovomilenin wird zur Trennung von Vomilenin ( $R_t$  ~3.4 min), 2 $\beta$ -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin ( $R_t$  ~4.6 min) und 17-O-Acetylnorajmalin ( $R_t$  ~5.2 min) das unten aufgeführte System verwendet.

**Tabelle 10: Inkubationsansatz und Assay für Dihydrovomilenin-Reduktase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
1,2-Dihydrovomilenin 1.4 mg/ ml EtOH	2,5 µl
500 mM KPi [pH 7.0]	5 µl
1,2-Dihydrovomileninreduktase-Testlösung	15 µl – 25 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	5 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)

Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)

Inj.-Volumen: 40 µl (- 400µl)

Fließmittel A: Acetonitril

Fließmittel B: 25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45 %  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %ig)

Flußrate: 1.68 ml/ min

Detektion: 250 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0	28	72
4,0	30	70
6,0	35	65
6,1	28	72
10	28	72

## 2.2 Vinorin-Hydroxylase Aktivitätstest

Als Enzymlösung werden in diesem Falle Mikrosomen (siehe 1.2, S. 30) verwendet. Da es sich bei dem Enzym um eine Cytochrom P450-Monooxygenase handelt, ist es notwendig die Reaktionsgefäße offen zu lassen, um eine stetige Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Man inkubiert für eine Stunde bei 35°C und 1100 rpm. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500 µl MeOH abgestoppt. Die Ansätze werden geschüttelt (Vortexer, 10 Sekunden) und anschließend bei 14.000 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aus dem partikelfreien Überstand wird in der Regel die zu injizierende Lösung abgenommen. Sollte das nicht der Fall sein und sollten Schritte, wie „Auschütteln bei bestimmtem pH“ oder „Ausschütteln mit Hilfe eines hydrophoben Lösungsmittels“ hinzukommen bevor die Prüfung der Substratumsetzung mittels HPLC erfolgt, so wird gesondert darauf hingewiesen. Vinorin ist bei etwa 8,7 min und Vomilenin bei etwa 3,5 min Retentionszeit zu detektieren.

**Tabelle 11: : Inkubationsansatz und Assay für Vinorin-Hydroxylase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
Vinorin 1 mg/ ml EtOH	7-10 µl
Vinorin-Hydroxylase-Mikrosomen	200 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	50 µl
Aufschlusspuffer A2	ad 500 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)

Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)

Inj.-Volumen: 40 µl

Fließmittel A: Acetonitril

Fließmittel B: 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Flußrate: variabel, siehe rechts

Detektion: 260 nm

Zeit [min]	Gradient		flow [ml/ min]
	%A	%B	
0,0	50	50	1,5
6,0	75	35	1,5
6,1	60	40	1,5
12,0	60	40	1,0
12,1	32	68	1,0
15	25	75	1,5
20,0	50	50	1,5

### 2.3 Cinnamoyl-Hydroxylase Aktivitätstest

Als Enzymlösung werden Mikrosomen (siehe 1.2, S. 30) verwendet. Da es sich bei der Cinnamoyl-4-hydroxylase ebenfalls um eine Cytochrom P450-Monooxygenase handelt, ist es auch hier notwendig, die Reaktionsgefäße geöffnet zu inkubieren, um eine stetige Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Man inkubiert für eine Stunde bei 30 °C und 600 rpm. Die Reaktion wird durch Zugabe von 60 µl 0,1 N HCl abgestoppt. Die Ansätze werden 3 mal mit ca. 300 µl EtOAc ausgeschüttelt, die EtOAc-Auszüge nach dem Abzentrifugieren vereinigt und mit Hilfe von Stickstoff eingedampft. Die resultierenden Proben werden mit 200 µl MeOH versetzt und das entsprechende Volumen injiziert. Zimtsäure ist bei 10,7 min und p-Coumarsäure bei etwa 3,88 min zu detektieren.

Tabelle 12: Inkubationsansatz und Assay für Cinnamoyl-Hydroxylase Aktivitätstest

Stammlösungen	Volumina
Zimtsäure 1 mg/ ml EtOH	3-7 µl
Cinnamoyl-4-hydroxylase-Mikrosomen	200 µl
20 mM NADPH <sub>2</sub>	50 µl
Aufschlusspuffer A2	ad 500 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)  
Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)  
Inj.-Volumen: 40 µl  
Fließmittel A: Acetonitril  
Fließmittel B: 39 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM  
Hexansulfonsäure [pH 2,6]  
Flußrate: variabel, siehe rechts  
Detektion: 284 nm

Zeit [min]	Gradient		flow
	%A	%B	[ml/ min]
0,0	32	68	1,5
2,4	32	68	1,5
2,5	32	68	0,7
6,0	32	68	0,7
6,1	32	68	1,25
12	32	68	1,25

## 2.4 Polyneuridinaldehyd Esterase Aktivitätstest

Zuerst wird je nach Proteinkonzentration eine bestimmte Enzymmenge mit Puffer und Substrat versetzt. Es folgt in der Regel eine Inkubation bei 35 °C und 600 rpm über 30 min. Zum Abstoppen der Reaktion werden 5 µl 0,1 N HCl hinzugegeben, um dann mit 5 µl einer frisch zubereiteten 1%-igen NaBH<sub>4</sub> in 10 mM NaOH-Lösung für 10 min bei RT zu inkubieren. Dieser Schritt ermöglicht die Reduktion von 16-epi-Vellosimin und Vellosimin zu 16-epi-Deoxysarpagin und 10-Deoxysarpagin und von Polyneuridinaldehyd zu Polyneuridin. Die Proteine werden durch Zugabe von 90 µl Methanol denaturiert, kurz gemischt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 18 000 x g abgetrennt. Der partikelfreie Überstand wird dann mittels HPLC aufgetrennt und detektiert. Je nach Herkunft der getesteten PNA Esterase wurde das Inkubationsvolumen der Enzymlösung variiert, um den Hintergrund in der sich anschließenden HPLC-Trennung so gering wie möglich zu halten. Vellosimin ist bei etwa 3,7 min und Polyneuridinaldehyd bei etwa 5,8 min zu detektieren.

**Tabelle 13: Inkubationsansatz und Assay für PNA Esterase Aktivitätstest**

Stammlösungen	Volumina
Polyneuridinaldehyd 1 mg/ml EtOH	2,5 µl
50 mM KPi [pH 7.0]	20 µl – 40 µl
Polyneuridinaldehydesterase-Testlösung	5 µl – 20 µl

Trennsäule: LiChrospher 60,  
RP-Select B (250 ´ 4 mm)  
Vorsäule: RP-Select B (4 ´ 4 mm)  
Inj.-Volumen: 100 µl  
Fließmittel A: Acetonitril  
Fließmittel B: Seral-H<sub>2</sub>O [pH 2,3]  
Flußrate: 1,5 ml/ min  
Detektion: 225 nm

Zeit [min]	Gradient	
	%A	%B
0	28	72
9	35	65
9,5	80	20
11,5	80	20
12	28	72
20	28	72

### 3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1 Nucleinsäureisolierung

##### 3.1.1 RNA-Präparation

Es muss mit absoluter Sauberkeit gearbeitet werden, da die RNA durch die ubiquitär vorkommenden RNAsen äußerst leicht hydrolysiert wird. Aus diesem Grund müssen vor Beginn der Isolierungsarbeiten sämtliche zu benutzenden Geräte sterilisiert und mit Alufolie gegen Re-Kontamination geschützt werden.

Die Pflanzenzellen aus der *Rauvolfia*-T<sub>30</sub>-Zelllinie werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um dann möglichst klein zermörsert zu werden. Der peqGOLD-RNAPure-Kit dient zur Isolierung der Gesamt-RNA. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers für pflanzliches Gewebe. Man gibt jeweils 1 ml peqGOLD-RNAPure zu 50 mg homogenisierten Pflanzenzellen. Die Qualität und die Konzentration der isolierten RNA werden in der Regel durch Elektrophorese in einem denaturierenden Agarosegel bestimmt.

##### 3.1.2 DNA-Isolierung

###### 3.1.2.1 Quick-Präparation

Die DNA-Quick-Präparation dient zur schnellen und preisgünstigen Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA (ca. 10 µg) und wird nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach BIRNBOIM H UND DOLY J (1979) durchgeführt. Diese Methode bietet sich an, um *screening*-artig transformierte Bakterienkulturen auf erfolgreichen Einbau eines Inserts in seinen Vektor zu prüfen. Die erhaltene DNA wird in einer RNase-Lösung nach SAMBROOK J *et al* (2001) aufgenommen.

###### 3.1.2.2 Isolierung reiner Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA-Mengen (bis zu 50 µg) wird das NucleoSpin Plasmid-System von Macherey & Nagel (Düren) verwendet. Wenn die Bakterien mit Plasmiden transformiert sind, die in hoher Kopienzahl in den Zellen vorliegen (sogenannte high copy plasmids), so



werden 4 ml Bakterienkultur und bei Plasmidvektoren in geringer Kopienzahl (sogenannte low copy plasmids) 12 ml Bakterienkultur eingesetzt. Die DNA, die zur Sequenzierung verwendet werden soll, wird nach durchgeführter Fällung lediglich in H<sub>2</sub>O statt des im Kit empfohlenen und bereitgestellten TE-Puffers aufgenommen. Die Durchführung wird ansonsten nach den Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen werden von der Firma GENterprise (Mainz) nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER F *et al*, 1977) durchgeführt.

### 3.2 Restriktionsverdau

In der Regel wird ein Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Die verwendeten Puffer richten sich nach den Herstellerangaben und liegen den Enzymen in der Regel bei (*Puffer 1-4*, siehe II8, S.24). Für das Schneiden von 1 µg DNA werden normalerweise 3 U Restriktionsenzym bei 37 °C verwendet, sofern der Hersteller keine anderen Angaben gemacht hat. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei dem angegebenen Temperaturoptimum im Wasserbad oder auf dem Thermomixer.

Bei einem Partialverdau werden zu etwa 15 µg DNA in einem 150 µl Ansatz 5 U Restriktionsendonuklease hinzugegeben. Der Verdau erfolgt bei den für das Enzym empfohlenen Temperaturen. Nach jeweils 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten werden jeweils 25 µl aus dem Ansatz entnommen. Die entnommenen Proben werden zum Abstoppen des Verdaus mit Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten auf 75°C erhitzt und dann bei -20°C bis zum Auftragen auf ein Agarosegel aufbewahrt.

### 3.3 Elektrophorese von Nucleinsäuren

#### 3.3.1 Präparative und analytische Agarosegele

Zwecks Ergebnisverifizierung und Auftrennung von DNA wird je nach Größe der erwarteten Fragmente ein 0,7-1,5%-iges Horizontalgel (siehe Tabelle 14, S. 50) gegossen. Die Agarose wird in TAE-Puffer aufgekocht und die verdunstete Flüssigkeit mit Seral-Wasser ergänzt. Nachdem eine Temperatur von etwa 55 °C erreicht ist, kommt die Lösung in die Elektrophoresekammer

und härtet innerhalb von ca. 30 min aus. Als Laufpuffer dient  $1 \times$  TAE, als  $10 \times$  Probenpuffer eine Mischung aus 0,25% (m/V) Bromphenolblau und 30% (V/V) Glycerol in Wasser. Dem Gel wird zur Visualisierung der DNA etwa 0,005% (V/V) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzugegeben. Das fertige Gel wird bei 302 nm auf einem Transilluminator betrachtet, gegebenenfalls weiterbearbeitet und per Photo dokumentiert. Sollte die DNA weiterverarbeitet werden, ist darauf zu achten, dass die UV-Strahlung zu Mutationen der DNA führen kann. Ein schnelles und sauberes Arbeiten ist erforderlich. Als Molekulargewichtsstandard dienen bis auf gesondert aufgeführte Ausnahmen *Bst*EII verdaute Lambdaphagen-DNA (New England Biolabs, Beverly, Frankfurt am Main) oder die DNA-Leiter Smart Ladder.

**Tabelle 14: Konzentration des Agarosegels nach Anzahl der Basenpaare**

% Agarose	0,7	1,0	1,5	2,0
DNA-Fragmentlänge (kb)	10-0,8	5-0,4	3-0,2	1,5-0,1

### 3.3.2 Denaturierende Agarosegele

Als denaturierende Gele für die Prüfung und Trennung isolierter RNA werden Formaldehyd-Gele verwendet. Folglich müssen alle Geräte, die mit der Probe in Berührung kommen, von RNase-Kontaminationen befreit werden. Dies erfolgt durch Waschen mit 3%-iger  $H_2O_2$ -Lösung und Methanol oder mit Hilfe des *RNaseA Sprays*. Die Trocknung erfolgt an der Luft. Alle Puffer werden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

Das Gel wird mit 1% Agarose (m/V) in  $1 \times$  MOPS-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C mit 0.05 VT Formaldehyd (37%-ig) versetzt und in die Gelwanne gegossen. RNA wurde vor dem Auftragen mit immer frisch hergestelltem Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt.

Probenpuffer: 60,0 µl Formamid,  
 20,0 µl  $10 \times$  MOPS-Puffer,  
 32,5 µl Formaldehyd (37%),  
 12,5 µl Wasser,  
 12,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml),  
 10,0 µl Glycerol,  
 10,0 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

Als Laufpuffer wurde  $1 \times$  MOPS verwendet.

### 3.4 Isolierung reiner DNA aus Agarosegelen

Das NucleoSpin Extract-Kit von Macherey & Nagel (Düren) wird benutzt, um DNA aus Agarosegelen zu extrahieren. Die entsprechenden Banden werden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Extraktionspuffer im entsprechenden Verhältnis versetzt. Die Probe wird nun entsprechend den Herstellerangaben bearbeitet. Die DNA wird mit mehreren Reinigungslösungen gewaschen, um dann im letzten Schritt von einer Membran eluiert zu werden. Bei diesem Schritt ist es ratsam, die Temperatur des Elutionspuffers auf ca. 70 °C zu erhöhen und in zwei Schritten zu eluieren. Auch hier wird -wie bei der Plasmidextraktion- anstelle des vorgeschlagenen Elutionspuffers Seralwasser verwendet, sollte die Probe direkt für eine Sequenzierung vorgesehen sein.

### 3.5 Präzipitation von Nucleinsäuren

Präzipitation von Nucleinsäuren dient zur Abtrennung überschüssiger Salze und zur Konzentrierung der Nucleinsäuren. Als Fällungsreagenzien werden Ethanol oder Isopropanol, als Salzkomponente NaOAc verwendet. Auf einen Teil Nucleinsäurelösung kommen 0,1 VT 3 M NaOAc (0,3 M Endkonzentration) und 2,5 VT Ethanol (1 VT Isopropanol). Die Mischung ruht für 15 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Nach Zentrifugation bei  $35.000 \times g$  und 4 °C für 30 min wird das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min zentrifugiert. Überschüssiger Ethanol wird abpipettiert, der Rückstand kurz getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

### 3.6 Gehaltsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Messung der Absorption bei 260nm dient zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung, die einen pH-Wert von 7,5 aufweisen muss (WILLFINGER W *et al*, 1997). Eine OD von 1 entspricht etwa 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Zur Abschätzung der Reinheit von DNA- und RNA in wässriger Lösung bestimmt man die Absorption bei 260nm und 280nm. Bei sauberer DNA/RNA sollte das Verhältnis  $E_{260/280}$  etwa 1,8 betragen. Bei geringen DNA-Konzentrationen

wird ein Teil der DNA auf ein Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgt die Gehaltsbestimmung durch einen optischen Vergleich der Intensität der Probe mit dem ebenfalls aufgetragenen DNA-Standard mit bekannter Konzentration.

### 3.7 Dephosphorylierung von mRNA

Verwendet wird die aus Pflanzenzellsuspensionskulturen isolierte Gesamt-RNA. Der Schritt der Dephosphorylierung ist wichtig, um unvollständige mRNA-Fragmente von den vollständigen mRNA-Volllängenklonen für eine nachfolgende cDNA-Bank Synthese auszusortieren. Die vollständige mRNA besitzt eine 5'-cap Struktur (ALBERTS B *et al*, 1986 und PERRY R, 1981) und steht so dem Enzym CIP zur Dephosphorylierung nicht zur Verfügung. Die restlichen Fragmente der mRNA werden am 5'-Ende dephosphoryliert und so der weiteren Bearbeitung entzogen. Die Inkubation erfolgt bei 50 °C für 60 min.

Reaktionsansatz: 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-H<sub>2</sub>O

### 3.8 Abspaltung der Cap-Struktur mit Tobacco Acid Phosphatase (TAP)

Das Enzym TAP entfernt die 5'-cap Struktur der mRNA-Volllängenklone und legt dadurch die Phosphat-Gruppe am 5'-Ende frei, die für eine Ligation bestimmter RNA-Fragmente an die mRNA-Volllängenklone gebraucht wird. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 60 min. Das Produkt wird abzentrifugiert und das Pellet wird in x µl RNA DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. „x µl“ RNA entspricht der für die RNA-Ligation benötigten RNA-Menge (Richtwert: 6 µl RNA).

Reaktionsansatz: 7  $\mu$ l dephosphorylierte RNA  
1  $\mu$ l 10  $\times$  Puffer TAP  
1  $\mu$ l RNase Inhibitor (10 U/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l TAP (0.5 U/ $\mu$ l)

### 3.9 Ligation

#### 3.9.1 DNA-Ligation

Ligation bezeichnet die Verknüpfung von Nucleinsäureketten. Dieser Verknüpfungsvorgang wird mit Hilfe eines Enzyms, der T<sub>4</sub>-Ligase bewerkstelligt. Als Puffer dienen wiederum die vom Hersteller mitgelieferten 10x-Puffer. Die Ligation von stumpfen Enden (blunt ends) erfolgt bei 12°C für etwa 18 h und die Ligation von überhängenden Enden (sticky ends) findet in einem Zeitraum von 5 bis 15 h bei 16°C statt.

Reaktionsansatz: 1 - 7  $\mu$ l zu ligierende DNA (0.01 - 0.1  $\mu$ g)  
1  $\mu$ l Vektor (25 – 50 ng/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l 10  $\times$  Puffer für T4 DNA Ligase  
1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (3 Units/ $\mu$ l)

#### 3.9.2 RNA-Ligation

Die RNA-Ligation erfolgte im Rahmen der Herstellung einer cDNA-Bank für das Projekt Homology cloning. Es wurde ein spezielles RNA-Oligonucleotid der Firma Invitrogen an das 5'-Ende der mRNA-Vollängenklone ligiert. Dabei werden zu x  $\mu$ l RNA (aus 3.8, S. 52) 250 ng Oligonukleotid zupipettiert, 2 min lang bei 70 °C inkubiert und für die weitere Reaktion auf Eis runtergekühlt. Die endliche Ligationsreaktion wurde bei 37 °C für 60 min inkubiert.

Reaktionsansatz: 1  $\mu$ l 10  $\times$  Puffer für T4 RNA Ligase  
1  $\mu$ l ATP (10 mM)  
1  $\mu$ l RNase Inhibitor (10 U/ $\mu$ l) und  
1  $\mu$ l T4 RNA Ligase (5 U/ $\mu$ l)  
x  $\mu$ l RNA (aus 3.8)

### 3.10 PCR – Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction) nach Mullis (SAIKI R *et al*, 1988) dient zur selektiven Vervielfältigung von DNA. Als Template kann je nach Aufgabenstellung cDNA, genomische oder Plasmid-DNA verwendet werden, wobei dann auch das Reaktionsvolumen variiert. Die Zusammensetzung der Ansätze und die Temperaturprogramme werden bei den jeweiligen Experimenten näher spezifiziert.

Oligonukleotide für die PCR oder zur Sequenzierung werden in gereinigter und gefriergetrockneter Form von der Firma MWG-Biotech geliefert.

Die Subklonierung von PCR-Fragmenten erfolgt standardmäßig in den pGEM-T Easy-Vektor. Das Produkt wird dann in Top10-Zellen transformiert. Über den Weg der Kultivierung und der sich anschließenden Plasmidisolierung kann so eine große Menge an DNA für weitere Experimente hergestellt werden. Um eine hohe Klonierungseffizienz zu erreichen, werden PCR-Fragmente auch in den pCR2.1-TOPO-Vektor unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning-Kits inkloniert. Diese beiden offenen Vektoren besitzen an den Enden einen 3´-Thymidin-Überhang. Durch PCR mit der Taq-Polymerase erhaltene DNA-Fragmente besitzen an ihren Enden einen 3´-Adenosin-Überhang und lassen sich dadurch sehr leicht in die genannten Vektoren einfügen.

#### 3.10.1 „Hot start“-PCR

Die Template-DNA und die verwendeten Primer werden zunächst separat auf 94°C erhitzt. Die übrigen Bestandteile werden vor dem Start des Temperaturprogramms aliquotiert zu den Proben gegeben. Der Sinn dieses Verfahrens ist die Vermeidung ungewünschter Amplifizierungen durch unspezifisch gebundene Primer, da die Polymerase auch schon bei Raumtemperatur Amplifizierungen durchführen kann. Werden keine speziellen Polymerasen verwendet, die diese unspezifischen Reaktionen vermeiden, so wird grundsätzlich jede der aufgeführten PCR nach der „hot start“-Methode durchgeführt.

### 3.10.2 „Touch-Down“-PCR

Diese Methode hat ihre Unterschiede zur herkömmlichen PCR in ihrem Temperaturprogramm. Die Annealing-Temperatur wird zwischen 5 °C und 10 °C über der Schmelztemperatur der Primer gewählt und in kleinen Schritten von etwa 2 °C an die eigentlich vorgesehene Annealing-Temperatur angenähert. Der Nutzen liegt in einer sehr spezifischen Bindung der Primer an das Template und damit in einer hohen und spezifischen Ausbeute an gesuchtem PCR-Produkt.

### 3.11 Synthese einer RACE-cDNA-Bank

Die mRNA wird dahingehend modifiziert, als dass an das 5'-Ende der mRNA ein bestimmtes Oligomer anligiert wird (siehe 3.9.2, S. 53). Diese RNA-Sequenz dient als Matrize für die *Avian Myeloblastosis Virus* Reverse Transkriptase in Verbindung mit einem spezifischen GeneRacer™ Oligo dT Primer für das 3'-Ende und ermöglicht so die Synthese eines cDNA-Vollängenklones mit vollständigem 5'-Ende (entspricht dem Oligomer, aber auf DNA-Ebene) und 3'-Ende (entspricht dem Poly-(A)-Schwanz plus einer Erkennungssequenz für GeneRacer™ 3'-Primer). Die so erhaltene cDNA-Bank dient in einer RACE-PCR als Template.

Zu 13 µl modifizierter RNA aus 3.9.2, S. 53 wird 1 µl GeneRacer™ Oligo dT Primer (24.1 µM) pipettiert. Es folgt das Erwärmen auf 70 °C für 5min um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Danach wird der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt. Die Synthese der cDNA erfolgt bei 42 °C für 60 min. Im Anschluss stoppt man die Transkription durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Das Produkt dieser Reaktion ist -wie oben erwähnt- die RACE-cDNA-Bank.

Reaktionsansatz: 13 µl modifizierte mRNA  
1 µl GeneRacer Oligo dT Primer  
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)

### 3.12 Herstellung kompetenter Organismen

Kompetente Zellen sind Zellen, welche mit Hilfe eines bestimmten Verfahrens (siehe 3.13) dazu gebracht werden, Fremd-DNA in die Zelle aufzunehmen. Sie werden auf unterschiedliche Weise hergestellt und müssen zur Erhaltung der Kompetenz bei -80 °C gelagert werden (HANAHAN D, 1985). In die Zellen werden Plasmide transformiert, die durch Antibiotikaresistenzen oder andere Markereigenschaften die erfolgreiche Einschleusung des Plasmids in die Zelle im Zuge ihrer Kultivierung anzeigen.

#### 3.12.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine reine Kultur der zu behandelnden Zellen wird bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 kultiviert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und danach 5 min bei 4 °C mit 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit etwa 15 ml TFB I-Puffer resuspendiert und für etwa 90 min auf Eis inkubiert. Danach wird erneut 5 min bei 4 °C mit 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird unter ständiger Kühlung vorsichtig in 2 ml kaltem TFB II resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird in den gewünschten Mengen in Caps aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

#### 3.12.2 Elektrokompente Bakterien

Bei der Herstellung elektrokompenter *E. coli* (DOWER *et al*, 1988) werden alle Schritte der Präparation möglichst bei 0 °C durchgeführt. Ein Liter LB-Medium wurde mit 1/100 vol einer frischen *E. coli* Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Zur Ernte wird die *E. coli*-Kultur 15 bis 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei maximal 4000 x g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert.



Der Mediumüberstand wird entfernt und das verbleibende Pellet vorsichtig in 1 l eiskaltem, sterilem Seral-H<sub>2</sub>O Wasser resuspendiert, ohne die Zellen zu lysieren. Die Zellsuspension wird zentrifugiert, das Zellsediment in 0,5 l eiskaltem Seral-H<sub>2</sub>O gewaschen und in ~20 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin (v/v in H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Die Zellen werden nochmals pelletiert, in eiskaltem 10 %-igem Glycerin zu einer Dichte von  $\sim 1 - 3 \times 10^{10}$  Zellen/ ml aufgenommen, in Aliquots mit flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.12.3 Elektrokompente Agrobakterien

200ml LB-Medium, welches 50 µg/ml Rifampicin enthält, wird angeimpft mit 0,5 ml einer Übernachtskultur des Agrobakteriumstammes GV3101, die die gleiche Antibiotikazusammensetzung enthält wie das genannte Medium. Es wird für etwa 24 h bei 28 °C inkubiert und bei etwa 120 rpm geschüttelt. Eine Messung der OD erfolgt nicht.

Die Kultur wird in 50 ml aufgeteilt und 10 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets zweimal mit eiskaltem, sterilem 10%igem Glycerol gewaschen. Nun resuspendiert man die Pellets und vereinigt sie, um dann 10 min bei 4 °C und 3000 x g zu zentrifugieren. Die Pellets werden resuspendiert in etwa 1 ml 10% Glycerol und in der gewünschten Menge in Caps aliquotiert. Die Caps werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 3.13 Transformation

Transformation bezeichnet die Einbringung von Fremd-DNA in eine kompetente Zelle mittels thermisch-chemischer Verfahren oder über die Beeinflussung der kompetenten Zellen und der DNA im elektrischen Feld. Es werden Verdünnungen der zu transformierenden Plasmidlösung (1 ng – 100 ng) eingesetzt oder der komplette Ligationsansatz (10 µl) verwendet.

### 3.13.1 Temperatur-Methode für *E. coli*-Stämme

Die kompetenten Zellen tauen langsam, etwa innerhalb von 15 min, auf Eis auf. Etwa 50 µl werden mit Cut-Tips auf die vorgekühlte, zu transformierende Lösung pipettiert und kurz gemischt. Es wird 30 min auf Eis inkubiert und dann für 90 s auf 39 °C im Wasserbad erwärmt. Dann werden die Proben

2 min auf Eis gekühlt, um dann mit 450 µl LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert zu werden. Die Bakteriensuspension wird dann auf die vorgewärmten LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Marker (Antibiotikum, X-Gal) aufgebracht, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.13.2 Elektroporation von *E. coli* Stämmen**

Die Zellen werden auf Eis aufgetaut und etwa 50 µl davon verwendet. Die oben genannten Mengen an DNA oder der Ligationsansatz werden zugegeben und für etwa 2 min auf Eis inkubiert. Dann wird der Mix in eine vorgekühlte sterile 2 mm-Küvette eingebracht und in das Elektroporationsgerät eingeführt. Der Impuls wird zweimal ausgelöst und die Mischung sofort mit etwa 1ml 37 °C warmem LB-Medium versetzt und für etwa 2-3 h auf einem Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Die Kulturen werden auf vorgewärmten LB-AGAR-Platten mit dem jeweiligen Marker ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

### **3.13.3 Elektroporation von Agrobakteriumstamm GV3101**

Die Zellen werden auf Eis aufgetaut und etwa 25 µl davon verwendet. Die oben genannte Menge an DNA oder der Ligationsansatz werden zugegeben und für etwa 2 min inkubiert. Dann wird der Mix in eine vorgekühlte sterile 2 mm-Küvette eingebracht und in das Elektroporationsgerät eingeführt. Der Impuls wird zweimal ausgelöst und die Mischung sofort mit etwa 1 ml 28 °C warmem LB-Medium versetzt und für etwa 2-3 h auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert.

Parameter: 130-200W (muss je nach Plasmid ausprobiert werden)

1,44 kV bis 2,2 kV

15 µF (Einstellung vom Gerät je nach Spannung vorgegeben)

### **3.14 Transposition von Bacmid-DNA und Blau/ Weiß-Screening**

Die Arbeiten zur Transposition der Bacmid-DNA erfolgen in Anlehnung an die Vorschriften zum Bac-to-Bac-Baculovirus Expressionssystem. Es werden LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin und 10 µg/ml Tetracyclin hergestellt und frisch je 100 µl X-Gal-Stammlösung (25 mg/ml DMF) und IPTG-Stammlösung (10 mg/ml H<sub>2</sub>O) hinzugegeben. 50 µl

kompetenter (siehe 3.12.1, S. 56) DH10Bac *E. coli* werden mit circa 5 ng der generierten rekombinanten Donorplasmid-DNA chemisch transformiert, auf beschriebenen Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die weiß gefärbten, auf dem entsprechenden Selektionsmedium überlebenden Kulturen werden gepickt, weiterkultiviert und die DNA auf herkömmliche Art isoliert (siehe 3.1.2.2, S. 48). Der erfolgreiche Einbau der gewünschten DNA in die Bacmid-DNA sollte abermals mittels PCR überprüft werden.

### 3.15 Einbringung der DNA in den Wirtsorganismus

#### 3.15.1 Transfektion von Bacmid-DNA in SF9-Zellen und Ernte des Baculovirus aus der transfizierten Zellkultur

Bei der verwendeten Methode der Insektenzellkultivierung (siehe II1.3, S. 18) verdoppeln sich die Insektenzellen innerhalb von 48 h. 24 h nach Überimpfen in neue Zellkulturflaschen sollte idealerweise eine Transfektion durchgeführt werden. Transfektion beschreibt den Vorgang der Einführung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen ohne shuttle. Als Medium wird T-3160 ohne Kanamycin- bzw. FCS-Zusatz verwendet.

Zum Einsatz kommen zwei Lösungen:

**Lösung A:** 1-2 µg Bacmid-DNA verdünnt in etwa 100 µl T-3160, keine Antibiotika

**Lösung B:** 1,5 - 9 µl Cellfectin® Reagens in etwa 100 µl T-3160, keine Antibiotika

Das Cellfectin® Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) stellt eine Lipid-Suspension dar, die durch langes Stehen lassen sedimentieren kann. Auf starkes, intensives Mischen sollte verzichtet werden. Zur Resuspendierung reicht mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes aus. Lösung A und Lösung B werden vereinigt, gemischt und bei Raumtemperatur für etwa 45 min stehen gelassen. Dann wird etwa 0,8 ml T-3160 ohne Antibiotika zugegeben und gründlich gemischt (Kein starkes Mischen!).

Das alte Medium wird von den Zellen mittels einer Membranpumpe abgesaugt und die Zellen werden mit dem antibiotikafreien Medium gewaschen. Nach diesem Waschschrift wird das Medium erneut abgesaugt. Nun werden die „trockenen“ Zellen mit der Lösung, die den Lipid-DNA-Komplex enthält überschichtet und etwa 5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wird das Transfektionsreagenz wieder abgesaugt, die Zellen werden mit neuem kanamycinhaltigem Medium überschichtet und wieder regulär kultiviert. Nach etwa 72 h können schon Baculoviren geerntet werden, die für eine neue Infektion genutzt werden können. Dazu werden die Kulturen wieder abgeschabt, in ein Falcon überführt und bei etwa 1000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Viren befinden sich im Überstand und können nach Verwerfen des Pellets und einer Zugabe von 2 % FBS bei 4 °C gelagert werden.

### 3.15.2 Infiltration der Tobacco Mosaic Virus-Module

Es kommen zwei unterschiedliche Module zum Einsatz. Ein 3'-Modul, welches das zu exprimierende Gen, das GOI, enthält und ein 5'-Modul, welches Sequenzen enthält, die einen *tool*-Charakter aufweisen. Jedes Modul und die nötige Rekombinase werden mittels Elektroporation in jeweils eine separate Kultur des *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (siehe 3.13.3, S. 58). Soll das GOI mit einem beliebigen Modul kombiniert werden, so kultiviert man getrennt voneinander die Kultur mit dem gewünschten Modul, die Kultur mit dem GOI und die Kultur mit der Integrase, d.h. der *RNA-abhängigen Polymerase*. Diese Kulturen können auch als *stock culture* bei -80 °C gelagert werden, so dass der Versuch immer unter identischen Bedingungen wiederholt werden kann.

Sind die Kulturen dicht genug in ca. 10 ml Selektionsmedium bei 28 °C gewachsen, werden von jeder Kultur etwa 500 µl mit einer Pipette abgenommen und in einem 2 ml Cap vereinigt. Die Kulturen werden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt gibt man 2 ml Infiltrationspuffer (siehe II8, S. 24) zu und homogenisiert, bis keine Pellets mehr erkennbar sind. Die erhaltene Suspension der Mischung der drei *Agrobacterienkulturen* wird mittels einer Spritze in die Blätter einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze injiziert, wobei die Verteilung der Injektionslösung im Blatt sehr gut zu beobachten ist. Je nach Alter und Beschaffenheit der Blätter unterscheidet sich deren Infiltrationspotenz stark von nahezu unmöglich bis sehr gut.

Zunächst wurden verschiedene Kombinationen von 3'- mit unterschiedlichen 5'-Modulen und teilweise auch unterschiedlichen Integrasen in ein und demselben Blatt eingebracht (siehe Tabelle 15, S. 61). Nach der Injektion

sollten die Blätter mit etwas Zellstoff vom überschüssigen Puffer befreit werden, um Salzverkrustungen der Blätter in der Nähe der Injektionsstelle zu vermeiden, weil sich dadurch leicht nekrotisches Gewebe bildet.

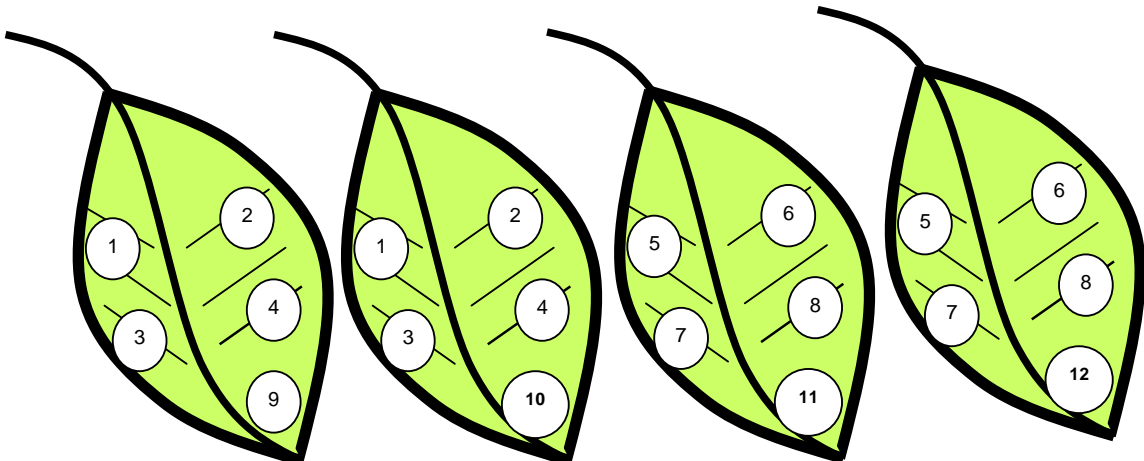
Tabelle 15: Infiltrationsschema am Beispiel von P2, P4 und GFP

Nachdem sich herauskristallisiert hat, bei welchen Modulen Aktivität zu verzeichnen ist, werden mit diesem Modul statt nur ein Teil eines Blattes direkt mehrere Blätter einer ganzen Pflanze infiltriert. Anbei die Abbildung einer Pflanze, die sich im optimalen Stadium befindet, um infiltriert zu werden.

P2			
	5'-Modul	3'-Modul	Integrase
1	pICH8420	P2	pICH 14313
2	pICH 10530	P2	pICH 14313
3	pICH 10570	P2	pICH 14313
4	pICH 11280	P2	pICH 14313
P4			
	5'-Modul	3'-Modul	Integrase
5	pICH 8420	P4	pICH 14313
6	pICH 10530	P4	pICH 14313
7	pICH 10570	P4	pICH 14313
8	pICH 11280	P4	pICH 14313
GFP			
	5'-Modul	3'-Modul	Integrase
9	pICH 8420	GFP	pICH 14313
10	pICH 10530	GFP	pICH 14313
11	pICH 10570	GFP	pICH 14313
12	pICH 11280	GFP	pICH 14313



Die hier gezeigte *Nicotiana benthamiana* Pflanze zeigt gesunde, große Blätter. Die den Kombinationen der Module zugeordneten Zahlen werden analog den gekennzeichneten Stellen der nachgebildeten Blätter in die richtigen Blätter entsprechend injiziert.



## 4 Datenbankrecherche, Anwendungen und Online-Tools

Zur Analyse und Bearbeitung von Protein- und Nukleinsäuresequenzen wurden die folgenden Datenbanken, Anwendungen und Online-Anwendungen benutzt:

### 4.1 ExPasy (Expert Protein Analysis System), Bioinformatikinstitut in Genf

Technisch sehr versierte Proteinanalyse,

[www.expasy.org](http://www.expasy.org)

#### 4.1.1 ExPasy-ENZYME

Enzymklassifizierung nach BAIROCH A (2000);

[www.expasy.org/enzyme/](http://www.expasy.org/enzyme/)

#### 4.1.2 ExPasy-Translate tool

Übersetzung von DNA- in Aminosäure-Code;

[us.expasy.org/tools/dna.html](http://us.expasy.org/tools/dna.html)

#### 4.1.3 PROSITE

Voraussagen zu Proteinfamilienzugehörigkeit, Domänen (FALQUET L *et al*, 2002; BUCHER P UND BAIROCH A, 1994);

[www.expasy.org/prosite/](http://www.expasy.org/prosite/)

#### 4.1.4 SWISS-PROT-Datenbank

Proteindatenbank für Sequenzvergleiche und Berechnung von Proteineigenschaften (MW, IEP) nach BOECKMANN B *et al*, 2003;

[www.ebi.ac.uk/swissprot](http://www.ebi.ac.uk/swissprot)

### 4.2 ClustalW

Paarweiser Sequenzvergleich mehrerer DNA- oder Aminosäurestücke nach THOMPSON J *et al* (1994);

[www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

### 4.3 NCBI

Homologiestudien durch Vergleiche mit der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (ALTSCHUL S *et al*, 1990);  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

### 4.4 FASTA

DNA- und Proteinsequenz Homologie-Studie (PEARSON W UND LIPMAN D, 1988);  
[www.ebi.ac.uk/fasta33/](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/)

### 4.5 SignalP

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

### 4.6 TargetP

Analyse der Proteinsequenz zur subzellulären Proteinlokalisierung;  
(EMANUELSSON O *et al* (2000))  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

### 4.7 auf Cytochrom P450-Enzyme spezialisierte Seiten

<http://arabidopsis-p450.biotec.uiuc.edu/>

<http://arabidopsis.org/info/genefamily/p450.html>

<http://www.p450.kvl.dk/>

## IV Ergebnisse

### 1 Ermittlung des Vollängenklones des Klons P4 für die Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Rauvolfia serpentina*

Im Zuge der Ermittlung mehrerer Cytochrom P450-Vollängenklone durch RUPPERT M (2001) wurde ein Fragment (siehe Abbildung 6, S. 64) gefunden, das mit P4 bezeichnet wird und das 3'-Ende eines Cytochrom P450-Klons darstellt. Das Verfahren, das zur Ermittlung dieses Fragmentes angewandt wurde, heißt **RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends)**.

Abbildung 6: 3'-Ende des Klons P4

1	GGC	ACT	GAA	GCT	GCT	GTG	GCT	GGA	GGG	AAG	GTG	GAT	TTC	AGG	TAT	TTG	CCA	
	G	T	E	A	A	V	A	G	G	K	V	G	F	R	Y	L	P	17
52	TTT	GGA	ATG	GGA	AGA	AGA	AGT	TGT	CCT	GGG	ATC	ATC	CTT	GCT	GTG	CCA	ATT	
	F	G	M	G	R	R	S	C	P	G	I	I	L	A	V	P	I	34
103	CTT	GGA	CTT	GTG	ATT	GCT	AAA	CTG	GTA	ACA	AAT	TTT	GAA	ATG	CAT	GCC	CCT	
	L	G	L	V	I	A	K	L	V	T	N	F	E	M	H	A	P	51
154	CAT	GGC	TTG	GAG	AAG	ATT	GAT	GTC	AGT	GAA	AAG	GGA	GGG	CAA	TTC	AGC	TTG	
	H	G	L	E	K	I	D	V	S	E	K	G	G	Q	F	S	L	68
205	CAC	ATT	GCA	AAA	CAT	TCC	ACA	GTT	GTC	TTC	AGA	CCA	ACC	AAA	GGA	TAA		
	H	I	A	K	H	S	T	V	V	F	R	P	T	K	G	*	85	

Erläuterungen zur Abbildung 6: gefunden von Dr. Martin Ruppert, die türkis unterlegte Sequenz diente als Matrize für den revers-komplementären Primer 5'-RACE-P4-1.

#### 1.1 Strategie zur Ermittlung des P4-Vollängenklons

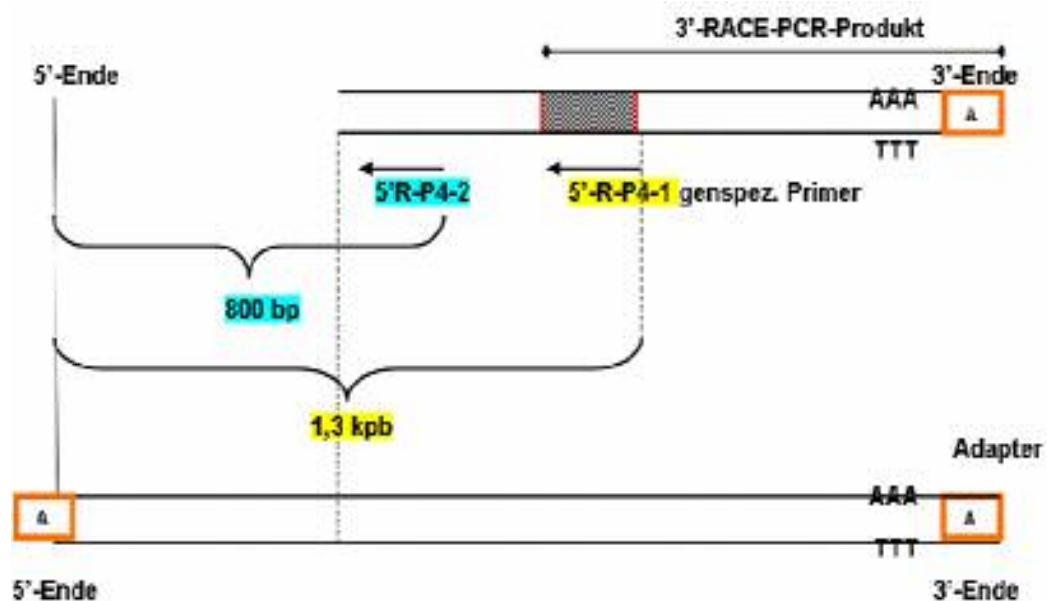
Das fehlende 5'-Ende wird vom 3'-Ende her in Richtung des 5'-Endes synthetisiert. Der genspezifische Primer für die PCR ist also revers-komplementär zur vorliegenden DNA-Sequenz, da die Primer immer als 5'-Oligomer vom Hersteller geliefert werden und die reale *in vitro*-Synthese durch die Polymerase natürlich immer von 5'-Richtung in 3'-Richtung verläuft.



Betrachtet man die Orientierung des Klons von Start- in Richtung Stop-Codon, so verläuft bildlich gesehen die Synthese des DNA-Stranges ausgehend vom 3'-Ende der Matrize in 5'-Richtung,. Diese Darstellung wurde gewählt, um den Weg der Klonierungsstrategie zu verdeutlichen.

**Abbildung 7: RACE-PCR Schema zur Ermittlung des Vollängenklons P4 mit Hilfe der Primer 5'-RACE-P4-1 und 5'-RACE-P4-2**

**Erläuterungen:** **A** im orangefarbenen Kästchen bezeichnet den anligierten Adapter. Zuerst wurde mit degenerierten Primern das 3'-Ende gefunden. Damit wurde der Primer 5'-R-P4-1 generiert. Das Produkt der folgenden PCR stellt die Matrize für die Synthese des Primers 5'-R-P4-2. Die folgende PCR vervollständigt den P450-Klon P4.



5'-RACE-P4-1 Primer
5'- GAA ATC CAC CTT CCC TCC AGC CAC AG - 3'
Schmelztemperatur: 68 °C, GC-Anteil: 57,7%
5'-RACE-P4-2 Primer
5'- TGA TAA CAA TAC CCT CTG TCC TTA CTG - 3'
Schmelztemperatur: 61,9 °C, GC-Anteil: 40,7%

Der Buchstabe **A** im orangefarbenen Kästchen steht für die dem Klon angefügten Adapter, für die es spezielle Adapter-Primer von Invitrogen (Karlsruhe) zu kaufen gibt. Der Adapter-Primer für das 3'-Ende wurde bereits in der PCR zur Generierung des 3'-Endes erfolgreich benutzt.

Der Adapter-Primer für das 5'-Ende dient als *forward*-Primer in den folgenden zwei PCR zur Amplifizierung des restlichen Klons durchgehend bis zum vollständigen 5'-Ende.

Zunächst wird eine PCR durchgeführt, bei der der 5'-Adapter-Primer und der genspezifische Primer 5'-RACE-P4-1 benutzt werden. Es entsteht ein Fragment, das etwa 800bp groß ist. Das Fragment bringt zwar einen weiteren Teil auf dem Weg zum vollständigen Klon P4, das 5'-Ende ist jedoch noch nicht komplett. Es wird ein neuer genspezifischer revers-komplementärer Primer 5'-RACE-P4-2 synthetisiert, der sich erneut am 5'-Ende orientiert, jetzt aber am 5'-Ende des neu gefundenen Fragmentes. Dieses Stadium der Ermittlung des P450-Klons P4 ist in Abbildung 7, S. 65 zu sehen. Das letzte fehlende Stück ist ebenfalls etwa 800bp groß und ist das Syntheseprodukt der letzten PCR, bei der jetzt der 5'-RACE-P4-2 als der genspezifische *revers*-Primer fungiert.

**Tabelle 16: PCR zur Synthese des ersten 800bp großen Fragmentes von Klon P4**

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	94	1
5	94	0,5
	65	3
5	94	0,5
	63	3
25	94	0,33
	61	3

Probe	
Template 1:100 verd. aus III3.11, S. 55	1 µl
Gene Racer™ 5'-Primer (20 µM)	1 µl
5'-RACE-P4-1 (20 µM)	1 µl
dNTP's (10 mM each)	1 µl
Advantagepolymerase-Puffer (10×)	5 µl
Advantage-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Ampuwa ad 50.0 µl	40 µl

Die DNA-Fragmente werden nach jeder der beiden PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, dadurch von Verunreinigungen der PCR-Ansätze gereinigt und auf die Größe hin durch Vergleiche mit einem Marker überprüft.

Tabelle 17: PCR zur Generierung des zweiten 800bp großen Fragmentes von P4

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Probe	
1	94	1	Template 1:100 verd. aus III3.11, S. 55	1 µl
5	94	0,5	Gene Racer™ 5'-Primer (20 µM)	1 µl
	71	3	5'-RACE-P4-2 (20 µM)	1 µl
5	94	0,5	dNTP's (10 mM each)	1 µl
	69	3	Advantagepolymerase-Puffer (10x)	5 µl
25	94	0,33	Advantage-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
	67	3	Ampuwa ad 50.0 µl	40 µl

## 1.2 Zwischenklonierungsschritte für die Sequenzanalyse und DNA-Gewinnung

Die Fragmente werden aus dem Agarosegel mit dem NucleoSpin Extract Kit extrahiert (siehe III3.4, S. 51) und zum Zwecke der DNA-Konzentrierung präzipitiert (siehe 3.5, S.51).

Die eluierten Fragmente weisen einen A-Überhang auf, den die Advantage-Polymerase angefügt hat. Das bietet einen entscheidenden Vorteil. Die Fragmente können beide in pGEMTeasy, der selbst einen T-Überhang aufweist, inkloniert werden. So ist kein Restriktionsverdau von PCR-Produkt und Vektor nötig. Nach erfolgreicher Ligation wird der ganze Ligationsansatz in Top10F' *E. coli* transformiert (siehe III3.13.3, S.57) und auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Es werden einzelne Kulturen auf korrekte Insertion mit Quick-Präparation (siehe III3.1.2.1, S. 48) überprüft und eine positive Kultur im entsprechenden Selektionsflüssigmedium zu 10 ml kultiviert. Diese Kultur wird mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (siehe III3.1.2.2, S. 48 ) aufgeschlossen und die DNA eluiert.

Nach der DNA-Vermehrung wird jedes Fragment mit Hilfe von Standard-Primern (m13for und m13rev) sequenziert. So wird die Sequenz durch Überprüfen der übereinstimmenden Stellen Schritt für Schritt zusammengesetzt, bis der vollständige Klon P4 vorliegt.

Abbildung 8: Volllängenklon P4

Erläuterungen: Der Klon P4 wurde mit Hilfe der RACE-PCR über insgesamt drei Zwischenprodukte ermittelt. Start- und Stop-Codon sind rot gekennzeichnet. Der braun gekennzeichnete Bereich zählt zum untranslatierten Bereich und stellt keinen Teil des eigentlichen Klons dar.

		9			18			27			36			45			54
<i>CTT</i>	<i>GTA</i>	<i>CTA</i>	<i>TAC</i>	<i>CTT</i>	<i>TCT</i>	<i>TGA</i>	<i>TTC</i>	<i>CTC</i>	<i>TCT</i>	<i>CAT</i>	<i>ACA</i>	<i>ATC</i>	<i>ACA</i>	<i>GCA</i>	<i>ATG</i>	GGC	AAC
															<b>M</b>	G	N
		63			72			81			90			99			108
TTT	CTC	AAT	AAA	TCC	GTC	TTT	TGC	ATT	CTC	CTT	GCA	ATT	ACA	CTT	CTC	TCA	TGC
F	L	N	K	s	V	F	C	I	L	L	A	I	T	L	L	S	C
		117			126			135			144			153			162
ACC	AAA	CTA	TTT	TCT	CCC	TGC	ATT	TCC	TTT	CCT	TCC	ACA	ATC	AAC	TCT	CTT	TTG
T	K	L	F	S	P	C	I	S	F	P	S	T	I	N	S	L	L
		171			180			189			198			207			216
TTC	ACA	ATC	TCT	TTA	CTT	TAC	TTC	ATC	ATA	CAC	TTT	CTC	CAC	ACC	AAA	AAA	TCA
F	T	I	S	L	L	Y	F	I	I	H	F	L	H	T	K	K	S
		225			234			243			252			261			270
AGT	AAA	CTC	CCA	CCC	GGG	CCA	TCC	TCC	TTC	CCC	ATA	TTT	GGC	AAT	TGG	CTA	CAA
S	K	L	P	p	G	P	S	S	F	p	I	F	G	N	W	L	Q
		279			288			297			306			315			324
GTA	GGC	AAT	GAC	TTA	AAT	CAT	CGT	TTA	CTA	GCC	GCG	ATG	TCT	AAG	AAA	TAC	GGG
V	G	N	D	L	N	H	R	L	L	A	A	M	S	K	K	Y	G
		333			342			351			360			369			378
CCA	ATA	TTC	TTG	CTC	AAG	CTC	GGC	TCA	AAA	AAC	CTA	GCC	GTG	GTA	TCC	AAC	CCT
P	I	F	L	L	K	L	G	S	K	N	L	A	V	V	S	N	P
		387			396			405			414			423			432
GAC	CTA	GCA	AAC	CAT	GTC	CTA	CAC	ACA	CAA	GGG	GTC	GAA	TTC	GGC	TCT	CGC	CCA
D	L	A	N	H	V	L	H	T	Q	G	V	E	F	G	S	R	P
		441			450			459			468			477			486
CGA	AAC	GTT	GTG	TTC	GAC	ATT	TTC	ACA	GGC	AAT	GGC	CAA	GAC	ATG	GTG	TTC	ACA
R	N	V	V	F	D	I	F	T	G	N	G	Q	D	M	V	F	T
		495			504			513			522			531			540
ATC	TAT	GGT	GAA	CAT	TGG	AGA	AAA	ATG	AGA	AGA	ATC	ATG	ACT	CTT	CCA	TTC	TTC
I	Y	G	E	H	W	R	K	M	R	R	I	M	T	L	P	F	F
		549			558			567			576			585			594
ACC	AAC	AAG	GTT	GTT	CAT	CAG	TAT	AGT	GAT	ATG	TGG	GAG	AAT	GAA	ATG	GAC	TTA
T	N	K	V	V	H	Q	Y	S	D	M	w	E	N	E	M	D	L
		603			612			621			630			639			648
GTT	GTC	CAT	GAC	TTG	CAA	AGT	GAT	CAA	ACA	GTA	AGG	ACA	GAG	GGT	ATT	GTT	ATC
V	V	H	D	L	Q	S	D	Q	T	V	R	T	E	G	I	V	I
		657			666			675			684			693			702
AGA	AAA	AGG	TTG	CAG	TTG	ATG	CTA	TAC	AAT	ATT	ATG	TAT	AGA	ATG	ATG	TTT	GAT
R	K	R	L	Q	L	M	L	Y	N	I	M	Y	R	M	M	F	D
		711			720			729			738			747			756
GCA	AAG	TTT	GAG	TCA	CAA	AAA	GAT	CCA	AAG	TTC	ATT	CAA	GCA	CTC	AGT	TCA	ATT
A	K	F	E	S	Q	K	D	P	K	F	I	Q	A	L	S	S	I
		765			774			783			792			801			810
CAG	AGA	GAA	GTA	GAT	TGG	CTC	AAA	GTT	TTG	ATT	ATA	ATT	TAT	GGC	GAT	TTT	ATT
Q	R	E	V	D	W	L	K	V	L	I	I	I	Y	G	D	F	I
		819			828			837			846			855			864
CCC	CTG	CTT	AGA	CCA	TTC	TTG	AGA	GGA	TAC	CTA	AAC	AAG	TGC	AGG	GAT	TTG	CAG
P	L	L	R	P	F	L	R	G	Y	L	N	K	C	R	D	L	Q
		873			882			891			900			909			918
AGG	AGA	AGG	CTT	GCA	TTT	TTC	AAC	AAT	TAT	TAT	GTC	GAG	AAA	AGA	AGG	AAA	ATA
R	R	R	L	A	F	F	N	N	Y	Y	V	E	K	R	R	K	I
		927			936			945			954			963			972
ATG	GCT	GAA	AAT	GGA	GAA	AAG	CAC	AAA	ATA	AGC	TGT	GCA	ATT	GAT	CAC	ATA	ATA

M	A	E	N	G	E	K	H	K	I	S	C	A	I	D	H	I	I
		981			990			999			1008			1017			1026
GAT	GCA	CAA	ATG	AAA	GGA	GAA	ATC	ACT	GAA	GAA	AAT	GTG	CTA	TAC	ATT	GTG	GAA
D	A	Q	M	K	G	E	I	T	E	E	N	V	L	Y	I	V	E
		1035			1044			1053			1062			1071			1080
GAC	ATC	AAT	GTT	GCA	GCA	ATA	GAA	ACA	ACT	TTA	TGG	TCC	ATG	GAA	TGG	GCA	ATT
D	I	N	V	A	A	I	E	T	T	L	W	S	M	E	W	A	I
		1089			1098			1107			1116			1125			1134
GCT	GAG	CTG	GTG	AAT	CAT	CCA	AGA	GTT	CAG	AAC	AAG	ATC	AGA	GAT	GAA	ATC	TCA
A	E	L	V	N	H	P	R	V	Q	N	K	I	R	D	E	I	s
		1143			1152			1161			1170			1179			1188
ACT	GTT	CTT	CAA	GGA	AAA	CCA	GTC	ACA	GAA	TCA	AAC	CTA	CAA	GAA	TTA	CCC	TAT
T	V	L	Q	G	K	P	V	T	E	S	N	L	Q	E	L	P	Y
		1197			1206			1215			1224			1233			1242
CTT	CAE	GCC	ACA	GTA	AAT	GAA	ACA	TTG	AGA	CTA	CAC	ACA	CCA	ATA	CCT	TTG	CTT
L	Q	A	T	V	N	E	T	L	R	L	H	T	P	I	P	L	L
		1251			1260			1269			1278			1287			1296
GTA	CCC	CAT	ATG	AAT	CTT	GAA	GAG	GCC	AAG	TTA	GGT	GGC	TAG	ACC	ATA	CCT	AAA
V	P	H	M	N	L	E	E	A	K	L	G	G	Y	T	I	P	K
		1305			1314			1323			1332			1341			1350
GAA	TCA	AAG	GTA	GTG	GTC	AAT	GCC	TGG	TGG	CTG	GCT	AAC	AAT	CCT	GCA	TGG	TGG
E	S	K	V	V	V	N	A	W	W	L	A	N	N	P	A	W	W
		1359			1368			1377			1386			1395			1404
AAG	AAC	CCC	GAT	GAG	TTC	CGG	CCA	GAA	CGG	TTC	GTG	GAG	GAA	GAA	AAT	GGC	ACT
K	N	P	D	E	F	R	P	E	R	F	V	E	E	E	N	G	T
		413			1422			1431			1440			1449			1458
GAA	GCT	GCT	GTG	GCT	GGT	GGG	AAG	GTG	GAT	TTC	AGG	TAT	TTG	CCA	TTT	GGA	ATG
E	A	A	V	A	G	G	K	V	D	F	R	Y	L	P	F	G	M
		1467			1476			1485			1494			1503			1512
GGA	AGA	AGA	AGT	TGT	CCT	GGG	ATC	ATC	CTT	GCT	GTG	CCA	ATT	CTT	GGA	CTT	GTG
G	R	R	S	C	P	G	I	I	L	A	V	P	I	L	G	L	V
		1521			1530			1539			1548			1557			1566
ATT	GCT	AAA	CTG	GTA	ACA	AAT	TTT	GAA	ATG	CAT	GCC	CCT	CAT	GGC	TTG	GAG	AAG
I	A	K	L	V	T	N	F	E	M	H	A	P	H	G	L	E	K
		1575			1584			1593			1602			1611			1620
ATT	GAT	GTC	AGT	GAA	AAG	GGA	GGG	CAA	TTC	AGC	TTG	CAC	ATT	GCA	AAA	CAT	TCC
I	D	V	S	E	K	G	G	Q	F	S	L	H	I	A	K	H	S
		1629			1638			1647			1656			1665			1674
ACA	GTT	GTC	TTC	AGA	CCA	ACC	AAA	GGA	TAA	--A	ATA	CAA	GTT	TCT	GGT	GTT	TTG
T	V	V	F	R	P	T	K	G	*								

## 2 Überexpression von Cytochrom P450-Enzymen in *sf9*-Insektenzellen

Insektenzellen können über eine Infektion mit rekombinalem Baculovirus, dem Expressionsvektor, zur Überexpression eines rekombinanten Proteins gebracht werden. Zunächst müssen also diese Baculoviren als Träger des GOI generiert werden.

### 2.1 Konstruktion des Expressionsvektors mit dem GOI

Der P450-Volllängenklon P4 soll für eine Einklonierung in den pFASTBAC1-Vektor vorbereitet werden. Zu diesem Zweck werden Primer mit passenden

Restriktionsschnittstellen für den pFASTBAC1-Vektor und den entsprechenden genspezifischen Sequenzen entworfen. Zur Einklonierung sollten nach Möglichkeit Schnittstellen gewählt werden, die sich nur in der MCS des Vektors und nicht im GOI bzw. im restlichen Vektorteil wieder finden. In diesem Falle wurden BamHI für das 5'-Ende und XhoI für das 3'-Ende gewählt.

**Abbildung 9: 5'- und 3'-Primer für Einklonierung des P450-Klons P4 in pFASTBAC1**

<b>forward-Primer: P4-Bac-for</b>
5'- ACG GAT CCA TGG GCA ACT TTC TCA ATA AAT C - 3' Schmelztemperatur: 65,5 °C, GC-Anteil: 41,9%
<b>reverse-Primer: P4-Bac-rev</b>
5'- CTG CTC GAG TTA TCC TTT GGT TGG TCT G - 3' Schmelztemperatur: 66,6 °C, GC-Anteil: 50%

Die sich anschließende PCR, bei der eine cDNA-Bank das Template stellt, die auch zum „Fischen“ von Vollängenklonen mit der RACE-PCR (siehe III.3.11, S. 55) geeignet ist, wird als „Touch down“-PCR (siehe III.3.10.2, S. 55) durchgeführt. Das erhöht die Sicherheit, die richtigen Klone für die Einklonierung in pFASTBAC1 zu generieren. Die erhaltenen PCR-Fragmente werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt, extrahiert, nach der Fällung in den pGEMTeasy-Vektor inkloniert, um dann in Top10F' *E. coli* transformiert und kultiviert zu werden. Dieser Zwischenklonierungsschritt dient der DNA-Vermehrung und einfachen Sequenzanalyse, da bei Verwendung dieses Vektors keine speziellen Primer für die Sequenzierungsreaktion gebraucht werden und man auf Standard-Primer zurückgreifen kann (siehe 1.2, S.67).

Nun folgt der Verdau von pFASTBAC1 und den positiven Klonen im pGEMTeasy-Vektor mit BamHI/XhoI nach den entsprechenden Enzymhersteller-Bedingungen und die Aufreinigung der Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion. Um nun die Ligation von Fragment und Vektor nicht durch falsche Salzkonzentration zu stören, werden die Fragmente nur in H<sub>2</sub>O statt in TE-Puffer aufgenommen. Der Ligationsansatz kann ohne weitere Aufarbeitung in TOP10F' *E. coli*

transformiert und kultiviert werden. Die Sequenz wird mit Standardprimern bestätigt.

Tabelle 18: PCR-Bedingungen für Klonierung von P450-Klon P4 in pFASTBAC1

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Probe	
1	94	1	Template 1:100 verd. aus III3.11, S. 55	1 µl
5	94	0,5	Primer P4-Bac-for (20 µM)	1 µl
	68	3		
5	94	0,5	Primer P4-Bac-rev (20 µM)	1 µl
	66	3		
26	94	0,33	dNTP's (10 mM each)	1 µl
	68	3	Advantagepolymerase-Puffer (10×)	5 µl
			Advantage-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
			Ampuwa ad 50.0 µl	40 µl

## 2.2 Gewinnung von Bacmid-DNA

Das rekombinante Plasmid (①<sup>1</sup>) aus 2.1, S. 69 wird in DH10BAC *E. coli* kompetente Zellen transformiert (②). Die DH10BAC kompetenten Zellen enthalten den Bacmid-Abschnitt mit einer mini-attTn7-target Seite und das Helfer-Plasmid. Der Bacmid-Abschnitt codiert für einen sogenannten Baculovirus-Shuttle-Vektor. Außerdem enthält er die genetische Information für eine Kanamycin-Resistenz. Diese ist erforderlich, um durch gezielte Selektion einen eventuellen Verlust des Bacmid-Abschnittes kenntlich zu machen. Das mini-Tn7-Element des Donor Plasmids (pFASTBAC1-Vektor) rekombiniert unter der Anwesenheit des Transpositions-Proteins (→ Helfer Plasmid) zur mini-attTn7-target Seite (③) des Bacmid-Abschnittes und wird dort eingebaut.

Das für die Transposase codierende Helferplasmid besitzt eine Sequenz, welche für eine Tetracyclin-Resistenz codiert. Diese Resistenz erlaubt, solche Organismen abzutrennen, welche unter bestimmten Umständen einen

<sup>1</sup> Die schwarzunterlegten arabischen Ziffern bezeichnen die in Abbildung 10, S. 74 dargestellten Bildelemente, die durch die Erläuterungen im Text ihre Erklärung finden.

Verlust des Helferplasmids erleiden und so die für die erfolgreiche Transposition (③) benötigte genetische Information verlieren.

Dem nun eingebauten pFASTBAC1 Donor-Plasmid wurde ein für Ampicillin-Resistenz codierender Genabschnitt mitgegeben, der es erlaubt die potentiellen Bakterien von den übrigen abzutrennen. Die Bakterien werden auf Ampicillin-Nährmedien kultiviert wobei diejenigen, welche keinen Vektor aufgenommen haben, keine Ampicillin-Resistenz aufweisen. Es bleiben folglich nur die mit dem Vektor transformierten übrig.

Erfolgreich rekombinierte Bacmide werden später daran zu erkennen sein, dass die entsprechenden Kolonien keine blaue Färbung aufweisen. Das für die  $\beta$ -Galactosidase codierende Gen wurde durch den Einbau des Zielgens, wie aus (②) ersichtlich, zerstört. Tritt die Blaufärbung durch den den LB-Agar-Platten zugegebenen Farbstoff *x-Gal* auf, so werden dadurch Kulturen gekennzeichnet, bei denen der Einbau nicht erfolgreich verlaufen ist. Die Dauer des Blau/ Weiß-Screenings beträgt zwischen sieben und vierzehn Tagen, da die Bakterienkulturen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden müssen, um ein Überwuchern der Platten zu verhindern. Durch die niedrige Temperatur beansprucht die Verstoffwechslung durch die Bakterien mehr Zeit.

### 2.3 Gewinnung und Ernte rekombinanter Baculoviren

Die Kulturen mit rekombinantem Bacmid werden im 10 ml Selektionsmedium (LB, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 7  $\mu$ g/ml Gentamycin, 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin) bis zur stationären Phase kultiviert. Danach wird die Bacmid-DNA auf herkömmlichem Wege über Plasmid-Präparation (siehe III3.1.2.2, S. 48) isoliert (④). Um sicher zu gehen, das richtige Insert zu verwenden, wird eine PCR nach dem Schema aus 2.1, S. 69 durchgeführt. Hierbei dient eine 1:100 Verdünnung der isolierten Bacmid-DNA als Template. Die erhaltene Bacmid-DNA kann dann dazu benutzt werden, um mit Hilfe von CELLFECTIN-Reagenz Insektenzellen zu transfizieren (⑤). Dies wird der Anleitung von III3.15.1, S. 59 folgend durchgeführt. Auf diese Weise können die von den transfizierten Insektenzellen gewonnenen Viren-Stöcke dazu benutzt werden, Insektenzellen zu infizieren (⑥) und in diesen die Expression des Proteins anzuregen. Es empfiehlt sich jedoch, die Infektion der Insektenzellen und

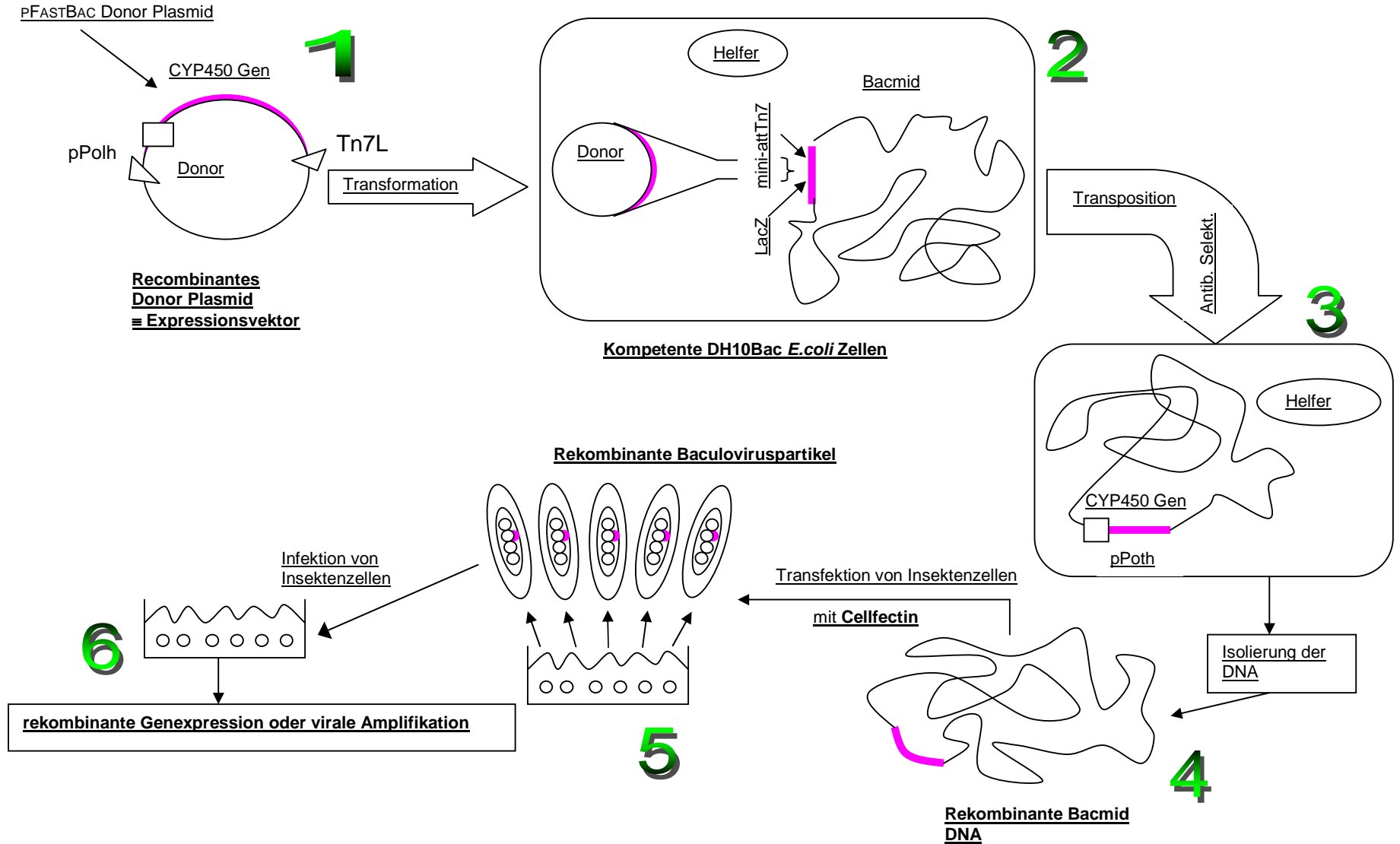


---

Ernte der Viren mehrfach zu wiederholen, um eine ausreichende Virusdichte für anständige Expression und anschließende Aktivitätstests zu erreichen.

**Abbildung 10: Generierung des rekombinanten Baculovirus und Genexpression mit Bac-To-Bac Expressionssystem**

Die detaillierte Erklärung der Abbildung ist unter den Punkten 0, S. 71 und 2.3, S. 72 nachzulesen. Alle Zahlen aus der Zeichnung sind im Text als schwarz unterlegte Nummern wieder zu finden.



## 2.4 Infektion, Expression, Mikrosomenisolierung und Aktivitätstest

Das primäre Ziel ist die Etablierung des Insektenzellsystems und die heterologe Expression der Vinorin-Hydroxylase. In einer unabhängigen Versuchsreihe mit radioaktiv markiertem Vinorin kam RUPPERT M jedoch zu dem Ergebnis, dass nicht-transformierte sf9-Insektenzellen das für den Aktivitätstest als Substrat elementare Vinorin deacetylieren (unveröffentlichte Daten). Durch die Deacetylierung wird die Prüfung des rekombinanten Proteins auf die gesuchte Vinorin-Hydroxylase-Aktivität vor ein unüberwindbares Problem gestellt. In einem solchen Fall wird normalerweise auf die Testung des Enzyms mit einem anderen Substrat zurück gegriffen. Jedoch hat FALKENHAGEN H *et al* (1995) die hohe Substratspezifität der Vinorin-Hydroxylase festgestellt. Damit ist die Identifizierung des heterolog exprimierten Enzyms mit einem anderen Substrat nicht aussagefähig. Folglich kann der definitive Beweis, dass es sich bei einem exprimierten Protein um die Vinorin-Hydroxylase handelt an dieser Stelle nicht erbracht werden. Ab diesem Zeitpunkt beschränkt sich die Etablierung des Insektenzellsystems auf die heterologe Identifizierung der putativen Cinnamoyl-Hydroxylase.

Die Insektenzellen werden nun sowohl mit dem in pFASTBAC1 vorliegenden P450-Klon P4, als auch mit der ebenfalls in pFASTBAC1 vorliegenden Cytochrom P450-Reduktase (RUPPERT M, unveröffentlichte Daten) infiziert. Hinzu kommt eine dritte Infektion, die eine Kombination aus beiden rekombinanten Baculoviren darstellt. Das heißt in diesem Zusammenhang, dass eine Infektion sowohl mit P4 als auch mit der Cytochrom P450-Reduktase in der gleichen Zellkulturflasche vorgenommen wird. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Coexpression bezeichnet.

24h nach dem 1:1-Überimpfen einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche sollten die sf9-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase sein und sich damit im besten Stadium für eine Infektion mit dem Baculovirus befinden. Nach Abnehmen des Mediums werden die Zellen mit 5 ml bzw. 2,5 ml + 2,5 ml Baculoviren-haltigem Medium unter keimfreien Bedingungen (Laminar flow-Box) infiziert. Die Inkubationszeit sollte 60 min bei 25 °C nicht unterschreiten

und die Zellkulturflaschen müssen alle 5 min geschwenkt werden, so dass sich das virale Medium gut über die Zellen verteilt und alle Zellen benetzt werden. Dann werden 20 ml Kultivierungslösung und Hemin (Stammlösung: 2 mg/ml in 50%iger ethanolischer 0,2 N NaOH) zugegeben. Die Endkonzentration an Hemin sollte 4 µg/ml pro infizierte Zellkulturflasche betragen, wobei darauf zu achten ist, die Heminlösung nicht direkt auf die Zellen zu geben, sondern vorher in den 20 ml Zusatzmedium zu lösen. Die abzentrifugierten Insektenzellen werden nach dem Prinzip der Mikrosomen-Isolierung aufgeschlossen (siehe III1.2.3, S. 32).

Das isolierte Exprimat wird nun auf Aktivität der Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Rauvolfia serpentina* getestet (siehe III2.3, S.46). Um sicher zu gehen, dass die Insektenzellkultur per se keine Aktivitäten dieser Art besitzt, wird der Test nach einem umfangreichen Blindprobensystem durchgeführt. Die Zuverlässigkeit des Testsystems wird durch positiv-Kontrollen garantiert. Diese positiv-Kontrollen sind Mikrosomen aus T<sub>30</sub>-Suspensionskultur, die am gleichen Tag wie die Insektenzellen geerntet werden. Die Mikrosomen-Präparation der T<sub>30</sub>-Zellen findet nach III1.2.1, S. 30 statt.

**Tabelle 19: Inkubationsplan für den Aktivitätstests der Cinnamoyl-Hydroxylase**

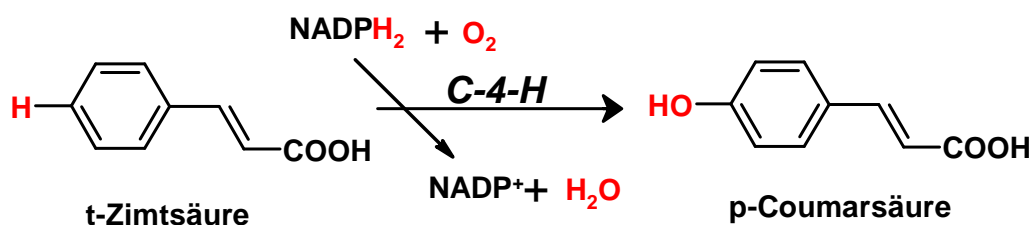
Mikrosomen	Cosubstrat	Substrat	Puffer
2 x 200 µl T <sub>30</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
(200 µl T <sub>30</sub> ) <sub>den</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
200 µl T <sub>30</sub>	-/-	3 µl Z	247 µl A2
200 µl T <sub>30</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	-/-	247 µl A2
O	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
(O) <sub>den</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
CPR	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
(CPR) <sub>den</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
2 x P4	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
(P4) <sub>den</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
P4	-/-	3 µl Z	247 µl A2
P4	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	-/-	247 µl A2
2 x P4 + CPR	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2
(P4 + CPR) <sub>den</sub>	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	3 µl Z	247 µl A2

P4 + CPR	-/-	3 µl Z	247 µl A2
P4 + CPR	50 µl 20 mM NADPH <sub>2</sub>	-/-	247 µl A2

Erläuterungen: Zimtsäure in EtOH, [1mg/ml] (**Z**), NADPH<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O [10mg/ml] (**NADPH<sub>2</sub>**), denaturiert (15 min, 95 °C), Substrat- und Co-Faktor-Zugabe nach Abkühlen (**den**), Isolierte Mikrosomen der Kontrolle: Insektenzellmikrosomen ohne Expression (**O**), Isolierte Mikrosomen des P450-Klons P4 (**P4**), Isolierte Mikrosomen der Cytochrom P450-Reduktase (**CPR**), Isolierte Mikrosomen von coexprimierter CPR und P4 (**P4+CPR**).

Der unter Verwendung des Baculovirussystems heterolog in *sf9*-Insektenzellen exprimierte P450-Klon P4 setzt Zimtsäure zu p-Coumarsäure unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH<sub>2</sub> um.

Abbildung 11: Umsetzung von Zimtsäure zu p-Coumarsäure unter Verbrauch von NADPH<sub>2</sub> und Sauerstoff

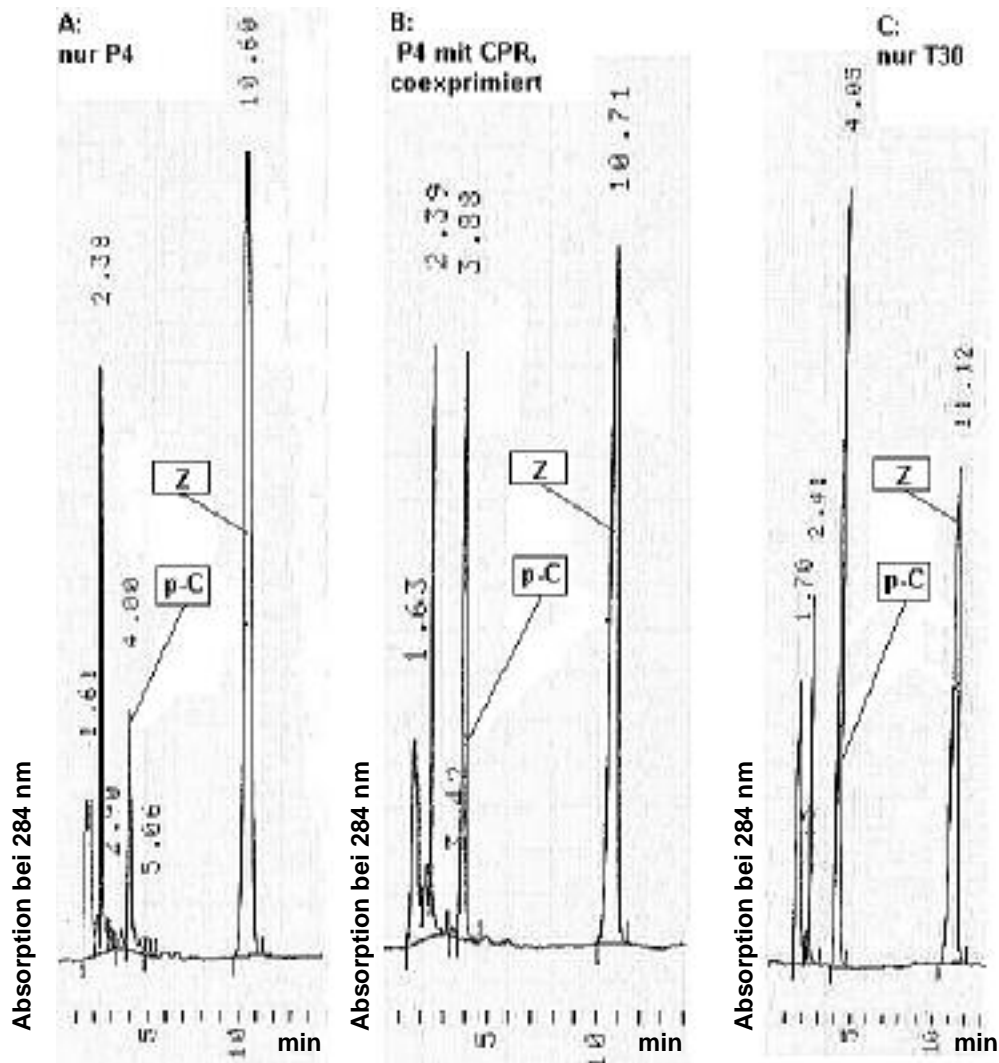


Jeder Inkubationsansatz wird zur Beendigung der enzymatischen Reaktion mit 60 µl 0,1 N HCl abgestoppt (siehe III.2.3, S. 46). Das bietet den Vorteil, dass sowohl Substrat als auch Produkt quantitativ in der wässrigen Lösung des Inkubationsansatzes protoniert werden und beim anschließenden Ausschütteln mit EtOAc ebenfalls quantitativ in die organische Phase übergehen.

Das Substrat Zimtsäure (siehe Tabelle 19, S. 76) wird zur p-Coumarsäure durch die Proben der isolierten T<sub>30</sub>-Mikrosomen, die Mikrosomen des Klons P4 und die Mikrosomen der coexprimierten Probe von P4+CPR, umgesetzt. Die Probe P4 (**A**) weist den wenigsten Umsatz der drei aktiven Proben auf. An zweiter Stelle steht die Probe mit Mikrosomen aus der Coexpression von P4+CPR. Den höchsten Umsatz zeigen die Mikrosomen aus T<sub>30</sub>.

Abbildung 12: HPLC-Ausdrucke der im Text benannten Proben A, B und C

Erläuterungen: Die Probe P4 (**A**) weist den geringsten Umsatz der drei aktiven Proben auf. An zweiter Stelle steht die Probe mit Mikrosomen aus der Coexpression: P4+CPR (**B**). Den höchsten Umsatz zeigen die Mikrosomen aus T<sub>30</sub> (**C**). Die Kürzel **p-C** und **Z** stehen für p-Coumar- und Zimtsäure. Die Messung erfolgte bei 260 nm.



Die isolierten Mikrosomen aus nicht-transformierten Insektenzellen (ohne Expression: „**0**“, siehe Tabelle 19, S.76) und aus der alleine exprimierten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase („**CPR**“, siehe Tabelle 19, S.76) zeigen beide keinen Umsatz. Kein Umsatz ist auch beim Auslassen von NADPH<sub>2</sub> und bei Denaturierung der jeweiligen Enzymlösung zu verzeichnen.

Die Analyse mittels SDS-Gel hat kein Ergebnis ergeben. Es konnten keine Banden im Vergleich zu den übrigen Kontrollen entdeckt werden, die eine Überexpression des exprimierten Klons beweisen würden.

### 3 Die „Putative Reduktase“

Im Arbeitskreis Stöckigt wurde im Zeitraum von Mitte März 2003 bis Ende Juni 2003 ein Projekt durchgeführt, welches den internen Namen Homology Cloning trug. Das Hauptinteresse bei diesem Projekt bestand in der Identifizierung der Vinorin-Hydroxylase (siehe Abbildung 3, S. 6) und Abbildung 25, S. 110). Dieses Cytochrom P450-Enzym ist verantwortlich für die Synthese eines wichtigen Intermediats der Ajmalin-Biosynthese. Bis dato ist es nicht gelungen, das verantwortliche Gen eindeutig durch heterologe Expression zu identifizieren.

#### 3.1 Homology Cloning

Das Grundprinzip des Homology Clonings ist die Suche nach Vollängenklonen einer bestimmten Enzymfamilie mit Hilfe degenerierter Primer. Diese degenerierten Primer werden entsprechend spezifischer, hoch konservierter, homologer Proteinsequenzen der Cytochrom P450-Enzyme entworfen (siehe I2.6, S. 11). So findet man cDNA-Fragmente, welche diese Sequenzen aufweisen und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit der gesuchten Enzymspezies angehören. Die so gefundenen cDNA-Fragmente dienen als Matrize für genspezifische Primer, die letzten Endes in einer RACE-PCR zum Vollängenklon führen sollen.

Da das Verfahren beim Ermitteln eines Vollängenklon analog ist zu *1.1 Strategie zur Ermittlung des P4-Vollängenklons* (siehe S. 64) wird hier auf die genaue Darlegung der Versuchsdurchführung verzichtet. Im Zuge dieses Projektes wurden drei Vollängenklone von P450s ermittelt, d.h. von jedem Klon liegt das 5'-Ende und das 3'-Ende vor. Die vollständige Sequenz muss noch durch Sequenzierung ermittelt werden. Die bereits vorhandenen DNA-Sequenzen dieser Vollängenklone sind im Anhang zu finden, wo ausserdem die restlichen Teilsequenzen zu weiteren potentiellen Cytochrom P450-Genen aufgeführt sind.

Durch die unspezifische Bindung eines Primers, der, wie schon erwähnt, eigentlich zum „Herausfischen“ von Cytochrom P450-Enzymen gedacht war, wurden cDNA-Stücke gefunden, die für eine putative Reduktase codieren. Nach dem Kompletieren des Vollängenklones wurde die vorläufige Identifizierung dieser unbekanntes Reduktase übernommen.

Tabelle 20: Volllängenklon der putativen Reduktase

Erläuterungen: Klon der unbekanntenen Reduktase. Start- und Stop-Codon sind rot gekennzeichnet. Der braun gekennzeichnete Bereich zählt zum untranslatierten Bereich und stellt keinen Teil des eigentlichen Klons dar.

		9			18			27			36			45			54
GGA	TCG	GCT	AAG	TTG	GTG	GAA	ATG	TCC	ACT	CTA	AGT	GTC	GAC	GAG	GAT	GTG	CTC
G	S	A	K	L	V	E	M	S	T	L	S	V	D	E	D	C	L
		63			72			81			90			99			108
AGC	TGG	GCC	GCA	AGA	GAT	TCA	TCT	GGA	GTT	CTG	TCA	CCC	TAC	AAA	TTT	AGC	CGA
S	W	A	A	R	D	S	S	G	V	L	S	P	Y	K	F	S	R
		117			126			135			144			153			162
AGC	AGA	GTG	ATC	GGG	GCT	GAT	GAT	GTT	GAT	ATA	AAA	ATT	GCA	TTT	TGT	GGA	GTT
S	R	V	I	G	A	D	D	V	D	I	K	I	A	F	C	T	V
		171			180			189			198			207			216
TGT	TAT	GCT	GAT	GTT	GTT	TGG	AGC	AGG	AAT	ATC	CTG	GGA	ACT	ACA	AAG	TAT	CCT
C	Y	A	D	V	V	W	S	R	N	I	L	G	T	T	K	Y	P
		225			234			243			252			261			270
TTG	GTG	CCT	GGA	CAC	GAA	ATT	GTT	GGG	ATT	GTA	AGA	GAA	GTT	GGC	CCC	AAT	GTT
L	V	P	G	H	E	I	V	G	I	V	R	E	V	G	P	N	V
		279			288			297			306			315			324
CAG	CGT	TTT	AAA	GTT	GGT	GAC	CAT	GTA	GGA	GTT	GGA	ACT	TAC	GTT	GGT	TCT	TGC
Q	R	F	K	V	G	D	H	V	G	V	G	T	Y	V	G	S	C
		333			342			351			360			369			378
AGA	CAA	TGT	GAA	TAC	TGT	GAC	GAT	GGA	TTA	GAA	GTC	CAT	TGC	TCA	GAA	GTA	GTC
R	Q	C	E	Y	C	D	D	G	L	E	V	H	C	S	E	V	V
		387			396			405			414			423			432
CTC	ACT	TCC	GAT	GGT	ATT	GAT	GTG	GAT	GGT	ACA	GTC	ACT	AAA	GGA	GGA	TAT	TCT
L	T	F	D	G	I	D	V	D	G	T	V	T	K	G	G	Y	S
		441			450			459			468			477			486
AGT	CAT	ATT	GTT	GTT	CAC	GAG	AGG	TAC	TGC	TTT	AGA	ATA	TCC	GAC	AAT	TAC	CCA
S	H	I	V	V	H	E	R	Y	C	F	R	I	P	D	M	Y	P
		495			504			513			522			531			540
CTT	GCA	TTG	GCA	GCA	CCT	TTG	CTT	TGT	GCT	GGG	ATT	ACT	GTC	TAC	ACG	CCC	ATG
L	A	L	A	A	P	L	L	C	A	G	I	T	V	Y	T	P	M
		549			558			567			576			585			594
ATG	CGT	CAC	AAC	ATG	AAC	CAA	CCT	GGC	AAA	TCT	TTG	GGT	GTG	ATT	GGG	CTA	GGT
M	R	H	N	M	N	Q	P	G	K	S	L	G	V	I	G	L	G
		603			612			621			630			639			648
GGT	CTT	GGT	CAC	TTA	GCA	GTT	AAG	TTT	GGA	AAG	GCT	CTT	GGA	CTG	AAA	GTA	ACA
G	L	G	H	L	A	V	K	F	G	K	A	L	G	L	K	V	T
		657			666			675			684			693			702
GTT	TTC	AGC	ACA	AGT	ACA	TCA	AAA	AGG	GAT	GAC	GCA	CTG	AAT	CTT	CTA	GGA	GCA
V	F	S	T	S	T	S	K	R	D	D	A	L	M	L	L	G	A
		711			720			729			738			747			756
GAC	AAT	TTT	GTA	GTC	TCA	TCT	GGC	GAA	CAG	CAG	ATG	ATG	AGG	CTG	GCT	AAA	TCA
D	N	F	V	V	S	S	G	E	Q	Q	M	M	R	L	A	K	S
		765			774			783			792			801			810
CTT	GAC	TTC	ATA	ATC	AAC	TCA	ACT	TCA	GCA	GAA	TTT	CTT	TTT	GAT	CCA	TAC	CTA



L	D	F	I	I	N	S	T	S	A	E	F	P	F	D	P	Y	L
		819			828			837			846			855			864
TCT	CTG	TTG	AAG	ACT	GCG	GGC	ATT	CTT	GTG	CTG	GCG	GGT	GCA	GGC	CGG	GAA	GTC
S	L	L	K	T	A	G	I	L	V	L	A	G	A	G	R	E	V
		873			882			891			900			909			918
AAA	TTC	AGC	CGG	GGA	AGC	CTA	ATT	ATG	GGT	ATG	AAG	ACC	ATA	TCT	GGC	AGC	GCA
H	F	S	P	G	S	L	I	M	G	M	K	T	I	S	G	S	A
		927			936			945			954			963			972
ACT	GGT	GGA	ACG	AAA	CAG	ACG	CAG	GAA	ATG	CTA	GAG	TTC	TGT	GCT	TCA	CAC	AAA
T	G	G	T	K	Q	T	Q	E	M	L	E	F	C	A	S	H	K
		981			990			999			100			101			102
ATT	TAT	CCA	GAA	ATT	GAA	ATT	ATT	CCA	ATT	CAA	CAG	TCA	AAT	GAG	GCT	CTT	GAG
I	Y	P	E	I	E	I	I	P	I	Q	Q	S	N	E	A	L	E
		103			104			105			106			107			108
AGG	ATG	ATC	AAC	AAG	GAT	GTG	AAA	TAT	CGT	TTC	GTG	ATA	GAT	GTT	GCA	AAT	TCG
R	M	I	N	K	D	V	K	Y	R	F	V	I	D	V	A	N	S
		108			109			110			111			112			113
CTC	AAG	TGA	GAT	TCC	GAT	TTG	GTA	CGT	ACG	CAG	AGG	GAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA
L	K	*	D	S	D	L	V	R	T	Q	R	E	K	K	K	K	K

## 3.2 Identifizierungsversuche der unbekanntes Reduktase

Ein Aktivitätstest-screening stellt den einfachsten Weg zur Identifizierung des gefundenen Klons dar. Nun bedürfen bestimmte Zwischenschritte der Ajmalin-Biosynthese, die von Reduktasen katalysiert werden, noch der Aufklärung. Deshalb liegt es nahe, den neuen Klon auf diese wichtigen Aktivitäten hin zu testen.

### 3.2.1 Vorbereitung für Aktivitätstests

Um einen Aktivitätstest durchführen zu können, muss exprimiertes Enzym vorliegen. Aus diesem Grund wird der gefundene Vollängenklon in den pQE60-Vektor inkloniert. Dieser Vektor bietet bestimmte Vorteile (siehe auch II3, S. 20): Die Expression in *E. coli* ist mit IPTG induzierbar und eine Reinigung des Exprimates ist über den angefügten C-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag möglich. Ferner kann durch geschickte Wahl des 3'-Primers der (His)<sub>6</sub>-tag eliminiert werden. Dadurch kann eine mögliche Beeinträchtigung des exprimierten Enzyms durch den (His)<sub>6</sub>-tag untersucht werden. Als Schnittstellen dienen bei diesem Vektor am 5'-Ende eine NcoI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle.

Am 5'-Ende wird die NcoI-Schnittstelle gewählt, bei der das ursprüngliche ATG-Startcodon des Vektors durch das ATG des GOI ersetzt wird. Das hat

zur Folge, dass im Zuge der Expression die verbesserte RBS (=Shine-Dalgarno Sequenz) des Vektors zum Tragen kommt. Nachteil dieser Vektorwahl ist der Austausch der ersten Aminosäure des Klon nach dem Startcodon. Dadurch erfolgt die Einbindung des kloneigenen Startcodons in die Restriktionsschnittstelle des Vektors. Die ursprüngliche Aminosäure Serin wird ausgetauscht gegen Alanin.

**Tabelle 21: 5'-Primer „R-5'-Ende-NcoI“ zur Einklonierung in pQE60**

<b>R-5'-Ende-NcoI</b>
5'- CGCC ATG GCC ACT CTA AGT GTC G- 3'
Schmelztemperatur: 66 °C, GC-Anteil: 60,9%

Am 3'-Ende kommen zwei verschiedene Primer zum Einsatz, um auch zwei verschiedene Klone zu generieren. Der erste Primer „R-3'-Ende-Stop-BglII“ ermöglicht die Amplifizierung eines Produktes, das keine (His)<sub>6</sub>-tag-codierende Region aufweist, indem vor Beginn des (His)<sub>6</sub>-tag ein Stop-Codon eingefügt wird. Der zweite Primer „R-3'-Ende-His-BglII“ sorgt für die Generierung des Produktes mit C-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag.

**Tabelle 22: Zwei 3'-Primer für die Generierung verschiedener Amplifizierungsprodukte der unbekanntem putativen Reduktase in pQE60**

<b>R-3'-Ende-Stop-BglII</b>
5'- CG AGA TCT TCA CTT GAG CGA ATT TGC - 3'
Schmelztemperatur: 63,2 °C, GC-Anteil: 46,2%
<b>R-3'-Ende-His-BglII</b>
5'- CG AGA TCT CTT GAG CGA ATT TGC AAC - 3'
Schmelztemperatur 63,2 °C, GC-Anteil: 46,2%

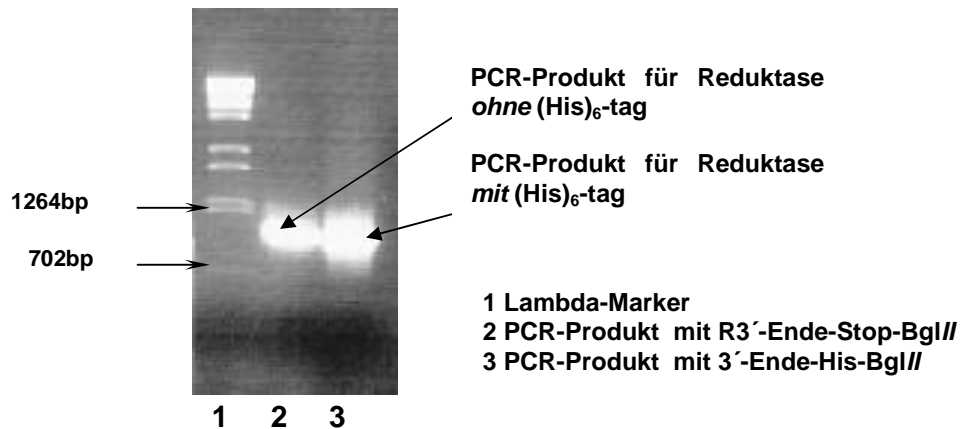
Die PCR, die mit den ausgewählten Primern durchgeführt wird, ergibt zwei intensive Banden bei der Aufreinigung durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe III.3.1, S. 49).

**Tabelle 23: PCR zur Klonierung zweier Reduktase-Klone in pQE60 für Expression in M15**

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	94	1
5	94	0,5
	67	3
5	94	0,5
	65	3
25	94	0,33
	62	1
	72	2,5

Probe	R+His	R-His
Template 1:100 verd. aus III.3.11, S. 55	1 µl	1 µl
R-5'-Ende-NcoI (20 µM)	1 µl	1 µl
R-3'-Ende-Stop-BglII (20 µM)		1 µl
R-3'-Ende-His-BglII (20 µM)	1 µl	
dNTP's (10 mM each)	1 µl	1 µl
Advantagepolymerase-Puffer (10x)	5 µl	5 µl
Advantage-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	1 µl
Ampuwa ad 50.0 µl	40 µl	40 µl

Abbildung 13: Gelphoto d. PCR-produkte von Reduktase mit (His)<sub>6</sub>-tag und Reduktase ohne (His)<sub>6</sub>-tag



Die beiden Banden aus der Abbildung werden ausgeschnitten, extrahiert (siehe III3.4, S. 51), gefällt (siehe III3.5, S. 51) und in Seral-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nun folgt der Verdau des Vektors pQE60 und der einzuklonierenden Fragmente mit den jeweiligen Enzymen genau nach den Angaben der Hersteller. Dem Restriktionsverdau schließt sich die Ligation mit einer T<sub>4</sub>-Ligase an, um die PCR-Fragmente in den Vektor einzubinden. Die Ligationsansätze werden erfolgreich in TOP10F' *E. coli* transformiert und auf Selektionsplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Nach Inokulation einer 10 ml Kultur mit entsprechendem Selektionsflüssigmedium wird eine Plasmidextraktion (siehe III3.1.2.2, S. 48) durchgeführt, um genug DNA für spätere Experimente zu isolieren. Die erhaltene DNA wird durch eine Test-PCR, die sich nach obigem Schema richtet, auf richtige Insertion überprüft. Dann folgt die Transformation in M15 *E. coli* mittels Elektroporation (siehe III3.13.2, S. 58) mit anschließender Ausplattierung auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin.

### 3.2.2 Expression der unbekanntenen putativen Reduktase in M15 *E. coli*

R(-)His wird nach III1.4, S. 33 kultiviert und aufgeschlossen. Die Induktion erfolgt jeweils mit 0,5 M IPTG und mit 1M IPTG über 18h. Das Pellet wird im Puffer A0 (siehe II8, S. 24) aufgenommen und weiterverarbeitet. Zunächst soll eine Testung des Rohextraktes vorgenommen werden.

Dazu werden alle Aktivitätstests exakt nach III2.1, S. 40 durchgeführt. Es ist bei keinem der vier durchgeführten Aktivitätstests eine Reduktase-Aktivität im

---

Vergleich zur Kontrolle (Vektor ohne Insert in gleicher M15 *E. coli* Kultur, identische Kultivierungsbedingungen, gleiche Mengen IPTG) zu verzeichnen. Nach Analyse mehrerer SDS-Gele konnte keine Überexpression eines Proteins in der gesuchten Größenordnung von etwa 33 kDa detektiert werden.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wird die gesamte Versuchsanordnung mit dem Klon R(+)His wiederholt, da bei einer folgenden His-Tag-Reinigung über Ni-NTA (siehe III1.5, S. 34) in der Regel eine Aufkonzentrierung des rekombinanten Proteins erreicht werden kann. Nach Testung des Eluates auf Proteingehalt (siehe III1.130), werden die Protein enthaltenden Fraktionen auf die verschiedenen Aktivitäten aus III2.1, S. 40 getestet. Doch auch hier ist das Ergebnis der Aktivitätstests im Vergleich zur Kontrolle negativ. Es kann keine Reduktase-Aktivität des R(+)His-Klons festgestellt werden. Die SDS-Gelanalyse bringt ebenfalls ein negatives Ergebnis. Die untersuchten Fraktionen des Eluates, die auf Aktivität getestet wurden und die Protein enthalten, verzeichnen keine zusätzliche Bande, welche die eines überexprimierten Proteins im Vergleich zur Kontrolle gleich käme.

## **4 *In planta* Expression mit Hilfe des rekombinanten Tobacco Mosaic Virus in *Nicotiana benthamiana***

Die Grundidee dieses Konzeptes geht davon aus, dass die Pflanze *Nicotiana benthamiana* als „Produktionsorganismus“ für das zu exprimierende Enzym dient. Es wird hier ein pflanzliches System gewählt, das die voraussichtlich höchste Wahrscheinlichkeit garantiert, ein Enzym posttranslational zu modifizieren, so wie es auch in der Herkunftspflanze des zu exprimierenden Gens für den Erhalt eines aktiven Enzyms möglicherweise notwendig wäre und in anderen Systemen in dieser Form nicht. neuerung

### **4.1 Innovationen bei der Verwendung des *Tobacco Mosaic Virus* als Expressionsvektor**

Als Träger der genetischen Information dient ein viraler Expressionsvektor, der auf dem *Tobacco mosaic virus* (TMV) basiert. Hier wurden von der Firma Icon Genetics durch den Ein- und/oder Ausbau verschiedener Gen-Elemente neue Vektoren konstruiert, die unterschiedlichste Eigenschaften aufweisen. Es ist kein Novum, dass Vektoren verwendet werden, die diversen funktionellen Anforderungen im wissenschaftlichen Alltag genügen und so zum Beispiel bestimmte Sequenzen dem gewünschten Protein hinzugefügt werden können, wie zum Beispiel His-tag, Ubiquitin, u.a. (siehe 4.2, S. 87). Neu allerdings ist die Tatsache, dass die Möglichkeit besteht, ein GOI innerhalb sehr kurzer Zeit mit unterschiedlichen Modulen kombinieren zu können. So wird dem Exprimat eine bestimmte Eigenschaft verliehen, die entweder die Expression entscheidend verbessert bzw. ermöglicht oder bestimmte Zellorganelle *screening*-artig als *target* zeitgleich in einem Versuchsaufbau abzuarbeiten erst möglich macht. Dadurch können notwendige posttranslationale Modifikationen innerhalb sehr kurzer Zeit in der Zelle durchlaufen werden, ohne die zeitlich aufwendigen Umklonierungsexperimente durchführen zu müssen.

Durch Kontakte zu dem Unternehmen *Icon Genetics* im Biozentrum Halle an der Saale konnte diese sehr neuartige Technik im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes erlernt werden. Zusätzlich konnten verschiedene

Grundmodule nach Mainz überführt werden, um diese in der Arbeitsgruppe von Professor Stöckigt für Forschungszwecke zu nutzen.

## 4.2 5'-Module

Im 5'-Teil des TMV sind Sequenzen lokalisiert, die dafür zuständig sind, dem rekombinanten Protein entweder bestimmte Eigenschaften zu verleihen oder die die Bewegung durch die verschiedenen Zellorganelle mittels Fusion mit einem Transitpeptid manipulieren. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dem 5'-Modul eine Sequenz mit *tool*-Charakter mitzugeben. Diese codiert für eine Aminosäuresequenz, die im Zuge der Aufreinigung oder Aktivierung nützlich ist. Details für den Laboralltag zu Eigenschaften der einzelnen Vektoren sind II3, S. 20 zu entnehmen.

**Tabelle 24: Kleine Übersicht über Eigenschaften der 5'-Module**

<b>Transitpeptid-Charakter</b>	
pICH8420	Apoplast-targeting
pICH10530	Chloroplast-targeting
pICH10570	unverändert, d.h. targeting mit GOI-eigener Zielsequenz
<b><i>tool</i>-Charakter</b>	
pICH11280	N-terminaler (His) <sub>6</sub> -tag
pICH7620	Ubiquitin

Diese Vektoren wurden vom Autor durch Plasmid-Isolierung (siehe III3.1.2.2, S. 48) in Halle isoliert, in kompetente *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformiert (MicroPulser™ Electroporation App. (Bio-Rad, Cat. Number 165-2100), 0.1 mm Küvetten, vorprogrammierte Einstellungen für *A. tumefaciens* (2.2 kV)), ausplattiert und nach Mainz überführt. Außerdem wurden alle 5'-Module in DH5 $\alpha$  *E. coli* und alle 3'-Module noch einmal in XL1-Blue MRF' *E. coli* (BULLOCK W *et al*, 1987) mit gleichem Gerät und *E. coli*-Einstellung transformiert. Die Kulturen wurden anschließend auf den jeweiligen Selektionsplatten ausgestrichen und nach Mainz mitgenommen. Als 5'-Module wurden nur die Vektoren pICH8420, pICH10530, pICH10570 und pICH11280 verwendet. Diese Module müssen vor Gebrauch keine Modifikationen erfahren. Sie können sofort in Form einer *Agrobacterium*

*tumefaciens* Kultur verwendet werden. Für die Infiltration werden die Vektoren einzeln in LB-Selektionsmedium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Rifampicin Endkonzentration bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert.

### 4.3 3'-Module

In das 3'-Modul ist das GOI eingebunden. Je nach Basensequenz des GOI muss entweder der Vektor pICH11599 eingesetzt werden, oder es kann der Vektor pICH10990 benutzt werden. pICH11599 findet dann als 3'-Modul Verwendung, wenn das Startcodon des einzuklonierenden GOI Teil einer NcoI-Restriktionsschnittstelle ist. Alle anderen GOI können regulär in den pICH10990 über eine zuvor mittels PCR an das GOI angebrachte BsaI-Restriktionsschnittstelle und eine der anderen Schnittstellen der MCS inkloniert werden, die wiederum in beiden Vektoren frei wählbar ist. Die BsaI-Schnittstelle ist so gewählt, dass in dem letztendlichen 3'-Modul eine Sequenz resultiert, die beim Zusammenbau des finalen TMV in der Pflanze durch *splicing*-Vorgänge als Intron ausgeschnitten und ein Fusionprotein aus dem Transkript des 5'-Moduls mit dem rekombinanten Protein exprimiert wird.

Als sehr anschaulich stellt sich die Wahl des 3'-Moduls pICH7410 als sogenannter Expressionsmarker heraus. Dieses 3'-Modul ist Träger der genetischen Information für das *Green Fluorescent Protein* (GFP). Dieses Protein zeigt im Dunkeln bei Beleuchtung mit UV-Licht von 490 nm grüne Fluoreszenz. Da es zum gleichen Zeitpunkt in *Nicotiana benthamiana* zur Expression gebracht wird wie die zu untersuchenden Modulkombinationen, kann man am Grad seiner Expression und an Hand anderer Parameter den ungefähren Erntezeitpunkt festlegen (siehe Abbildung 19, S. 99).

#### 4.3.1 Erster Klonierungsschritt für P2

Zur Einbindung des GOI in den pICH10990 muss zunächst ein Fragment durch PCR generiert werden, das die BsaI-Schnittstelle am 5'-Ende des Klon aufweist und eine PstI-Schnittstelle am 3'-Ende. In das gleiche PCR-Produkt werden mit einer SacI- und einer XhoI-Schnittstelle zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingebunden, die sich beide im nativen P450-Klon

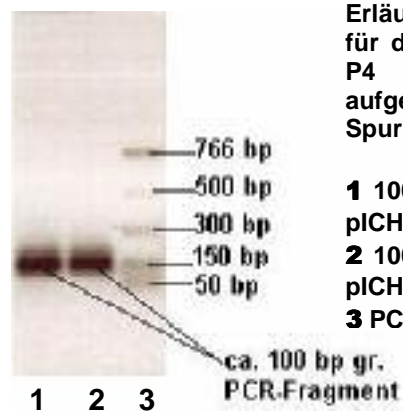


P2 wiederfinden. Die SacI-Schnittstelle befindet sich ganz am Anfang des Klons P2 und die XhoI-Schnittstelle ganz am Ende. Hauptanliegen dieser Vorgehensweise ist die durch die geringe Größe der Fragmente bedingte Einfachheit der PCR und der allgemein niedrigere Preis der Sequenzierungsreaktion bei kurzen Fragmenten.

**Tabelle 25: forward- und reverse-Primer für Einklonierung von P2 in pICH10990**

<b>CYP2sac1Xho1-for</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG AGC TCG CAA CTC GAG GAC TTG GAC ATG - 3'
Schmelztemperatur:>75 °C, GC-Anteil: 52,2%
<b>CYP2pst1-rev</b>
5'- CGC TGC AGC TAG ATC TCT TTT TTC AGA GCA GAA CAG TGA TGT - 3'
Schmelztemperatur 73,2 °C, GC-Anteil: 45,5%

**Abbildung 14: Agarosegel von den Produkten des ersten Klonierungsschrittes des P450-Klons P2 in pICH10990**



**Erläuterungen:** etwa 100bp grosses PCR-Fragment für den ersten Klonierungsschritt des P450-Klons P4 in den Expressionsvektor pICH10990, aufgetragen in zwei Geltschen, rechte äussere Spur: PCR-Marker von NEB

- 1** 100bp großes PCR-Produkt für Einklonierung in pICH10990
- 2** 100bp großes PCR-Produkt für Einklonierung in pICH10990
- 3** PCR-Marker von NEB

Die PCR ist erfolgreich verlaufen (siehe Gelphoto). Das Fragment ist etwa 100bp gross und wird mittels Gelextraktion (siehe III.3.4, S. 51) aus dem Agarosegel (siehe Tabelle 14, S. 50) gewonnen, wobei nur mit H<sub>2</sub>O eluiert wird, um den sich anschließenden Verdau mit BsaI und PstI nicht durch falsche Salzkonzentration zu beeinflussen. Der Vektor pICH10990 wird mit den gleichen Enzymen verdaut, aus dem Agarosegel extrahiert und -wie das PCR-Produkt- zur Aufkonzentrierung der DNA gefällt (siehe III.3.5, S. 51) und schliesslich auch in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um das verdaute PCR-Fragment in den vorbereiteten Vektor einzubinden, wird eine *three-way*-Ligation

durchgeführt. Diese Form der DNA-Ligation ist nötig, da der Vektor zusätzlich zur MCS noch eine interne Bsal-Schnittstelle aufweist. Das ist in der Regel kein Problem, hat doch Bsal differente Schnittstellen auf beiden Seiten seiner Erkennungssequenz. Ungewollte Ligationen durch die T<sub>4</sub>-Ligase stellen in diesem Falle kein Problem dar.

**Tabelle 26: PCR zur Klonierung von P450-Klon P2 in Expressionsvektor pICH10990**

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	1
28	95	1
	65	1
	72	1
1	72	10

Probe	
Template 1:100 verd. aus III3.11, S. 55	10 µl
Cyp2-Sac1Xho1-for (20 µM)	1 µl
Cyp2-Pst1-rev (20 µM)	1 µl
dNTP's (10 mM each)	1 µl
<i>Pfu turbo</i> -Puffer (10×)	5 µl
<i>Pfu turbo</i> -Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Ampuwa ad 50.0 µl	31 µl

Die verwendete *Pfu turbo-Polymerase* ist eine Polymerase, die mit speziellen *proof-reading* Enzymen kombiniert ist und so eine sehr hohe Sicherheit bezüglich der Vermeidung von Punktmutationen innerhalb des PCR-Produktes gewährleistet. Die Annealingtemperatur wird laut den Herstellerangaben um ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur des Primers gewählt, der die niedrigere Schmelztemperatur aufweist (siehe Tabelle 25, S. 89).

Tabelle 27: Verdau und Ligation von P2-PCR-Fragment und pICH10990

Probe	PCR-Fragment	pICH10990	Probe	Menge
Bsal	1,5 µl	1,5 µl	pICH10990	7 µl
Bsal verdaut bei 50 °C, daher zuerst 1h nur Bsal-Verdau, dann Zugabe von PstI und erneut 1h bei 37 °C inkubieren			PCR-Fragment	1 µl
PstI	1,5 µl	1,5 µl	Puffer	1 µl
Puffer No. 3 (NEB)	5 µl	5 µl	T <sub>4</sub> -Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	34µl	34µl		
DNA	8 µl	8 µl		

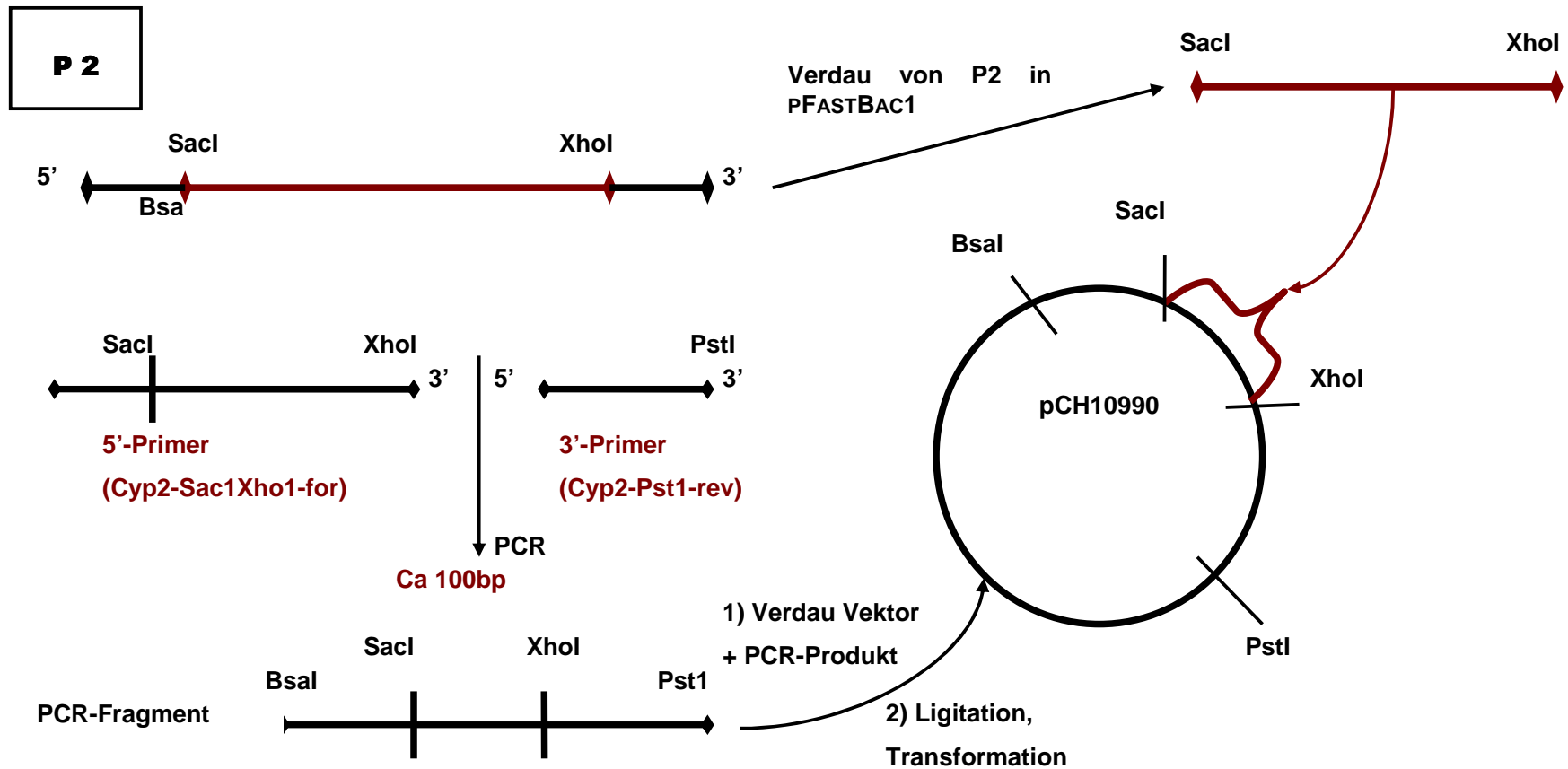
Der Ligationsansatz wird in Top10F' *E. coli* transformiert und auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Carbenicillin erfolgreich ausplattiert. Mit den erhaltenen Kulturen werden Übernachtkulturen im flüssigen Selektionsmedium inokuliert, um nach deren Wachstum über den Weg der Plasmid-Isolierung eine größere Menge an DNA zu gewinnen.

#### 4.3.2 Subklonierung des P450-Klons P2

Aus dem P450-Klon P2 im pPFASTBAC1-Vektor wird mittels regulärem Restriktionsverdau (nach Herstellerangaben) mit SacI und XhoI das fehlende Fragment des P2 ausgeschnitten. Genauso wird pICH10990 verdaut und wie das ausgeschnittene PCR-Fragment im Agarosegel von den restlichen DNA-Fragmenten getrennt. Nach der Gel-Extraktion, DNA-Präzipitation und Wiederaufnahme in H<sub>2</sub>O werden die DNA-Bruchstücke im gleichen Verhältnis wie in Tabelle 27, S. 91 miteinander durch die T<sub>4</sub>-Ligase ligiert.

Das Ergebnis dieser Ligation ist das 3'-Modul mit dem möglicherweise für die Vinorin-Hydroxylase codierenden vollständigen Klon P2. Dieser Ligationsansatz wird wieder in Top10F' *E. coli* transformiert und nach erfolgreichem Wachstum auf 100 µg/ml Carbenicillin-Selektionsplatten in einer 10ml Kultur im flüssigen Selektionsmedium angezogen. Aus dieser Kultur kann genug rekombinanter P2 in pICH10990 für die weiteren Arbeitsschritte gewonnen werden.

Abbildung 15: Klonierungsschema für den P450-Klon P2 in Expressionsvektor pICH10990



Erläuterungen der Abbildung: Im ersten Klonierungsstück wird ein Fragment generiert mit BsaI-, SacI-, XhoI- und PstI-Schnittstellen. Das Fragment wird in pICH10990 einkloniert. Aus P2 in pFASTBAC1 wird über SacI/XhoI-Verdau das fehlende Fragment ausgeschnitten und in den rekombinanten, mit dem PCR-Fragment versehenen, verdauten Vektor über die passenden Schnittstellen eingebunden.

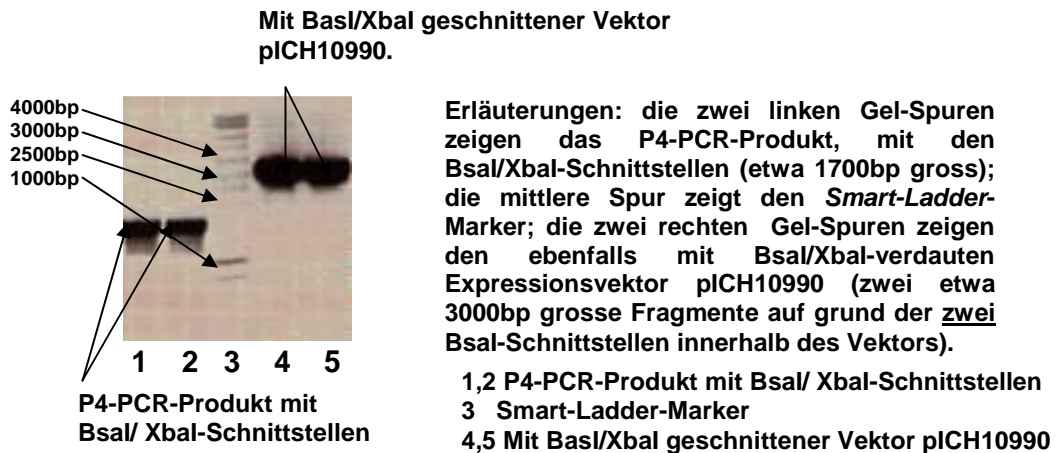
### 4.3.3 Klonierung von P4 in pICH10990

Analog 4.3.1, S. 88 wird ein Fragment generiert, das die BsaI-Schnittstelle am 5'-Ende des P450-Klons P4 durch den *forward*-Primer Cyp4-Bsa1-for aufweist und eine XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende durch den *reverse*-Primer CYP4-XbaI-rev. Statt den gleichen Weg einzuschlagen wie bei Klon P2, wurde nun aus Zeitgründen versucht, den Klon P4 in einem Schritt -ohne Subklonierung- einzubinden.

Tabelle 28: forward- und reverse-Primer für Einklonierung von P4 in pICH10990

<b>CYP4-Bsa1-for</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG GCA ACT TTC TCA ATA AAT CCG TC - 3'
Schmelztemperatur: 70,4 °C, GC-Anteil: 41,5%
<b>CYP4-XbaI-rev</b>
5'- TTC TAG ATT AAC CTT TGG TTG GTC TGA AGA CAA - 3'
Schmelztemperatur 65,9 °C, GC-Anteil: 38,2%

Abbildung 16: Restriktionsverdau des P450-Klons P4 und des Zielvektors pICH10990



Das Fragment ist etwa 1700bp gross (siehe Gelphoto) und wird mittels Gelextraktion aus dem Agarosegel (siehe Tabelle 14, S. 19) gewonnen, wobei auch hier nur mit H<sub>2</sub>O eluiert wird, um den sich anschließenden Verdau mit BsaI und XbaI nicht durch falsche Salzkonzentration zu stören. Dieser Verdau verläuft analog zu 4.3.1, S. 88 unter Austausch von PstI durch XbaI. Der Vektor pICH10990 wird mit den gleichen Enzymen verdaut und aus dem Agarosegel extrahiert. Er wird wie das P2-PCR-Produkt zur

Aufkonzentrierung der DNA gefällt (siehe III.3.5, S. 51) und ebenfalls in H<sub>2</sub>O rückgelöst. Zur Einbindung des verdauten P4-PCR-Fragmentes in den vorbereiteten pICH10990, wird auch hier erfolgreich eine *three-way*-Ligation durchgeführt. Der Ligationsansatz wird in kompetente Top10F' *E. coli* transformiert und auf Selektionsplatten (siehe 4.3.2, S. 91) ausgestrichen. Die Kultur wird benutzt, um 10 ml Übernachtskultur im entsprechenden Selektionsmedium anzupflanzen und aus dieser - analog Klon P2 in pICH10990 - etwa dieselbe Menge des endgültigen 3'-Moduls zu extrahieren, das für die rekombinante Cinnamoyl-4-Hydroxylase codiert.

**Tabelle 29: PCR für Klonierung von P4 in pICH10990**

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	1
28	95	1
	60,5	1
	72	3
1	72	10

Probe	
Template 1:100 verd. aus III.3.11, S. 55	10 µl
CYP4-Bsa1-for (20 µM)	1 µl
CYP4-Xba1-rev (20 µM)	1 µl
dNTP's (10 mM each)	1 µl
<i>Pfu turbo</i> -Puffer (10x)	5 µl
<i>Pfu-turbo</i> -Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Ampuwa ad 50.0 µl	31 µl

Die Synthesedauer der *Pfu turbo*-Polymerase muß hier entsprechend der Länge des zu amplifizierenden Fragments erhöht werden (pro 1000bp 1 min plus 1 min zusätzlich, zudem wird sehr oft noch etwas Zeit zugegeben um die Sicherheit der Amplifikation zu gewährleisten). Auch hier liegt die Annealing-Temperatur ca. 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur beider Primer.

#### 4.3.4 Klonierung der Polyneuridinaldehyd Esterase in pICH10990

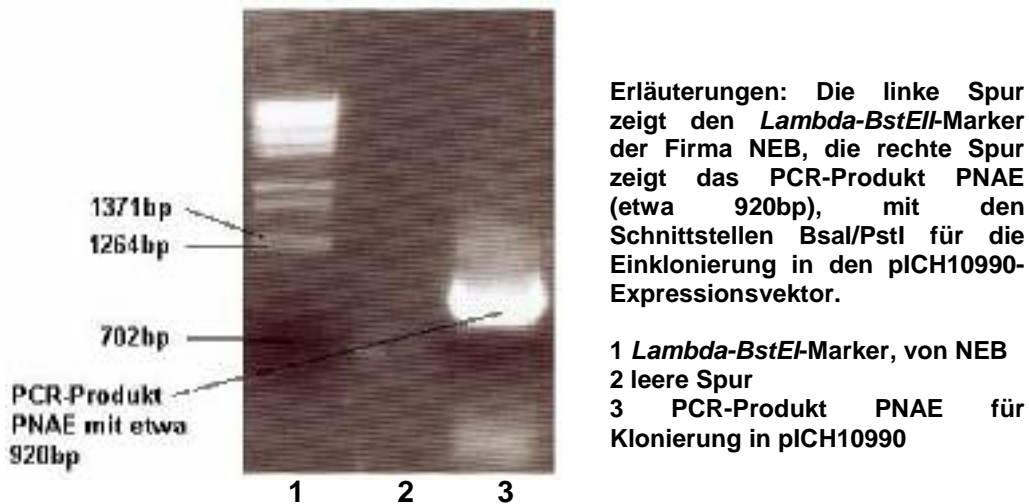
Zur zusätzlichen Kontrolle der Funktionalität des Pflanzensystems soll die Polyneuridinaldehyd Esterase (PNAE) aus *Rauvolfia serpentina* mit Hilfe des Pflanzensystems heterolog exprimiert werden.

Analog dem P450-Klon P4 wird eine PCR durchgeführt, deren Ergebnis ein Fragment ist, das die Bsal-Schnittstelle am 5'-Ende des Klons durch den *forward*-Primer PNAE-for erhält und eine PstI-Schnittstelle am 3'-Ende durch den *reverse*-Primer PNAE-rev. Auch die PNAE wird direkt ohne Subklonierung in den pICH10990 eingebunden.

Tabelle 30: *forward*- und *reverse*-Primer für Einklonierung von PNAE in pICH10990

<b>PNAE-Bsal-for</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGC ATT CTG CTG CAA ACG CC - 3'
Schmelztemperatur: 70,6 °C, GC-Anteil: 48,6%
<b>PNAE-PstI-rev</b>
5'- AAA CTG CAG TTA TGA ATC TGA TAT ATC AAG - 3'
Schmelztemperatur 59,9 °C, GC-Anteil: 30%

Abbildung 17: Agarosegel des PCR-Produktes für die Einklonierung der PNAE in Expressionsvektor pICH10990



Das PCR-Produkt hat etwa eine Größe von 920bp (siehe Gelphoto) und wird mittels Agarosegel und Gelextraktion (siehe Tabelle 14, S. 19) aufgereinigt. Erneut wird wegen der störenden Einflüsse der Puffersalze des TE-Puffers aus dem NucleoSpinExtract Kit beim sich anschließenden Bsal/ PstI-Verdau nur mit H<sub>2</sub>O eluiert. Dieser Verdau verläuft analog zu 4.3.1, S. 88. Der Vektor pICH10990 wird auch mit Bsal und PstI verdaut, aus dem Agarosegel extrahiert und zur Aufkonzentrierung der DNA gefällt (siehe III.3.5, S. 51), um dann auch in H<sub>2</sub>O resuspendiert zu werden. Zur Einbindung der verdauten PNAE in den identisch verdauten Vektor wird auf Grund der zwei vektor-

internen Bsal-Restriktionsschnittstellen eine *three-way*-Ligation durchgeführt. Der resultierende Ligationsansatz wird in kompetente Top10F' *E. coli* transformiert und auf Selektionsplatten (siehe 4.3.2, S. 91) ausgestrichen. Mit einer positiven Kultur werden 10ml Übernachtkultur im entsprechenden Selektionsmedium inokuliert und aus dieser Kultur durch Plasmid-DNA-Präparation (siehe III.3.1.2.2, S. 48) der rekombinante Expressionsvektor isoliert.

Tabelle 31: PCR für Klonierung von PNAE in pICH10990

Anzahl d. Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	1
28	95	1
	55	1
	72	2
1	72	10

Probe	
Template 1:100 verd. aus III.3.11, S. 55	10 µl
PNAE-Bsa1-for (20 µM)	1 µl
PNAE-Pst1-rev (20 µM)	1 µl
dNTP's (10 mM each)	1 µl
<i>Pfu turbo</i> -Puffer (10×)	5 µl
<i>Pfu-turbo</i> -Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Ampuwa ad 50.0 µl	31 µl

Die Synthesedauer der *Pfu turbo*-Polymerase muß hier entsprechend der Länge des zu amplifizierenden Fragments auf 2 min festgelegt werden. Die Annealing-Temperatur muss laut Hersteller der Polymerase wiederum etwa ca. 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur beider Primer liegen.

#### 4.4 Transformation und Kultivierung für Infiltration

Die rekombinanten 3'-Module werden in kompetente *A. tumefaciens* GV3101 mit 2,4kV transformiert (siehe III.3.13.3, S. 58) und auf 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Rifampicin Selektionsplatten ausplattiert. Diese Kulturen werden erneut erfolgreich mit einer Test-PCR geprüft, bei der die Primer und das PCR-Programm verwendet werden, die jeweils zur Einklonierung in pICH10990 benutzt wurden. Die positiv getesteten Kulturen werden im 10 ml Selektionsmedium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Rifampicin angezogen.

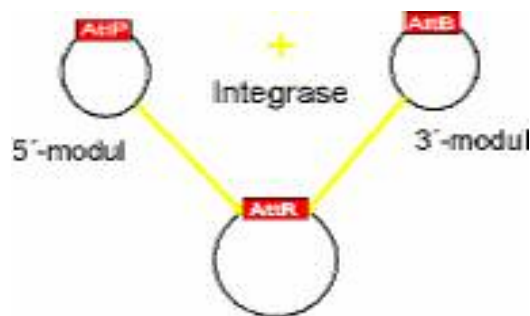


#### 4.5 Infiltration und Zusammenbau von 5'- und 3'-Modul in der Pflanze

Am Vortag der geplanten Infiltration müssen die zu verwendenden 5'-Module ebenfalls in Form von Übernachtskulturen in 10 ml Selektionsmedium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Rifampicin kultiviert werden. Die zur endgültigen Synthese des Vektors erforderliche Integrase liegt ebenfalls transformiert in *A. tumefaciens* vor und muss auf die gleiche Art kultiviert werden. Die Besonderheit besteht jedoch darin, dass statt Carbenicillin 50 µg/ml Kanamycin zum Einsatz kommen. Die Infiltration wird nach der Vorschrift von III3.15.2, S. 60 durchgeführt.

Der Zusammenbau des fertigen Expressionsvektors, also bestehend aus dem GOI und der zusätzlichen *target*- oder *tool*-Sequenz, erfolgt direkt in der Pflanze auf DNA-Ebene. Dem durch das *A. tumefaciens* vermittelten Transfer von 3'-Modul- und 5'-Modul-DNA in den Zellkern folgt der Zusammenbau des rekombinanten Vektors durch die Integrase, eine seitenspezifische DNA-Rekombinase.

Abbildung 18: Verschmelzung beider Provektoren



Zusammenbau durch die Integrase zum resultierenden Expressionsvektor unter Heraushebung der Rekombinations-Sequenzen (**AttP** bei 3'- und **AttB** beim 5'-Modul) und der resultierenden Bindungsstelle (**AttR**) innerhalb des Introns.

Die dazu nötigen Rekombinations-Sequenzen sind Teil des resultierenden Introns, das während der Ausschleusung des fertigen Vektors aus dem Zellkern im Rahmen von *splicing*-Vorgängen herausgetrennt wird. Das Intron übt auf den Vektor stabilisierende Eigenschaften aus. So werden bei denen dem *splicing* vorgeschalteten Vorgängen spontane Rekombinationen reduziert. Durch das Heraustrennen dieses Introns wird die genetische Information für ein exaktes Fusionsprotein geschaffen. Die Introns sind so gewählt, dass sich die vorgeschaltete Sequenz und das GOI im gleichen

Leserahmen befinden. Nun werden die üblichen physiologischen Wechselwirkungen und Regelkreise durchlaufen: der fertige Vektor repliziert sich nur im Cytosol und erreicht niemals den Nucleus.

Mit der Wahl des 5'-Moduls kann auf verschiedene subzelluläre Kompartimente abgezielt werden, wodurch die posttranslationalen Modifikationen des exprimierten Zielproteins erst ermöglicht werden.

Zur Testung der Klone P2, P4, und PNAE wurden folgende 5'-Module und Integrasen verwendet: pICH8420, pICH10530, pICH10570 und pICH10881, pICH14313. Später, bei Prüfung der PNAE, kam das 5'-Modul pICH11280 hinzu. Durch die Kombination der Module miteinander kann direkt getestet werden, ob die Klone im Chloroplasten, im Apoplasten oder in dem Kompartiment Aktivität zeigen, welches der nativen *target*-Sequenz entspricht.

Zu Anfang eines solchen *screenings* werden alle Modul-Kombinationen zusammen auf einem Blatt von *Nicotiana benthamiana* nach einem vorher festgelegten Versuchsplan (siehe Tabelle 15: Infiltrationsschema, S. 61) injiziert. Vorteil dieser Art der Probenverteilung ist die Gleichheit bei der Expression mit den verschiedenen Modulen. Es können so unterschiedliche Blatt- und Pflanzenzustände bei der Beurteilung des Exprimats ausgeschlossen werden, d.h. dadurch ist der direkte Vergleich der Module nach der Qualität des rekombinanten Proteins möglich.

#### **4.6 Enzymisolierung**

Vierzehn Tage nach der Infiltration erfolgt die Ernte der infiltrierten Pflanzen. Die Blätter sind deutlich durch die Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* gekennzeichnet. Der allgemeine Status der Expression kann am Status der Expression von GFP vergleichsweise in etwa abgelesen werden, da die Pflanzen alle unter identischen Bedingungen kultiviert werden (siehe Abbildung 19, S. 99).

**Abbildung 19: Photo eines Blattes mit GFP-Expression nach 11 Tagen mit Infiltrationsstellen und Photo eines Blattes mit Infiltration mit PNAE.**



Unabhängig von der anschließend durchgeführten Isolierung werden die Blätter oder Blattteile mit den infiltrierten Stellen von der Pflanze mit Skalpell oder Schere abgetrennt. Sie können in diesem Stadium in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Es ist darauf zu achten, dass nur die Pflanzenteile zusammen kommen, die mit gleichen Modul-Kombinationen versehen sind.

#### **4.7 Mikrosomen-Isolierung für P2 und P4 mit anschließendem Aktivitätstest**

Im Allgemeinen wird für alle Aktivitätstests von Cytochrom P450-Enzymen der Weg der Mikrosomen-Isolierung gewählt, um an aktive Enzyme im zellfreien Zustand zu gelangen. Einzige Ausnahme ist der erfolglos durchgeführte Versuch der *4.8 Standard-Isolierung* von S. 100.

Die Ernte der infiltrierten Blätter oder Blattfragmente unterscheidet sich nicht von der schon in 4.6, S. 98 erwähnten Methode. Die geernteten Proben, hier immer etwa 9g Blattmaterial pro Modul und Klon, werden nach III1.2.2, S. 31 prepariert, mit dem Unterschied, dass zu Anfang nur eine einzige Fällung der Mikrosomen durchgeführt wird, um die Gefahr der Inaktivierung durch verlängerte Bearbeitungszeit möglichst gering zu halten.

Es resultieren 2 ml Enzymlösung pro Klon, die in den entsprechenden Mengen im nun folgenden Enzymaktivitätstest (P2: siehe III2.2, S.45; P4 siehe III2.3, S.46) eingesetzt werden. Ein Ergebnis ist bei beiden Klonen zunächst nicht eindeutig, da die mitgeschleppten „grünen“ Verunreinigungen

den Assay negativ beeinflussen. Bei beiden wird der Produktpeak von den Verunreinigungen vollständig überdeckt.

Nun wird nach erneuter Infiltration unter identischen Bedingungen und identischen *A. tumefaciens* Kulturen die Mikrosomen-Isolierung exakt wie in III1.2.2, S. 31 beschrieben durchgeführt. Der folgende Aktivitätstest ist jetzt dahingehend verbessert, dass die Verunreinigungen durch die zweite Mikrosomen-Fällung im Assay jetzt ausgeschaltet sind und der Produktpeak - wenn vorhanden- auf jeden Fall ersichtlich ist. Fakt ist jedoch: es ist bei keinem der drei eingesetzten Module eine Umsetzung, weder von Vinorin zu Vomilenin durch P2, noch von Zimtsäure zur p-Coumarsäure durch P4, zu verzeichnen. Die als positiv-Kontrolle unter den identischen Bedingungen, d.h. ebenfalls mit zweimaliger Fällung, zeitgleich isolierten Mikrosomen aus T<sub>30</sub> und anderen Zellenlinien der Suspensionszellkultur aus *Rauvolfia serpentina*, zeigen aber die gesuchten Aktivitäten.

#### **4.8 Standard-Isolierung mit anschließenden Aktivitätstests**

Zunächst wurde die Standard-Isolierung (siehe III1.3, S. 33) für rekombinante Proteine aus *Nicotiana benthamiana* gewählt. Die Pflanzenteile werden je nach Modul getrennt voneinander bearbeitet. Nach dem Aufschluss aus jeweils etwa 7g Pflanzenmaterial schließt sich der Aktivitätstest mit dem Rohextrakt an.

##### **4.8.1 Ergebnis des Aktivitätstest von P2 und P4**

Das Ergebnis der Testung des Klons P2 auf Vinorin-Hydroxylase-Aktivität (siehe III2.2, S. 45) ist negativ. Es konnte keine Aktivität detektiert werden. Der Aktivitätstest des P450-Klons P4 auf Cinnamoyl-4-Hydroxylase-Aktivität (siehe III2.3, S. 46) zeigt ebenfalls keinen Umsatz. Der vorhandene Rohextrakt wird bei beiden Klonen von etwa 8 ml auf 1,5 ml mit Centriprep-Konzentratoren (siehe II11, S. 26) aufkonzentriert und der Aktivitätstest wiederholt. Im Ergebnis kann für beide Klone trotzdem kein Umsatz gemessen werden.

Auf einem angefertigten SDS-Gel aus dem isolierten Rohextrakt konnten keine spezifischen Banden ausgemacht werden, die der Größe der gesuchten Enzyme entsprechen und auf eine Überexpression schließen lassen.

#### 4.8.2 Ergebnis des Aktivitätstests der Polyneuridinaldehyd Esterase

Der nahezu von jeglichen stark grün eingefärbten Verunreinigungen befreite Überstand wird auf Aktivität nach III2.4, S. 47 geprüft. Um auszuschließen, dass eine detektierte Aktivität nicht von einer möglicherweise intrinsischen Aktivität von *N. benthamiana* kommt, wird ein umfangreiches Probensystem verwendet. In dieses Probensystem werden positiv-Kontrollen miteingebunden, um die Funktionalität des Aktivitätstests zu gewährleisten. Als positiv-Kontrolle dient eine hochaktive PNAE-Enzymlösung, die durch heterologe Expression der PNAE (Induktion mit IPTG bei einer Konzentration von 1 mM/ml, 18 h Inkubation) in pQE70 und anschließende Aufarbeitung (siehe III1.4 Gewinnung von Enzymrohextrakt aus Bakterienkulturen, S. 33) gewonnen wird. Ein Beispiel für einen Probenplan ist aus Tabelle 32, S. 101 zu ersichtlich. Nach der Testung verschiedener Volumina der Enzymlösung hat sich herausgestellt, dass der Assay eine bessere Auflösung ergibt, wenn nur 5 µl Enzymlösung eingesetzt werden.

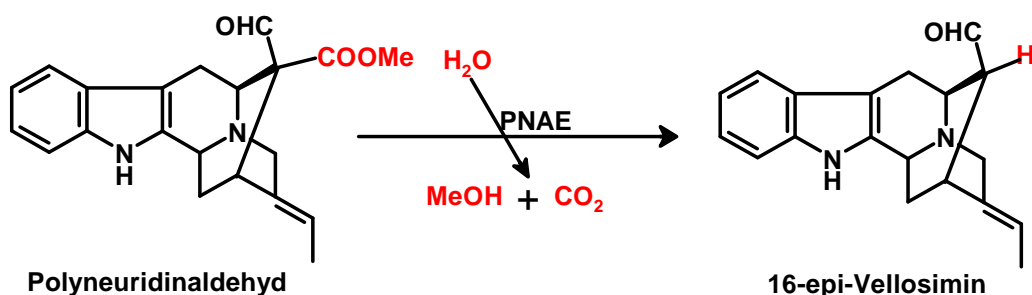
**Tabelle 32: Beispiel für einen Inkubationsplan für PNAE-Aktivitätstest**

2 x 5µl <i>N.b.</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µ ( <i>N.b.</i> ) <sub>den.</sub>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µ <i>N.b.</i>	-/-	40µl KPi
2 x 5µl PNAE aus <i>N.b.</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µl (PNAE) <sub>den.</sub> aus <i>N.b.</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µl PNAE aus <i>N.b.</i>	-/-	40µl KPi
2 x 5µl <i>E. coli</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µl <i>E. coli</i>	-/-	40µl KPi
2 x 5µl PNAE aus <i>E. coli</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µl (PNAE) <sub>den.</sub> aus <i>E. coli</i>	2,5µl PNA	37,5µl KPi
5µl PNAE aus <i>E. coli</i>	-/-	40µl KPi

Erläuterungen: PNA in EtOH, [1mg/ml] (**PNA**), denaturiert (15 min, 95 °C), Substrat-Zugabe nach Abkühlen (**den**), positiv-Kontrolle: PNAE in *E. coli* exprimiert (**PNAE aus *E. coli***), PNAE in *N. benthamiana* exprimiert (**PNAE aus *N.b.***), negativ-Kontrollen: aus nicht-transformierten *N. benthamiana* gewonnene Enzym-Lösung (***N.b.***), aus nicht-transformierten *E. coli* gewonnene Enzymlösung (***E. coli***).

Die *in planta* Expression der PNA Esterase mit Hilfe des rekombinanten Tobacco Mosaic Virus in *N. benthamiana* war erfolgreich. Der heterolog exprimierte Klon der Polyneuridinaldehyd Esterase zeigt eine Umsetzung von Polyneuridinaldehyd zu 16-epi-Vellosimin, allerdings nur bei Verwendung des Moduls pICH10570. Die übrigen 5'-Module, die verwendet wurden, zeigen in der Kontrolle (Kombination mit GFP) die volle Funktionalität. Zu erkennen ist dies an der Ausprägung der GFP-Expression, die bei jedem Versuchsaufbau gleichzeitig als Expressionsmarker dient.

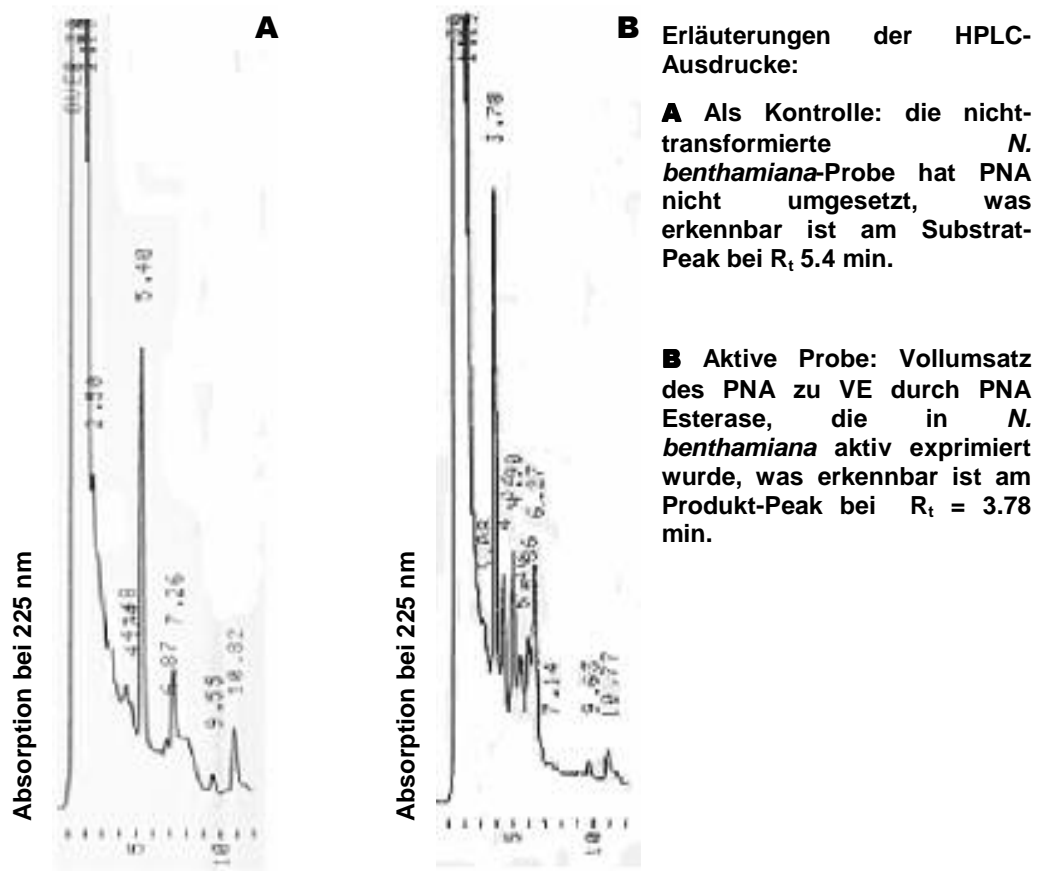
**Abbildung 20:** Umsetzung von Polyneuridinaldehyd (PNA) zu 16-epi-Vellosimin (VE) unter Abspaltung von MeOH und CO<sub>2</sub>



Zum Abstoppen der Reaktion werden 5 µl 0,1 N HCl zum Reaktionsgemisch hinzu gegeben und dann mit 5 µl der frisch zubereiteten 1%-igen NaBH<sub>4</sub> in 10 mM NaOH-Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt ermöglicht die Reduktion von 16-epi-Vellosimin und Vellosimin zu 16-epi-Deoxysarpagin und 10-Deoxysarpagin sowie von Polyneuridinaldehyd zu Polyneuridin. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass die vorher im Vergleich zu ihren Produkten reaktiven Moleküle die Reaktivität der Aldehyd-Gruppe durch Reduktion zum Alkohol einbüßen. Die Folge ist, dass die Peaks im HPLC-Schaubild schärfer werden. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgt wie in III.2.4, S. 47 detailliert erläutert ist.

Der Rohextrakt des heterolog exprimierten Enzyms setzt Polyneuridinaldehyd zu 16-epi-Vellosimin um. Auch die heterolog in *E. coli* exprimierte PNA Esterase katalysiert diese Reaktion. Die nach identischem Schema zur Kontrolle angefertigten Rohextrakte aus nicht-transformierten *Nicotiana benthamiana* und *E. coli*, zeigen keine gesuchte enzymatische Aktivität. Die denaturierten Proben der aktiven Ansätze weisen ebenfalls keine Umsetzungen auf.

Abbildung 21: HPLC-Ausdrucke der enzymatischen Umsetzung der in *N. benthamiana* überexprimierten PNA Esterase



Die Auswertung eines SDS-Gels ergibt keine Banden, die den Rückschluss zulassen, dass in *N. benthamiana* die PNA Esterase im Vergleich zu den mitgelaufenen Kontrollen deutlich überexprimiert wurde. Es konnte keine zusätzliche Bande, die der PNA Esterase entsprechen würde, verzeichnet werden.

#### 4.9 Verifizierung der PNAE über Aktivitätstest mit anschließender Massenspektrometrie

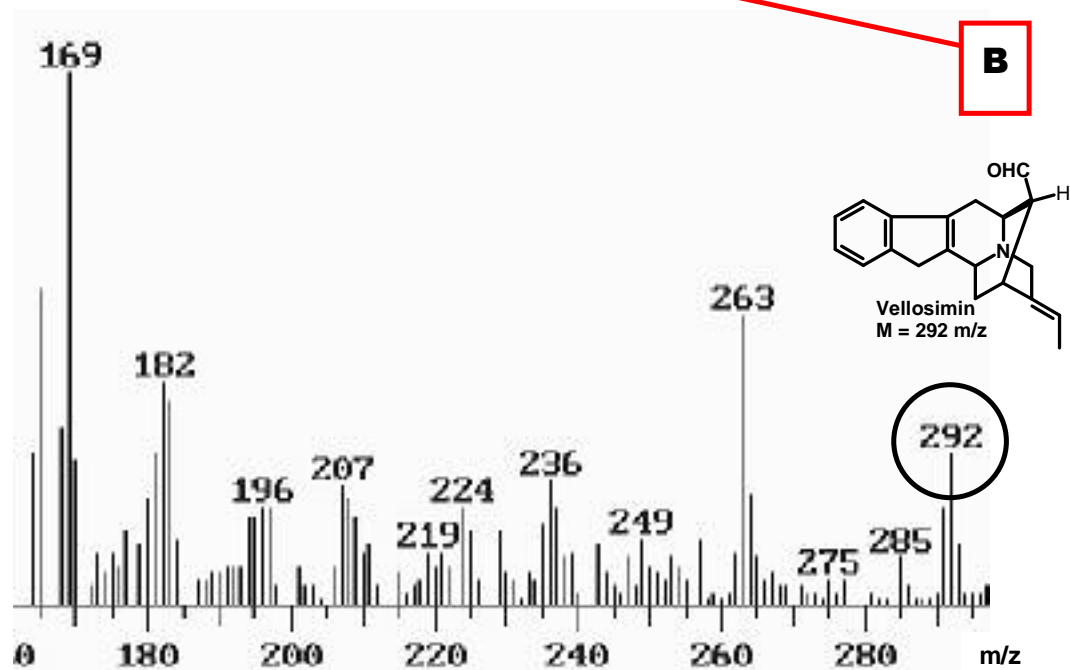
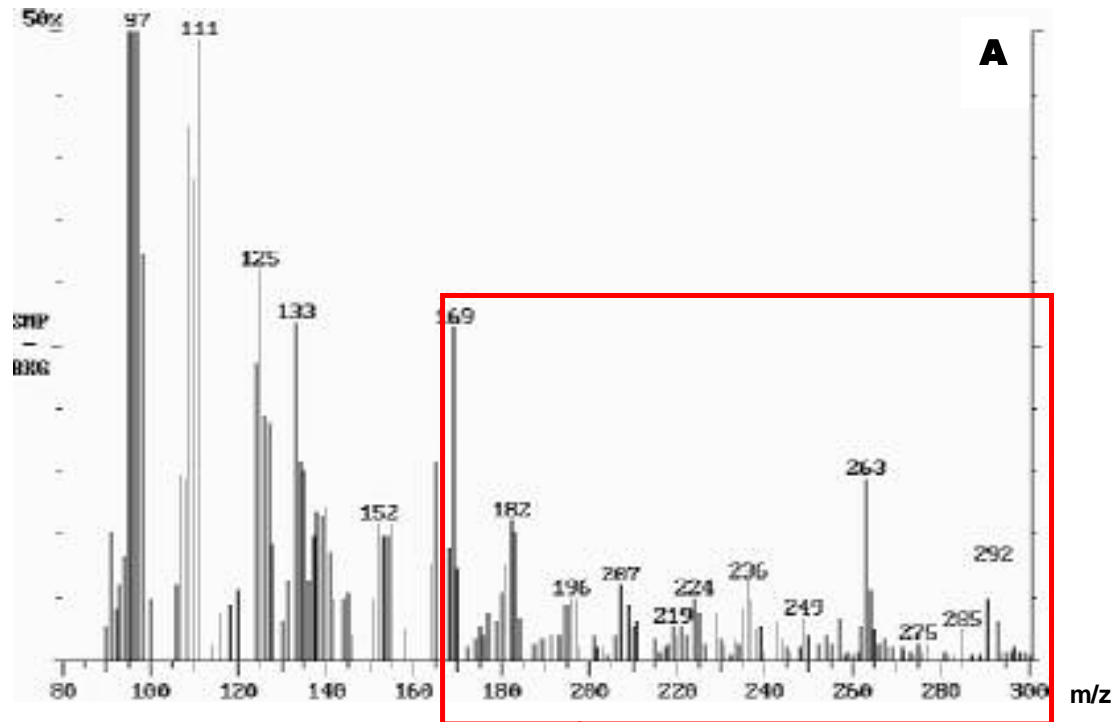
Der PNAE-haltige Rohextrakt wird mit etwa 9  $\mu\text{g}$  PNA versetzt und einer Inkubation von etwa 1h bei 35 °C unterzogen um abschließend über DC (Fließmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3=8,8:1,2:0,1$ ) aufgetrennt zu werden. Als Alkaloidvergleiche werden Vellosimin und Polyneuridinaldehyd mit aufgetragen. Die im Ansatz genau in Höhe des Vellosimins auf der DC

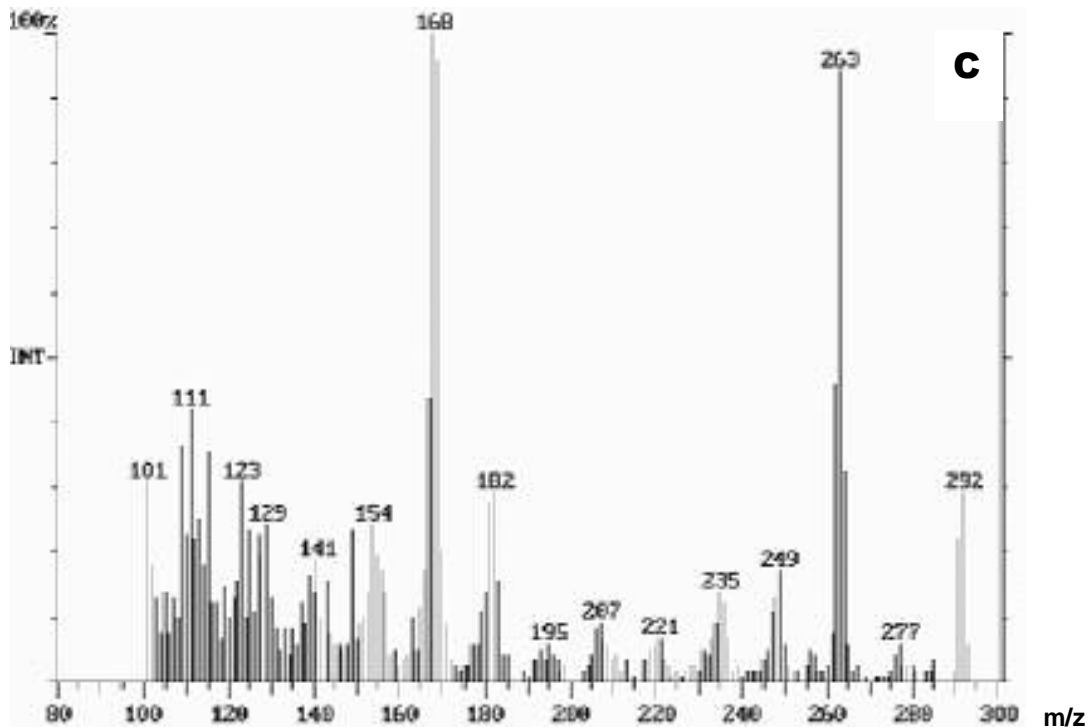
auf tretende Substanz wird ausgekratzt, mit einer  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (7:3) Mischung vollständig in ein 1,5 ml Probengefäß eluiert und mit  $\text{N}_2$  eingedampft. Der verbleibende Rest wird in 50  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und in die Tiegel für die Massenspektrometrie eingebracht. Die massenspektrometrische Analyse der Substanz ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Als Vergleich ist ein Referenzspektrum von reinem Vellosimin abgebildet. Dem Zerfallsmuster und den Ergebnissen aus HPLC und DC nach zu urteilen, stellt das Produkt der Umsetzung Vellosimin dar.



Abbildung 22: Massenspektren des Produktes der Umsetzung der PNA Esterase

Erläuterungen: **(A)** - zeigt das Produkt der enzymatischen Umsetzung der in *N. benthamiana* exprimierten PNA Esterase, der rot eingegrenzte Bereich wird noch einmal vergrößert in **(B)** dargestellt; Referenzspektrum des reinen Vellosimins **(C)**





#### 4.10 Expression der Polyneuridinaldehyd Esterase mit dem (His)<sub>6</sub>-tag-Modul pICH11280

Die Expression der PNAE in Verbindung mit dem (His)<sub>6</sub>-tag-Modul pICH11280 soll die Möglichkeit eröffnen, die PNAE in einem Maße anzureichern, das auch eine Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE ermöglicht.

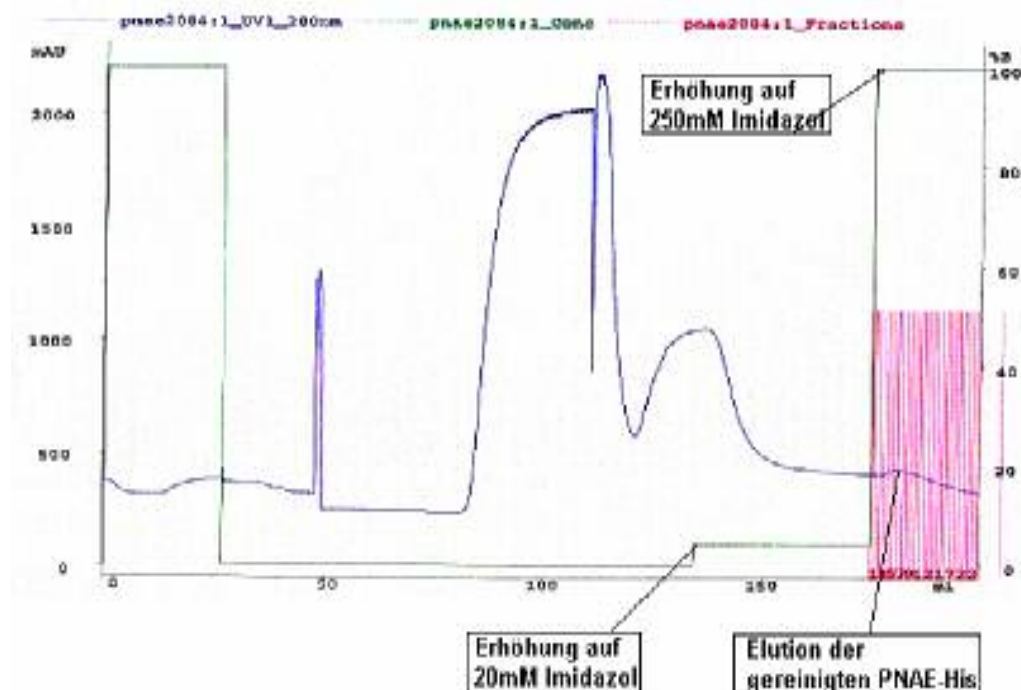
##### 4.10.1 Infiltration von *Nicotiana benthamiana* mit PNAE-3'-Modul, pICH11280, pICH14313 sowie Standardisierung

Zu diesem Zweck werden das PNAE-3'-Modul, das 5'-Modul pICH11280 und die Integrase pICH14313 in ihren entsprechenden *A. tumefaciens* Kulturen in den jeweiligen Selektionsflüssigmedien kultiviert (siehe 4.5, S. 97). Es folgt die gewohnte Infiltration nach 4.5, S. 97, wobei nun direkt vier Pflanzen mit der angegebenen Kombination infiltriert werden. Nach einer Expressionsdauer von 14 Tagen werden die Pflanzen analog 4.6, S. 98 geerntet, und es folgt die Standardisierung nach Punkt 4.8, S. 100. Hier wird statt des Aufschlusspuffers A3, der Aufschlusspuffer A4 benutzt, um zusätzliches Umpuffern in den Ladepuffer zur Enzymreinigung über den Äkta-Explorer zu vermeiden.

#### 4.10.2 Ni-NTA-Reinigung der PNAE-(His)<sub>6</sub> mit dem Äkta-Explorer

Gemäß dem Gewicht der Pflanzenteile, resultieren etwa 30 ml Pflanzenrohextrakt. Nach dem Zentrifugieren (siehe III1.3, S. 33) wird der Rohextrakt mit dem Äkta-Explorer über eine Ni-NTA Superflow-Agarose (gepackt, in einer HR 10/10 Säule von Pharmacia) mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten gereinigt. Die Säule wird zunächst mit Puffer A4 äquilibriert, um dann den zu analysierenden Rohextrakt auf die Säule zu laden, was bei einem Fluss von 1 ml/min etwa 30 min dauert. Nach dem Laden der 30 ml Proteinlösung werden die nicht an das Säulenmaterial bindenden Proteine über einen Zeitraum von 135 min von der Säule gewaschen. Anschließend wird mit ca. 25 ml 20 mM Imidazol eluiert, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu waschen. Dann folgt die Anhebung des Gradienten auf 250 mM Imidazol (100% Elutions-Puffer). Es kann nur ein sehr kleiner Proteinpeak erzielt werden, doch die eluierten Fraktionen werden in 1 ml Schritten aufgefangen (siehe Abbildung 23, S. 107). Nach einfacher Analyse des Proteingehaltes (III1.1, S. 30) werden nur die Fraktionen drei bis vierzehn vereinigt und dem weiteren Procedere unterworfen.

Abbildung 23: Chromatogramm einer NI-NTA-Reinigung der PNAE-(His)<sub>6</sub>



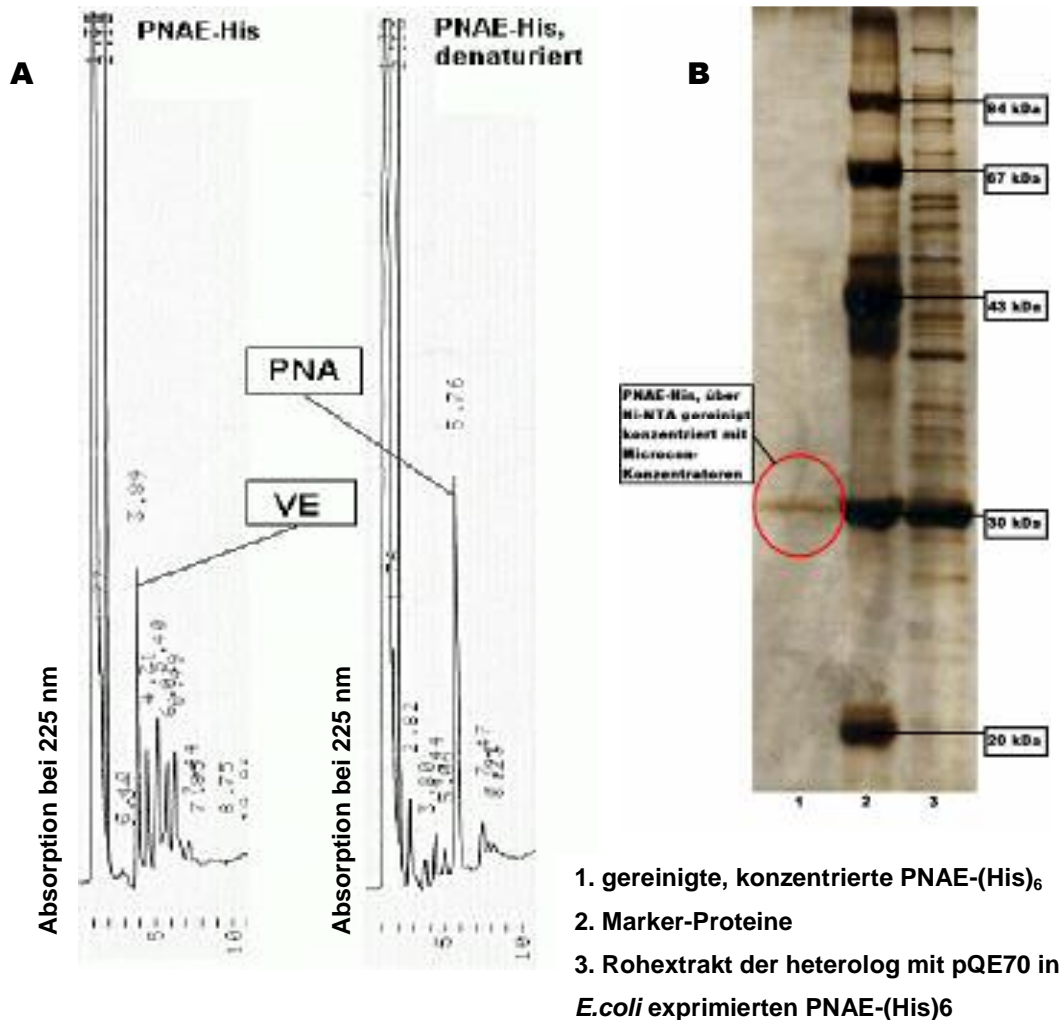
Die aufgefangenen und vereinigten Fraktionen drei bis vierzehn werden sofort auf Aktivität hin getestet. Das Ergebnis ist nicht auswertbar, da die hohe Imidazol-Konzentration zu Störungen der PNAE-Aktivität führt. Aus diesem Grund muss die Lösung 2-fach in 10 l eines 50 mM KPi [pH 7,0] dialysiert werden (siehe III1.6.1, S. 35). Nach der Dialyse wird ein Aktivitätstest durchgeführt, der ebenfalls die Aktivität der PNAE-His bestätigt (siehe Abbildung, S. 109).

#### **4.10.3 Identifizierung der PNAE-(His)<sub>6</sub> durch Aktivitätstest und SDS-PAGE**

Aus den übrigen ca. 10 ml Proteineluat wird ein SDS-PAGE-Gel der Vorschrift (siehe III1.8.1, S.36) entsprechend angefertigt, dessen Ergebnis negativ war. Aus diesem Grund wurde die vorhandene Enzymlösung mit Microcon-Konzentratoren auf ein Endvolumen von etwa 2 ml eingeengt.

Die nun folgende SDS-PAGE lässt mit der regulären Coomassie-Färbung (siehe III1.8.1.3.1, S. 38) eine ganz schwache Bande bei etwa 30 kDA erahnen. Diese Tatsache ist Grund genug, das gleiche Gel einer Silberfärbung zu unterziehen. Das Ergebnis ist positiv. Die gesuchte Bande ist nach der Silberfärbung eindeutig als die gereinigte PNAE-(His)<sub>6</sub> zu identifizieren (siehe Abbildung, S. 109).

Abbildung 24: HPLC-Ausdruck der über Ni-NTA gereinigten PNAE-(His)<sub>6</sub> und SDS-PAGE-Foto nach der Silberfärbung



#### Erläuterungen:

**A** Die mit His-Tag exprimierte PNA Esterase („**PNAE-His**“) zeigt Umsatz, ersichtlich am Produkt-Peak von Velloosimin (**VE**). Die denaturierte Probe der PNAE-His („**PNAE-His denaturiert**“) zeigt keinen Umsatz, hier ist nur das Substrat Polyneuridinaldehyd (**PNA**) meßbar.

**B** Die aktive Proteinfraktion wird über den Äkta-Explorerer aufgereinigt und anschliessend aufkonzentriert. Diese Proteinfraktion wird mittels SDS-PAGE aufgereinigt und mit Silberfärbung visualisiert.

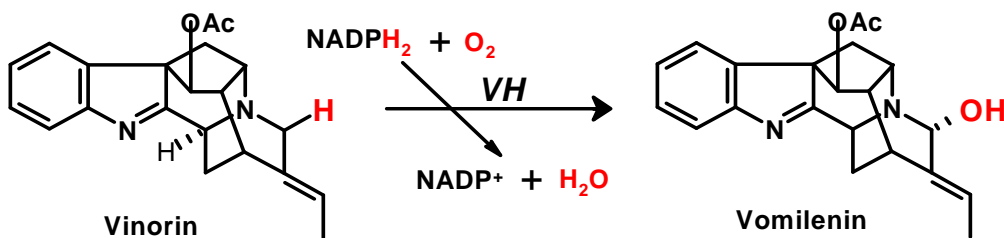
## V Diskussion

In der Reaktionskaskade der Biosynthese des Alkaloids Ajmalin sind mindestens 11 Enzyme beteiligt, die sich durch eine hohe Substratspezifität auszeichnen. Der größte Teil dieses von Tryptamin und Secologanin ausgehenden Biosyntheseweges (STÖCKIGT, 1995) ist dahingehend aufgeklärt, dass acht Schlüsselpositionen spezifischen Enzymen zugeordnet werden können, die auch heterolog exprimiert wurden (siehe Abbildung 3, S. 6, kursiv gekennzeichnete Enzyme).

### 1 Die Vinorin-Hydroxylase

Ein sehr wichtiges Enzym stellt die Vinorin-Hydroxylase dar. Dieses Enzym katalysiert einen sehr wichtigen Schritt in der Ajmalin Biosynthese: An Position 21 wird Vinorin, das Produkt der Vinorin-Synthase (PFITZNER A *et al*, 1986) unter Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch hydroxyliert.

Abbildung 25: Umsetzung von Vinorin zu Vomilenin durch die Vinorin-Hydroxylase



Dieser Reaktiostyp wird immer von Monooxygenasen durchgeführt, die zu der Klasse der Cytochrom P450-Enzyme gezählt werden. Durch FALKENHAGEN H UND STÖCKIGT J (1995) wurde diese These an Hand von Inhibierungs- (Ketoconazol, Metyrapon, u.a.) und Abhängigkeitsstudien (O<sub>2</sub>, Co-Faktor) belegt. Im gleichen Jahr gelang FALKENHAGEN H die Feststellung der hohen Substratspezifität der Vinorin-Hydroxylase, die auch unter der Bezeichnung Vinorin-21-Monooxygenase (EC 1.14.13.75) in Datenbanken eingetragen ist. Die für eine solche Reaktion nötigen Elektronen werden von einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase geliefert, die auch aus *Rauvolfia serpentina* schon isoliert und heterolog in *E. coli* exprimiert wurde (RUPPERT M, 2001).

Die Isolierung der Vinorin-Hydroxylase mit anschließender Aufreinigung aus pflanzlichen Suspensionszellkulturen ist bis dato nicht gelungen. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Struktur der Vinorin-Hydroxylase als membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym. Es ist schwierig, über den Weg der herkömmlichen Proteinreinigung, an ein aktives Cytochrom P450-Enzym zu gelangen (CHAPPLE C, 1998). Verantwortlich dafür sind die lipophilen Strukturen und die damit verbundenen Moleküleigenschaften dieser Enzyme. Nur über Einsatz von Detergentien ist es möglich, membrangebundene Enzyme aus ihrer nativen Umgebung zu isolieren. Dadurch, dass Detergentien die natürliche membranöse Struktur aufbrechen, können zwar Cytochrom P450-Enzyme isoliert werden, allerdings muss zur Aufnahme der Enzymtätigkeit ein gewisses Membrangefüge (BAYBURT T *et al*, 1998) wiederhergestellt werden, um die ursprüngliche räumliche Orientierung der Proteine zu gewährleisten.

Diese Rekonstituierung kann sich als ein durchaus schwieriges Unterfangen erweisen und wird nicht selten durch „Versuch und Irrtum“ geleitet. In jüngster Zeit wurde über sogenannte „soluble nanoscale lipid bilayer“ (DUAN H *et al*, 2004) berichtet, die eine methodische Rekonstituierung von heterolog exprimierten pflanzlichen Cytochrom P450-Enzymen in aktiver Form erlauben sollen.

Nach dem Scheitern der proteinchemischen Aufarbeitung der VH versuchte man das Problem auf molekularbiologischem Wege zu lösen. Insgesamt vier komplette Cytochrom P450-Klone P1, P2, P3 und P5 wurden durch RUPPERT mit Hilfe degenerierter Primer und dem RACE-PCR-Verfahren isoliert und in *E. coli* mit der Cytochrom P450-Reduktase als Fusionsproteine zur Expression gebracht. Es konnte keine VH-Aktivität detektiert werden, die Expression der rekombinanten Proteine war ebenfalls sehr gering. Die verwendeten Vektoren waren der pSE280-Vektor und der pQE70-Vektor. Der pSE280-Vektor ist mittlerweile veraltet. Er ist schlecht steuerbar und weist keine Tag-Funktion zur anschließenden Aufreinigung auf. Der pQE70-Vektor ist eher für die Expression von Cytochrom P450-Enzymen geeignet. Er hat einen C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag und lässt sich mit IPTG induzieren. Sein T5-Promotor ist sehr potent. Das kann sich als nachteilig erweisen, wenn dadurch die Expression zu hoch ist. Subzelluläre Fraktionierung und

Immunoblotanalyse haben gezeigt, dass rekombinante Proteine, die mit starken Promotoren exprimiert wurden, in *inclusion bodies* zu finden sind (BARNES H, 1996). Das würde bedeuten, dass Vektoren mit sehr starken Promotoren nicht kompatibel sind mit der Expression von enzymatisch aktiven, membranassoziierten Cytochrom P450-Enzymen in *E. coli*.

Es gibt eine Vielzahl verschiedenster Expressionsvektoren und es wurde in den letzten Jahren von diversen Erfolgen bei der Expression von P450s berichtet. BAYBURT *et al* gelang es 1993 mit Hilfe des pOR262-Vektors eine humane P450-Reduktase in *E. coli* zu exprimieren. Im Jahre 2000 exprimierte HAUDENSCHILD *et al* die Limonen-Hydroxylase aus *Menthae* in *E. coli* unter Verwendung des pCW-Vektors. HOSEA *et al* exprimierte in gleichen Jahr eine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Modifikation des pCWori(+)-Vektors nach SHET M *et al* (1993). In den folgenden beiden Jahren gab es weiterhin Veröffentlichungen von Expressionen in *E. coli* (ANTEROLA A *et al*, 2002) (ICHINOSE H *et al*, 2002). Diese weisen jedoch eher Ausnahme- als Modellcharakter auf. Die verwendeten Vektoren wurden bei sonstigen P450-Expressionen in der Literatur nicht mehr in diesem Zusammenhang beschrieben.

Betrachtet man sich Arbeiten der letzten fünf Jahre bezüglich der Expression von P450s in *E. coli*, tritt immer wieder der pCW-Vektor in Erscheinung. Dieser Vektor stellt ein Derivat des pHSe5-Vektors dar. Er enthält ein pBR322 *origin* zur Plasmid-Replikation und das *lacI<sup>q</sup>* Gen, das IPTG-gesteuert die basale Promotor-Aktivität reguliert. Zusätzlich ist ein  $\beta$ -Lactamase-Gen eingebunden, das eine Ampicillin-Resistenz zu Zwecke der Selektion generiert. Die Transkriptions/ Translationsregion stammt vom Lysozym-Gen des T4-Phagen und enthält eine sieben Basenpaare lange Shine-Dalgarno-Sequenz, welche drei Basenpaare vom Initiationscodon entfernt liegt. Neueste Veröffentlichungen zeigen, dass bei Expression von P450s in *E. coli* zumeist auf bestimmte Modifikationen dieses Vektors zurückgegriffen wird. Der Unterschied liegt zumeist in der MCS oder in der möglicherweise schon zusätzlich einklonierten CPR verschiedenartiger Herkunft (MAST N *et al*, 2004) (BAASA B *et al*, 2004). Die *E. coli*-Stämme, die meistens zur Expression benutzt werden sind JM109, DH5 $\alpha$  oder XL1-blue. Die Expression findet normalerweise im Standardmedium (LB-Medium) statt,



doch werden auch je nach Versuchsanordnung weitere Zusatzstoffe hinzugegeben. Über Substanzen, die dem Medium zugegeben werden können, um die Wahrscheinlichkeit des Gelingens oder die Höhe der Ausbeute zu verbessern, muss im Einzelfall entschieden werden (zum Beispiel:  $\delta$ -Aminolevulinsäure, (Austin CJ, 2004) (Akhtar MK et al, 2003))

Für die Expression eukaryotischer P450s in Prokaryoten ist außerdem die Modifizierung des Membranankers von Bedeutung. Da die Expressionslevel zwischen den einzelnen Cytochrom P450-Spezies sehr verschieden sind, werden oft Modifikationen des N-Terminus von 20-30 Aminosäuren benötigt, um überhaupt höhere Expressionslevel erreichen zu können (NTHANGENI M et al, 2004). Hinzu kommt, dass bei erreichtem hohem Expressionslevel die katalytische Aktivität reduziert werden kann (CRESPI C UND MILLER V, 1999).

Der native Mangel bestimmter tRNA in *E. coli* kann dazu führen, dass es zu unerwünschten Leserahmenverschiebungen bei der heterologen Expression von Cytochrom P450-Enzymen kommt (SPANJAARD R et al, 1990). Cytochrom P450-Enzyme weisen viele solcher Basentriplets in ihrer cDNA auf, die auf eben diese eher seltenen tRNA zurückgreifen. Abhilfe schafft das *argU*-Gen. Es codiert die in *E. coli* seltene tRNA<sup>Arg4</sup>, die über das AGA-Codon erkannt wird. In neueren Modifikationen der gängigen Expressionsvektoren findet sich immer eine Einbindung dieses Gens.

Ein aktueller Trend geht in die Richtung der Coexpression von Chaperonen. Bei einer in vitro Proteinbiosynthese kann die Faltung eines Proteins ungestört ablaufen, sofern sie von äusseren Faktoren unabhängig verläuft. Findet diese Faltung aber in der Zelle statt, so muss sie häufig mit Hilfe der molekularen Chaperonen, die als eine „Proteinmaschinerie“ fungieren, vollzogen werden. Sie können Fehlfaltung und in der Regel irreversible Aggregationen ungefalteter Proteinketten verhindern, beziehungsweise deren korrekte und effiziente Faltung forcieren.

Viele Chaperone sind Stress- oder Hitzeschockproteine (Hsps). Sie sind nicht nur für die Faltung neusynthetisierter Proteine erforderlich, sondern auch für die "Reparatur" von Proteinketten, die sich unter Zellstress wie zum Beispiel hoher Temperatur fehlgefaltet haben. Neueste Versuchsreihen zeigen, dass sich die Coexpression von Chaperonen sehr positiv auf die Ausbeute an aktivem Exprimat auswirkt. So konnte gezeigt werden, dass die

Expression einer humanen Aromatase (CYP19) von 240 nmol/l Kultur auf etwa 350-400 nmol/l Kultur alleine durch die Coexpression der bakteriellen Chaperone GroES/GroEL erhöht werden konnte (KAGAWA N *et al*, 2004).

## **2 Der P450-Volllängenklon P4 – Die Cinnamoyl-Hydroxylase**

Außer den schon untersuchten Volllängenklonen hat RUPPERT ein etwa 300bp großes DNA-Fragment eines Cytochrom-P450 Gens isoliert. Dieses Fragment zeigt hohe Homologie zu einer Cinnamoyl-Hydroxylase, wobei der endgültige Beweis einer Cinnamoyl-Hydroxylase noch erbracht werden muss. Cytochrom P450-Enzyme sind sehr plastisch in ihrem katalytischen Verhalten. Schon durch den Austausch von nur einer Aminosäure kann das Profil ihrer Substrat-Umsetzung stark verändert werden (LINDBERG R UND NEGISHI M, 1989). Das heißt, es besteht zwar die Möglichkeit, dass eine hohe Homologie zu einer Cinnamoyl-Hydroxylase vorliegt, der Klon aber trotzdem für die gesuchte Vinorin-Hydroxylase codiert. Es galt also, den Volllängenklon des Klons P4 zu komplettieren.

Die Methode der Wahl (VON SCHUHMANN G, 2003) ist die RACE-PCR nach CHENCHIK A *et al* (1996). Bei diesem Verfahren werden sowohl das 5'-Ende als auch das 3'-Ende des Klons auf der RNA-Ebene mit bestimmten Adaptern versehen (siehe III.3.11, S. 55). Die entsprechend synthetisierte cDNA dient als Anlagerungssequenz für die passenden Primer. In der PCR mit genspezifischem Primer und einem Adapter-Primer kann das jeweilige vollständige Ende generiert werden. Wie unter IV.1, S. 64 detailliert beschrieben, ist es gelungen den Volllängenklon P4 zu finden.

### **2.1 Homologiestudien zum P450-Klon P4**

Der Klon P4 zeigt hohe Homologien zu vielen verschiedenen Cinnamoyl-Hydroxylasen. An dieser Stelle wird jedoch nur auf eine reduzierte Auswahl zu Vergleichszwecken eingegangen.

Bei Homologie-Vergleichen (siehe III.4.3 NCBI, S. 63) werden immer eine enorme Anzahl von homologen Sequenzen angezeigt, die aus der Genom-Sequenzierung von *Arabidopsis* und anderen Pflanzen herühren. Da diese

Gene als putative Gene noch nicht eindeutig identifiziert sind, werden nur die eindeutig identifizierten Fälle diskutiert.

**Tabelle 33: Homologien zu P450-Klon P4**

Vertreter	Homologie zu P450-Klon P4	Veröffentlichung
<i>Nicotiana tabacum</i> AC: AAK62344	79%	RALSTON L <i>et al</i> , (2001)
<i>Citrus sinensis</i> AC: AAF66065	76%	BETZ C <i>et al</i> , (2001)
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> AC: AAD11427	69%	MICHALOWSKI C UND BOHNERT H, (1998)
<i>Camptotheca acuminata</i> AC: AAT39513	60%	KIM Y <i>et al</i> , (2004)
<i>Catharanthus roseus</i> AC: CAA83552	59%	HOTZE M <i>et al</i> , (1995)
<i>Zinnia elegans</i> AC: Q43240	59%	YE Z UND VARNER J, (1996)

Aufgrund der hohen, mit ClustalW (siehe III.4.2, S. 62) ermittelten Homologien zu den in der Tabelle aufgeführten Pflanzengenen und dem durchgeführten Alignment liegt der Schluss nahe, dass es sich beim Klon P4 um eine Cinnamoyl-Hydroxylase handelt. In Abbildung 26, S. 116 sind diesbezüglich wichtige Aminosäuresequenzen farbig herausgehoben.

Es sind eindeutig die Häm-Bindemotive **F-X-X-G-X-X-X-C-X-G** und **P-E-R-F** (**rot**) in der C-terminalen Region zu identifizieren (KALB V UND LOPER J, 1988). Zudem ist das N-terminale konservierte Tetrapeptid **P-P-G-P** (**grün**) als Prolin-reiche Region mit Scharnierfunktion vorhanden. Sie ist essentiell für die korrekte Häm-Einbindung und die Stabilität des Cytochrom P450-Enzyms (SZCZESNA-SKORUPA E *et al*, 1993). Mit Hilfe des Programmes DNAsis 2.5 (Hitachi) wurde die 2D-Struktur nach CHOU P UND FASMAN G (1978) bestimmt und der **Membrananker** der Cinnamoyl-Hydroxylase lokalisiert. Diese Sequenz ist **türkis** unterlegt, um die Abgrenzung zu den übrigen Sequenzen zu verdeutlichen. Da dieser Teil nicht ganz am Anfang des N-Terminus liegt, ist zu erwarten, dass die vorstehenden Aminosäuren im Transfer durch die Zellkompartimente als Signalpeptide fungieren und im Verlauf des Transportes abgeschnitten werden. Diese Vorgänge finden statt wenn sich ein Enzym zum Beispiel vom Endoplasmatischen Retikulum zu den *Protein storage vacuoles* (PSV) bewegt und dabei den Golgi-Apparat passiert (HARA-NISHIMURA I *et al*, 1998; JIANG L UND ROGERS J, 1998).

Eine weitere wichtige Sequenz innerhalb des Klons P4 stellt das Motiv (A/G)(A/G)X(E/D)T(T/S) (blau) dar. Das stark konservierte Threonin dieser Konsensussequenz spielt durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen eine kritische Rolle in der Gestaltung der Molekülstruktur. Zudem wird vermutet, dass genau dieses Threonin zusammen mit den angrenzenden Aminosäuren an der Aktivierung von Sauerstoff durch einen Protonentransfer von der Proteinoberfläche zum Eisen-gebundenen O<sub>2</sub> beteiligt ist (SCHALK M *et al*, 1999) (MORI S *et al*, 2004).

#### Abbildung 26: Alignment der Sequenz des Klons P4 mit weiteren Cinnamoyl-Hydroxylasen anderer Pflanzen

**Erläuterungen: Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Ein konservierter Austausch ist durch einen Doppelpunkt (:) markiert und ein halbkonservierter Austausch wird durch einen Punkt (.) angezeigt. Die farbigen Markierungen erklären sich aus dem obigen Text.**

```

Rauvolfia      -----MGNFLNKSVMFC--ILLAITLLSCTKLFSPCISFPSTINSLFTI 42
Nicotiana     --MKNMAKLLNKTIFC--ILFTIAFLSFAKLLSSYLSMPFPLKYMSLIV 45
Citrus        -----MANLVTISFFS--ILLTISLLSFNKSLN-LISITLPL-----V 35
Mesembryanthemum
MAKMETHSKPMSKKLARNLILLAISIIVLTTSSS-NPNFSYYLAIFLPII 49
Camptotheca   -----MDLLLVEKTLALFAA----- 16
Catharathus   -----MDLLLLEKTLGLFAA----- 16
Zinnia        -----MDLLLVEKTLALFAA----- 16
                : : .
                : : .
                PPGP
Rauvolfia     SLLYFIHFLHTKKSSKLP*P*P*SSFP*IFGNWLQVGNDLNHRLLAAMSKEY 92
Nicotiana     PLLPLIINFLYVKPQN*LP*P*PTAV*IFGNWLQVGNDLNHQLLATMSQTY 95
Citrus        PLIAYVLKSF*FKSSKAFY*P*P*P*IS*IFGNWLQVGNDLNHRLLASMAQIY 85
Mesembryanthemum
VYLVHSICFHRAQNSGTT*P*P*P*LP*IFGNWLQVGNDLNHRCLAALAKTY 99
Camptotheca   -IVLAITISKLRGKRFK*LP*P*P*IPV*VFGNWLQVGDDLNHRNLTDLAKKF 65
Catharathus   -IIVASIVSKLRGKRFK*LP*P*P*IPV*VFGNWLQVGDDLNHRNLSDYAKKF 65
Zinnia        -IIASIFISKLRGKRFK*LP*P*P*IPV*IFGNWLQVGDDLNHRNLTDLAKKF 65
                :          * * * . . :*****:*****: * : : :
                :          * * * . . :*****:*****: * : : :

Rauvolfia     GPIFLLKLGSKNLAVVSNPDLANHVLTQGV*EFGSRPRNVVFDIFTGNGQ 142
Nicotiana     GPIFLLKLGSKNLAVVSNPELADQVLHTQGV*EFGSRPRNVVFDIFTGNGQ 145
Citrus        GPVFRLLKLGSKNLI*VVSEPDLATQVLHTQGV*EFGSRPRNVVFDIFTGNGQ 135
Mesembryanthemum
GPMFLLKLGVRN*LVVSNPELACEVLHAHGV*EFGSRPRNVVFDIFTGGGQ 149
Camptotheca   GDMFLLRMGQRN*LVVSSPDLAKEVLHTQGV*EFGSRTRNVVFDIFTGKGQ 115
Catharathus   GEIFLLRMGQRN*LVVSSPELAKEVLHTQGV*EFGSRTRNVVFDIFTGKGQ 115
Zinnia        GEIFLLRMGQRN*LVVSSPNLAKEVLHTQGV*EFGSRTRNVVFDIFTGKGQ 115
                * : * * : * : * * * . * : * . * * : * * * * * * * * * * * *

```

Rauvolfia DMVFTIYGEHWRKMRRIMTLPPFTNKVVHQYSDMWENEMDLVVHDLQSD- 191  
 Nicotiana DMVFTIYGDHWRKMRRIMTLPPFTNKVVHQYSDMWENEMDLVVNDLKKN- 194  
 Citrus DMVFTVYGEHWRKMRRIMTLPPFTNKVVHNYSDMWEQEMDLVVHDLKNDY 185  
 Mesembryanthemum DMVFTIYGDHWRKMRRIMTVPPFTNKVVNNYSPMWEDEMCKVNDLNHNE 199  
 Camptotheca DMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPPFTNKVVQYRYGWEEEAARVVEDVKKN- 164  
 Catharathus DMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPPFTNKVVQYRYGWEEEAARVVEDVKKN- 164  
 Zinnia DMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPPFTNKVVQYRTGWEEAAAAVDDVKKN- 164

\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\* \*\* \* \*.\*::

Rauvolfia ---QTVRTEGIVIRKRLQLMLYNIMYRMMFDAKFESQKDPKFIQALSSIQ 238  
 Nicotiana ---EKVKYEGIVIRKRLQLMLYNIMYRMMFDAKFESQNDPLFIEATKFN 241  
 Citrus ---ESVSTKGIVIRKRLQLMLYNIMYRMMFDAKFESQEDPLFIEATRFN 232  
 Mesembryanthemum KISIKAKHEGFVIRKRLQLMLYNIMYRMMFDEGFESMEDPMFIDATKFN 249  
 Camptotheca ---PEALTGTGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNG 211  
 Catharathus ---PESATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNG 211  
 Zinnia ---PKAATEGVIRKRLQLMMYNMFRIMFDRRFESEDDPLFVKLKMLNG 211

\*.\*\*\*\*\*:\*.\*\*\* \*\* .\*\* \*.

Rauvolfia REVDWLKVLIIYIGDFIPLLRPFLRGYLNKCRDLQRRRLAFFNNYVEKR 288  
 Nicotiana ERSRLAQSFYNYGDFIPLLRPFLRGYLNKCKDLQTRRLAFFNNYFVEKR 291  
 Citrus ERSRLAQSFYNYGDFIPLLRPFLRGYLNKCRDLQCRRLAFFNNYFVEKR 282  
 Mesembryanthemum ERSRLAQSFYNYGDFIPLLRPFLRSYLSKCRDLQKSRLAFFNNYFVEKR 299  
 Camptotheca ERSRLAQSFYNYGDFIPLLRPFLRGYLKICKDIKERRQLFKDYFLDER 261  
 Catharathus ERSRLAQGFYNYGDFIPLLRPFLRGYLRICKEVKERRQLFKDYFVDER 261  
 Zinnia ERSRLAQSFYNYGDFIPLLRPFLKGYLKLCKEVEKRFQLFKDYFVDER 261

.. : : \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*.\*\*\* \*::: \* : \* : \* : \* : \*

AAXETT

Rauvolfia RKIMAENGE-KHKISCAIDHIIAQAQKGEITEENVLYIIVENINVAIETT 337  
 Nicotiana RKIMDENGE-KHKISCAIDHIIAQAQKGEINEQNVLYIIVENINVAIETT 340  
 Citrus RKIMAANGE-KHKISCAIDHIIAQAQKGEITEENVLYIIVENINVAIETT 331  
 Mesembryanthemum RKIMAANGE-HHKISCAIDHIIAQAQKGEINAENVLYIIVENINVAIETT 348  
 Camptotheca KKLSTKGMNDNYGLKCAIDHILEAQKGEINEDNVLYIIVENINVAIETT 311  
 Catharathus KKFSTKSMDDNSLCAIDHILEAQKGEINEDNVLYIIVENINVAIETT 311  
 Zinnia KKLSTKSMDDNQKCAIDHILDAKGEINEDNVLYIIVENINVAIETT 311

\*: : . : .\*\*\*\*\*:\*.\*\*\* \*::: \* : \* : \* : \* : \*

Rauvolfia LWSMEWAIAELVNHPVQNKIRDEISTVLQ-GKPVTESNLQELPYLQATV 386  
 Nicotiana LWSMEWAIAELVNHPVQKIRDEISTVLK-GRSVTESNLHELPHYLLATV 389  
 Citrus LWSMEWAIAELVNHPVQKIRREISTVLK-GNPVTESNLHELPHYLQAAV 380  
 Mesembryanthemum LWSMEWALAEVNHPVQKIRHEIAMKLE-GKPVTESNLQELPYLQAVV 397  
 Camptotheca LWSIEWGIAELVNHPVQKLRHEIQTVLPGPTQVTEPEVQKLPYLQAVV 361  
 Catharathus LWSIEWGIAELVNHPVQKLRDELETVLGPGVQITEPDTYKLPYLQAVI 361  
 Zinnia LWSIEWAIAELVNHPVQKLRHELVSQLGPGVQVTEPDLHKLPHYLQAVI 361

\*\*\*:\*.\*\*\*:\*\*\*\*\* :\* \*\* \* : \* \* :\*.\*\*\* : :\*\*\*\*\* \*.

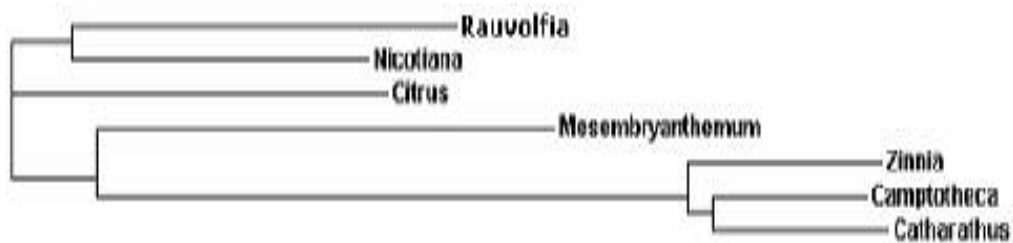
Rauvolfia NETLRLHTPIPLLPHMNLEEAALGGYTIPKESKVVNNAWLANNPAAWK 436  
 Nicotiana NETLRLHTPIPLLPHMNLEEAALGGYTIPKETKVVNNAWLANNPAAWK 439  
 Citrus KEVLRHTPIPLLPHMNLEEAALGGFTIPKESKIVNNAWLANNPAAWK 430  
 Mesembryanthemum KETLRLHTPIPLLPHSNLEEAALGGYTIPKNSKVVNNAWLANNPAAWK 447  
 Camptotheca KETLRLRMAIPLLPHMNLDHAKLGGYDPAESKILVNNAWLANNPAAHW 411  
 Catharathus KETLRLRMAIPLFLPHMNLDHAKLGGYDPAESKILVNNAWLANNPAAHW 411  
 Zinnia KETLRLRMAIPLLPHMNLDHAKLGGYDPAESKILVNNAWLANNPAAQW 411

\*.\*\*\*: .\*\*\*:\*.\*\*\* \*.\*:\*\*\*\*\*: \* : \* : \* : \* : \* : \*

	PERF	FXXGXXCXG	
Rauvolfia	NPDEFRPERFVEEENGTEAAVAGGKVDFR/LPFGMGRRSCPGLIILAVPIL	486	
Nicotiana	NPNEFRPERFLEEDSSTEAAVAGGKVDFR/LPFGMGRRSCPGLIILALPIL	489	
Citrus	KPEEFRPERFLEECNIDAVAGGKVDFR/LPFGVGRRSCPGLIILALPIL	480	
Mesembryanthemum	DAEEFRPERFLEEAGADAAGGKVDFR/VLPFGVGRRSCPGLIILALPIL	497	
Camptotheca	KPEEFRPERFLEESKVDANGN----DFR/LPFGVGRRSCPGLIILALPIL	457	
Catharathus	KPEEFRPERFLEESKVEANGN----DFR/LPFGVGRRSCPGLIILALPIL	457	
Zinnia	KPEEFRPERFLEESKVEANGN----DFR/LPFGVGRRSCPGLIILALPIL	457	
	..:*****:~: ~: ~: ~:*****:***		
Rauvolfia	GLVIAKLVTNFEMHAPHGLEKIDVSEKGGQFSLHIAKHSTVVFRPTKG--	534	
Nicotiana	GLVIAKLVSNFEMQPPGVEKVDTSERGGQFSLHIAKHSTVVFKPIAA--	537	
Citrus	GLVIAKLVTSFEMKAPQGIDKIDVSEKGGQFSLHIANHSTVVFDPIMESL	530	
Mesembryanthemum	GLVIAKLVSNFEMQPPGEEKIDVSEKGGQFSLHIAKHSTVVFHPIHAA-	546	
Camptotheca	GITLGRVLVQNFELPPPGQSKIDTSEKGGQFSLHILKHSTIVAKPISF--	505	
Catharathus	GITIGRLVQNFELPPPGKSKIDTSEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRTF--	505	
Zinnia	GITIGRLVQNFELPPPGQDKVDTTEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRVL--	505	
	*.:.:** .**~ * * .*:~:~:*****~:***~* *		
Rauvolfia	-----		
Nicotiana	-----		
Citrus	SQPMPQ 536		
Mesembryanthemum	-----		
Camptotheca	-----		
Catharathus	-----		
Zinnia	-----		

Die Sequenzvergleiche geben einen Querschnitt bezüglich der Verwandtschaftsgrade der Einzelsequenzen zueinander. Eine andere Darstellung dieser evolutionsbiologischen Analyse ist der Phylogenetische Baum in der Form eines durchschnittlichen Abstandsbaumes. In dieser Darstellung werden die in Tabelle 33, S. 115 aufgestellten Homologien und die Nähe zu den anderen Vertretern etwas deutlicher.

**Abbildung 27: Phylogentischer Baum der Verwandtschaftsverhältnisse der verglichenen Sequenzen.**



Das Ergebnis des phylogenetischen Baumes ist überraschend. *Rauvolfia* und *Catharanthus* sind beide Angehörige der Familie der Apocynaceen. Deshalb ist es unverständlich, dass beide Sequenzen evolutionsbiologisch so weit voneinander entfernt dargestellt werden. Das von mir identifizierte Gen der Cinnamoyl-Hydroxylase wurde mit Hilfe einer cDNA-Bank ermittelt, die aus der isolierten Gesamt-RNA einer *Rauvolfia serpentina* Zellsuspensionskultur (T<sub>30</sub>-Zelllinie) gewonnen wurde (siehe III.3.11, S. 55). Eine weitere durch RUPPERT hergestellte cDNA-Bank, bei der ebenfalls die *Rauvolfia*-T<sub>30</sub>-Zelllinie die erforderliche RNA lieferte, eröffnete die identische Sequenz des Vollängenklons der Cinnamoyl-Hydroxylase. So konnte die Sequenz durch zwei unabhängige cDNA-Quellen bestätigt und eine fehlerhafte Bearbeitung infolge der Verwendung einer falschen cDNA-Bank ausgeschlossen werden. Trotzdem ist die von HOTZE M *et al* (1995) veröffentlichte Sequenz evolutionsbiologisch relativ weit von der *Rauvolfia*-Sequenz entfernt. Für die aufgezeigte Nähe dieses Gens zu dem entsprechenden Gen aus *Camptotheca accuminata*, spricht jedoch, dass das in *Camptotheca* vorkommende Camptothecin aus den gleichen Präkursoren, dem Tryptamin und Secologanin und synthetisiert wird wie das in *Catharanthus* anzutreffende Catharanthin. Um die aufgezeigte Problematik abschließend bewerten zu können, müsste die Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Catharanthus* erneut eindeutig identifiziert werden.

## 2.2 Expression in sf9-Insektenzellen

Nach den erfolglosen Expressionsversuchen in *E. coli* sollte jetzt ein neues Expressionssystem ausprobiert werden. Abhilfe schien die Verwendung eines eukaryotischen Systems zu versprechen. Die Expression in sf9-Insektenzellen mit rekombinantem Baculovirus als Expressionsvektor ist ein solches System. Schon 1995 wurde von KRAUS P UND KUTCHAN T die Berbamunin Synthase, ein Cytochrom P450-Enzym aus *Berberis stolonifera*, heterolog in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus exprimiert.

Das Baculovirussystem in Kombination mit sf9-Insektenzellen soll die Möglichkeit eröffnen, pflanzliche Cytochrom P450-Enzyme heterolog zur Überexpression zu bringen, die nativ als Membranassoziate vorliegen. Diese Membranassoziate haben im Vergleich zu den löslichen Vertretern des Sekundärstoffwechsels einen differenteren strukturellen Aufbau. Die

Komplexität wirkt sich jedoch auf die weitere Bearbeitung aus. Sie müssen in der Regel solubilisiert, gereinigt und rekonstituiert werden. Zudem ist die Expression meist nur sehr gering. KRAUS P UND KUTCHAN T ermittelten 1995 in einem Liter Insektenzellkultur die zwanzigtausend-fache Konzentration an Berbamunin-Synthase als in der entsprechenden Menge einer Pflanzensuspensionskultur.

Um überhaupt als Membranassoziate vorzuliegen und deren Funktion erfüllen zu können, sind bestimmte Strukturmerkmale, wie zum Beispiel der Membrananker erforderlich. Membrangebundene Enzyme werden in der Regel nur von Organismen produziert, welche eine Zellmorphologie aufweisen, die sich von denen der „einfachen“ prokaryotischen Organismen klar unterscheidet. Ein viel versprechender Ausweg diese Gruppe der Cytochrom-P450 Enzyme trotz ihrer besonderen Moleküleigenschaften in einem Fremdorganismus zur Expression zu bringen, scheinen eukaryotische Zellen darzustellen. Eine Möglichkeit wäre die Expression in Säugerzellen. Diese bieten all die genannten Vorteile, die ein eukaryotisches Expressionssystem erfordert. Nachteilig ist jedoch die aufwendige und kostenintensive Kultivierung (z.B.:CO<sub>2</sub>-Begasung). Die Wahl ist daher auf *sf9*-Insektzellen von *Spodoptera frugiperda* gefallen. Für die benötigten Zwecke bieten sie die gleichen Vorteile, bedürfen jedoch nicht der aufwendigen Kultivierung der Säugerzellen.

Als Expressionsvektor dient der modifizierte Baculovirus. Er leitet sich ab vom *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV). Das zu exprimierende Gen wird hinter und damit unter der Kontrolle des sehr leistungsfähigen Polyhedrin-Promotors einkloniert. Die Größe des AcNPV liegt mit 130 kb in einem Bereich, der für molekularbiologische Aufgaben schlecht zu bearbeiten ist. Aus diesem Grund verläuft die Konstruktion eines rekombinanten Baculovirus in zwei Schritten (Details siehe IV2.2, S.71 und IV2.3, S.72).

Das Gene Of Interest (GOI) wird in einen Transfer-Vektor eingebaut. In einer seitenspezifischen Transposition wird die Expressions-Kassette durch die auf dem Helferplasmid codierte Transposase in die Bacmid-DNA eingefügt und so der rekombinante Baculovirus als Expressionsvektor fertig gestellt. Das Insektenzellsystem weist keine solche Diversität bezüglich der Wirtszellen



auf, wie das bei Bakterien oder Hefen der Fall ist. Das bedeutet, dass das System keine Besonderheiten bezüglich verschiedener Insektenzellstämme oder zahlreicher verschiedener Expressionsvektoren besitzt. Hauptsächlich sind 3 verschiedene Expressionsvektoren in Verwendung. pFASTBAC1 ist ein Transfer-Vektor, der eine MCS, einen Polyhedrin-Promotor, eine Ampicillin- und eine Gentamycin-Resistenz codiert. Die Mini-Tn7-Stelle ist die Erkennungs- und Schneidesequenz für die seitenspezifische Transpositionsreaktion. Der Vektor wird bei der Expression von Cytochrom P450-Enzymen sehr oft eingesetzt. Sowohl pflanzliche (JENNEWAIN S(b) *et al*, 2004), tierische (LEE S UND BUHLER D, 2002) als auch Insekten- (SASABEA M *et al*, 2004) Cytochrom P450-Enzyme können damit exprimiert werden.

Der Vektor pFASTBACHT verfügt über die gleiche genetische Ausstattung wie der pFASTBAC1-Vektor, nur dass zusätzlich ein His-Tag dem Exprimat angefügt wird, der die Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Der Vektor pFastBacDUAL weist dagegen bei ansonsten wieder gleicher Ausstattung zwei Promotoren und zwei MCS auf. Ein Promotor ist der Polyhedrinpromotor, der andere ist der *p10*-Promotor. Dieser Vektor ist für die Expression eines Fusionsproteins gedacht (KAUFMANN B, 2001). Der Vorteil bei der Expression eines Fusionsproteines, ist die direkte räumliche Nähe der beiden verbundenen Proteine. Denkbar wäre hierbei die Expression eines P450 mit entsprechender CPR.

Ebenfalls möglich ist die Coexpression von ein und derselben Insektenzellkultur durch zwei oder mehr unterschiedliche rekombinante Baculoviren. So wird eine Zellkulturflasche mit zwei rekombinanten Baculoviren co-transfiziert, so dass die Insektenzellen beide rekombinanten Proteine nebeneinander exprimieren (MCDONNELL C *et al*, 2004). Auch hier liegt der Vorteil wieder in der räumlichen Nähe der exprimierten Enzyme (siehe unten).

### 2.3 Testung des Klons P4 im Insektenzellsystem

RUPPERT M exprimiert die Vollängenklone P1, P2, P3 und P5 in den Insektenzellen, doch konnte auch hier keine VH-Aktivität detektiert werden. Ebenso brachten die Expressionsmuster in der SDS-PAGE Analyse keine nennenswerten Ergebnisse (unveröffentlichte Daten).

Übrig blieb noch, den Klon P4 auf VH-Aktivität hin zu prüfen. Nachdem RUPPERT M die genannten P450-Klone auf VH-Aktivität getestet hatte und zu keinem Ergebnis gekommen war, wurde das Insektenzellsystem auf die Tauglichkeit bezüglich der VH-Expression hin untersucht. Dabei stellte RUPPERT M fest, dass die Insektenzellen das Substrat Vinorin deacetylieren und so dem eigentlichen Assay entziehen. Daher war eine heterologe Expression der Vinorin-Hydroxylase in Insektenzellen nicht erfolgversprechend. Wie unter 2.1, S. 114 schon erörtert, geben die Homologiestudien Anlass zu der Annahme, dass der P450-Klon P4 der Klasse der Cinnamoyl-Hydroxylasen zuzuordnen ist. Das zusätzliche Fehlschlagen des VH-Aktivitätstests untermauert diese Vermutung. Endgültige Sicherheit ist jedoch erst gegeben, wenn das rekombinante Protein eine Umsetzung von Zimtsäure zu p-Coumarsäure katalysiert.

Es musste ein Assay aufgebaut werden, der die Trennung von Substrat und Produkt mittels HPLC ermöglicht. Der HPLC-Lauf wurde nach einem Versuchsaufbau von GERASIMENKO I *et al* (2001) modifiziert und die Inkubationen stark abgewandelt nach OVERKAMP S *et al* (2000) durchgeführt. Ergebnis beider Modifikationen ist der vorliegende Assay (siehe III.2.3, S. 46). Das putative Cinnamoyl-Hydroxylase-Gen wurde erneut unter den Bedingungen von IV.2.4, S. 75 mit dem Insektenzellsystem exprimiert. Wie schon detailliert erläutert, wird sämtlichen Ansätzen eine Hemin-Lösung zugegeben (CHEN L *et al*, 1997). Das Hemin gewährleistet die Vermeidung eines Grundkörpermangels beim Aufbau des Häm-Proteins, das als die funktionell zentrale Struktur der Cytochrom P450-Enzyme anzusehen ist.

Das exprimierte Protein wird in Form von Mikrosomen isoliert und auf Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität überprüft. Das Ergebnis ist positiv, der Klon P4 zeigt eindeutig den Umsatz von Zimtsäure zur p-Coumarsäure.

Die höchste Aktivität weisen die Mikrosomen aus den T<sub>30</sub>-Kulturen auf. Bei den Mikrosomen aus den Insektenzellen zeigen sich folgende interessante Phänomene:

- Der Klon P4 alleine, also ohne zusätzlich exprimierte Cytochrom P450-Reduktase, zeigt eindeutig eine Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität unter Verbrauch von NADPH. Die *sf9*-Insektenzellen verfügen ebenfalls über NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen. Die Expression

ist damit prinzipiell ohne die Coexpression einer NADPH-Cytochrom P450 Reduktase möglich. Nachteil bei diesem Verfahren ist jedoch, dass nur eine genau definierte Viruslast zur Infektion notwendig ist. Ist die Virus-Dichte zu gering, wird zu wenig rekombinantes Protein exprimiert. Bei zu hoher Virusdichte resultiert eine Abnahme der Aktivität des exprimierten P450 (WEN Z *et al*, 2003). Es ist deshalb anzuraten, direkt eine Co-Expression mit der erforderlichen P450-Reduktase durchzuführen.

- Die Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität nimmt zu, wenn eine Coexpression von P4 und Cytochrom P450-Reduktase stattgefunden hat (siehe IV2.4, S. 75). Die räumliche Nähe der Cytochrom P450-Reduktase zur Cinnamoyl-Hydroxylase scheint sich positiv auf das Umsetzungsverhalten auszuwirken. Bei Inkubationen, bei denen getrennt exprimierte Proben von P4 und CPR erst kurz vor der Inkubation vereinigt werden, zeigt sich kein Unterschied zu der Inkubation von „P4 alleine“, also ohne CPR-Expression. Nur bei der Coexpression kann die deutliche Aktivitätssteigerung detektiert werden. Möglicherweise bilden die co-exprimierten Proteine im Rahmen des Zellaufschlusses Molekülverbände, in denen CPR und P4 nebeneinander auf einem Mikrosom vorliegen.
- Zum Vergleich zeigt die Cytochrom P450-Reduktase ohne P4 keine Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität.

Die Co-Expression der Cytochrom P450-Reduktase aus *Rauvolfia serpentina* mit P4 zeigt, dass die Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität auf diese Weise um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Schon CHEN L *et al* zeigte 1997, dass die unter Verwendung des Baculovirussystems detektierte Aktivität eines Cytochrom P450-Enzyms alleine geringer ist als bei Co-Expression mit einer entsprechenden Cytochrom P450-Reduktase.

Trotzdem besteht auch die Möglichkeit, dass die *sf9*-Zellen-eigene NADPH Cytochrom P450-Reduktase nicht mit dem heterolog exprimierten P450 kompatibel ist und somit dann keine Aktivität zu verzeichnen ist (DUAN H *et al*, 2004).

Abschliessend lässt sich feststellen, dass das *sf9*-Insektenzellsystem in Verbindung mit dem Baculovirus als Expressionsvektor für P450-Enzyme voll

funktionstüchtig ist. Die exprimierte Cinnamoyl-Hydroxylase könnte nun als positiv-Kontrolle bei erneuter Durchführung von Expressionsexperimenten dienen, die auf eine Identifizierung von weiteren Cytochrom P450-Klonen abzielen. Zudem ist die Erforschung des Baculovirus-Systems in Verbindung mit Insektenzellen weiterhin aktuell (Li X *et al*, 2004). In Zukunft können deshalb möglicherweise neue Erkenntnisse in die weitere Gestaltung des vorhandenen Systems einfließen.

### **3 Die putative Reduktase**

Wie schon unter IV3, S. 79 erläutert, ist ein Teil des Klons der unbekanntes Reduktase beim Homology Cloning Projekt isoliert worden. Ziel des Projektes war es, die cDNA wichtiger Cytochrom P450-Enzyme aus *Rauvolfia serpentina* zu isolieren, im speziellen die der Vinorin-Hydroxylase. Zu diesem Zweck wurde versucht, mittels RACE-PCR und degenerierten Primern an Vollängenklone von Cytochrom P450-Enzymen zu gelangen. Durch die unspezifische Bindung eines der degenerierten Primer wurde der Teil eines Klons ermittelt, der mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht für ein Cytochrom P450-Enzym codiert. Dieser Klon wurde mittels RACE-PCR vervollständigt.

#### **3.1 Homologie-Studien zur „Unbekannten Reduktase“**

Zunächst wurde versucht, den gefundenen Klon durch Datenbankvergleiche zu identifizieren. Daraus folgende Homologiestudien (siehe III4.3, NCBI, S. 63 und III4.2, ClustalW, S. 62) zeigen, dass eine erhöhte Homologie zu verschiedenen Reduktasen besteht. Auch bei diesen Homologie-Vergleichen werden sehr viele homologe Sequenzen angezeigt, die nur putativer Natur sind. Wie bei der Cinnamoyl-Hydroxylase, wurde auch hier eine Auswahl getroffen, die sich auf eindeutig identifizierte Enzyme beschränkt. Hier sind die Homologien allerdings nicht wie bei der Cinnamoyl-Hydroxylase auf genau diese Enzymklasse beschränkt, sondern erstrecken sich auf verschieden spezialisierte Reduktasen.

Tabelle 34: Homologie zur "Putativen Reduktase"

Stammpflanze	Vertreter	Homologie (Identität) zum Klon der putativen Reduktase	Veröffentlichung
<i>Medicago sativa</i> AC AAC35846	Cinnamyl-Alkohol Dehydrogenase	51% (47%)	BRILL E (1999)
<i>Fragaria x Ananassa cv</i> AC AAK28509	Alcohol Dehydrogenase	51% (46%)	BLANCO-PORTALES R (2002)
<i>Petroselinum crispum</i> AC CAA48028	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	51% (45%)	KIEDROWSKI S (1992)
<i>Populus tremuloides</i> AC AAK58693	Sinapyl Alkohol Dehydrogenase	50% (45%)	LI L (2001)
<i>Lolium perenne</i> AC AAL99536	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	49% (45%)	LYNCH D (2000)
<i>Solanum tuberosum</i> AC CAD29291	Alcohol-NADP+ Oxidoreductase	49% (44%)	MONTESANO M (2003)
<i>Pinus taeda</i> AC CAA86072	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	48% (43%)	MACKAY J (1995)
<i>Apium graveolens</i> AC AAC15467	Mannitol Dehydrogenase	48% (42%)	WILLIAMSON J (1995)
<i>Pinus radiata</i> AC Q40976	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	47% (42%)	WAGNER A (1996)
<i>Picea abies</i> AC CAA05095	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	47% (41%)	SCHUBERT R (1998)
<i>Populus deltoides</i> AC P31657	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase	45% (40%)	VAN DOORSSELAERE J (1995)

Die Homologien zu den oben aufgeführten Reduktasen und das Alignment (siehe Abbildung 28, S. 126) führen zu der Vermutung, dass der vorliegende Klon für eine Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase codiert. Die Sequenz **G-X-G-X-X-G (rot)** ist auch ein typisches Strukturmerkmal für einen Vertreter der mittelkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (MDR-Familie). Diese Struktur ist für die NAD-Bindung verantwortlich (WIERENGA R *et al*, 1985). Das unten

aufgeführte Alignment zeigt einen Sequenzvergleich der in Tabelle 34 aufgeführten Gene, die für die zugehörigen Enzyme aus der jeweiligen Pflanze codieren.

Abbildung 28: Alignment des gefundenen putativen Reduktase-Klons mit elf weiteren Reduktasen unterschiedlicher Herkunft (vgl. Tabelle 34, S. 125).

**Erläuterungen:** Die aufgeführten Sequenzen gehören zu den in Tabelle 34, S. 106 aufgeführten Pflanzenvertretern und erklären sich auch an Hand der Tabelle. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Ein konservierter Austausch ist durch einen Doppelpunkt (:) markiert und ein halbkonservierter Austausch wird durch einen Punkt (.) angezeigt. Die farbigen Markierung erklären sich aus dem obigen Text.

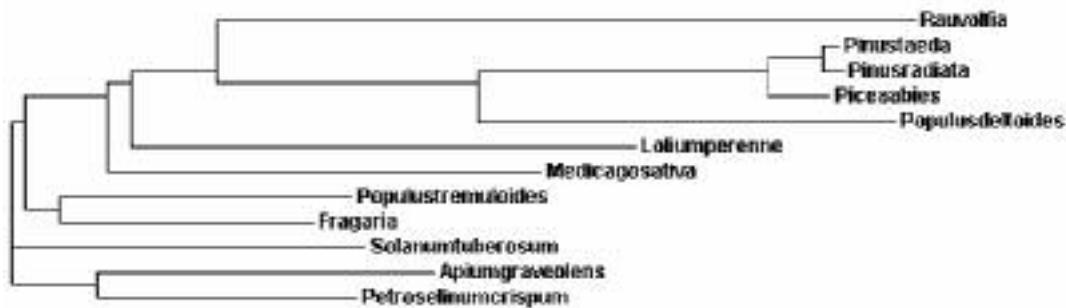
Apiumgraveolens	-----MAKSSEIEHPVKAFGWAARDTTGLLSPFKFSR-RATGEKDVRLKVLFCGVCCHSDH	54
Petroselinumcrispum	-----LSPFKFSR-RATGDNDRFKVLYCGVCHSDL	31
Solanumtuberosum	-----MAKSSENEHPKAFGWATRHTSGVLSPPFNFSR-RVTGEKHVQFKVMYCGICHSDL	54
Populustremuloides	-----MSKSPPEEHPVKAFGWAARDQSGHLSPPFNFSR-RATGEEDVRFKVLVYCGVCHSDL	54
Fragaria	-----MSIEQEHPNKASGWAARDSSGVLSPFNFSR-RETGEKDMFKVLYCGICHSDH	52
Medicagosativa	-----MAKSPETELPLKAFGWAARDTSGTLLSPFHFSR-RENGDDDDSVKILLYCGVCHSDL	54
Loliumperenne	MAPTAAEQTEHHQHTRKAVGLAARD DAGHLSPLAITR-RSTGDDDDVVIKILLYCGICHSDL	59
Pinustaeda	-----MGSLESEK--TVTGYAARDSSGHLSPYTYNL-RKKGPEDEVIVKVIYCGICHSDL	51
Pinusradiata	-----MGSLETEK--TVTGYAARDSSGHLSPYTYNL-RKKGPEDEVIVKVIYCGICHSDL	51
Piceaabies	-----MGSLESEK--TVTGYAARDSSGHLSPYTYTL-RNKGPEDEVIVRVIYCGICHSDL	51
Populusdeltoides	-----MGSLETER--KIVGWAATDSTGHLAPYTYSL-RDTGPEDEVFKVILSCGVCHTDI	51
Rauvolfia	-----MSTLSVDE--DCLSWAARDSSGVLSPYKFSRSRVIGADDVDIKIAFCGVCYADV	52
	: . . . . . : : . * : * . : * * . . . : : * * : * : *	
Apiumgraveolens	HMIHNNWGFTTYPIVPGHEIVGVVTEVGSKVEKFKVGDVNGIGCLVGSRCSCESCDDNRE	114
Petroselinumcrispum	HMVKNEWGMTTYPVPGHEIVGRVTEVGSKVEKFKVGDVAVGVGCLVGSCLSCENCDDDDSE	91
Solanumtuberosum	HQLKNEWGNTKYPMPVPGHEVGVVIEVGSKVEKFKVGDVGVGCMVGSRCRCENCTVDLE	114
Populustremuloides	HSIKNDWGFSTYPLVPGHEIVGEVTEVGSKVKVNVVGDVGVGCLVGSACHSCESCANDLE	114
Fragaria	HMVKNEWGFSTYPLVPGHEIVGEVTEVGSKVKVQKFKVGDVGVGCVIGSRSRSCENCETHLE	112
Medicagosativa	HTLKNWGFTTYPVVPGHEIVGVVTKVGINVVKFRVGDVGVGVIIVESCQTCENCNQDLE	114
Loliumperenne	HALKNDWKNSTRYPMPVPGHEIAGEVTEVGNVSKFKAGDRVGVGCMVNSCRSCESCDCXGFE	119
Pinustaeda	VQMRNEMGMSHYPMVPGHEVGVVTEIGSEVKKFKVGEHVGVGCVIGSRSRSCGNCSME	111
Pinusradiata	VQMRNEMGMSHYPMVPGHEVGVVTEIGSEVKKFKVGEHVGVGCVIGSRSRSCGNCSME	111
Piceaabies	VQMRNEMGMSNYPMVPGHEVGVVTEIGSEVKKFKVGEHVGVGCVIGSRSRSCGNCSME	111
Populusdeltoides	HQIKNDLGMESHYPMVPGHEVGVVTEVGSVTRFKVGDVGVGVIIVGSCKNCHPCXSEIE	111
Rauvolfia	VWSRNILGTTKYPLVPGHEIVGVVTEVGNVQRFKVGVDVGVGVTYVGSRCRQCCDDGLE	112
	: * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Apiumgraveolens	SHCENTIDTYGSIYFDGTMTHGGYSDTMVADEHFILRWPKNPLDLSGAPLLCAGITTYSP	174
Petroselinumcrispum	NNCAKQVQTYAFNTVDGSIYGGYADSMVADQHFVLRWPNLPLDLSGAPLLCAGITTYSP	151
Solanumtuberosum	NYCPRQIPTYNGYSLDGTLLTFGGYSDMMVSDHEFVVRWPNLSMDA-APLLCAGITTYSP	173
Populustremuloides	NYCPKMLTYAS IYHDGTITTYGGYS DHMVANERY IIRFPDNMPLDGGAPLLCAGITTYSP	174
Fragaria	NYCPKQILTYGANYYDGTITTYGGCSDIMVAHEHFVVRIPDNLPLDGAAPLLCAGITTYSP	172
Medicagosativa	QYCPKPVFTYNSP-YKGRTRYGGYSDFVVVHQRYVVQFPDNLPLDAGAPLLCAGITTYSP	173
Loliumperenne	NHCPGMLTYNSVDVGTVTYGGYSMVVVERFVVRFPDAMPDLKAPLLCAGITTYSP	179
Pinustaeda	QYCSKR IWTYNDVNHGDTPTQGGFASSMVVDQMFVVRIPENLPLEQAAPLLCAGVTVFSP	171
Pinusradiata	QYCSKR IWTYNDVNHGDTPTQGGFASSMVVDQMFVVRIPENLPLEQAAPLLCAGVTVFSP	171
Piceaabies	QYCSKR IWTYNDVNHGDTPTQGGFASSMVVDQMFVVRIPENLPLEQAAPLLCAGVTVFSP	171
Populusdeltoides	QYCNKKIWSYNDVYTDGKPTQGGFAESMVVHQKFFVVRIPDGMSPQQAAPLLCAGLTVYSP	171
Rauvolfia	VHCSEVVLTFDGLDVGTVTKGGYS SHIVVHERYCFRIPDNYPLALAAPLLCAGITTYPT	172
	* : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Apiumgraveolens	LKYYGLDKPGTKIGVVGGLGLGHVAVRMAKAFGAQVTVIDISESKRKEALEKLGADSFLL	234
Petroselinumcrispum	LRYPGLDKPGTKIGVVGGLGLGHVAVRMAKAFGAHVTVISTSESKKQEALEKLGADSFLL	211
Solanumtuberosum	LKYFGLDKPGMHIGVVGGLGLGHMAVKFAKAFGTVTVISTSANKKQEAIERLGADSFLL	233
Populustremuloides	LKYFGLDEPGKHIGIVGGLGLGHVAVRFAKAFGSKVTVISTSPSKKEEALKNFADSFLL	234
Fragaria	LRYPGLDKPGMHIGVVGGLGLGHVAVRFAKAMGVKTVISTSPKKEEALKHLAGDSFLL	232
Medicagosativa	MKYGMTEPGKHLGVAGLGLGLGHVAIKFGKAFGLKVTVISTSPNKETEALDKLGADSFLL	233
Loliumperenne	MKYHGLNVPGLHLGVVGLGLGLGHVAVRFGKAFGMKVTVISTSPGKKEEALGRLGADAFIV	239
Pinustaeda	MKHFAMTEPGKCGIILGLGVGHLGVKIAKAFGLHVTVISTSDKKEEAMEVLGADAYLV	231
Pinusradiata	MKHFAMTEPGKCGIILGLGVGHLGVKIAKAFGLHVTVISTSDKKEEAMEVLGADAYLV	231
Piceaabies	MKHFAMTEPGKCGIILGLGVGHLGVKIAKAFGLHVTVISTSDKKEEAMEVLGADAYLV	231
Populusdeltoides	LKHFGKQSGLRGGIILGLGVGHLGVKIAKAMGHVTVISTSDKKEEAMEHLGADAYLV	231
Rauvolfia	MMRHNMNQPGLSLGIVLGLGLGHLAVRFGKALGLKVTVISTSKRDDALNLLGADNFVV	232
	: . . . . . * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	



Apiumgraveolens	NSDQEQMKGARSSLDGI IDTVPVNHPLAPLFDLLKPNGKLVVMGAPKPELFPVFSLLKG	294
Petroselinumcrispum	SSDSQMQAATGTLHGI IDTVSALHPVVPLLGLLKVNGKLVVMGAPKPELFPVFPPLMG	271
Solanumtuberosum	SRDPEQMKAAMNTLDGI IDTVSAVHPILPLMLMKS HGKLVVMGAPKPELFPVFPPLMG	293
Populustremuloides	SRDQEQMQAAGTLDGI IDTVSAVHPLLPLFGLLKS HGKLI LVGAPKPELFPFSLIAG	294
Fragaria	SRDQDHMQAAIGTMDGI IDTVSAQHPLPLIGLLKSHGKLVVMGAPKPELFPVFPPLMG	292
Medicagosativa	SKDPEKMKAAAMGTMDYI IDTISAHSLMPLLGLLKLNGKLVTVGLPSKPELFSVPLVAG	293
Loliumperenne	SKDAEMKAVMSTMDGI INTVSANIPLTPLFGLLKPNGKLMVGLPEKPIEIPFPALVAT	299
Pinustaeda	SKDTEKMMAAESLDYIMDTIPVAHPLEPYLALLKTNGKLVMLGVVPEPLHFVTPPLIIG	291
Pinusradiata	SKDTEKMMAEAESLDYIMDTIPVAHPLEPYLALLKTNGKLVMLGVVPEPLHFVTPPLIIG	291
Piceaabies	SKDAEKMQEAAESLDYIMDTIPVAHPLEPYLALLKTNGKLVMLGVVPEPLHFVTPPLIIG	291
Populusdeltooides	SSDVESMQKAADQLDYI IDTVPVHHPLEPYLALLKLDGKLI LMGVINAPLQFVTPMVMIG	291
Rauvolfia	SSGEQQMRLAKSLDFI INSTSAEFPDPYLSLLKTAGILVLGAG-REVKFSPGSLIMG	291
	. . : * . . * : . : * : . . * : * * * * : . : . . : . . :	
Apiumgraveolens	RKLLGGTINGGIKETQEMLDFAAKHNITADVEVIPMDYVNTAMERLVKSDVRYRFVIDIA	354
Petroselinumcrispum	RKVLAGSNIIGLKETQEMLDFAAQHNITADVEVIPVDYVNTAMERLVKSDVRYRFVIDVA	331
Solanumtuberosum	RKLVAGSICIGGMKETQEMLDFAAKHNITPDIEVVPMDYVNTALERLLKSDVRYRFVLDIG	353
Populustremuloides	RKIVAGSGIGGMKETQEMIDFAAKHNITADIEVISTDYLNNTAMERLAKNDVRYRFVIDVG	354
Fragaria	RKMVAGSGIGGMKETQEMIDFAAKHNITADIEVIPIDYLNNTAMERLVKADVRYRFVIDIG	352
Medicagosativa	RKLIIGSNIIGGMKETQEMLDPCGKHNTADIELIKMHEINTAMERLHKADVRYRFVIDVA	353
Loliumperenne	NKTLAGSIIGGMSDTQEMLDLAAKHGVTADIEVVGAEYVNTALERLAKNDVRYRFVIDIG	359
Pinustaeda	RRSIAGSFIGSMEETQETLDFCAEKKVSSMIEVVGLDYINTAMERLEKNDVRYRFVVDVA	351
Pinusradiata	RRSIAGSFIGSMEETQETLDFCAEKKVSSMIEVVGLDYINTAMERLEKNDVRYRFVVDVA	351
Piceaabies	RRSIAGSFIGSMEETQETLDFCAEKKVSSMIEVVGLDYINTAMERLVKNDVRYRFVVDVA	351
Populusdeltooides	RKSIAGSFIGSMKETEEMLEFCCKEKGVASMIEVVKMDYINTAFERLEKNDVRYRFVVDVA	351
Rauvolfia	MKTISSSATGGTKQTQEMLEFCASHKIYPEIEIIPIQSNEALERMINKDVRYRFVIDVA	351
	: : * : * . : * : * : . . : . . : * : . . * * : * : * : * : * : * : * :	
Apiumgraveolens	NTMRTEESLGA	365
Petroselinumcrispum	NTIKTE-----	337
Solanumtuberosum	NTLNKK-----	359
Populustremuloides	NTLAATKP---	362
Fragaria	NTLKASS----	359
Medicagosativa	NSFSSL-----	359
Loliumperenne	NTLDNVAATTE	370
Pinustaeda	GSELDN-----	357
Pinusradiata	GSKLDN-----	357
Piceaabies	RSNLDK-----	357
Populusdeltooides	GSKLIH-----	357
Rauvolfia	NSLK-----	355
	:	

Das Alignment der verschiedenen Sequenzen ermöglicht einen Blick auf die evolutionsbiologische Herkunft der verglichenen Enzyme. Eine deutlichere Darstellung ist der Phylogenetische Baum in Form eines Abstandsbaumes. In Abbildung 29, S. 127 werden die Verwandtschaftsgrade der verglichenen Pflanzengene noch einmal in Form eines Diagramms verdeutlicht.

Abbildung 29: Phylogenetische Baum aus den Sequenzen der unbekannt putativen Reduktase und der restlichen damit verglichenen Reduktasen.



### 3.2 Funktion der „Unbekannten Putativen Reduktase“

In der Biosynthese des Ajmalins standen zum Zeitpunkt der Bearbeitung dieses Klons noch verschiedene Reduktasen zur heterologen Expression und der damit verbundenen Charakterisierung aus. (Vomilenin-Reduktase

und die *1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase*, beide aus dem Hauptweg der Biosynthese des Ajmalins; *Cathenamin-Reduktase*, *Perakin-Reduktase*, letztere aus einem Seitenweg der Ajmalin-Biosynthese). Aus diesem Grund hat die Testung des neuen Klons als ein potentieller Anwärter für eine der gesuchten Reduktasen erste Priorität. Inzwischen ist die Aufklärung der Perakin-Reduktase schon entscheidend vorangeschritten: ROSENTHAL C hat die Perakin-Reduktase heterolog in *E. coli* exprimiert und teilweise charakterisiert (unveröffentlichte Daten).

Der unbekannte Klon wird in pQE60 inkloniert. Dieser Vektor ermöglicht eine schnelle Reinigung des Exprimates über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, da ein Fusionsprotein resultiert, das aus dem exprimierten GOI und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag besteht (*R(+)*His). Trotzdem kann durch den gezielten Einbau eines Stop-Codons die Expression des (His)<sub>6</sub>-Tag unterbunden werden (*R(-)*His). Das kann notwendig sein, wenn der (His)<sub>6</sub>-Tag in der Nähe der Substrat- oder Co-Substrat-Bindestelle liegt und aus sterischen Gründen die enzymatische Reaktion beeinträchtigt.

Der pQE60-Vektor wird mit dem GOI in den jeweiligen Modifikationen (siehe IV3.2, S. 81) in M15 *E. coli* exprimiert. Die M15 Zellen weisen das zusätzliche Helferplasmid *pREP4* auf, das durch Zugabe von IPTG an der Blockierung des potenten T5-Promotors durch Produktion des *Lac*-Repressor-Proteins konzentrationsabhängig gehindert wird. Die Expression des GOI kann also mit IPTG induziert werden.

Die Aktivitätstests der (*R(-)*His) auf die unterschiedlichen Reduktase-Aktivitäten (siehe oben und III2.1, S. 40) hin fallen alle negativ aus. Es ist kein Unterschied zwischen der Expression mit (His)<sub>6</sub>-Tag und ohne (His)<sub>6</sub>-Tag zu verzeichnen. Daher sollte eine potentielle sterische Beeinträchtigung der Substrat- oder Co-Substrat-Bindestelle bedingt durch den (His)<sub>6</sub>-Tag ausgeschlossen werden können.

Sollte der gefundene Klon überhaupt für eine der vermuteten Reduktasen codieren, so sollte eigentlich die gesuchte Aktivität schon im Rohextrakt zu verzeichnen sein. Möglich ist natürlich, dass die Aktivität zu gering oder die Stabilität des exprimierten Enzyms im Rohextrakt nicht gesichert ist oder die Expression nicht ausreicht. Ein Grund dafür könnte die am Anfang des



Proteins modifizierte Base (Austausch von Serin durch Alanin, siehe IV3.2, S. 81) sein. Der Austausch einer Aminosäure kann das Aktivitätsprofil eines Enzyms maßgeblich beeinflussen.

Die Analyse der SDS-PAGE-Gele gab auch keinen Aufschluss über ein eindeutig überexprimiertes Protein. Daher liegt natürlich der Schluss nahe, dass schon bei der Expression Fehler auftreten, die die erfolgreiche Gewinnung eines rekombinanten aktiven Proteins erschweren.

Die Aufreinigung des R(+)His mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie müsste eigentlich mehr Aufschluss über die Eigenschaften des Exprimates geben. Doch die Reinigung fällt ebenfalls negativ aus. Die Ni-NTA-Matrix vermag es nicht, das exprimierte Protein zu binden und so einen Reinigungseffekt und damit die genauere Charakterisierung zu ermöglichen. Möglicherweise ist der (His)<sub>6</sub>-Tag durch restliche Molekülstrukturen des Enzyms verdeckt, wodurch die Bindung sterisch verhindert würde. Die Testung des Eluats ergibt in mehreren Fraktionen einen erhöhten Proteingehalt, doch zeigen auch diese Proben keine der gesuchten Reduktase-Aktivitäten. Ebenso zeigt die SDS-PAGE wieder keine überhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle, obwohl dies eigentlich bei IPTG-Induktion zu erwarten wäre. Möglicherweise ist der gewählte Vektor nicht optimal für die Reduktase.

Für zukünftige Untersuchungen sollte der Klon in einen anderen Vektor umkloniert werden. Es wurden bereits Primer entwickelt (siehe Anhang), die eine Einklonierung des Reduktase-Klons nach der Amplifizierung in den pQE2-Vektor gestatten. Das gäbe die Gelegenheit, einen Vektor zu benutzen, der keine Modifizierung der Anfangssequenzen vornimmt und zudem die Chance bietet, später den N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag abzuschneiden.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Vektors der die Reinigung über einen Chitin-Tag ermöglicht (Strictosidin-Glucosidase aus *Rauvolfia serpentina*, GERASIMENKO I *et al*, 2002). Außerdem könnte der gefundene Klon wirklich für eine Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase codieren. Dies müsste anhand eines spezifischen Aktivitätstests überprüft werden.

#### **4 *In planta* Expression mit Hilfe des rekombinanten Tobacco Mosaic Virus in *Nicotiana benthamiana***

Die Identifizierung der Vinorin-Hydroxylase steht trotz der Testung verschiedener Expressionssysteme noch immer aus. Weder in *E. coli* noch in Insektenzellen ist es möglich die verschiedenen durch RUPPERT und im Projekt Homology Cloning isolierten Cytochrom P450-Klone zu exprimieren und eine VH-Aktivität zu detektieren. Die Gründe dafür können vielfältiger Art sein. Bei der Testung eines jeden Systems sind viele unterschiedliche Lösungsansätze abgearbeitet worden, um das jeweilige System zu optimieren. Zwar funktionieren die vorhandenen Expressionssysteme nachweislich mit P450s, doch leider bisher ohne die Detektion einer VH-Aktivität.

Das war Grund genug, ein Expressionssystem auszuwählen, das der Expression der VH in ihrer nativen Umgebung näher kommt als das bisher der Fall war. Die heterologe Expression in einer Pflanze bietet hier verschiedene Vorteile. Die augenscheinlich trivialsten Gründe, die für ein pflanzliches System sprechen, sind erstens die Abwesenheit tierischer Pathogene. Andererseits kann die Ausbeute, bezogen auf das Feuchtgewicht, beträchtlich höher sein, als bei Systemen, die auf tierischen Zelllinien beruhen (LUNDBLAD R UND KINGDON H, 1999).

Ungleich wichtiger ist die Tatsache, dass das zu exprimierende Protein in der nahezu gleichen Umgebung wie in der Original-Pflanze zur Expression gebracht werden kann. Die folgende Passage durch diverse subzelluläre Kompartimente und Organellen bis zum eigentlichen Bestimmungsort erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass notwendige posttranslationale Modifikationen am jeweiligen Protein stattfinden. So ist die Wahrscheinlichkeit, ein aktives Enzym zu erlangen auf jeden Fall höher, zumindest im Vergleich zu den bisher genutzten Expressionssystemen.

Es gibt bei pflanzlichen Expressionssystemen zwei Plattformen: transgene Pflanzen und die ursprünglich von Pflanzen-Viren abgeleiteten Vektoren. Transgene Pflanzen bedürfen als gentechnologische Modifikation des Wildtyps längerer Zeiten, bis stabile Samen-Linien vorhanden sind. Zudem gibt es häufig Schwierigkeiten bei der Konstanz der Expression. Verursacht wird dies durch *gene silencing* (VAUCHERET H, 1998) (FINNEGAN J UND McELROY D, 1994) oder den Mangel an zuverlässiger genetischer Präsenz der modifizierten genetischen Information. Es dauert in der Regel circa 14 Monate eine „vollwertige“, also stabile transgene Pflanze zu generieren.

Eine Alternative ist die Anwendung von transienten Expressionssystemen. Die Infektion mit dem *Agrobacterium tumefaciens* ist eine solche Möglichkeit. Das Ti-Plasmid des *Agrobacterium*s kann modifiziert werden und diese genetische Information wird im Rahmen einer *Agrobacterium*-Infiltration in das Genom der infiltrierten Pflanzen eingebaut und exprimiert (MORI S *et al*, 2004). Nachteil dabei ist, dass die Expression schon nach spätestens zwei bis drei Tagen zum Erliegen kommt, was an der natürlichen Abwehr der Pflanze gegen den „Eindringling“ liegt. Dies ist auch eine Folge des *gene silencing* und kann mit Hilfe eines zusätzlichen rekombinanten Pflanzenvirus zurück gedrängt werden. Dieser exprimiert ein Protein, das diesen Effekt unterdrückt (VOINNET O *et al*, 2003).

Nahezu unbeeinflusst von *gene silencing* ist die Verwendung von transienten Systemen, die vollständig auf Pflanzen-Viren aufbauen (MARILLONNET S *et al*, 2004) und nicht die Integration des Gene Of Interest in das Wirtsgenom durch das Ti-Plasmid des Agrobakteriums nutzen. Es wurden pflanzliche RNA-Virus-Vektoren entwickelt, die das zu exprimierende Gen zusätzlich zu allen benötigten viralen Genen enthalten (DONSON J, 1991). Diese Vektoren können sich mit dem eingefügten fremden Gen in der Wirtspflanze systemisch bewegen. Für Vektoren, die auf Viren basieren, die subgenomische mRNA benutzen um Gene zu exprimieren, kann die Fähigkeit, sich in der Pflanze zu bewegen, generell durch einen zusätzlichen subgenomischen Promotor erreicht werden (CHAPMAN S *et al*, 1992). Auch wurden Vektoren entwickelt, die aus der Poty- und Clostero-Gruppe stammen und bei denen das GOI in eine Polyprotein-Sequenz eingesetzt wird. Sie weist zusätzliche Schnittstellen auf, um das angrenzende

exprimierte Protein mittels Proteinasen auszuschneiden (HAGIWARA Y *et al*, 1999).

**Tabelle 35: Übersicht verschiedener Vektoren auf der Basis von Pflanzen-Viren**

Virus Gruppe	Virus	Referenz
Tobamovirus	TMV	(SUGIYAMA Y <i>et al</i> , 1995) (TURPEN T <i>et al</i> , 1995)
Potyvirus	TEV	(ARAZI T <i>et al</i> , 2001) (Choi I <i>et al</i> , 2000)
Potex	PVX	(Toth R <i>et al</i> , 2001)
Tombusvirus	TBSV	(SCHOLTHOF H, 1999)
Alfamovirus	AIMV	(SANCHEZ-NAVARRO J <i>et al</i> , 2001)
Cloistrovirus	BYV	(PEREMYSLOV V <i>et al</i> , 1999)

**Erläuterungen zur Tabelle:** Die aufgeführten Viren sind alle in modifizierter Form als Expressionsvektor verwendet worden, wie aus der jeweils beigefügten Literaturstelle zu entnehmen ist. **Abkürzungen:** Tobacco Mosaic Virus (**TMV**), Tobacco Etch Virus (**TEV**), Potatoe Virus X (**PVX**), Tomato Bushy Stunt Virus (**TBSV**), Alfalfa Mosaic Virus (**AIMV**), Beet Yellows Virus (**BYV**)

Wie aus Tabelle 35, S. 132 ersichtlich, gibt es eine Vielzahl potentieller Pflanzen-Viren, die prinzipiell als Expressionsvektoren einsetzbar sind. Ein Großteil davon hat jedoch nur Ausnahmecharakter, wohingegen der rekombinante TMV seit geraumer Zeit vermehrt als Expressionsvektor eingesetzt wird (TURPEN T, 1999) (SKULACHEV MV *et al*, 1999) (MEDINA-ESCOBAR N *et al*, 2003) (PÉREZ FILGUEIRA D *et al*, 2004).

Der TMV wird durch eine Vielzahl verschiedener „Ein- und Umbaumaßnahmen“ von Promotoren, Introns, Resistenzen und anderer nützlicher Sequenzen (z.B. (His)<sub>6</sub>-Tag) den aktuellen Bedürfnissen der Wissenschaftler angepasst und erhält so seine „individuelle Gestalt“.

In diesem Falle hat Icon Genetics die aufgeführten diversen Modifikationen des TMV (Details zu Virussystem von Icon Genetics siehe IV4.1 *Innovationen bei der Verwendung des Tobacco Mosaic Virus* als Expressionsvektor, S. 86) in Form verschiedener Module entwickelt, um mit Hilfe des TMV vielleicht sogar im industriellen Maßstab rekombinante Proteine erzeugen zu können. Das System der verschiedenen TMV-Module wurde von Icon Genetics übernommen und zu Expressionszwecken im präparativen Labormaßstab genutzt.

Als Wirtspflanze kommen für den TMV grundsätzlich alle *Solanaceen* in Betracht. Es hat sich jedoch gezeigt, dass T-DNA-Transfer, Rekombination der Module innerhalb der Pflanzenzelle, Transkription und das optionale *splicing*, in *Nicotiana benthamiana* mit sehr hoher Effizienz verlaufen (MARILLONNET S *et al*, 2004). Daher fiel die Entscheidung für *Nicotiana benthamiana* als Wirtspflanze.

Als Expressionsmarker, wird wie schon mehrfach erwähnt, ein 3'-Modul eingesetzt, das ein nach CHIU W *et al* (1996) modifiziertes *Green Fluorescent Proteine*-Gen als GOI enthält. Dieses GFP-Gen ist Derivat des originalen GFP aus *Aequorea victoria* und wurde unter anderem genutzt, um mit Hilfe der Expression von GFP-Fusionsproteinen sowohl die Lokalisierung pflanzlicher als auch viraler Proteine im subzellulären Raum zu bestimmen (GILLESPIE T *et al*, 2002). MEDINA-ESCOBAR N benutzte 2003 eine modifizierte Form des TMV zur Herstellung eines Fusionsproteins mit GFP, um so subzelluläre Adressen von Proteinen zu identifizieren.

#### **4.1 Einklonierung der Klone P2 und P4 in das 3'-Modul pICH10990**

Das GFP-3'-Modul pICH7410 wird bei jeder Infiltration grundsätzlich mit allen verwendeten 5'-Modulen und mit jeder Integrase kombiniert, um die Funktionstüchtigkeit der verwendeten Module zu belegen.

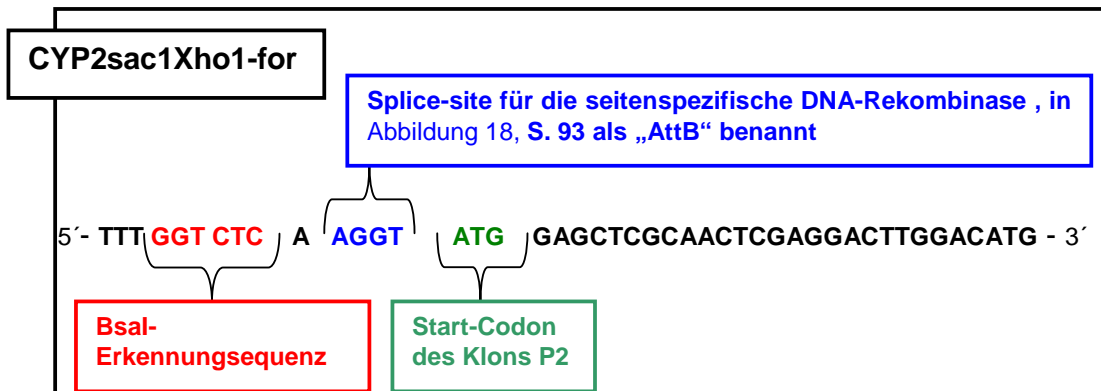
Beim P450-Klon P2 von RUPPERT besteht die höchste Wahrscheinlichkeit, dass er für die VH codiert. Es liegt eine Sequenzidentität der Aminosäuren von etwa 56,8% zur Tabersonin-16-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* vor (SCHRÖDER G *et al*, 1999) und Tabersonin stellt wie Vinorin ein monoterpenoides Indolalkaloid, also ein relativ grosses, kompliziertes Molekül dar. Hinzu kommt, dass alle bisher bekannten Mitglieder der CYP71D-Unterfamilie, zu der auch der Klon P2 gerechnet wird, Hydroxylierungen am Aromaten katalysieren. Das alles sind Indizien, die für den Verdacht sprechen, dass der P450-Klon P2 die genetische Information für die gesuchte Vinorin-Hydroxylase liefert. Aus diesem Grund ist P2 dafür vorgesehen worden, im neuen *Nicotiana*-System getestet zu werden. Als Positiv-Kontrolle dient der Klon P4, dessen Identität als Cinnamoyl-

Hydroxylase aus *Rauvolfia serpentina* durch heterologe Expression belegt ist (siehe 2.2, S. 119).

Die Klone P2 und P4 wurden, wie in IV4.3, S. 88 beschrieben, in den Provektor einkloniert. Dieses 3'-Modul stellt dann den Träger des GOI dar. Die hierzu benötigten forward-Primer werden für die Generierung des einzuklonierenden PCR-Fragmentes gezielt gestaltet (siehe Abbildung 30, S. 134).

**Abbildung 30: Verdeutlichung der Primergestaltung am Beispiel des 3'-Modul-Primers CYP2sac1Xho1-for**

Erläuterungen zur Abbildung: Die erste Aminosäure des GOI kommt direkt hinter die „splice-site“. Im fertig klonierten pICH10990 entspricht die „splice-site“ AttB. Sie ist die DNA-Sequenzen, die die seitenspezifische DNA-Rekombinase durch Verbindung mit der AttP-Stelle des 5'-Moduls zur Bindungsstelle AttR verschmilzt. Die AttR-Stelle befindet sich innerhalb des Introns (siehe IV4.5, S.97).



Wie in der Abbildung deutlich wird, kommt die erste Aminosäure des GOI direkt hinter die „splice-site“. Im fertig klonierten rekombinanten pICH10990 entspricht diese „splice-site“ der Stelle AttB. Sie stellt also die DNA-Sequenzen dar, die die seitenspezifische DNA-Rekombinase durch Verbindung mit der AttP-Stelle des 5'-Moduls zur Bindungsstelle AttR verschmilzt. Die AttR-Stelle sitzt innerhalb des Introns, das, wie schon in IV4.5, S. 97 erwähnt, im darauffolgenden splicing-Vorgang herausgetrennt wird.

Das Intron ist speziell für die Stabilität des resultierenden noch nicht „gesplitten“ DNA-Vektors ausgearbeitet, und es müssen verschiedene Anforderungen bezüglich der Basenwahl, bestimmter Erkennungsequenzen und der Größe gegeben sein (SIMPSON G UND FILIPOWICZ W, 1996). Liegen die Gene ohne Intron in einem Vektor vor, kann das GOI durch Rekombination homologer oder doppelter Sequenzen verloren gehen

(RABINDRAN S UND DAWSON W, 2001). Diese Instabilität wächst mit der Größe des Inserts.

#### **4.2 Testung unterschiedlicher Module mit P2 und P4, Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

Wie schon in IV4.8.2, S. 101 erläutert, wurden die Module pICH8420, pICH10530 und pICH 10570 als 5'-Module eingesetzt und die Module pICH10881 und pICH14313 als Integrase.

Während pflanzliche, genauso wie tierische, Cytochrom P450-Enzyme im ER vermutet werden, gibt es auch Berichte darüber, dass pflanzliche P450s in der Plasmamembran (KJELBOM P *et al*, 1985) oder der Provacuole (MADYASTHA K *et al*, 1977) lokalisiert sind. Hinzu kommt, dass die N-terminale Sequenz von CYP74 und CYP79B2/3 den *transit*-Peptiden des Chloroplast-targetings ähnelt (SONG W *et al*, 1993; HULL A *et al*, 2000). Folglich scheint die subzelluläre Lokalisierung der pflanzlichen P450s mit der Individualität des jeweiligen Proteins zu variieren.

Es sind große Hoffnungen in das Modul pICH8420 gesetzt worden, da dies das Modul darstellt, welches für eine Apoplast-targeting-Peptidsequenz codiert. Nach Analyse der Klonesequenzen P2 und P4 bezüglich ihrer nativen subzellulären Aufenthaltswahrscheinlichkeiten (EMANUELSSON O *et al*, 2000), wurde eine Wahrscheinlichkeit von 87,5% für P2 und 96,1% für eine Zugehörigkeit zum *Secretory Pathway* ermittelt. Damit ist eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum am wahrscheinlichsten.

Das gab Grund zu der Hoffnung, dass das Apoplast-targeting genau das richtige Modul darstellt, um die beiden Klone in dieser Kombination zu exprimieren. Diese Hoffnung bestätigte sich jedoch nicht. Auch mit den restlichen Modulen wie Chloroplast-targeting und der Klon-eigenen target-Sequenz konnten weder Überexpression noch Enzym-Aktivitäten (siehe IV4.7, S. 99 und IV4.8.1, S. 100) festgestellt werden. Es war zu erwarten, dass die Isolierung von P2 und P4, wie sie bei IV4.8.1, S. 100 durchgeführt wurde keinen Erfolg hatte. Diese Standard-Isolierung (III1.3, S. 33) greift auf den Puffer A3 zurück, der das Detergens Triton-X-100 enthält. Wie schon in V1, S. 110 erläutert, ist der Kontakt mit Detergentien für Cytochrom P450-

Enzyme problematisch. Wahrscheinlich werden bei dieser Art des Aufschlusses die vorhandenen rekombinanten Enzyme denaturiert.

Auch die Mikrosomen-Isolierung aus infiltrierter *Nicotiana benthamiana* brachte keine neuen Erkenntnisse. Es konnte keine VH-Aktivität detektiert werden, sogar noch nicht einmal die Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität war nachweisbar. Das lässt den Schluss zu, dass bei der durchgeführten Mikrosomen-Isolierung die Aktivität verloren geht. Die Cinnamoyl-Hydroxylase kommt in jeder Pflanze vor. Sie katalysiert die erste Hydroxylierungs-Reaktion im Phenyl-Propan-Weg, der zur Biosynthese von wichtigen Verbindungen, wie zum Beispiel Ligninen, Tanninen, Anthocyanen und verschiedener Klassen von Phytoalexinen führt (GABRIAC B *et al*, 1991). Diese Tatsache sollte es möglich machen, eine grundsätzlich vorkommende Cinnamoyl-Hydroxylase mittels Aktivitätstest zu detektieren. Doch auch aus jungen Blattspitzen frisch isolierte Mikrosomen zeigen keine Cinnamoyl-Hydroxylase-Aktivität. Das bedeutet, dass die Methode der Mikrosomen-Isolierung zwar für Tests aus der Zellsuspensionskultur vollkommen zufriedenstellend ist, doch für *Nicotiana benthamiana* Pflanzen (siehe III1.2.2, S. 31) verbessert werden muss.

Ein weiteres Manko des Systems könnte in der Kombination mit dem Apoplast-targeting selber liegen. So wurde schon im Jahre 1999 von BOEVINK P *et al* über die Instabilität des eigentlich widerstandsfähigen GFP im apoplastischen Raum aufgrund rascher Degradierung durch Proteasen berichtet. Lediglich die Expression als Fusionsprotein mit verschiedenen anderen Proteinen konnte diese Tatsache in den Hintergrund drängen. Eines dieser Proteine codiert eine Vorstufe zu einem RALF-Peptid (**R**apid **A**lkalization **F**actor), einem Peptid-Hormon, das in die Transduktion der Abwehrsignale involviert ist (PEARCE G *et al*, 2001). Eine Verbesserungsmöglichkeit wäre also die Erzeugung eines Fusionsproteins aus dem gesuchten Protein und einem solchen RALF-Peptid in Kombination mit dem ursprünglichen Apoplast-targeting.

### 4.3 Expression von PNAE – das System funktioniert also doch

Mit der Optimierung der Mikrosomen-Isolierung ist die Frage der Tauglichkeit des Systems noch nicht geklärt. Zu viele äußere, suboptimale Einflüsse wie unzureichendes Licht, Temperaturschwankungen und das damit verbundene



veränderte Wachstumsverhalten der Pflanzen könnten die Tauglichkeit des Expressionssystems zusätzlich beeinträchtigen.

Zudem tritt im „normalen“ Tabak (*Nicotiana tabaccum*) ein Resistenz-Phänomen gegen den TMV auf. Dieses Phänomen taucht bei Vorliegen eines *N*-Resistenzgens gegen den TMV auf und bewirkt sowohl die Lokalisierung einer TMV-Infektion, als auch die Elicitierung einer hypersensitiven nekrotischen Antwort (LEVY M *et al*, 2004). Die Transskription des *N*-Gens erfährt außerdem eine *up*-Regulation bei der TMV-Infektion (JIN H *et al*, 2003). Möglicherweise könnte eine analoge Erscheinung auch in *Nicotiana benthamiana* zur Beeinflussung der Expressionsversuche führen.

Nachdem es noch nicht möglich war, in dem aus Halle überführten System ein Enzym heterolog zu exprimieren, muss zuerst die Funktionsfähigkeit generell getestet werden. Dazu wird ein Enzym ausgewählt, das zur Klasse der löslichen Enzyme gehört: die Polyneuridinaldehyd Esterase (PNAE), welche im Jahre 2000 erstmals heterolog exprimiert wurde (DOGRU E *et al*, 2000). Die Einklonierung der PNAE in pICH10990 verläuft problemlos (siehe IV4.3.4, S.94). Auch hier wird anschließend mit den gleichen 5'-Modulen kombiniert wie bei den Klonen P2 und P4. Die exprimierte PNAE zeigt bei Kombination mit dem 5'-Modul pICH10570 Umsatz von PNA zu VE, was mittels HPLC und Massenspektrometrie bestätigt werden kann. Alle anderen 5'-Module mit „target“-Charakter führen zu keiner PNAE-Aktivität.

Die Untersuchung des Enzymrohextraktes mit SDS-PAGE zeigt trotz Konzentrierung im Vergleich zur Kontrolle keine zusätzliche überexprimierte Bande auf dem Gel. Ungeachtet mehrfacher Versuchsdurchführung und Variierung verschiedener Parameter (unterschiedliche Mengenverhältnisse der *Agrobacterium*-Kulturen bei der Infiltration, unterschiedliche Expressionsdauer, unterschiedlicher Pflanzenstatus (Alter der Blätter, Habitus) kann keine Anhebung der Enzymausbeute erzielt werden, so dass mittels SDS-PAGE keine weitere Charakterisierung erfolgen kann. Gleichwohl ist der Beweis erbracht, dass das System mit *Nicotiana benthamiana* als Wirtspflanze und dem rekombinanten *Tobacco Mosaic Virus* als Expressionsvektor unter den gegebenen Laborbedingungen funktioniert.

Die Sequenzanalyse nach EMANUELSSON O *et al* (2000) lässt leider keine Schlüsse auf die native Lokalisierung der PNAE zu. Als sicher anzunehmen ist nur die Tatsache, dass die PNAE nicht im Chloroplasten lokalisiert ist (TargetP-Wert: 0,009). Auch die Zugehörigkeit zum *Secretory Pathway* ist mit einem TargetP-Wert von 0,280 eher gering. Dagegen ist die Lokalisierung in den Mitochondrien mit einem TargetP-Wert von 0,342 schon erhöht, gipfelt aber in einem TargetP-Wert von 0,442 bei nicht genau lokalisierbaren Zellorganellen. Somit kann erklärt werden, warum das Chloroplast-targeting und das Apoplast-targeting bei der PNAE nicht funktionieren.

Da mit dem zuvor angewandten Versuchsaufbau keine SDS-PAGE-Analyse möglich war, wurde nun das PNAE-3'-Modul mit dem 5'-Modul pICH11280 kombiniert. Dieses Modul ermöglicht eine Expression des GOI unter Generierung eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag und so eine nachfolgende Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Durch die anschließende Chromatographie wird es schließlich möglich sein, aus einer größeren Menge an Ausgangsmaterial eine Protein- bzw Enzym-Konzentration zu erreichen, die mittels SDS-PAGE nachweisbar ist (siehe Abbildung 23, S. 109).

Zu diesem Zweck werden vier ganze Pflanzen infiltriert (siehe IV4.10.1, S. 106). Die Reinigung des Rohextraktes mit dem Äkta-Explorer zeigt nur einen sehr kleinen Protein-Peak der gereinigten PNAE-His (siehe Abbildung 23, S. 107), was wiederum den Schluss zulässt, dass nur eine geringe Menge an rekombinantem Protein produziert wird. Diese Tatsache steht im Gegensatz zur veröffentlichten Aussage, dass bei Verwendung dieses Expressionssystems die Ausbeute an rekombinantem Protein bis zu 80% der gesamten löslichen Proteinfraction beträgt (MARILLONNET S *et al*, 2004). Statt des von uns verwendeten Promotors *AtACT2* (*Arabidopsis actin 2*) verspricht die Verwendung eines Promotors mit höherer Potenz eine Verbesserung. Ein sehr potenter Promotor ist der *CaMV 35S(1x) promoter*, der nur noch vom *rice Act1 promoter* übertroffen wird. Beide Promotoren wurden in dem Moos *Physcomitrella patens* getestet. Die Übertragbarkeit in andere eukaryotische Systeme wurde erfolgreich geprüft (HORSTMANN V *et al*, 2004).

Aussagen über weitere Fehler der gewählten Versuchsanordnung sind nur bei einer weitergehenden Kenntnis des vorliegenden Expressionssystems

feststellbar. Es müssen noch mehrere unterschiedliche Proteine mit diesem System exprimiert werden, um Erfahrungen zu sammeln, die Rückschlüsse auf Verbesserungen der Versuchsanordnung zulassen.

## 5 Ausblick: Zukünftige Strategien zur Expression von Cytochrom P450-Enzymen aus *R. serpentina*

Bei allen behandelten Expressionssystemen kommen noch weitere mögliche Optimierungen in Frage. In den vorangegangenen Kapiteln wurde dem durch Einbezug neuerer Forschungsergebnisse und -richtungen Rechnung getragen. An dieser Stelle werden nun die aufgezeigten Wege und Möglichkeiten auf wenige Kernaussagen reduziert, um jedes der diskutierten Expressionssysteme noch einmal angemessen für den zukünftigen Ausblick zu beleuchten.

Die Etablierung des Insektenzellensystems für die Expression von P450-Enzymen ist mit der heterologen Expression der Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Rauvolfia serpentina* erfolgreich verlaufen. Die Testung von P450-Klonen auf Vinorin-Hydroxylase-Aktivität mit Hilfe dieses Expressionssystems ist dagegen problematisch. Die Insektenzellen spalten die Acetyl-Gruppe des Vinorins ab, wodurch eine Detektion der Enzymaktivität nicht ohne weiteres möglich ist. Zudem ist die Vinorin-Hydroxylase ein sehr spezifisches Enzym und entzieht sich dadurch der Testung durch andere Substrate. Für die weitere Bearbeitung von Cytochrom P450-Klonen sollte daher das System an anderen Schlüsselpositionen der Ajmalin-Biosynthese eingesetzt werden, bei denen keine Beeinträchtigung der enzymatischen Nachweisreaktion zu verzeichnen ist. Eine Möglichkeit wäre die Untersuchung der Sarpagin-Synthase. Dieses Enzym sorgt in einer Hydroxylierungsreaktion des Aromaten für die Umwandlung von 10-Deoxysarpagin zu Sarpagin (HINSE C, 2003) und genau diese Aktivität findet sich auch in isolierten Mikrosomen aus Suspensionszellkulturen von *Rauvolfia serpentina* (RUPPERT M, 2001) (Yu B *et al*, 2002). Das lässt den Rückschluss zu, dass auch dieses Enzym der Familie der Cytochrom P450-Enzyme angehört.

Das nächstliegende Ziel sollte sein, die vorhandenen P450-Klone mit einem anderen Expressionssystem auf ihre Aktivität hin zu überprüfen. In dem bakteriellen Expressionssystem *E. coli* wurden die P450-Klone P1, P2, P3 und P5 untersucht. Diese Versuche waren erfolglos. Doch die Experimente wurden im Jahre 2001 durchgeführt und mit dem heutigen Stand der Forschung sollte man die Expression der vorhandenen Klone erneut in einem

prokaryotischen System versuchen. Mit Hilfe von Modifikationen der neueren Vektorsysteme (z.B.: Modifikation des pCW-Vektors) und einer Variierung der Rahmenbedingungen (z.B.: Coexpression von bakteriellen Chaperonen) dürften sich die Chance zur Identifizierung der Vinorin-Hydroxylase deutlich verbessert haben. Auch die Fortschritte auf dem Gebiet der Isolierung und Reinigung von Cytochrom P450-Enzymen hat weite Fortschritte gemacht. Hier kann durch die Aquirierung neuer Techniken die Proteinausbeute vielleicht deutlich erhöht werden.

Das *Nicotiana*-Expressionssystem wurde schon mit der Expression des P450-Klons P2 und der Cinnamoyl-Hydroxylase aus *Rauvolfia* getestet, jedoch konnte bis jetzt noch keine der beiden gesuchten Aktivitäten detektiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten keine zufriedenstellenden Mikrosomen-Präparation vorgenommen werden. Hier muss die Gewinnung der exprimierten P450-Fractionen an oberster Stelle stehen und der nächste Schritt zu einem aktiven Enzym führt nur über die Optimierung der Protein-Isolierung. Ist dieses Ziel erreicht, sollte das System noch auf alle ungetesteten vorhandenen P450-Klone angewendet werden. Zu diesem Zweck wurden schon Primer, deren Sequenzen im Anhang unter VIII.3.1, S. 176 zu finden sind, entworfen und synthetisiert. Es folgt dann die Einklonierung und die Testung der verschiedenen Klone auf Aktivität.

Interessant könnte auch die Modifikation der vorhandenen Promotoren oder gar die Option gänzlich neue Promotoren auszuprobieren sein. Sollte ein Problem in der Expression der Mikrosomen liegen, könnte so durch die Anhebung der aktiven Proteinmenge dieses Problem relativiert werden. Auch besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von universellen, hoch-potenten Promotoren Derivate des TMV herzustellen, die die Überexpression in Suspensionszellkulturen ermöglichen. Dadurch würde die neue Problematik der Mikrosomenisolierung entfallen, da dieser Arbeitsschritt zur Genüge getestet wurde und auf optimierte Versuchsprotokolle zurückgegriffen werden kann. Optimierungsmöglichkeiten des vorliegenden pflanzlichen Expressionssystems werden sich auch im Verlaufe der Experimente herauskristallisieren. Noch ist das System erst kurze Zeit in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Ein sehr wichtiges Expressionssystem, das noch nicht in der vorliegenden Arbeit erläutert wurde, ist die Expression von Cytochrom P450-Enzymen in Hefen.

### Expression in Hefen

Während sich die heterologe Expression in Bakterien größtenteils auf verschiedene Stämme von *E. coli* beschränkt, kann bei der heterologen Expression in Hefen zwischen verschiedenen Hefen ausgewählt werden. Es wurden schon humane Cytochrom P450-Enzyme in *Schizosaccharomyces pombe* (EHMER P *et al*, 2002) und *Pichia pastoris* (ANDERSEN M UND MOLLER B, 2002) exprimiert. Die zum Zwecke der P450-Expression jedoch sicherlich am meisten verwendete Hefe stellt *Saccharomyces cerevisiae* dar (HUMPHREYS JM, 2004) (HÜBNER S *et al*, 2003) (GANG D *et al*, 2002) (URBAN P *et al*, 2001). Daneben existiert noch die Hefe *Yarrowia lipolytica*. MÜLLER S *et al* hat 1999 verschiedene Hefen nach ihrer Effizienz bezüglich der Produktion von heterolog exprimiertem Protein miteinander verglichen. *Yarrowia lipolytica* stellte sich dabei als die geeignetste Hefe heraus, um Proteine heterolog zu exprimieren. Es sind zwar Vektoren konstruiert worden und man hat diese Hefen weiter modifiziert (JURETZEK T, 2000, 2001) (NICAUD J, 2002), doch ist ihre weite Verbreitung ausgeblieben. Hauptsächlich wird dieses System benutzt, um humane P450s zu studieren und deren Metabolisierungen zu simulieren. Lipophile Zusätze zum Medium (z.B.: Olivenöl) induziert die Promotoren *POX2* und *ICL* und sorgt so für die Expression des rekombinanten Proteins (NTHANGENI M *et al*, 2004).

*Pichia pastoris* ist dagegen nur wenig in der Literatur beschrieben, was die Expression von P450s angeht. RUPPERT exprimiert die Cytochrom P450-Reduktase aus *Rauvolfia serpentina* ebenfalls in *Pichia* (unveröffentlichte Daten). Trotzdem findet diese Hefe ansonsten keine weitere Verbreitung.

Der Standard der Hefe-Expression stellt nach wie vor die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* dar. In keinem Expressionssystem wurden so viele P450s exprimiert, wie in *Saccharomyces cerevisiae*. Im Laufe der Zeit haben sich verschiedene Stämme etabliert, wovon die wichtigsten WAT11 und WAT21 sind. Beide Stämme sind aus dem Stamm W303-B hervorgegangen und sind insofern modifiziert worden, als sie beide CPRs überexprimieren, die nicht zur eigentlichen Enzymgrundausrüstung der

Hefen gehören. WAT11 und WAT21 enthalten anstelle der endogenen NADPH-Reduktase die entsprechenden Reduktasen aus *Arabidopsis thaliana* ATR1 und ATR2. Beide sind unter der Kontrolle des *GAL10-CYC1*-Promotors, der durch Galactose induziert wird. Das GOI wird in den Standard-Expressionsvektor pYeDP60 einkloniert (URBAN P *et al*, 1994). Dieser Vektor steht auch unter der Kontrolle des *GAL10-CYC1*-Promotors und ist folglich auch mit Galactose induzierbar. Der Vektor geht ursprünglich auf den „*yeast 2- $\mu$ m minicircle*“ zurück, der mit einer Expressionskassette versehen wurde, welche die Selektionsmarker *URA3* und *ADE2* enthält. Der *URA3*-Marker sorgt für eine Uracil-Auxotrophy während der *ADE2*-Marker für eine Adenin-Auxotrophy codiert. Außerdem sind noch eine MCS und der *PGK1*-Terminator vorhanden. In diesem Hefe-System wurden mittlerweile sehr viele verschiedene Cytochrom P450-Enzyme exprimiert (HUMPHREYS JM, 2004) (HÜBNER S *et al*, 2003) (GANG D *et al*, 2002) (URBAN P *et al*, 2001). Die Zugabe von bestimmten Häm-Präkursoren wie  $\delta$ -Aminolevulinsäure in Kombination mit Fe(III), bewirkt eine signifikante Steigerung von P450-Aktivitäten (JIANG H UND MORGAN JA *et al*, 2004). Auch die Optimierung der Hefe-Kultivierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivitäten der exprimierten P450s. So erhöht der Zusatz einer Stickstoffquelle zu dem Kultivierungsmedium auf Aminosäurebasis (Caseinsäurehydrolysat) signifikant die Wachstumsrate und Ausbeute der rekombinanten Hefen im Vergleich zur Verwendung von anorganischem Stickstoff (Ammoniumsalzen). Als Grund wird hierfür der verminderte energetische Aufwand für die Hefezellen genannt, um Biomasse und Proteine zu synthetisieren (MOAT A UND FOSTER J, 1995).

Neueste Veröffentlichungen berichten bei der Überexpression eines P450 über eine Induktion der „*unfolded protein response*“ und von Chaperonen in Hefen (SZCZESNA-SKORUPA E, 2004). Diese zellulären Mechanismen zur Reperatur sind Faktoren, die eine potentiell erfolgreiche Expression der gesuchten Vinorin-Hydroxylase in *Saccharomyces* unterstreichen.

Ein weiteres Beispiele für die erfolgreiche Nutzung des *Saccharomyces*-Systems ist die selbstversorgende und autarke Totalsynthese von Hydrocortison aus einer einfachen Kohlenstoffquelle (Glucose, Galactose) in *Saccharomyces cerevisiae* (SZCEBARA F *et al*, 2003). IKEZAWA N *et al* gibt

2003 die Entdeckung eines Vertreters einer neuen Cytochrom P450-Familie bekannt, die ebenfalls in Hefe exprimiert wurde. Auch wichtige Gene der Taxolbiosynthese, wie die Taxoid 2 $\alpha$ -Hydroxylase und die Taxadien 5 $\alpha$ -Hydroxylase konnten erfolgreich mit Hilfe von *Saccharomyces cerevisiae* aufgeklärt werden (CHAU M *et al*, 2004) (JENNEWEIF S(b) *et al*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression der vorhandenen Cytochrom P450-Klone in jedem Falle in diesem System versucht werden sollte.



## VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme aus der Arzneipflanze *Rauvolfia serpentina* bearbeitet. Es wurde versucht, das an der Biosynthese des Alkaloids Ajmalin beteiligte Cytochrom P450-Enzym Vinorin-Hydroxylase heterolog und funktionell zu exprimieren.

Ein zunächst noch unbekanntes Cytochrom P450-Gen-Fragment aus *Rauvolfia serpentina* konnte mittels RACE-PCR zum P450-Volllängenklon P4 komplettiert werden. Die Identifizierung des Klons P4 als Cinnamoyl-Hydroxylase erfolgte nach ausführlichen Homologie-Studien durch heterologe Expression in *Sf9*-Insektenzellen mit rekombinantem Baculovirus als Expressionsvektor und einem abschliessenden HPLC-basierten Aktivitätstest. Die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aus *Rauvolfia serpentina* wurde mit der Cinnamoyl-Hydroxylase in diesem System coexprimiert und erhöhte deren Umsatz.

Im Rahmen des Homology Cloning Projektes konnten drei Volllängenklone und 13 Teilsequenzen von unterschiedlichen, neuen, unbekanntem Cytochrom P450-Klonen ermittelt werden. Des Weiteren wurde durch das unspezifische Binden eines degenerierten Primers ein weiterer Klon gefunden, der im Rahmen von Homologie-Studien der Gruppe der löslichen Reduktasen zugeordnet werden konnte. Diese putative Reduktase wurde durch heterologe Expression mit dem pQE60-Vektor als Expressionsvektor in *E.coli* und HPLC-gestützte Aktivitätstests im zellfreien Medium auf die Aktivität von mehreren gesuchten Schlüsselenzymen der Ajmalin-Biosynthese leider erfolglos geprüft.

Es stellte sich heraus, dass die Insektenzellen als Expressionssystem für die gesuchte Vinorin-Hydroxylase nicht tauglich sind. Die Insektenzell-Mikrosomen zeigten eine starke Tendenz das Substrat Vinorin zu deacetylieren und dadurch einen Aktivitätstest unmöglich werden zu lassen. Bedingt durch diese Untauglichkeit wurde ein weiteres eukaryotisches Expressionssystem gewählt. Hier handelt es sich um ein Modul-gestütztes, pflanzliches Expressionssystem mit *Nicotiana benthamiana* als Wirtspflanze und dem modifizierten *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) als Expressionsvektor. Die Module stellen Teilstücke des TMV dar. Der finale Expressionsvektor

wird in der Pflanzenzelle durch gezielte Rekombination zusammengesetzt. Dadurch können mit einem einzigen Klonierungsschritt eine Vielzahl unterschiedlicher Module *screening*-artig kombiniert und durch deren unterschiedliche Beschaffenheit dem exprimierten Protein diverse Eigenschaften verliehen werden. Es wurde versucht den Cinnamoyl-Hydroxylase-Klon P4 als Kontrolle und den unbekanntes P450-Klon P2, der möglicherweise für die Vinorin-Hydroxylase codiert, in diesem System zu exprimieren. Die gewählten Modul-Kombinationen konnten jedoch noch nicht zu einer weiteren Aufklärung der Vinorin-Hydroxylase beitragen.

Zur grundsätzlichen Verifizierung der Funktionstüchtigkeit des *Nicotiana*-Systems, wurde die Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNA-Esterase) mit mehreren verschiedenen Modulen kombiniert. Die durch HPLC und Massenspektroskopie verifizierten Aktivitätstests konnten die gesuchte Funktionstüchtigkeit mit zwei unterschiedlichen Modulen bestätigen. Dabei konnte auch die Aktivität eines (His)<sub>6</sub>-Tag-PNA-Esterase-Fusionsproteins nach erfolgter Ni-NTA-Reinigung detektiert und eine Expression mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung bestätigt werden.

---

## VII Literatur

- AKHTAR MK, KADERBHAI NN, HOPPER DJ, KELLY SL, KADERBHAI MA. Export of a Heterologous Cytochrome P450 (CYP105D1) in *Escherichia coli* Is Associated with Periplasmic Accumulation of Uroporphyrin. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46, 45555–45562
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Der Zellkern. *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.*, 215 (1990) 403 - 410
- ANDERSEN MD, MOLLER BL. Use of methylotropic yeast *Pichia pastoris* for expression of cytochromes P450. *Methods Enzymol.* 357 (2002) 333–342
- ANTEROLA AM, JEON JH, DAVIN LB, LEWIS NG. Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis in *Pinus taeda* Factors Affecting Monolignol Ratios And Carbon Allocation In Phenylpropanoid Metabolism *J. Biol. Chem.* Vol. 277 (2002) 21 18272–18280
- ARAZI T, SLUTSKY SG, SHIBOLETH YM, WANG YZ, RUBINSTEIN M *ET AL.* Engineering *Zucchini yellow mosaic* potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits *J. Biotech.* 87 (2001) 67-82
- AUSTIN CJ, MIZDRAK J, MATIN A, SIRIJOVSKI N, KOSIM-SATYAPUTRA P, WILLOWS RD, ROBERT TH, TRUSCOTT RJ, POLEKHINA G, PARKER MW, JAMIE JF. Optimised expression and purification of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Protein Expr. Purif.* Oct 37(2) (2004) 392-8.
- BAASA BJ, DENISOVA IG, SLIGARA SG. Homotropic cooperativity of monomeric cytochrome P450 3A4 in a nanoscale native bilayer environment *Arch. Biochem. Biophys.* 430 (2004) 218–228
- BACKES WL, KELLEY RW. Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol. Ther.* 98 (2003) 221–233
- BAIROCH A. The Enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res.* (2000)
- BARNES HJ Maximizing Expression of Eukaryotic Cytochrome P450s in *Escherichia coli* *Methods Enzymology* vol 272 (1996)
- BAYBURT T, CARLSON J, SLIGAR S, Reconstitution and Imaging of a Membrane Protein in a Nanometer-Size Phospholipid Bilayer, *J. Structural Biology* 123 (1998) 37–44
- BAYER A. Charakterisierung der Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina* durch Reinigung, Expression, Mutation und Kristallisation, Dissertation an Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (2003)

- BETZ C, MCCOLLUM T UND MAYER R. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *Plant Mol. Biol.* 46 (6) (2001) 741-748
- BIRNBOIM HC, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* (1979) 1513 – 1523
- BLAKESLY RW UND BOEZI JA. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82 (1977) 580-582.
- BLANCO-PORTALES R, MEDINA-ESCOBAR N, LOPEZ-RAEZ J, GONZALEZ-REYES J, VILLALBA J, MOYANO E, CABALLERO J, MUNOZ-BLANCO J. Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) *J. Exp. Bot.* 53 (375) (2002) 1723-1734
- 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.*, 31 (2003) 365 – 370
- BOEVINK P, MARTIN B, OPARKA K, SANTA CRUZ S, HAWES, C Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin A. *Planta* 208 (1999) 392–400
- BRADFORD MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248 – 254
- BRILL E, ABRAHAMS S, HAYES C, JENKINS C WATSON J Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.) *Plant Mol. Biol.* 41 (2) (1999) 279-291
- BUCHER P, BAIROCH A. A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. ISMB-94. Proceedings 2<sup>nd</sup> 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, FERNUNDEZ JM, SHORT JM. XL1-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA Escherichia coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection. *BioTechniques* 5 (1987) 376 – 378
- CABELLO-HURTADO F, BATARD Y, SALAUN JP, DURST F, PINOT F, WERCK-REICHHART, D. Cloning, expression in yeast, and functional characterization of CYP81B1, a plant cytochrome P450 that catalyzes in-chain hydroxylation of fatty acids *J. Biol. Chem.* 273(1998)7260-7267

- CHAERLE L, HAGENBEEK D, DEBRUYNE E, VALCKE R, VUNDERSTRAETEN D. Thermal and Chlorophyll-Fluorescence Imaging Distinguish Plant-Pathogen Interactions at an Early Stage Plant Cell Physiol. 45(7)(2004) 887–896
- CHAPMAN S, KAVANAGH T, BAULCOMBE D. Potatoe virus X as a vector for gene expression in plants Plant J. 2 (1992) 549-557
- CHAPPLE C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases Annu Rev. Plant Physiol and Mol. Biol., 49 (1998) 311-43
- CHAU M UND CROTEAU R Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase involved in Taxol biosynthesis, Arch. Biochem. Biophys. 427 (2004) 48–57
- CHAU M, JENNEWEIN S, WALKER K, CROTEAU R. Taxol Biosynthesis: Molecular Cloning and Characterization of a Cytochrome P450 Taxoid 7 $\beta$ -Hydroxylase Chem. & Biol. Vol 11(2004) 663–672
- CHEN L, BUTERS J, HARDWICK J, TAMURA S, PENMAN B, GONZALEZ F, CRESPI C, Coexpression of Cytochrome P4502A6 and human NADPH-P450 Oxidoreductase in the Baculovirus system (1997) Vol 25, No. 4
- 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 21 (1996) 526 – 534
- CHIU W, NIWA Y, ZENG W, HIRANO T, KOBAYASHI H, SHEEN J. Engineered GFP as a vital reporter in plants CURR. BIOL. 6 (3) (1996) 325-330
- CHOI IR, STENGER DC, MORRIS TJ, FRENCH R. A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals Plant J. 14 (2000) 7-10
- CHOU P UND FASMAN G Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47 (1978) 45-47
- CRESPI CL UND MILLER VP The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes—state of the art and prospects for the future Pharmacol. Ther. 84 (1999) 121–131
- CROWE J, DÖBELI H, GENTZ R, HOCHULI E, STÜBER D, HENCO K. 6  $\times$  His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. Methods Mol. Biol. 31 (1994) 371 – 387
- DIESPERGER H, MÜLLER C, SUNDERMANN H. Rapid Isolierung of plant microsomal fraction by Mg<sup>2+</sup>-precipitation, FEBS Letters Vol 43 (1974) No 2, 155-158
- DOGRU E, WARZECHA H, SEIBEL F, HAEBEL S, LOTTSPREICH F, STÖCKIGT J. The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpene indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the  $\alpha/\beta$  hydrolase super family. Eur. J. Biochem; 267 (2000) 1397 – 1406
- DONSON J, KEARNEY CM, HILF ME, DAWSON WO. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 7204-7208

- DOWER WJ, MILLER JF UND RAGSDALE CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 6127-6145
- DUAN H, CIVJAN N, SLIGAR S, SCHULER M. Co-incorporation of heterologously expressed Arabidopsis cytochrome P450 and P450 reductase into soluble nanoscale lipid bilayers, *Arch. of Biochem. a. Biophysics* 424 (2004) 141-153
- DUPORT C, SCHOEPP B, CHATELAIN E, SPAGNOLI R, DUMAS B, POMPON D. Critical role of the plasma membrane for expression of mammalian mitochondrial side chain cleavage activity in yeast *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1502-1514
- EHMER PB, BUREIK M, BERNHARDT R, MULLER U, HARTMANN RW. Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81 (2002) 173-179
- EMANUELSSON O, NIELSEN H, BRUNAK S, VON HEIJNE G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, *J.Mol. Biol.* 300 (2000) 1005-1016
- 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* 41 (1995) 2683 - 2690
- FALKENHAGEN H UND STÖCKIGT J. Enzymatic Biosynthesis of Vomilenine, a Key Intermediate of the Ajmaline Pathway, Catalyzed by a Novel Cytochrome P450-Dependent Enzyme from Plant Cell Cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Z. Naturforsch., 50c* (1995) 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.* 30 (2002) 235 - 238
- FINNEGAN J UND MCELROY D. Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/technology* 12 (1994) 883-888
- GABRIAC B, WERCK-REICHHART D, TEUTSCH H, DURST F. Purification and Immunocharacterization of a Plant Cytochrome P450: The Cinnamic Acid 4-Hydroxylase, *Arch. of Biochem. Biophys.* 288 (1991) 302-309
- GANG DR, BEUERLE T, ULLMANN P, WERCK-REICHHART D, PICHERSKY E. Differential Production of meta Hydroxylated Phenylpropanoids in Sweet Basil Peltate Glandular Trichomes and Leaves Is Controlled by the Activities of Specific Acyltransferases and Hydroxylases *J. Plant Physiol.* 130(3) (2002)1536-1544
- 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.* 68 (2002) 906 - 911

- GARFINKEL D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Arch. Biochem. Biophys. 77 (1958) 493-509
- GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, UNGER M, STÖCKIGT J. Development of an Efficient System for the Separation of Indole Alkaloids by HPLC and its Applications Phytochem. Analysis 12 (2001) 96-103
- GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, MA X, STÖCKIGT J. Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to about 2000 monoterpene indole alkaloids. Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2204 – 2213
- GILLESPIE T, BOEVINK P, HAUPT S, ROBERTS A, TOTH R, VALENTINE T, CHAPMAN S, OPARKA K. Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus. Plant Cell 14 (2002) 1207–1222
- GRAHAM SE UND PETERSON JA. How similar are P450s and what can their differences teach us? Arch. Biochem. Biophys. 369 (1999) 24-29
- HAGIWARA Y, PEREMYSLOV VV, DOLJA VV. Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization J. Virol. 125 (1999) 7988-7993
- 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)
- HARA-NISHIMURA I, SHIMADA T, HATANO K, TAKEUCHI Y, NISHIMURA M. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor accumulating vesicles. Plant Cell 10 (1998) 825–836
- HASEMANN CA, KURUMBALL RG, BODDUPALLI SS, PETERSON JA, DEISENHOFER J. Structure and function of cytochromes P450: A comparative analysis of three crystal structures Structure 3 (1995) 41-62
- HAUDENSCHILD C, SCHALK M, KARP F, CROTEAU R. Functional Expression of Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* Arch. Biochem. Biophys. Vol. 379 (2000) 127–136
- HEUKESHOVEN J UND DERNICK R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6 (1985) 103 – 112
- HINSE C. Analyse von Biotransformationen und Naturstoffsynthesen in pflanzlichen Zellkulturen unter Anwendung der in vivo NMR-Spektroskopie ohne Markierung, Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Fachbereich für Biologie (2003)

- HOCHULI E, DÖBELI H, SCHACHER A. New metal chelate absorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411 (1987) 177 – 184
- HORSTMANN V, HUETHER C, JOST W, RESKI R, DECKER E. Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude *BMC Biotechnology* 4 (2004) 13
- HOSEA NA, MILLER GP, GUENGERICH FP. Elucidation of Distinct Ligand Binding Sites for Cytochrome P450 3A4 *Biochemistry* 39 (2000) 5929-5939
- HOTZE M, SCHRODER G, SCHRODER J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 374 (3)(1995) 345-350
- HÜBNER S, HEHMANN M, SCHREINER S, MARTENS S, LUKAC R, MATERN U. Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. *Phytochemistry* 64 (2003) 445–452
- HULL A, VIJ R, CELENZA J. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 2379–2384
- HUMPHREYS JM UND CHAPPLE C. Immunodetection and quantification of cytochromes P450 using epitope tagging: immunological, spectroscopic, and kinetic analysis of cinnamate 4-hydroxylase *J. Immunol. Meth.* 292 (2004) 97– 107
- ICHINOSE H, WARIISHI H, TANAKA H. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor* *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002) 658–664
- IKEZAWA N, TANAKA M, NAGAYOSHI M, SHINKYO R, SAKAKI T, INOUE K, SATO F. Molecular Cloning and Characterization of CYP719, a Methyleneedioxy Bridge-forming Enzyme That Belongs to a Novel P450 Family, from cultured *Coptis japonica* Cells *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40
- JENNEWEIN S(a), WILDUNG MR, CHAU M, WALKER K, CROTEAU R. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis *PNAS* Vol 101 (2004) No. 24 9149–9154
- JENNEWEIN S(b), LONG RM, WILLIAMS RM, CROTEAU R. Cytochrome P450 Taxadiene 5 $\alpha$ -Hydroxylase, a Mechanistically Unusual Monooxygenase Catalyzing the First Oxygenation Step of Taxol Biosynthesis *Chemistry & Biology* Vol. 11 (2004) 379–387
- JIANG H UND MORGAN JA. Optimization of an In Vivo Plant P450 Monooxygenase System in *Saccharomyces cerevisiae* *Biotech Bioeng* 85 (2004) 2



- JIANG L UND ROGERS JC. Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J. Cell Biol.* 143(1998) 1183–1199
- JIN H, LIU Y, YANG K, KIM C, BAKER , ZHANG S. Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J* 33 (2003) 719–731
- JURETZEK T, LE DALL M, MAUERSBERGER S, *ET AL.* Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 18 (2001) 97–113.
- JURETZEK T, WANG HJ, MAUERSBERGER S, BARTH G. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of heterologous gene in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 5 (2000) 320–326
- KAGAWA N, HORI H, WATERMAN MR, YOSHIOKA S. Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli* *Steroids* 69 (2004) 235–243
- KALB VF UND LOPER JC. Proteins from eight eukaryotic cytochrome P-450 families share a segmented region of sequence similarity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7221–7225
- KAUFMANN B. In vitro-Untersuchungen zu Parvovirus B19-Proteinkapsiden und deren Rezeptor-Interaktionen Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg, Juli 2001
- KIEDROWSKI S, KAWALLECK P, HAHLBROCK K, SOMSSICH I, DANGL J. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus *EMBO J.* 11 (13) (1992) 4677-4684
- KIM Y, KIM D, KIM Y, LEE S UND LEE I. Cloning of ferulate 5-hydroxylase and its wound-induced expression in *Camptotheca acuminata*, Unpublished direct Submission to NCBI, Biology, Yonsei, Seodaemun-gu, Shinchon-dong 134, Seoul 120-749, South Korea (2004)
- KJELLBOM P, LARSSON C, ASKERLUND P, SCHELIN C, WIDELL S. Cytochrome P450/420 in plant plasma membranes: a possible component of the blue-light-reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Photochem Photobiol* 42 (1985) 779–783
- KLINGENBERG M. Pigments of rat liver microsomes *Arch. Biochem. Biophys.* 75 (1958) 376-386
- KRAUS P UND KUTCHAN T. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1995) Vol 92 2071-2075
- KURIHARA Y UND WATANABE YA. TMV-Cg Mutant with a Truncated Coat Protein Induces Cell Death Resembling the Hypersensitive Response in *Arabidopsis* *Mol. Cells* vol 17 (2004) 334-339

- KUTCHAN T, HAMPP N, LOTSPEICH F, BEYREUTHER K, ZENK M. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 237 (1-2) (1988) 40 – 44
- KUTCHAN T. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene Phytochem. 32 (1993) 493-506
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(259) (1970) 680-685
- LEE SJ UND BUHLER DR. Functional Properties Of A Rainbow Trout Cyp3A27 Expressed By Recombinant Baculovirus In Insect Cells Drug Metabolism And Disposition Vol. 30 (2002) 12
- LEVY M, EDELBAUM O, SELA I. Tobacco Mosaic Virus Regulates the Expression of Its Own Resistance Gene N1, Plant Physiology Vol. 135 (2004) 2392–2397
- LI L , CHENG X, LESHKEVICH J , UMEZAWA T , HARDING S, CHIANG V. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase Plant Cell 13 (7) (2001) 1567-1586
- LI X, BAUDRY J, BERENBAUM MR, SCHULER MA. Structural and functional evolution of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist P450. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 2939–2944
- LINDBERG RL, NEGISHI M. Alteration of mouse cytochrome P450 substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. Nature 339 (1989) 632–634
- LINSMAIER EM, SKOOG F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 18 (1965) 100 – 127
- LÜLLMANN H MOHR K ZIEGLER A Taschenatlas der Pharmakologie, Thieme Verlag 3. Auflage (1996) 96, 114, 186
- LUNDBLAD R, KINGDON H, COMMENT Molecular 'Pharming' Biotechnol. Appl. Biochem. 30 (1999) 99–100
- LYNCH D, LIDGETT A, SPANGENBERG G Isolation and characterisation of cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNA homologues from ryegrass. *2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops*, Lorne, Australia (2000)
- MACKAY J, LIU W, WHETTEN R , SEDEROFF R O'MALLEY D Genetic analysis of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine: single gene inheritance, molecular characterization and evolution Mol. Gen. Genet. 247 (5) (1995) 537-545
- MADYASTHA K, RIDGWAY J, DWYER J, COSCIA C. Subcellular localization of a cytochrome P-450- dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. J Cell Biol 72 (1977) 302–313

- MADYASTHA KM, RIDGWAY JE, DWYER JG, COSCIA CJ. Subcellular localization of a cytochrome P-450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. *J Cell Biol* 72 (1977) 302–313
- MARILLONNET S, GIRITCH A, GILS M, KUNDZIA R, KLIMYUK V, GLEBA Y. *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*, 101 (2004) 6852-6857
- MAST N, UNDERSSON U, NAKAYAMA K, BJORKHEM I, PIKULEVAA IA. Expression of human cytochrome P450 46A1 in *Escherichia coli*: effects of N- and C-terminal modifications *Arch. Biochem. Biophys.* 428 (2004) 99–108
- MCDONNELL CM, PETERSEN, BROWN R, BERENBAUM MR, SCHULER MA. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription *Insect Biochem.Mol. Biol.* 34 (2004) 1129–1139
- MEDINA-ESCOBAR N, HAUPT S, THOW G, BOEVINK P, CHAPMAN S, OPARKA K. High-Throughput Viral Expression of cDNA–Green Fluorescent Protein Fusions Reveals Novel Subcellular Addresses and Identifies Unique Proteins That Interact with Plasmodesmata *The Plant Cell*, Vol. 15 (2003) 1507–1523
- MEHARENNA YT, LI H, HAWKES DB, PEARSON AG, DEVOSS J, POULOS TL. Crystal Structure of P450cin in a Complex with Its Substrate, 1,8-Cineole, a Close Structural Homologue to D-Camphor, the Substrate for P450cam *Biochemistry* 43 (2004) 9487-9494
- MEYERS TS UND 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* 10 (1965) 144 – 145
- MICHALOWSKI C UND BOHNERT H. Direct Submission 09-OCT-1998 *Biochemistry*, University of Arizona, Bio Sciences West 513, Tucson, AZ 85721, USA (1998)
- MILLGATE A, POGSON B, WILSON I, KUTCHAN T, ZENK M, GERLACH W, FIST A, LARKIN P. Analgesia: morphine-pathway block in top1 poppies *Nature* 431 (2004) 413-414
- MIZUTANI M UND OHTA D Two Isoforms of NADPH:Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana* Gene Structure, Heterologous Expression in Insect Cells, and Differential Regulation *Plant Physiol.* 116 (1998) 357–367
- MOAT AG FOSTER JW. *Microbial physiology*. New York: John Wiley & Sons. (1995) 450–452
- MONTESANO M, HYYTIAINEN H, WETTSTEIN R PALVA E. A novel potato defence-related alcohol-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase induced in response to *Erwinia carotovora* *Plant Mol. Biol.* 52 (1) (2003) 177-189
- MORI S, KOBAYASHI H, HOSHI Y, KONDO M, NAKANO M. Heterologous expression of the flavonoid 30,50-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida* *Plant Cell Rep* 22 (2004) 415–421

- MÜLLER S, SUNDAL T, KAMP-HANSEN P, DALBOGE H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14 (1998) 1267–1283
- MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, KROEMER H, SCHÄFER-KORTING. Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 8. Auflage, 2001: 542 – 551
- NAGAKURA N, RUEFFER M, ZENK MH. The Biosynthesis of monoterpene indole alkaloids from strictosidine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (1979) 2308 – 2312.
- NEGROUK V, EISNER G, MIDHA S, LEE H, BASCOMB N, GLEBA Y. Affinity purification of streptavidin using tobacco mosaic virus particles as purification tags *Anal. Biochem.* 333 (2004) 230–235
- NELSON DR <http://drnelson.utmem.edu/bacteria.html>, aktualisiert im März 2004
- NICAUD JM, MADZAK C, VAN DEN BROEK P, ET AL. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2 (2002) 371–379
- NIELSEN H, SOREN B, VON HEIJNE G. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.*, 12 (1999) 3 – 9
- NTHANGENI MB, URBAN P, POMPON D, SMIT MS, NICAUD JM. The use of *Yarrowia lipolytica* for the expression of human cytochrome P450 CYP1A1. *Yeast* 21 (2004) 583–592
- OMURA T UND SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2370-2378
- OPRIAN DD UND COON MJ. Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P450-reductase during reduction by NADPH *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8935-8944
- OVERKAMP S, HEIN F, BARZ W. Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures *Plant Science* 155 (2000) 101–108
- PAQUETTE S, BAK S, FEYEREISEN R. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana* *DNA Cell. Biol.* 19 (2000) 307-317
- PEARCE G, MOURA D, STRATMAN J, RYAN C. RALF, A 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 12843–12847.
- PEARSON WR UND LIPMAN DJ. Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 2444 – 2448

- PEREMYSLOV VV, HAGIWARA Y, DOLJA VV. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus Natl Acad Sci USA 96 (1999) 14771-14776
- PÉREZ FILGUEIRA DM, MOZGOVOJ M, WIGDOROVITZ A, DUS SANTOS MJ, PARRENO V, TRONO K, FERNUNDEZ FM, CARRILLO C, BABIUK LA, MORRIS TJ, BORCA MV. Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8\* produced in plants using a TMV-based vector Arch. Virol. (2004) DOI 10.1007/s00705-004-0379-7
- PERRY RP. RNA processing comes of age. J. Cell Biol. 91 (1981) 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)
- PFITZNER A UND STÖCKIGT J. Partial Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry, 21 (1982) 1585 – 1588
- PODUST L, POULOS T, WATERMAN M. Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (Cyp51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 3068-3073
- POLZ L, SCHÜBEL H, STÖCKIGT J. Characterization of 2 $\beta$ -(*R*)-17-O-Acetyljmalan: Acetylerase – a Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia* Alkaloid Ajmaline. Z. Naturforsch., 42c (1987) 333 – 342
- RABINDRAN S UND DAWSON W. Assessment of recombinants that arise from the use of a TMV-based transient expression vector. Virology 284 (2001) 182–189
- RALSTON L, KWON S, SCHOENBECK M, RALSTON J, SCHENK D, COATES R UND CHAPPELL J Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) Arch. Biochem. Biophys. 393 (2)(2001) 222-235
- RO DK, EHLTING J, DOUGLAS CJ. Cloning, Functional Expression, and Subcellular Localization of Multiple NADPH-Cytochrome P450 Reductases from Hybrid Poplar Plant Physiol 130 (2002) 837–1851
- RUAN KH, SO SP, ZHENG W, WU J, LI D, KUNG J. Solution structure and topology of the N-terminal membrane anchor domain of a microsomal cytochrome P450: prostaglandin I<sub>2</sub> synthase Biochem. J. 368 (2002) 721-728
- RUEFFER M, NAGAKURA N, ZENK M. Strictosidine, the common precursor for monoterpene indole alkaloids with 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -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)

- SAIKI RK, GELFUND 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* 239 (1988) 487 – 491
- SAMBROOK J, FRITSCH EF UND MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T Maniatis. New York, Cold Spring Harbour Press. (1989)
- SAMBROOK J UND RUSSEL DW. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual (Volume 1-3)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)
- SAMMONS DW, ADAMS LD UND NISHIZAWA EE. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2 (1981) 135-140.
- SANCHEZ-NAVARRO J, MIGLINO R, RAGOZZINO A, BOL JF. Engineering of Alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector *Arch. Virol.* 146 (2001) 923-939
- SANGER F, NICKLEIN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463 – 5467
- SASABEA M, WENB Z, BERENBAUM MR, SCHULERA MA. Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea* *Gene* 338 (2004) 163–175
- SCHALK M, NEDELKINA S, SCHOCH G, BATARD Y, WERCK-REICHHART D. Role of Unusual Amino Acid Residues in the Proximal and Distal Heme Regions of a Plant P450, CYP73A1 *Biochemistry* 38 (1999) 6093-6103
- SCHMIDT D UND STÖCKIGT J. Enzymatic formation of the sarpaganbridge: a key step in the biosynthesis of sarpagine- and ajmaline-type alkaloids. *Planta Med.* 61 (1995) 254-258.
- SCHOLTHOF HB. Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rubinoculation with intact plasmid DNA of a Tomato bushy stunt virus gene vector *J Virol.* 34 (1999) 299-323
- SCHRÖDER G, UNTERBUSCH E, KALTENBACH M, SCHMIDT J, STRACK D, DE LUCA V, SCHRÖDER J. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase *FEBS Letters* 458 (1999) 97-102
- SCHUBERT R, SPERISEN C, MUELLER-STARCK G, LA SCALA S, ERNST D, SUNDERMANN JR, HAEGER K. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene structure in *Picea abies* (L.) Karst.: genomic sequences, Southern hybridization, genetic analysis and phylogenetic relationships *Trees (Berl. West)* 12 (1998) 453-463
- SCHULER M. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions *Plant. Physiol.* 112 (1996) 1411-1419

- SHAPIRO AL, VIÑUELA E, MAIZEL JV. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 815 – 820
- SHET MS, FISHER CW, HOLMANS PL, ESTABROOK RW. Human cytochrome P450 3A4: Enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol 90 (1993) 11748-11752
- SIMINSZKY B, CORBIN FT, WARD ER, FLEISCHMANN TJ, DEWEY RE. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides *J Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 4 (1999)1750-1755
- SIMPSON GG, FILIPOWICZ W. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: Mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery, *PL. MOL. BIOL.* 32 (1-2)(1996) 1-41
- SKULACHEV MV, IVANOV PA, KARPOVA OV, KORPELA T, RODIONOVA NP, DOROKHOV YL, ATABEKOV JG. Internal Initiation of Translation Directed by the 5´- Untranslated Region of the Tobamovirus Subgenomic RNA *J Virology* 263 (1999) 139-154
- SONG W, FUNK C, BRASH A Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 8519–8523
- SONG WC, FUNK CD, BRASH AR Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 8519–8523
- 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<sup>Arg</sup>. *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5031 – 5035
- STÖCKIGT J. UND ZENK M. Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the enzymatic formation the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1977) 646-648.
- STÖCKIGT J. Alkaloidbiosynthese in *Rauwolfia* –Heilmittel mit 3000jähriger Tradition- *GIT Fachz. Lab.* 32 (1988) 608-615
- SUGIYAMA Y, HAMAMOTO H, TAKEMOTO S, WATANABE Y, OKADA Y. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus *FEBS Lett.* 359 (1995) 247-250
- SZCZEBARA FM, CHUNDELIER C, VILLERET C, MASUREL A, BOUROT S, DUPORT C, BLANCHARD S, GROISILLIER A, TESTET E, COSTAGLIOLI P, CAUET G, DEGRYSE E, BALBUENA D, WINTER J, ACHSTETTER T, SPAGNOLI R, POMPON D, DUMAS B. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast *Nature Biotech* 21 (2003) 143-149

- SZCZESNA-SKORUPA E, CHEN C, LIU H, KEMPER B. Gene Expression Changes Associated with the Endoplasmic Reticulum Stress Response Induced by Microsomal Cytochrome P450 Overproduction J. BIOL. CHEM. 279 (2004)14 13953–13961
- SZCZESNA-SKORUPA E, STRAUB P, KEMPER B. Deletion of a conserved tetrapeptide, PPGP, in P450 2C2 results in loss of enzymatic activity without a change in its cellular location. Arch. Biochem. Biophys. 304 (1993) 170–175
- TEUTSCH HG, HASENFRATZ MP, LESOT A, STOLTZ C, GARNIER JM, JELTSCH JM, DURST F, WERCK-REICHHART D. Isolierung and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. Proc Natl Acad Sci USA (1993) 4102–4106
- 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., 22 (1994) 4673 – 4680
- TOTH RL, CHAPMAN S, CARR F, SANTA CRUZ F. A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors FEBS Lett. 489 (2001) 215-219
- TREDGER JM UND STOLL S. CYTOCHROMES P450 – their impact on drug treatment. Hospital Pharmacist, 9 (2002) 167 – 173
- TURPEN TH, REINL SJ, CHAROENVIT Y, HOFFMAN SL, FALLARME V, GRILL LK. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus Bio/Technology 13 (1995) 53-57
- TURPEN TH. Tobacco mosaic virus and the virescence of biotechnology Phil Trans R Soc Lond B 354 (1999) 665-673
- UNGER M UND FRANK A. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 2273–2281
- URBAN P, JOBERT AS, LAINÉ R, POMPON D. Cytochrome P450 (CYP) mutants and substrate-specificity alterations: segmentdirected mutagenesis applied to human CYP1A1 Biochem. Soc. Trans. 29 (2001) 2
- URBAN P, WERCK-REICHHART D, TEUTSCH HG, DURST F, REGNIER S, KAZMAIE R, POMPON D. Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast Eur. J. Biochem 222 (1994) 843-850
- VAN DOORSSELAERE J, BAUCHER M, FEUILLET C, BOUDET A, VAN MONTAGU M, INZE D. Isolierung of cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNAs from two important economic species: alfalfa and poplar. Demonstration of a high homology of the gene within angiosperms Plant Physiol. Biochem. 33 (1995) 105-109



- VAUCHERET H, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUREBACH F, GODON C, MOREL JB. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16 (1998) 651–659.
- VERMILION JL, BALLOU DP, MASSEY V, COON MJ. Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P450-reductase J. *Biol. Chem.* 256 (1981) 266-277
- VOINNET O, RIVAS S, MESTRE P, BAULCOMBE D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus *The Plant Journal* 33 (2003) 949–956
- VON SCHUHMANN. Isolierung, Reinigung und Expression zentraler Enzyme der Biosynthese des pflanzlichen Antiarrhythmikums Ajmalin, Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Fachbereich für Biologie (2003)
- 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.* 10 (2002) 1913 – 1918
- WAGNER A, WALDEN A, WALTER C. A cDNA Encoding a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (Accession No.U62394) from *Pinus radiata*.(PGR96-097) *Plant Physiol.* 112 (1996) 1397
- WEN Z, PAN L, BERENBAUM M, SCHULER M. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase, *Insect Bioch.Mol. Biol.* 33 (2003) 937–947
- WIERENGA RK, DE MAEYER MCH, HOL WGJ. Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide-binding proteins. *Biochemistry*, 24 (1985) 1346 – 1357
- WILLFINGER WW, MACKEY K, CHOMCYNski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 (1997) 474 –476, 478–481
- WILLIAMS PA, COSME J, SRIDHAR V, JOHNSON E, MCFREE D. Mammalian microsomal cytochrome p450 monooxygenases : Structural adaptations for membrane binding and functional diversity *Mol Cell* 5 (2000) 121-131
- WILLIAMS PA, COSME J, WARD A, ANGOVE HC, VINKOVIC DM, JHOTI H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin *NATURE* 424, Juli (2003)
- WILLIAMSON J, STOOP J, MASSEL M, CONKLING M, PHARR D. Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16) (1995) 7148-7152
- WU J, So SP, RUAN KH. Determination of the membrane contact residues and solution structure of the helix F/G loop of prostaglandin I<sub>2</sub> synthase *Arch. Biochem. Biophys.* 411 (2003) 27–35

YE Z UND VARNER J. Expression patterns of cinnamic acid 4-hydroxylase gene during lignification in *Zinnia elegans*, *Plant Sci.* 121 (1996) 133-141

YU B, RUPPERT M, STÖCKIGT J. Deoxysarpagine Hydroxylase – A Novel Enzyme Closing a Short Side Pathway of Alkaloid Biosynthesis in *Rauvolfia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 (2002) 2479-2483

## VIII Anhang

### 1 5'- und 3'-Enden der Cytochrom P450-Klone aus dem Projekt Homology cloning

#### 1.1 P450-Klon P7

5'-Ende:

	9	18	27	36	45	54													
ATG	GAG	TTA	CTA	GTT	CTT	CTA	TAC	TAC	ATA	AAT	GCT	GCC	ATA	GTT	GGA	GCA	CTT		
M	E	L	L	V	L	L	Y	Y	I	N	A	A	I	V	G	A	L		
	63	72	81	90	99	108													
GCT	TTC	TTT	CTT	GTT	CTT	CAC	TTG	TCA	TCT	CGG	AAT	CCT	AAG	CCT	GCC	AAA	AAC		
A	F	F	L	V	L	H	L	S	S	R	N	P	K	P	A	K	N		
	117	126	135	144	153	162													
AAT	TCT	CCG	CCT	GAA	GCC	GGT	GGC	AGA	TGG	CCC	ATA	ATT	GGA	CAC	CTT	CAC	CTC		
N	S	P	P	E	A	G	G	R	W	P	I	I	G	H	L	H	L		
	171	180	189	198	207	216													
TTA	GGA	GAG	CTT	CCA	CAC	ATA	AGC	TTG	GCA	GCC	ATG	GCT	GAC	AAC	TAT	GGG	CCA		
L	G	E	L	P	H	I	S	L	A	A	M	A	D	N	Y	G	P		
	225	234	243	252	261	270													
ATC	TTC	ACC	ATC	AGG	CTT	GGT	GTC	AAG	CTA	GCT	GTG	GTT	GTG	AGT	AGC	TGG	GAG		
I	F	T	I	R	L	G	V	K	L	A	V	V	V	S	S	W	E		
	279	288	297	306	315	324													
CTG	GCT	AAA	GTA	TTG	TTC	ACC	ACC	TAT	GAT	GTG	ACT	GTA	TCC	TTA	AGG	CCA	AAA		
L	A	K	V	L	F	T	T	Y	D	V	T	V	S	L	R	P	K		
	333	342	351	360	369	378													
TTT	TTG	GCT	GCT	AAA	TAT	ATG	AGC	TTT	GAC	TAT	GCC	ATG	TTC	GGC	TTC	TCG	CCT		
F	L	A	A	K	Y	M	S	F	D	Y	A	M	F	G	F	S	P		
	387	396	405	414	423	432													
TAT	GGA	GCA	TAT	TGG	CGC	GAG	CTA	CGG	AAA	TTA	ATC	AGC	GTT	GAA	TTG	CTT	TCC		
Y	G	A	Y	W	R	E	L	R	K	L	I	S	V	E	L	L	S		
	441	450	459	468	477	486													
ACT	CGC	AGG	CTA	GAG	CTG	CTC	AAG	CAT	GTT	CGA	GTT	TCT	GAG	ACT	GAG	ATT	TCC		
T	R	R	L	E	L	L	K	H	V	R	V	S	E	T	E	I	S		

```

          495          504          513          522          531
ACA AAG GAG CTT TAC AAG ACT TGG AAT GAT AAG AAA GAT GGA TCA GGG CGT
  T  K  E  L  Y  K  T  W  N  D  K  K  D  G  S  G  R

3'-Ende:

          9          18          27          36          45          54
ATT GGG CCG ACG TCG CAT GCT CCC GGC CGC CAT GGC GGC CGC GGG AAT TCG ATT
  I  G  P  T  S  H  A  P  G  R  H  G  G  R  G  N  S  I

          63          72          81          90          99          108
GAT GTT GAC GTA AGA GGT GCC CAG TTT GAA TTG ATC CCA TTT GGT GCT GGC AGA
  D  V  D  V  R  G  A  Q  F  E  L  I  P  F  G  A  G  R

          117          126          135          144          153          162
AGA ATT TGT CCC GGG GCA GCT TTT GGA CTT CAA ATG TTA CAC CTG GTT CTG GCG
  R  I  C  P  G  A  A  F  G  L  Q  M  L  H  L  V  L  A

          171          180          189          198          207          216
AAT GTG CTG CAA GCT TTC GAG TTC TCA ACT CCG TCT GAT GAA CCC ATT GAT ATG
  N  V  L  Q  A  F  E  F  S  T  P  S  D  E  P  I  D  M

          225          234          243          252          261          270
ACG GAG AGC GCT GGG CTG ACC AAT TGC AAA GCC ACC CCG CTT GAT GTC CTT ATT
  T  E  S  A  G  L  T  N  C  K  A  T  P  L  D  V  L  I

          279          288          297          306          315          324
GCA CCC CGC CTT TCT ACA AGT CTT TAC TAA
  A  P  R  L  S  T  S  L  Y  *

```

Die Vorhandenen Fragmente des P450-Klons P7 ergeben zusammen eine Übereinstimmung für ein Cytochrom P450-Enzym aus der Soya-Bohne, welches bestimmte Aufgaben im Metabolismus von Phenyl-Harnstoff-Herbiziden übernimmt (SIMINSZKY B *et al*, 1999).

## 1.2 P450-Klon P12

5'-Ende:

	9	18	27	36	45	54														
ATG	GCC	CTC	TCT	CTG	GTG	CTC	CTC	ACG	TTC	ACC	TTT	CTC	TTC	CTA	GGA	TAC	TAT			
M	A	L	S	L	V	L	L	T	F	T	F	L	F	L	G	Y	Y			
	63	72	81	90	99	108														
CTA	TAT	CAA	AGG	TTC	CGG	TTC	AAG	CTT	CCT	CCA	GGT	CCA	CGG	TCG	TTG	CCG	ATC			
L	Y	Q	R	F	R	F	K	L	P	P	G	P	R	S	L	P	I			
	117	126	135	144	153	162														
GTT	GGG	AAC	CTC	TAC	GAC	ATA	AAG	CCG	GTG	AGG	TTC	CGT	TGT	TTC	TCC	GAA	TGG			
V	G	N	L	Y	D	I	K	P	V	R	F	R	C	F	S	E	W			
	171	180	189	198	207	216														
TCG	GAA	CAT	TAT	GGC	CCG	ATT	ATA	TCG	GTG	TGG	TTT	GGC	TCG	ACG	ATG	AAC	GTT			
S	E	H	Y	G	P	I	I	S	V	W	F	G	S	T	M	N	V			
	225	234	243	252	261	270														
ATT	GTT	TCC	AGC	TCT	GAA	TTG	GCT	AGG	GAG	GTT	TTG	AAA	GAG	AAT	GAT	CAG	CAG			
I	V	S	S	S	E	L	A	R	E	V	L	K	E	N	D	Q	Q			
	279	288	297	306	315	324														
TTG	GCT	GAC	CGG	CAC	CGG	AGC	CGG	TCT	GCT	GCT	AAG	TTT	AGC	AGA	GAC	GGG	CAG			
L	A	D	R	H	R	S	R	S	A	A	K	F	S	R	D	G	Q			
	333	342	351	360	369	378														
GAC	CTC	ATC	TGG	GCT	GAC	TAC	GGA	CCG	CAC	TAT	GTG	AAG	GTT	AGA	AAA	GTC	TGC			
D	L	I	W	A	D	Y	G	P	H	Y	V	K	V	R	K	V	C			
	387	396	405	414	423	432														
ACC	CTT	GAA	CTG	TTC	TCT	CCT	AAG	AGG	CTT	GAA	GCT	CTA	AGA	CCC	ATC	AGA	GAA			

T L E L F S P K R L E A L R P I R E

441 450 459 468 477

GAT GAG GTC ACG GCC ATG GTG GAG TCC ATT TAT AAA GAC TGC ACC AAT GCT

D E V T A M V E S I Y K D C T N A

### 3'-Ende:

9 18 27 36 45 54  
CGC AGG GAC CGC CTC ACT CGT GCC ATC ATG GAA GAG CAT ACC CTT GCT CGC CAG  
R R D R L T R A I M E E H T L A R Q

63 72 81 90 99 108  
AAG AGT GGA GGA GCC AAG CAA CAC TTT GTT GAT GCC TTG CTT ACT CTC AAA GAT  
K S G G A K Q H F V D A L L T L K D

117 126 135 144 153 162  
CAA TAC GAT CTT AGT GAA GAC ACC ATC ATT GGC CTT CTA TGG GAC ATG ATT ACT  
Q Y D L S E D T I I G L L W D M I T

171 180 189 198 207 216  
GCT GGG ATG GAC ACC ACT GCC ATC AGT GTC GAA TGG GCT ATG GCT GAG TTA ATA  
A G M D T T A I S V E W A M A E L I

225 234 243 252 261 270  
AAG AAT CCT AGG GTC CAA CAA AAA GCC CAA GAG GAG TTG GAC CGA GTA ATC GGG  
K N P R V Q Q K A Q E E L D R V I G

279 288 297 306 315 324  
TAC GAC CGG GTG ATG ACT GAA ACG GGC TTT TCA AGC CTC CCC TAC CTA CAA TGT  
Y D R V M T E T G F S S L P Y L Q C

333 342 351 360 369 378  
GTA GCC AAG GAA GCG CTG AGG TTG CAC CCT CCA ACA CCT CTG ATG CTT CCT CAT  
V A K E A L R L H P P T P L M L P H

387 396 405 414 423 432  
CGA GCC AAT GCC AAC GTC AAG ATC GGT GGC TAC GAC ATT CCC AAG GGC TCA AAC  
R A N A N V K I G G Y D I P K G S N

441 450 459 468 477 486  
GTG CAC GTA AAC GTG TGG GCA GTC GCT CGA GAT CCA GCC GTG TGG AAG AGC CCT  
V H V N V W A V A R D P A V W K S P

---

495	504	513	522	531	540
ACA GAA TTC AGG CCG GAG AGG TTC CTT GAG GAG GAT GTT GAC ATG AAG GGT CAT					
T E F R P E R F L E E D V D M K G H					
549	558	567	576	585	594
GAT TTT AGG CTA CTT CCG TTT GGT GCA GGT AGA AGA GTA TGC CCA GGG GCA CAA					
D F R L L P F G A G R R V C P G A Q					
603	612	621	630	639	648
TTG GGC ATC AAT CTG GTC GCG TCG ATG TTG GGC CAC CTT TTG CAC CAT TTC AAT					
L G I N L V A S M L G H L L H H F N					
657	666	675	684	693	702
TGG GCT CCA GCT AAT GGG TTG AGC CCA GAT GAA ATT GAC ATG GGG GAG AAC CCA					
W A P A N G L S P D E I D M G E N P					
711	720	729	738	747	756
GGC CTG GTA ACC TAT ATG AGG ACC CCA CTT GAG GCA GTT CCT ACC CCA AGA TTA					
G L V T Y M R T P L E A V P T P R L					
765	774	783	792	801	810
CCT GCA GAG TTA TAC AAA CGT GTG GTT GTG GAT ATA TAA					
P A E L Y K R V V V D I *					

Die Fragmente des P450-Klons P12 weisen eine Übereinstimmung zu einer Hydroxylase aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel von *Ocimum basilicum* auf (GANG D *et al*, 2002)

### 1.3 P450-Klon P13

5'-Ende:

9	18	27	36	45	54
ATG GAG TTT CTC TAC TGC ACT CTG GCG TTG ATC ATC TCC ATA TTC TTT ACT AGA					
M E F L Y C T L A L I I S I F F T R					
63	72	81	90	99	108
AGA TAC ATA CTA AAG CAT AAG AAG GAC AAA TTG CCC CCA AGC CCA CCA GCT CTT					
R Y I L K H K K D K L P P S P P A L					

---

117	126	135	144	153	162
CCG CTC TTA GGC CAT	CTC CAC CTC	CTG AAA GGT	GTC CTC CAC	CGC TCT CTC	CAA
P L L G H	L H L L K	G V L H R	S L Q		
171	180	189	198	207	216
TCT ATC TCC CTT AAG	TAC GGT CCC	ATC GTC TTC	CTT CGG TTT	GGG GTT CGT	CGT
S I S L K Y	G P I V F	L R F G V	R R		
225	234	243	252	261	270
TAC CTT GTC GTC TCT	TCT CCG GAC	ATC GCC GAG	GAA TGC TTC	ACC AAG AAC	GAT
Y L V V S S	P D I A E	E C F T K	N D		
279	288	297	306	315	324
ATT GTA TTT GCA AAC	CGG CCT GAG	TCC CTC GCC	TCC AAG CAC	CTT TCT TAC	AAC
I V F A N R	P E S L A	S K H L S	Y N		
333	342	351	360	369	378
GGC ACC ACC GTC GGA	TTC GCT CCC	TAC GGA GAC	TAC TGG CGC	AAC CTC CGC	CGT
G T T V G F	A P Y G D	Y W R N L	R R		
387	396	405	414	423	432
GTC TCC GCC ATC AAT	ATC TTT TCA	CCC CTC AGC	CTG CAG AAC	TCC TTA CGC	ATC
V S A I N I	F S P L S	L Q N S L	R I		
441	450	459	468	477	486
CGG GTT GAG GAA ACC	CGG CTC ACG	GTC AAA AGA	TTG TTG CCG	GAA TCG AAT	ACC
R V E E T R	L T V K R	L L P E S	N T		
495	504	513	522	531	540
GAG ACA TGG ACG GAA	CTG GAC CTG	ACT TCT CTG	TTC AAA GAA	TTG GTG GAC	GAC
E T W T E L	D L T S L	F K E L V	D D		
549	558	567	576	585	
ACG ATC ATG AGG ATG	ACT TGT GGA	AAA AGA TGG	TTC AAA TCA	GCT	
T I M R M T	C G K R W	F K S A			

## 3'-Ende:

9	18	27	36	45	54
ATG ATT GGT GAT TGC	CGG AGA AAG	GGA GGA GCT	TCA AGT TCC	ACT GAT AAG	CAG
M I G D C R	R K G G A	S S S T D	K Q		
63	72	81	90	99	108



AAG AGG ACG ATT GTT GAA GCA CTG TTG TCG GCA CAA GAA GCT GAA CCT GAG CAC  
 K R T I V E A L L S A Q E A E P E H  
 117 126 135 144 153 162  
 TAT ACA GAC GAT GTC ATC AAG GGG TTG ATC CTG ATT ATG TTT ACA GCA GGA ACT  
 Y T D D V I K G L I L I M F T A G T  
 171 180 189 198 207 216  
 GAT ACC ACC AGT CTG ACC ATG CAA TGG GCA ATG GCC CTC TTG TTA GAT CAT CCA  
 D T T S L T M Q W A M A L L L D H P  
 225 234 243 252 261 270  
 GAG GTC CTT GAC AAG GCA AAG ATG GAG TTA GAA AAC AAT CTT GCA CCA GGT CAT  
 E V L D K A K M E L E N N L A P G H  
 279 288 297 306 315 324  
 TTG ATA GAG GAT GCT GAT CTT GCT AAA CTG CCT TAC TTA TCT TGC ATA ATC AAT  
 L I E D A D L A K L P Y L S C I I N  
 333 342 351 360 369 378  
 GAA ACA TTG AGA CTT TTC CCA GCT GCA CCG CTT CTG CTG CCT CAT TTT TCT TCA  
 E T L R L F P A A P L L L P H F S S  
 387 396 405 414 423 432  
 GAA GAT TGC ACC GTA AGT GGT TAC AAG GTT CCT AAA GAT ACA ACC TTG TTT GTT  
 E D C T V S G Y K V P K D T T L F V  
 441 450 459 468 477 486  
 AAT GTT TGG GCT ATT CAC AGA GAC CCT AAT GTA TGG GAA GAG CCT ACA AAG TTC  
 N V W A I H R D P N V W E E P T K F  
 495 504 513 522 531 540  
 AAG CCT GAA AGG TTC GAG GGA ATT GAA GTG GGA TCT GAA GGG TTC AAA TAT CTT  
 K P E R F E G I E V G S E G F K Y L  
 549 558 567 576 585 594  
 CCA TTC GGA AAG GGT AGA AGA GCT TGT CCA GGA AAT ACC TTA GCC CTG AGG TTT  
 P F G K G R R A C P G N T L A L R F  
 603 612 621 630 639 648  
 GTG GGA TTG GTA CTG GGC ACA TTG ATC CAG TGG TTT GAT TGG AAA AGA TTG GGA  
 V G L V L G T L I Q W F D W K R L G  
 657 666 675 684 693 702

CTT GAG ATA GAA TAC TTA GAG GAA AAT GCT GGG CTC ACT ATA CAT AAG GCC AAA  
 L E I E Y L E E N A G L T I H K A K

711 720 729 738 747 756  
 CCT TTG AAG GCG TTG TAC AGG CCG CGC CAA GCC AGG ATT AAC TCC CTT ACC TCT  
 P L K A L Y R P R Q A R I N S L T S

765  
 CTT CTT TGA  
 L L \*

Der P450-Klon P13 zeigt Übereinstimmungen mit einem Cytochrom P450-Enzym aus der Familie CYP81B1 aus *Helianthus tuberosus* (CABELLO-HURTADO F, 1998) und ist mit großer Wahrscheinlichkeit in die Verstoffwechselung von Fettsäuren involviert.

## 2 Teilsequenzen aus dem Homology Cloning Projekt

Die aufgeführten Sequenzen lassen noch keine Rückschlüsse auf eine endgültige Zugehörigkeit zu einer P450-Familie erahnen. In weiteren Schritten müssen die vorhandenen Sequenzen genutzt werden, um neue P450-Volllängklone zu ermitteln.

### 2.1 P6

9 18 27 36 45 54  
 TTG GAT CCG GAA GGG TTT GGG CCG GAG GGG TTC ATG GGG AAG GCT ATT GAC GTG  
 L D P E G F G P E G F M G K A I D V

63 72 81 90 99 108  
 AAG GGA CAG GAC TTC GAG CTG CTG CCG TTT GGC CCC GGC CCC AGC CCC TGC CCC  
 K G Q D F E L L P F G P G P S P C P

116  
 GGG CCC TT  
 G P

**2.2 P8**

9                    18                    27                    36                    45                    54  
 TTG GAT CCG GAG GGG TTT GGG CCG GAG GGG TTC GTC GAC GGA ACG ATT GAT TTG  
 L D P E G F G P E G F V D G T I D L  
  
 63                    72                    81                    90                    99                    108  
 CAA GGG CAG GAC TTT CAG TTA GTA CCA TTC GGC CCC GGC CCC ACC CCC TGC CCC  
 Q G Q D F Q L V P F G P G P T P C P  
  
 116  
 GGG CCC TT  
 G P

**2.3 P9**

9                    18                    27                    34                    45                    54  
 GGG CCG GAA GGG TCT GTA GGG AGC AAA ATT CAT GTT GGG GGA ATC ATT TTG GAG  
 G P E G S V G S K I H V G G I N L E  
  
 63                    72                    81                    90                    99                    108  
 CTC ATT CCG TTT GGC CCC GGC CCC ACC CCC TGT CCC GGG CCC TAA ATC GAA TTC  
 L I P E G P G P T P C P G P L I E F  
  
 117                    126                    135                    144  
 CCG CGG CCG CCA TGG CGG CCG GGA GCA TGC GAC GTC GGG  
 P R P P W R P G A C D V G



**2.6 P14**

9	18	27	36	45	54
GGA TGG GCT GGA TTT GAT CCG TCT CGA AGC CCT GGA GCA TTA TAC CCA AAT GAG					
G W A G F D P S R S P G A L Y P N E					
63	72	81	90	99	108
ATT ATA TCA GAT TTT GCC TTC TTG CCC TTT GGC GGA GGA CCA AGG AAA TGT GTA					
I I S D F A F L P F G G G P R K C V					
117	126	135	144	153	162
GGA GAC CAG TTT GCA CTT ATG GAG TCG ACC ATA GCA TTG GCA ATG TTA TTG CAG					
G D Q F A L M E S T I A L A M L L Q					
171	180	189	198	207	214
AAG TTT GAC GTG GAG CTG AAG GGA CCA CCA GAG GCC GTA GAA CTT GTT ACA GGA					
K F D V E L K G P P E A V E L V T G					
225	234	243	252	261	270
GCA ACA ATC CAT ACC AAA AAT GGA TTG TGG TGC AGA TTG AAG AAG AGG TCA AAC					
A T I H T K N G L W C R L K K R S N					
279	288	297	306		
CCA CGG ACG AAG TCC TCT TGT GAA GAG GTT GAA AAT TGA					
P R T K S S C E E V E N *					

**2.7 P15**

9	18	27	36	45	54
GGC GCG AGA GGG CAG CAT TTC GAG CTC CTG CTC AAA GTC AAG AGC GAC ATA GGC					
G A R G Q H F E L L L K V K S D I G					
63	72	81	90	99	108
CAA CTT TTC CTT AAT ATC ACG GAC AAT TTC CCG TTC AGC AGA GGT GGT AAA CAT					
Q L F L N I T D N F P F S R G G K H					
117	126	135	144	153	162
GTA ACC TCT TTC AGT GAG GAT CTT CAT GAG TTG ATC GGT GAG GTC ACG ACC TGC					
V T S F S E D L H E I L G E V T T C					
171	180	189			
AAG GTC AAG ACG AAG AAT AGC ATG GGG TAG					
K V K T K N S M G *					





## 2.13 P21

```

          9          18          27          36          45          54
GAG GGA ATT GAA GTG GGA TCT GAA GGG TTC ATA TTT CTT CCA TTC GGA AAG GGG
  E  G  I  E  V  G  S  E  G  F  I  F  L  P  F  G  K  G

          63          72          81          90          99          108
AGA AGA GCT TGT CCA GGA AAT ACC TTA GCC CTG AGG TTT GTG GGA TTG GTA CTG
  R  R  A  C  P  G  N  T  L  A  L  R  F  V  G  L  V  L

          117         126         135         144         153         162
GGC ACA TTG ATC CAG TGG TTT GAT TGG AAA AGA TTG GGA CCT GAG ATA GAA TAC
  G  T  L  I  Q  W  F  D  W  K  R  L  G  P  E  I  E  Y

          171         180         189         198         207         216
TCA GAG GAA AAA GCT GGA CTC ACC ATA CAT AAG GCC AAA CCT TTG AAG GCA TTG
  S  E  E  K  A  G  L  T  I  H  K  A  K  P  L  K  A  L

          225         234         243         252         261
TAC AGG CCG CGC CAA GCC ATG ACC AAT TCC CTT ACC TCT CTT CTT TGA
  Y  R  P  R  Q  A  M  T  N  S  L  T  S  L  L  *

```

## 3 Synthetisierte Primer

### 3.1 Primer für Einklonierung in pICH10990

<b>P1forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG AGA TAA TGA ATT TCT CT - 3' Schmelztemperatur: 64,8 °C, GC-Anteil: 34,3%
<b>P3forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG AAG ATC AAA ATT GGT TG - 3' Schmelztemperatur: 66 °C, GC-Anteil: 37,1%
<b>P5forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGA GAA GAG CAG AGC - 3' Schmelztemperatur: 66,8 °C, GC-Anteil: 46,7%
<b>P7forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG AGT TAC TAG TTC TTC TA - 3' Schmelztemperatur: 66 °C, GC-Anteil: 37,1%



<b>P12forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG CCC TCT CTC TGG TGC TC - 3' Schmelztemperatur: 73 °C, GC-Anteil: 54,3%
<b>P13forBsa1</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG AGT TTC TCT ACT GCA CT - 3' Schmelztemperatur: 68,3 °C, GC-Anteil: 42,9%
<b>P1revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TTA ATT TCC TGC AAC GGA GAT - 3' Schmelztemperatur: 64 °C, GC-Anteil: 40%
<b>P3revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TCA GAG TTT GGC TAG CAA ATC - 3' Schmelztemperatur: 65,4 °C, GC-Anteil: 43,3%
<b>P5revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TCA TTT GCA TAG CCG ATA ACT - 3' Schmelztemperatur: 64 °C, GC-Anteil: 40%
<b>P7revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TTA GAT AAG ACT TGT AGA AAG - 3' Schmelztemperatur: 61,3 °C, GC-Anteil: 33,3%
<b>P12revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TTA TAT ATC CAC AAC CAC ACG - 3' Schmelztemperatur: 64 °C, GC-Anteil: 40%
<b>P13revPst1</b>
5'- AAA CTG CAG TCA AAG AAG AGA GGT AAG GGA - 3' Schmelztemperatur: 65,4 °C, GC-Anteil: 43,3%
<b>SG-Ma-for</b>
5'- TTT GGT CTC AAG GTA TGG ACA ATA CTC AAG CTG AG - 3' Schmelztemperatur: 68,3 °C, GC-Anteil: 42,9%
<b>SG-Ma-rev</b>
5'- AAA CTG CAG TTA GGT TTT TTG CCT CTT GAC - 3' Schmelztemperatur: 64 °C, GC-Anteil: 40%

### 3.2 Primer für unbekannte putative Reduktase zur Einklonierung in pQE2-Expressionsvektor

<b>R/-for-pQE2</b>
5´- GCA TGC GCA AAT GTC CAC TCT AAG TGT CG - 3´ Schmelztemperatur: 68,1 °C, GC-Anteil: 51,7%
<b>P1forBsa1</b>
5´- CCG CGG TTA CTT GAG CGA ATT TGC AAC - 3´ Schmelztemperatur: 66,5 °C, GC-Anteil: 51,9%

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

### **Vortrag und Posterpräsentation (Abstract)**

WOLL J, GIRITCH A, STÖCKIGT J. A Novel Virus-Based Plant Expression System For Genes Of Alkaloid Biosynthesis. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft – Joint Meeting 2004, Regensburg, Deutschland

## Danksagungen

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. Joachim Stöckigt für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit. Bei der Suche nach Problemlösungen bin ich jederzeit auf offene Ohren gestossen und konnte auch bei der Erstellung dieses Manuskriptes immer auf kritische sowie konstruktive Kritik bauen.

Dr. Martin Ruppert danke ich für die überaus kompetente Einarbeitung und seine Geduld und Kreativität bei der Findung neuer Lösungsansätze verschiedener Probleme des Laboralltags.

Ich möchte mich bei der Landesgraduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz bedanken, die durch die zweijährige finanzielle Förderung und Abverlangung der regelmässigen Anträge und Zwischenberichte die Fertigstellung des Promotionsvorhabens forciert hat.

Besonders dankbar bin ich meinen KollegInnen der Arbeitsgruppe Stöckigt und den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am Mainzer Institut für Pharmazie, die immer für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Es hat stets Spass bereitet mich mit den Genannten nicht nur im Labor auszutauschen.

Dem Unternehmen Icon Genetics und besonders den Mitarbeitern vor Ort danke ich für die professionelle und sehr kollegiale Unterstützung bei meinem Forschungsaufenthalt im Biozentrum Halle. Die Ausstattung mit den nötigen Materialien und vor allem dem Know How war elementar für die Entwicklung dieser Dissertation.

An dieser Stelle gilt mein persönlicher Dank meinen Eltern und Susi für Rat, Geduld sowie Unterstützung in jeder Phase der Arbeit.