

Reinigung und Coexpression von Enzymen der Raubasin-Biosynthese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

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

vorgelegt von

Bodo Hammes
geb. in Neuwied

Mainz
2004

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2005

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I EINLEITUNG..... | 1 |
| 1 CATHARANTHUS ROSEUS – EINE QUELLE BEDEUTENDER INDOLALKALOIDE | 1 |
| 2 DIE BIOSYNTHESE DER INDOLALKALOIDE ALS BASIS FÜR ‚METABOLIC-ENGINEERING‘ | 4 |
| 3 COEXPRESSION VON ENZYMEN DER NATURSTOFFBIOSYNTHESE | 6 |
| 4 AUFGABENSTELLUNG | 9 |
| II MATERIAL..... | 10 |
| 1 BIOLOGISCHES MATERIAL..... | 10 |
| 1.1 Pflanzenzellkulturen..... | 10 |
| 1.2 Bakterienstämme..... | 11 |
| 2 KULTURMEDIEN..... | 11 |
| 2.1 Medium für Pflanzenzellkulturen..... | 11 |
| 2.2 Bakterienmedien | 12 |
| 3 PUFFERLÖSUNGEN | 12 |
| 4 FERTIGSÄULEN, LEERSÄULEN UND SÄULENMATERIALIEN | 14 |
| 5 VEKTOREN | 15 |
| 6 KITS FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE | 16 |
| 7 ENZYME, MARKER UND ZUBEHÖR FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE | 16 |
| 8 FEINCHEMIKALIEN UND ZUBEHÖR..... | 17 |
| 9 GERÄTE..... | 18 |
| III METHODEN..... | 22 |
| 1 REINIGUNG VON PROTEINEN UND DEREN ANALYTIK..... | 22 |
| 1.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenzellkulturen..... | 22 |
| 1.2 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Bakterienzellkulturen | 23 |
| 1.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen | 23 |
| 1.3.1 Dialyse..... | 23 |
| 1.3.2 Verwendung einer Entsalzungssäule..... | 24 |
| 1.3.3 Konzentrieren von Proteinlösungen | 24 |
| 1.3.3.1 Konzentrieren kleiner Volumina mit Einwegkonzentratoren | 24 |
| 1.3.3.2 Konzentrieren kleiner Volumina mit Trichloressigsäure | 24 |
| 1.4 Säulenchromatographische Reinigung von Enzymen..... | 25 |
| 1.4.1 Anionenaustauschchromatographie | 25 |
| 1.4.1.1 DEAE-Sepharose - Fast Flow | 25 |
| 1.4.1.2 Source 30Q | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.4.1.3 MonoQ..... | 26 |
| 1.4.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)..... | 26 |
| 1.4.3.1 Source 15Phe | 27 |
| 1.4.3.2 Hydroxyapatit..... | 27 |
| 1.4.4 Affinitätschromatographie..... | 27 |
| 1.4.4.1 2',5'-ADP-Sepharose 4B..... | 27 |
| 1.4.4.2 HiTrap Blue HP..... | 28 |
| 1.4.4.3 EAH-Sepharose 4B | 28 |
| 1.4.5 Größenausschlusschromatographie..... | 30 |
| 1.4.5.1 Sephadex G25 | 30 |
| 1.4.5.2 Sephacryl S-100 HR..... | 31 |
| 1.5 Gelelektrophoretische Methoden..... | 32 |
| 1.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 32 |
| 1.5.2 Färbemethoden..... | 34 |
| 1.5.2.1 Coomassie-Färbung..... | 34 |
| 1.5.2.2 Silberfärbung..... | 35 |
| 1.6 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen..... | 36 |
| 1.7 Bestimmung der Enzymaktivität | 37 |
| 2 CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE METHODEN | 38 |
| 2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)..... | 38 |
| 2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)..... | 38 |
| 2.3 Massenspektrometrie | 41 |
| 2.4 UV/VIS-Spektroskopie..... | 42 |
| 3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN..... | 43 |
| 3.1 Gewinnung von Nukleinsäuren..... | 43 |
| 3.1.1 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von Plasmid DNA..... | 43 |
| 3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Minipräparationen („Quicktest“)..... | 43 |
| 3.1.1.2 Isolierung hochreiner Plasmid-DNA..... | 44 |
| 3.1.1.3 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen | 44 |
| 3.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen | 45 |
| 3.3 Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 45 |
| 3.4 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren..... | 46 |
| 3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 46 |
| 3.4.2 Ligation von DNA..... | 46 |
| 3.4.3 Restriktion von DNA..... | 47 |
| 3.4.5 Auffüllen von 5'-Überhängen (Endfilling)..... | 47 |
| 3.5 Elektrophorese von Nukleinsäuren..... | 49 |
| 3.6 Transformation von Plasmid DNA in Bakterienzellen..... | 49 |
| 3.6.1 Herstellung thermokompetenter Bakterienzellen..... | 50 |
| 3.6.2 Transformation von DNA in thermokompetente Zellen | 50 |
| 3.7 Entwicklung und Herstellung eines Coexpressions-Systems..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4 ELEKTRONISCHE DATENBANKEN UND WICHTIGE INTERNETSEITEN | 52 |
| IV ERGEBNISSE..... | 53 |
| 1 MOLEKULARBIOLOGISCHER TEIL | 53 |
| 1.1 <i>Klonierung der Strictosidin-Synthase-cDNA in pQE-70</i> | 53 |
| 1.1.1 Synthese der Strictosidin-Synthase-cDNA mittels PCR | 53 |
| 1.1.2 Isolierung der Strictosidin-Synthase-cDNA | 56 |
| 1.1.3 Umklonierung des Strictosidin-Synthase-Gens in <i>pQE-70</i> | 60 |
| 1.2 <i>Klonierung der Strictosidin-β-D-Glucosidase-cDNA in pQE-70</i> | 62 |
| 1.2.1 Synthese der SG-cDNA mit integrierter Ribosomenbindestelle mittels PCR..... | 62 |
| 1.2.2 Isolierung der Strictosidin- β -D-Glucosidase-cDNA mit vorgeschalteter Ribosomenbindestelle | 65 |
| 1.2.3 Umklonierung des RBS-SG-Gens in <i>pQE-70</i> | 67 |
| 1.3 <i>Konstruktion des Coexpressions-Systems</i> | 70 |
| 1.3.1 Isolierung der MCS aus <i>pSE-280</i> und Einbau in <i>pQE-70-STR</i> | 70 |
| 1.3.2 Synthese der RBS-SG-cDNA mittels PCR | 75 |
| 1.3.3 Isolierung des PCR-Produkts RBS-SG | 76 |
| 1.3.4 Einfügen der RBS-SG-cDNA in das Expressions-System <i>pQE-70bh-STR</i> | 78 |
| 1.4 <i>Expression, Aktivitätstests und Produktidentifizierung</i> | 82 |
| 1.4.1 Expressionsversuche und Aktivitätstests..... | 82 |
| 1.4.1.1 <i>pQE-70-STR</i> und <i>pQE-70-RBS-SG</i> in M15-Zellen | 83 |
| 1.4.1.1.1 <i>pQE-70-STR</i> in M15-Zellen | 83 |
| 1.4.1.1.2 <i>pQE-70-RBS-SG</i> in M15-Zellen..... | 85 |
| 1.4.1.2 <i>pQE-70bh-STR-RBS-SG</i> in M15-Zellen | 88 |
| 1.4.2 Identifizierung von Cathenamin als Endprodukt des gekoppelten Assays | 93 |
| 2 PROTEINREINIGUNG | 99 |
| 2.1 <i>Entwicklung eines Aktivitätstests für die Cathenamin-Reduktase</i> | 100 |
| 2.2 <i>Test verschiedener Pflanzenzellen auf Cathenamin-Reduktase-Aktivität</i> | 100 |
| 2.3 <i>Reinigung der Cathenamin-Reduktase</i> | 103 |
| 2.3.1 Extraktion löslicher Proteine aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen | 103 |
| 2.3.2 Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose - Fast Flow | 104 |
| 2.3.3 Hydroxyapatit-Chromatographie | 106 |
| 2.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ..... | 107 |
| 2.3.5 Kontrolle des Reinigungserfolgs per SDS-Gelelektrophorese | 109 |
| 2.4 <i>Versuche zur Sequenzierung der Cathenamin-Reduktase</i> | 110 |
| 2.5 <i>Molekulargewichtsbestimmung</i> | 111 |
| 2.6 <i>Co-Substratspezifität</i> | 112 |
| 2.7 <i>Analyse der entstandenen Reaktionsprodukte</i> | 114 |
| 2.7.1 Identifizierung eines unbekanntes Nebenprodukts | 114 |
| 2.7.2 Identifizierung der entstandenen Hauptprodukte..... | 115 |
| 2.8 <i>Weitere Reinigungsversuche</i> | 116 |

| | |
|---|------------|
| IV DISKUSSION | 118 |
| 1 ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DES COEXPRESSIONS-SYSTEMS | 118 |
| 1.1 Klonierung der Strictosidin-Synthase und der Strictosidin- β -D-Glucosidase | 119 |
| 1.2 Herstellung und Test des Coexpressions-Systems | 123 |
| 2 PROTEINREINIGUNG | 128 |
| 2.1 Reinigungsprotokoll für die Cathenamin-Reduktase | 131 |
| 2.2 Charakterisierung der isolierten Cathenamin-Reduktase..... | 134 |
| 3 AUSBLICK | 137 |
| VI ZUSAMMENFASSUNG | 139 |
| VII LITERATURVERZEICHNIS | 141 |
| VIII ANHANG | 149 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| % (m/V) | Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung) |
| % (V/V) | Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung) |
| A | Adenin |
| A ₂₈₀ | Absorption bei 280 nm |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| Amp | Ampicillin |
| Ampuwa | Wasser für Injektionszwecke |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| <i>Bam</i> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| <i>Bgl</i> | <i>Bacillus globigii</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin) |
| C | Cytosin |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CR | Cathenamin-Reduktase |
| Da | Dalton |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DEAE- | Diethylaminoethyl- |
| DMAPP | Dimethylallyldiphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C,G, T) |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| EDC | ([N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-HCl]) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EI | Electron-Impact (Elektronenstoß-Ionisation) |
| EtOH | Ethanol |
| eV | Elektronenvolt |
| F ₂₅₄ | Fluoreszenzindikator |
| FM | Fließmittel |
| g | Gravitationskonstante (g = 9.81 m/s ²) |
| G | Guanin |
| Glu | Glucose |
| HA | Hydroxyapatit |
| HCl | Salzsäure |

| | |
|----------------------|--|
| HIC | Hydrophobe Interaktionschromatographie |
| <i>Hind</i> | <i>Haemophilus influenza</i> |
| His | Histidin |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| IPP | Isopentenylidiphosphat |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid |
| Kan | Kanamycin |
| kat | Katal (Umsatz von 1 Mol Substrat pro Sekunde) |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| KPi | Kaliumphosphat |
| <i>Kpn</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| LB | LURIA-BERTANI |
| LiOH | Lithiumhydroxid |
| LMW | Marker zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen |
| log | Logarithmus |
| LS | LINSMAIER-SKOOG |
| Lux | Beleuchtungsstärke |
| M | molare Konzentration |
| m/z | Verhältnis Masse/Ladung |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| MeOH | Methanol |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| <i>Mlu</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| mM | Millimolar |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| M_r | Molekulargewicht |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSH | β -Mercaptoethanol |
| NADH+H ⁺ | Reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid |
| NADPH+H ⁺ | reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NEB | New England Biolabs |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilo Triacetic Acid (Nickel-Nitriloessigsäure) |

| | |
|------------------|---|
| OD | optische Dichte |
| Pa | Pascal |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| <i>Pst</i> | <i>Providencia stuartii</i> |
| RBS | Ribosomenbindestelle |
| R_f | relative Laufstrecke |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RP | Reversed Phase (Umkehrphase) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RS | Raubasinsäure |
| R_t | Retentionszeit |
| RT | Raumtemperatur |
| <i>Sac</i> | <i>Streptomyces achromogenes</i> |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| sec | Sekunde |
| SG | Strictosidin- β -D-Glucosidase |
| <i>Sph</i> | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> |
| STR | Strictosidin-Synthase |
| T | Thymin |
| TAE | Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| u | Unit (1u = 16.67 nkat) |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| Vis | Sichtbares Licht |
| VT | Volumenteil |
| W | Watt |
| λ_{\max} | Absorptionsmaximum |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: <i>Catharanthus roseus</i> (L.) am Naturstandort | 1 |
| Abb. 2: Vinblastin und Vincristin aus <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (FAVRETTO <i>et al.</i> , 2001) | 2 |
| Abb. 3: Raubasin und Serpentin als Hauptinhaltsstoffe in <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don | 3 |
| Abb. 4: Enzymatische Bildung von Raubasin aus Tryptamin und Secologanin über die Zwischenprodukte Strictosidin und Cathenamin..... | 5 |
| Abb. 5: Darstellung des Endfillings am Beispiel des Vektorsystems <i>pQE-70-STR</i> ... | 48 |
| Abb. 6: Primerentwicklung für die Strictosidin-Synthase mit farblich hervorgehobenen Restriktionsschnittstellen..... | 54 |
| Abb. 7: Agarosegel (1 %ig) nach PCR zur Generierung der Schnittstellen für <i>Sph</i> I und <i>Bam</i> H I..... | 55 |
| Abb. 8: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau der STR-cDNA im Vektor <i>pGEM-T</i> mit <i>Sph</i> I und <i>Bam</i> H I zur Insert-Kontrolle..... | 57 |
| Abb. 9: Darstellung der möglichen Fragmente bei einem Verdau mit <i>Sph</i> I und <i>Bam</i> H I | 58 |
| Abb. 10: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von <i>pGEM-T-STR</i> zur Generierung der <i>Sph</i> I- und <i>Bam</i> H I-Schnittstellen..... | 59 |
| Abb. 11: Vektorkarte des <i>pQE-70</i> -Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktions-schnittstellen für <i>Sph</i> I und <i>Bam</i> H I..... | 61 |
| Abb. 12: 5'- und 3'-Enden der Strictosidin- β -D-Glucosidase cDNA mit farblich hervorgehobenen Forward- und Reverse-Primern | 62 |
| Abb. 13: Agarosegel (1 %ig) nach PCR zur Gewinnung der SG-cDNA unter gleichzeitiger Generierung der Schnittstellen für <i>Bam</i> H I und <i>Bgl</i> II | 64 |
| Abb. 14: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von <i>pGEM-T-RBS-SG</i> zur Generierung der <i>Bam</i> H I- und <i>Bgl</i> II-Schnittstellen..... | 66 |
| Abb. 15: Vektorkarte des <i>pQE-70</i> -Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen für <i>Bam</i> H I und <i>Bgl</i> II | 68 |
| Abb. 16: Darstellung der identischen ‚sticky-ends‘ der Restriktionsenzyme <i>Bam</i> H I und <i>Bgl</i> II | 68 |
| Abb. 17: Isolierung der MCS aus <i>pSE-280</i> sowie Generierung der Restriktions- schnittstellen im Plasmid <i>pQE-70-STR</i> mittels <i>Bam</i> H I und <i>Hind</i> III | 72 |
| Abb. 18: Nachweis des erfolgreichen Einbaus der neuen MCS mit einer Länge von 253 bp in <i>pQE-70-STR</i> | 74 |
| Abb. 19: Vektorkarte des <i>pQE-70bh-STR</i> -Plasmids mit den farblich gekenn- zeichneten Restriktionsschnittstellen für <i>Sph</i> I, <i>Bam</i> H I und <i>Hind</i> III | 74 |
| Abb. 20: Entwicklung eines Reverse-Primers für die Strictosidin- β -D-Glucosidase (SGrev) mit farblich hervorgehobener Restriktionsschnittstelle | 75 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Abb. 21: | Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von <i>pGEM-T-RBS-SG</i> zur Generierung der <i>Bam</i> H I- und <i>Kpn</i> I-Schnittstellen | 77 |
| Abb. 22: | Vektorkarte des <i>pQE-70bh-STR-RBS-SG</i> -Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen für <i>Sph</i> I, <i>Bam</i> H I und <i>Kpn</i> I | 79 |
| Abb. 23: | Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von <i>pQE70bh-STR-RBS-SG</i> zum Nachweis der erfolgreichen Ligation der RBS-SG-cDNA in <i>pQE70bh-STR</i> | 80 |
| Abb. 24: | Enzymatische Bildung von Strictosidin aus Tryptamin und Secologanin... | 83 |
| Abb. 25: | HPLC-Ergebnis der Aktivitäts-tests der Strictosidin-Synthase in <i>pQE-70-STR</i> | 85 |
| Abb. 26: | Bildung des Strictosidin-Aglykons und anschließende Umlagerung zu Cathenamin | 86 |
| Abb. 27: | HPLC-Ergebnis der Aktivitätstests der Strictosidin- β -D-Glucosidase in <i>pQE-70</i> | 87 |
| Abb. 28: | HPLC-Ergebnis der Aktivitätstests des Coexpressions-Systems in <i>pQE-70bh-STR-RBS-SG</i> | 91 |
| Abb. 29: | Zeitabhängige Bildung von Nebenprodukten aus Cathenamin im Laufe der Inkubation..... | 92 |
| Abb. 30: | Reduktion von Cathenamin zu Tetrahydroalstonin durch Zusatz von NaBH ₄ | 94 |
| Abb. 31: | EI-Massenspektrum des Reduktionsprodukts von Cathenamin im Vergleich mit einem THA-Referenzspektrum..... | 95 |
| Abb. 32: | EI-Massenspektrum des unbekanntes Nebenprodukts | 96 |
| Abb. 33: | EI-Massenspektrum des extrahierten Reaktionsprodukts im Vergleich mit einem Referenzspektrum von Cathenamin..... | 98 |
| Abb. 34: | Schematische Darstellung von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin als mögliche Reduktionsprodukte des Enzyms Cathenamin-Reduktase | 99 |
| Abb. 35: | Elutionsprofil der DEAE-Sepharose FF-Säule | 105 |
| Abb. 36: | Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Säule..... | 107 |
| Abb. 37: | Elutionsprofil an MonoQ | 108 |
| Abb. 38: | SDS-PAGE der gereinigten Proteinfractionen nach MonoQ..... | 109 |
| Abb. 39: | Molekulargewichtsbestimmung der Cathenamin-Reduktase an Sephacryl S-100 HR..... | 111 |
| Abb. 40: | HPLC-Ergebnis zur Bestimmung der Cosubstrat-Spezifität der Cathenamin-Reduktase | 113 |
| Abb. 41: | EI-Massenspektrum des unbekanntes Nebenprodukts nach Inkubation der Cathenamin-Reduktase mit NADPH | 115 |
| Abb. 42: | Bildung von Cathenamin aus Strictosidin über die stabilen Zwischenstufen 4,21-Dehydrocorynanthein-Aldehyd und 4,21-Dehydrogeissoschizin | 123 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 43: Farbige Darstellung der Sequenzen im Vektorkonstrukt <i>pQE-70bh-STR-RBS-SG</i> mit hervorgehobenen Restriktionsschnittstellen..... | 125 |
| Abb. 44: Bildung von Vallesiachotamin/red. Vallesiachotamin aus Strictosidin | 127 |
| Abb. 45: Biosynthese von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin mit den wichtigsten Zwischenprodukten (nach ZENK, 1980)..... | 129 |
| Abb. 46: Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin als mögliche Produkte der enzymatischen Umsetzung von Cathenamin durch Zugabe von NADPH | 130 |
| Abb. 47: Bildung von 22-N-Tetrahydroalstonin aus Cathenamin nach Zugabe von Ammoniumsulfat und NADPH | 134 |
| Abb. 48: Schematische Darstellung des Coexpressions-Vektors <i>pQE-70bh-STR-RBS-SG</i> | 139 |
| Abb. 49: Enzymatische Bildung von Cathenamin aus Tryptamin und Secologanin..... | 140 |
| Abb. 50: Enzymatische Reduktion von Cathenamin zu Raubasin in Anwesenheit von NADPH | 140 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. 1: Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen im Laufe der Extrakterstellung | 89 |
| Tab. 2: R _f -Werte von Tetrahydroalstonin an Normalphasen-DC in versch. Fließmitteln..... | 94 |
| Tab. 3: Aktivität der Cathenamin-Reduktase in unterschiedlichen Pflanzenzellkulturen | 101 |
| Tab. 4: Verlauf der Cathenamin-Reduktase-Aktivität nach versch. Kultivierungszeiten | 102 |
| Tab. 5: Bestimmung des pH-Optimums der Cathenamin-Reduktase-Aktivität | 103 |

I Einleitung

1 *Catharanthus roseus* – eine Quelle bedeutender Indolalkaloide

Catharanthus roseus (L.) G. Don –auch bekannt als *Vinca rosea* (STEARN, 1975) sowie unter dem deutschen Namen „Madagaskar-Immergrün“– aus der Familie der Apocynaceae ist eine aufrechte, immergrüne tropische Pflanze, deren Blüten in vielen farblichen Variationen auftreten können. Sie stellt eine beachtliche Quelle therapeutisch genutzter Naturstoffe dar. Hierzu gehören in erster Linie die antineoplastisch wirkenden Bis-Indolalkaloide Vincristin und Vinblastin (BROSSI, 1990; UEDA *et al.*, 2002), aber auch Serpentin und Raubasin als antihypertensiv wirkende Indolalkaloide (BRODIE *et al.*, 1956; KRONEBERG, 1958).



Abb. 1: *Catharanthus roseus* (L.) am Naturstandort

Bereits 1959 bzw. 1962 konnten Vindolin und 16-Demethoxyvindolin von GORMAN *et al.* und SVOBODA *et al.* als Vorstufen der beiden Chemotherapeutika Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don isoliert werden, ihre physikochemischen und kristallographischen Eigenschaften wurden jedoch erst von RUSZKOWSKA *et al.* (2004) bestimmt. Vincristin und Vinblastin als Endprodukte der jeweiligen Biosynthesen wurden zwischen 1958 und 1962 (GORMAN und SVOBODA, beide Angehörige der Firma Eli Lilly, USA; NOBLE *et al.*, 1958) gewonnen. Über die

pharmakologischen Wirkungen dieser strukturell nahezu identischen Substanzen wurden zahlreiche Untersuchungen angestellt, deren Anfänge von NOBLE (1990) zusammengefasst wurden. Demnach begann die Erforschung von *Catharanthus roseus* (L.) G. Don zu Beginn der fünfziger Jahre mit dem Ziel, einen antidiabetisch wirkenden Naturstoff zu isolieren. Im Laufe entsprechender Experimente einer Forschergruppe um Noble, Beer und Cutts an der Universität Vancouver fand man im Tierversuch an Ratten zwar eine geringe antidiabetische Wirkung des pflanzlichen Rohextrakts, diese ging allerdings mit einer extremen Verringerung der Leukozytenkonzentration im Blut der Tiere einher, deren Ursache in einer Zerstörung des Knochenmarks lag. Die für diese Wirkung verantwortliche Substanz erhielt den Namen Vincal leukoblastin, der später in Vinblastin geändert wurde. Nahezu zeitgleich arbeitete eine Forschergruppe der Firma Eli Lilly, Indianapolis, an einem ähnlichen Projekt, das mit der Isolation eines Stoffes mit dem Namen Leurocristin –heute als Vincristin bekannt– abgeschlossen werden konnte (Abb. 2).

Die erzielte Ausbeute an Vinblastin innerhalb der ersten industriellen Extraktion durch Eli Lilly belief sich auf 0.0002% bezogen auf das Trockengewicht der verwendeten *Catharanthus*-Blätter.

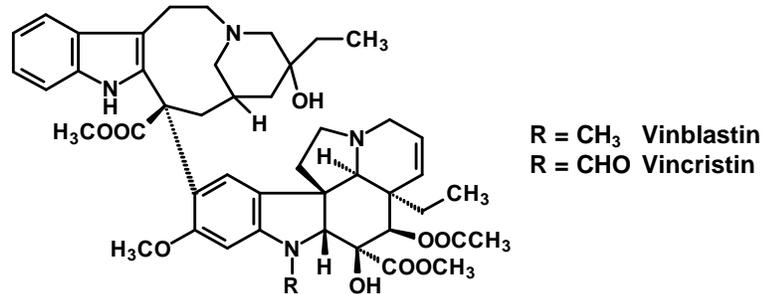


Abb. 2: Vinblastin und Vincristin aus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (FAVRETTO *et al.*, 2001)

Vinblastin und Vincristin bestehen aus einer Catharanthin- und einer Vindolinhälfte. Sie unterscheiden sich nur durch den Rest am Indolstickstoff des Vindolinteils.

Aufgrund ihrer komplexen Strukturen ist eine vollsynthetische Herstellung dieser therapeutisch unverzichtbaren Bis-Indole bis heute nicht gelungen (HUGHES *et al.*, 2002; VERPOORTE *et al.*, 1999). Dies führte zu einer großen Bandbreite unterschiedlicher Ansätze, die Alkaloidbiosynthese innerhalb von *Catharanthus*-Zellkulturen zu erhöhen.

Die mitosehemmende Wirkung dieser Arzneistoffe wird heute bei der zytostatischen Behandlung von Hodgkin-Lymphomen, Mammakarzinomen, Neuroblastomen sowie Karzinomen des Urogenitaltraktes und der Lunge ausgenutzt.

Nach seiner Entdeckung wurde Raubasin in den siebziger und achtziger Jahren erfolgreich zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen und zerebralen Durchblutungsstörungen eingesetzt. In dieser Zeit lag die Menge an isoliertem Raubasin aus *Rauvolfia*- und *Catharanthus*-Arten bei geschätzten 3 500 kg pro Jahr (ARENS *et al.*, 1978), wodurch der damalige therapeutische Stellenwert der Substanz deutlich wird.

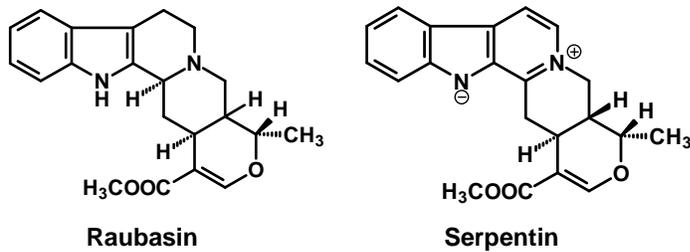


Abb. 3: Raubasin und Serpentin als Hauptinhaltsstoffe in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

In der heutigen Zeit kommt der Arzneistoff vermehrt in einer Kombination mit dem broncholytisch wirkenden Almitrin zur Anwendung. Diese Kombination hat in klinischen Tests aufgrund einer gesteigerten Sauerstoffversorgung des Gehirns zu einer Verbesserung der neurologischen Funktionen von Herzinfarkt-Patienten geführt, ohne einen Einfluss auf die Herzfähigkeit zu haben (LI *et al.*, 2004; LI, 1998). BENTUÉ-FERRER *et al.* (1998) bestätigten diese Erkenntnisse und erweiterten die Indikation für die erwähnte Arzneistoffkombination um eine Therapie bei altersbedingten kognitiven Störungen.

Zahlreiche Experimente haben erwiesen, dass Raubasin in einer Monotherapie im Gegensatz zu zytotoxischen Indolalkaloiden aus *Catharanthus*- oder *Rauvolfia*-Arten keinerlei antineoplastisches Potential besitzt (VON POSER *et al.*, 1990; STANFORD *et al.*, 1986).

2 Die Biosynthese der Indolalkaloide als Basis für ‚Metabolic-Engineering‘

Die Toxizität verschiedener Pflanzen ist auf der Anwesenheit unterschiedlicher Alkaloide begründet. Hierbei handelt es sich um kleine stickstoffhaltige Moleküle, die in einer nahezu unüberschaubaren Vielfalt zum Selbstschutz der Pflanzen gebildet werden (HARTMANN, 1996). In ca. 20% aller bekannten Pflanzenarten sind solche Substanzen enthalten, und ihre Bedeutung im medizinischen Bereich wächst stetig an. Nachdem die Isolierung und Beobachtung der pharmakologischen Wirkungen neuer Substanzen in den fünfziger und sechziger Jahren sehr schnell gelang, machte man sich an die Aufklärung der eigentlichen Biosyntheseschritte dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, welche bis heute viele Fragen offen lassen.

Die Biosynthese der Indolalkaloide verläuft über verschiedene Schlüssel-moleküle, die als Vorstufen unterschiedlicher Alkaloidklassen fungieren. So stellt z.B. Strictosidin die zentrale Vorstufe für die Bildung von über 2 000 verschiedenen Indolalkaloiden mit der Gruppe der Corynanthean-Alkaloide (Raubasin) oder auch der Ibogan-Alkaloide (Vincristin und Vinblastin) dar (KUTCHAN *et al.*, 1991). Die Bildung von Strictosidin wird von der Strictosidin-Synthase katalysiert, die zu einer Verknüpfung von Tryptamin und Secologanin führt. Sie stellt das erste Enzym aus dem Alkaloidstoffwechsel dar, dessen cDNA entdeckt wurde, und somit in aktiver Form heterolog in Bakterienkulturen exprimiert werden konnte (KUTCHAN, 1989; KUTCHAN *et al.*, 1988; TREIMER *et al.*, 1979). Im weiteren Verlauf der Raubasin-Biosynthese (Abb. 4, Seite 5) kommt es zur Abspaltung der Glucose, wofür die Strictosidin- β -D-Glucosidase verantwortlich ist. Diese konnte von LUIJENDIJK *et al.* (1998) aus *Catharanthus* isoliert und charakterisiert werden. GERASIMENKO *et al.* gelang 2002 die Reinigung und anschließende aktive heterologe Expression in *E. coli* eines nahezu identischen Enzyms aus *Rauvolfia serpentina*. Die Bildung von Raubasin verläuft schließlich über eine Reihe von Zwischenprodukten, von denen Cathenamin eine direkte Vorstufe darstellt. Dessen Reduktion in Abhängigkeit eines Cofaktors wurde zwar bereits mehrfach beobachtet (HEMSCHIEDT *et al.*, 1985; ZENK, 1980), jedoch konnten die zugehörigen Aminosäure- und Nukleotidsequenzen, die für eine heterologe Expression benötigt wurden, bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht ermittelt werden.

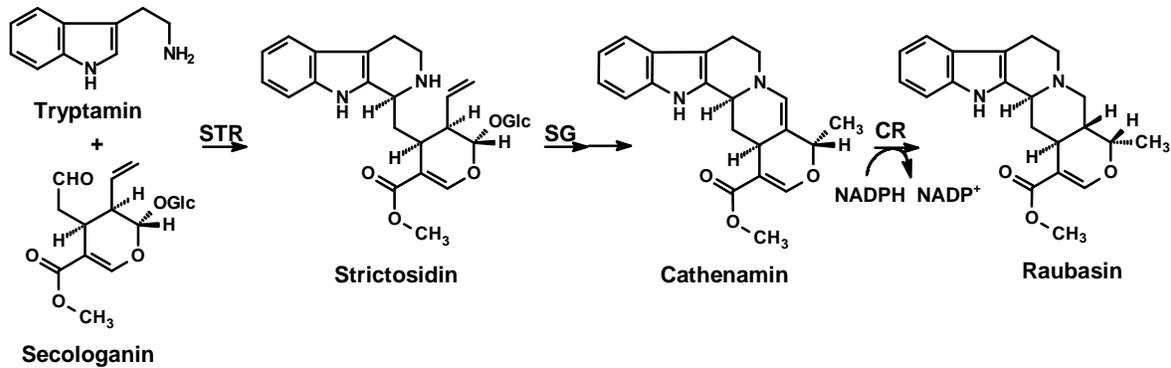


Abb. 4: Enzymatische Bildung von Raubasin aus Tryptamin und Secologanin über die Zwischenprodukte Strictosidin und Cathenamin

STR: Strictosidin-Synthase, **SG:** Strictosidin-β-D-Glucosidase, **CR:** Cathenamin-Reduktase

Die extrem niedrigen Ausbeuten, die bei Extraktionen der Vinca-Alkaloide erzielt wurden (Kapitel I.1), führten zur Entwicklung unterschiedlichster Strategien, mit denen die Alkaloidproduktion in Pflanzenzellen erhöht werden konnte.

Zu diesen Eingriffen in die Physiologie der Pflanzenzellen gehörte die Weiterentwicklung der Nährmedien (DEUS-NEUMANN *et al.*, 1984; VERPOORTE *et al.*, 1999) sowie der Zusatz von Wachstumsregulatoren und Chemikalien (GANAPATHI *et al.*, 1990; BIONDI *et al.*, 2000; NAMDEO *et al.*, 2002; MORENO-VALENZUELA *et al.*, 2003; EL-SAYED *et al.*, 2004). Weitere Erfolg versprechende Möglichkeiten auf diesem als ‚Metabolic Engineering‘ bezeichneten Gebiet bestehen in der Einführung zusätzlicher Gene durch Verwendung von Partikel-Kanonen (SATDIVE *et al.*, 1987) oder in der Infektion der Zellkulturen mit Phytoplasmen (FAVALI *et al.*, 2004).

Die Blockade entsprechender Abbaureaktionen stellt ebenfalls einen Angriffspunkt zur Erhöhung der Alkaloidausbeuten dar. So stellte SCHRIPSEMA *et al.* 1994 fest, dass der Abbau von Raubasin in *Catharanthus*-Zellen vergleichbar mit der Biosyntheserate ist. Solche katabolen Wege können ebenso wie konkurrierende Nebenwege die Ausbeute des gewünschten Naturstoffs herabsetzen. Unter Verwendung von Agrobakterien, erreichte CANEL *et al.* (1998) durch Überexpression der Strictosidin-Synthase und der Tryptophan-Decarboxylase –welche für die Bildung von Tryptamin benötigt wird– in transgenen *Catharanthus*-Zellen eine 10-fach höhere Strictosidin-Ausbeute und damit verbunden eine verbesserte Alkaloidproduktion. Ähnliche Experimente führte HUGHES *et al.* (2004) an *Catharanthus roseus* ‚hairy-root‘-Kulturen durch, die zu einer 6-fachen Überproduktion von Tryptamin und einer 2.3-fachen Serpentin-Ausbeute führten.

All diese Versuche zur Steigerung der Alkaloiderträge aus den entsprechenden Pflanzen verlangen detaillierte Kenntnisse bezüglich des bearbeiteten Biosynthesewegs. Sämtliche Zwischenprodukte sowie die involvierten Enzyme müssen bekannt sein, damit gezielte Eingriffe in die Naturstoffbiosynthese möglich werden.

3 Coexpression von Enzymen der Naturstoffbiosynthese

Die im vorherigen Abschnitt aufgeführten Möglichkeiten zur Erhöhung der Naturstoffbiosynthese in Pflanzen wurde gegen Ende der Neunziger Jahre um das Kapitel der Coexpression erweitert. Hierunter versteht man die gleichzeitige Expression mehrerer Enzyme innerhalb pflanzlicher oder mikrobieller Zellkulturen. Dabei besteht prinzipiell die Möglichkeit zur Transformation der entsprechenden Gene in die Expressionszellen unter Verwendung eines oder mehrerer Plasmide, sowie kommerziell angebotener oder speziell hergestellter Coexpressions-Plasmide.

Aufbauend auf den Ergebnissen von CANEL *et al.* (1998, Kapitel I.2) entwickelte GEERLINGS *et al.* ein Jahr später einen Coexpressions-Vektor, in dem die cDNAs der Tryptophan-Decarboxylase und der Strictosidin-Synthase aus *Catharanthus roseus* enthalten sind. Als Wirtsorganismus wurden Wurzelkulturen der pharmazeutisch bedeutenden Chinarinde (*Cinchona officinalis*) verwendet, wodurch die Produktion der Hauptinhaltsstoffe Chinin und Chinidin um das drei- bis fünffache gesteigert werden konnte.

Ein ähnliches Ziel verfolgte HUANG *et al.* (2001), der die Biosynthese des therapeutisch bedeutenden Arzneistoffs Taxol untersuchte. Zur Verbesserung der Syntheseleistung für dieses komplex gebaute Diterpen-Alkaloid, das bis heute nur partialsynthetisch hergestellt werden kann, wurde ein Expressions-System hergestellt, das die ersten vier Enzyme zur Bildung von Taxadien ausgehend von IPP und DMAPP enthielt. Taxadien stellt das Schlüssel-molekül im pflanzlichen Biosyntheseweg des Taxols dar, das in sehr geringen Mengen aus *Taxus*-Arten isoliert werden kann.

MARTIN *et al.* gelang 2003 die Nachstellung des Biosynthesewegs von Amorphadien, einer der Hauptvorstufen des immer weiter verbreiteten Malariamittels Artemeter, in Kulturen von *Escherichia coli*. Dabei kam es zum Einbau zweier ‚Genkassetten‘, in denen die insgesamt acht involvierten Enzyme codiert waren. Unter ‚Genkassetten‘ oder ‚Genclustern‘ versteht man Sequenzabschnitte, in denen die Informationen für die Expression mehrerer Enzyme enthalten sind, und die als Ganzes in einen entsprechenden Vektor eingebracht werden können.

Neuere Experimente beschäftigen sich vermehrt mit der Synthese der Vorstufen, die im Laufe der Bildung aller pflanzlicher terpenoide Verbindungen auftreten. So gelang es BURLAT *et al.* insgesamt vier Gene zu vereinen, die zur Bildung von IPP bzw. 10-Hydroxygeraniol benötigt werden. Als Expressionsort wurde hier das Phloemparenchym in *Catharanthus roseus*-Pflanzen gewählt, welches unter normalen Bedingungen nicht an dieser Biosynthese beteiligt ist.

Das wohl bekannteste Beispiel erfolgreicher Coexpression zur Erlangung eines Naturstoffs wurde 2001 entwickelt. Dabei gelang es einer deutsch-schweizerischen Forschergruppe, die Gene, die für die Bildung des Provitamin A (β -Carotin) verantwortlich sind, in Reis-Endosperm einzuführen (BEYER *et al.*, 2002). Die drei involvierten Enzyme wurden in drei verschiedene Plasmide kloniert und anschließend unter Verwendung von Agrobakterien in einem einzigen Schritt transformiert. Daraus entstand bereits in der ersten Pflanzengeneration der so genannte ‚Goldene Reis‘, dessen Endosperm aufgrund des gebildeten β -Carotins ein orangefarbenes Äußeres lieferte. Das entstandene Produkt ist in der Lage, Mangelerscheinungen durch unzureichende Provitamin A-Zuführung vorzubeugen.

Ein ebenso interessanter Forschungsbereich stellt die Biosynthese industriell genutzter Naturstoffe dar. In diesem Zusammenhang wurde z.B. über die Bildung des Lebensmittel- und Kosmetikfarbstoffs Bixin (BOUVIER *et al.*, 2003) sowie des Färbemittels Indigo (FURUYA *et al.*, 2004) in Mikroorganismen berichtet. Die Bildung des Flavonoids Naringenin durch Klonierung und Coexpression von insgesamt vier Enzymen aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* wurde 2004 von WATTS *et al.* beschrieben. Ebenfalls in *E. coli* konnte die Biosynthese von Succinat durch Überexpression dreier Enzyme von RAVISHANKAR *et al.* (2004) nachgestellt werden.

Auf dem Gebiet der mikrobiellen Antibiotika-Biosynthese sind die Forschungen im Vergleich zu den beschriebenen pflanzlichen Inhaltsstoffen deutlich fortgeschrittener. Bereits 1999 berichtete eine deutsch-amerikanische Arbeitsgruppe um CHEN *et al.* über die Einführung zweier ‚Genkassetten‘ in jeweils einen Expressionsvektor mit anschließender Expression der Proteine in *Streptomyces collinus*. Eines der beiden Gencluster enthielt die codierenden Genabschnitte für neun Enzyme, die im Laufe der Naphthomycin-Synthese benötigt werden, das andere verfügte über 14 Gene aus der Ansatrienin- (Mycotrienin-) Biosynthese.

Ein Jahr später publizierten LI *et al.* (2000) die parallele Expression von drei Enzymen der Carbapenem-Biosynthese in *Escherichia*-Stämmen. Bei diesem Projekt wurde vor jedes der drei Gene eine Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) eingefügt, damit die Bindungsfähigkeit der beteiligten Ribosomen nicht negativ beeinträchtigt wurde. Lässt man diese Ribosomenbindestellen ebenso wie die Stop-Codons der vorangegangenen cDNAs weg, kommt man zu Fusionsproteinen bzw. Protein-Polymeren (GOEDEN-WOOD *et al.* 2002). Die Lage der klonierten Gene zueinander innerhalb des Expressionsvektors beschäftigte WILLIAMS *et al.* (2004). Er fand heraus, dass in *Arabidopsis thaliana* direkt benachbarte Gene coexprimiert werden. Er schloss daraus, dass in entsprechenden Experimenten auf die räumliche Nähe der zusammengehörenden Genabschnitte geachtet werden sollte.

Abschließend seien noch Coexpressionsversuche aus der Kohlenhydrat- sowie der Cortison-Biosynthese erwähnt. CHEN *et al.* beschrieb 2002 die Expression von fünf verschiedenen Enzymen unter Verwendung zwischengeschalteter Ribosomenbindestellen in *E. coli*, die an der Bildung α -glykosidisch gebundener Zucker beteiligt sind. Eine der bedeutendsten und umfangreichsten Arbeiten in Bezug auf die Coexpression mehrerer Enzyme stellt die Arbeit einer Gruppe um Szczebara dar. Ihnen gelang die komplette Biosynthese von Hydrocortison durch Klonierung einer ‚Genkassette‘, in der die nötigen 13 Genabschnitte für die involvierten Enzyme vorhanden waren, in *Saccharomyces cerevisiae* (SZCZEBARA *et al.*, 2003). Das entstandene System war dabei vollständig autonom, was die Gabe von Edukten bzw. Präkursoren überflüssig machte.

Die erläuterten Beispiele zeigen, wie groß das Interesse an der Entwicklung solcher Coexpressions-Systeme ist, mit denen die Biosynthese eines gewünschten Naturstoffs unter Verwendung von Mikroorganismen durchgeführt werden kann.

4 Aufgabenstellung

An der Entwicklung neuer Coexpressions-Systeme, die zur Gewinnung pharmazeutisch wichtiger Naturstoffe geeignet sind, wird auf internationaler Ebene seit mehreren Jahren mit wachsendem Engagement gearbeitet (Kapitel I.3). Die pflanzliche Biosynthese von Indolalkaloiden konnte in bisherigen Projekten jedoch nicht in ein solches Expressions-System eingebunden werden.

Vor diesem Hintergrund stand die Entwicklung und Herstellung eines Systems im Vordergrund, das die parallele Expression mehrerer Enzyme der Indolalkaloid-Biosynthese erlaubte. Dabei war besonderes Augenmerk darauf zu legen, dass es sich um ein Gen-Konstrukt handelte, welches aus einem einzelnen Plasmid bestand, das für die Aufnahme von Genen mehrerer Enzyme geeignet war. Dies würde die heterologe Expression der Proteine in homologen *Escherichia coli*-Kulturen ermöglichen.

Als Ausgangspunkt einer solchen Mehrfachexpression standen die Gene der Strictosidin-Synthase sowie der Strictosidin- β -D-Glucosidase zur Verfügung. Sie katalysieren die ersten beiden Schritte in der Biosynthese pflanzlicher Indolalkaloide, die beispielsweise dem Ajmalan-Typ (Ajmalin) oder Heteroyohimban-Typ (Raubasin) angehören.

Im weiteren Verlauf des Projektes sollte die säulenchromatographische Reinigung einer Raubasin-bildenden Cathenamin-Reduktase mit dem Ziel der Partialsequenzierung erfolgen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, wie viele Enzyme an der Reduktion des Cathenamins beteiligt sind. Ausgehend von den Partialsequenzen wäre die Ermittlung der zugehörigen cDNA und der anschließende Einbau in das zuvor konstruierte Coexpressions-System möglich, wodurch erstmals ein kompletter pflanzlicher Alkaloid-Biosyntheseweg in Mikroorganismen exprimiert werden könnte.

II Material

Warenrechtlich oder urheberrechtlich geschützte Namen und Produkte werden im Folgenden nicht besonders gekennzeichnet.

1 Biologisches Material

1.1 Pflanzenzellkulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellsuspensionskulturen stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Dabei handelte es sich vorwiegend um Pflanzenzellen aus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Andere Zelllinien wurden zu Test- und Vergleichszwecken genutzt.

Ausgehend von einer Kalluskultur wurden die Zellen zunächst in ca. 40 ml LS-Medium (LINSMAIER UND SKOOG, 1965) angezogen. Dies erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm und einer Umgebungstemperatur von 24 ± 2 °C bei diffusem Dauerlicht mit einer Stärke von ~600 Lux in 300 ml großen Erlenmeyerkolben, welche mit Schaumgummistopfen verschlossen wurden.

Nach sieben Tagen konnten die so erhaltenen Zellen in ca. 80 ml LS-Medium umgesetzt werden. Weitere sieben Tage später wurde der Inhalt zweier kleiner Kolben in einen 1l-Erlenmeyerkolben überimpft, der mit 200 ml frischem LS-Medium gefüllt war.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Air-Flow-Werkbank durchgeführt.

Zur Isolierung der enthaltenen Enzyme sowie von DNA und RNA wurden die Zellkulturen nach einer Wachstumsdauer von neun bis elf Tagen geerntet. Hierunter versteht man das Abtrennen der Pflanzenzellen vom Nährmedium mittels Vakuumfiltration unter Verwendung eines Büchnertrichters. Das so gewonnene Gewebe wird mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren, in Gefrierbeutel gefüllt und bei -20 °C gelagert.

1.2 Bakterienstämme

Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um Sicherheitsstämme, die nach den Einstufungen der ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) für die Verwendung in gentechnischen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 zugelassen sind.

Im Einzelnen fanden folgende Stämme von *Escherichia coli* Verwendung:

- M15 [pRep4]: *E. coli* K12 (Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺)
- Top10F': F'*{lacIq Tn10 (Tet^R)}*mcrA Δ (*mrr*–*hsd* RMS–*mcr* BC Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nup*

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte bei -80 °C in LB-Medium mit einem Zusatz von 15% Glycerol.

2 Kulturmedien

Die verwendeten Medien wurden vor Gebrauch sterilisiert. Dies erfolgte unter Verwendung von gespanntem Wasserdampf für 30 Minuten bei 2 bar und 121 °C. Hitzelabile Komponenten wurden über einen Sterilfilter der Porengröße 0,22 μ m zur abgekühlten Nährlösung gegeben.

2.1 Medium für Pflanzenzellkulturen

Für die Anzucht der Zellsuspensionskulturen wurde LS-Medium nach LINSMAIER UND SKOOG (1965) verwendet, welches durch Zusatz von je 1×10^{-6} mol/l 1-Naphthyl-essigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure modifiziert wurde. Vor Gebrauch war die Einstellung des pH-Werts auf 6.0 unter Verwendung von 1M NaOH nötig.

2.2 Bakterienmedien

Als Standardnährlösung für Bakterien wurde LB-Medium nach SAMBROOK *et al.*(1989) verwendet. Es setzte sich aus 1 % (m/V) Trypton, 1 % (m/V) NaCl und 0,5 % (m/V) Hefe-Extrakt zusammen und besaß einen pH-Wert von 7.0.

Bei Bedarf wurden den bereits sterilisierten Kulturmedien Ampicillin und Kanamycin mit folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: 50 $\mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 50 mg/ml)

Kanamycin: 25 $\mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 10 mg/ml)

Die Zugabe der sterilfiltrierten Lösungen erfolgte stets nach Abkühlen der Medien, um ein Zersetzen der hitzelabilen Substanzen zu vermeiden.

3 Pufferlösungen

Die benötigten Puffer wurden meist in einer höheren Konzentration hergestellt als benötigt und bei Bedarf auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Bei der erforderlichen Einstellung des pH-Wertes kam es hauptsächlich zum Einsatz von Natronlauge, Salzsäure und ortho-Phosphorsäure. Alle Puffer, die bei der Proteinreinigung, bei Enzymtests sowie bei der HPLC verwendet wurden, waren zuvor mit Hilfe von Vakuum steril zu filtrieren.

KPi-Puffer wurden durch Mischen von 1M K_2HPO_4^- und 1M KH_2PO_4 -Stammlösungen hergestellt. Der gewünschte pH-Wert konnte hierbei durch das Mischungsverhältnis der beiden Stammlösungen eingestellt werden.

Zur Herstellung von Tris-HCl-Puffern wurden 1M Tris-Stammlösungen eingesetzt, deren pH-Werte unter Verwendung konzentrierter HCl erreicht wurden.

Die folgende Aufstellung zeigt weitere Puffer, die im Laufe der molekularbiologischen Arbeit angewendet wurden:

| Puffer | Zusammensetzung |
|------------------------|---|
| MOPS | 20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7.0 |
| Resuspendierungspuffer | 50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8.0 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 |
| TAE | 40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8.0 |
| TE | 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7.5 |
| TfB 1 | 100 mM RbCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (V/V) Glycerol pH 5.8, eingestellt mit Essigsäure |
| TfB 2 | 10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15% (V/V) Glycerol pH 6.8, eingestellt mit KOH |

4 Fertigsäulen, Leersäulen und Säulenmaterialien

| Hersteller /Lieferant | Produkte |
|------------------------------------|---|
| Amersham Biosciences (Freiburg) | 2',5'-ADP-Sepharose 4B XK 16/20 DEAE-Sepharose – Fast Flow XK 16/20 EAH-Sepharose 4B XK 16/20 HiTrap Blue HP (1.6 x 2.5 cm) HiTrap Desalting (1.6 x 2.5 cm) MonoQ HR 5/5 Sephacryl S-100 HR HiPrep 16/60 Sephadex G25 Superfine C 16/20 Sephadex G25 Superfine XK 50/30 SOURCE 30Q XK 26/40 SOURCE 15Phe XK 16/20 |
| BioRad (München) | Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite (Typ I) in Leersäule XK 16/20 von Amersham Biosciences (Freiburg) |
| Merck (Darmstadt) | HPLC-Säule LiChrospher 60 RP select B (5 μ m), 250 mM mit Vorsäule Select B |

5 Vektoren

| Vektor | Verwendung |
|---|--|
| <p><i>pGEM-T</i> und <i>pGEM-T easy</i> Vector System I (Promega, Mannheim)</p> | <p>3 002/3 015 bp, vermitteln Ampicillinresistenz Hierbei handelt es sich um linearisierte high-copy-Plasmide, die zur Subklonierung der amplifizierten PCR-Produkte verwendet wurden. Dazu sind an den 3'-Enden Thymidin-Überhänge vorhanden, an welche DNA-Fragmente mit Adenin-Überhängen binden können. Diese werden mit Hilfe einer entsprechenden Polymerase generiert.</p> |
| <p><i>pSE-280</i> (Invitrogen, Karlsruhe)</p> | <p>3 893 bp, vermittelt Ampicillinresistenz Bei diesem Vektor handelt es sich um einen Expressionsvektor, der an exprimierte Enzyme einen N-terminalen (His)₆-tag anhängt. Von dem gesamten Plasmid wurde ein Teil der multiple-cloning-site verwendet, welcher mit den Restriktionsenzymen <i>Bam</i>HI und <i>Hind</i>III herausgeschnitten werden konnte.</p> |
| <p><i>pQE-70</i> (Qiagen, Hilden)</p> | <p>3 426 bp, vermittelt eine Ampicillinresistenz Mit diesem low-copy-Plasmid wurden alle Expressionen aktiver Enzyme im Laufe dieser Arbeit durchgeführt. Die multiple-cloning-site des Vektors wurde für Arbeiten zur Coexpression zweier Enzyme durch Einligieren der MCS aus <i>pSE-280</i> verändert. <i>pQE-70</i> ermöglicht die Expression von Proteinen mit C-terminalen (His)₆-tags. Dies macht eine einfache Reinigung über Ni-NTA möglich.</p> |

6 Kits für die Molekularbiologie

| Kit | Hersteller /Lieferant | Anwendung |
|--------------------|-----------------------------|--|
| NucleoSpin Extract | Macherey & Nagel (Düren) | Elution von DNA aus Agarose-Gelen |
| NucleoSpin Plasmid | Macherey & Nagel (Düren) | Isolierung hochreiner Plasmid-DNA aus Bakterien |

7 Enzyme, Marker und Zubehör für die Molekularbiologie

| Hersteller /Lieferant | Produkte |
|---|---|
| Amersham Biosciences (Freiburg) | LMW Electrophoresis Calibration Kit (14 bis 97 kDa) |
| BD Biosciences Clontech (Heidelberg) | Advantage DNA-Polymerase-Mix |
| Eurogentec (Seraing, Belgien) | DNA-Marker SmartLadder 200 |
| Invitrogen (Karlsruhe) | Large Fragment of DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) <i>Taq</i> -DNA-Polymerase |
| MWG-Biotech AG (Ebersberg) | Degenerierte und spezifische Primer |
| New England BioLabs (Frankfurt/Main) | Restriktionsendonukleasen, <i>Vent</i> -Polymerase |
| Promega (Mannheim) | dNTP's, T ₄ DNA-Ligase, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase |

8 Feinchemikalien und Zubehör

| Hersteller /Lieferant | Produkte |
|--|---|
| Acros Organics BVBA (Geel, Belgien) | Acetonitril, Falcon-Röhrchen |
| AppliChem (Darmstadt) | Acrylamid, LowEEO Agarose, Ampicillin, Glycin, Hexansulfonsäure, IPTG, Kanamycin, NADH, NADPH, TEMED, Tris, Feinchemikalien |
| Biozym (Hess. Oldendorf) | PCR-Gefäße |
| Fluka (Taufkirchen) | D-Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| Fresenius (Bad Homburg) | Ampuwa (Wasser für die Molekularbiologie) |
| ICN (Eschwege) | SDS |
| Intermedica (Klein-Winternheim) | Halbmikroküvetten |
| Millipore (Schwalmstadt) | Einwegkonzentratoren Microcon YM-10 |
| Roth (Karlsruhe) | Acetonitril, Raubasin, Tetrahydroalstonin |
| Sarstedt (Nümbrecht) | Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße |
| Schleicher & Schüll (Dassel) | Membranfilter 0,22 μm |

| | |
|-----------------------|---|
| Serva (Heidelberg) | Coomassie Brilliant Blue G-250 / R-250 Servapor Dialyseschläuche mit Ø 9, 16 und 29 mm |
| Sigma (München) | Feinchemikalien |
| VWR (Darmstadt) | DC-Platten, HPLC-Säule LiChrospher 60 RP select B (5 µm) 250 x 4 mm und Vorsäule 4 x 4 mm, Methanol für die HPLC, Falcon- und Greiner-Röhrchen, Feinchemikalien |

9 Geräte

| Methoden | Geräte |
|----------------------------------|---|
| Aufschluss von Bakterien | Sonotrode Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlin) |
| Aufschluss von Pflanzengewebe | Universalmühle M20 (IKA, Stauffen) Ultra-Turrax TP 18/10 (IKA, Stauffen) |
| Dokumentation | Agarosegele: - UV-Transilluminator / 320 nm (Bachofer, Reutlingen) - Polaroidkamera MP 4+, Modell 44-16 (KemaKeur, Niederlande); mit Polaroidfilm Polaplan 667 (Polaroid, Cambridge/USA) PC-gestützt: - Digitalkamera Canon Powershot G5 - Flachbettscanner Highscan (Highscreen) und ColorPage HR5 (Genius) |

| | |
|---------------------|---|
| Elektrophorese | Horizontalelektrophorese: - BlueMarine 100 und 200 (Serva, Heidelberg) - ComPhor Midi Elektrophoresekammer Vertikalelektrophorese: SE 600 Hoefer (Amersham Biosciences, Freiburg) Netzgeräte: E532, E853 und E844 (Consort, Turnhout/Belgien) |
| Gefriertrocknung | Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6 (Christ, Osterode) mit Drehschieber-Vakuumpumpe RS8 (Vakuubrand, Wertheim) |
| HPLC | Merck-Hitachi-System (Merck, Darmstadt) bestehend aus: - Pumpe L-6500 - Autosampler AS-2500 - UV/Vis-Detektor L-4250 - Integrator D-2500 |
| Massenspektrometrie | MAT 44S (Finnigan, Bremen) |
| Mixen | Vortexer Reax 2000 (Heidolph, Kelheim) |
| OD-Bestimmung | Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) |
| PCR | Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg) |
| pH-Messung | inoLab pHLevel 1 sowie pH DIGI 550 (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim) |
| Proteinreinigung | a) mit Peristaltikpumpe: - IPC-Pumpe (ISMATEC, Basel/Schweiz) - UV/Vis-Detektor 2158 UVICORD SD (LKB Bromma, Schweden) - Fraktionenkollektor 2070 ULTRORAC II (LKB Bromma, Schweden) - Schreiber REC 102 (Pharmacia LKB, Freiburg) |

| | |
|-------------------------------------|---|
| | <p>b) mit ÄKTA-Explorer-System von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 Pumpen P-900 - Durchflusszellen mit 22 μl und 88 μl Volumen zur Messung von Leitfähigkeit, pH-Wert und Temperatur - Multiwavelength UV/Vis-Monitor UV-900 - Mischkammer M-900, - Pufferventil IV-908 - Säulenselektionsventil PV-98 - Fraktionenkollektor Frac-900 - Kühlung: Betrieb der Anlage erfolgte im MaxiColdLab-Kühlschrank (LKB, Schweden) bei 7 ± 1 °C - Steuerung und Dokumentation: Pentium 133 Mhz PC (Compaq), Software UNICORN Control System auf OS/2 Warp (IBM), Farbtintenstrahldrucker HP Deskjet 690 C sowie Canon i560 |
| Reinstwasser | Seralpur PRO 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach) |
| Rotationsverdampfer | Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakkubrand, Wertheim) mit Rotationsvorrichtung 51111 VV1 (Heidolph, Kelheim) |
| Schüttler | Pilot Shake RC 2 SR bzw. SP (Kühner, Basel/Schweiz) |
| Sterilisation und steriles Arbeiten | Autoklav FV sowie TEC 120 (Federagi Autoclavi SPA, Albuzzano/Italien) Laminar-Flow-Box (Fröbel-Labortechnik, Lindau) sowie Oasis steril (Schmid Technik AG, Geroldswil/Schweiz) |

| | |
|----------------------|--|
| Temperieren | Brutschrank UL 30 (Memmert, Schwabach) Mikrowelle NN-E201 W (Panasonic, Hamburg) Schüttelinkubator Thermoshake THO5 (Gerhardt, Königswinter) Thermomixer 5437, Thermomixer comfort und Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg) Wasserbad Fisherbrand FBC 620 (Fisher Scientific, Schwerte) |
| Ultraschallwasserbad | Sonorex RK 5110 S (Bandelin, Berlin) |
| UV/Vis-Spektroskopie | Lambda 2-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) |
| Zentrifugation | Kühlzentrifuge Avanti J-25 mit Rotoren JA-10 und JA-20 Kühlzentrifuge Avanti J-30 I mit Rotoren JA-10, JA-18.1, JA-20 und JA-30.50 Ti (Beckmann Coulter, München) Kühlzentrifuge Z 320 K (Hermle, Gosheim) Kühlzentrifuge Rotanta/RP sowie Universal 32R (Hettich, Tuttlingen) Biofuge A und Biofuge 15 (Heraeus/Sepatech, Osterode) |

III Methoden

1 Reinigung von Proteinen und deren Analytik

Alle Arbeitsschritte im Laufe einer Proteinreinigung, sowohl aus Pflanzenzellen als auch aus Bakterien, wurden bei 4 °C durchgeführt. Sämtliche Pufferlösungen wurden mit entsalztem Wasser hergestellt.

1.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenzellkulturen

Zur Gewinnung von Rohextrakten aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen wurden die filtrierte und in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellen mit der 1,5-fachen Menge Aufschlusspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0 mit 20 mM MSH) versetzt und in einem lauwarmen Wasserbad (~35 – 40 °C) unter vorsichtigem Rühren vollständig aufgetaut. Danach konnten sie mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert und aufgeschlossen werden, um sie anschließend für dreißig Minuten bei 4 °C langsam rühren zu lassen. Eine darauf folgende Zentrifugation für 30 min bei 14 000 x g und 4 °C diente dem Entfernen von Zellresten, die während der Homogenisierung entstanden sind. Eine erste Abtrennung unerwünschter Proteine konnte mit Hilfe einer fraktionierten Fällung erreicht werden. Hierbei wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 35 % bei Raumtemperatur im Überstand gelöst und anschließend für 45 min im Kühlraum stehengelassen. Die gefällten Proteine konnten durch erneute Zentrifugation (30 min, 14 000 x g, 4 °C) entfernt werden. Dieser Reinigungsschritt wurde wiederholt, wobei diesmal Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 70 % zugesetzt wurde. Nach Zentrifugation (30 min, 14 000 x g, 4 °C) lag die gewünschte Enzymfraktion von 35 – 70 % vor. Das entstandene Pellet wurde in Resuspendierungspuffer aufgenommen und je nach Verwendungszweck entsalzt bzw. umgepuffert.

1.2 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Bakterienzellkulturen

Hierfür wurden 10 ml einer Übernachtskultur in 300 ml antibiotikahaltigem LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.6 mM konnte die Expression gestartet werden. Diese erfolgte über Nacht bei einer Raumtemperatur von 26 ± 1 °C und 100 rpm.

Im Anschluss daran wurden die Bakterienzellen mittels Zentrifugation für 10 min bei 5 000 x g und 4 °C vom Medium abgetrennt und in 2.0 ml Lysepuffer pro Gramm Bakterienmasse resuspendiert. Der Lysepuffer bestand aus 50 mM KPi-Puffer pH 6.0 und 20 mM Mercaptoethanol. Ihm wurde unmittelbar vor der Verwendung Lysozym in einer Konzentration von 1 mg/ml beigemischt.

Die daraus resultierende Zellsuspension wurde nach einer halbstündigen Inkubation bei 100 rpm auf Eis mit Ultraschall für 3 x 10 sec (75 W) behandelt. Die dabei entstandenen Zelltrümmer konnten durch Zentrifugation für 30 min bei 12 000 x g und 4 °C entfernt werden und man erhielt einen klaren Überstand, den Proteinrohextrakt. Dieser konnte je nach pH-Wert entweder direkt oder nach vorheriger Umpufferung für Aktivitätstests herangezogen werden.

1.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen

1.3.1 Dialyse

Bei der Dialyse wurden die zu behandelnden Proteinlösungen in spezielle Dialyseschläuche überführt. Deren Durchmesser reichte je nach Ausführung und zu entsalzender Proteinmenge von 6 bis 29 mm mit einer Ausschlussgröße von 12 bis 14 kDa. Die Entsalzung bzw. Umpufferung der enthaltenen Enzymlösungen erfolgte unter ständigem Rühren über Nacht bei 4 °C gegen 10 bis 12 l des gewünschten Puffers. Bei hohen Salzkonzentrationen musste der Puffer mehrmals gewechselt werden, um eine möglichst vollständige Entsalzung zu erreichen.

1.3.2 Verwendung einer Entsalzungssäule

Die Entsalzungssäule stellt gegenüber der Dialyse eine wesentlich schnellere Methode der Umpufferung dar. Bei dem hier verwendeten Material handelt es sich um Sephadex G25. Vor dem Umpuffern wurde die Säule mit dem Startpuffer des nächsten säulenchromatografischen Reinigungsschritts äquilibriert.

1.3.3 Konzentrieren von Proteinlösungen

1.3.3.1 Konzentrieren kleiner Volumina mit Einwegkonzentratoren

Bei Enzymlösungen mit einem Volumen kleiner als 1 ml kamen Microcon YM-10 Einwegkonzentratoren zum Einsatz, die in Rotoren für 1.5 ml Gefäße handelsüblicher Tischzentrifugen passen. Nach 20 min bei 10 000 x g wurde die konzentrierte Lösung durch Umdrehen des Einsatzes und erneuter Zentrifugation für 3 min bei 1 000 x g gewonnen.

1.3.3.2 Konzentrieren kleiner Volumina mit Trichloressigsäure

Enzymlösungen, die für eine direkte Identifizierung mittels SDS-PAGE eine zu geringe Konzentration besaßen, wurden unter Verwendung von Trichloressigsäure konzentriert. Hierbei wurde eine 20 %ige wässrige TCA-Lösung verwendet, welche der Proteinlösung bis zu einer Endkonzentration von 4 % zugesetzt wurde. Nach einer mindestens dreißigminütigen Fällung auf Eis erfolgte Zentrifugation für 15 min bei 15 000 x g und 4 °C. Im Anschluss daran wurde das Pellet 2-mal mit -20 °C kaltem Aceton gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde erneut unter den o.g. Bedingungen zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde bei Raumtemperatur trocknen gelassen und in dem gewünschten Puffer resuspendiert.

1.4 Säulenchromatographische Reinigung von Enzymen

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten säulenchromatographischen Reinigungsschritte standen zwei unterschiedliche Systeme zur Verfügung.

Zum einen wurde eine konventionelle Apparatur aus einer Peristaltikpumpe, einem UV-Detektor, einem Schreiber und einem Fraktionensammler verwendet. Hierbei war keinerlei Möglichkeit der Überwachung bezüglich des Systemdrucks, der Leitfähigkeit, des pH-Werts usw. gegeben. Die Bildung eines linearen Gradienten erfolgte mittels hydrostatischen Drucks. Dieses System besaß einen niedrigen Systemdruck, wodurch man in der Auswahl der Säulen und Säulenmaterialien sehr flexibel war.

Zum anderen kam die computergesteuerte Anlage ÄKTA-Explorer zum Einsatz. Hierbei konnte man die unterschiedlichsten Parameter wie z.B. Leitfähigkeit, Systemdruck, pH-Wert oder Gradient zu jedem beliebigen Zeitpunkt einer Trennung beobachten, aufzeichnen und auswerten. Lineare Gradienten wurden mit Hilfe zweier pulsationsarmer Kolbenpumpen erzeugt. Diese Anlage besaß einen recht hohen Systemdruck. Dies musste bei der Auswahl der Säulen und der Trennmaterialien beachtet werden.

1.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie nutzt man Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Gruppen der Säulenmatrix und negativ geladenen Bereichen der Enzyme aus. Deren Bindung an das Säulenmaterial ist in erster Linie vom Material selbst, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers abhängig.

1.4.1.1 DEAE-Sepharose - Fast Flow

Die DEAE-Sepharose ist ein schwacher Anionenaustauscher. Bei ihren funktionellen Gruppen handelt es sich um **DiEthylAminoEthyl**reste, die mit einer Matrix aus Sepharose der Teilchengröße 45 bis 165 μm verknüpft sind. Das Material hat im gequollenen Zustand eine sehr hohe Bindekapazität von 110 mg Albumin pro ml.

1.4.1.2 Source 30Q

Die funktionellen Gruppen dieses stark basischen Anionentauschers sind kovalent gebundene Ammoniumkationen. Sie befinden sich auf einer Matrix aus miteinander verknüpften Polystyren- und Divinylbenzeneinheiten mit einer Teilchengröße von durchschnittlich 30 μm . Die Bindekapazität von 40 mg Albumin pro ml Matrixsuspension ist im Vergleich zur DEAE-Sepharose zwar deutlich niedriger, jedoch erlaubt Source 30Q aufgrund seiner Porosität wesentlich höhere Flussraten bei niedrigerem Systemdruck. Daher ist dieses Material sehr gut für die Verwendung zu Beginn einer Reinigung geeignet.

1.4.1.3 MonoQ

MonoQ fällt in die Gruppe der starken Anionenaustauscher und besitzt eine Bindungskapazität von 30 bis 50 mg Protein pro ml Matrix, deren Affinitätswirkung durch Tetraalkylammoniumgruppen hervorgerufen wird. Die Säule mit einem Volumen von 1 ml wurde daher stets im letzten Reinigungsschritt verwendet.

1.4.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei diesem Chromatographieprinzip kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den zu reinigenden Enzymen und dem Säulenmaterial. Als Voraussetzung für das Gelingen der Trennung müssen den Proteinen die Hydrathüllen durch Zusatz von Salzen wie Ammoniumsulfat oder Kaliumsulfat teilweise entzogen werden. Andere geeignete Salze können unter Zuhilfenahme der chaotropen Reihe (HOFMEISTER-Serie) ausgewählt werden. Die dadurch entstandenen hydrophoben Bereiche an den Enzymen führen zur Bindung an die Matrix. Durch abfallende Salzkonzentration im Elutionspuffer erhalten die gesuchten Enzyme wieder verstärkt hydrophile Eigenschaften und werden je nach Struktureigenschaften von der Säule eluiert.

1.4.3.1 Source 15Phe

Die funktionellen Gruppen dieses SOURCE-Materials werden von Phenylresten gebildet, die an die Oberflächen kugelförmiger, poröser und monodisperser Teilchen aus Divinylbenzen und Polystyrol gebunden sind. Die Teilchengröße beträgt $15\ \mu\text{m}$ im Durchmesser und die Bindekapazität des Materials liegt bei ca. $25\ \mu\text{g}$ Protein pro ml.

1.4.3.2 Hydroxyapatit

Die Einteilung dieses Trennmaterials in eines der Chromatographieprinzipien ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird darüber diskutiert, ob man hierbei von einer Ionenaustauschchromatographie oder einer hydrophoben Interaktionschromatographie sprechen kann. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um eine Kombination aus beidem.

Die Partikel mit einem Durchmesser von $40\ \mu\text{m}$ zeichnen sich durch eine Bindekapazität von $>25\ \text{mg}$ Lysozym pro ml aus. Bei Verwendung dieser Säule ist der Verdünnungsfaktor relativ gering und man erhält recht konzentrierte Proteinfraktionen.

1.4.4 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird versucht, das Zielmolekül durch eine reversible Adsorption an einen spezifischen, matrixgebundenen Bindungspartner zu heften und somit selektiv aus der Proteinlösung abzutrennen

1.4.4.1 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Mit diesem Material werden alle Enzyme einer Proteinlösung erfasst, die entweder ADP-, NADP^+ - oder NADPH_2 - abhängige Reaktionen katalysieren. Auf der Oberfläche der Sepharose befinden sich kovalent gebundene ADP-Einheiten. Das

Bindungsvermögen des Materials liegt bei etwa 0.4 mg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase pro ml gequollener Matrix.

1.4.4.2 HiTrap Blue HP

Diese Fertigsäule ist mit einem Material gefüllt, das ebenfalls für die Reinigung von NAD⁺/NADP⁺-abhängigen Enzymen geeignet ist. Im Gegensatz zur 2',5'-ADP-Sepharose 4B fungiert hierbei der blaue Farbstoff Cibacron Blue F3G-A als Rezeptor, welcher kovalent an Agarose gebunden ist. Die Partikelgröße des Trennmaterials liegt bei ca. 34 μm und seine Bindungskapazität beträgt 20 mg Albumin pro ml Matrix.

1.4.4.3 EAH-Sepharose 4B

Hierbei handelt es sich um ein aktivierbares Material, das je nach Anforderung mit verschiedenen chemischen Molekülen beladen werden kann. Auf der Oberfläche der Sepharosemoleküle befinden sich Spacer aus 1,6-Diaminohexan, an welche Liganden, die Carboxylgruppen besitzen, mit der Carbodiimid-Methode chemisch gebunden werden können. Aufgrund des Spacers ist das Material besonders für die Bindung kleiner Proteine geeignet.

Als Ausgangssubstanz für die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Säule wurde Raubasin –auch Ajmalicin genannt– verwendet, welches zusammen mit Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin das Produkt der gesuchten Enzyme darstellt. Da es sich bei Raubasin um einen Methylester der Raubasinsäure handelt, kann dieser unter alkalischer Verseifung in die freie Säure überführt werden. Im Folgenden ist die Durchführung dieser Verseifung mit anschließender Kupplung an die Sepharose beschrieben:

In einem 100 ml Rundkolben wurden 0,5 mmol Raubasin (= 250 mg) in 10 ml THF gelöst. Danach wurden 0,72 mmol (= 30 mg) LiOH in 4,5 ml Wasser gelöst und so vorsichtig unter starkem Rühren der Raubasinlösung zugetropft, dass sich keine zwei Phasen bildeten. Die Verseifungsreaktion wurde bei 50 °C und unter Rückfluss über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt.

Der Umsatzverlauf der Reaktion unterlag regelmäßiger DC-Kontrolle. Hierzu wurde jeweils 1 ml des Reaktionsansatzes entnommen, mit 1 M HCl neutralisiert und dann zweimal mit je 750 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel konnte unter Stickstoffbegasung evaporiert werden. Der erhaltene Rückstand wurde in 100 μ l einer Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 7 : 3 aufgenommen und per DC aufgetrennt. Das verwendete Fließmittel bestand aus 9 VT Chloroform und 1 VT Methanol.

Zur Verifizierung des entstandenen Reaktionsproduktes wurde der entsprechende Substanzfleck von der DC-Platte mit Methanol eluiert und ein FD-Massenspektrum aufgenommen. Der Massenpeak lag bei m/z 338; dies entspricht der Masse von Raubasinsäure (Raubasin M_r 352 abzüglich M_r 14 der abgespaltenen $-CH_2$ -Einheit).

Zur vollständigen Extraktion der erhaltenen Carbonsäure, wurde das im Verseifungsansatz enthaltene THF am Rotationsverdampfer unter Vakuum abdestilliert. Noch vorhandenes Edukt fiel dabei aus. Durch Ausschütteln mit 20 ml Chloroform konnte die wasserlösliche Raubasinsäure von den übrigen Substanzen abgetrennt werden. Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet und entsprechend der Vorschrift zur Herstellung der Säulenmatrix wieder in Wasser aufgenommen, um die empfohlene Konzentration zu erreichen.

Die Kupplungsreaktion erfolgte nach der Carbodiimid-Methode, bei der durch Zugabe eines Carbodiimids ein aktiver Ester der zu kuppelnden Carbonsäure erzeugt wurde. Dieser kann dann die gewünschte Bindung mit den Spacergruppen der Säulenmatrix eingehen.

Für die Kupplungsreaktion wurden 200 mg der entstandenen 232 mg Carbonsäure in einem Gemisch aus 5 Teilen Wasser pH 4,5 und 1 Teil 1,4-Dioxan gelöst und mit 1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde zu 10 ml gequollener EAH-Sepharose 4 B im 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und bei 70 rpm vorsichtig durchmischt.

Als Kupplungsreagenz wurde das Carbodiimid EDC ([N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-HCl]) ausgewählt. Hiervon wurden 1,2 mol in 1 ml Wasser pH 4,5 gelöst und anschließend der pH-Wert mit 1 M HCl erneut auf 4,5 eingestellt. Durch Zugabe der Lösung zur Matrixsuspension wurde die Reaktion gestartet. Nach 22 Stunden vorsichtigem Schütteln bei 70 rpm und Raumtemperatur war die Reaktion beendet.

Im Anschluss wurde das Säulenmaterial EAH-RS-Sepharose 4B entsprechend der Herstellervorschrift für die weitere Verwendung vorbereitet und in eine geeignete Säule gepackt.

1.4.5 Größenausschlusschromatographie

Das Trennprinzip dieses Verfahrens beruht auf der Größe und somit der Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Enzyme in der Gelmatrix. Je größer die Moleküle sind, desto ungehinderter können sie die Matrix passieren. Die kleineren Teilchen, wie z.B. Alkaloide, Salze oder niedermolekulare Proteine, diffundieren sehr viel stärker und häufiger in die Poren der Matrix als höhermolekulare Moleküle und verlassen entsprechend später die Säule. Dieses Verfahren wird zur Trennung von Enzymen sowie zur Bestimmung ihrer Molekülgrößen, aber auch zum Umpuffern von Enzymfraktionen verwendet.

1.4.5.1 Sephadex G25

Sephadex G25 besteht aus einer Dextranmatrix, an deren Oberfläche Epichlorhydrin gebunden ist. Aufgrund der Teilchengröße von $52\ \mu\text{m}$ im gequollenen Zustand können Moleküle mit einer Größe von 1 000 bis 5 000 Da abgetrennt werden. Daher eignet sich das Material sehr gut zur Entsalzung und Umpufferung.

Die Sephadex-Matrix erlaubt sehr hohe Flussraten von bis zu 10 ml/min, wodurch die Arbeitsschritte nach wenigen Minuten beendet werden können.

Für Enzymlösungen mit einem Volumen von höchstens 1.5 ml wurde eine HiTrap Desalting-Fertigsäule mit einem Volumen von 5 ml verwendet.

Zur Entsalzung und Umpufferung größerer Proteinmengen wurde eine Säule mit 30 ml Bettvolumen genutzt.

1.4.5.2 Sephacryl S-100 HR

Bei Sephacryl S-100 HR handelt es sich um ein Material, das nur sehr wenige unspezifische Bindungen mit den Proteinmolekülen eingeht. Diese können durch Wahl eines optimalen Puffersystems, wie z.B. 50 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.3, weiter herabgesetzt werden.

Die Matrix besteht aus Allyldextran und N,N'-Methylenbisacrylamid und besitzt einen optimalen Trennbereich zwischen 1 000 und 50 000 Dalton.

1.5 Gelelektrophoretische Methoden

1.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde von SHAPIRO *et al.* (1967) etabliert und stellt ein denaturierendes Verfahren dar, bei dem die Trennung der Proteine auf deren Molekülgröße beruht. Durch den Zusatz des Emulgators Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, und es entstehen Moleküle mit einem konstanten Verhältnis von negativer Ladung zur Masse. Dies macht eine Trennung der einzelnen Teilchen im elektrischen Feld erst möglich. Des Weiteren kommt es durch die Verwendung von SDS zur Zerstörung der Tertiär- und Quartärstrukturen der Enzyme und somit zur Linearisierung. Die Zugabe von reduzierendem Mercaptoethanol hat die Aufspaltung intermolekularer Disulfidbrücken zur Folge, wodurch unter Umständen unerwünschte Proteinfragmente entstehen können. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen SDS-Protein-Addukte fast ausschließlich auf deren Größe zurückzuführen. Daraus ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der relativen Molekülmassen und den R_f -Werten der einzelnen Enzyme.

Zur Interpretation der relativen Massen wird ein Markergemisch aus Proteinen definierter Größe aufgetragen. Im Folgenden ist die Zusammensetzung des verwendeten Größenstandards „LMW-Calibration-Kit“ der Firma Amersham Biosciences aufgeführt:

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|------------|
| 67 μg | Phosphorylase b (Hasenmuskel) | 97 000 kDa |
| 83 μg | Albumin (Rinderblut) | 66 000 kDa |
| 147 μg | Ovalbumin (Hühnerei) | 45 000 kDa |
| 83 μg | Carboanhydrase (Rindererythrocyten) | 30 000 kDa |
| 80 μg | Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) | 20 100 kDa |
| 116 μg | α -Lactalbumin (Rindermilch) | 14 400 kDa |

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde eine Vertikalelektrophoresekammer verwendet, die zur Aufnahme von zwei Gelen geeignet ist. Diese bestanden jeweils aus einem engmaschigen Trenngel und einem weitmaschigen Sammelgel, welche

nacheinander zwischen je zwei Glasplatten (265 x 145 mm) gegossen wurden. Die hierbei erhaltenen Gele hatten eine Stärke von 1.5 mm.

Folgende Lösungen kamen bei der Gelherstellung zum Einsatz:

Acrylamid-Stammlösung:

29.2 % (m/V) Acrylamid

0.8 % (m/V) Bis-Acrylamid

Trenngellösung (11 %iges Gel):

11.0 ml Acrylamid-Stammlösung

7.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

11.2 ml Wasser

150 μ l SDS-Lösung 20 % (m/V)

20 μ l TEMED

150 μ l APS-Lösung 10 % (m/V)

Sammelgellösung (5 %iges Gel):

1.25 ml Acrylamid-Stammlösung

1.85 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

4.25 ml Wasser

37.5 μ l SDS-Lösung 20 % (m/V)

5.0 μ l TEMED

100 μ l APS-Lösung 10% (m/V)

Bei der Anfertigung eines Gels wurde mit dem Trenngel begonnen, das bis zu einer Höhe von ca. 10 cm ausgegossen und mit Wasser überschichtet wurde. Dies verhinderte den Kontakt der Gelmasse mit Luftsauerstoff, damit die Polymerisation ungehindert ablaufen konnte. Außerdem erhielt man dadurch eine glatte Oberfläche und einen gleichmäßigen Übergang zum Sammelgel. Nach der 45-minütigen Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und ein Kamm zur Bildung von 15 Probenaschen eingebracht, die durch das Ausgießen des Sammelgels gebildet wurden.

Zur Probenvorbereitung und zur eigentlichen Elektrophorese wurden die folgenden Lösungen verwendet:

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

Zur Probenvorbereitung wurden 50 μl Proteinlösung bekannter Konzentration mit 50 μl Probenpuffer und 10 μl Glycerol gemischt, für 7 min bei 95 °C und 500 rpm inkubiert und kurz zentrifugiert. Nachdem die Proben in die Taschen pipettiert waren, wurde das obere Pufferreservoir auf die Apparatur gesetzt, vorsichtig mit Laufpuffer gefüllt und in den mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoretank überführt. Die gesamte Apparatur wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C betrieben.

Folgende Laufbedingungen haben sich als zuverlässig erwiesen:

| Parameter | 1 SDS-Gel | 2 SDS-Gele |
|------------------|------------------|-------------------|
| Stromstärke | 12 - 14 mA | 22 - 24 mA |
| Spannung | variabel | variabel |
| Laufzeit | 14 - 16 Stunden | 14 - 16 Stunden |

Die Trennung war beendet, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende der Glasplatten erreicht hatte. Unter den oben genannten Bedingungen erfolgte eine schnelle Auftrennung, wodurch bereits beim Abbruch der Elektrophorese in der Regel die zwei kleinsten Markerproteine (14.4 kDa und 20.1 kDa) das Gel bereits verlassen hatten. Daraus ergab sich eine verbesserte Trennleistung für größere Enzyme.

1.5.2 Färbemethoden

Zur Detektion der aufgetrennten Enzyme standen unterschiedliche Färbemethoden zur Verfügung. Je nach Proteinkonzentration kam entweder die Silberfärbung oder die Coomassie-Färbung zur Anwendung.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1.5.2.1 Coomassie-Färbung

Die hier beschriebene Methode der Coomassie-Färbung (MEYERS UND LAMBERTS, 1965) ist für Proteinmengen von 0.1 bis 0.3 μg pro Bande geeignet. Hierzu wurde

das Gel zunächst in einer Färbelösung bei 300 rpm für etwa 35 min angefärbt und der Hintergrund anschließend mit Hilfe einer Entfärbelösung wieder ausgewaschen. Die Dauer der Entfärbung konnte durch Erwärmen des Wasseranteils in der Entfärbelösung (ca. 55 °C), und anschließendem Mischen mit den anderen Komponenten, auf etwa 6 Stunden verkürzt werden. Dabei war ein Wechsel der Entfärbelösung alle 1.5 bis 2 Stunden nötig.

Die Aufbewahrung der Gele erfolgte –eingeschweißt in einem Gefrierbeutel– im Kühlschrank bei 4 bis 6°C.

Färbelösung:

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

Entfärbelösung:

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

1.5.2.2 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung nach HEUKESHOVEN UND DERNICK (1985) können Proteine mit einer Konzentration von 1 bis 30 ng sichtbar gemacht werden.

Neben ungefärbten Gelen können auch solche verwendet werden, die nach einer Coomassie-Färbung wieder vollständig entfärbt sind.

Nach kurzem Waschen der Gele in Wasser erfolgte zweimal eine 30-minütige Inkubation in 200 ml Fixierlösung bei 300 rpm. Im Anschluss an ein 60 minütiges Bad in 200 ml Inkubationslösung wurde dreimal mit je 200 ml Wasser für 10 min gründlich gewaschen. Es folgten eine Inkubation mit 200 ml Silberlösung unter Lichtausschluss und ein erneuter Waschschrift mit Wasser. Die Gele wurden so lange unter Abdunklung in die Entwicklerlösung gelegt, bis sich scharfe, braune Banden auf dem ungefärbten Hintergrund zeigten. Dieser Prozess konnte durch Zugabe von 10 %iger Essigsäure gestoppt werden.

Die Aufbewahrung erfolgte wie unter III.1.6.2.1 beschrieben.

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen aufgeführt:

Fixierlösung:

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

Inkubationslösung:

30 % (V/V) Ethanol
6.8 % (m/V) Natriumacetat
0.125 % (m/V) Glutardialdehyd
0.2 % (m/V) Natriumthiosulfat x 5 H₂O
70 % (V/V) Wasser

Silberlösung:

0.2 % (m/V) Silbernitrat
0.01 % (m/V) Formaldehyd
100 % (V/V) Wasser

Entwicklerlösung:

2.5 % (m/V) Natriumcarbonat
0.02 % (m/V) Formaldehyd
100 % (V/V) Wasser

Stopplösung:

10 % (V/V) Essigsäure
90 % (V/V) Wasser

1.6 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das Verfahren nach BRADFORD (1976) angewendet. Für die Erstellung der erforderlichen Eichgerade wurden wässrige Lösungen von BSA im Konzentrationsbereich von 20 bis 180 µg/ml hergestellt. Jeweils 10 µl dieser Lösungen wurden mit Wasser auf 100 µl verdünnt, mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt und 5 min nach einmaligem Umschütteln bei 595 nm vermessen. Als Nullabgleich dienten 100 µl Wasser in 900 µl Bradford-Reagenz. Der Mittelwert aus drei Messungen der Standardlösungen ging in die Eichgerade ein.

Die Gehaltsbestimmung von Lösungen unbekannter Konzentrationen erfolgte analog. In den Fällen, in denen die Absorption der Proteinlösungen < 0.2 und > 0.8 war und somit außerhalb des linearen Bereichs lag, mussten entweder stärker konzentrierte Lösungen verwendet werden oder entsprechende Verdünnungen vorgenommen werden.

Bradford-Reagenz:

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 50 ml Ethanol (96 %) und 100 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) gelöst, mit Wasser auf 1 Liter verdünnt und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 - 8 °C.

1.7 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Catheramin-Reduktase (Raubasin-Synthase) erfolgte routinemäßig unter Zusatz des Cosubstrats NADPH, allerdings wurden auch Versuche zur NADH-Abhängigkeit gemacht. In beiden Fällen handelte es sich bei dem eingesetzten Substrat um Catheramin.

Der verwendete Test erlaubte sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen.

In der folgenden Tabelle sind die genauen Zusammensetzungen der Assays aufgeführt:

| Stammlösung | Volumen | Endkonzentration |
|---|----------------|-------------------------|
| 20 mM NADPH ₂ (18.2 mg/ml H ₂ O) oder 20 mM NADH ₂ (16.7 mg/ml H ₂ O) | 5.0 µl | 1 mM |
| 1 M KPi pH 6.6 (variabel) | 5.0 µl | 50 mM |
| 28 mM Catheramin (10 mg/ml MeOH) | 0.5 µl | 0.14 mM |
| Proteinlösung | 89.5 µl | |

Die Inkubation erfolgte für 30 bis 60 min bei 30°C und 500 rpm im Thermomixer. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl MeOH und starkem Mixen abgestoppt. Die hierbei ausgefallenen Proteine konnten dann mittels Zentrifugation bei 14 000 x g für 5 min abgetrennt werden. Der klare Überstand wurde per HPLC analysiert.

2 Chromatographische und spektroskopische Methoden

2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Hierzu wurden DC-Fertigplatten des Typs Kieselgel 60 F₂₅₄ mit einer Schichtdicke von 0.2 mm auf die benötigte Größe zugeschnitten und die zu analysierenden Lösungen mit einer Glaskapillare entweder punktförmig oder bandenförmig aufgetragen. Für die anschließende Trennung wurden die folgenden Fließmittel verwendet:

| | |
|---|---------------------|
| FM 1: Aceton / Petrolether / Diethylamin | (2 : 7 : 1) |
| FM 2: Xylol / n-Hexan / Ethylacetat / Ether | (1.5 : 4.5 : 5 : 4) |
| FM 3: Ethylacetat / Ether / n-Hexan | (2 : 2 : 4) |
| FM 4: Petrolether / Ethylacetat | (1 : 1) |
| FM 5: Chloroform / Methanol / Essigsäure | (8.1 : 0.9 : 1) |
| FM 6: Chloroform / Methanol / Ammoniak | (9 : 1 : 0.1) |
| FM 7: Chloroform / Methanol | (9 : 1) |

Die Laufstrecke betrug in der Regel 12 bis 14 cm. Die DC-Kammern wurden je nach Trennsystem mit und ohne eingestelltem Filterbogen betrieben. Dies hatte Auswirkungen auf die Kammersättigung und somit auf die Trennleistung.

Die Detektion erfolgte zunächst unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, wobei die aufgetrennten Indolalkaloide eine Fluoreszenzlöschung zeigten. Zusätzlich wurden die Platten mit 5 %iger (m/V) Ammonium-Cer-(IV)-sulfat-Lösung in 85 %iger ortho-Phosphorsäure besprüht und bei Tageslicht ausgewertet. Indolalkaloide färbten sich unter diesen Bedingungen orange-braun.

2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde routinemäßig zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Strictosidin-Synthase, der Strictosidin- β -D-Glucosidase sowie der Cathenamin-Reduktase eingesetzt. Die Absorption der zu detektierenden Substanzen wurde je

nach Assay bei 250 nm bzw. 280 nm gemessen. Dabei konnten sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Enzymaktivität gemacht werden.

Für Untersuchungen zu den Einzelaktivitäten der Strictosidin-Synthase sowie der Strictosidin- β -D-Glucosidase wurde das folgende Trennsystem verwendet:

Trennsäule: LiChrospher 60 RP-Select B (250 x 4 mm)
 Vorsäule: RP-Select B (4 x 4 mm)
 Injektionsvolumen: 40 μ l
 Eluent A: Acetonitril
 Eluent B: H₂O, mit 85 %iger ortho-Phosphorsäure auf pH 2.3 eingestellt
 Detektion: 250 nm

Programm 1:

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Fluss [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|----------------|
| 0.0 | 10 | 90 | 1.5 |
| 8.0 | 50 | 50 | 1.5 |
| 11.0 | 80 | 20 | 1.5 |
| 11.5 | 10 | 90 | 1.5 |
| 15.0 | 10 | 90 | 1.5 |

Die Enzymaktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase sowie deren Aktivität im gekoppelten Expressions-System in *E. coli* in Verbindung mit der Strictosidin-Synthase konnte mit dem folgenden Trennsystem verfolgt werden:

Trennsäule: LiChrospher 60 RP-Select B (250 x 4 mm)
 Vorsäule: RP-Select B (4 x 4 mm)
 Injektionsvolumen: 60 μ l
 Eluent A: Acetonitril
 Eluent B: 25 mM K₂HPO₄, mit 85 %iger ortho-Phosphorsäure auf pH 2.3 eingestellt
 Detektion: 250 oder 280 nm

Programm 2:

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Fluss [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|----------------|
| 0.0 | 28 | 72 | 1.68 |
| 4.0 | 30 | 70 | 1.68 |
| 6.0 | 35 | 65 | 1.68 |
| 6.1 | 28 | 72 | 1.68 |
| 10.0 | 28 | 72 | 1.68 |

Die Strictosidin-Synthase bildet aus den Substraten Tryptamin-HCl und Secologanin das Produkt Strictosidin. Dieses wird von der Strictosidin- β -D-Glucosidase in Cathenamin umgewandelt.

Mit dem gezeigten System konnten Tryptamin-HCl (R_t 1.9 min), Strictosidin (R_t 2.9 min) und Cathenamin (R_t 7.9 min) getrennt werden. Secologanin war aufgrund seines Absorptionsmaximums bei den verwendeten Wellenlängen nicht detektierbar.

Für Untersuchungen zur Aktivität der Cathenamin-Reduktase in pflanzlichen Rohextrakten und bei den einzelnen Reinigungsschritten wurde das folgende Trennsystem verwendet:

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

Vorsäule: RP-Select B (4 x 4 mm)

Injektionsvolumen: 60 μ l

Eluent A: Acetonitril

Eluent B: 39 mM NaH_2PO_4 + 2.5 mM Hexansulfonsäure, mit 85 %iger ortho-Phosphorsäure auf pH 3.6 eingestellt

Detektion: 280 nm

Programm 3:

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Fluss [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|----------------|
| 0.0 | 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 |
| 15.0 | 30 | 70 | 1.68 |

Cathenamin (R_t 12.2 min) wurde enzymatisch in Raubasin (R_t 7.5 min), Tetrahydroalstonin (R_t 8.0 min) und 19-Epi-Raubasin umgewandelt. 19-Epi-Raubasin konnte jedoch mit dem verwendeten System nicht von Raubasin getrennt werden.

2.3 Massenspektrometrie

Die Aufnahmen der Massenspektren erfolgten nach Fragmentierung der Moleküle mittels Elektronenstoß-Ionisation bei 70 eV. Bei den zu messenden Substanzen handelte es sich in erster Linie um Indolalkaloide, die entweder als Referenzsubstanz vorlagen oder nach erfolgter Trennung von einer DC-Platte eluiert werden konnten. Hierbei wurden die zu messenden Substanzflecken ausgekratzt, in eine mit Watte verschlossene Glaskapillare überführt und mit einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 7 : 3 gespült. Die so erhaltenen Lösungen konnten dann in die vorgesehenen Aluminiumtiegel überführt und vollständig getrocknet werden. Die Proben wurden über Direktinlass in den Ionenstrom eingebracht und mit einem Temperaturgradienten von 50 bis 300 °C bei einer Steigerung um 50 °C pro min und einer Ionenquellentemperatur von 200 °C verdampft. Als Analysator kam ein Quadrupol zum Einsatz. Dieser besitzt eine sehr hohe Empfindlichkeit, die für die erfolgreiche Bestimmung von Extrakten aus DC-Platten unerlässlich ist.

Die Aufnahme von FD-Massenspektren (Feld-Desorption) erfolgte im Auftrag am Institut für Chemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

2.4 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren der einzelnen Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 220 bis 350 nm unter Verwendung von Quarzküvetten mit dem Lamda 2 Spektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel konnte entweder Wasser oder Methanol verwendet werden.

Außerdem wurden Proteinkonzentrationen anhand einer Standardkurve bei 595 nm ermittelt (III 1.7).

Die Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen bei 600 nm (OD_{600}) wurde mit dem Eppendorf Biophotometer bestimmt, um einen Anhaltspunkt für das Wachstum der Bakterien zu bekommen. Als Vergleichswert diente LB-Medium mit und ohne Antibiotika.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Gewinnung von Nukleinsäuren

Im Rahmen dieser Arbeit musste Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen isoliert werden. Je nach benötigtem Reinheitsgrad wurden hierfür verschiedene Techniken angewendet.

3.1.1 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von Plasmid DNA

3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Minipräparationen („Quicktest“)

Diese Methode nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) erlaubt die schnelle Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA.

Die zu untersuchenden Bakterienkolonien wurden über Nacht in 4 ml antibiotikahaltigem LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Jeweils 2 ml der zu untersuchenden Kulturen wurden in Eppendorf-Caps überführt und bei RT für 5 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen Pellets wurden mit 125 µl Resuspendierungspuffer (Kapitel II.3) versetzt und so lange geschüttelt, bis keine Agglomerate mehr zu erkennen waren. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zugabe von 270 µl einer 1 %igen Lösung von SDS in 0.2 M NaOH und vorsichtiges Umschwenken der Reaktionsgefäße (3 - 4-mal). Im Laufe der nachfolgenden 5 min kam es zur vollständigen Lyse der Zellen. Durch Zugabe von 200 µl kalter 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5.5, 4 °C), mehrmaligem Schütteln und anschließender Inkubation für 5 min bei 4 °C im Kühlschrank konnten die enthaltenen Proteine gefällt werden. Diese wurden zusammen mit Zellfragmenten durch anschließende Zentrifugation (15 min, 4 °C, 14 000 x g) abgetrennt und die Überstände in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Fällung der gewünschten Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 600 µl eiskaltem Isopropanol (-20 °C), mehrmaligem Schütteln und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 14 000 x g und 4 °C. Die entstandenen Pellets wurden mit 900 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, d.h. mehrmals vorsichtig umgeschüttelt und für 10 min bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das restliche Lösungsmittel mit

etwas Küchenpapier vorsichtig entfernt. Zum vollständigen Trocknen wurden die offenen Reaktionsgefäße für ca. 3 min bei 50°C in einen Thermomixer gestellt. Zum Schluss wurden die Pellets in je 20 µl einer RNase A-Lösung nach SAMBROOK *et al.* (2001) resuspendiert.

RNase A-Lösung:

RNase A zu 10 mg/ml in 0.01 M Natriumacetat Puffer (pH5.2) lösen, für 15 min auf 100 °C erhitzen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen, dann 0.1 VT 1 M Tris-HCl- Puffer (pH 7.4) zugeben und mischen.

3M Kaliumacetat-Lösung pH 5.5:

60.0 ml 5 M Kaliumacetat

11.5 ml Eisessig

28.5 ml Wasser

3.1.1.2 Isolierung hochreiner Plasmid-DNA

Zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA war es nötig, eine 15 ml Übernacht-Kultur bei 4 000 x g und 4 °C für 5 min zu zentrifugieren. Die Aufarbeitung des so erhaltenen Bakterienpellets erfolgte nach dem Protokoll des Kits NucleoSpin Plasmid der Firma Macherey & Nagel. Im letzten Schritt der Säulchen-Reinigung erfolgte die Elution der DNA jedoch mit reinem Ampuwa anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers.

Die so gewonnene DNA konnte für weitere Vektorpräparationen oder Sequenzierungen verwendet werden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise (Mainz) nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode durchgeführt.

3.1.1.3 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Zur Konzentrationserhöhung sowie zur Abtrennung überschüssiger Salze konnten die Nukleinsäuren einer Fällung unterzogen werden. 1 VT der wässrigen Nukleinsäurelösung wurde zur Einstellung des idealen pH-Werts mit 0.1 VT 3 M Natrium-

acetatlösung versetzt. Nach Zugabe des Fällungsreagenzes (2.5 VT Ethanol abs. oder 1 VT Isopropanol) wurde das Gemisch entweder 15 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Die ausgefällten Nukleinsäuren konnten dann durch Zentrifugation (14 000 x g, 4 °C, 30 min) abgetrennt werden. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des überschüssigen Alkohols und Trocknen des Pellets konnte dies in einem geeigneten Volumen Ampuwa oder TE-Puffer aufgenommen werden.

3.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die gut getrennten Banden eines Agarose-Gels wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss daran konnte die enthaltene DNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract über kleine Säulchen herausgewaschen werden. Die Elution der DNA-Fragmente aus den Säulenmembranen erfolgte auch hier mit Ampuwa.

3.3 Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der einzelnen Banden eines Agarose-Gels konnten durch Vergleich mit den standardisierten Markerbanden abgeschätzt werden.

Eine genauere Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch mit dem Eppendorf Biophotometer anhand der OD_{260} der zu bestimmenden Lösungen durchgeführt. Hierzu war eine vorherige Einstellung des pH-Werts auf 7.5 notwendig.

Die Reinheit der Proben ergab sich aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} , der bei 1.8 liegen sollte.

3.4 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (MULLIS, 1990 / SAIKI *et al.*, 1988) stellt eine einfache Möglichkeit dar, DNA gezielt zu vervielfältigen.

Als Template (auch Matrize genannt) kam in erster Linie Plasmid-DNA zum Einsatz. Die Zusammensetzungen der einzelnen Ansätze sowie die verwendeten Temperaturprogramme sind bei den einzelnen Versuchen im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt.

Durch Verwendung eines Thermocyclers mit temperierbarem Deckel konnte auf das Überschichten der PCR-Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden. Dies wäre bei einem Gerät mit nicht beheizbarem Deckel nötig gewesen, um eine Kondensation der kleinen Reaktionsvolumina am Verschluss der Reaktionsgefäße zu verhindern.

3.4.2 Ligation von DNA

Bei der Ligation wurden die Enden der Gene entsprechender Enzyme mit den Enden der linearisierten Zielvektoren verknüpft. Auf diese Weise konnten die zu bearbeitenden Gene in die jeweiligen Plasmide inkloniert werden. Die richtige Orientierung wurde hierbei durch spezifische Überhänge gewährleistet.

Im Folgenden ist eine typische Zusammensetzung der Komponenten aufgeführt:

| Komponente | Volumen |
|---|-------------------------|
| zu ligierende DNA (0.01 – 0.1 μg) | 1.0 – 7.0 μl |
| Vektor (25 – 50 ng/ μl) | 1.0 μl |
| 10 x Puffer für T4 DNA Ligase | 1.0 μl |
| T4 DNA Ligase (3 U/ μl) | 1.0 μl |
| Ampuwa | ad 10.0 μl |

Die Ligationen wurden über Nacht (16 Std.) im Wasserbad bei 16 °C durchgeführt.

3.4.3 Restriktion von DNA

Mit Hilfe der Restriktion wurden Fragmente aus DNA-Stücken herausgeschnitten, um den Erfolg vorangegangener Arbeiten zu kontrollieren oder neue Schnittstellen für anschließende Ligationen zu generieren. Für den Umsatz von 1 μg DNA wurden 1 - 3 μg Endonuklease zugesetzt. Die Reaktionen mussten mit dem optimalen 10 x Puffer angesetzt werden, teilweise war der Zusatz von BSA notwendig. Bei mehrfachen Restriktionen wurde der optimale Puffer anhand von Tabellen ermittelt.

Die Dauer der einzelnen Restriktionen war von den jeweiligen Enzymen abhängig und musste den gegebenen Bedingungen angepasst werden.

Die Temperatur betrug hierbei immer 37 °C.

3.4.5 Auffüllen von 5'-Überhängen (Endfilling)

Das Auffüllen von überhängenden Enden wurde durchgeführt, um die Ligationsquote von Inserts, die am 5'- und 3'-Ende die gleichen Überhänge („sticky-ends“) besaßen, zu erhöhen und somit die Anzahl der Religationen zu verringern.

Hierbei wurde eine der Schnittstellen unverändert gelassen, der 5'-Überhang der anderen verwendeten Restriktionsschnittstelle jedoch aufgefüllt. Das resultierende ‚blunt-end‘ gab daher die richtige Ligationsrichtung vor, und die Anzahl der Religationen konnte verringert werden.

Die für das Endfilling vorgesehenen Schnittstellen –sowohl des Vektors, als auch des Inserts– mussten zunächst durch einen Verdau generiert werden. Um für die weiteren Schritte ausreichend Material zur Verfügung zu haben (ca. 1 μg Vektorplasmid und 3 μg Insert), wurde die nachfolgend aufgeführte Restriktion mehrfach angesetzt und für 1.5 Stunden bei 37 °C inkubiert:

| Komponente | Volumen |
|--|-----------------------|
| Plasmidextrakt (Insert oder Vektor) | q.s. |
| Restriktionsenzym (10 U/ μl) | 2.5 μl |
| 10 x Puffer für Restriktionsenzym | 3.0 μl |
| Ampuwa | ad 30.0 μl |

Für das anschließende Auffüllen der entstandenen 5'-Überhänge wurde ein solcher Ansatz durch die Zugabe eines dNTP-Mixes und des Klenow-Fragments (Large Fragment of DNA-Polymerase I) ergänzt:

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------|------------------|
| Restriktionsansatz | 30.0 μ l |
| dNTP's (20 mM) | 1.0 μ l |
| 10 x Puffer NEB 1 | 12.0 μ l |
| Klenow-Fragment (3 U/ μ l) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | ad 150.0 μ l |

Nach einer 20-minütigen Inkubation erfolgte das Abstoppen der Reaktion für 15 min bei 70 °C und anschließender Zugabe von 30 μ l 6 x Gelauftragspuffer. Bis zur Trennung über ein 1 %iges Agarosegel wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt. Abschließend konnte das Insert mit dem zweiten benötigten Restriktionsenzym ausgeschnitten werden und in den analog behandelten Vektor einligiert werden. In Abb. 5 ist das Prinzip des Endfillings am Beispiel des Vektorsystems *pQE-70-STR* veranschaulicht.

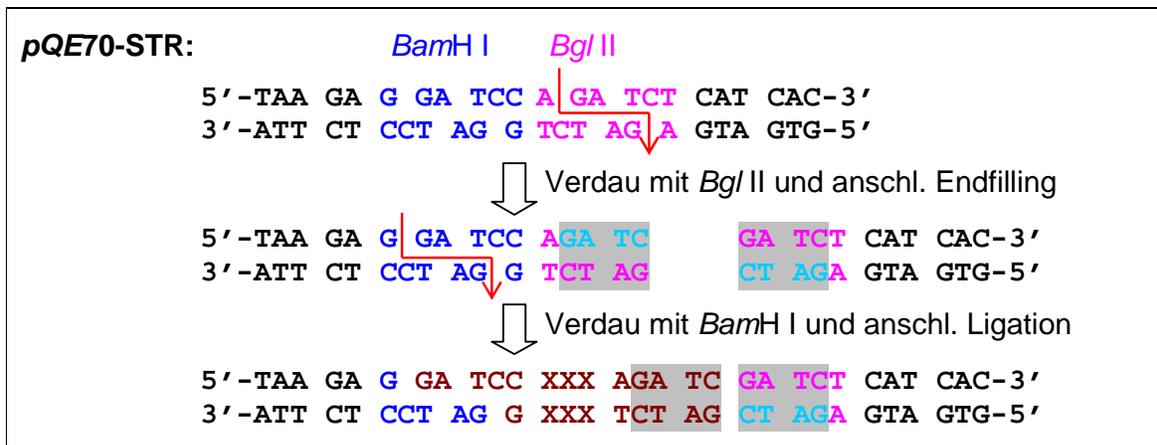


Abb. 5: Darstellung des Endfillings am Beispiel des Vektorsystems *pQE-70-STR*

Blau: *Bam*H I-Schnittstelle, **Rosa:** *Bgl* II-Schnittstelle, **Grau:** aufgefüllte Überhänge
Türkis: ergänzte Basen, **Dunkelrot:** mögliches Insert
Rot: Schnittstellen mit entsprechenden Überhängen

Nach Verdau des Plasmids mit *Bgl* II und anschließendem Endfilling sind die ‚blunt-ends‘ generiert; ein folgender Verdau mit *Bam*H I führt zu einem ‚sticky-end‘. Ein analog hergestelltes Insert kann dementsprechend in nur einer Orientierung eingebaut werden.

3.5 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1.0 - 1.5 %ige Agarosegele angefertigt. Die verwendete Konzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Stücke. Die Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer in kurz aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit ~1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml Wasser) auf 30 ml Agaroselösung versetzt und noch heiß in die vorbereitete Form ausgegossen. Das auspolymerisierte Gel konnte dann in der Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, und die Proben bis zu einem Volumen von 40 µl in die vorgesehenen Taschen pipettiert werden.

Zur Probenvorbereitung und zur eigentlichen Elektrophorese wurden die folgenden Lösungen verwendet:

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| <i>6 x Probenpuffer:</i> | <i>50 x TAE-Puffer:</i> |
| 30 % (V/V) Glycerol | 121 g Tris |
| 0.25 % (m/V) Bromphenolblau | 28.55 ml Eisessig |
| 70 % (V/V) Wasser | 50 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 |
| | ad 500 ml Wasser |

Die Auftrennung erfolgte bei ~1 V/cm² und war beendet, wenn die Bromphenolblau-Front ca. 2/3 der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Die Detektion der Banden erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 320 nm. Zur Größenbestimmung und Mengenbestimmung der detektierten Fragmente wurde standardmäßig der Marker „SmartLadder“ verwendet, der ein Größenspektrum von 200 bis 10 000 bp besitzt.

3.6 Transformation von Plasmid DNA in Bakterienzellen

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von DNA in Bakterienzellen. Hierzu stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme der DNA mittels Temperaturschock durchgeführt.

3.6.1 Herstellung thermokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung thermokompetenter Bakterienzellen nach HANAHAN (1985) wurden 2 ml einer Übernacht-Kultur aus einer monoklonalen Kolonie in 100 ml steriles LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben (für Top10-Zellen; für M15-Zellen mit Kanamycin) und bei 37 °C und 200 rpm bis zur OD₆₀₀ von 0.5 angezogen.

Die Suspensionskultur wurde zu je 50 ml in Falcon-Röhrchen aufgeteilt, 5 min auf Eis gelagert und anschließend für 5 min bei 4 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets vorsichtig in je 15 ml kaltem TfB 1-Puffer resuspendiert. Während der Resuspendierung und der anschließenden 90-minütigen Inkubation waren die Bakterien ständig auf Eis zu lagern, da sie ab diesem Punkt sehr empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen und Scherkräften waren. Nach der folgenden Zentrifugation (5 min, 4 000 x g, 4 °C) wurden die Pellets sehr vorsichtig auf Eis in je 2 ml TfB 2-Puffer resuspendiert. Die erhaltenen, homogenen Suspensionen konnten unter Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen zu je 200 µl in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Die Lagerung der thermokompetenten Bakterien erfolgte bei – 70 °C.

TfB 1-Puffer (sterilfiltriert):

100 mM RbCl₂

50 mM MnCl₂

30 mM Kaliumacetat

10 mM CaCl₂

15 % (V/V) Glycerol

pH 5.8, eingestellt mit Essigsäure

TfB 2-Puffer (sterilfiltriert):

10 mM MOPS

10 mM RbCl₂

75 mM CaCl₂

15 % (V/V) Glycerol

pH 6.8, eingestellt mit KOH

3.6.2 Transformation von DNA in thermokompetente Zellen

Die zur Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und je 50 µl mit Hilfe von abgeschnittenen Pipettenspitzen zu den vorbereiteten Transformationslösungen (meist fertige Ligationen) gegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße für 90 Sekunden

auf 37 °C erwärmt und danach direkt wieder für 2 min auf Eis abgekühlt. Zu jedem Ansatz wurden 450 µl vorgewärmtes, antibiotikafreies LB-Medium gegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Bakteriensuspensionen auf vorgewärmte Selektionsplatten (LB-Agar-Platten mit Ampicillin-Zusatz für Top10F'-Zellen und mit Ampicillin-Kanamycin-Zusatz für M15-Zellen) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.7 Entwicklung und Herstellung eines Coexpressions-Systems

Für die Entwicklung eines Vektorsystems, das die gleichzeitige Expression mehrerer Enzyme erlaubt, wurde als Grundlage der Expressionsvektor *pQE-70* der Firma Qiagen verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Vektor, der ursprünglich drei Restriktionsschnittstellen besaß, und zwar *Sph* I, *Bam*H I und *Bgl* II. Theoretisch konnte man somit die cDNAs von zwei verschiedenen Enzymen hintereinander in das System einbringen und diese exprimieren. Wie im experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation gezeigt wird, war dies jedoch nicht ohne weiteres möglich, da die beiden Restriktionsenzyme *Bam*H I und *Bgl* II die gleichen ‚sticky-ends‘ besaßen und der Vektor an diesen Schnittstellen ohne weiteres religieren konnte. Um dies zu vermeiden, wurde ein Teil der multiple-cloning-site des Vektors *pSE-280* unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*H I und *Hind* III in den Vektor *pQE-70* eingefügt. Somit steht für die Ligation weiterer cDNAs eine viel größere Anzahl Restriktionsschnittstellen zur Verfügung.

Die genaue Durchführung der erwähnten Arbeiten ist in Kapitel IV.1.3 des experimentellen Teils angegeben.

4 Elektronische Datenbanken und wichtige Internetseiten

Zur Bearbeitung, Analyse und Interpretation der Protein- und Nukleinsäuresequenzen wurde auf die folgenden elektronischen Datenbanken und Internetseiten zurückgegriffen:

- ClustalW:
Sequenzalignments mehrerer DNA- und Proteinfragmente nach THOMPSON *et al.* (1994);
www.ebi.ac.uk/clustalw/
- ExPasy (Expert Protein Analysis System), Institut für Bioinformatik in Genf:
zur Übersetzung von DNA in den Aminosäurecode sowie als Proteindatenbank für Sequenzvergleiche und Berechnung von Proteineigenschaften nach BOECKMANN *et al.* (2003)
www.expasy.org/tools/dna.html
www.ebi.ac.uk/swissprot
- FASTA:
zur Suche von Homologien eigener DNA- und Proteinsequenzen in Datenbanken nach PEARSON und LIPMANN (1988)
www.ebi.ac.uk/fasta33/
- NCBI National Center of Biotechnology Information:
zur Suche homologer Sequenzen in Datenbanken (ALTSCHUL *et al.*, 1990)
- BRENDA:
Enzymdatenbank der Universität Köln
www.brenda.uni-koeln.de

IV Ergebnisse

1 Molekularbiologischer Teil

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel (III.3.7) erwähnt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Expressions-System entwickelt und hergestellt, das die Coexpression mehrerer Enzyme des Sekundärstoffwechsels aus *Rauvolfia serpentina* in einem einzigen Vektor ermöglichte. Damit können die gewünschten Stoffwechselprodukte in einer einzigen, homogenen *E. coli*-Kultur mittels heterologer Expression produziert werden. Im Folgenden ist die Entwicklung und der Aufbau eines Systems beschrieben, das für den Einbau von mindestens sechs verschiedenen cDNA's oder auch „Genkassetten“ geeignet ist.

1.1 Klonierung der Strictosidin-Synthase-cDNA in *pQE-70*

1.1.1 Synthese der Strictosidin-Synthase-cDNA mittels PCR

Auf der Grundlage der bereits bekannten Sequenz der Strictosidin-Synthase (EMBL Y00756; KUTCHAN *et al.*, 1988; BRACHER, 1992) aus *Rauvolfia serpentina* wurden genspezifische Primer entwickelt, die die entsprechenden Erkennungssequenzen für die später verwendeten Restriktionsendonukleasen enthielten.

Als geeigneter Expressionsvektor stellte sich *pQE-70* heraus, da er geeignete Restriktionsschnittstellen besaß und die Bildung des enthaltenen C-terminalen (His)₆-Tags durch Einbau eines vorgeschalteten Stop-Codons unterbunden werden konnte. Bei einem N-terminalen (His)₆-Tag, wie er z.B. im Vektor *pQE-2* vorkommt, wäre dessen Bildung unumgänglich und könnte negative Auswirkungen auf die Aktivitäten der co-exprimierten Enzyme haben.

Die Verwendung des Vektors *pQE-70* setzte entsprechend seiner Polylinker-Sequenz am N-Terminus der codierenden cDNA eine *Sph*I-Schnittstelle voraus. Für die Restriktionsschnittstelle am C-Terminus des zu amplifizierenden Gens fiel die Wahl auf *Bam*H I.

Aus der folgenden Abb. 6 sind die verwendeten Primer mit den integrierten Restriktionsschnittstellen sowie deren Herleitung zu entnehmen:

| Forward-Primer STRforSphI: | |
|------------------------------------|---|
| Peptidsequenz: | M A K L S D S Q T M |
| cDNA-Sequenz: | 5'- ATG GCC AAA CTT TCT GAT TCG CAA ACT ATG-3' |
| Primersequenz: | 5'-A GCA TGC ATG GCC AAA CTT TCT GAT TCG CAA AC -3' |
| | <i>Sph I</i> |
| Reverse-Primer STRrevBamHI: | |
| Peptidsequenz: | G N S F V S S H * |
| cDNA-Sequenz: | 5'- GGA AAT TCT TTT GTT TCA AGT CAT TAA-3' |
| Gegenstrang: | 3'- CCT TTA AGA AAA CAA AGT TCA GTA ATT-5' |
| Gegenstrang revers: | 5'- TTA ATG ACT TGA AAC AAA AGA ATT TCC-3' |
| Primersequenz: | 5'-GGA TCC TTA ATG ACT TGA AAC AAA AGA ATT TCC-3' |
| | <i>BamH I</i> <i>t₀</i> |

Abb. 6: Primerentwicklung für die Strictosidin-Synthase mit farblich hervorgehobenen Restriktionsschnittstellen

Hellgrün: *Sph I*-Schnittstelle, **Blau:** *BamH I*-Schnittstelle, **Rot:** Stop-Codon

Die gefriergetrockneten Primer wurden mit Ampuwa auf 10 pmol/ μ l verdünnt. Als Template für die PCR wurde ein Plasmidextrakt des Vektorkonstrukts *pUC19-STR* verwendet. Der PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------------|--------------|
| Template | 1.0 μ l |
| Primer STRforSphI (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| Primer STRrevBamHI (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| dNTP's (20 mM) | 1.0 μ l |
| <i>Advantage</i> -Puffer (10x) | 2.5 μ l |
| <i>Advantage</i> -Polymerase-Mix | 0.5 μ l |
| Ampuwa | 18.0 μ l |

Der verwendete *Advantage*-Polymerase-Mix enthielt neben der Proof-reading Polymerase *Advantage* zusätzlich *Taq*-Polymerase. Diese generierte am 3'-Ende der

amplifizierten Fragmente einen Adenin-Überhang, der für die spätere Ligation in die Klonierungsvektoren *pGEM-T* bzw. *pGEM-T easy* benötigt wurde.

In der nachstehenden Tabelle ist das verwendete Temperatur-Zeit-Programm aufgeführt:

| Anzahl der Zyklen | Temperatur | Zeit |
|-------------------|------------|----------|
| 1 | 94 °C | 1.0 min |
| 30 | 94 °C | 0.5 min |
| | 58 °C | 1.0 min |
| | 72 °C | 2.0 min |
| 1 | 72 °C | 10.0 min |

Nach erfolgter PCR wurden 24 μ l des verwendeten Ansatzes mit 4 μ l Probenpuffer für Agarosegele versetzt und über ein 1 %iges Gel aufgetrennt (Kapitel III.3.5). Der Rest des Reaktionsansatzes wurde bei -20 °C eingefroren.

In Abb. 7 ist deutlich die Bande der selektiv amplifizierten cDNA der STR erkennbar. Bei dem gezeigten Größenstandard handelt es sich um „SmartLadder“ 200.

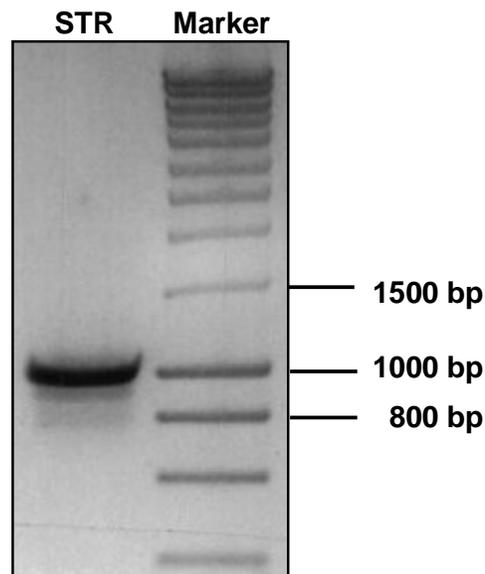


Abb. 7: Agarosegel (1 %ig) nach PCR zur Generierung der Schnittstellen für *Sph I* und *BamH I*

STR: amplifizierte cDNA der Strictosidin-Synthase mit einer Größe von 1 035 bp

Marker: SmartLadder 200

Das amplifizierte Fragment mit einer Länge von 1 035 bp wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und per NucleoSpin Extract Kit (Kapitel III.3.2) eluiert.

1.1.2 Isolierung der Strictosidin-Synthase-cDNA

Zur weiteren Bearbeitung und für die spätere Ligation der cDNA in den gewählten Expressionsvektor bot sich die Ligation des eluierten Fragments in das high-copy-Plasmid *pGEM-T* an. Dieser Klonierungsvektor besaß an seinem jeweiligen 3'-Ende ein ungepaartes Thymidin und konnte somit das PCR-Produkt, das seinerseits einen Adenin-Überhang am 3'-Ende enthielt, direkt aufnehmen. Der Thymidin-Überhang des Vektors erhöhte demnach auch die Ligationsquote, da Religationen weitestgehend ausgeschlossen waren.

Die Durchführung der Ligation sowie die anschließende Transformation in TOP10F'-Zellen erfolgte wie in den Kapiteln III.3.4.2 und III.3.6.2 beschrieben.

Einige der Kolonien, die nach der Transformation auf den verwendeten LB-Amp-Platten entstanden, wurden isoliert und erneut vermehrt. Die enthaltenen Plasmide wurden aus den entsprechenden Flüssigkulturen aufgereinigt (Kapitel III.3.1.1.2) und auf die Anwesenheit sowie die richtige Orientierung des gewünschten cDNA-Fragments in *pGEM-T* untersucht.

Zur Feststellung der Anwesenheit der cDNA wurde ein Verdau von 5 μ l des Extrakts mit den Restriktionsendonukleasen *Sph*I und *Bam*HI über einen Zeitraum von 2 Stunden bei 37 °C und 500 rpm durchgeführt. Das anschließende Agarosegel (1 %ig) brachte Banden mit einer Größe von ~400, ~650 und 1 035 bp hervor, was bedeutete, dass die gewünschte cDNA im Vektor enthalten war.

Für weitere Untersuchungen war die Herstellung eines reinen Plasmidextrakts erforderlich. Dieser wurde aus der Übernachtskultur eines positiven Klons mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits (Kapitel III.3.2) erhalten.

Zur genaueren Untersuchung des Inserts wurde der reine Plasmidextrakt für 30 min bei 37 °C und 500 rpm nach dem aufgeführten Pipettierschema verdaut:

| Komponente | 1 | 2 |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 2.0 μ l | 2.0 μ l |
| <i>Sph</i> I (5 U/ μ l) | 1.5 μ l | - |
| <i>Sph</i> I (1 U/ μ l) | - | 1.5 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| Ampuwa | 3.5 μ l | 3.5 μ l |

Das erhaltene Bandenmuster nach Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel ist in Abb. 8 zu ersehen.

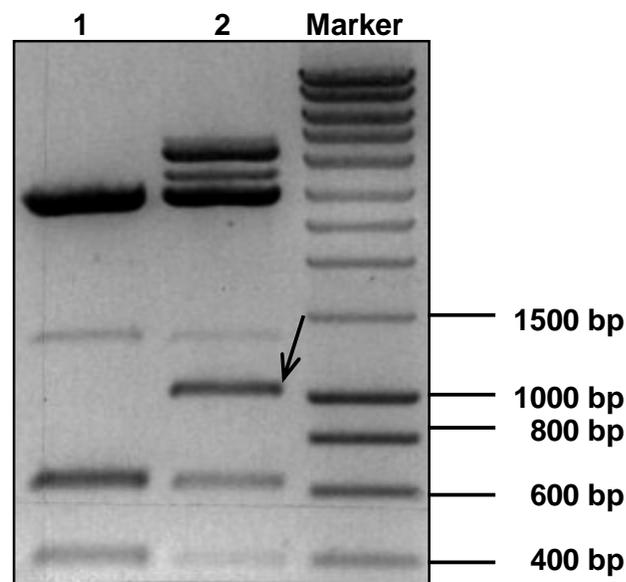


Abb. 8: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau der STR-cDNA im Vektor *pGEM-T* mit *Sph*I und *Bam*H I zur Insert-Kontrolle

1: Verdau mit 7.5 U *Sph* I und 20 U *Bam*H I, STR-cDNA (1 035 bp, →) wurde komplett verdaut

2: Verdau mit 1.5 U *Sph* I und 20 U *Bam*H I, STR-cDNA (→) ist noch nicht komplett gespalten

Marker: SmartLadder 200

Aufgrund der Tatsache, dass der Vektor *pGEM-T* sowie die cDNA der Strictosidin-Synthase jeweils eine interne Schnittstelle für *Sph*I besaßen, konnte man anhand des aufgetretenen Bandenmusters im Agarosegel eindeutig die Anwesenheit der cDNA im Vektor bestimmen. Jedoch war nicht eindeutig zu erkennen, ob zusätzlich

ein 26 bp großes Stück aus dem Vektor enthalten war. Dieser Befund erklärt sich folgendermaßen: Die *Sph* I-Schnittstelle in *pGEM-T* liegt 26 bp vor dem 5'-Ende der einligierten STR-cDNA und hätte bei späteren Versuchen gestört. Die nachfolgende Abb. 9 soll diese Problematik veranschaulichen:

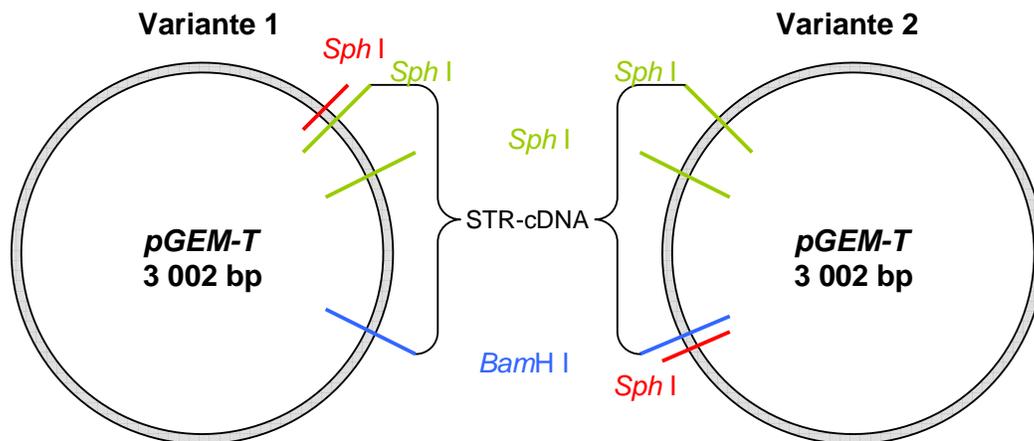


Abb. 9: Darstellung der möglichen Fragmente bei einem Verdau mit *Sph* I und *Bam* H I

Hellgrün dargestellt sind die vorhandenen *Sph* I-Schnittstellen der STR-cDNA

Blau dargestellt sind die vorhandenen *Bam* H I-Schnittstellen der STR-cDNA

Rot dargestellt sind die *Sph* I-Schnittstellen im Vektor *pGEM-T*

Bei einem Doppelverdau mit *Sph* I und *Bam* H I wäre die Abtrennung des 26 bp-Fragments nach der Variante 1 nicht gesichert, wogegen bei Variante 2 sicher davon ausgegangen werden kann, dass nur die gewünschte cDNA herausgeschnitten wird. Ein vollständiger alleiniger Verdau mit *Sph* I ergibt nach Variante 1 Fragmente mit 26 und 403 bp, bei Variante 2 kommt es zur Bildung von 403 und 658 bp großen Fragmenten.

Den dargestellten Sachverhalten zur Folge konnte die richtige Orientierung und somit die Abwesenheit des störenden 26 bp-Fragments nur durch einen Verdau mit *Sph* I sichergestellt werden. Dabei wurden 2 μ l Plasmidextrakt mit 7.5 U *Sph* I in einem Gesamtvolumen von 10 μ l über eine Dauer von 1.5 Stunden bei 37 °C und 500 rpm hydrolysiert. Die Reaktion brachte zwei Spaltprodukte mit 403 und 658 bp hervor, womit der Nachweis der gewünschten Orientierung erbracht war.

Wäre auf dem Agarosegel nur eine Bande bei ~400 bp aufgetreten, hätte die Ligation das unerwünschte Produkt geliefert und das 26 bp kurze Genstück wäre nicht abzutrennen gewesen.

Zur Isolierung der gewünschten cDNA mussten Bedingungen zum Verdau gefunden werden, bei denen das STR-Gen noch nicht komplett gespalten und somit auf dem Agarosegel erkennbar war.

Die folgende Zusammensetzung stellte sich hierfür als optimal heraus:

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 2.0 μ l |
| <i>Sph</i> I (1 U/ μ l) | 1.5 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 1.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 1.0 μ l |
| Ampuwa | 3.5 μ l |

Der aufgeführte Ansatz wurde 4-mal hergestellt und für jeweils 5, 10, 20 und 30 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit konnten die entsprechenden Spaltungsreaktionen durch Zugabe von 4 μ l Probenpuffer (Kapitel III.3.5) und anschließendem Einfrieren bei -20 °C gestoppt werden. Auf dem nachfolgenden Agarosegel (1 %ig, Abb. 10) war die gewünschte Bande mit 1 035 bp nach 5- und 10-minütiger Inkubation deutlich zu erkennen und konnte extrahiert werden (Kapitel III.3.2).

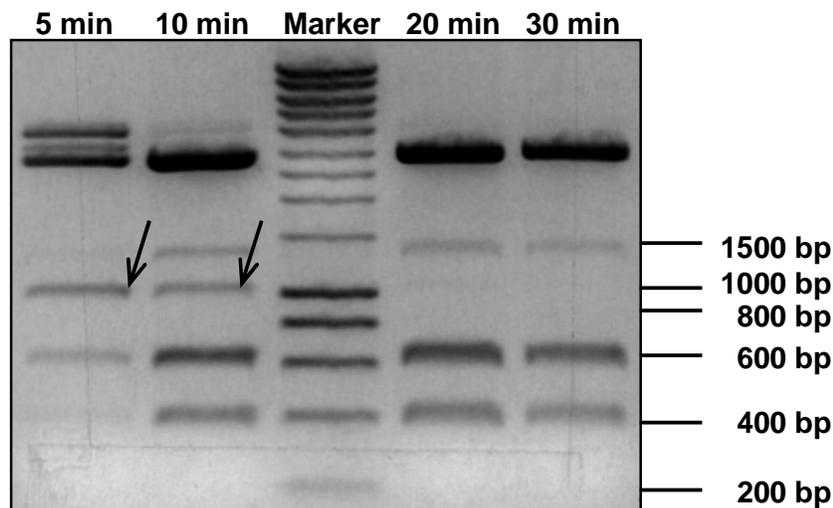


Abb. 10: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von *pGEM-T-STR* zur Generierung der *Sph* I- und *Bam*H I-Schnittstellen

Nach 5- und 10-minütigem Verdau ist die STR-cDNA (→) mit 1 035 bp erkennbar.

Marker: SmartLadder 200

Damit war die cDNA der Strictosidin-Synthase mit den Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Bam*H I, die zur Ligation in den gewünschten Expressionsvektor *pQE-70* benötigt wurden, isoliert.

1.1.3 Umklonierung des Strictosidin-Synthase-Gens in *pQE-70*

Parallel zur Herstellung des Inserts wurde der Expressionsvektor *pQE-70* für die Aufnahme des STR-Gens vorbereitet. Hierzu musste der zirkulär vorliegende Vektor zunächst unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Bam*H I linearisiert werden, wobei gleichzeitig die Bildung der erforderlichen Ligationsstellen erfolgte.

Zunächst erfolgte eine Inkubation von 100 μ l *pQE-70* in 15 ml TOP10F'-Zellkultur über Nacht mit anschließender Plasmidextraktion (Kapitel III.3.1.1.2). Nach einem Testgel zur Abschätzung der Vektorkonzentration (~ 60 ng/ μ l) kam es zum Restriktionsverdau der aufgereinigten zirkulären Plasmide mit *Sph*I und *Bam*H I bei 37 °C und 500 rpm für 2 Stunden.

Der Ansatz enthielt:

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 5.0 μ l |
| <i>Sph</i> I (5 U/ μ l) | 4.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 1.5 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 2.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 5.5 μ l |

Bei dem durchgeführten Restriktionsverdau kam es zur Linearisierung des 3 426 bp großen Vektors, wobei direkt hinter der Promotorregion die *Sph*I-Schnittstelle generiert wurde. In einem Abstand von 8 bp in Richtung 3'-Ende entstand die *Bam*H I-Schnittstelle.

Die schematische Abb. 11 des Expressionsvektors veranschaulicht diesen Sachverhalt:

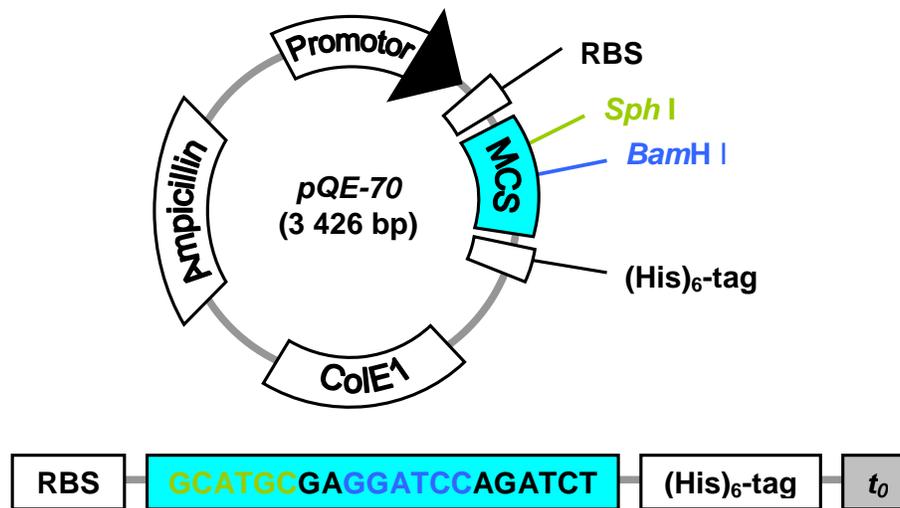


Abb. 11: Vektorkarte des *pQE-70*-Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionschnittstellen für *Sph* I und *Bam* H I

Hellgrün: *Sph* I-Schnittstelle, Blau: *Bam* H I-Schnittstelle, Türkis: Multiple-Cloning-Site

t₀: Stop-Codons in allen Leserahmen

Die beim Plasmidverdau entstandenen Spaltprodukte konnten über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt werden. Der linearisierte Vektor *pQE-70* wurde aus dem Gel wie unter III.3.2 beschrieben extrahiert.

Nach Ligation (Kapitel III.3.4.2) der STR-cDNA in das vorgeschchnittene Vektorplasmid konnte dieses in TOP10F'-Zellen transformiert (Kapitel III.3.6.2) und auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert werden. Die so erhaltenen Kolonien wurden selektiert und nach ihrer Vermehrung einer Minipräparation (Kapitel III.3.1.1.1) unterzogen.

Der anschließende Verdau mit *Sph* I und *Bam* H I zeigte, dass jede der untersuchten Kolonien das Vektorkonstrukt *pQE-70-STR* enthielt.

Eine dieser positiv getesteten Bakterienkulturen wurde erneut über Nacht vermehrt, das enthaltene Plasmid extrahiert (Kapitel III.3.2) und zur späteren Aktivitätsbestimmung in M15-Zellen transformiert (Kapitel III.3.6.2).

Die Expressionsversuche sowie die anschließenden Aktivitätstests sind zur besseren Übersicht in Kapitel IV.1.4 beschrieben.

1.2 Klonierung der Strictosidin- β -D-Glucosidase-cDNA in *pQE-70*

Bevor die cDNA der Strictosidin- β -D-Glucosidase in das Coexpressions-System aufgenommen werden konnte, musste die Aktivität des Enzyms mit vorgeschalteter Ribosomen-Bindestelle (RBS) nachgewiesen werden. Diese wurde eingefügt, damit die Bildung des Enzyms bei späteren Coexpressionsversuchen gewährleistet war.

1.2.1 Synthese der SG-cDNA mit integrierter Ribosomenbindestelle mittels PCR

Für die Entwicklung geeigneter Primer wurde auf die Sequenz der Strictosidin- β -D-Glucosidase aus *Rauvolfia serpentina* (GERASIMENKO *et al.* 2002, GenBank AJ302044) zurückgegriffen.

Bei der Auswahl der Restriktionsschnittstellen wurde darauf geachtet, dass eine spätere Ligation des RBS-SG -Gens hinter das STR-Gen nicht behindert wurde. Daher kam für den Forward-Primer nur *Bam*H I in Frage; für den Reverse-Primer ergab sich demnach *Bgl* II als noch verbleibende Restriktionsschnittstelle in *pQE-70*. Die folgende Abb. 12 zeigt die Herleitung der Primersequenzen mit den integrierten Restriktionsschnittstellen und der vorgeschalteten RBS:

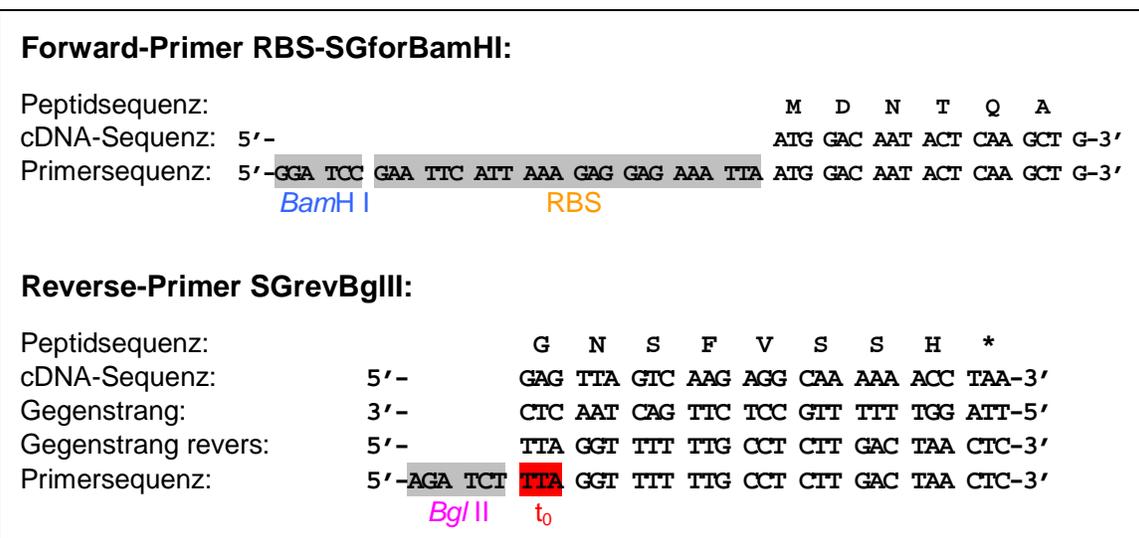


Abb. 12: 5'- und 3'-Enden der Strictosidin- β -D-Glucosidase cDNA mit farblich hervorgehobenen Forward- und Reverse-Primern

Blau: *Bam*H I-Schnittstelle, **Rosa:** *Bgl* II-Schnittstelle,
Orange: Ribosomenbindestelle, **Rot:** Stop-Codon

Die Sequenz der eingefügten RBS wurde dem Plasmid *pQE-70* entnommen und vor dem Start-Codon für die Strictosidin- β -D-Glucosidase als Überhang eingefügt. Sie sollte ein erneutes Binden an das Ribosom und damit die Expression des Enzyms in dem geplanten gekoppelten Assay ermöglichen (JOHNSTON *et al.*, 2000).

Die Primer wurden gemäß den Herstellerangaben auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ l verdünnt und im unten aufgeführten Reaktionsansatz eingesetzt. Als Matrize für die Vervielfältigungsreaktion stand ein Extrakt des Vektors *pTYB1* mit enthaltener SG-cDNA zur Verfügung.

| Komponente | Volumen |
|--|--------------|
| Template | 1.0 μ l |
| Primer RBS-SGforBamHI (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| Primer SGrevBgIII (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| dNTP's (20 mM) | 1.0 μ l |
| <i>Advantage</i> -Puffer (10x) | 2.5 μ l |
| <i>Advantage</i> -Polymerase-Mix | 0.5 μ l |
| Ampuwa | 18.0 μ l |

Aufgrund des langen 5'-Überhangs der RBS im Forward-Primer und den insgesamt recht niedrigen Schmelztemperaturen wurde ein PCR-Programm gewählt, in dem die ersten 5 Zyklen unter Verwendung einer niedrigeren Bindungstemperatur durchgeführt wurden. Damit sollte die Bindung des Forward-Primers begünstigt werden.

Das Zeitintervall für die Elongationsphase wurde im Vergleich zur PCR für die Strictosidin-Synthase um 30 sec verlängert, da die cDNA der Strictosidin- β -D-Glucosidase ca. 600 bp länger ist.

Die anschließenden 25 Zyklen erfolgten dann wieder unter einer etwas erhöhten Annealingtemperatur.

Das komplette Temperatur-Zeit-Programm ist in der aufgeführten Tabelle dargestellt:

| Anzahl der Zyklen | Temperatur | Zeit |
|-------------------|------------|----------|
| 1 | 94 °C | 1.0 min |
| 5 | 94 °C | 0.5 min |
| | 45 °C | 1.0 min |
| | 72 °C | 2.5 min |
| 25 | 94 °C | 0.5 min |
| | 58 °C | 1.0 min |
| | 72 °C | 2.5 min |
| 1 | 72 °C | 10.0 min |

Nach erfolgter Reaktion wurden 24 μ l des verwendeten Ansatzes mit 5 μ l Probenpuffer versetzt und über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt (Kapitel III.3.5). Der Rest des Reaktionsansatzes wurde bei -20 °C gelagert.

Das einzige Genstück, das bei der PCR amplifiziert wurde, ergab nach der Gelelektrophorese eine Bande bei ~1 600 bp (Abb. 13).

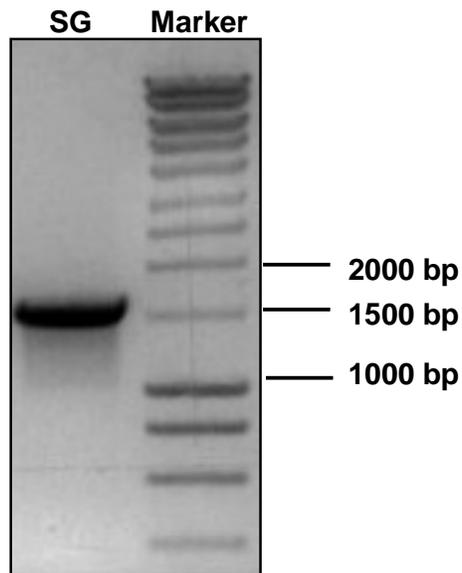


Abb. 13: Agarosegel (1 %ig) nach PCR zur Gewinnung der SG-cDNA unter gleichzeitiger Generierung der Schnittstellen für *Bam*H I und *Bgl* II

SG: amplifizierte cDNA der Strictosidin- β -D-Glucosidase incl. RBS mit einer Größe von 1 623 bp

Marker: SmartLadder 200

Die entstandene cDNA der SG incl. RBS stand somit für weitere Arbeiten zur Verfügung.

1.2.2 Isolierung der Strictosidin- β -D-Glucosidase-cDNA mit vorgeschalteter Ribosomenbindestelle

Das erhaltene Fragment mit einer Größe von 1 623 bp konnte unter Verwendung des Kits NucleoSpin Extrakt (Kapitel III.3.2) aus dem Agarosegel gewonnen und in den Vektor *pGEM-T* eingeführt werden. Die Zusammensetzung des hierzu benötigten Ligationsansatzes sowie die Durchführung der anschließenden Transformation des Plasmids in TOP10F[']-Zellen sind in den Kapiteln III.3.4.2 und III.3.6.2 aufgeführt.

Von einigen Bakterienkolonien, die auf den Selektionsplatten gewachsen waren, wurden Übernachtkulturen angesetzt. Aus den erhaltenen Flüssigkulturen konnten die Plasmide isoliert werden und ein erster Test auf Anwesenheit des gewünschten Vektorkonstrukts *pGEM-T-RBS-SG* durchgeführt werden. Hierbei kam es zum Verdau von 5 μ l des Extraktes mit dem Restriktionsenzym *BamH I* für 2 Stunden bei 37 °C und 500 rpm.

Aufgrund einer internen Schnittstelle für *BamH I* innerhalb der ersten Hälfte der RBS-SG-Sequenz sollte eine einzelne Bande mit einer Größe von 721 bp entstehen. Diese Überlegung wurde nach Auftrennung des Reaktionsgemisches über ein 1 %iges Agarosegel bestätigt.

Zur Gewinnung der RBS-SG-cDNA wurden 200 μ l einer positiv getesteten Flüssigkultur in 15 ml LB-Amp-Medium überimpft und über Nacht inkubiert. Die gesamte Kultur wurde anschließend einer Plasmidisolation unterzogen (Kapitel III.3.1.1.2).

Die bereits erwähnte interne Restriktionsschnittstelle für *BamH I* machte die Isolierung der cDNA nur mit Hilfe eines partiellen Verdau bei verschiedenen Inkubationszeiten möglich. Der unten aufgeführte Reaktionsansatz wurde insgesamt 5-mal angesetzt und jeweils für 5, 10, 15, 20 und 30 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert:

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 4.0 μ l |
| <i>Bgl</i> II (10 U/ μ l) | 2.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I-Puffer (10 x) | 2.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 9.0 μ l |

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 5 μ l Probenpuffer und sofortigem Einfrieren bei -20 °C abgestoppt. Nach Auftrennen der entstandenen Fragmente über ein Agarosegel (1 %ig, Abb. 14) trat die gewünschte Bande mit einer Größe von 1 623 bp nach 5, 10 und 15 min auf. Nach einer Inkubationszeit von über 20 min war die cDNA komplett zersetzt, und es konnten ausschließlich die Spaltprodukte mit 721 und 902 bp identifiziert werden.

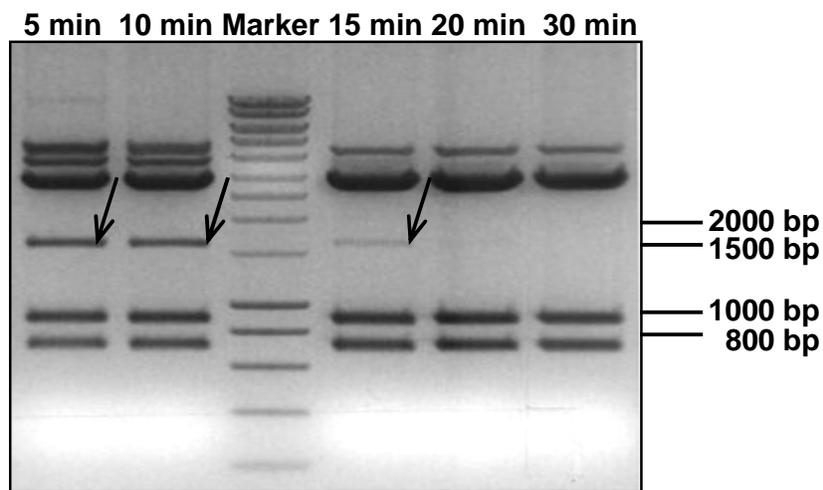


Abb. 14: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von *pGEM-T-RBS-SG* zur Generierung der *Bam*H I- und *Bgl* II-Schnittstellen

Nach 5-, 10- und 15-minütigem Verdau ist die RBS-SG-cDNA (→) mit 1 623 bp erkennbar.

Marker: SmartLadder 200

Beide Banden, die nach 5- und 10-minütigem Verdau auftraten, wurden analog zu Kapitel III.3.2 über eine Säule aufgereinigt und mit 25 μ l Ampuwa eluiert.

Damit war die erste Voraussetzung für die Ligation der cDNA mit den Schnittstellen für *Bam*H I und *Bgl* II in den Expressionsvektor *pQE-70* geschaffen.

1.2.3 Umklonierung des RBS-SG-Gens in *pQE-70*

Für eine erfolgreiche Ligation der RBS-SG-cDNA in das Vektorplasmid *pQE-70* war ein Verdau des Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*H I und *Bgl* II nötig. Da diese beiden Schnittstellen einen verhältnismäßig geringen Abstand von 6 bp zueinander besaßen, war eine längere Inkubationszeit erforderlich.

Für die Generierung der Restriktionsschnittstellen wurde daher das folgende Reaktionsgemisch für 3 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend über ein Agarosegel (1 %ig) aufgetrennt:

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 4.0 μ l |
| <i>Bgl</i> II (10 U/ μ l) | 2.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I-Puffer (10 x) | 2.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 9.0 μ l |

Bei dem durchgeführten Verdau wurde die *Bgl* II-Schnittstelle in einem Abstand von 6 bp hinter der *Bam*H I-Schnittstelle in Richtung des 3'-Endes eingefügt. Dies ist in Abb. 15 noch einmal veranschaulicht:

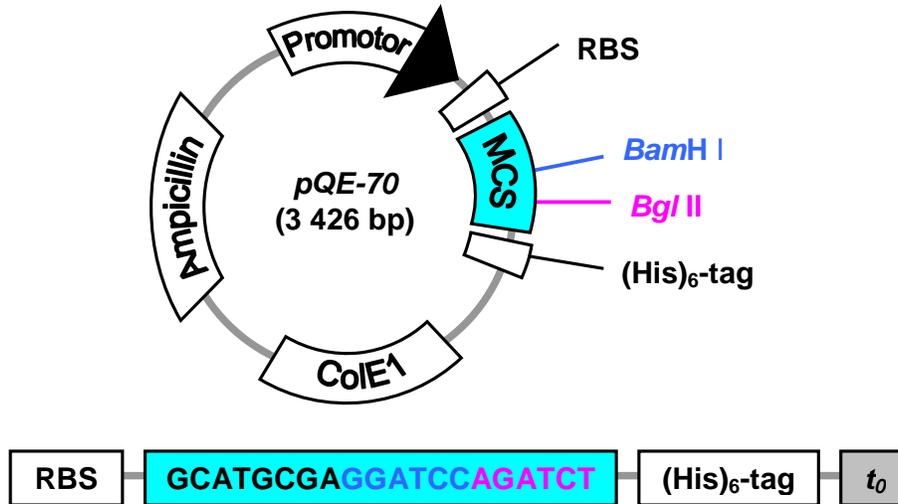


Abb. 15: Vektorkarte des *pQE-70*-Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen für *BamH I* und *Bgl II*

Blau: *BamH I*-Schnittstelle, Rosa: *Bgl II*-Schnittstelle, Türkis: Multiple-Cloning-Site
 t₀: Stop-Codons in allen Leserahmen

Das linearisierte Plasmid (3426 bp) wurde analog zu Kapitel III.3.2 aufgearbeitet und stand für die Aufnahme des RBS-SG-Gens bereit.

Bei der anschließenden Ligation (Kapitel III.3.4.2) kam es zu einer geringen Ausbeute des gewünschten Vektorkonstrukts. Die Anzahl der Religationen im leeren Vektor war ungewöhnlich hoch. Die Ursache hierfür war in den Überhängen der Restriktionsstellen der beiden Enzyme *BamH I* und *Bgl II* zu suchen. Diese so genannten ‚sticky-ends‘ wiesen identische Sequenzen auf, wodurch die Religationen und damit die schlechte Ligationsquote erklärt werden konnten. Außerdem war bei dieser Konstellation kein gerichteter Einbau des Gens in das Plasmid möglich, d.h. die Orientierung der cDNA war nicht kontrollierbar. Diese konnte sowohl vorwärts als auch rückwärts eingebaut werden (Abb. 16).



Abb. 16: Darstellung der identischen ‚sticky-ends‘ der Restriktionsenzyme *BamH I* und *Bgl II*

Rot: Schnittstellen mit entsprechenden Überhängen

Trotz des geschilderten Sachverhaltes war es möglich, Kolonien zu erhalten, die das gewünschte Vektorkonstrukt *pQE-70-RBS-SG* enthielten. Dies konnte mittels Restriktionsverdau von erhaltenen Plasmidextrakten mit *Bam*HI nachgewiesen werden, wobei ein Fragment mit einer Größe von 721 bp entstand.

Für die spätere Bestimmung der Aktivität wurde das Plasmid *pQE-70-RBS-SG* aus einer positiven Bakterienkultur in größeren Mengen hergestellt (Kapitel III.3.1.1.2) und anschließend in M15-Zellen transformiert (Kapitel III.3.6.2).

Wie schon bei der Isolierung des STR-Gens beschrieben (Kapitel IV.1.1.2), werden die Versuche zur Expression und Aktivitätsbestimmung in Kapitel IV.1.4 gesondert aufgeführt.

1.3 Konstruktion des Coexpressions-Systems

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Vorarbeiten zur Herstellung eines Expressions-Systems beschrieben, mit dem man zwei Enzyme gleichzeitig innerhalb eines einzigen Vektors darstellen konnte.

Da die Ligation des RBS-SG-Gens in die Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Bgl* II, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, erfolgreich war, wurden Versuche unternommen, dieses Gen direkt hinter die STR-Sequenz im Vektorkonstrukt *pQE-70-STR* einzubauen. Dies konnte hier nicht mit der in Kapitel IV.1.1.3 erläuterten Methode erreicht werden. Es gelang zwar, die cDNA an der gewünschten Stelle einzubauen, jedoch befand sich das Gen in der unerwünschten 3'→5'-Orientierung anstelle der erforderlichen 5'→3'-Orientierung. Damit war die fehlerfreie Expression der Strictosidin- β -D-Glucosidase nicht gewährleistet.

Versuche, die Religationsquote des Vektors durch Auffüllen der *Bgl* II-Schnittstellen mit Hilfe des Klenow-Fragments (Kapitel III.3.4.5) zu verringern und entsprechend die Orientierung der RBS-SG-cDNA vorzugeben, führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Aufgrund dieser Sachverhalte kam es zur Planung eines veränderten Systems, das die Aufnahme von mindestens sechs einzelnen cDNAs oder sechs ‚Genkassetten‘ und somit die parallele Expression einer größeren Zahl von Enzymen erlauben würde.

Der Ausgangspunkt für das überarbeitete Vektorkonstrukt stellte das Plasmid *pQE-70-STR* dar. Im Folgenden wird der Einbau einer größeren Multiple-Cloning-Site (MCS) sowie der RBS-SG-cDNA ausführlich beschrieben.

1.3.1 Isolierung der MCS aus *pSE-280* und Einbau in *pQE-70-STR*

Bei der Auswahl einer MCS, die in das bestehende Vektorsystem *pQE-70-STR* eingefügt werden konnte, kam es auf eine hohe Anzahl Restriktionsschnittstellen an, welche für die unkomplizierte Ligation mehrerer Enzyme geeignet sein sollten, d.h. die keine Interaktion mit bereits vorhandenen und noch einzufügenden Sequenzen erwarten ließen.

Eine hierfür geeignete MCS befand sich in einem Expressionsvektor mit der Bezeichnung *pSE-280*. Auf einer Gesamtlänge von 347 bp waren insgesamt 41 Restriktionsschnittstellen zu finden, darunter auch *BamH I* und *Hind III*, die in einem Abstand von 253 bp zueinander lagen und für den Einbau in *pQE-70-STR* sehr gut geeignet waren.

Aus 40 ml einer Übernachtskultur von *pSE-280* in TOP10F'-Zellen wurde analog zu Kapitel III.3.1.1.2 ein hochreiner Plasmidextrakt hergestellt. Dieser wurde mit den Restriktionsenzymen *BamH I* und *Hind III* für 1.5 Stunden in einem Gesamtvolumen von 25 μ l bei 37 °C inkubiert:

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------|--------------|
| Plasmidextrakt | 12.0 μ l |
| <i>Hind III</i> (20 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| <i>BamH I</i> (20 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 2.5 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 2.5 μ l |
| Ampuwa | 7.0 μ l |

Nach Zusatz von 5 μ l Probenpuffer und anschließender gelelektrophoretischer Trennung (1 %iges Agarosegel, Abb. 17) konnte die Bande mit einer Größe von ~250 bp extrahiert (Kapitel III.3.2) und der Ligation in *pQE-70-STR* zugeführt werden.

Parallel zu den durchgeführten Arbeiten wurde das Plasmid *pQE-70-STR* für die Aufnahme der neuen MCS vorbereitet. Hierbei kam es zunächst zur Linearisierung des Vektorkonstrukts durch das Restriktionsenzym *Hind III*. Dessen Schnittstelle lag zwar innerhalb des codierenden Bereichs für den C-terminalen (His)₆-tag, führte aber zu keiner Beeinträchtigung, da diese Polylinker-Region hier nicht genutzt wurde.

Der Ansatz zur Linearisierung enthielt die unten aufgeführten Komponenten und wurde über einen Zeitraum von 1.5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------|--------------|
| Plasmidextrakt | 10.0 μ l |
| <i>Hind</i> III (20 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 2.5 μ l |
| Ampuwa | 12.0 μ l |

Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte der Ansatz durch Zugabe von 27.5 μ l Ampuwa, 3.5 μ l BSA (1mg/ml), 3.5 μ l *Bam*H I-Puffer (10x) und 0.5 μ l *Bam*H I (20u/ μ l) auf ein Gesamtvolumen von 60 μ l erweitert werden. Nach erneuter Inkubation für 1.5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad war der Vektor mit den angestrebten Restriktionsschnittstellen versehen und konnte aus dem darauf folgenden Agarosegel (1 %ig, Abb. 17) extrahiert werden (Kapitel III.3.2).

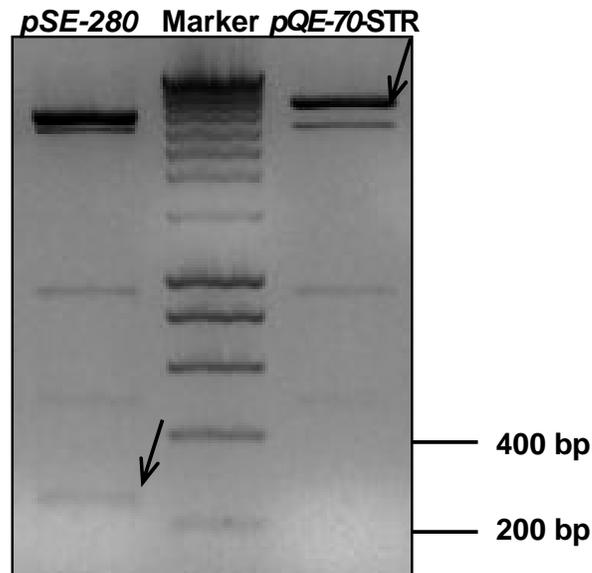


Abb. 17: Isolierung der MCS aus *pSE-280* sowie Generierung der Restriktionsschnittstellen im Plasmid *pQE-70-STR* mittels *Bam*H I und *Hind* III

***pSE-280*:** Dargestellt ist die Bande der MCS mit einer Größe von 253 bp (→) nach Verdau des Plasmids *pSE-280* mit *Bam*H I und *Hind* III.

***pQE-70-STR*:** Dargestellt ist die ausgeschnittene Bande des linearisierten Plasmids *pQE-70-STR* (4 461 bp) nach Verdau mit *Bam*H I und *Hind* III.

Marker: SmartLadder 200

Damit waren die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Einführung der neuen MCS in *pQE-70-STR* geschaffen. Die Ligationsreaktion wurde wie in Kapitel III.3.4.2 beschrieben durchgeführt.

Nach Transformation (Kapitel III.3.6.2) der Ligationsansätze in TOP10F'-Bakterien und anschließender Vermehrung über Nacht, konnte ein Plasmidextrakt hergestellt werden, der auf die Anwesenheit der MCS untersucht werden sollte. Hierüber konnte bereits ein alleiniger Verdau des Extrakts mit der Restriktionsendonuklease *Sph I* Auskunft geben. Da *pQE-70-STR* zwei *Sph I*-Schnittstellen im Abstand von 404 bp enthielt und innerhalb der neuen MCS ebenfalls eine solche Spaltstelle enthalten war, trat auf dem Agarosegel (1 %ig) zusätzlich eine 704 bp große Bande auf.

Zur endgültigen Bestätigung des Ergebnisses wurde ein reiner Plasmidextrakt angefertigt, der mit den Restriktionsenzymen *BamH I* und *Hind III* behandelt wurde:

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------|--------------|
| Plasmidextrakt | 4.0 μ l |
| <i>Hind III</i> (20 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| <i>BamH I</i> (20 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| NEB-Puffer 2 (10 x) | 2.0 μ l |
| BSA (1 mg/ml) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 11.0 μ l |

Nach einer Inkubationszeit von 1.5 Stunden bei 37 °C und anschließender Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel konnte die Anwesenheit der MCS endgültig bestätigt werden.

In Abb. 18 ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Trennung nochmals verdeutlicht. Man kann im unteren Größenbereich eine Bande bei ~250 bp erkennen. Hierbei handelt es sich um die neu eingefügte MCS.

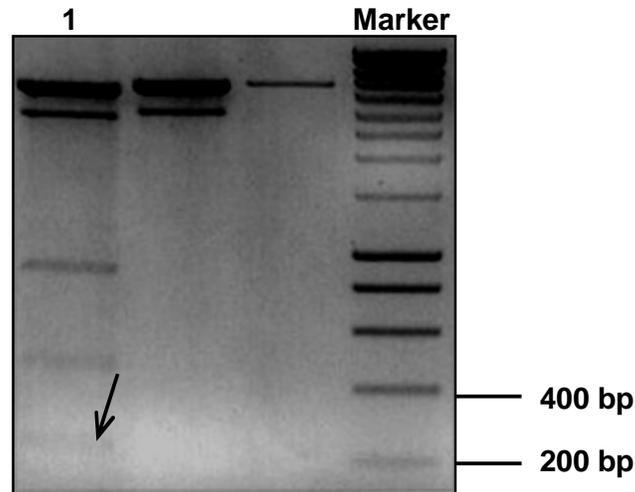


Abb. 18: Nachweis des erfolgreichen Einbaus der neuen MCS mit einer Länge von 253 bp in *pQE-70-STR*

1: Im unteren Größenbereich ist die MCS mit einer Länge von 253 bp erkennbar (→), die in das Plasmid *pQE-70-STR* eingefügt wurde.

Marker: SmartLadder 200

Das entstandene Vektorkonstrukt wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zur besseren Übersicht mit der Bezeichnung *pQE-70bh-STR* geführt und ist in Abb. 19 beschrieben.

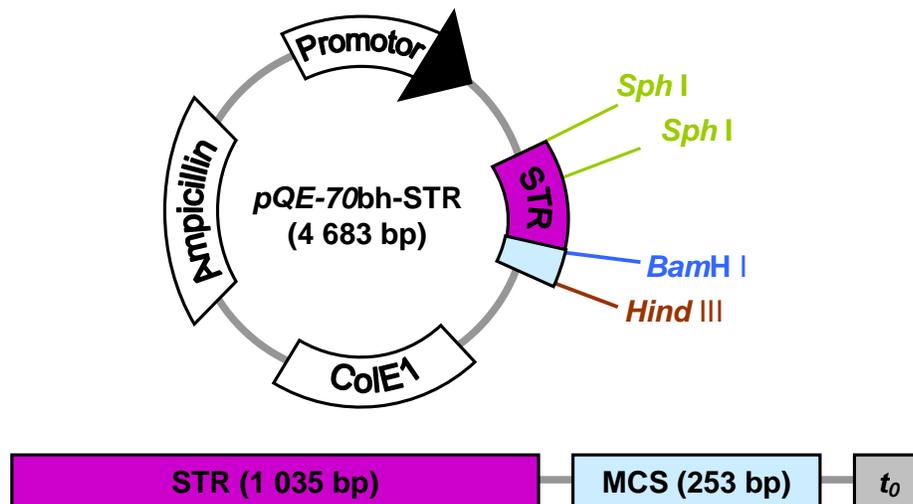


Abb. 19: Vektorkarte des *pQE-70bh-STR*-Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen für *Sph* I, *Bam*H I und *Hind* III

Hellgrün: *Sph* I-Schnittstelle, **Blau:** *Bam*H I-Schnittstelle, **Dunkelrot:** *Hind* III-Schnittstelle

Violett: Strictosidin-Synthase, **Hellblau:** Multiple-Cloning-Site

t₀: Stop-Codons in allen Leserahmen

1.3.2 Synthese der RBS-SG-cDNA mittels PCR

Die Konstruktion des in Kapitel IV.1.3 beschriebenen Vektorsystems, in welchem eine weitaus größere Anzahl geeigneter Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stand, machte eine Neusynthese der RBS-SG-cDNA nötig. Bei der Auswahl einer neuen Schnittstelle am 3'-Ende der zu bildenden cDNA war darauf zu achten, dass die entstehenden ‚sticky-ends‘ nach einem Verdau nicht interagieren konnten und keine interne Spaltstelle im STR- sowie RBS-SG-Gen störte.

Als geeignetes Restriktionsenzym stellte sich *Kpn*I heraus, dessen Erkennungssequenz in einen neuen Reverse-Primer integriert wurde (Abb. 20).

Reverse-Primer SGrevKpnI:

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|-----|-----|--------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|--------|-----|--------|
| Peptidsequenz: | | G | N | S | F | V | S | S | H | * | | |
| cDNA-Sequenz: | 5'- | GAG | TTA | GTC | AAG | AGG | CAA | AAA | ACC | TAA-3' | | |
| Gegenstrang: | 3'- | CTC | AAT | CAG | TTC | TCC | GTT | TTT | TGG | ATT-5' | | |
| Gegenstrang revers: | 5'- | TTA | GGT | TTT | TTG | CCT | CIT | GAC | TAA | CTC-3' | | |
| Primersequenz: | 5'- | GGT | ACC | TTA | GGT | TTT | TTG | CCT | CIT | GAC | TAA | CTC-3' |
| | | | | <i>Kpn</i> I | <i>t</i> ₀ | | | | | | | |

Abb. 20: Entwicklung eines Reverse-Primers für die Strictosidin- β -D-Glucosidase (SGrev) mit farblich hervorgehobener Restriktionsschnittstelle

Dunkelgrün: *Kpn*I-Schnittstelle, Rot: Stop-Codon

Der neue Reverse-Primer wurde entsprechend dem Herstellungsprotokoll mit Ampuwa auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ l eingestellt. Das verwendete Temperatur-Zeit-Programm wurde bereits in Kapitel IV.1.2.1 beschrieben.

Der Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

| Komponente | Volumen |
|--|--------------|
| Template | 1.0 μ l |
| Primer RBS-SGforBamHI (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| Primer SGrevKpnI (10 pmol/ μ l) | 1.0 μ l |
| dNTP's (20 mM) | 1.0 μ l |
| <i>Advantage</i> -Puffer (10x) | 2.5 μ l |
| <i>Advantage</i> -Polymerase-Mix | 0.5 μ l |
| Ampuwa | 18.0 μ l |

Nach Ablauf des PCR-Programms erfolgte eine Analyse des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 %). Das hierbei erhaltene Gel zeigte eine einzelne Bande bei einer Größe von ~1 600 bp (vgl. Abb. 13), welche ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extrakt (Kapitel III.3.2) gereinigt wurde.

1.3.3 Isolierung des PCR-Produkts RBS-SG

Der erhaltene Gelextrakt aus Kapitel IV.1.3.2 konnte nun in den Klonierungsvektor *pGEM-T* eingefügt werden (Kapitel III.3.4.2).

Im Anschluss an die Transformation des so entstandenen Vektorkonstrukts *pGEM-T-RBS-SG* in TOP10F'-Bakterien (Kapitel III.3.6.2) und der Anzucht positiver Kolonien in LB-Amp-Medium, konnte der Erfolg der Ligation durch Spaltung des Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen *BamH I* und *Kpn I* bestätigt werden.

Der hierzu angesetzte Verdau von 4 μ l des reinen Plasmidextrakts (Kapitel III.3.1.1.2) mit 10 U *Kpn I* in einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurde im Wasserbad bei 37 °C über einen Zeitraum von 1.5 Stunden durchgeführt. Hierbei kam es zur Linearisierung des vorliegenden 4 461 bp großen Plasmids *pGEM-T-RBS-SG*.

Danach erfolgte eine Erweiterung des Ansatzes auf ein Gesamtvolumen von 60 μ l durch Zugabe von 31.5 μ l Ampuwa, 4 μ l *BamH I*-Puffer (10 x), 4 μ l BSA (1mg/ml) und 0.5 μ l *BamH I* (20 U/ μ l). Bei der anschließend durchgeführten Inkubation (37 °C, 1.5 Stunden) wurden dann aufgrund der RBS-SG-internen *BamH I*-Schnittstelle zwei Fragmente der Größen 908 bp und 725 bp gebildet.

Dies wurde nach Zusatz von 4 μ l Probenpuffer mit Hilfe der Gelelektrophorese unter Verwendung eines 1 %igen Agarosegels bestätigt.

Analog zu Kapitel IV.1.2.2 war auch hier ein partieller Verdau mit unterschiedlichen Zeitintervallen zur Isolierung des gewünschten Inserts RBS-SG unumgänglich. Hierzu wurde das Plasmid *pGEM-T-RBS-SG* zunächst in ausreichender Menge unter Verwendung des Kits NucleoSpin Plasmid (Kapitel 3.1.1.2) hergestellt und durch Spaltung mit *Kpn I* linearisiert.

Der verwendete Ansatz mit den folgenden Komponenten wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad behandelt:

| Komponente | Volumen |
|------------------------------|-------------|
| Plasmidextrakt | 8.0 μ l |
| <i>Kpn</i> I (10 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| NEB-Puffer 1 (10 x) | 2.0 μ l |
| BSA (1mg/ml) | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 7.0 μ l |

Zur langsamen Hydrolyse des enthaltenen RBS-SG-Gens wurde der oben genannte Ansatz durch Zugabe von 15 μ l *Bam*H I-Puffer (10 x), 15 μ l BSA (1 mg/ml), 99.4 μ l Ampuwa und 0.6 μ l *Bam*H I (20 U/ μ l) auf ein Gesamtvolumen von 150 μ l vergrößert und bei 37 °C im Wasserbad über eine Dauer von 45 min inkubiert. Dabei wurden nach 5, 10, 15, 20, 30 und 45 min jeweils 25 μ l entnommen, mit 5 μ l Probenpuffer versetzt und sofort bei -20 °C eingefroren.

Die so abgestoppten Reaktionsmischungen konnten über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt werden. Das erhaltene Gelfoto zeigte die gewünschte Bande in allen sechs Ansätzen, jedoch waren die Konzentrationen innerhalb der ersten 15 min der Spaltungsreaktion am höchsten. Dies ist in Abb. 21 dargestellt.

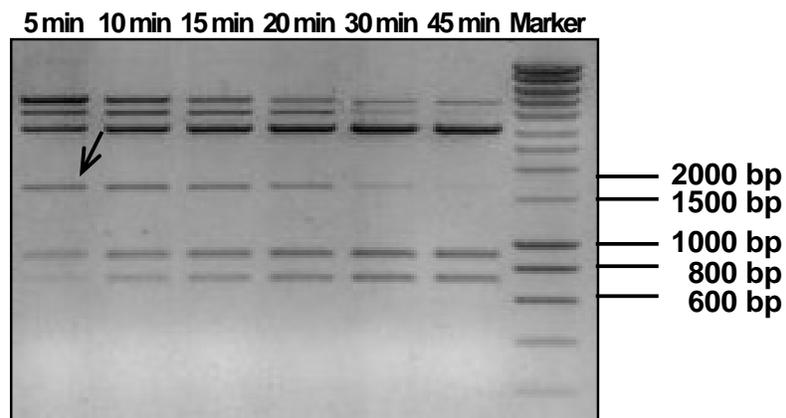


Abb. 21: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von *pGEM-T-RBS-SG* zur Generierung der *Bam*H I- und *Kpn* I-Schnittstellen

Nach 5-, 10-, 15- und 20-minütigem Verdau ist die RBS-SG-cDNA (→) mit 1 623 bp gut erkennbar.

Marker: SmartLadder 200

Alle sichtbaren Banden mit einer Größe von 1 623 bp wurden aus dem Gel extrahiert (Kapitel III.3.2) und in 25 μ l Ampuwa aufgenommen. Damit war das gewünschte Insert zur Ligation in das Expressions-System *pQE-70bh-STR* hergestellt.

1.3.4 Einfügen der RBS-SG-cDNA in das Expressions-System *pQE-70bh-STR*

Im letzten Schritt zur Herstellung des Coexpressions-Systems musste das vorbereitete SG-Gen mit der vorgeschalteten RBS an der gewünschten Position im bereits vorhandenen Vektorkonstrukt *pQE-70bh-STR* eingefügt werden.

Zur Generierung der erforderlichen Restriktionsschnittstellen wurde ein reiner Plasmidextrakt aus einer Übernachtskultur (TOP10F') hergestellt. Davon wurden in einem ersten Schritt 6 μ l mit 10 U *Kpn*I in einem Gesamtvolumen von 20 μ l gespalten. Nach 2 Stunden im Wasserbad bei 37 °C lag der linearisierte Vektor mit einer Länge von 4 683 bp vor.

Danach erfolgte die Herstellung der zweiten Schnittstelle, indem der komplette erste Verdau mit 10 U *Bam*H I in einem Gesamtvolumen von 60 μ l hydrolysiert wurde. Dieser Arbeitsschritt war nach 1.5 Stunden im Wasserbad bei 37 °C beendet.

Nach erfolgreicher Gelelektrophorese (Agarose, 1%) konnte der Vektor extrahiert (Kapitel III.3.2) und für die Ligation des RBS-SG-Gens verwendet werden (Kapitel III.3.4.2).

Im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation des Plasmids in TOP10F'-Zellen (Kapitel III.3.6.2). Die hierbei verwendeten ampicillinhaltigen Selektionsplatten wiesen nach einer 10-stündigen Wachstumsphase eine große Zahl Bakterienkolonien auf.

Für einen ersten Test auf Erfolg der Ligation war der Verdau eines hergestellten Plasmidrohextrakts mit der Restriktionsendonuklease *Bam*H I ausreichend. Bei der alleinigen Verwendung dieses Enzyms sollte eine Bande mit der Größe von 725 bp auftreten. Dieses Fragment konnte durch die RBS-SG-interne und die über PCR eingeführte *Bam*H I-Schnittstelle gebildet werden (vgl. Kapitel IV.1.1.2).

Nachdem die erwartete Bande in den Plasmiden aller getesteter Kolonien auf dem Agarosegel aufgetreten war, wurde eine Übernachtskultur mit 200 μ l einer positiv getesteten Bakteriensuspension in 40 ml LB-Amp-Medium angezogen und das

enthaltene Vektorkonstrukt *pQE-70bh-STR-RBS-SG* ebenfalls unter Verwendung des Kits NucleoSpin Plasmid (Kapitel III.3.1.1.2) aufgereinigt. Hierbei erfolgte die Elution des Vektors von der verwendeten Extraktionssäule mit 50 μ l Ampuwa.

Zur Veranschaulichung der anschließend durchgeführten Testreihen zur Bestätigung des ersten Ergebnisses ist das konstruierte Vektorsystem in der folgenden Abb. 22 schematisch dargestellt:

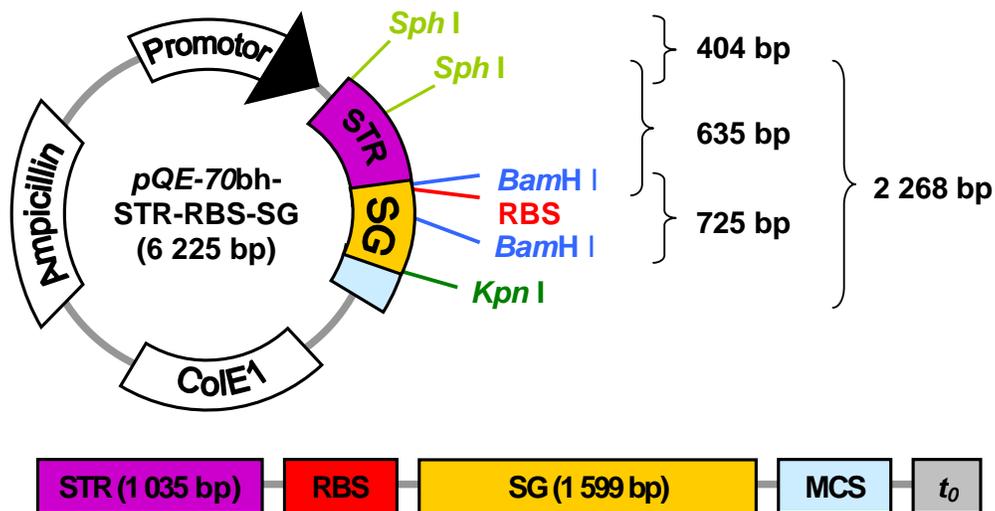


Abb. 22: Vektorkarte des *pQE-70bh-STR-RBS-SG*-Plasmids mit den farblich gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen für *Sph* I, *Bam*H I und *Kpn* I

Hellgrün: *Sph* I-Schnittstelle, Blau: *Bam*H I-Schnittstelle, Dunkelgrün: *Kpn* I-Schnittstelle

Violett: Strictosidin-Synthase, Orange: Strictosidin- β -D-Glucosidase

Rot: RBS, Hellblau: Multiple-Cloning-Site, t_0 : Stop-Codons in allen Leserahmen

Für eine genauere Untersuchung des gewonnenen Plasmids *pQE-70bh-STR-RBS-SG* wurden mehrere Inkubationen mit den Endonukleasen *Sph* I, *Bam*H I und *Kpn* I in verschiedenen Kombinationen durchgeführt.

Aus Abb. 22 ist ersichtlich, dass ein alleiniger Verdau mit *Bam*H I zwei Fragmente mit einer Länge von 725 bp und 5500 bp hervorbringen sollte.

Die Kombination aus *Bam*H I und *Sph* I würde demzufolge Banden mit 404 bp, 635 bp, 725 bp und 4461 bp generieren, wogegen die Restriktion mit *Sph* I und *Kpn* I zu Bruchstücken mit 404 bp, 2386 bp und 3435 bp führen sollte.

Die in der nachstehenden Übersicht aufgeführten Reaktionsansätze wurden über einen Zeitraum von 1.5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

| Komponente | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Plasmidextrakt | 4.0 μ l | 4.0 μ l | 4.0 μ l |
| <i>Sph</i> I (10 U/ μ l) | - | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I (20 U/ μ l) | 0.5 μ l | 0.5 μ l | - |
| <i>Kpn</i> I (10 U/ μ l) | - | - | 1.0 μ l |
| NEB-Puffer 1 (10 x) | - | - | 2.0 μ l |
| <i>Bam</i> H I-Puffer (10 x) | 2.0 μ l | 2.0 μ l | - |
| BSA (1 mg/ml) | 2.0 μ l | 2.0 μ l | 2.0 μ l |
| Ampuwa | 11.5 μ l | 10.5 μ l | 10.0 μ l |

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit je 5 μ l Probenpuffer versetzt und über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt (Kapitel III.3.5).

Die entstandenen Bandenmuster zeigten ausschließlich die theoretisch berechneten Fragmente (Abb. 23).

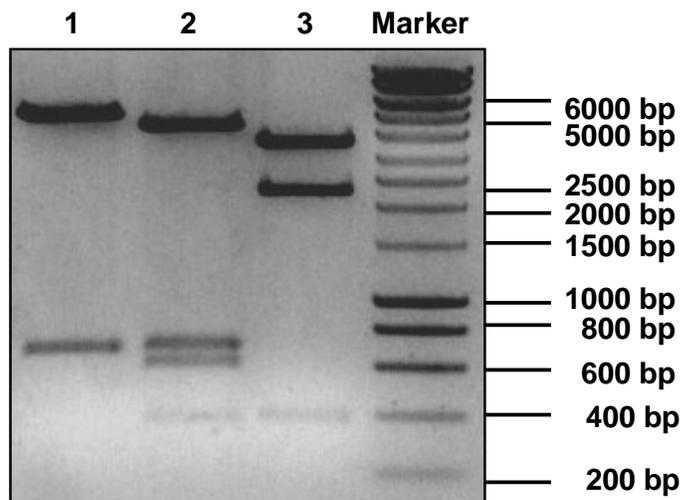


Abb. 23: Agarosegel (1 %ig) nach Verdau von *pQE70bh-STR-RBS-SG* zum Nachweis der erfolgreichen Ligation der RBS-SG-cDNA in *pQE70bh-STR*

- 1: Verdau mit *Bam*H I, Banden der Größe 725 bp und 5 500 bp sind entstanden
- 2: Verdau mit *Sph* I und *Bam*H I, Banden mit 404 bp, 635 bp, 725 bp und 4 461 bp
- 3: Verdau mit *Sph* I und *Kpn* I, Banden der Größe 404 bp, 2 268 bp und 3 553 bp

Beim Restriktionsverdau mit den verschiedenen Kombinationen entstanden nur die theoretisch möglichen Fragmente, d.h. die Ligation war erfolgreich.

Marker: SmartLadder 200

Damit war der Beweis erbracht, dass die RBS-SG-cDNA in der richtigen Orientierung hinter die STR-cDNA eingefügt wurde und es sich bei dem hergestellten Plasmid um das geplante und nun einsetzbare Coexpressions-System *pQE-70bh-STR-RBS-SG* handelte.

Der positiv getestete Plasmidextrakt wurde daraufhin in M15-Zellen transformiert (Kapitel III.3.6.2) und stand für die erforderlichen Expressionsversuche sowie für Aktivitätstests zur Verfügung. Hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.4 Expression, Aktivitätstests und Produktidentifizierung

Die Expressionsversuche sollten den Nachweis erbringen, dass die simultane Bildung der beiden Enzyme Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase mit dem neu konstruierten Vektor *pQE-70bh-STR-RBS-SG* möglich war.

In diesem Kapitel sind aus Gründen der Übersicht die Expressionsversuche zu den Plasmiden *pQE-70-STR*, *pQE-70-RBS-SG* und *pQE-70bh-STR-RBS-SG* sowie deren anschließende Testung zusammengefasst.

Im weiteren Verlauf wird detailliert auf die Identifizierung des Heteroyohimbin-Alkaloids Cathenamin als Hauptprodukt des Coexpressions-Systems *pQE-70bh-STR-RBS-SG* eingegangen.

1.4.1 Expressionsversuche und Aktivitätstests

Die beiden Expressions-Systeme *pQE-70-STR* und *pQE-70-RBS-SG* dienen als Referenzplasmide für den Vergleich der Einzelaktivitäten der Strictosidin-Synthase und der Strictosidin- β -D-Glucosidase mit deren Aktivitäten im gekoppelten Enzym-Assay. Als Kontrolle wurde bei jedem Expressionsversuch eine Vergleichskultur inkubiert, die den verwendeten Expressionsvektor *pQE-70* ohne Insert im *E. coli*-Stamm M15 enthielt.

Die Bakterien wurden bei 37 °C und 200 rpm in 300 ml LB-Medium pro Erlenmeyerkolben nach Zusatz von Kanamycin (Endkonzentration 25 mg/l) und Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l) auf eine optische Dichte von $OD_{600} = 0.5$ angezogen und mit IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.6 mM versetzt. Die hierdurch gestartete Expression war nach ca. 20 Stunden bei 26 ± 1 °C und 100 rpm beendet.

1.4.1.1 *pQE-70-STR* und *pQE-70-RBS-SG* in M15-Zellen

Die Herstellung der für den Aktivitätsnachweis verwendeten Proteinrohextrakte erfolgte analog zu Kapitel III.1.2. Abweichend hiervon wurde als Grundlage für den Lysepuffer 50 mM KPi pH 7.0 benutzt.

1.4.1.1.1 *pQE-70-STR* in M15-Zellen

Für die Testung der Strictosidin-Synthase wurden die Rohextrakte von Bakterienkulturen aus zwei verschiedenen Kolonien verwendet, um eventuelle Abweichungen in der Aktivität der exprimierten Enzyme beobachten zu können.

Da die Strictosidin-Synthase die Reaktion von Tryptamin und Secologanin zu Strictosidin katalysiert, wurden die Proteinlösungen der beiden Zellkulturen mit wässrigen Tryptamin- und Secologaninlösungen über eine Dauer von 30 min bei 30 °C und 500 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die hierbei ablaufende Reaktion ist in der folgenden Abb. 24 verdeutlicht:

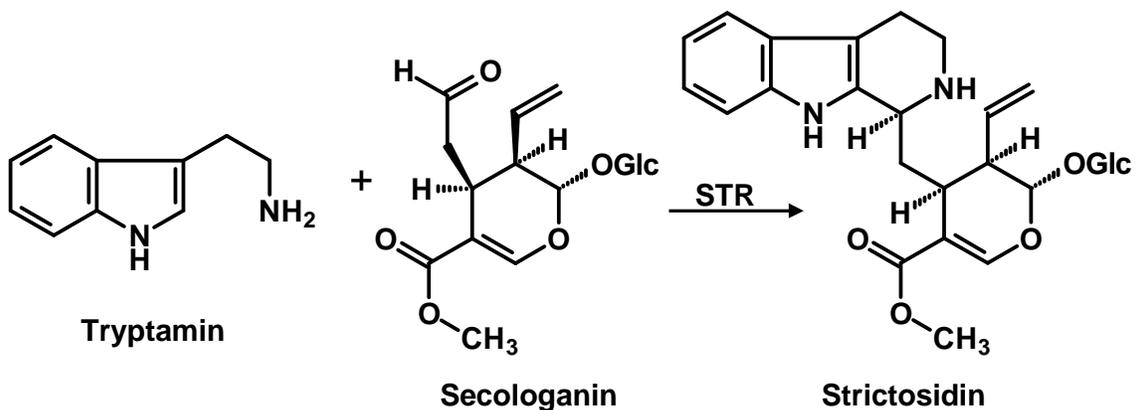


Abb. 24: Enzymatische Bildung von Strictosidin aus Tryptamin und Secologanin

STR: Strictosidin-Synthase

Die genauen Zusammensetzungen der Inkubationsansätze sind in der folgenden Übersicht aufgeführt:

| Komponente | Volumen |
|-------------------------|---------------|
| Tryptamin-HCl (1 mg/ml) | 6.25 μ l |
| Secologanin (1 mg/ml) | 12.00 μ l |
| Rohextrakt STR-1 | 81.75 μ l |
| Rohextrakt STR-2 | 81.75 μ l |

Parallel dazu wurden unter den gleichen Bedingungen Ansätze vorbereitet, die nur Tryptamin-HCl, Secologanin und Strictosidin enthielten und zur Bestimmung der Retentionszeiten im verwendeten Puffersystem dienten. Eine weitere Inkubation, die nur den Proteinrohextrakt enthielt, gab Aufschluss darüber, welche Peaks im anschließenden HPLC-Chromatogramm auf den reinen Extrakt zurückzuführen waren. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten konnten durch Einsatz von Ampuwa und 50 mM KPi-Puffer pH 7.0 den oben genannten Inkubationen angepasst werden.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die einzelnen Ansätze mit 100 μ l Methanol versetzt, wodurch die enthaltenen Proteine denaturiert und somit durch Zentrifugation (14 000 x g, 5 min) abgetrennt werden konnten. Dies führte zum sofortigen Abstoppen der enzymatischen Reaktion.

Die erhaltenen Überstände wurden in HPLC-Vials gefüllt und zu je 40 μ l unter Verwendung des HPLC-Programms Nr. 1 (Kapitel III.2.2) in die HPLC injiziert.

In Abb. 25 ist das Ergebnis der Aktivitätstests dokumentiert.

Im linken Teil der Abbildung sind die Retentionszeiten der verwendeten Substanzen zu erkennen: Tryptamin-HCl verlässt nach 4.7 min die HPLC-Säule, Secologanin nach 5.8 min und Strictosidin wird nach 8.0 min eluiert.

Daraus wird deutlich, dass der Peak mit der Retentionszeit 8.0 min im Inkubationsansatz zu Strictosidin gehört. Dies bedeutet, dass eine enzymatische Bildung von Strictosidin aus den Edukten Tryptamin-HCl und Secologanin stattgefunden hat, deren Peaks sich gegenüber der Kontrolle deutlich verkleinert haben.

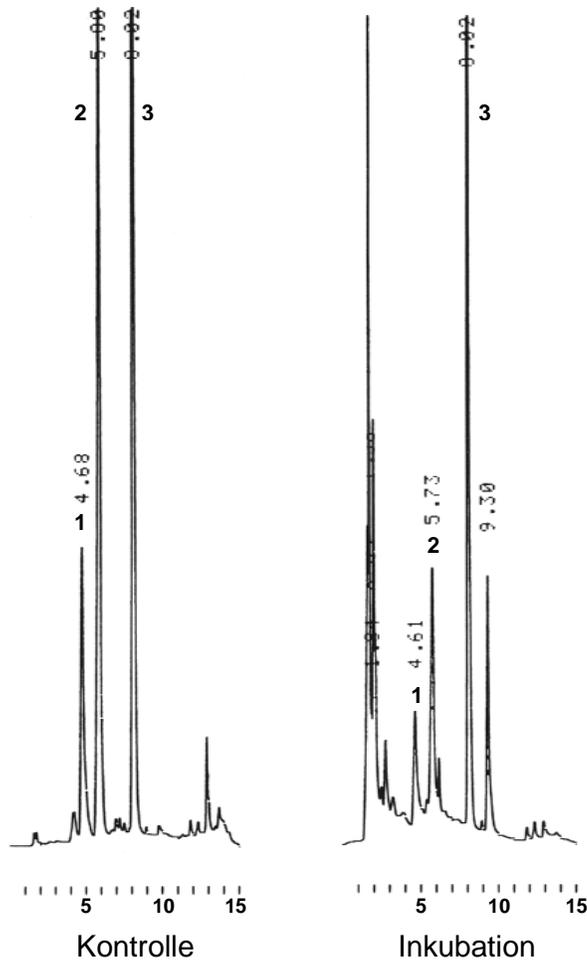


Abb. 25: HPLC-Ergebnis der Aktivitätstests der Strictosidin-Synthase in pQE-70-STR

Kontrolle: Es sind die Retentionszeiten von Tryptamin (**1**, 4.7 min), Secologanin (**2**, 5.8 min) und Strictosidin (**3**, 8.0 min) in 50 mM KPi-Puffer pH 7.0 dargestellt. Die Zusammensetzung der Kontrolle entspricht einer Inkubationsmischung ohne Rohextrakt.

Inkubation: Bei der Inkubation des Rohextrakts mit Tryptamin-HCl und Secologanin ist eine deutliche Bildung des Produkts Strictosidin bei gleichzeitiger Abnahme der Edukte zu erkennen.

Der Peak mit der Retentionszeit von 9.3 min stammt aus dem Rohextrakt.

Somit war die Funktionalität des exprimierten Enzyms Strictosidin-Synthase bewiesen und der Klon konnte für weitere Versuche als Dauerkultur aufbewahrt werden. Hierzu wurden je 850 μ l Bakterienkultur mit 200 μ l Glycerol vermischt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

1.4.1.1.2 pQE-70-RBS-SG in M15-Zellen

Zur Testung der Strictosidin- β -D-Glucosidase wurden ebenfalls zwei positive Klone getestet. Die Aufarbeitung der benötigten Rohextrakte verlief dabei analog zur Strictosidin-Synthase.

Die Strictosidin- β -D-Glucosidase katalysiert die Umwandlung von Strictosidin zum instabilen Strictosidin-Aglykon, das seinerseits unter Ringschluss zu Catheramin weiterreagiert.

Diese Reaktion stellt den Beginn des Biosyntheseweges von Ajmalin –aber auch von den Heteroyohimbin-Alkaloiden Raubasin, 19-Epi-Raubasin und Tetrahydroalstonin– dar und ist schematisch in Abb. 26 wiedergegeben.

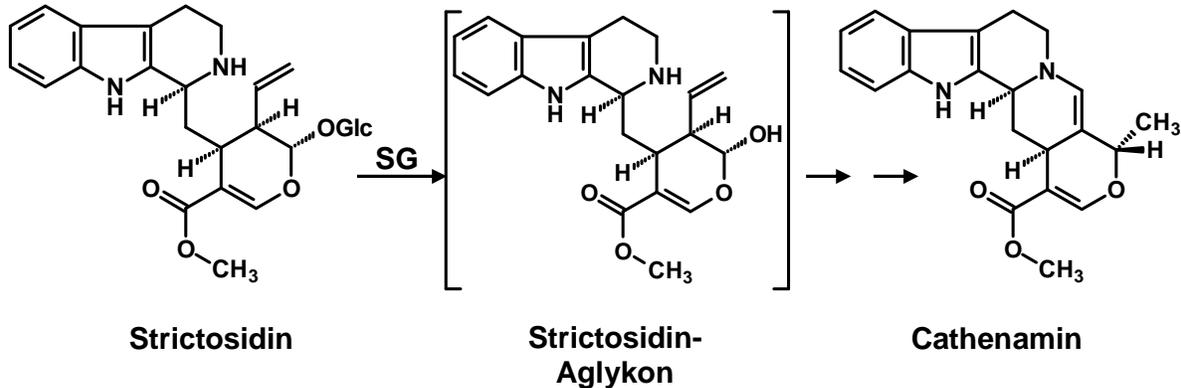


Abb. 26: Bildung des Strictosidin-Aglykons und anschließende Umlagerung zu Catheramin

SG: Strictosidin- β -D-Glucosidase

Für die enzymatische Deglucosylierung von Strictosidin wurde kein Cofaktor benötigt, wodurch den folgenden Inkubationsansätzen lediglich eine wässrige Lösung von Strictosidin (1mg/ml) als Edukt beigegeben werden musste:

| Komponente | Volumen |
|------------------------|--------------|
| Strictosidin (1 mg/ml) | 8.5 μ l |
| Rohextrakt RBS-SG-1 | 91.5 μ l |
| Rohextrakt RBS-SG-2 | 91.5 μ l |

Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Retentionszeiten Ansätze mit den Standardsubstanzen Strictosidin und Catheramin (1mg/ml MeOH) in 50 mM KPi pH 7.0 angefertigt. Eine alleinige Inkubation des Rohextrakts diente der Detektion unerwünschter Peaks im HPLC-Chromatogramm.

Im Anschluss an die 30-minütige Inkubation der Proben bei 30 °C und 500 rpm im Thermomixer erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Ausfällen der enthaltenen

Proteine mit 100 μ l Methanol. Nach Abtrennen der denaturierten Enzyme mittels Zentrifugation (14 000 x g, 5 min) konnte der erhaltene Überstand für die HPLC-Analyse verwendet werden.

Die Trennung erfolgte unter Verwendung des HPLC-Programms Nr. 1 (Kapitel III.2.2) und Detektion bei 250 nm.

Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 27 dargestellt. Hier zeigt das linke Chromatogramm Strictosidin (8.5 μ l in 200 μ l MeOH) bei einer Retentionszeit von 8.1 min. Die rechte Abbildung zeigt die Analyse des Inkubationsansatzes bestehend aus 8.5 μ l Strictosidin und 91.5 μ l Rohextrakt RBS-SG-1 nach Zusatz von 100 μ l MeOH. Strictosidin, das ein Absorptionsmaximum bei 227 nm hat, ist nahezu vollständig zu Cathenamin umgesetzt worden. Dessen Peak besitzt eine Retentionszeit von 10.1 min und fällt hier aufgrund seines Absorptionsmaximums von 280 nm bei der gewählten Wellenlänge von 250 nm verhältnismäßig klein aus. Die Detektion von Cathenamin wird zusätzlich durch dessen Instabilität erschwert. Diese ist in der hohen Reaktivität der Substanz begründet.

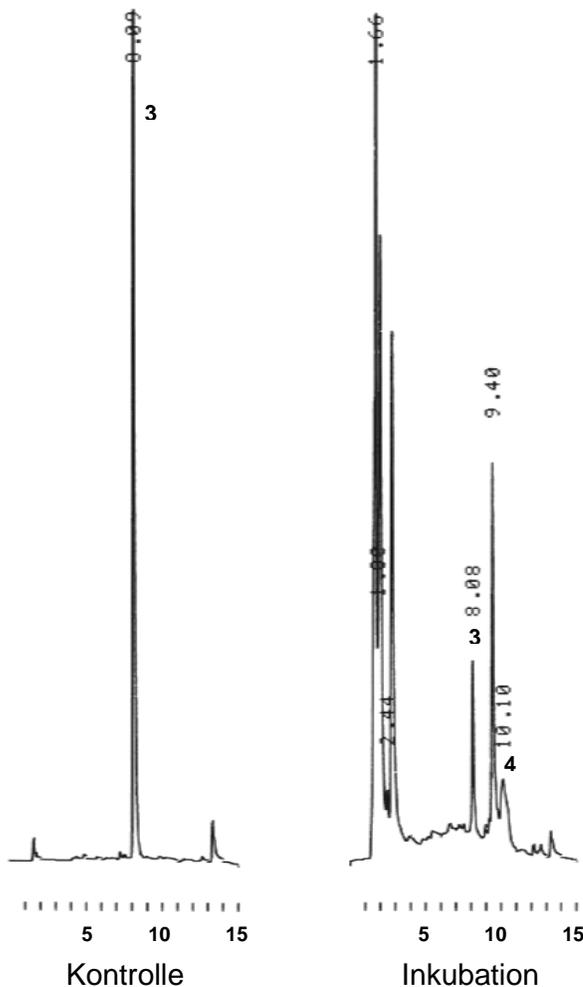


Abb. 27: HPLC-Ergebnis der Aktivitätstests der Strictosidin- β -D-Glucosidase in *pQE-70*

Kontrolle: Hier ist die Retentionszeit von 8.1 min des eingesetzten Edukts Strictosidin (**3**) in 50 mM KPi pH 7.0 gezeigt. Die Zusammensetzung der Kontrolle entspricht einer Inkubationsmischung ohne Rohextrakt.

Inkubation: Bei einer Retentionszeit von 10.1 min ist das gewünschte Produkt Cathenamin (**4**) erkennbar. Der Vergleich mit der Kontrolle zeigt eine deutliche Abnahme des eingesetzten Strictosidins (**3**).

Der Peak mit der Retentionszeit von 9.4 min stammt aus dem Rohextrakt.

Damit war die funktionelle Expression der Strictosidin- β -D-Glucosidase mit vorgeschalteter Ribosomenbindestelle nachgewiesen, und die entsprechende cDNA konnte für die nachfolgende Klonierung in das geplante Coexpressions-System verwendet werden.

Im Anschluss an die Aktivitätstests wurden verschiedene Dauerkulturen eines positiv getesteten Klons *pQE-70-RBS-SG* in M15-Zellen angelegt (s.o.).

1.4.1.2 *pQE-70bh-STR-RBS-SG* in M15-Zellen

Bei der Herstellung des Proteinrohextrakts für die Testung des Coexpressions-systems wurde die Vorschrift aus Kapitel III.1.2 leicht abgewandelt. Zunächst wurden insgesamt 40 ml einer Übernachtskultur in 2.4 l LB-Kan-Amp-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu $OD_{600} = 0.5$ kultiviert. Durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 0.6 mM wurde die Expression der Enzyme induziert.

Im Anschluss an die 14-stündige Expressionsphase bei 26 ± 1 °C und 100 rpm wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 000 x g, 10 min, 4 °C) vom Medium abgetrennt und in insgesamt 16 ml Lysepuffer (50 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH + 16 mg Lysozym) resuspendiert. Zur Auflösung eventuell vorhandener Zellagglomerate wurde die Zellsuspension für 10 sec mit Ultraschall (75 W) behandelt und danach für 30 min auf Eis ruhen gelassen. Nach Zerstörung der Zellmembranen durch Ultraschall (3 x 10 sec, 75 W) kam es zur Abtrennung der entstandenen Zellfragmente mittels Zentrifugation (12 000 x g, 30 min, 4 °C). Zur Beseitigung störender Proteine aus den Bakterienzellen wurde der erhaltene Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen (vgl. Kapitel III.1.1). Im ersten Schritt dieser Vorreinigung wurden die unerwünschten Proteine durch Zusatz des Fällungsreagenzes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 35 % und anschließender Fällung für 30 min bei 4 °C erfasst. Diese konnten durch Zentrifugation für 30 min bei 9 000 x g und 4 °C abgetrennt werden. Der zweite Schritt der fraktionierten Fällung sollte die gewünschten Proteine im Bereich der Sättigungskonzentration von 35 – 70 % Ammoniumsulfat hervorbringen. Nach einer Ruhezeit von 30 min bei 4 °C wurden die ausgefällten Enzyme bei 9 000 x g und 4 °C innerhalb von 30 min zentrifugiert. Der entstandene Rückstand wurde nun in 1 ml Resuspendierungspuffer (50 mM KPi pH 7.0 + 150 mM NaCl) aufgenommen

und erneut für 5 min bei 4 °C und 9 000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand (0.8 ml) konnte nun über eine HiTrap Desalting-Säule (Kapitel III.1.3.2) mit einem Volumen von 5 ml unter Verwendung von 50 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH +150 mM NaCl bei einer Flussrate von 10 ml/min entsalzt werden. Die ersten 2.4 ml des Durchflusses wurden erneut zentrifugiert (14 000 x g, 4 °C, 5 min) und standen für die Aktivitätstests des Coexpressions-Systems zur Verfügung.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Laufe der Extrakterstellung wurden nach jedem Fällungsschritt, sowie nach der Entsalzung des Rohextrakts über Sephadex G25, Proben entnommen und nach der BRADFORD-Methode vermessen (Kapitel III.1.7). Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen sind in Tab. 1 wiedergegeben.

| Fraktion | Proteinkonzentration |
|---|------------------------|
| nach 1. $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ -Fällung | 825 $\mu\text{g/ml}$ |
| nach 2. $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ -Fällung | 3 100 $\mu\text{g/ml}$ |
| Proteinrohextrakt nach Entsalzen | 2 190 $\mu\text{g/ml}$ |

Tab. 1: Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen im Laufe der Extrakterstellung

Aus der Aufstellung geht hervor, dass die Proteinkonzentration nach der zweiten Ammoniumsulfat-Fällung stark zugenommen hat. Dies ist in der Aufnahme des entstandenen Pellets in nur 1 ml Resuspendierungspuffer begründet. Die Entsalzung der so erhaltenen Proteinlösung über Sephadex G25 führte dann zu einer leichten Abnahme der Proteinkonzentration, da einerseits das verwendete Säulenmaterial eine Ausschlussgröße von 5 000 Dalton besaß, andererseits eine Verdünnung der Lösung stattfand.

Für den eigentlichen Aktivitätstest des entstandenen Proteinrohextrakts wurde der folgende Reaktionsansatz bei 35 °C und 500 rpm für 1.5 Stunden inkubiert:

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|---------------|------------------------|
| Tryptamin-HCl (1 mg/ml) | 6.25 μ l | 0.32 mM |
| Secologanin (1 mg/ml) | 12.00 μ l | 0.32 mM |
| 1 M KPi pH 6.0 + 20 mM MSH | 5.00 μ l | 50 mM KPi + 0.4 mM MSH |
| Proteinrohextrakt nach Entsalzen | 81.75 μ l | 1.7 mg/ml |

Durch Zusatz des KPi-Puffers erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf 6.0. Dadurch sollte die Aktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase, deren pH-Optimum bei 5.0 – 5.2 liegt (GERASIMENKO *et al.*, 2002), etwas erhöht werden, ohne jedoch die Strictosidin-Synthase-Aktivität (pH-Optimum von 7.0; KUTCHAN, 1989) zu weit herabzusetzen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zusatz von 100 μ l MeOH abgestoppt, zentrifugiert (5 min, 14 000 x g) und die Proben per HPLC analysiert. Bei dem verwendeten HPLC-Programm handelte es sich um Programm Nr. 2 (Kapitel III.2.2). Die Detektion erfolgte dieses Mal bei einer Wellenlänge von 280 nm, wodurch das erwartete Produkt Cathenamin (λ_{\max} 280 nm) besser zu identifizieren sein sollte. Dies hatte jedoch zur Folge, dass das eingesetzte Secologanin (λ_{\max} 237 nm) nicht mehr zu detektieren war. Ein Aufteilen des Inkubationsansatzes in zwei Teile und anschließende Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen kam aufgrund der eingesetzten kleinen Stoffmengen nicht in Frage.

Das erhaltene HPLC-Chromatogramm (Abb. 28) zeigte eine deutliche Aktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase, die das Strictosidin, welches von der Strictosidin-Synthase im ersten Reaktionsschritt gebildet wurde, komplett umgesetzt hatte.

Im rechten Teil der Abbildung ist das Produkt Cathenamin mit einer Retentionszeit von 8.1 min gut zu erkennen. Der Tryptamin-HCl-Peak ist im Vergleich zur Kontrolle deutlich kleiner geworden und liegt bei ~1.95 min. Der Peak des Zwischenprodukts Strictosidin sollte, wie im linken Teil der Abbildung gezeigt ist, bei 2.95 min liegen, ist aber aufgrund des direkten Umsatzes zu Cathenamin im rechten Chromatogramm nicht mehr zu erkennen.

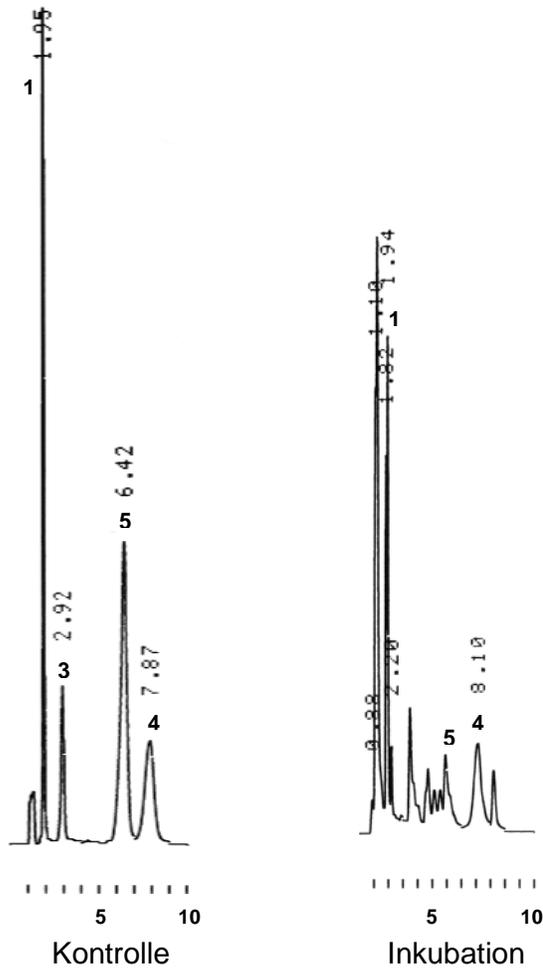


Abb. 28: HPLC-Ergebnis der Aktivitätstests des Coexpressions-Systems in pQE-70bh-STR-RBS-SG

Kontrolle: Hier sind die Retentionszeiten von Tryptamin-HCl (**1**, 1.95 min), Strictosidin (**3**, 2.92 min) und Cathenamin (**4**, 7.9 min) gezeigt. Die Zusammensetzung der Kontrolle entspricht einer Inkubationsmischung ohne Rohextrakt.

Inkubation: Bei einer Retentionszeit von 8.1 min ist das gewünschte Produkt Cathenamin (**4**) erkennbar. Der Vergleich mit der Kontrolle zeigt eine deutliche Abnahme des eingesetzten Tryptamin-HCl (**1**). Strictosidin (**3**) ist nicht mehr detektierbar, da es als Zwischenprodukt direkt zu Cathenamin (**4**) umgesetzt wurde.

Der Peak mit einer Retentionszeit von 6.42 min in der Kontrolle stellt Tetrahydroalstonin (**5**) dar, das durch Reduktion von Cathenamin gebildet werden kann.

Die kleineren Peaks mit Retentionszeiten zwischen 3.5 und 6.5 min stellen Nebenprodukte von Cathenamin dar.

Die kleineren Peaks im Bereich von 3.5 und 6.5 min, die im rechten Teil der Abbildung zu sehen sind, resultierten direkt aus Cathenamin, das sich während der Inkubationszeit in verschiedene Nebenprodukte umlagerte.

Die Entstehung dieser Nebenprodukte aus Cathenamin konnte durch unterschiedliche Inkubationszeiten belegt werden. Hierbei wurde ein 5-facher Ansatz zusammengestellt und für 1.5 Stunden bei 35 °C und 500 rpm inkubiert:

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|----------------|------------------------|
| Tryptamin-HCl (1 mg/ml) | 31.25 μ l | 0.32 mM |
| Secologanin (1 mg/ml) | 60.00 μ l | 0.32 mM |
| 1 M KPi pH 6.0 + 20 mM MSH | 25.00 μ l | 50 mM KPi + 0.4 mM MSH |
| Proteinrohextrakt nach Entsalzen | 408.75 μ l | 1.7 mg/ml |

Nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min wurden jeweils 100 μ l abgenommen, mit der gleichen Menge MeOH versetzt und per HPLC analysiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass die kleineren Peaks im mittleren Retentionsbereich nach 15 min kaum vorhanden waren, mit zunehmender Inkubationsdauer jedoch immer größer wurden (Abb. 29). Diese zusätzlichen Peaks stellten Zersetzungsprodukte von Cathenamin dar, deren Bildung auf die thermische Instabilität des Cathenamins zurückzuführen war. Gleichzeitig kam es zu einer Verkleinerung des Cathenamin-Peaks. Bei Vergleichsinkubationen, die nur die Substrate ohne Proteinrohextrakt sowie den reinen Proteinrohextrakt enthielten, konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden.

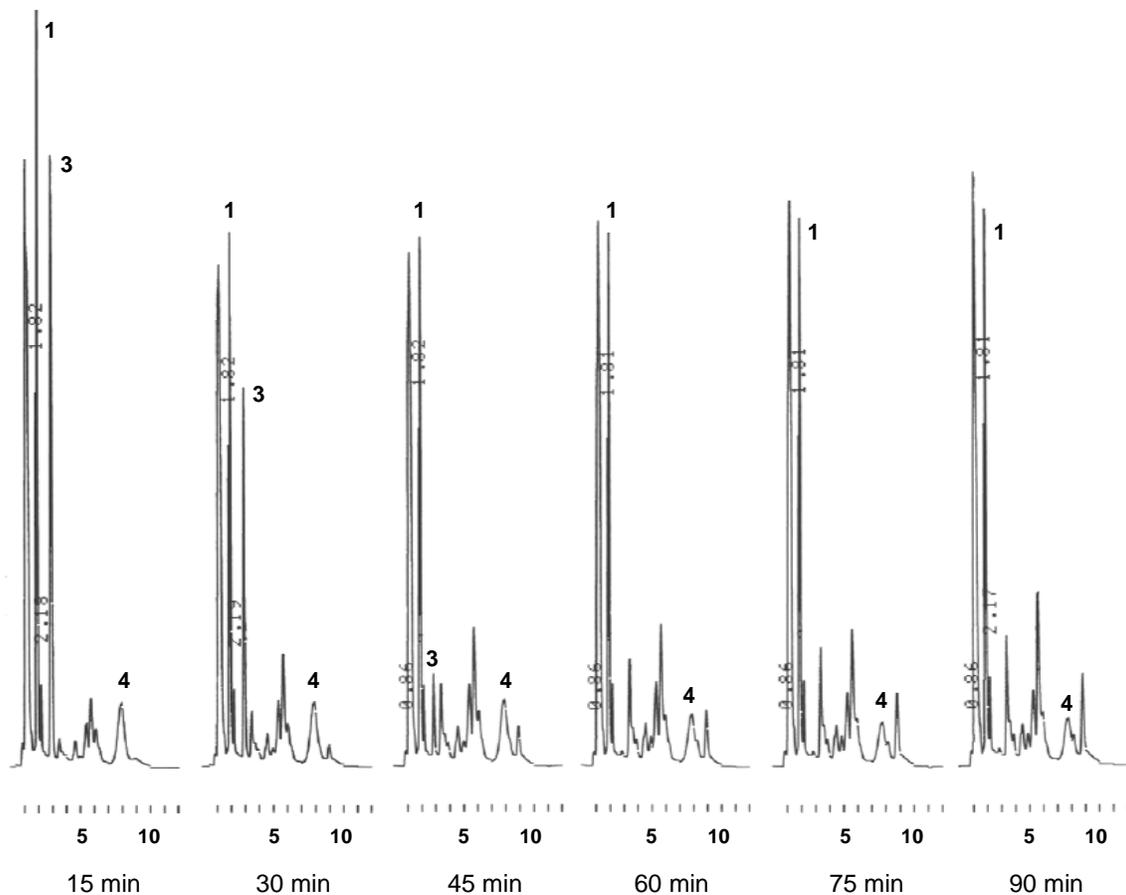


Abb. 29: Zeitabhängige Bildung von Nebenprodukten aus Cathenamin im Laufe der Inkubation

Dargestellt ist die Zunahme von unerwünschten Nebenprodukten im Verlauf einer 90-minütigen Inkubation des Proteinrohextrakts mit enthaltener Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase nach Zugabe von Tryptamin-HCl (1) und Secologanin. Nach 30 min ist die maximale Bildung von Cathenamin (4) erreicht, das Zwischenprodukt Strictosidin (3) ist dagegen erst nach ca. 60 min verbraucht. Mit zunehmender Inkubationsdauer zersetzt sich das Cathenamin immer mehr und es entstehen die Nebenprodukte, welche im mittleren R_f -Bereich zu sehen sind.

Somit war die erfolgreiche Coexpression der beiden Enzyme Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase mit zwischengeschalteter Ribosomenbindestelle im Vektorsystem *pQE-70bh-STR-RBS-SG* nachgewiesen.

Die Beweisführung zur tatsächlichen enzymatischen Bildung des Endprodukts Cathenamin ist im folgenden Kapitel detailliert beschrieben.

1.4.2 Identifizierung von Cathenamin als Endprodukt des gekoppelten Assays

Um die Bildung von Cathenamin aus Tryptamin und Secologanin unter Ausnutzung des im vorherigen Abschnitt getesteten Coexpressions-Systems zu belegen, waren unterschiedliche Verfahren nötig. Aufgrund der bereits beschriebenen Eigenschaften des erwarteten Produkts Cathenamin wurde zunächst versucht, dessen Reduktionsprodukt Tetrahydroalstonin (s. Abb. 28, Seite 91) zu identifizieren. Tetrahydroalstonin ist eine wesentlich stabilere Verbindung als Cathenamin, die im HPLC-Chromatogramm ein scharfes Signal zeigt und im Vergleich zu Cathenamin besser identifiziert werden kann.

Für die Identifizierung von Tetrahydroalstonin als Reduktionsprodukt von Cathenamin wurde bei der Herstellung des verwendeten Rohextrakts auf eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung verzichtet, um die eventuelle Bildung von Nebenprodukten beobachten zu können. Aus Bakterienkulturen von *pQE-70bh-STR-RBS-SG* in M15-Zellen mit einem Gesamtvolumen von 1.8 l wurde analog zu Kapitel IV.1.4.1.2 ein Rohextrakt in 50 mM KPi pH 6.0 + 20 mM MSH gewonnen, der in einer 200-fachen Inkubation eingesetzt wurde:

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|---------------|------------------|
| Tryptamin-HCl (1 mg/ml) | 1 250 μ l | 0.32 mM |
| Secologanin (1 mg/ml) | 2 400 μ l | 0.32 mM |
| Proteinrohextrakt nach Entsalzen | 20 ml | 1.55 mg/ml |

Nach Aufteilen des Ansatzes in 20 Reaktionsgefäße erfolgte die Inkubation für 3 Stunden bei 35 °C und 500 rpm im Thermomixer. Im Anschluss daran wurden die

einzelnen Reaktionsgemische mit 4 %iger Ammoniaklösung auf einen pH-Wert von ~9.5 eingestellt und anschließend 2 x mit je 800 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt. Die durch Zentrifugation (14 000 x g, 5 min) erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt und unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der so entstandene Rückstand wurde in 150 μ l MeOH gelöst und mit ca. 0.1 mg Natrium-Borhydrid (NaBH_4) versetzt. Durch Zugabe von 20 μ l Aceton wurde die Reaktion nach 15 min gestoppt. Die Reduktion des enthaltenen Cathenamins zu Tetrahydroalstonin ist in der nachfolgenden Abb. 30 verdeutlicht:

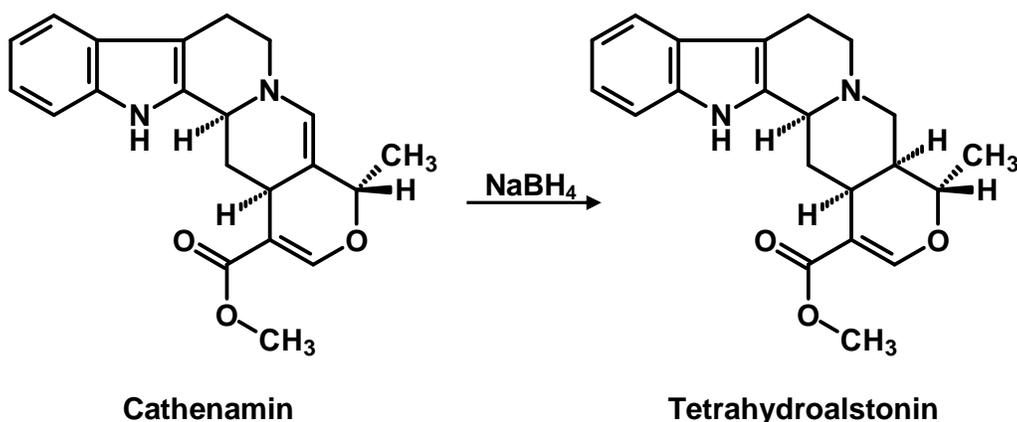


Abb. 30: Reduktion von Cathenamin zu Tetrahydroalstonin durch Zusatz von NaBH_4

Die erhaltene Alkaloidlösung wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Normalphase, F_{254} , Korngröße 60 μ m) aufgetragen und zur Bestimmung der R_f -Werte in verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt. Die Laufstrecke betrug jeweils 15 cm. Tab. 2 zeigt die erzielten R_f -Werte bei den entsprechenden Laufmitteln (Kapitel III.2.1):

| Fließmittel | R_f -Wert |
|-------------|-------------|
| FM 1 | 0.48 |
| FM 2 | 0.34 |
| FM 3 | 0.29 |

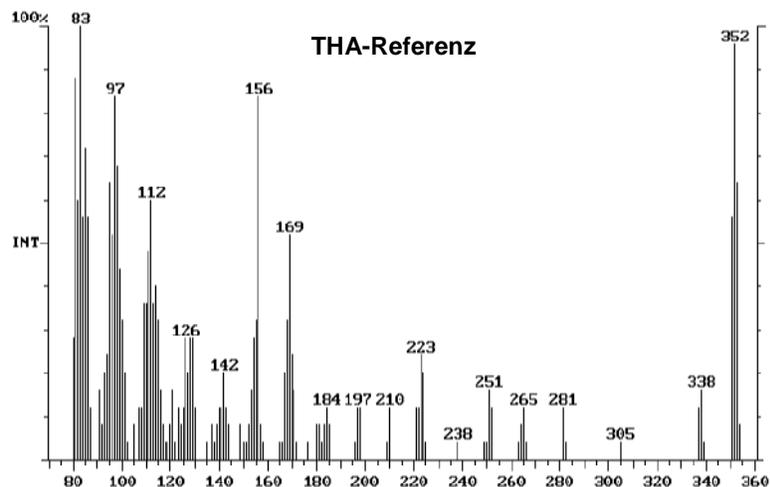
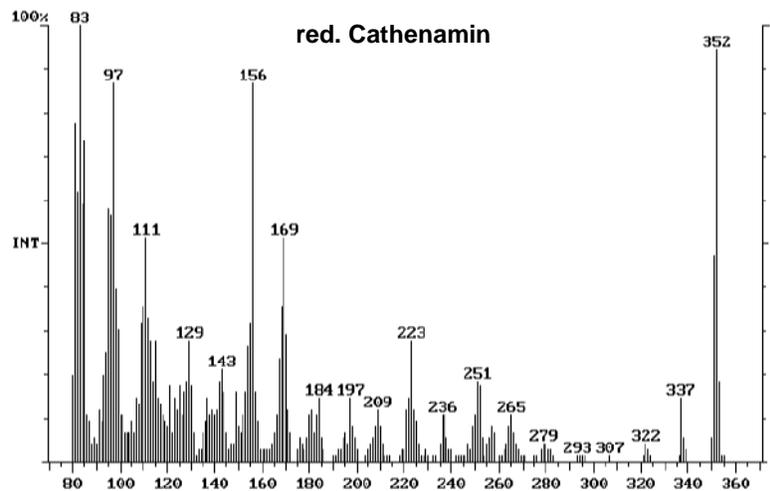
Tab. 2: R_f -Werte von Tetrahydroalstonin an Normalphasen-DC in versch. Fließmitteln

Der Substanzfleck von Tetrahydroalstonin konnte bei einer Wellenlänge von 254 nm unter Vergleich der R_f -Werte mit einer mitgelaufenen Standardsubstanz identifiziert werden. Bei Verwendung eines Ammonium-Cer-(IV)-sulfat-Sprühreagenzes stellte sich eine deutliche hellblaue Fluoreszenz bei 254 nm ein.

Zur massenspektroskopischen Untersuchung des Reaktionsprodukts wurde ein unbehandelter Substanzfleck aus der DC-Platte ausgekratzt und mit einem Gemisch aus 7 Teilen CHCl_3 und 3 Teilen MeOH extrahiert. Nach Überführen der erhaltenen Lösung in einen MS-Tiegel und vollständigem Trocknen der Probe konnte ein EI-Massenspektrum (Kapitel III.2.3) gemessen werden. Ein Vergleich des erhaltenen Fragmentierungsmusters mit einer bereits gemessenen Probe einer Standardlösung ergab, dass es sich bei der extrahierten Substanz um Tetrahydroalstonin handelte (Abb. 31).

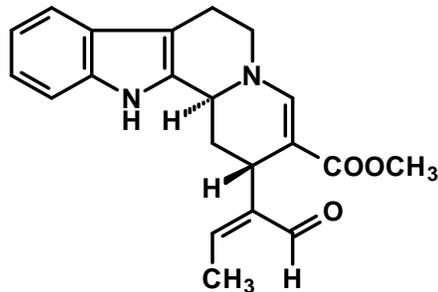
Abb. 31: EI-Massenspektrum des Reduktionsprodukts von Cathenamin im Vergleich mit einem THA-Referenzspektrum

Im oberen Teil der Abbildung ist das Fragmentierungsmuster der extrahierten Substanz zu sehen. Im Vergleich mit der gemessenen THA-Referenz ist eine eindeutige Übereinstimmung festzustellen.

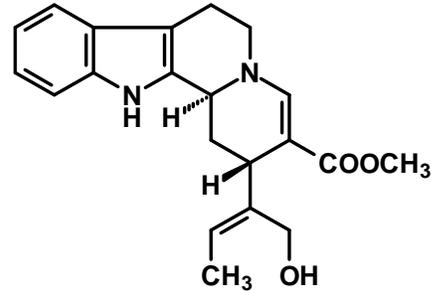


Eine parallel durchgeführte Extraktion eines unbekanntes Nebenprodukts mit dem R_f -Wert 0.29 nach Trennung im FM 1 (Kapitel III.2.1) ergab eine Substanz mit der Massenzahl m/z 352. Das erhaltene Fragmentierungsmuster ließ vermuten, dass es sich bei diesem Stoff um reduziertes Vallesiachotamin (Abb. 32) handelte.

Dessen Bildung könnte auf die Anwesenheit von Glucosidasen in *E. coli* zurückgeführt werden, die ebenfalls an einer Umsetzung von Strictosidin beteiligt waren.



Vallesiachotamin, M_r 350



red. Vallesiachotamin, M_r 352

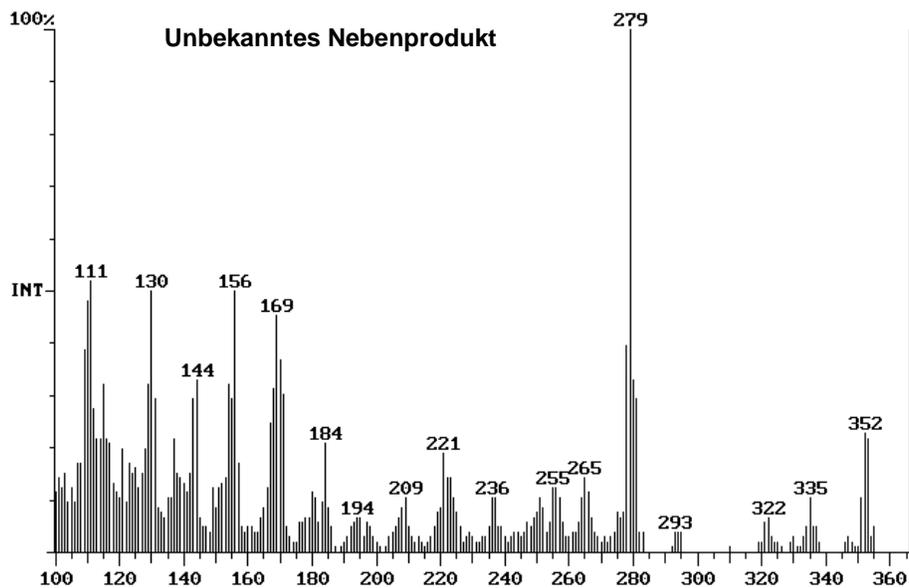


Abb. 32: EI-Massenspektrum des unbekanntes Nebenprodukts

Im Massenspektrum der unbekanntes Substanz ist ein Massenpeak von m/z 352 erkennbar, der zusammen mit den für Vallesiachotamin typischen Fragmenten m/z 335, 322, 279, 221 und 209 auf die Anwesenheit von reduziertem Vallesiachotamin hindeutet.

Nachdem die Bildung von Tetrahydroalstonin nach Reduktion des Inkubationsansatzes mit NaBH_4 bewiesen war, wurde versucht, Cathenamin als das eigentliche Hauptprodukt der Reaktion direkt nachzuweisen. Hierzu wurde der entsalzte Proteinrohextrakt einer 10-fachen Inkubation mit der folgenden Zusammensetzung unterworfen:

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|---------------------|------------------|
| Tryptamin-HCl (1 mg/ml) | 62.5 μl | 0.32 mg/ml |
| Secologanin (1 mg/ml) | 120.0 μl | 0.32 mg/ml |
| Proteinrohextrakt nach Entsalzen | 817.5 μl | 1.55 mg/ml |

Nach einer Inkubation von 15 min bei 35 °C und 500 rpm erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf 8.0 durch Zugabe von 1 M KPi. Die enthaltenen Indolalkaloide konnten dann durch zweimaliges Ausschütteln mit je 800 μl Ethylacetat extrahiert werden (s.o.). Die vereinigten organischen Phasen wurden unter N_2 -Begasung zur Trockne eingengt und der entstandene gelbe Rückstand in 50 μl CHCl_3 -MeOH-Gemisch (7 : 3) gelöst. 45 μl dieser Lösung wurden dann auf eine DC-Platte (Normalphase, F_{254} , Korngröße 60 μm) in Form einer 1 cm breiten Bande aufgetragen und unter Verwendung von FM 1 (Kapitel III.2.1) über eine Laufstrecke von 18.5 cm aufgetrennt. Bei einem R_f -Wert von 0.46 war eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm auf der Höhe des ebenfalls aufgetragenen Cathenamin-Standards erkennbar. Sowohl der Substanzfleck der Analyse, als auch der des Standards wurden mit 50 μl CHCl_3 -MeOH-Gemisch (7 : 3) eluiert und per EI-MS (Kapitel III.2.3) analysiert.

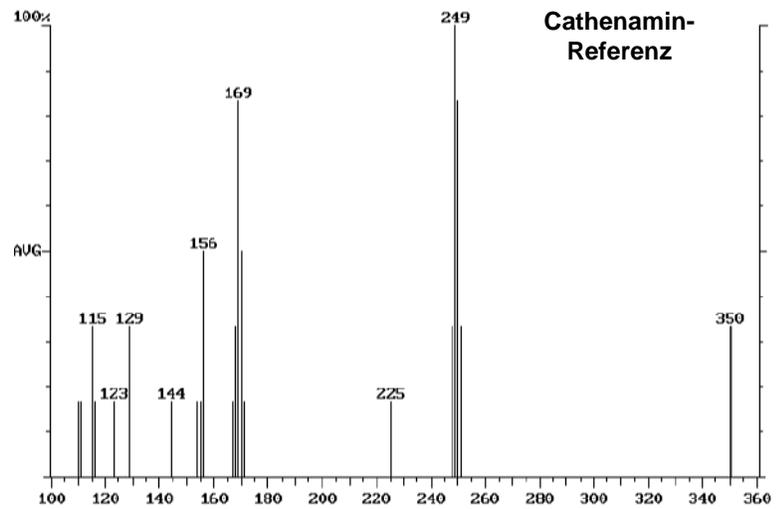
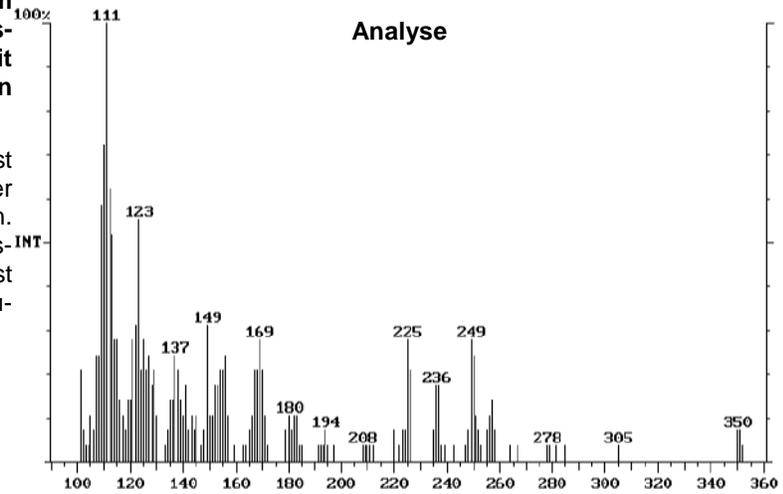
In Abb. 33 sind die Massenspektren der analysierten Substanzen wiedergegeben. Im Vergleich mit der gemessenen Referenz traten die Cathenamin-typischen Fragmente mit den Massenzahlen m/z 350, 249, 169 und 156 auch in der Analyse auf.

Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass Cathenamin direkt bei der Inkubation entsteht.

Bei dem verwendeten Quadrupol-Analysator in der Massenspektrometrie muss allgemein –im Gegensatz zu Geräten mit einem Sektorfeld-Analysator– eine Schwankung der Intensitäten einzelner Fragmente für die Auswertung der erhaltenen Spektren in Betracht gezogen werden.

Abb. 33: EI-Massenspektrum des extrahierten Reaktionsprodukts im Vergleich mit einem Referenzspektrum von Cathenamin

Im oberen Teil der Abbildung ist das Fragmentierungsmuster der extrahierten Substanz zu sehen. Im Vergleich mit der gemessenen Cathenamin-Referenz ist eine Übereinstimmung festzustellen.



2 Proteinreinigung

Im Anschluss an die molekularbiologischen Arbeiten in Bezug auf die Coexpression der Strictosidin-Synthase und der Strictosidin- β -D-Glucosidase wurde mit der Aufreinigung eines Enzyms begonnen, das dem Coexpressions-System als drittes Protein hinzugefügt werden sollte. Hierbei fiel die Wahl auf ein Enzym, welches Catheramin durch Reduktion in Raubasin bzw. Tetrahydroalstonin umwandelt (HEMSCHIEDT *et al.*, 1980). Wie bereits in Kapitel I.4 verdeutlicht, galt es zu klären, wie viele Enzyme an dieser Reaktion beteiligt waren, und ob eine Trennung der Einzelaktivitäten der potentiellen Zielproteine erreicht werden konnte.

Die nachfolgende Abb. 34 stellt schematisch die drei möglichen enzymatischen Reduktionsprodukte von Catheramin dar, die bei Zusatz des Cofaktors NADPH entstehen konnten:

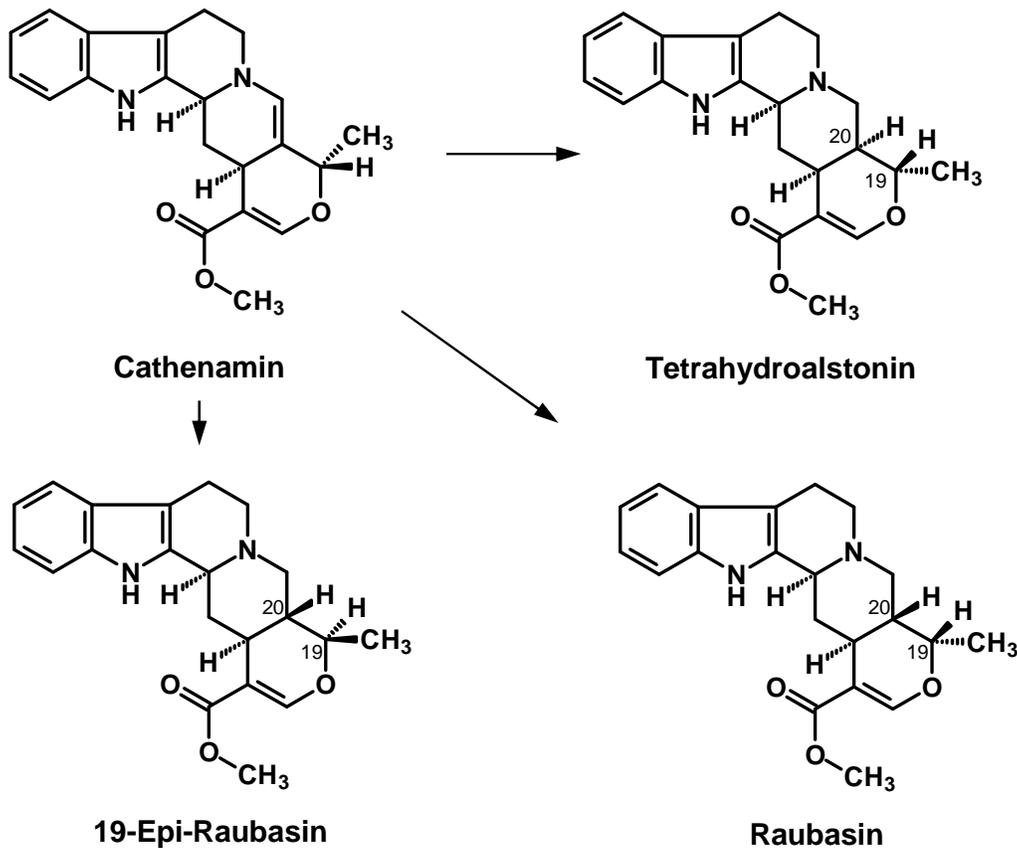


Abb. 34: Schematische Darstellung von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin als mögliche Reduktionsprodukte des Enzyms Catheramin-Reduktase

2.1 Entwicklung eines Aktivitätstests für die Cathenamin-Reduktase

Vor dem Beginn der eigentlichen Proteinreinigung war es nötig, einen geeigneten Enzymassay zu entwickeln. Hierzu musste zunächst ein HPLC-System ausgearbeitet werden, das die Trennung der verwendeten Edukte sowie der potentiellen Produkte aus den Enzymtests erlaubte. Bei diesem HPLC-Programm handelte es sich um das in Kapitel III.2.2 angegebene Programm Nr. 3, mit dem sich auch quantitative Aussagen bezüglich der Umsätze treffen ließen. Das Trennsystem erlaubte die Detektion von Cathenamin, Raubasin und Tetrahydroalstonin, eine Trennung der beiden Reduktionsprodukte Raubasin und 19-Epi-Raubasin konnte hiermit jedoch nicht erzielt werden.

Die optimierten Bedingungen für die Durchführung der Standardinkubationen sowie deren Zusammensetzungen sind aus Kapitel III.1.7 ersichtlich.

2.2 Test verschiedener Pflanzenzellen auf Cathenamin-Reduktase-Aktivität

Um bei der bevorstehenden Proteinreinigung die größtmögliche Ausbeute zu erzielen, musste eine Zelllinie gefunden werden, deren Proteinrohextrakt aufgrund seiner Cathenamin-Reduktase-Aktivität am besten geeignet war.

Zur Durchführung solcher Tests wurden jeweils 20 g gefriergetrocknetes Zellmaterial in einer vorgekühlten Universalmühle für 30 sec gemahlen. Das entstandene feine Pulver wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt, mit 20 ml Taupuffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0 + 20 mM MSH) gemischt und bei Raumtemperatur und 100 rpm für 30 min aufgetaut. Die erhaltene Suspension wurde anschließend für 30 min bei 4 °C ruhen gelassen. Bei der nachfolgenden Zentrifugation für 30 min bei 14 000 x g und 4 °C wurden die enthaltenen Zellfragmente abgetrennt und ein klarer Überstand gewonnen. Dieser erste Rohextrakt wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Hierbei kam es im ersten Schritt zur Abtrennung aller störender Proteine, die im Bereich von 0 – 35 % Sättigungskonzentration des Fällungsreagenzes ausfielen. Während einer 30-minütigen Ruhezeit bei 4 °C verringerte das Ammoniumsulfat die Hydrathüllen der enthaltenen Proteine und führte somit zur Aggregation, wodurch die Fällung der Enzyme erfolgte.

Nach Abtrennung der Proteine durch Zentrifugation (14 000 x g, 4 °C, 30 min) wurde der klare Überstand zur erneuten Ammoniumsulfat-Fällung verwendet. Dabei wurde die gewünschte Fraktion von 35 – 70 % Ammoniumsulfat nach Fällung (30 min, 4 °C) per Zentrifugation bei 14 000 x g und 4 °C für 30 min erhalten und in 1.5 ml 50 mM KPi pH 7.0 + 150 mM NaCl resuspendiert. Hierin enthaltene ungelöste Substanzen mussten durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 14 000 x g entfernt werden. Der klare Überstand konnte nun unter Verwendung einer mit 50 mM KPi pH 7.0 + 150 mM NaCl äquilibrierten HiTrap Desalting-Fertigsäule (Kapitel III.1.4.5.1) von niedermolekularen Inhaltsstoffen (< 5 000 Da) befreit werden.

Die auf diese Weise hergestellten Proteinrohextrakte wurden dann in Standardinkubationen (Kapitel III.1.7) eingesetzt und nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von je 100 µl MeOH und anschließender Abtrennung der ausgefallenen Proteine (5 min, 14 000 x g) per HPLC analysiert (Kapitel IV.2.1).

| Pflanzenzellkultur | Familie | Aktivität |
|---|-------------|-----------|
| <i>Catharanthus roseus</i> G. Don | Apocynaceae | +++ |
| <i>Catharanthus roseus</i> Rose Carpet (RC) | Apocynaceae | +++ |
| <i>Rauvolfia serpentina</i> x <i>Rhazya stricta</i> Kiew (RRK) | Apocynaceae | ++ |
| <i>Rauvolfia serpentina</i> x <i>Rhazya stricta</i> Mainz (RRM) | Apocynaceae | ++ |
| <i>Rauvolfia serpentina</i> (BENTH. EX KURZ) | Apocynaceae | + |
| <i>Rauvolfia serpentina</i> hairy roots | Apocynaceae | - |
| <i>Rauvolfia chinensis</i> (HEMSL.) | Apocynaceae | - |
| <i>Rauvolfia mannii</i> (STAPF) | Apocynaceae | - |
| <i>Rauvolfia mombasiana</i> (STAPF) | Apocynaceae | - |
| <i>Rauvolfia verticillata</i> (LOUR.) | Apocynaceae | - |

Tab. 3: Aktivität der Cathenamin-Reduktase in unterschiedlichen Pflanzenzellkulturen

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, dass die gesuchte Aktivität besonders ausgeprägt in *Catharanthus roseus*-Arten auftrat. Da Raubasin als Endprodukt der enzymatischen Reaktion hauptsächlich in *Catharanthus*- bzw. *Vinca*-Arten vorkam, wurde dieses Ergebnis auch erwartet. Im Laufe dieser ersten Testreihe konnten noch keine Beweise für die Existenz mehrerer Enzyme zur Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin gefunden werden. Allerdings wurden in allen Inkubationen

Doppelpeaks beobachtet, deren Retentionszeiten auf die Anwesenheit der genannten Alkaloide schließen ließen.

Aufgrund ihres guten Wachstums wurden für die Proteinreinigung *Catharanthus roseus* Rose Carpet-Zellen verwendet.

In einer weiteren Testserie konnte die ideale Kultivierungsdauer ermittelt werden, nach welcher die Aktivität des gesuchten Enzyms ihr Maximum erreicht hatte. Hierzu wurden Zellkulturen nach einer Wachstumszeit von 4, 6, 8, 10 und 12 Tagen filtriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die anschließende Herstellung des Rohextrakts sowie die Aktivitätstestung erfolgte wie oben beschrieben.

In der nachfolgenden Tab. 4 ist der Verlauf der Cathenamin-Reduktase-Aktivität in *Catharanthus roseus* Rose Carpet wiedergegeben:

| Kultivierungsdauer | rel. Aktivität |
|--------------------|----------------|
| 4 Tage | 36 % |
| 6 Tage | 62 % |
| 8 Tage | 94 % |
| 10 Tage | 100 % |
| 12 Tage | 71 % |

Tab. 4: Verlauf der Cathenamin-Reduktase-Aktivität nach versch. Kultivierungszeiten

Aus den Tests ging hervor, dass nach einer 8- bis 10-tägigen Wachstumsphase die höchste Aktivität auftrat.

Somit wurden für die anschließenden Reinigungsversuche ausschließlich Zellen aus *Catharanthus roseus* Rose Carpet mit einem Alter von 8 bis 10 Tagen verwendet.

Um eine optimale Ausnutzung der Enzymaktivität während der Proteinreinigung zu erreichen, musste der entsalzte Enzymrohextrakt zusätzlich bei unterschiedlichen pH-Werten auf seine Aktivität untersucht werden. Hierzu wurden die Standardinkubationen (Kapitel III.1.7) unter Verwendung von 1 M KPi-Puffern auf pH-Werte im Bereich von 6.0 bis 7.5 eingestellt und für 30 min bei 30 °C und 500 rpm inkubiert.

In der folgenden Tab. 5 ist der Aktivitätsverlauf mit einem Maximum bei pH 6.6 wiedergegeben. Damit konnte das Ergebnis von HEMSCHIEDT *et al.* (1985) bestätigt werden.

| pH-Wert | rel. Aktivität |
|---------|----------------|
| 6.0 | 42 % |
| 6.3 | 69 % |
| 6.6 | 100 % |
| 6.9 | 73 % |
| 7.2 | 51 % |
| 7.5 | 28 % |

Tab. 5: Bestimmung des pH-Optimums der Catheramin-Reduktase-Aktivität

Daraus resultierend wurden alle Inkubation, die die Catheramin-Reduktase betrafen, bei einem pH-Wert von 6.6 durchgeführt, um einen maximalen Umsatz zu erreichen.

2.3 Reinigung der Catheramin-Reduktase

Die Proteinreinigung der Raubasin-bildenden Catheramin-Reduktase wurde mit Ausnahme der Größenausschlusschromatographie an Sephadex G25 Superfine unter Verwendung des mikroprozessorgesteuerten Systems ÄKTA-Explorer durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte, die die verwendeten Proteinlösungen betrafen, fanden bei einer Temperatur von 4 °C statt, um die Stabilität und somit die Aktivität des gesuchten Enzyms so lange wie möglich zu gewährleisten.

2.3.1 Extraktion löslicher Proteine aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Für die Proteinreinigung konnte sowohl frisches als auch tiefgefrorenes Zellmaterial verwendet werden, da die Aktivität bei beiden Zellarten vergleichbar war. Standardmäßig wurden gefrorene Pflanzenzellen verwendet, deren Aufschluss analog zu Kapitel III.1.1 durchgeführt wurde. Hierbei wurden aus 750 g gefrorenen

Catharanthus roseus RC-Zellen 1 320 ml eines ersten Rohextrakts erhalten, der einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen wurde (vgl. Kapitel IV.2.2). Dabei konnte durch Abtrennen unerwünschter Proteine (z.B. mikrosomale Enzyme) im Konzentrationsbereich von 0 – 35 % Ammoniumsulfat eine erste Vorreinigung des Extrakts erzielt werden. Die ausgefällten Proteine im Bereich zwischen 35 und 70 % Ammoniumsulfat wurden durch Zentrifugation abgetrennt und in 125 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH resuspendiert.

Der auf diese Weise hergestellte Proteinrohextrakt musste nun zur Entfernung des Fällungsmittels einer Entsalzung unterzogen werden. Dabei wurde auf die Größenausschlusschromatographie zurückgegriffen, da diese im Vergleich zur Dialyse eine effektivere und schnellere Bearbeitung der Proben erlaubte. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Leersäule XK 50/30, die mit 430 ml Sephadex G25 Superfine gepackt war (Kapitel II.4, III.1.4.5.1). Die zentrifugierte (14 000 x g, 30 min, 4 °C) Proteinlösung wurde bei einer Flussrate von 10 ml/min auf die zuvor konditionierte (10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH) Säule geladen und mit Äquilibrationpuffer nachgespült. Die ersten 165 ml der entsalzten und alkaloidfreien Proteinlösung, die die Säule verließen, wurden gesammelt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge (Kapitel III.1.7) ergab eine Konzentration von 3.8 mg/ml, was einer Gesamtmenge von ~630 mg Protein entsprach.

2.3.2 Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose - Fast Flow

Die am Vortag entsalzte Proteinlösung wurde vor Beginn der Ionenaustauschchromatographie (Kapitel III.1.4.1.1) zur Abtrennung ausgefällter Bestandteile, die zu einem Verschmutzen der Säule führen konnten, bei 14 000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Parallel dazu wurde die zuvor regenerierte¹ Säule² mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH äquilibriert. Nachdem die klare Proteinlösung mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die Säule geladen war, wurde mit Äquilibrationpuffer nachgespült. Dadurch kam es zum Auswaschen der Proteine,

¹ Regenerationsbedingungen: - 150 ml 1 M NaOH, gefolgt von 150 ml NaCl
- Flussrate: 0.3 ml/min, Flussrichtung: upflow
- Äquilibrieren mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH

² DEAE-Sepharose FF in XK 26/20-Säule (Durchmesser: 26 mm, Länge: 20 cm, Bettvolumen: 55 cm³)

die nicht an die DEAE-Matrix gebunden hatten. Nach deren vollständiger Entfernung wurden die verbleibenden Enzyme durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 – 200 mM KCl in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH über eine Länge von 70 min (entspr. 210 ml) eluiert. Während der Elution wurden Enzymfraktionen zu je 5 ml gesammelt, die für die in Kapitel III.1.7 beschriebenen Standardinkubationen verwendet werden konnten. Die HPLC-Analyse (Programm 3, Kapitel III.2.2) ergab, dass sich die Aktivität der gesuchten Raubasin-bildenden Cathenamin-Reduktase in einem weiten Konzentrationsbereich von 20 – 90 mM KCl erstreckte. Keine der in diesem Bereich getesteten Fraktionen wies dabei eine reine Aktivität zur Bildung von Raubasin oder Tetrahydroalstonin auf. Die hierzu gehörenden Produktpeaks im HPLC-Chromatogramm standen immer im gleichen Verhältnis zueinander, wobei der Tetrahydroalstonin-Peak immer um durchschnittlich 15% größer war als der des Raubasins. Die aktivsten Enzymfraktionen Nr. 11 bis 18, die gleichzeitig auch die wenigsten Nebenprodukte bildeten, wurden vereinigt, in einen Dialyseschlauch mit einem Durchmesser von 16 mm gegeben und über Nacht gegen 10 Liter 10 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH bei 4 °C dialysiert.

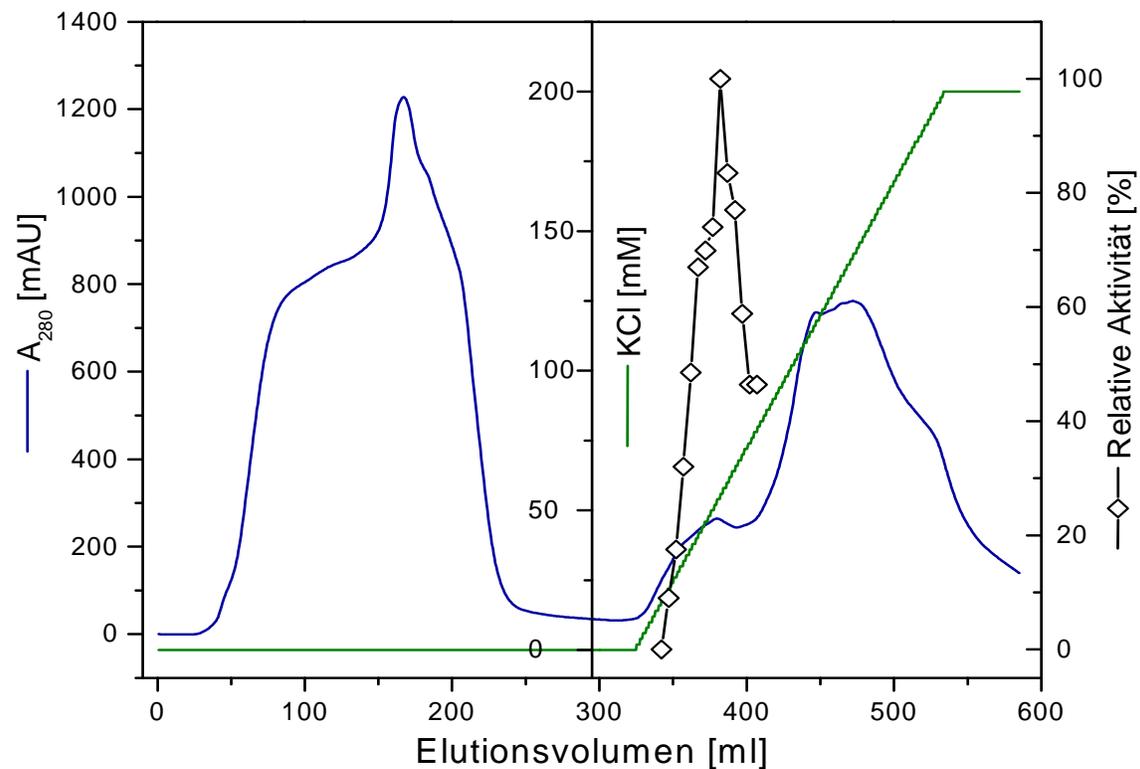


Abb. 35: Elutionsprofil der DEAE-Sepharose FF-Säule

Blau: UV-Absorption der enthaltenen Proteine bei 280 nm

Grün: linearer Gradient von 0 – 200 mM KCl mit einem Gesamtvolumen von 210 ml:

Die relative Aktivität der weiterbearbeiteten Fraktionen ist mit \blacklozenge gekennzeichnet.

Die so erhaltene Enzymfraktion hatte ein Volumen von 36 ml und eine Gesamtprotein-Konzentration von 1.4 mg/ml. Aufgrund der erwähnten gleichzeitigen Bildung zweier Produkte war die Bestimmung der Einzelaktivitäten nicht möglich. Das ÄKTA-Chromatogramm mit den weiterbearbeiteten Raubasin-bildenden Fraktionen ist in Abb. 35 wiedergegeben.

2.3.3 Hydroxyapatit-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung wurde die dialysierte Proteinfraction für 30 min bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert und auf eine bereits regenerierte³ und äquilibrierte (1.5 ml/min, 10 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH) Hydroxyapatit-Säule⁴ geladen. Durch Nachspülen der Säule mit Äquilibriumspuffer wurden die nicht gebundenen Enzyme von der Säule entfernt. Die gebundenen Proteine konnten dann unter Anwendung eines linearen Gradienten von 10 –150 mM KPi pH 7.0 in 10 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH für 100 min (entspr. 150 ml) zu je 4 ml fraktioniert werden. Aus den Aktivitätstests (Kapitel III.1.7) dieser Fraktionen ging eine Aktivität des gesuchten Enzyms in einem KPi-Konzentrationsbereich von 25 – 60 mM hervor. Auch hier war eine Unterscheidung in zwei verschiedene Enzyme nicht möglich, da der bereits bekannte Doppelpeak aus Raubasin und Tetrahydroalstonin im gleichen Verhältnis wie bereits bei der DEAE-Säule auftrat. Die Fraktionen Nr. 9 bis 17 wiesen hierbei die größten Aktivitäten in Verbindung mit den geringsten Nebenprodukten auf, und wurden über Nacht bei 4 °C gegen 10 Liter 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH dialysiert (Ø des Dialyseschlauchs: 16 mm). Die vereinigten Fraktionen besaßen ein Volumen von 40 ml und eine Gesamtprotein-Konzentration von 370 µg/ml. Die Bestimmung der Einzelaktivitäten war auch nach dieser Säule nicht möglich.

In Abb. 36 ist das während der Reinigung aufgezeichnete Chromatogramm dargestellt.

³ Regenerationsbedingungen: - 90 ml 1.5 M KCl bei 0.5 ml/min, upflow
- Äquilibrieren mit 10 mM KPi pH 7.0 + 20 mM MSH

⁴ Hydroxyapatit in XK 16/20-Säule (Durchmesser: 16 mm, Länge: 20 cm, Bettvolumen: 10 cm³)

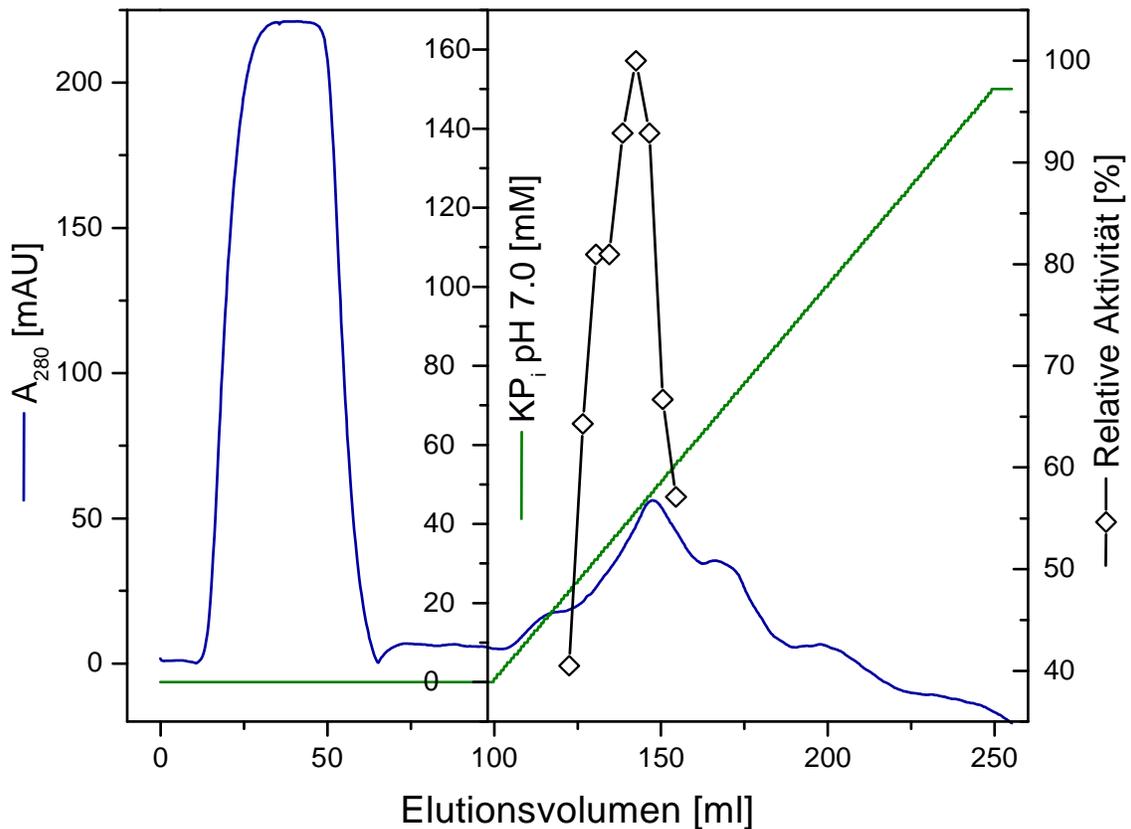


Abb. 36: Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Säule

Blau: UV-Absorption der enthaltenen Proteine bei 280 nm

Grün: linearer Gradient von 10 – 150 mM KPi mit einem Gesamtvolumen von 150 ml:

Die relative Aktivität der weiterbearbeiteten Fraktionen ist mit \diamond gekennzeichnet.

2.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ

Im letzten Schritt der Proteinreinigung kam der starke Anionenaustauscher MonoQ (Kapitel III.1.4.1.3) zum Einsatz, dessen sehr hohe Bindekapazität in Verbindung mit einem Säulenvolumen von nur 1 ml zu einer sehr guten Trennleistung führte. Nach Zentrifugation (14 000 x g, 4 °C, 30 min) der dialysierten Proteinlösung und gleichzeitiger Äquilibrierung der Säule⁵ mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH bei einem Fluss von 1 ml/min, konnte die klare Proteinfraktion auf die Säule gegeben werden. Sobald nicht gebundene Bestandteile der Lösung die Säule verlassen hatten, wurde mit der Elution der Proteine durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 – 200 mM KCl über einen Zeitraum von 60 min begonnen (entspr. 60 ml).

⁵ MonoQ HR 5/5-Fertigsäule (Durchmesser: 5 mm, Länge: 5 cm, Bettvolumen: 1 cm³)

Regenerationsbedingungen: - 5 x 0.5 ml Acetonitril/Ameisensäure 1:1, 0.25 ml/min, upflow
- Äquilibrieren mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH

Hierbei ausgewaschene Proteine wurden in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und direkt im Anschluss für Aktivitätstests (Kapitel III.1.7) herangezogen. Das Maximum der Enzymaktivität, die auch hier nicht weiter differenziert werden konnte, lag bei Fraktion Nr. 30, was einer KCl-Konzentration von 79 mM entsprach. Die Konzentration des enthaltenen Gesamtproteins betrug 370 $\mu\text{g/ml}$.

Die positiv getesteten Fraktionen wurden für weitere Tests bei 4 °C aufbewahrt.

In Abb. 37 ist das erhaltene Elutionsprofil der Säule dargestellt.

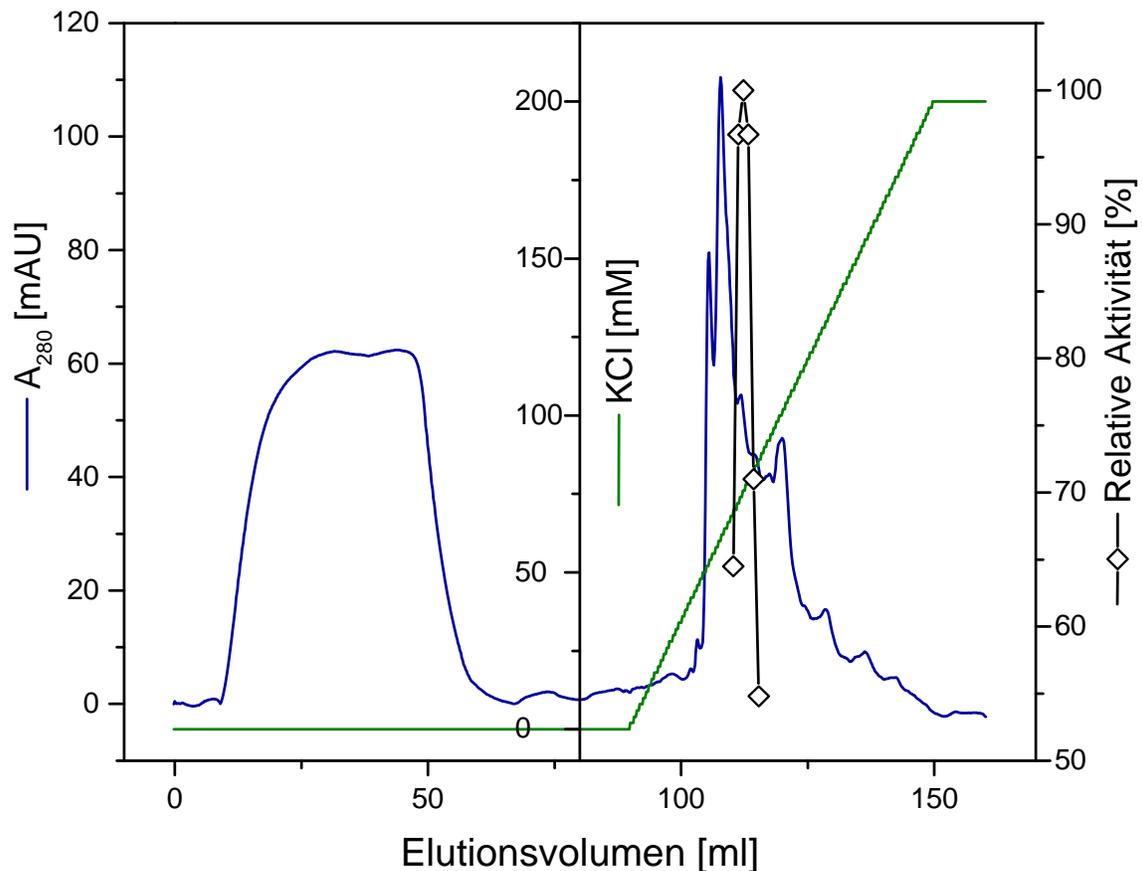


Abb. 37: Elutionsprofil an MonoQ

Blau: UV-Absorption der enthaltenen Proteine bei 280 nm

Grün: linearer Gradient von 0 – 200 mM KCl mit einem Gesamtvolumen von 60 ml:

Die relative Aktivität der weiterbearbeiteten Fraktionen ist mit \diamond gekennzeichnet.

2.3.5 Kontrolle des Reinigungserfolgs per SDS-Gelelektrophorese

Nach jeder durchgeführten Proteinreinigung wurde ein SDS-Gel angefertigt, um den Reinigungserfolg zu kontrollieren. Die Vorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel III.1.5.1 beschrieben.

Die verwendeten Proben wurden vor bzw. nach jeder Säule von der entsprechenden Proteinlösung abgenommen und je nach Proteinkonzentration für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Zusammensetzung einer solchen Probe ist in Kapitel III.1.5.1 aufgeführt.

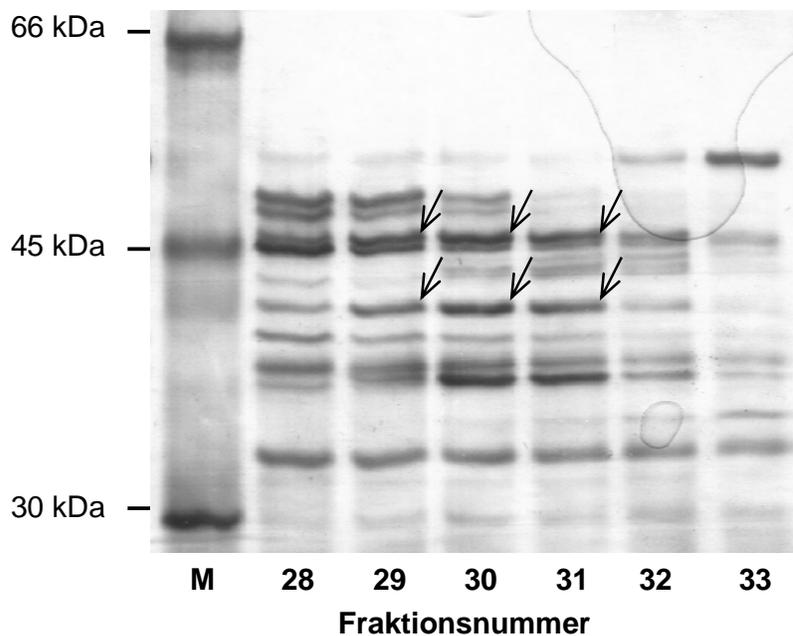
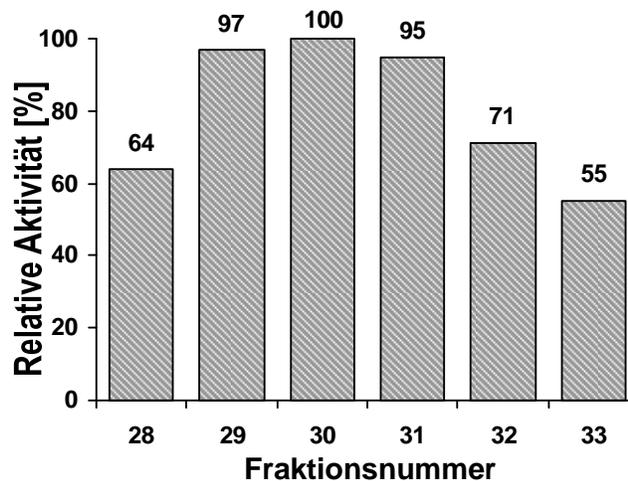


Abb. 38: SDS-PAGE der gereinigten Proteinfractionen nach MonoQ

Auf dem SDS-Gel sind zwei Banden (\rightarrow) der Größen 46 kDa und 36 kDa zu erkennen, die mit dem im Säulendiagramm dargestellten Aktivitätsverlauf der einzelnen Fractionen korrelieren.

M: Marker LMW



Zur Identifizierung der gesuchten Proteinbande wurde jede aktive Fraktion der letzten Reinigungssäule auf das Gel aufgetragen und anhand des relativen Aktivitätsverlaufs des gewünschten Enzyms untersucht. Bei der im vorigen Abschnitt beschriebenen Reinigung der Catheramin-Reduktase wurden die Fraktionen Nr. 28 – 33 für die SDS-Trennung ausgewählt. Um für eine spätere Sequenzierung der erhaltenen Proteinbanden genügend Material zur Verfügung zu haben, wurden pro Fraktion nur 25 μ l Enzymlösung eingesetzt. Die Trennung erfolgte über Nacht (15,5 Stunden) bei einer Stromstärke von 13 mA. Zur Detektion wurde zunächst das Verfahren der Silberfärbung (Kapitel III.1.5.2.2) gewählt, da die Erfassung der geringen Proteinmengen mit Coomassie nicht möglich gewesen wäre.

In Abb. 38 ist das erhaltene SDS-Gel zusammen mit dem Aktivitätsverlauf der Catheramin-Reduktase dargestellt. Auf dem Gel waren zwei Banden mit 46 kDa und 36 kDa deutlich erkennbar, die dem Aktivitätsverlauf des gesuchten Enzyms entsprachen.

2.4 Versuche zur Sequenzierung der Catheramin-Reduktase

Die Durchführung der Sequenzierungsversuche erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Lottspeich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach einer hydrolytischen Spaltung der gewünschten –Coomassie-gefärbten (Kapitel III.1.5.2.1)– Banden unter Verwendung der Endoproteinasen LysC und AspN durchgeführt. Die dabei entstandenen Bruchstücke wurden aus dem Gel gewaschen und per MS und HPLC analysiert.

Die hierbei erhaltenen Fragmente zeigten, dass es sich bei der Bande mit einer Größe von 36 kDa (Abb. 38) aufgrund einer hohen Homologie zur Fructose-bisphosphat-Aldolase nicht um die gesuchte Catheramin-Reduktase handeln konnte.

2.5 Molekulargewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Catheramin-Reduktase erfolgte unter Anwendung der Gelfiltration. Hierbei bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Elutionsgeschwindigkeit der Enzyme, dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichts.

Bei dem verwendeten Säulenmaterial handelte es sich um Sephacryl S-100 HR (Kapitel III.1.4.5.2), das in einer Fertigsäule⁶ mit einer Länge von 60 cm gepackt war. Um eine Aussage über die Größe des gesuchten Enzyms machen zu können, musste die Säule zunächst mit Hilfe eines internen Standards geeicht werden. Die hierzu benötigte Eichlösung setzte sich zu gleichen Teilen aus α -Chymotrypsin (25 kDa), Albumin aus Hühnerei (45 kDa) und BSA (67 kDa) zusammen, und wurde bei einer Flussrate von 0.3 ml/min auf die äquilibrierte⁷ Säule geladen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 150 mM NaCl und einem konstanten Fluss von 0.3 ml/min.

Für die Bestimmung der Catheramin-Reduktase wurden 1.8 ml eines vorgereinigten Rohextrakts (Kapitel IV.2.2) aus 35 g gefrorenem Zellmaterial gewonnen und unter den gleichen Bedingungen wie der Standard aufgetrennt. Die Analyse der eluierten Fraktionen (Kapitel III.1.7; Kapitel III.2.2, Programm 3) ergab ein Aktivitätsmaximum, das mit einem Molekulargewicht von $64.6 \text{ kDa} \pm 5 \%$ korrelierte (Abb. 39).

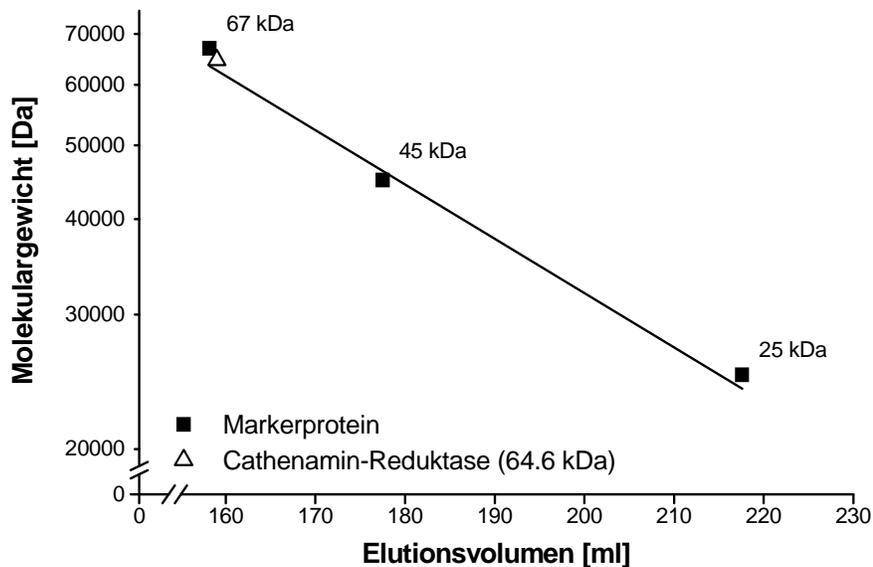


Abb. 39: Molekulargewichtsbestimmung der Catheramin-Reduktase an Sephacryl S-100 HR

⁶ Sephacryl S-100 HR 16/60 (Durchmesser: 16 mm, Länge: 60 cm, Bettvolumen: 120 cm³)

⁷ Äquilibrationpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 150 mM NaCl

2.6 Co-Substratspezifität

Wie schon in den vorherigen Abschnitten beschrieben, handelte es sich bei der bearbeiteten Cathenamin-Reduktase um ein NAD(P)H-abhängiges Enzym. Dies wurde bereits von STÖCKIGT *et al.* (1976) sowie von HEMSCHIEDT *et al.* (1985) beschrieben.

Zur Überprüfung der NADH-Abhängigkeit der gesuchten Cathenamin-Reduktase wurden vorgereinigte Enzymrohextrakte (Kapitel IV.2.2) hergestellt, die analog zu den in Kapitel III.1.7 angegebenen Reaktionsansätzen inkubiert wurden. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Cofaktoren betragen dabei jeweils 1 und 2 mM. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 30 °C und 500 rpm konnte die NADPH-Abhängigkeit der Cathenamin-Reduktase per HPLC-Analyse (Kapitel III.2.2, Programm 3) bestätigt werden. Die dabei erzielte relative Aktivität des Enzyms wurde als 100% festgelegt. Zusätzlich zum erwarteten Produkt Raubasin konnte der Peak eines unbekanntes Nebenprodukts bei einer Retentionszeit von ~3.6 min detektiert werden, dessen Identifizierung im nächsten Abschnitt behandelt wird.

Die Inkubationen mit NADH als Cofaktor zeigten einen ebenso hohen Substratumsatz, wie die NADPH-haltigen Reaktionen. Im Gegensatz dazu kam es allerdings nicht zur Ausbildung des unerwünschten Nebenprodukts im unteren R_t -Bereich.

In Abb. 40 sind die erhaltenen HPLC-Chromatogramme der durchgeführten Inkubationen gezeigt.

Parallel zu dieser Testreihe wurden Versuche unternommen, den Umsatz des Substrats Cathenamin zu erhöhen, um eine bessere Ausbeute und Detektierbarkeit der entstandenen Produkte zu erreichen. Hierzu wurde ein regenerierendes System für NADPH und NADH verwendet, das bereits von FALKENHAGEN (1995) sowie MERTENS (2003) beschrieben wurde. Das Prinzip dieses Systems bestand darin, durch Zugabe von Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eine ständige Regeneration von NADPH bzw. NADH aus dem oxidierten Cofaktor NADP^+ bzw. NAD^+ herbeizuführen. Dadurch wäre der zugesetzte Cofaktor in einem ständigen Überschuss vorhanden, ohne dass eine hohe Konzentration die Enzymaktivität negativ beeinflussen könnte.

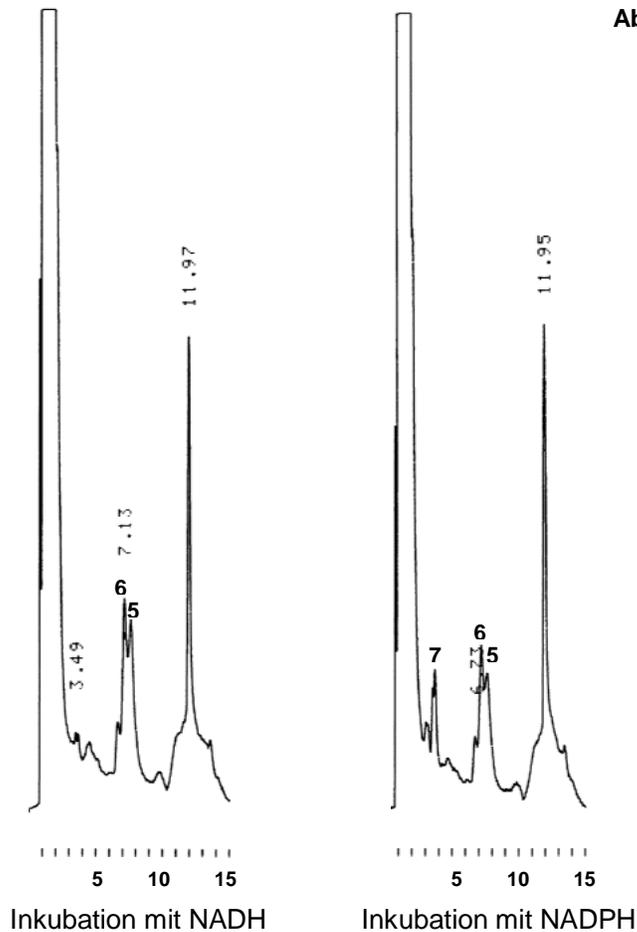


Abb. 40: HPLC-Ergebnis zur Bestimmung der Cosubstrat-Spezifität der Cathenamin-Reduktase

Im linken Teil der Abb. ist die Inkubation mit NADH gezeigt. Bei einer R_t von 7.13 min ist Ajmalicin (6) zu erkennen, bei einer R_t von 7.60 min Tetrahydroalstonin (5).

Das rechte Chromatogramm zeigt die HPLC-Analyse der durchgeführten Inkubation mit NADPH als Cofaktor. Hier tritt ein zusätzlicher Peak eines unbekanntes Nebenprodukts (7) mit einer R_t von ~3.6 min auf.

Die Aktivität der Cathenamin-Reduktase ist in beiden Fällen gleich groß (100 %), da bei einer R_t von 12.2 min kein Cathenamin-Peak mehr erkennbar ist.

Der Peak bei R_t ~11.95 min ist auf das verwendete Puffersystem zurückzuführen.

Für die Testung eines solchen Systems wurden die in Kapitel III.1.7 angegebenen Standardinkubationen angesetzt und mit jeweils 10 mM Glucose-6-Phosphat und 2 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase versetzt. Aufgrund der eingestellten pH-Werte in den Reaktionsansätzen von 6.0 – 7.5 (Kapitel IV.2.2, Tab. 5) und dem pH-Optimum der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von 7.8, konnte im Laufe der Testreihe (30 min, 30 °C, 500 rpm) jedoch kein positiver Effekt festgestellt werden. Nach Einstellung der Reaktionsbedingungen auf das pH-Optimum der eingesetzten Dehydrogenase war die Aktivität der gesuchten Cathenamin-Reduktase zu gering für eine aussagekräftige Beurteilung des regenerierenden Systems.

2.7 Analyse der entstandenen Reaktionsprodukte

2.7.1 Identifizierung eines unbekanntes Nebenprodukts

Zur Identifizierung des bereits in Kapitel IV.2.5 beschriebenen Nebenprodukts, das bei der Inkubation der Enzymlösung unter Zusatz von NADPH als Cofaktor entstand, wurden 150 g gefrorene Zellen analog zu Kapitel IV.2.2 hergestellt. Nach Inkubation der Enzymlösung in je einem 50-fachen Ansatz mit NADPH und NADH (Kapitel III.1.7) für 30 min bei 30 °C und 500 rpm und anschließender HPLC-Analyse (Programm 3, Kapitel III.2.2), wurde der pH-Wert der Reaktionsansätze mit 1.5 M KPi auf 8.0 eingestellt und die enthaltenen Alkaloide durch dreimaliges Ausschütteln mit je 400 μ l Ethylacetat und anschließender Zentrifugation (14 000 x g, 5 min) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit einem Rotationsverdampfer bei 45 °C und 180 mbar getrocknet. Die erhaltenen Rückstände wurden dann mit je 100 μ l eines CH₂Cl₂-MeOH-Gemischs im Verhältnis 7 : 3 gelöst und über eine Länge von 1 cm bandenförmig auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F₂₅₄) aufgetragen. Die Auftrennung der Analysen erfolgte mit dem FM 1 (Kapitel III.2.1) über eine Laufstrecke von 13.7 cm. Die Detektion bei 254 nm zeigte –zusätzlich zu den erwarteten Produkten Raubasin und Tetrahydroalstonin im höheren R_f-Bereich– einen weiteren Substanzfleck mit einem R_f-Wert von 0.53. Die unbekannte Substanz wurde mit MeOH aus dem Kieselgel eluiert und der HPLC-Analyse zugeführt (Programm 3, Kapitel III.2.2). Hier konnte eine Übereinstimmung der Retentionszeit von 3.2 min mit der vor der Extraktion durchgeführten Testmessung festgestellt werden. Bei der eluierten Substanz handelte es sich demnach um das gesuchte Nebenprodukt.

Beim Besprühen einer parallel durchgeführten DC-Analyse mit Ammonium-Cer-(IV)-sulfat-Lösung (Kapitel III.2.1) färbte sich die unbekannte Verbindung rot-braun, was einen eindeutigen Hinweis auf ein Indolalkaloid darstellte. Dies konnte nach einer EI-MS-Analyse bestätigt werden, allerdings war mit den zur Verfügung stehenden Methoden keine eindeutige Identifizierung des unbekanntes Alkaloids möglich. Das entstandene Muster aus den Fragmenten m/z 352, 256, 236 und 169 ist in Abb. 41 wiedergegeben.

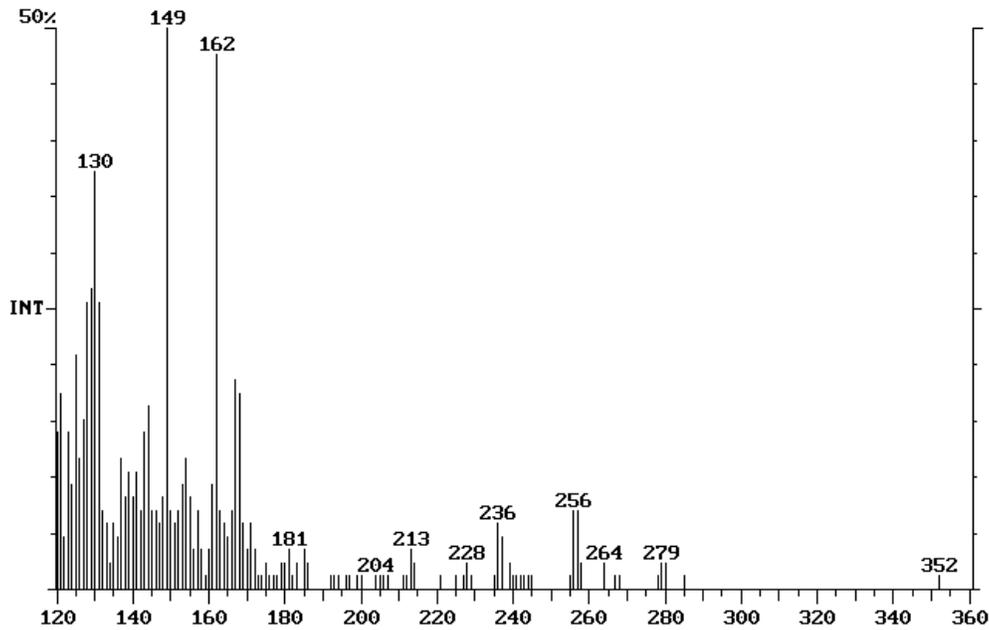


Abb. 41: EI-Massenspektrum des unbekannten Nebenprodukts nach Inkubation der Cathenamin-Reduktase mit NADPH

2.7.2 Identifizierung der entstandenen Hauptprodukte

Bei der im vorherigen Abschnitt durchgeführten DC-Analyse wurde das Heteroyohimbin-Alkaloid Tetrahydroalstonin bei einem R_f -Wert von 0.78 in Form eines hellblau fluoreszierenden Substanzflecks bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Direkt darunter (R_f -Wert von 0.72) befand sich ein schwächerer Fleck, der dem Raubasin zugeordnet werden konnte. Beide Verbindungen wurden aus dem Kieselgel eluiert per EI-MS analysiert. Die Substanz mit dem größeren R_f -Wert konnte dabei aufgrund der detektierten Fragmente mit den Massenzahlen m/z 352, 337, 184 und 169 eindeutig als Tetrahydroalstonin identifiziert werden. Die EI-MS-Analyse des zweiten Alkaloids ließ aufgrund der kleinen Substanzmenge keine zuverlässige Aussage über die Identität des gemessenen Stoffs zu, jedoch deutete das Fragmentierungsmuster auf ein Heteroyohimbin-Alkaloid hin. Die Massenspektren von Tetrahydroalstonin (vgl. Abb. 31, S. 95) und Raubasin unterscheiden sich nur in ihren Intensitäten bezüglich der Fragmente m/z 184, 169 und 337. Während bei Tetrahydroalstonin das Fragment 184 m/z eine wesentlich kleinere Intensität aufweist als das Fragment mit einer Größe von 169, ist dies bei Raubasin umgekehrt. Die Intensitäten für das Fragment 337 m/z sind bei Raubasin kleiner als bei Tetrahydroalstonin.

2.8 Weitere Reinigungsversuche

Wie eingangs erwähnt, war zu Beginn der Proteinreinigung nicht bekannt, ob die Bildung der drei erwähnten Produkte Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin von einem oder mehreren Enzymen katalysiert wurde. Zur Klärung dieser Frage kamen im Laufe der Proteinreinigung noch weitere Reinigungsprinzipien zur Anwendung, die jedoch aufgrund ihrer mangelnden Effizienz nicht in das optimierte Reinigungsprotokoll aus Kapitel IV.2.3 aufgenommen wurden.

Bei Experimenten, in denen das Trennmaterial der ersten Reinigungssäule gegen den starken Anionenaustauscher Source30Q (Kapitel III.1.4.1.2) ausgetauscht wurde, konnten ebenfalls Fraktionen gewonnen werden, in denen die Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin getrennt beobachtet wurde. Bei diesem Reinigungsschritt wurde der analog zu Kapitel IV.2.3.1 hergestellte Rohextrakt aus 560 g gefrorenem Zellmaterial, mit einer Flussrate von 6 ml/min auf die zuvor mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 mM MSH äquilibrierte Säule⁸ geladen und mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 – 500 mM KCl über einen Zeitraum von 75 min (entspr. 450 ml). Die erhaltenen Fraktionen (jeweils 10 ml) wurden, wie in Kapitel IV.2.3 beschrieben, auf ihre Aktivität untersucht. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme (Programm 3, Kapitel III.2.2) zeigten unterschiedliche Aktivitätsverläufe für die Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin, die allerdings zu keinem Zeitpunkt der säulenchromatographischen Reinigung getrennt voneinander vorlagen. Aufgrund der schlechten Ausbeute dieser Methode und der insgesamt schlechteren Trennleistung gegenüber der DEAE-Sepharose - FF, wurde Source 30Q nicht in das optimierte Reinigungsprotokoll aufgenommen.

Die in Kapitel III.1.4.4 aufgeführten Affinitätschromatographien an 2',5'-ADP-Sepharose 4B und HiTrap Blue HP sowie EAH-AS-Sepharose 4B lieferten trotz vielfältiger Puffersysteme und anderer Reinigungsparameter, wie z.B. Flussraten und Gradientenverläufe, keine Verbesserungen der Trennleistung und Reinigungseffizienz.

Bei der Verwendung des hydrophoben Materials Source 15Phe wurde die zu reinigende Proteinfraction zunächst mit einem geeigneten Fällungsreagenz bis zu einer Endkonzentration von 0.5 M versetzt, um die Hydrophilie der enthaltenen

⁸ Source 30Q in XK26/40-Säule (Durchmesser: 26 mm, Länge: 40 cm, Bettvolumen: 123 cm³)

Enzyme herabzusetzen und somit eine Bindung an die Säulenmatrix zu ermöglichen. Bereits bei Vorversuchen stellte sich heraus, dass Ammoniumsulfat –in der HOFMEISTER-Serie als effektives und schonendes Salz bezeichnet– hierzu nicht geeignet war, da es mit Cathenamin als Substrat für den Aktivitätstest interagiert. Damit war eine Enzymreaktion nicht mehr möglich und die Kontrolle des Reinigungsverlaufs per HPLC-Analyse nicht mehr gewährleistet. Eine Umstellung des Salzes auf Kaliumsulfat, das sehr ähnliche Eigenschaften wie Ammoniumsulfat besaß, erwies sich allerdings als ineffizient. Es gelang zwar, durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0.5 – 0 M Kaliumsulfat über 45 ml, aktive Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml von der Säule zu eluieren, jedoch war die Wirkung des Fällungsreagenzes nicht ausreichend. Daher kam es zu einer unzureichenden Bindung der Proteine an die Säulenmatrix, und das gesuchte Enzym fand sich in größerer Menge im Durchfluss der Säule wieder.

IV Diskussion

1 Entwicklung und Herstellung des Coexpressions-Systems

Im ersten Teil der erstellten Dissertation wurde ein Coexpressions-System entwickelt, das die gleichzeitige heterologe Expression der beiden Enzyme Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase als Schlüsselenzyme in der pflanzlichen Biosynthese z.B. der Indolalkaloide Ajmalin und Raubasin in *E. coli*-Bakterien erlaubte.

Mit einem solchen Vektorkonstrukt könnte bei Vorliegen der entsprechenden DNA-Sequenzen möglicherweise der komplette Biosyntheseweg eines pflanzlichen Sekundärstoffs in homologen Bakterienkulturen nachgestellt werden. Durch diese Methode der heterologen Expression der beteiligten Enzyme wäre eine wesentlich schnellere und effizientere Herstellung des gewünschten Naturstoffs in einem Maßstab möglich, der mit pflanzlichen Zellkulturen wahrscheinlich nie erreicht werden könnte. Dies liegt in erster Linie an der großen Empfindlichkeit pflanzlicher Suspensionskulturen hinsichtlich Temperatur, Lichtintensität und Komposition der verwendeten Nährmedien, aber auch an der Zusammensetzung des Enzymspektrums in den Zellen. Durch Änderungen in Bezug auf die Temperatur, Lichtintensität oder auch die Dichte der Zellen während des Wachstums können innerhalb der pflanzlichen Biosynthese der enthaltenen Naturstoffe bestimmte Nebenwege an- und abgeschaltet werden, indem die Transkription der beteiligten Enzyme reguliert wird. Dadurch werden zum einen verschiedene Naturstoffe stärker gebildet, die Synthese anderer Substanzen kann jedoch behindert werden. Nähere Untersuchungen hierzu wurden von DEUS-NEUMANN (1984) an Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus roseus* G. Don durchgeführt. Ein anderer wichtiger Unterschied besteht in der Kultivierungsdauer und Größe der Kulturen der jeweiligen Zellsysteme. Während sich eine Bakterienkultur innerhalb weniger Stunden verdoppeln kann, dauert dies bei Pflanzenzellkulturen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen in der Regel zwischen 3 – 5 Tagen.

Erste Versuche zur parallelen Expression der beiden Enzyme Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase in Mikroorganismen wurden bereits von GEERLINGS *et al.* (2001) unternommen. Dabei gelang jedoch nur die Bildung der

zwei Enzyme durch Transformation der codierenden Gensequenzen, die in unterschiedlichen Vektoren einkloniert wurden, in Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae*.

Das hier vorgestellte System bietet die Möglichkeit, cDNAs für bis zu sechs verschiedene Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels in einem einzelnen Vektor aufzunehmen. Ein Einbringen von „Genkassetten“, die aus bereits miteinander verknüpften cDNA-Sequenzen unterschiedlicher Enzyme bestehen, ist grundsätzlich ebenso möglich.

1.1 Klonierung der Strictosidin-Synthase und der Strictosidin- β -D-Glucosidase

Auf der Grundlage der Nukleotidsequenz der Strictosidin-Synthase (KUTCHAN *et al.*, 1988) aus *Rauvolfia serpentina* wurden Primer mit den Restriktionsschnittstellen entwickelt, die für eine erfolgreiche Klonierung des STR-Gens in einen geeigneten Expressionsvektor benötigt wurden (Abb. 6, S. 54). Bei dessen Auswahl musste darauf geachtet werden, dass sich die enthaltenen Restriktionsschnittstellen maximal einmal in der zu klonierenden cDNA wiederholten. Bei einer größeren Anzahl solcher sequenzinterner Schnittstellen wäre die Isolierung der gewünschten cDNA mit einem größeren Aufwand verbunden und die Ausbeute des Gens während der einzelnen Arbeitsschritte nicht ausreichend gewesen.

Ein hierzu geeigneter Vektor stellte *pQE-70* dar. Die multiple-cloning-site dieses Plasmids enthielt lediglich drei Restriktionsschnittstellen, was für die ersten Versuche zur Konstruktion eines Coexpressions-Systems mit zwei Enzymen ausreichte. Die zweite Restriktionsschnittstelle würde somit sowohl zum Einbau der Strictosidin-Synthase, als auch der Strictosidin- β -D-Glucosidase verwendet werden. Des Weiteren enthielt *pQE-70* den starken Promotor T5, dessen hohe Transkriptionsrate für ein Coexpressions-System mehrerer Enzyme besonders geeignet schien. Die Bildung eines C-terminalen (His)₆-tags, der zur Reinigung exprimierter Proteine mittels Affinitätschromatographie verwendet werden konnte (GERASIMENKO *et al.*, 2002; HEFNER *et al.*, 2002), wurde durch ein vorgeschaltetes Stop-Codon im Reverse-Primer unterbunden, da bei gleichzeitiger Expression zweier Enzyme nur das Enzym in 3'-Richtung der Plasmidsequenz mit dem (His)₆-tag versehen würde.

Für das andere Enzym müsste auf diese Reinigungstechnik verzichtet werden, es sei denn, der Übergang zwischen den beiden Enzymen enthielt kein Stop-Codon für das vorangestellte Enzym. Dadurch käme es zur Bildung eines Fusionsproteins, wodurch ein Funktionsverlust der Enzyme auftreten könnte, die (His)₆-tag-Reinigung jedoch durchführbar wäre.

Bei der Ligation eines PCR-Produkts in den Klonierungsvektor *pGEM-T* war aufgrund der jeweils 3'-ständigen Thymidin-Überhänge keine Steuerung der Ligationsrichtung des zu klonierenden Gens möglich. Somit war zunächst zu klären, in welcher Orientierung das eingefügte STR-Gen im Plasmid vorlag, da sich in einem Abstand von 26 bp in 5'-Richtung der multiple-cloning-site eine *Sph I*-Schnittstelle in der Vektorsequenz befand (Abb. 9, S. 58). Zusammen mit der STR-internen sowie der durch PCR eingeführten *Sph I*-Schnittstelle, ergaben sich demnach bei einer Spaltung des Plasmids *pGEM-T-STR* mittels *Sph I* –abhängig von der Ligationsrichtung des STR-Gens– Fragmente unterschiedlicher Größe (Kapitel IV1.1.2). Das kleine 26 bp-Fragment hätte die Klonierungsarbeiten und die anschließenden Expressionsversuche behindert, und seine Anwesenheit musste daher von vornherein ausgeschlossen werden. Anhand eines Agarosegels wäre ein solch kleiner Größenunterschied zwischen den einzelnen Banden nicht erkennbar gewesen. Aufgrund der STR-internen Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Sph I* nach 403 bp mussten geeignete Bedingungen für die Isolierung der cDNA gefunden werden, unter denen es zu einer partiellen Spaltung des Gens kam. Dies konnte durch eine Verdünnung des Enzyms *Sph I* erreicht werden. Nach einem letzten Klonierungsschritt in den Expressionsvektor *pQE-70* und anschließender Transformation in M15-Zellen konnte die Aktivität der Strictosidin-Synthase getestet werden. M15-Zellen zeichneten sich dadurch aus, dass das enthaltene *pREP4*-Plasmid ununterbrochen das Lac-Repressor-Protein bildete, welches die hohe Transkriptionsrate des Expressionsvektors *pQE-70* unterband. Durch gezielte Zugabe von IPTG wurde das Lac-Repressor-Protein abgefangen und die Transkription gestartet.

Da es sich bei der in Abb. 24 (S. 83) dargestellten Reaktion um eine äquimolare Umsetzung von Tryptamin und Secologanin zu Strictosidin (KUTCHAN, 1993) handelte, wurden die gleichen molaren Mengen der beiden Edukte in den Inkubationen eingesetzt (TREIMER *et al.*, 1979; KUTCHAN, 1989). Bei einer Inkubationsdauer von 30 min bei 30 °C konnte noch kein kompletter Umsatz der

beiden Edukte beobachtet werden, was jedoch bei einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 45 – 60 min möglich war. Die Bildung des in Abb. 25 (S. 85) gezeigten Peaks mit einer Retentionszeit von 9.3 min wurde in allen Inkubationen beobachtet, die Proteinrohextrakt enthielten. Die Peakgröße blieb dabei unabhängig vom Substratzusatz gleich, was darauf hindeutete, dass diese Substanz ein fester Bestandteil des Enzymextrakts war und nicht erst während den Inkubationen gebildet wurde.

Bevor die Strictosidin- β -D-Glucosidase als zweites Enzym dem Expressions-System hinzugefügt werden konnte, musste gewährleistet sein, dass die Bindung an die Ribosomen, die an der Translation der beiden zu exprimierenden Proteine beteiligt waren, nicht gestört würden und die Enzymaktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase erhalten bleibt. Bei einem „nahtlosen“ Übergang der beiden Gensequenzen vom Stop-Codon der vorangehenden Gensequenz zum Start-Codon der nachfolgenden mRNA wäre kein räumlicher Spielraum mehr für die Bindung des Ribosoms vorhanden gewesen. Diese wäre demnach an der entsprechenden mRNA zur Translation in die Strictosidin- β -D-Glucosidase als zweitem Enzym nicht gewährleistet gewesen. Aufgrund dessen entschloss sich DONG 1996 zum Einbau einer Ribosomenbindestelle als Zwischenstück bei der Coexpression von Cytochrom P450 und einer nachgeschalteten Reduktase. Die Sequenz dieser Ribosomenbindestelle wurde bereits 1973/1974 von SHINE / DALGARNO untersucht und als 5'-GGAGGT-3' postuliert. Dieses Motiv, das entsprechend seinen Entdeckern als Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) benannt wurde, konnte in späteren Arbeiten von MA *et al.* (2002) bestätigt und näher charakterisiert werden. Demnach gab es mehrere SD-Motive, deren Sequenzen 5'-GGAG-3', 5'-GAGG-3' und 5'-AGGA-3' mit leichten Abweichungen in Abständen von 8 – 10 bp vor der zu translatierenden Sequenz in *E. coli*-Genen zu finden waren.

Zur Sicherstellung des Einbaus einer funktionierenden Ribosomenbindestelle und zur Einhaltung der richtigen Abstände in Bezug auf das vorangehende Stop-Codon sowie das nachfolgende Start-Codon, wurde sich der entsprechenden RBS-Sequenz aus dem verwendeten Expressionsvektor *pQE-70* bedient. Damit sollte zusätzlich eine gleich hohe Bindungsaffinität der beteiligten Ribosomen an die mRNAs der beiden Enzyme erreicht werden, damit es zu einer möglichst gleichmäßigen Expression der gewünschten Enzyme kam. Der eingebaute Spacer besaß die Sequenz 5'-GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA-3' und enthielt die o.g. SD-Motive in

unterschiedlichen Leserahmen. Die Integration dieser Sequenz in den Forward-Primer ergab zusammen mit der angefügten *Bam*H I-Schnittstelle einen Überhang von 30 bp bei der ersten Anlagerung des Primers an die zu amplifizierende cDNA. Durch Herabsetzen der Bindungstemperatur während der ersten 5 Zyklen der PCR wurde die Anlagerung des Oligonukleotids an die DNA begünstigt und die Reaktion konnte im weiteren Verlauf normal fortgeführt werden. Bei der anschließenden Isolation der SG-cDNA aus dem Klonierungsvektor *pGEM-T* kam erneut das Verfahren des partiellen Verdaus zum Einsatz, da es aufgrund einer SG-internen *Bam*H I-Schnittstelle schnell zu einer kompletten Spaltung der cDNA kam.

Die Umklonierung des auf diese Weise isolierten RBS-SG-Gens in den Expressionsvektor *pQE-70* wurde dadurch erschwert, dass die beiden vorgesehenen Restriktionsschnittstellen –*Bam*H I und *Bgl* II– die gleichen ‚sticky-ends‘ besaßen. Dies war insofern verwunderlich, da diese beiden Schnittstellen zusammen mit *Sph* I die Einzigen darstellten, die laut Herstellerangaben bei *pQE-70* verwendet werden konnten. Die dadurch entstandene Identität der jeweiligen 5'-Enden hatte zur Folge, dass der Einbau des Gens nicht gerichtet erfolgen konnte (Abb. 16, S. 68). Zusätzlich war die Effektivität der Ligation stark herabgesetzt und es kam zu vermehrten Religationen des leeren, linearisierten Vektors. Trotz dieser Schwierigkeit gelang die Klonierung der RBS-SG-cDNA in *pQE-70*, wenn auch mit einer sehr geringen Ausbeute (1 positive Kolonie von 96 getesteten).

Für die Testung der Enzymaktivität war im Gegensatz zur Strictosidin-Synthase kein Zusatz eines Cofaktors nötig. Wie in der folgenden Abb. 42 (S. 123) dargestellt ist, verläuft die Bildung des Indolalkaloids Cathenamin ausgehend von Strictosidin über zahlreiche Intermediate (STÖCKIGT *et al.*, 1978; STÖCKIGT, 1978; GERASIMENKO *et al.*, 2002).

Der dargestellte Reaktionsverlauf zeigt, dass die Bildung des Cathenamins über viele instabile Zwischenprodukte läuft. Die direkte Vorstufe bildet dabei 4,21-Dehydrogeissoschizin, das in einem Gleichgewicht mit dem Endprodukt steht. Cathenamin selbst liegt in einem Gleichgewicht mit seiner Iminium-Form vor (Abb. 45, S. 129). Die große Anzahl von Zwischenprodukten kann für die in Abb. 27 (S. 87) dargestellten Peaks im unteren R_f -Bereich der Inkubation verantwortlich gemacht werden. Die Verbindung mit der Retentionszeit von 9.4 min trat bereits bei den Versuchen zur Strictosidin-Synthase-Aktivität auf, hatte aber auch hier keinerlei Einfluss auf die Detektierbarkeit der erwarteten Substanzen.

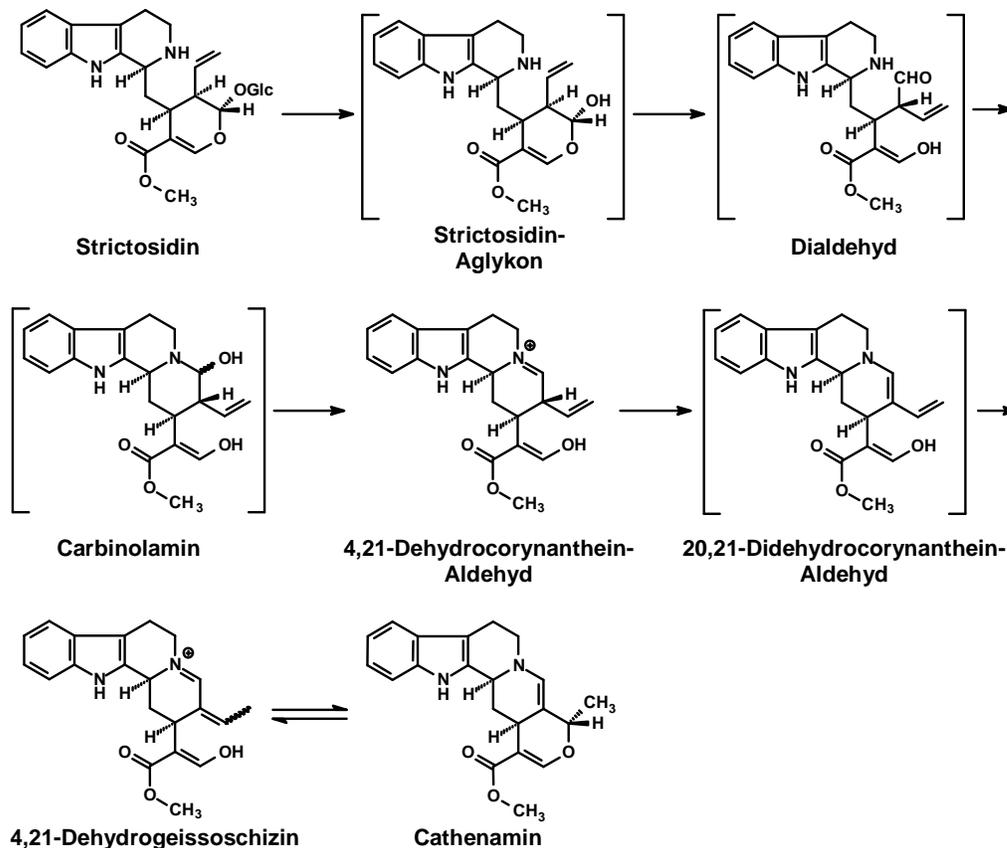


Abb. 42: Bildung von Catenamin aus Strictosidin über die stabilen Zwischenstufen 4,21-Dehydrocorynanthein-Aldehyd und 4,21-Dehydrogeissoschizin

1.2 Herstellung und Test des Coexpressions-Systems

Zu Beginn der Arbeiten bezüglich der Ligation der beiden codierenden cDNAs in unmittelbarer Nachbarschaft innerhalb des Expressionsvektors *pQE-70* war der Einbau der RBS-SG-cDNA in das zuvor produzierte Plasmid *pQE-70-STR* vorgesehen. Die im vorigen Abschnitt erläuterten Schwierigkeiten bei der Ligation der RBS-SG-cDNA in die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Bgl*II machten eine Überarbeitung dieses Konzepts nötig. Versuche, bei denen es zum Auffüllen der 5'-Überhänge (RICHTERICH, 1989) an den *Bgl*II-Schnittstellen (Kapitel III.3.4.5) kommen sollte, waren zwar erfolgreich, allerdings konnte auch hierdurch keine gerichtete Ligation erzielt werden.

Durch die Planung eines neuen Plasmidkonstrukts sollte nicht nur ein Austausch einer der problematischen Restriktionsschnittstellen erreicht werden, sondern auch

–im Hinblick auf spätere Arbeiten– eine starke Erweiterung der Ligationsmöglichkeiten erzielt werden. Die effektivste Variante hierzu bestand in der Einklonierung einer wesentlich größeren multiple-cloning-site, als sie in *pQE-70* vorhanden war. Bei der Durchsicht der zur Verfügung stehenden Plasmide fiel die Wahl für eine solche multiple-cloning-site auf die des Vektors *pSE-280*. Bei einer Gesamtgröße von 347 bp standen insgesamt 41 Restriktionsschnittstellen zur Verfügung. Durch Auswahl der Schnittstellen für *Bam*H I und *Hind* III verkürzte sich die multiple-cloning-site zwar um 94 bp bzw. 13 potentielle Restriktionsschnittstellen, es konnte jedoch immer noch auf eine ausreichende Anzahl Spaltstellen zurückgegriffen werden. Die Tatsache, dass die Restriktionsstelle für *Hind* III innerhalb des (His)₆-tag-codierenden Abschnitts in der *pQE-70*-Sequenz lag, war für die durchzuführenden Arbeiten kein Hindernis, da eine Reinigung der exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie nicht in Frage kam (Kapitel V.1.1). Nach der Isolation und der anschließenden Klonierung dieser modifizierten MCS in *pQE-70*-STR entstand das Vektorkonstrukt *pQE-70bh*-STR mit einer Größe von 4 683 bp, das durch eine hydrolytische Spaltung mit den Restriktionseendonukleasen *Bam*H I und *Kpn* I für die Aufnahme der RBS-SG-cDNA vorbereitet wurde. Der Austausch der *Bgl* II-Schnittstelle gegen eine *Kpn* I-Schnittstelle machte eine Neusynthese des einzufügenden RBS-SG-Gens unter Verwendung eines entsprechend modifizierten Reverse-Primers nötig.

Nach der Ligation der RBS-SG-cDNA an das 3'-Ende der Strictosidin-Synthase-Sequenz konnte die Anwesenheit der beiden Gene in den gewünschten Positionen mittels Restriktion des entstandenen Vektorkonstrukts *pQE-70bh*-STR-RBS-SG bestätigt werden. Eine komplette Sequenzierung der erhaltenen Nukleotidabfolge, speziell in der Übergangsregion der beiden cDNAs, war aufgrund der Gesamtlänge des Inserts von 2 672 bp nicht möglich. Sequenzierungsreaktionen, die am jeweiligen 5'- bzw. 3'-Ende starteten, konnten die Übergangsregion aufgrund einer maximalen Auflösung von 1 000 bp nicht erfassen. In der folgenden Abb. 43 ist diese Region farblich dargestellt.

Bei den schwarz unterlegten Sequenzen handelt es sich um die Restriktionsschnittstellen *Pst* I, *Mlu* I und *Sac* II. Sie kommen in den cDNAs der Strictosidin-Synthase und der Strictosidin- β -D-Glucosidase nicht vor, wodurch sie zusammen mit *Kpn* I für die Klonierung weiterer Sequenzen verwendet werden können.

```

5'-TGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAA
GCATGCATGGCCAAACTTTCTGATTCGCAAACTATGGCACTGTTACCGT
.....ATGATAAGAAGGGAAATTCTTTTGTTTCAAGTCATTAAGAGGATCCG
AATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATGGACAATACTCAAGCTGAGCCTCTT
.....CAAGAGGCAAAAAACCTAAGGTACGGTTGTTAACGTTAGCCGGCTA
CGTATACTCCGGAATATTAATAGGCCTAGGATGCATATGGCGGCCGCCTG
CAGCTGGCGCCATCGATACGCGTACGTCGCGACCGCGGACATGTACAGAG
CTCGAGAAGTACTAGTGGCCACGTGGGCCGTGCACCTTAAGCTTAATTAG-3'

```

Abb. 43: Farbige Darstellung der Sequenzen im Vektorkonstrukt *pQE-70bh-STR-RBS-SG* mit hervorgehobenen Restriktionsschnittstellen

Grau: *pQE-70*-Sequenz, **Rot:** RBS, **Violett:** STR-cDNA, **Orange:** SG-cDNA

Schwarz: MCS, **Hellgrün:** *Sph* I, **Blau:** *Bam*H I, **Dunkelgrün:** *Kpn* I, **Hellrot:** *Hind* III

Weiß: *Pst* I, *Mlu* I und *Sac* II zur Klonierung weiterer cDNAs

Der bei den Aktivitätstests verwendete Rohextrakt wurde mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung und anschließender Entsalzung über Sephadex G25 vorgereinigt und auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt. Dieser Wert stellte einen Kompromiss zwischen den unterschiedlichen pH-Optima der zu testenden Enzyme dar. Während das Optimum der Strictosidin-Synthase bei pH 7.0 lag (TREIMER *et al.*, 1979), wurde der höchste Substratumsatz der Strictosidin- β -D-Glucosidase bei einem pH-Wert von 5.0 – 5.2 festgestellt (GERASIMENKO *et al.*, 2002).

Zur besseren Beobachtung des entstandenen Endprodukts Cathenamin erfolgte die Detektion der entstandenen Substanzen in der HPLC bei einer Wellenlänge von 280 nm. Dies entsprach dem Absorptionsmaximum des Cathenamins, hatte allerdings zur Folge, dass Secologanin –mit einem Maximum bei 237 nm– bei dieser Einstellung nicht mehr detektiert werden konnte. Wie aus Abb. 28 (S. 91) hervorgeht, kam es bei den Inkubationen zu einem vollständigen Umsatz des Zwischenprodukts Strictosidin zu Cathenamin. Dies äußerte sich darin, dass ein entsprechender Strictosidin-Peak in den HPLC-Chromatogrammen der durchgeführten Inkubationen fehlte. Da nur die Edukte Tryptamin und Secologanin eingesetzt wurden, konnte man davon ausgehen, dass die Aktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase in dem vorliegenden System deutlich höher war, als die der Strictosidin-Synthase (69.8 nkat/mg). Dies wurde durch einen Vergleich der Einzelaktivitäten nach

heterologer Expression der beiden Enzyme in vorangegangenen Arbeiten bestätigt. ROESSNER *et al.* (1992) ermittelte eine Aktivität von 30 nkat/mg für die Strictosidin-Synthase in *E. coli*, wogegen KUTCHAN *et al.* (1994) eine Aktivität von 62 nkat/mg in Insektenzellkulturen detektierte. Die Aktivität der Strictosidin- β -D-Glucosidase-Aktivität wurde von GERASIMENKO *et al.* (2002) mit 347 nkat/mg in *E. coli* angegeben, konnte jedoch an dem hier bearbeiteten Coexpressions-System aufgrund der vorhergehenden Synthese von Strictosidin –aus Tryptamin und Secologanin– als Substrat der Glucosidase nicht bestimmt werden. Der deutliche Unterschied zwischen der STR- und der SG-Aktivität könnte bei weiteren Versuchen zu einer Optimierung des Coexpressions-Systems dahingehend ausgenutzt werden, dass der pH-Wert der Inkubationsansätze zugunsten der Strictosidin-Synthase verschoben wird. Dadurch käme es zu einer noch effektiveren Bildung des Endprodukts Cathenamin, da dessen Vorstufe Strictosidin schneller und in größerem Maße zur Verfügung stehen würde, als dies unter den angegebenen Bedingungen der Fall war. Die Entstehung der Substanzen, die im unteren R_f -Bereich der HPLC-Chromatogramme (Abb. 28, S. 91) zu sehen waren, wurden auf die Zwischenprodukte zurückgeführt, die im Laufe der Strictosidin-Synthese auftraten (Abb. 42, S. 123). Die kleineren Peaks im mittleren Bereich der Chromatogramme wurden von Substanzen gebildet, die während der Cathenamin-Synthese auftraten (Abb. 45, S. 129).

Während der Versuche zur Identifizierung dieser Zwischenprodukte kam es zur Isolierung einer Substanz mit der Massenzahl m/z 352. Nach Vergleich des erhaltenen EI-Massenspektrums mit bereits vorhandenen Referenzspektren und Literaturangaben konnte diese unbekannte Verbindung als reduziertes Vallesiachotamin identifiziert werden. Wie in der nachfolgenden Abb. 44 dargestellt ist, entsteht Vallesiachotamin während der Cathenamin-Biosynthese aus einer Vorstufe durch Abspaltung der Glucose im Strictosidin-Molekül. Diese Reaktion wird sowohl von der Strictosidin- β -D-Glucosidase, als auch von unspezifischen Glucosidasen katalysiert, welche Bestandteile des natürlichen Enzymspektrums von *E. coli*-Bakterien darstellen (KUTCHAN, 1993).

Aufgrund der recht hohen Reaktivität von Cathenamin als Hauptprodukt der Enzyminkubationen wurde zunächst eine Reduktion der Reaktionsprodukte mittels Natrium-Borhydrid durchgeführt. Dabei wurde das verhältnismäßig instabile Cathenamin in das beständigere Reduktionsprodukt Tetrahydroalstonin umgewandelt (Abb. 30, S. 94). Erst nachdem dessen Identität durch DC-, HPLC- und

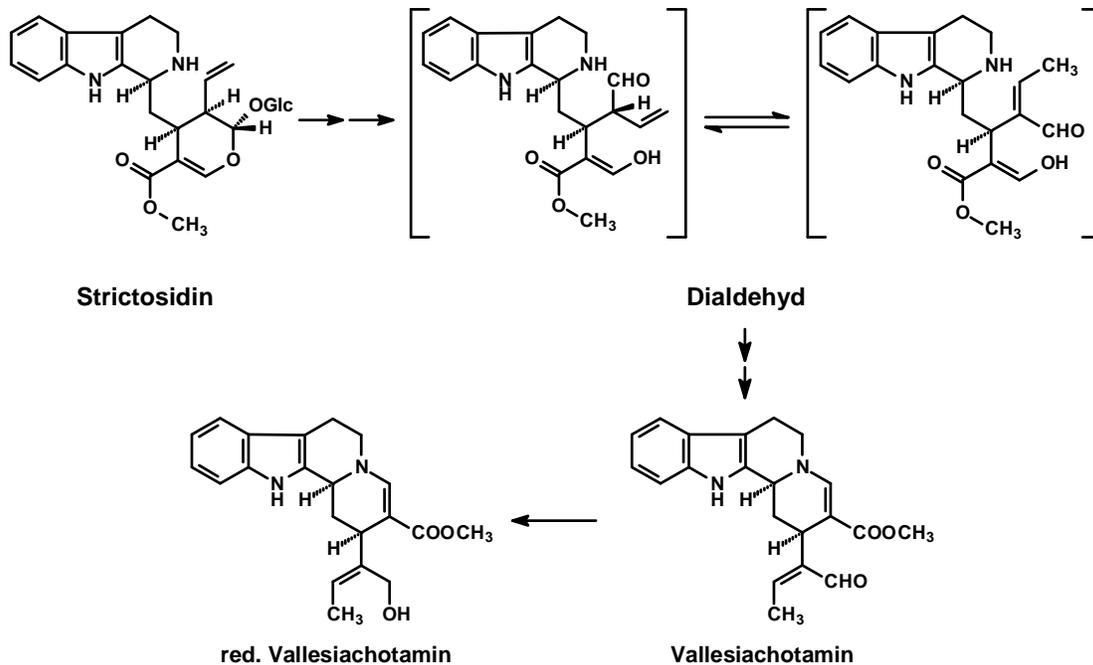


Abb. 44: Bildung von Vallesiachotamin/red. Vallesiachotamin aus Strictosidin

EI-MS-Analysen bestimmt war, wurde mit dem Nachweis des eigentlichen Hauptprodukts begonnen. Im Gegensatz zur Bestimmung von Tetrahydroalstonin und dessen Nebenprodukten, kam hierfür ein per fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung und anschließender Entsalzung (Sephadex G25) vorgereinigter Enzymextrakt zur Anwendung. Dies war für den Ausschluss störender Substanzen nötig, die die Detektion von Cathenamin aufgrund ihrer Absorptionsmaxima und ihres Laufverhaltens in den verwendeten HPLC- und DC-Trennsystemen beeinträchtigen konnten. Der pH-Wert zur Extraktion der enthaltenen Alkaloide wurde auf 8.0 eingestellt –anstelle von pH 9 – 10 wie bei Tetrahydroalstonin–, damit eine Bildung von Cathenamin alleine aufgrund des höheren pH-Werts während der Extraktion ausgeschlossen werden konnte. Das EI-MS-Spektrum der extrahierten Substanz zeigte die Cathenamin-typischen Fragmente mit den Massenzahlen 352, 249 und 169, was einen eindeutigen Beweis für die Bildung von Cathenamin darstellte.

Damit war die Funktionalität des konstruierten Coexpressions-Systems aus Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase im Vektorkonstrukt *pQE-70bh-STR-RBS-SG* sowie deren heterologe Expression in homologen *E. coli*-Kulturen nachgewiesen.

2 Proteinreinigung

Zur Erweiterung des im vorangegangenen Kapitel erläuterten Coexpressions-Systems aus Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation die Proteinreinigung der Cathenamin-Reduktase mit dem Ziel entwickelt, die dazugehörige Aminosäuresequenz zu erhalten. Die daraus abzuleitende Nukleotidsequenz, die für das gesuchte Enzym codierte, wäre für den Einbau in das vorbereitete Expressions-System geeignet gewesen. Dadurch sollte die Biosynthese des Naturstoffs Raubasin in einer homologen Bakterienkultur durch heterologe Expression der beteiligten Enzyme ermöglicht werden.

Wie bereits von STÖCKIGT *et al.* 1976 beschrieben, wandelte das gesuchte Enzym, das hauptsächlich in *Catharanthus*-Zelllinien vorkam, unter Zusatz des Cofaktors NADPH das Heteroyohimbin-Alkaloid Cathenamin in Raubasin um. Zusätzlich wurden die Nebenprodukte Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin identifiziert (STÖCKIGT *et al.* 1980). Die Bildung von 19-Epi-Raubasin wurde im gleichen Jahr ebenfalls von STÖCKIGT *et al.* beschrieben. Demnach stellten Geissoschizin und 4,21-Dehydrogeissoschizin die wichtigsten Vorstufen des 19-Epi-Raubasins dar, das über die Zwischenstufe des 19-Epi-Cathenamins gebildet wurde.

Der gesamte Biosyntheseweg der drei Alkaloide, ausgehend von Tryptamin und Secologanin, ist in der nachfolgenden Abb. 45 (S. 129) veranschaulicht. Das Schema wurde 1980 von ZENK veröffentlicht und fasst die beschriebenen Reaktionen zusammen. Aus der Übersicht geht klar hervor, dass die Bildung des 19-Epi-Raubasins über einen anderen Weg abläuft als die der beiden anderen Hauptprodukte. Die Bildung des 19-Epi-Raubasins wird demnach erst durch die Anwesenheit des entsprechenden Cathenamin-Epimers sowie dessen Iminium-Form in Anwesenheit von NADPH als Reduktionsmittel ermöglicht.

Cathenamin liefert dementsprechend zusammen mit seiner Iminium-Form die Vorstufe zu Raubasin und Tetrahydroalstonin. 4,21-Dehydrogeissoschizin nimmt somit eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von allen drei Produkten ein, kann aber selbst ebenfalls unter Zusatz von NADPH in einer reversiblen Reaktion zu Geissoschizin umgewandelt werden (PFITZNER *et al.*, 1982).

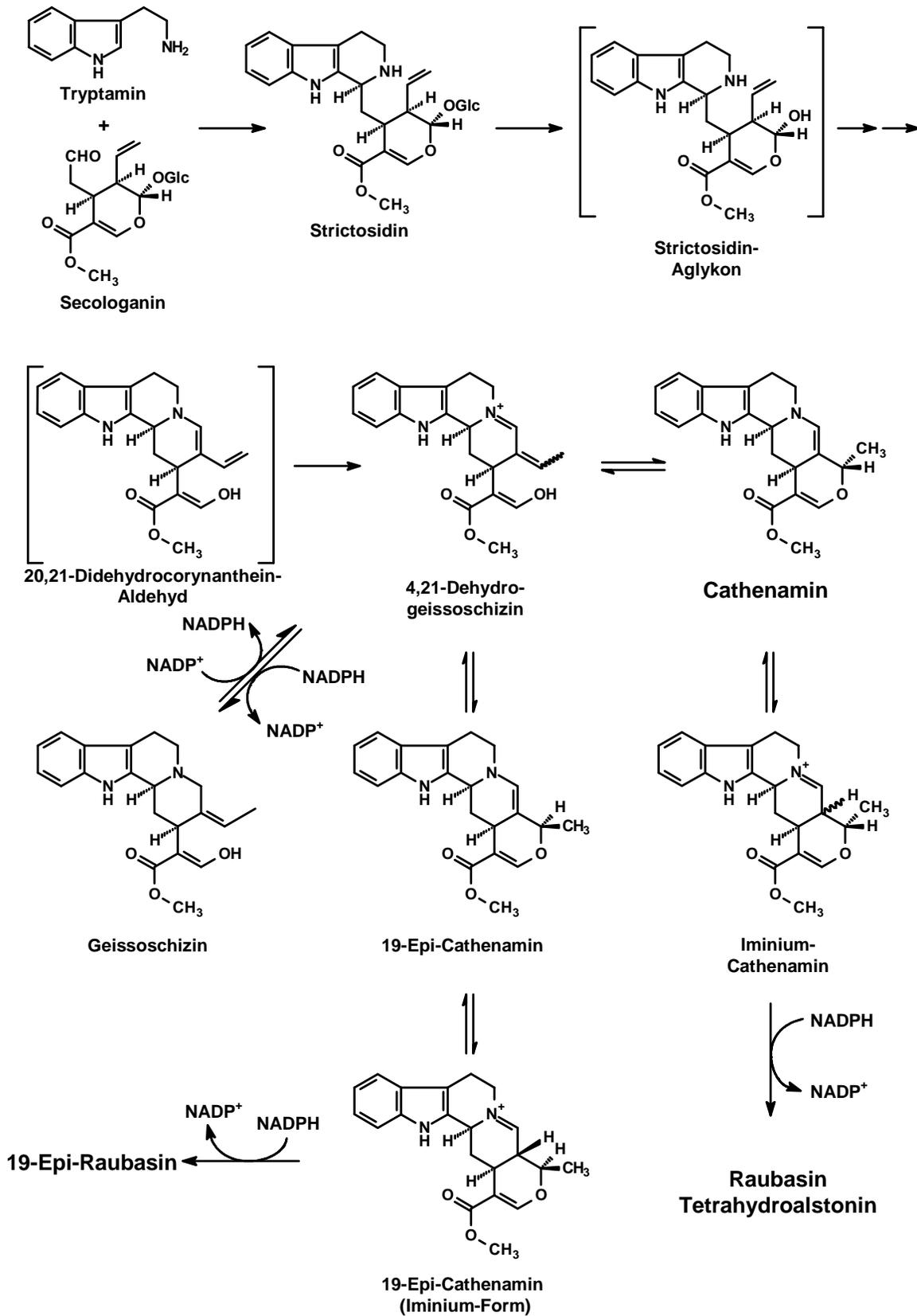


Abb. 45: Biosynthese von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin mit den wichtigsten Zwischenprodukten (nach ZENK, 1980)

Demnach sind theoretisch zwei NADPH-abhängige Enzyme für die Bildung von Tetrahydroalstonin/Raubasin und 19-Epi-Raubasin verantwortlich, deren molekulare Struktur bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Des weiteren können theoretisch nur Geissoschizin und Dehydrogeissoschizin als NADPH-abhängige Nebenprodukte auftreten.

Wie in Abb. 46 gezeigt ist, lassen sich die beiden Nebenprodukte Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin nur anhand der räumlichen Anordnung des Wasserstoffs und der Methylgruppe an den C-Atomen 19 und 20 vom Hauptprodukt Raubasin unterscheiden.

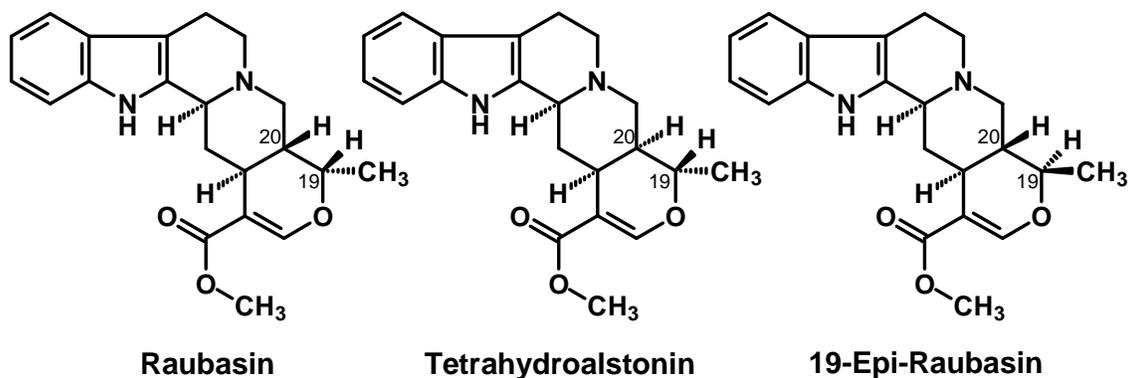


Abb. 46: Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin als mögliche Produkte der enzymatischen Umsetzung von Cathenamin durch Zugabe von NADPH

Trotz der minimalen Strukturunterschiede –und den damit verbundenen geringen physikochemischen Differenzen der drei genannten Verbindungen– gelang es, ein HPLC-System zu entwickeln, das die Trennung von Raubasin und Tetrahydroalstonin an einer Reversed-Phase-Säule (RP-18) erlaubte. Mit diesem Trennprogramm (Programm 3, Kapitel III.2.2), das auf der Grundlage eines Puffersystems von v. SCHUMANN weiterentwickelt wurde, war allerdings keine Trennung der Epimeren Raubasin und 19-Epi-Raubasin möglich. Da es sich, wie erwähnt, bei dem Letztgenannten um kein in *Catharanthus* natürlich vorkommendes Alkaloid handelte, war die erzielte Trennleistung des Systems für die zu bearbeitende Proteinreinigung und die hierfür erforderliche Verfolgung der Aktivitätsverläufe ausreichend.

Für die effektive Entwicklung eines Reinigungsprotokolls ist die Kenntnis der einzelnen Reaktionsschritte und der daraus resultierenden Zwischen- und Hauptprodukte im Laufe der Raubasin-Biosynthese erforderlich.

2.1 Reinigungsprotokoll für die Cathenamin-Reduktase

Auf der Grundlage der vorangegangenen Dissertation von HEMSCHIEDT (1983) sollte ferner die Frage nach der Anzahl der an der Reaktion beteiligten Enzyme geklärt werden. HEMSCHIEDT *et al.* (1985) äußerte die Vermutung, dass es sich um zwei verschiedene Enzyme handelte, die zur Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin führten, was in Einklang mit dem in Abb. 45 (S. 129) dargestellten Biosyntheseweg steht. Eine Trennung der beiden Enzyme voneinander gelang ihm jedoch nicht. Das o.g. HPLC-System sollte die getrennte Beobachtung der Enzymaktivitäten zur Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin erlauben, um schon zu Beginn der geplanten Reinigung Aufschluss über die Anzahl der involvierten Proteine und deren Aktivitätsprofile zu geben.

Bei der Testung der Zellsuspensionskulturen unterschiedlicher Pflanzenzelllinien, die alle aus der Familie der Apocynaceae stammten, wurde die höchste Enzymaktivität in *Catharanthus roseus*-Arten detektiert. Da Raubasin zusammen mit Serpentin den Hauptinhaltsstoff dieser Pflanzengattung darstellte, war dies ein erwartetes Ergebnis. STÖCKIGT beschrieb 1995 einen geringen Raubasin-Gehalt in *Rauvolfia*-Arten, was sich mit den detektierten Enzymaktivitäten deckte. Die getesteten Hybrid-Zellen, die aus einer Verschmelzung der Zellkerne von *Rauvolfia serpentina* mit *Rhazya stricta* hervorgingen, hatten ihr Enzympotential bereits in vorangegangenen Arbeiten unter Beweis gestellt (GERASIMENKO *et al.*, 2004), wurden aber hier aufgrund ihres komplexeren Enzymspektrums und einer geringeren Cathenamin-Reduktase-Aktivität gegenüber *Catharanthus roseus* RC nicht für die Proteinreinigung verwendet. Der erhöhte Enzymgehalt dieser Hybridzellen ist auf den diploiden Chromosomensatz zurückzuführen, der durch die Verschmelzung der Zellkerne von *Rauvolfia*- und *Rhazya*-Zellen entstanden ist.

Bei der Durchführung des ersten säulenchromatographischen Reinigungsschritts an DEAE-Sepharose – FF gelang zwar die Beobachtung unterschiedlicher Aktivitätsmaxima bezüglich der Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin, jedoch war in keiner der gesammelten Fraktionen eine alleinige Bildung eines der beiden Alkaloide detektierbar. Das erhaltene Aktivitätsmaximum für die Bildung von Tetrahydroalstonin, das in einem weiten Bereich hinter dem des Raubasin-bildenden Enzyms zu finden war, ist im Elutionsprofil der Säule (Abb. 35, S. 105) nicht dargestellt, da das primäre Zielprotein der Reinigung die Raubasin-Synthase

darstellte. Für die Konditionierung der Fraktionen, die für den nächsten Reinigungsschritt verwendet werden sollten, wurde auf das Verfahren der Dialyse zurückgegriffen. Obwohl diese Art der Umpufferung vergleichsweise zeitaufwendig ist, wurde dem Verfahren der Vorzug vor der Größenausschluss-Chromatographie an Sephadex G25 Superfine gegeben. Hierbei kam es verfahrensbedingt zu relativ großen Verdünnungseffekten, verbunden mit einem beachtlichen Verlust an Enzymmasse. Da die gesuchte Raubasin-Synthase in einer deutlich niedrigeren Konzentration vorlag als die entsprechende Tetrahydroalstonin-bildende Reduktase, sollte der Verlust des Zielenzym bei jedem Reinigungsschritt so gering wie möglich gehalten werden.

Im Gegensatz zur DEAE-Säule ließ sich bei der Trennung an Hydroxyapatit und MonoQ keine getrennte Aktivität zur Bildung von Raubasin und Tetrahydroalstonin beobachten. Bei den HPLC-Analysen der durchgeführten Inkubationen traten stets die in Kapitel IV.2.3 erwähnten Doppelpeaks aus Raubasin und Tetrahydroalstonin auf.

In weiteren Reinigungsversuchen sollte die Isolierung der Einzelaktivitäten für die Bildung der beiden Hauptprodukte Raubasin und Tetrahydroalstonin ermöglicht werden. Wie bereits erwähnt, war mit der Anwendung des starken Anionenaustauschers Source 30Q keine Verbesserung der Trennleistung zu erreichen. Auch mit diesem Material war zwar eine getrennte Beobachtung der Aktivitäten möglich, allerdings war das erzielte Ergebnis einer kompletten Reinigung bezüglich der Enzymausbeute und der Abtrennung störender Enzyme nicht zufriedenstellend.

Die Reinigungseffizienz an den Affinitätsmaterialien 2',5'-ADP-Sepharose 4B und HiTrap Blue HP verlief ebenfalls nicht erwartungsgemäß. Da bei beiden Matrices aufgrund ihrer Struktur eine spezifische Bindung von NADPH-abhängigen Enzymen die Grundlage des Reinigungsprinzips darstellte, konnte keine ausreichende Bindung der Proteine erzielt werden. Dies ist umso erstaunlicher, da es sich bei der gesuchten Catheramin-Reduktase definitiv um ein NADPH-abhängiges Enzym handelte (s.o.). Die Ursache für dessen unerwartetes Verhalten könnte in seiner Tertiärstruktur liegen, die eine Bindung an die Liganden der Säulenmatrix –welche nicht über Spacer-Gruppen verfügt– aus räumlicher Sicht behindern könnte. Zur Umgehung dieses Problems wurde ein Säulenmaterial angefertigt, an dessen Oberfläche Raubasin als Ligand gebunden wurde (Kapitel III.1.4.4.3). Unter der Annahme, dass

das gesuchte Protein von einem Liganden, der sein eigenes enzymatisches Produkt darstellte, zurückgehalten würde, kam es zunächst zur chemischen Herstellung von Raubasinsäure, die im weiteren Verlauf an die EAH-Sepharose 4B-Matrix gekoppelt wurde. Das hierfür angewendete Verfahren (Kapitel III.1.4.4.3) in Zusammenhang mit dem entstandenen Produkt war für eine eindeutige Quantifizierung der Liganden an der Matrixoberfläche jedoch nicht geeignet. Hier wäre nur die Möglichkeit eines destruktiven Verfahrens gegeben gewesen, was in Anbetracht der kleinen Matrixmengen nicht möglich war. Auch bei diesem Trennverfahren gelang eine Adhäsion von Enzymen aus der Proteinlösung, jedoch führte die Bindekapazität des Säulenmaterials zu einer unzureichenden Anlagerung des Zielproteins. Zur Erhöhung der Bindekapazität könnte die Matrixmenge erhöht werden, jedoch würde dies zu einer Vergrößerung des Verdünnungseffekts der Proteine führen. Dies würde wiederum zu einer schlechteren Trennleistung führen. Ein im Anschluss durchgeführtes SDS-Gel zeigte, dass alle Enzyme, die von der Säule eluiert werden konnten, denselben Aktivitätsverlauf aufwiesen. Eine sichere Identifizierung der Cathenamin-Reduktase war somit nicht möglich.

Da das hydrophobe Material Source 15Phe eine bewährte und besonders effektive Trennmethode darstellte (v. SCHUMAN *et al.* 2002; GERASIMENKO *et al.* 2004), sollte es auch hier zum Reinigungserfolg beitragen. Dabei galt es, das Verfahren unter Verwendung eines anderen geeigneten Fällungsmittels als Ammoniumsulfat aus den folgend erläuterten Gründen zu optimieren. Bereits bei zuvor durchgeführten Tests konnte nach Zugabe von Ammoniumsulfat zu den Inkubationen des Rohextrakts kein Umsatz festgestellt werden. Die Ursache hierfür liegt in der Instabilität des eingesetzten Cathenamins, das in einem Gleichgewicht mit der ringoffenen Form steht. Diese reagiert bei Zugabe von Ammoniumsulfat und unter Anwesenheit von NADPH zum 22-N-Analogon des Tetrahydroalstonins (HUSSON *et al.* 1977; HEINSTEIN *et al.* 1979). Es kommt demnach zum Austausch des Sauerstoffs im Ring E des Cathenamins gegen NH, wodurch die enzymatische Reaktion der Cathenamin-Reduktase verhindert wird. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 47 auf der nachfolgenden Seite veranschaulicht.

Durch den Austausch des Ammoniumsulfats gegen Kaliumsulfat wurde jedoch keine zufriedenstellende Trennung erreicht. Zwar war eine Bindung der Cathenamin-Reduktase an die Säulenmatrix zu beobachten, die Menge des ungebundenen Enzymanteils konnte allerdings trotz intensiver Versuche nicht verringert werden.

Dadurch war eine zu geringe Ausbeute des Zielproteins in Relation zur eingesetzten Zellmasse zu verzeichnen (Kapitel IV.2.8).

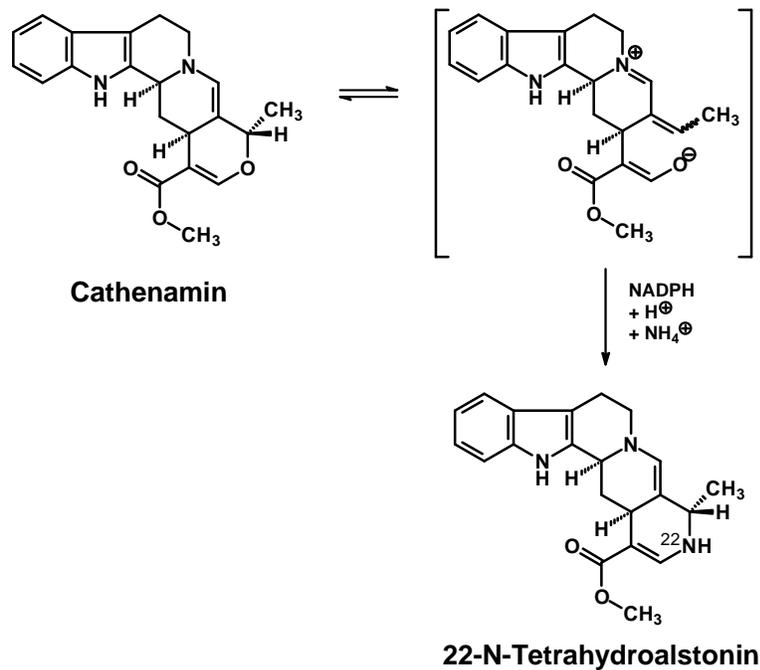


Abb. 47: Bildung von 22-N-Tetrahydroalstonin aus Catheramin nach Zugabe von Ammoniumsulfat und NADPH

2.2 Charakterisierung der isolierten Catheramin-Reduktase

Die Bestimmung des Molekulargewichts der erhaltenen Catheramin-Reduktase erfolgte unter Anwendung der Größenausschluss-Chromatographie an Sephacryl S-100 HR (Kapitel IV.2.5). Das erhaltene Ergebnis von 64.6 kDa konnte mit einer methodenbedingten Abweichung von $\pm 5\%$ bestimmt werden. Dieses Ergebnis stellt einen beachtlichen Unterschied zur Größenbestimmung durch HEMSCHIEDT *et al.* (1985) dar, der ein Molekulargewicht von 81 kDa detektierte. Die Differenz von 64.6 kDa zu den in Abb. 38 (S. 109) gezeigten Banden im SDS-Gel mit 36 und 46 kDa, die anhand ihres Aktivitätsverlaufs als einzige für das gesuchte Enzym in Frage kamen, war durch die Probenvorbereitung zur SDS-Gelelektrophorese zu erklären. Dabei wurden die zu trennenden Proteinfractionen in einem SDS- und MSH-haltigen Puffer aufgeköcht (Kapitel III.1.5.1), wobei es zur Aufspaltung der zu untersuchenden Enzyme kommt. Eine anschließende Teilsequenzierung nach dem in Kapitel IV.2.4 geschilderten Verfahren war dadurch jedoch nicht behindert, da sie

nur kurze Sequenzbruchstücke lieferte, deren exakte Lokalisation innerhalb des zu bestimmenden Proteins nicht vorauszusagen war.

Erste Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass es sich bei der Bande mit einer Größe von 36 kDa (Abb. 38, S. 109) nicht um die gesuchte Reduktase, sondern um eine Aldolase handelte. Damit konnte nur noch die Bande mit einer Größe von 46 kDa der gesuchten Cathenamin-Reduktase zugeordnet werden. Dies wurde dadurch bekräftigt, dass aufgrund der angewendeten Silberfärbung (Kapitel IV.1.5.2.2) und der damit verbundenen hohen Empfindlichkeit, die Anwesenheit weiterer Proteinbanden auf dem SDS-Gel ausgeschlossen werden konnte. Der Grund für den Einsatz der Silberfärbung lag in der niedrigen Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen, die in der eingesetzten Menge mit dem sonst üblichen Verfahren der Coomassie-Färbung, die für eine reibungslose Sequenzierungsreaktion erforderlich war, nicht erfasst worden wären. Zusätzlich erlaubte das Verfahren der Silberfärbung eine viel detailliertere Betrachtung der aufgetrennten Banden, da diese wesentlich schärfer in Erscheinung traten als Coomassie-gefärbte Banden. Die aufgetragene Proteinmenge wurde so gering wie möglich gehalten, um für die späteren Sequenzierungsversuche genügend Material zur Verfügung stellen zu können. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurden die aktiven Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von jeweils 800 μ l zunächst einzeln gegen 10 l dest. Wasser mit einem pH-Wert von 6.5 dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Somit war die Möglichkeit gegeben, durch Resuspendierung im geeigneten Puffer die zur Sequenzierung benötigten Konzentrationen herzustellen, und die im durchgeführten SDS-Gel enthaltenen Banden mit Coomassie in der benötigten Intensität zu entwickeln oder zur Bestimmung des N-Terminus auf PVDF-Membranen zu blotten.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zur Co-Substratspezifität bezüglich NADPH und NADH kam es zur Bildung eines unbekanntes Nebenprodukts, das nur bei Zusatz von NADPH im unteren R_f -Bereich der HPLC-Analyse auftrat (Abb. 40, S. 113). Während der Versuche zur Identifizierung dieses Produkts gelang es, den HPLC-Peak konkret einem Substanzfleck mit einem R_f -Wert von 0.53 auf der Platte einer zuvor durchgeführten dünnschichtchromatographischen Trennung (FM 1, Kapitel III.2.1) zuzuordnen. Die Retentionszeit sowie der R_f -Wert lagen im Bereich von denen des Geissoschizins, die in einer parallel durchgeführten

Referenzmessung ermittelt werden konnten. Die unbekannte Verbindung führte im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm zu einer Fluoreszenzlöschung und zeigte nach Besprühen mit Ammonium-Cer-(IV)-sulfat-Lösung eine bräunliche Farbe, was ein konkreter Hinweis auf ein Indolalkaloid darstellte. Die Analyse des ausgekratzten Substanzflecks mittels EI-MS bestätigte dies. Eine konkrete Identifizierung der Verbindung durch Vergleiche des erhaltenen Fragmentierungsmusters mit aufgenommenen Referenzspektren und Literaturangaben konnte jedoch aufgrund von enthaltenen Verunreinigungen nicht eindeutig erfolgen. Bei Betrachtung des Reaktionsablaufs während der Biosynthese von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin in Abb. 45 (S. 129) kamen jedoch nur Geissoschizin und 4,21-Dehydrogeissoschizin für die Rolle des unbekanntes Nebenprodukts in Frage. Zum einen handelt es sich bei der Bildung von Geissoschizin um die einzige Reaktion, die –abgesehen von den drei Hauptprodukten– Cofaktor-abhängig verläuft, zum anderen besitzen diese beiden Substanzen eine größere Hydrophilie, die für die kürzere Retentionszeit bei der HPLC-Analyse und die niedrigeren R_f -Werte bei der DC-Analyse verantwortlich gewesen sein dürften.

Die Durchführung der Nachweisreaktion für die entstandenen Hauptprodukte verlief analog zur Bestimmung des unbekanntes Nebenprodukts. Die Identifizierung von Raubasin wurde durch seine niedrige Konzentration auf der DC-Platte und der damit verbundenen kleinen Substanzmenge bei der anschließenden EI-MS-Analyse erschwert. Das erhaltene Massenspektrum war somit für eine zuverlässige Identifizierung nur bedingt geeignet. Eine Abtrennung gegenüber Tetrahydroalstonin, das in dem Substanzfleck mit dem höheren R_f -Wert enthalten war (Kapitel IV.2.7.2), hätte nur anhand der Intensitäten der beiden Fragmente m/z 169 und 184 erfolgen können. Bei Tetrahydroalstonin ist deren Verhältnis zugunsten des kleineren Fragments verschoben, wogegen bei Raubasin das Fragment mit der Massenzahl 184 überwiegt.

3 Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation präsentierten Arbeiten zur heterologen Coexpression mehrerer Enzyme durch Einführen einzelner cDNAs in *E. coli* stellt den ersten Versuch dar, einen abgeschlossenen Alkaloid-Biosyntheseweg *in vitro* nachzustellen. Dabei katalysieren die beiden exprimierten Enzyme Strictosidin-Synthase und Strictosidin- β -D-Glucosidase die ersten Reaktionsschritte der Raubasin- sowie der Ajmalin-Biosynthese, welche bereits zum größten Teil sowohl auf der Proteinebene, als auch auf molekularer Ebene aufgeklärt sind.

Im Falle des vorgestellten Coexpressions-Systems, das hier nur geringfügig optimiert werden konnte, würde eine Überarbeitung im Hinblick auf die Ausbeute der gebildeten Proteine den ersten weiteren Entwicklungsschritt darstellen. Hierbei wäre besonderes Augenmerk auf die zugesetzte Menge von IPTG als Induktor der Expressionsreaktion zu legen. Ebenfalls eine Möglichkeit zur Entwicklung wäre in der Optimierung des pH-Wertes der Inkubationsreaktionen zu sehen, der einerseits zu einer gesteigerten Produktion des Strictosidins als erstem Intermediat der Biosynthese führt, gleichzeitig aber die Gesamtmenge an gebildetem Cathenamin als vorläufigem Endprodukt nicht verringert. In diesem Zusammenhang müssen die Inkubationsbedingungen so gewählt werden, dass eine übermäßige Bildung von unerwünschten Nebenprodukten vermieden wird.

Eine weitere Optimierung der Ausbeuten wäre durch einen Wechsel zu einem Expressions-Organismus möglich, der nicht oder nur in geringem Mass über unspezifische Glucosidasen oder auch Esterasen verfügt. Die Bildung dieser Enzyme, die zu einem Abbau der gewünschten Naturstoffe führen können, ist in solchen Wirtssystemen unterdrückt. Hierbei kämen sowohl spezielle *E. coli*-Stämme oder auch Hefen in Frage.

Für die Einführung weiterer cDNAs in das bestehende System ist zu beachten, dass dies unter Berücksichtigung vorhandener Restriktionsschnittstellen –entweder als Einzelgene oder als ‚Genkassetten‘ mit mehreren codierenden Abschnitten– abläuft. Dabei sollte die Bindungsfähigkeit der beteiligten Ribosomen an den involvierten mRNA-Sequenzen nicht vernachlässigt werden.

Die Proteinreinigung der Cathenamin-Reduktase aus *Catharanthus roseus* RC mit dem Ziel der teilweisen Sequenzierung der Aminosäureabfolge wurde in nahezu allen Bereichen der zur Verfügung stehenden Reinigungsmethoden ausgetestet. Zur genauen Ermittlung der Aminosäure-Teilsequenz der in Abb. 38 (S. 109) dargestellten Proteinbande mit einer Größe von 46 kDa, käme das Verfahren der N-terminalen Sequenzierung in Frage. Für weiterführende Arbeiten bezüglich der Ermittlung des Vollängenklons der Cathenamin-Reduktase wäre eine PCR-Primerentwicklung auf der Grundlage des zuvor ermittelten N-Terminus erforderlich. Die Entwicklung des benötigten zweiten (oder dritten) Primers müsste dann auf konservierten Sequenzbereichen verwandter Reduktasen aufgebaut werden, die für NADPH-Bindestellen codieren. Eine weitere Möglichkeit zum Design geeigneter Primer ist in einer intensiven Datenbankrecherche zum Auffinden homologer Bereiche innerhalb anderer pflanzlicher Reduktasen zu sehen.

Im Falle einer aktiven Expression des so erhaltenen Enzyms stünde einer Klonierung der entsprechenden cDNA in das vorgestellte Coexpressions-System *pQE-70bh-STR-RBS-SG* nichts im Wege. Damit wäre die erste *in vitro*-Biosynthese des Heteroyohimbin-Alkaloids Raubasin durch Ausnutzung geeigneter Expressions-Systeme in *E. coli* ermöglicht.

VI Zusammenfassung

Die vorgestellten Arbeiten bezüglich der Biosynthese von pflanzlichen Indolalkaloiden können in einen molekularbiologischen und einen proteinchemischen Teil aufgegliedert werden.

Im molekularbiologischen Abschnitt stand die Entwicklung eines Vektorsystems im Vordergrund, das die gleichzeitige Expression mehrerer Enzyme in bakteriellen Kulturen erlaubte. Hierfür konnte zunächst die cDNA der Strictosidin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina* in den Expressionsvektor *pQE-70* einkloniert und das Protein aktiv exprimiert werden. Bevor es zum Einbau des Strictosidin- β -D-Glucosidase-Gens –ebenfalls aus *Rauvolfia serpentina*– kam, musste dessen Aktivität mit einer vorgeschalteten Ribosomenbindestelle sichergestellt werden. Diese zusätzliche Binderegion wurde an das 5'-Ende der cDNA angefügt, um die ungestörte Expression des Enzyms im späteren Coexpressions-System zu gewährleisten. Im Hinblick auf weiterführende Arbeiten in Bezug auf die komplette *in vitro*-Synthese bereits bekannter Alkaloide, wie z.B. das antiarrhythmisch wirkende Ajmalin oder das antihypertensiv wirkende Heteroyohimbin-Alkaloid Raubasin, wurde die ursprüngliche multiple-clonig-site des verwendeten Expressionsvektors *pQE-70* um 27 zusätzliche Restriktionsschnittstellen (verteilt auf 253 bp) erweitert. Nach erfolgreicher Ligation der Strictosidin- β -D-Glucosidase-cDNA mit vorgeschalteter Ribosomenbindestelle an das 3'-Ende des Strictosidin-Synthase-Gens gelang die heterologe Coexpression beider Enzyme in einer homogenen Suspensionskultur des *E. coli*-Expressionsstamms M15. Dafür wurde das in Abb. 48 schematisch dargestellte Vektorkonstrukt *pQE-70bh-STR-RBS-SG* entwickelt.

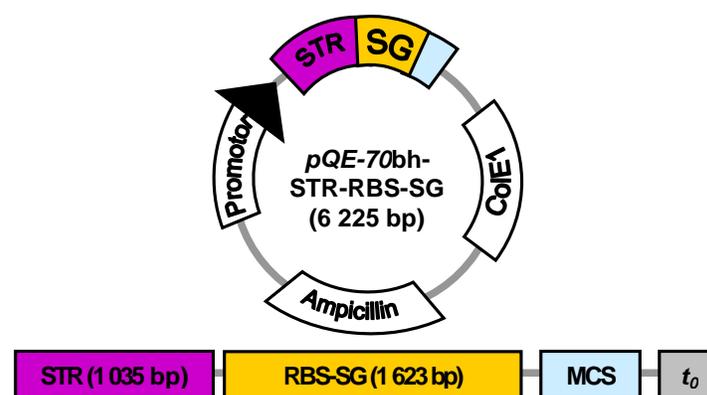


Abb. 48: Schematische Darstellung des Coexpressions-Vektors *pQE-70bh-STR-RBS-SG*

STR: Strictosidin-Synthase, RBS-SG: Strictosidin- β -D-Glucosidase mit Ribosomenbindestelle

Das Endprodukt der anschließenden enzymatischen Umsetzung von Tryptamin und Secologanin nach der in Abb. 49 aufgeführten Reaktion konnte als Cathenamin identifiziert werden.

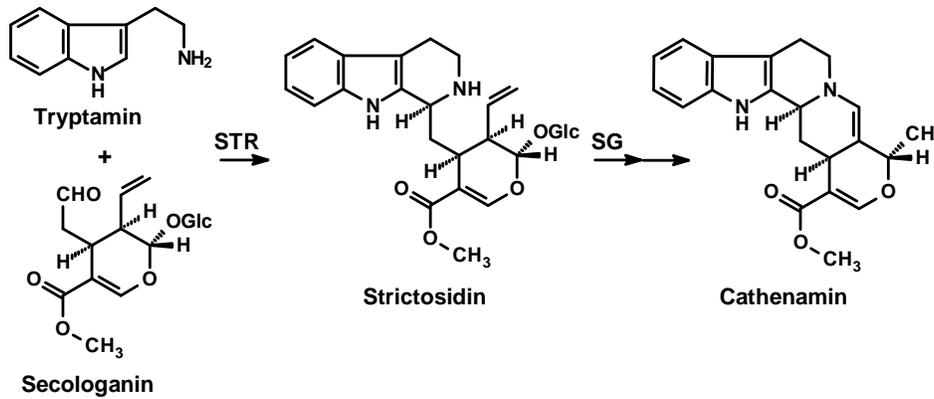


Abb. 49: Enzymatische Bildung von Cathenamin aus Tryptamin und Secologanin

STR: Strictosidin-Synthase, SG: Strictosidin-β-D-Gluosidase

Im proteinchemischen Teil der Dissertation wurde die Reinigung einer Cathenamin-Reduktase aus *Catharanthus roseus* RC mit dem Ziel der partiellen Bestimmung der Aminosäuresequenz bearbeitet. Das gesuchte Enzym wandelte in einer NADPH-abhängigen Reaktion das Edukt Cathenamin in Raubasin gemäß Abb. 50 um.

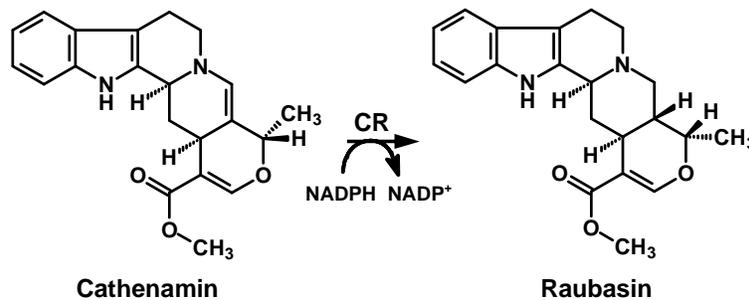


Abb. 50: Enzymatische Reduktion von Cathenamin zu Raubasin in Anwesenheit von NADPH

Des weiteren wurde untersucht, wie viele Enzyme insgesamt an der Umwandlung von Cathenamin zu Raubasin und den eng verwandten Produkten Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin beteiligt waren. Unter Anwendung eines hierfür entwickelten säulenchromatographischen Protokolls gelang die Reinigung einer Raubasin-bildenden Reduktase, deren Teilsequenz jedoch noch nicht bestimmt werden konnte. Die Anzahl der beteiligten Enzyme bei der Ausbildung von Raubasin, Tetrahydroalstonin und 19-Epi-Raubasin konnte auf mindestens zwei beziffert werden.

VII Literaturverzeichnis

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol Biol.*, 1990; 215: 403 – 410

ARENS H, STÖCKIGT J, WEILER W, ZENK MH. Radioimmunoassays for the determination of the Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in Plants. *Planta Med.*, 1978; 34: 37 – 46

BENTUÉ-FERRER D, ALLAIN H. Clinical Efficacy of Almitrine-Raubasine. *Eur. Neurol.*, 1998; 39: 39 – 44

BEYER P, AL-BABILI S, YE X, LUCCA P, SCHNAUB P, WELSCH R, POTRYKUS I. Golden Rice: Introducing the β -Carotene Biosynthesis Pathway in Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. *J. Nutr.*, 2002; 132: 506S – 510S

BIONDI S, FORMALÉ S, OKSMAN-CALDENTY KM, EEVA M, AGOSTANI S, BAGNI N. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Reports*, 2000; 19: 691 – 697

BIRNBOIM HC, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1979; 7: 1513 – 1523

BOECKMANN B, BAIROCH A, APWEILER R, BLATTER MC, ESTREICHER A, GASTEIGER E, MARTIN MJ, MICHOD K, O'DONOVAN C, PHAN I, PILBOUT S, SCHNEIDER M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 365 – 370

BOUVIER F, DOGBO O, CAMARA B. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). *Science*, 2003; 300: 2089 – 2091

BRACHER D, KUTCHAN TM. Strictosidine Synthase from *Rauwolfia serpentina*: Analysis of a Gene Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992; 294: 717 – 723

BRADFORD MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248 – 254

BRODIE BB, SHORE PA, PLETSCHER A. Serotonin-Releasing Activity Limited to *Rauwolfia* Alkaloids with Tranquillizing Action. *Science*, 1956; 123: 992 – 998

BROSSI A. Antitumor Bisindole Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.). *The Alkaloids* (A. Brossi, ed.), Academic Press, 1990; 37

BURLAT V, OUDIN A, COURTOIS M, RIDEAU M, ST. PIERRE B. Co-expression of three MEP pathway genes and *geraniol 10-hydroxylase* in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *The Plant Journal*, 2004; 38: 131 – 141

CANEL C, LOPES-CARDOSO M, WHITMER S, VAN DER FITS L, PASQUALI G, VAN DER HEIJDEN R, HOGE JHC, VERPOORTE R. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 1998; 205: 414 – 419

CHEN S, VON BAMBERG D, HALE V, BREUER M, HARDT B, MÜLLER R, FLOSS HG, REYNOLDS KA, LEISTNER E. Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin. Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tü 1892. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 261: 98 – 107

CHEN X, LIU Z, ZHANG J, ZHANG W, KOWAL P, WANG PG. Reassembled Biosynthetic Pathway for Large-Scale Carbohydrate Synthesis: α -Gal Epitope Producing "Superbug". *Chem. Bio. Chem.*, 2002; 3: 47 – 53

DALGARNO L, SHINE J. Conserved Terminal Sequence in 18S rRNA May Represent Terminator Anticodons. *Nature New Biol.*, 1973; 245: 261- 262

DEUS-NEUMANN B, ZENK MH. Instability of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Planta Med.*, 1984; 50: 427 – 431

DONG J, PORTER TD. Coexpression of Mammalian Cytochrome P450 and Reductase in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996; 327: 254 – 259

EL-SAYED M, CHOI YH, FRÉDÉRICH M, ROYTRAKUL S, VERPOORTE R. Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with stemmadenine. *Biotechnol. Lett.*, 2004; 26: 793 – 798

FALKENHAGEN H, POLZ L, TAKAYAMA H, KITAJIMA M, SAKAI SI, AIMI N, STÖCKIGT J. Substrate Specificity of Vinorine Hydroxylase, a novel Membrane-bound Key Enzyme of *Rauwolfia* Indole Alkaloid Biosynthesis. *Heterocycles*, 1995; 41: 2683 – 2690

FAVALI MA, MUSETTI R, BENVENUTI S, BIANCHI A, PRESSACCO L. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma*, 2004; 223: 45 – 51

FAVRETTO D, PIOVAN A, FILIPPINI R, CANIATO R. Monitoring the production yields of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* from somatic embryogenesis. Semiquantitative determination by flow-injection electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001; 15: 364 – 369

FURUYA T, TAKAHASHI S, ISHII Y, KINO K, KIRIMURA K. Cloning of a gene encoding flavin reductase coupling with dibenzothiophene monooxygenase through coexpression screening using indigo production as selective indication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 570 – 575

GANAPATHI G, KARGI F. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). J. Exp. Bot., 1990; 41: 259 – 267

GEERLINGS A, HALLARD D, MARTINEZ-CABALLERO A, LOPES-CARDOSO I, VAN DER HEIJDEN R, VERPOORTE R. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports, 1999; 19: 191 – 196

GEERLINGS A, REDONDO FJ, CONTIN A, MEMELINK J, VAN DER HEIJDEN R, VERPOORTE R. Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001; 56: 420 – 424

GERASIMENKO I, MA X, SHELUDKO Y, MENTELE R, LOTTSPREICH F, STÖCKIGT J. Purification and partial amino acid sequences of the enzyme vinorine synthase involved in a crucial Stepp of ajmaline biosynthesis. Bioorg. Med. Chem., 2004; 12: 2781 – 2786

GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, MA X, STÖCKIGT J. Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. Eur. J. Biochem., 2002; 269: 2204 – 2213

GOEDEN-WOOD N, CONTICELLO VP, MULLER SJ, KEASLING JD. Improved Assembly of Multimeric Genes for the Biosynthetic Production of Protein Polymers. Biomacromol., 2002; 3: 874 – 879

GORMAN M, NEUSS N, SVOBODA GH, BARNES AJ JR, CONE NJ. A note on the alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*Catharanthus roseus* G. Don). II. Catharanthine, lochnericine, vindolinine and vindoline. J. Am. Pharm. Assoc. (Baltim.), 1959; 48: 256 – 257

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

HARTMANN T. Diversity and Variability of Plant Secondary Metabolism: a Mechanistic View. Entomol. Exp. Appl., 1996; 80: 177 – 188

HEFNER T, Arend J, Warzecha H, Siems K, Stöckigt J. Arbutin Synthase, a Novel Member of the NRD1 β Glycosyltransferase Family, is a Unique Multifunctional Enzyme Converting various Natural Products and Xenobiotics. Bioorg. Med. Chem., 2002; 10: 1731 – 1741

HEINSTEIN P, HÖFLE G, STÖCKIGT J. Involvement of Cathenamine in the Formation of N-Analogues of Indole Alkaloids. Planta Med., 1979; 37: 349 – 357

HEMSCHIEDT T, ZENK MH. Glucosidases Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of *Catharanthus* Cell Cultures. FEBS Lett., 1980; 110: 187 – 191

HEMSCHIEDT T, ZENK MH. Partial purification of a NADPH dependent tetrahydroalstonine synthase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 1985; 4: 216 – 219

HEMSCHIEDT T. Bildung und Umsetzung von Iminium-Cathenamin, katalysiert durch spezifische Enzyme, Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1983

HEUKESHOVEN J, DERNICK R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 1985; 6: 103 – 112

HOFMEISTER F. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie (Leipzig), 1888; 24: 247 – 260

HUANG Q, ROESSNER CA, CROTEAU R, SCOTT AI. Engineering *Escherichia coli* for the Synthesis of Taxadiene, a Key Intermediate in the Biosynthesis of Taxol. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001; 9: 2237 – 2242

HUGHES EH, HONG S, GIBSON SI, SHANKS JV, SAN K. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. *Metab. Eng.*, 2004; 6: 268 – 276

HUGHES EH, SHANKS JV. Metabolic Engineering of plants for alkaloid production. *Metab. Eng.*, 2002; 4: 41 – 48

HUSSON HP, KAN-FAN C, SÉVENET T, VIDAL JP. Structure de la Cathénamine Intermédiaire Clé de la Biosynthèse des Alkaloides Indoliques. *Tetrahedron Lett.*, 1977; 22: 1889 – 1892

JOHNSTON K, CLEMENTS A, VENKATARAMANI RN, TRIEVEL RC, MARMORSTEIN R. Coexpression of Proteins in Bacteria Using T7-Based Expression Plasmids: Expression of Heteromeric Cell-Cycle and Transcriptional Regulatory Complexes. *Prot. Expr. Purif.*, 2000; 20: 435 – 443

KRONEBERG G. Pharmakologie des *Rauwolfia*-Alkaloids Raubasin (delta-Yohimbin-Ajmalicin). *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 1958; 233: 72 – 97

KUTCHAN TM, DITTRICH H, BRACHER D, ZENK MH. Enzymology and Molecular Biology of Alkaloid Biosynthesis. *Tetrahedron*, 1991; 47: 5945 – 5954

KUTCHAN TM, HAMPP N, LOTTSPREICH F, BEYREUTHER K, ZENK MH. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 1988; 237: 40 – 44

KUTCHAN TM. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 1989; 257: 127 – 130

KUTCHAN TM. Strictosidine From Alkaloid To Enzyme To Gene. *Phytochemistry*, 1993; 32: 493 – 506

KUTCHAN, TM, BOCK A, DITTRICH H. Heterologous Expression of the Plant Proteins Strictosidine Synthase and Berberine Bridge Enzyme in Insect Cell Culture. *Phytochem.*, 1994; 35: 353 – 360

LI R, STAPON A, BLANCHFIELD JT, TOWNSEND CA. Three Unusual Reactions Mediate Carbapenem and Carbapenam Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000; 122: 9296 – 9297

LI S. Stroke and Functional Rehabilitation: The Chinese Experience. *Eur. Neurol.*, 1998; 93: 26 – 30

LI S., LONG J, MA Z, XU Z, LI J, ZHANG Z. Assessment of the therapeutic activity of a combination of almitrine and raubasine on functional rehabilitation following ischaemic stroke. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2004; 20: 409 – 415

LINSMAIER EM, SKOOG F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 1965; 18: 100 – 127

LUIJENDIJK TJC, STEVENS LH, VERPOORTE R. Purification and characterisation of strictosidine β -D-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, 1998; 36: 419 – 425

MA J, CAMPBELL A, KARLIN S. Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. *J. Biotechnol.*, 2002; 184: 5733 – 5745

MARTIN VJJ, PITERA DJ, WITHERS ST, NEWMAN JD, KEASLING JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.*, 2003; 21: 796 – 802

MERTENS R, GREINER L, VAN DEN BAN E, HAAKER H, LIESE A. Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2003; 24 – 25: 39 – 52

MEYERS TS, LAMBERTS BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965; 107: 144 – 145

MORENO-VALENZUELA OA, MINERO-GARCÍA Y, CHAN W, MAYER-GERALDO E, CARBAJAL E, LOYOLA-VARGAS VM. Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol. Lett.*, 2003; 25: 1345 – 1349

MULLIS KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin.*, 1990; 48: 579 – 582

NAMDEO A, PATIL S, FULZELE DP. Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Prog.*, 2002; 18: 159 – 162

NOBLE RL, BEER CT, CUTTS JH. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1958; 76: 882 – 894

NOBLE RL. The discovery of the vinca alkaloids – chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol.*, 1990; 68: 1344 – 1351

PEARSON WR, LIPMAN DJ. Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 2444 – 2448

PFITZNER A, STÖCKIGT J. Partial Purification and Charakterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 1982; 21: 1585 – 1588

RAVISHANKAR HL, VADALI V, BENNETT GN, SAN KY. Increasing the Acetyl-CoA Pool in the Presence of Overexpressed Phosphoenolpyruvate Carboxylase or Pyruvate Carboxylase Enhances Succinat Production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.*, 2004; 20: 1599 – 1604

RICHTERICH P. Non-radioactive chemical sequencing of biotin labelled DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1989; 17: 2181 – 2186

ROESSNER CA, DEVAGUPTA R, HASAN M, WILLIAMS HJ, SCOTT AI. Purification of an indole alkaloid biosynthetic enzyme, strictosidine synthase, from recombinant strain of *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 1992; 4: 295 – 300

RUSZKOWSKA J, CHROBAK R, MAURIN JK, CZARNOCKI Z. Vindoline and 16-de-methoxyvindoline: two catharanthus-derived alkaloids. *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 2004; 60: 377 – 380

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 1988; 239: 487 – 491

SAMBROOK J, RUSSEL DW. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual (Volume 1-3)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SATDIVE RK, FULZELE DP, EAPEN S. Studies on Production of Ajmalicine in Shake Flasks by Multiple Shoot Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Prog.*, 2003; 19: 1071 – 1075

SCHRIPSEMA J, DAGNINO D, DOS SANTOS R, VERPOORTE R. Breakdown of indole alkaloids in suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* and *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1994; 38: 301 – 307

SHAPIRO AL, VIÑUELA E, MAIZEL JV. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1967; 28: 815 – 820

SHINE J, DALGARNO L. 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementary to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1974; 71: 1342 – 1346

STANFORD JL, MARTIN EJ, BRINTON LA, HOOVER RN. *Rauwolfia* use and breast cancer: case control study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986; 76: 817 – 822

STEARNS WT. A synopsis of the genus *Catharanthus* (*Apocynaceae*). In: *The Catharanthus alkaloids* (W.I. Taylor, N.R. Farnsworth, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, 1975; 9 – 44

STÖCKIGT J, HÖFLE G, PFITZNER A. Mechanism of the biosynthetic conversion of geissoschizine to 19-epi-ajmalicine in *Catharanthus roseus*. *Tetrahedron Lett.*, 1980; 21: 1925 – 1926

STÖCKIGT J, RUEFFER M, ZENK MH, HOYER GA. Indirect Identification of 4,21-Dehydrocorynantheine Aldehyde as an Intermediate in the Biosynthesis of Ajmalicine and Related Alkaloids. *Planta Med.*, 1978; 33: 188 – 192

STÖCKIGT J, SOLL HJ. Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* and *C. ovalis*. *Planta Med.*, 1980; 40: 22 – 30

STÖCKIGT J, TREIMER J, ZENK MH. Synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids by cell free extracts of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *FEBS Lett.*, 1976; 70: 267 – 270

STÖCKIGT J. Biosynthesis in *Rauvolfia serpentina* - Modern aspects of an old Medicinal Plant. In: *The Alkaloids* (G.A. Cordell, ed.), Academic Press, 1995; 47: 115 – 172

STÖCKIGT J. Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine. *Phytochem.*, 1979; 18: 965 – 971

SVOBODA GH, JOHNSON IS, GORMAN M, NEUSS N. Current Status of Research on the Alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*Catharanthus roseus* G. Don). *J. Pharm. Sci.*, 1962; 51: 707 – 720

SZCZEBARA FM, CHANDELIER C, VILLERET C, MASUREL A, BOUROT S, DUPORE 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. *Nat. Biotechnol.*, 2003; 21: 143 – 149

THOMPSON JD, HIGGINS DJ, GIBSON TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.*, 1994; 22: 4673 – 4680

TREIMER F, ZENK MH. Purification and Properties of Strictosidine Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. *Eur. J. Biochem.*, 1979; 101: 225 – 233

UEDA J, TEZUKA Y, BANSKOTA AH, LE TRAN Q, TRAN QK, HARIMAYA Y, SAIKI I, KADOTA S. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002; 25: 753 – 760

V 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. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002; 10: 1913 – 1918

V SCHUMANN G. Isolierung, Reinigung und Expression zentraler Enzyme der Biosynthese des pflanzlichen Antiarrhythmikums Ajmalin, Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Chemie und Pharmazie, 2003

VERPOORTE R, VAN DER HEIJDEN R, TEN HOOPEN HJG, MEMELINK J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.*, 1999; 21: 467 – 479

VON POSER G, ANDRADE HHR, DA SILVA KVCL, HENRIQUES AT, HENRIQUES JAP. Genotoxic, mutagenic and recombinogenic effects of rauwolfia alkaloids. *Mutat. Res.*, 1990; 232: 37 – 43

WATTS KT, LEE PC, SCHMIDT-DANNERT C. Exploring Recombinant Flavonoid Biosynthesis in Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Chem. Bio. Chem.*, 2004; 5: 500 – 507

WILLIAMS EJ, BOWLES DJ. Coexpression of neighboring genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, 2004; 14: 1060 – 1067

ZENK MH. Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and related Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 1980; 43: 438 – 451

VIII Anhang

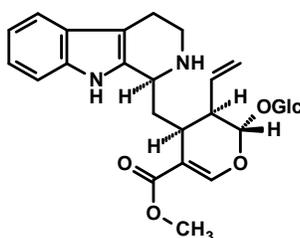
1 Spektroskopische Daten

Strictosidin

Summenformel: $C_{27}H_{34}N_2O_9$

Molekulargewicht: 530.31

Strukturformel:



Retentionszeit: 2.85 – 2.95 min (HPLC-Programm Nr. 2, Kapitel III.2.2)

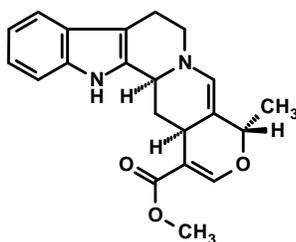
λ_{\max} : 227 nm

Cathenamin (20,21-Didehydroajmalicin)

Summenformel: $C_{21}H_{22}N_2O_3$

Molekulargewicht: 350.42

Strukturformel:



Retentionszeit: 7.8 – 8.0 min (HPLC-Programm Nr. 2, Kapitel III.2.2)

12.0 – 12.3 min (HPLC-Programm Nr. 3, Kapitel III.2.2)

EI-MS: m/z (rel. Int. [%]): 350 (65), 249 (100), 169 (47), 156 (46)

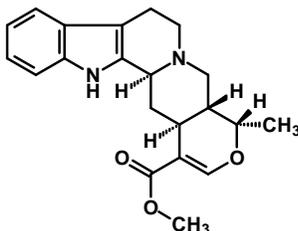
λ_{\max} : 280 nm

Raubasin (Ajmalicin)

Summenformel: $C_{21}H_{24}N_2O_3$

Molekulargewicht: 352.43

Strukturformel:



Retentionszeit: 7.1 – 7.3 min (HPLC-Programm Nr. 3, Kapitel III.2.2)

EI-MS: m/z (rel. Int. [%]): 352 (100), 225 (13), 223 (4), 184 (57)

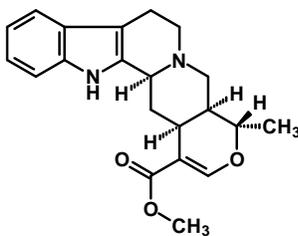
λ_{\max} : 280 nm

Tetrahydroalstonin

Summenformel: $C_{21}H_{24}N_2O_3$

Molekulargewicht: 352.43

Strukturformel:



Retentionszeit: 6.4 – 6.5 min (HPLC-Programm Nr. 2, Kapitel III.2.2)

7.6 – 7.8 min (HPLC-Programm Nr. 3, Kapitel III.2.2)

EI-MS: m/z (rel. Int. [%]): 352 (100), 225 (4), 223 (20), 184 (15)

λ_{\max} : 280 nm

2 Sequenzen

pQE-70bh-STR-RBS-SG

Dargestellt ist die komplette Nukleotidsequenz des Vektorkonstrukts pQE-70bh-STR-RBS-SG in 5' → 3'-Richtung.

Schwarz: pQE-70-Sequenz, **Rot:** RBS, **Violett:** STR-cDNA, **Orange:** SG-cDNA
Grau: MCS, **Hellgrün:** *Sph* I, **Blau:** *Bam*H I, **Dunkelgrün:** *Kpn* I

```

CTCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCA 60
ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCGAT 120
GGCCAAACTTTCTGATTGCAAACTATGGCACTGTTACCGTCTTCTTTCTTTCTCTC 180
CTCTTCGCTCGCTCTCTCTCTCCAATCTTGAAGAGATTTTGATTGAGGCTCCTTCCTA 240
TGCCCCAATTCCTTACCTTCGACTCAACCAACAAAGGGTCTACACCTCCGTCCAAGA 300
TGGCCGAGTTATCAAGTACGAAGGCCAACTCCGGTTTCGTCGACTTCGCCTATGCATC 360
TCCCTACTGGAACAAAGCGTTCTGTGAGAACAGCACAGATGCAGAGAAAAGACCCTTGTG 420
TGGGAGGACATATGATATTTATATAACTTGAACCAACCAGCTTACATTGTTGATTG 480
CTATTATCATCTTTCTGTGGTTGGTCTGAAGGTGGGCATGCTACCCAACCTCGCCACCAG 540
CGTTGATGGAGTCCCATCAAGTGGCTCTATGCAGTAACAGTTGATCAGAGAACTGGGAT 600
TGTTTACTTCACCGATGTTAGCACCTTATATGATGACAGAGGTGTCCAACAAATTATGGA 660
TACAAGCGATAAAAACAGGAAGACTAATAAAGTATGATCCCTCCACCAAGAAACAACACT 720
ACTGTTGAAAGAGCTACACGTTCCAGGTGGCGCAGAAGTCAGTGCAGATAGCTCCTTTGT 780
TCTTGTGGCTGAGTTTTTGGCCATCAAATTTGCAAAATATTGGCTAGAAGGGCCTAAGAA 840
GGGCACTGCGGAGTTTTAGTGAAAATCCCAAACCCAGGAAATATAAAGAGGAACGCTGA 900
TGGACATTTTTGGGTTTCTCAAGTGAAGAATTAGATGGAAATATGCACGGAAGAGTTGA 960
TCCTAAAGGAATAAAAATTTGATGAGTTTGGGAACATTCTTGAAGTTATCCCCTCCCACC 1020
ACCATTGCGAGTGAACACTTCGAACAAATTCAGAGCATGATGGTTTGTCTGATACATTGG 1080
AACCTGTTCATGGCTCTGTGGGCATATTAGTATATGATAAGAAGGGAAATTCCTTTTGT 1140
TTCAAGTCATTAAGAGGATCCGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATGGACAATACTCAA 1200
GCTGAGCCTCTTGTGTTGCCATTGTCCCGAAGCCAAATGCATCAACAGAGCACACGAAT 1260
TCTCACCTCATTCCTGTAACACGAAGTAAGATCGTTGTTTCATCGTCGAGATTTCCCCCAA 1320
GATTTTCATCTTCGGTGCAGGAGGATCTGCTTATCAGTGTGAGGGTGCATACAACGAAGGC 1380
AATCGAGGTCCAGCATCTGGGATACCTTCACTCAGCGAAGCCAGCCAAAATATCAGAT 1440
GGATCTAACGGAAACCAGGCCATCAATTGTTACCATATGTACAAGGAAGATATCAAAAT 1500
ATGAAGCAGACAGGGTTGGAATCATATAGGTTCTCAATTTTCATGGTCAAGAGTGTACC 1560
GGTGAAGACTAGCTGCTGGAGTGAATAAAGATGGAGTCAAGTTCTATCATGACTTTATA 1620
GATGAGCTTCTAGCCAAATGGCATCAAACCTTCCGTAACCTCTTCCACTGGGATCTTCCCT 1680
CAAGCTCTTGAAGATGAATACGGTGGCTTCTTGAGTCATAGAATCGTGGATGACTTTTTGT 1740
GAGTACGCTGAATTTTGGCTTTTGGGAATTTGGTGACAAAATCAAATACTGGACGACGTT 1800
AATGAACCACATACCTTCGCTGTAATGGCTATGCCCTTGGTGAATTTGCACCGGGGAGA 1860
GGTGGTAAAGGTGACGAAGGGGATCCAGCCATAGAACCCTATGTGGTACACATAATATA 1920
CTTCTTGTCTCACAAGCTGCTGTGGAAGAAATATAGGAACAAATTTTCAGAAATGTCAAG 1980
GGTGAATTTGGAATTTGTGCTTAATTCATGTGGATGGAGCCTCTCAGTGTATGTCAGGCT 2040
GATATTGATGCTCAGAAAAGAGCTCTTGATTTTATGCTTGGATGGTTTTTGGAGCCATTG 2100
ACAACAGGTGACTACCCAAAATCTATGAGAGAAGCTCGTAAAAGGACGCTTCCAAAATTT 2160
TCAGCCGATGATTTCTGAAAAATTAAGGCTGCTATGATTTTTATTGGAATGAATTACTAC 2220
ACTGCTACTTATGTGACTAATGCAGTTAAATCCAACCTCTGAAAAATTAAGTTACGAGACT 2280
GATGATCAAGTTACTAAGACTTTTGAACGGAACCAAAAACCCATTGGTCATGCGTTGTAT 2340
GGAGGGTGGCAGCATGTCGTTCCCTTGGGGACTTTACAAGCTCTTGGTTTACACAAAAGAG 2400
ACATAACCATGTTCCGGTGTATATGTACAGAAAAGTGGGATGGTTGAAGAAAACAAAACC 2460
AAGATACTGCTTTCAGAAGCTCGTCGCGATGCAGAGAGGACAGATATCACAAAAGCAT 2520
CTTGCAAGTGTACGAGACGCTATTGACGATGGAGTGAATGTAAAAGGTTACTTTGTATGG 2580
TCATTTTCGACAACCTTCGAGTGAATTTGGGTTATATATGTCGTTATGGAATTTATTCAT 2640
GTTGATTACAAGATTTTGAAGATATCCAAAGGAATCAGCCATATGGTACAAGAATTTTC 2700
ATTGCCGAAAAATCTACTACTTCTCCAGCAAAGAGACGGCGTGAAGAAGCTCAAGTTGAG 2760
TTAGTCAAGAGGCCAAAAACCTAAGGTACCAGGTTGTTAACGTTAGCCGGCTACGTATACT 2820
CCGGAATATTAATAGGCCTAGGATGCATATGGCGGCCCTGCAGCTGGCGCCATCGATA 2880
CGCGTACGTCGCGACCGCGGACATGTACAGAGCTCGAGAAGTACTAGTGGCCACGTGGGC 2940
CGTGCACCTTAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACC 3000
TCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTTATTGGT 3060

```

GAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAA 3120
AATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGC 3180
ATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTT 3240
TTTAAAGACCGTAAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGC 3300
CCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGAT 3360
ATGGGATAGTGTACACCCTTGTACACCCTTTCCATGAGCAAACGAAACGTTTTTCATC 3420
GCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTTCGCAAGATGT 3480
GGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATGAGAATATGTTTTT 3540
CGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGA 3600
CAACTTCTTCGCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCT 3660
GATGCCGTCGGGATTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAAT 3720
GCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGG 3780
CAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGGCATCAAATAA 3840
AACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACG 3900
CTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCCTTAGAGCTGCCTCGCGCTTTCCGGTGATGACGG 3960
TGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC 4020
CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGC 4080
CATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAG 4140
CAGATTCTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA 4200
AAATACCGCATCAGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTACTGCTCAGTGCCTGCGCTCGGCTCGTT 4260
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA 4320
GGGGATAACGCAGGAAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAA 4380
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCACAATAA 4440
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCC 4500
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC 4560
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT 4620
TCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGAC 4680
CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG 4740
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACA 4800
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC 4860
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA 4920
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA 4980
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAAC 5040
TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTA 5100
AATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT 5160
TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATA 5220
GTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC 5280
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC 5340
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG 5400
TCTATTAATTTGTCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAAC 5460
GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTC 5520
AGCTCCGGTTCACACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG 5580
GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTC 5640
ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCT 5700
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTGC 5760
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC 5820
ATCATTGGAACAGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCC 5880
AGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGC 5940
GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACA 6000
CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT 6060
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTT 6120
CCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATATCATGACA 6180
TTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTAC 6225

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Stöckigt angefertigt. Ihm möchte ich sehr für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für die Unterstützung und Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit danken.

Bei meinen ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich für die stete Hilfsbereitschaft, die fachlichen Diskussionen sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre.