

**„Charakterisierung zentraler
Enzyme des Ajmalin-
Biosynthesewegs aus *Rauvolfia
serpentina*“**

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

**Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz**

**Marco Hill
Geb. am 17.02.1977 in Neuss**

Mainz, 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGEN	XI
I Einleitung	1
1. Sekundärstoffwechsel	1
2. <i>Rauvolfia serpentina</i> und das Indolalkaloid Ajmalin	2
3. Bearbeitete Enzyme der Ajmalin-Biosynthese	6
3.1 Vomilenin- und 2 β -(<i>R</i>)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase	6
3.2 Vinorin-Synthase	7
3.3 Polyneuridinaldehyd-Esterase.....	8
II Material	11
1. Biologisches Material	11
1.1 Bakterienstämme.....	11
1.2 Eukaryotische Expressionssysteme und Pflanzenmaterial.....	11
1.3 Vektoren	12
2. Nährmedien	13
2.1 Bakterienmedium	13
2.2 Hefemedien	14
2.3 Sterilisation der Medien	14
3. Puffer	14
4. Kits, Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie und Proteinkristallisation	15
5. Säulen und Säulenmaterialien	15

6. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	16
7. Geräte	17
III Methoden	19
1. Aufreinigung und Analyse von Proteinen	19
1.1 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus Bakterienkulturen.....	19
1.2 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus <i>Pichia pastoris</i>	19
1.3 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
1.4 Affinitätschromatographie an einer Nickel-Nitrilotriessigsäure- Matrix (Ni-NTA).....	20
1.5 Aufreinigung von Enzym durch Anionenaustauscherchromatographie .	21
1.6 Umpufferung von Proteinlösungen	21
1.6.1 Dialyse	22
1.6.2 Umpufferung mit einer Entsalzungssäule	22
1.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	22
1.8 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
1.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung und Größenbestimmung von Proteinen	23
1.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
1.9.2 Färbung von SDS-Gelen.....	25
1.10 Abspaltung des N-terminalen Histidin-Restes durch Dipeptidyl- Aminopeptidase (DAPase)	26
2. Molekularbiologische Methoden.....	26
2.1 Verschiedene Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion	26
2.1.1 PCR zur Umklonierung von Zielgenen aus pQE60 in pQE2.....	26
2.1.2 Einfügen von Punktmutationen durch PCR.....	28
2.2 Ligation und Restriktion von DNA.....	28
2.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten	28

2.2.2	Restriktionsverdau von DNA.....	29
2.3	Aufreinigung von DNA.....	29
2.3.1	Aufreinigung und Analyse von DNA mittels Agarosegele.....	29
2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Top10-Zellen.....	30
2.3.2.1	Plasmid-Minipräparation.....	30
2.3.2.2	Isolation hochreiner Plasmid-DNA.....	31
2.4	Herstellung kompetenter Wirtsorganismen und Einschleusung der Fremd-DNA.....	31
2.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien und Hefen.....	31
2.4.1.1	Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.4.1.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen.....	32
2.4.1.3	Herstellung von elektrokompenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.4.1.4	Herstellung elektrokompeter Hefezellen (<i>Pichia pastoris</i> , GS115).....	33
2.4.2	Transformation.....	33
2.4.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	33
2.4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	34
2.4.2.3	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> durch Elektroporation.....	34
2.4.2.4	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> durch Elektroporation.....	34
2.5	Infektion von <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Infiltration von Tabak-Mosaikvirus basierenden Modulen über <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.	Durchgeführte Aktivitätstests.....	35
3.1	Durchführung des Aktivitätstest für die putative Vomilenin-Reduktase.....	35
3.2	Durchführung des Aktivitätstest für die putative 2 β -(<i>R</i>)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase.....	37

3.3	Durchführung des Aktivitätstests für die Polyneuridinaldehyd-Esterase	37
3.4	Durchführung des Aktivitätstests für die Vinorin-Synthese.....	39
4.	Aufreinigung und Identifizierung von Alkaloiden	40
4.1	Isolation von Vinorin und Vomilenin aus Wurzelzellkulturen	40
4.2	Massenspektrometrie	42
5.	Proteinkristallisation	42
5.1	Angewendete kristallographische Methoden	42
5.1.1	Hanging- und Sitting-Drop	43
5.1.1.1	Sitting-Drop	43
5.1.1.2	Hanging-Drop	44
5.1.2	Mikrodialyse und Kristallisation in Kapillaren	44
5.1.2.1	Dialyseknöpfe	45
5.1.2.2	Proteinkristallisation in Kapillaren.....	45
5.2	Cokristallisation und „Soaking“	46
5.2.1	Cokristallisation.....	46
5.2.2	„Soaking“ von Proteinkristallen	47
5.3	Identifikation von Proteinkristallen	47
5.4	Einfrieren von Proteinkristallen.....	48
5.5	Vermessung von Proteinkristallen	48
6.	Computerprogramme und Online-Tools	49
6.1	Bearbeitung der Rohdaten einer Kristallvermessung	49
6.2	Strukturaufklärung und Verfeinerung.....	49
6.3	Verwendete Online-Tools	50
IV	Ergebnisse	51
1.	Expressionsversuche mit der putativen Vomilenin- und 2β-(R)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase	51

1.1	Umklonierung der Reduktase-cDNAs in pQE2	52
1.2	Expression und Aktivitätstests	53
1.3	Umklonierung der putativen Reduktaseklone in pPIC3.5 und Expression in <i>Pichia pastoris</i>	54
1.4	Umklonierung der putativen 2 β -(<i>R</i>)-1,2-Dihydrovomilenin- Reduktase und Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	56
1.4.1	Prinzip der heterologen Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> und der verwendeten Module	56
1.4.2	Aktivitätstests mit Proteinextrakten aus infiltrierten <i>Nicotiana</i> <i>benthamiana</i> -Pflanzen	59
2.	Kristallisation und Komplexierungsversuche der Vinorin- Synthase (VS)	60
2.1	Expression und Aufreinigung der Vinorin-Synthase	60
2.2	Kristallisation der Vinorin-Synthase	62
2.2.1	Cokristallisation der Vinorin-Synthase mit Coenzym A (CoA) und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA)	64
2.2.2	Soaking der Vinorin-Synthase mit Coenzym A (CoA) und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA)	65
2.2.3	Komplexierungsversuche der Vinorin-Synthase mit ihrem natürlichen Produkt Vinorin	67
3.	Mutagenesestudien der Vinorin-Synthase	69
4.	Kristallisation und Strukturaufklärung der Polyneuridinaldehyd- Esterase (PNAE) aus <i>Rauvolfia serpentina</i>	75
4.1	Umklonierung der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus pQE70 in pQE2.75	
4.2	Kristallisation der Polyneuridinaldehyd-Esterase	78
4.2.1	Variationen von Kristallisationstemperatur, Proteinkonzentration und Pufferzusammensetzung	80
4.2.2	Reduktive Methylierung der Oberflächen-Lysine der PNAE	81
4.2.3	Anwendung unterschiedlicher Verfahren zur Kristallisation der PNEA	82
4.3	Röntgenbeugungsmuster und Strukturaufklärung der Polyneuridin- aldehyd-Esterase	84

V	Diskussion	90
1.	Versuche zur aktiven Expression der Vomilenin- und 2β-(R)-1.2 Dihydrovomilenin-Reduktase	90
1.1	Expressionsversuche der Reduktasen mit dem Vektor pQE2.....	91
1.2	Expressionsversuche der Reduktasen im eukaryotischen Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i>	93
1.3	Expression der putativen 2 β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase in <i>Nicotiana benthamiana</i>	95
2.	Komplexierungsversuche und Mutagenesestudien mit der Vinorin-Synthase	98
2.1	Die Vinorin-Synthase und die Position ihrer Liganden.....	98
2.2	Mutationen der Vinorin-Synthase	102
3.	Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Polyneuridin-aldehyd-Esterase	104
3.1	Struktur und Merkmale der Polyneuridinaldehyd-Esterase	104
3.2	Strukturelle Vergleiche zwischen der Röntgenstruktur und einem <i>in silico</i> -Modell der Polyneuridinaldehyd-Esterase	108
3.2.1	Die Cap-Domäne	108
3.2.2	Die katalytische Triade	112
VI	Zusammenfassung	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die indische Schlangenzwurzel <i>Rauvolfia serpentina</i> (A) und deren pharmazeutisch genutzte Wurzeln (B).....	2
Abbildung 2:	Struktur des monoterpenoiden Indolalkaloids Ajmalin	3
Abbildung 3:	Der Biosyntheseweg des Ajmalins in <i>Rauvolfia serpentina</i>	4
Abbildung 4:	Die enzymatische Reaktion der Vinorin-Synthase aus <i>R. serpentina</i>	7
Abbildung 5:	Enzymatische Reaktion der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus <i>R. serpentina</i>	8
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der α/β -Hydrolase-Faltung	9
Abbildung 7:	Sitting-Drop-Proteinkristallisation	44
Abbildung 8:	Hanging-Drop-Proteinkristallisation	44
Abbildung 9:	Proteinkristallisation mit Dialyseknöpfen	45
Abbildung 10:	Proteinkristallisation in Kapillaren	46
Abbildung 11:	PCR-Primer für die Umklonierung der putativen Reduktase-cDNAs in pQE2	52
Abbildung 12:	PCR-Primer für die Umklonierung der putativen Reduktase-cDNAs in pPIC3.5.....	54
Abbildung 13:	PCR-Primer für die Umklonierung der putativen 2β -(R)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase cDNA in pICH 10990	57
Abbildung 14:	GFP-Kontrolle der durchgeführten Expressionsversuche in <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
Abbildung 15:	Aufreinigung der Vinorin-Synthase durch Ni-NTA Affinitätschromatographie	61
Abbildung 16:	Aufreinigung der Vinorin-Synthase durch Anionen-Austauschchromatographie.....	62
Abbildung 17:	SDS-Gel der aufgereinigten Vinorin-Synthase: A) Nach Ni-NTA, B) Nach His-Abspaltung und MonoQ, C) Marker (III.1.9.1)	62
Abbildung 18:	Kristall der Vinorin-Synthase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>	63
Abbildung 19:	Erstelltes Modell der Vinorin-Synthase mit dem Liganden CoA (Ma X <i>et al.</i> , 2004)	64

Abbildung 20:	Gemessenes Massenspektrum des isolierten Vinorins	67
Abbildung 21:	A) Lage des Motivs HXXXD im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase, B) Nähere Betrachtung der Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Asp 164 und Arg 279	70
Abbildung 22:	Verwendete Primer für Mutagenesestudien der Asparaginsäure 164 der Vinorin-Synthase	71
Abbildung 23:	HPLC-Chromatogramme nach vergleichendem Aktivitätstest A) Mutante D164N; B) Native Vinorin-Synthase	72
Abbildung 24:	Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Arginin 279 der Vinorin-Synthase	73
Abbildung 25:	Lage der Aminosäure Asparagin 277 am engen Eingang des VS-Kanals	73
Abbildung 26:	Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Asparagin 277 der Vinorin-Synthase	74
Abbildung 27:	Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Valin 165 der Vinorin-Synthase	75
Abbildung 28:	Verwendete Primer zur Umklonierung der PNAE in den Vektor pQE2	76
Abbildung 29:	Aufreinigung der PNAE durch Ni-NTA Affinitätschromatographie .	77
Abbildung 30:	A) SDS-Gel der homogenen PNAE nach der Ni-NTA Chromatographie, B) SDS-Gel der PNAE nach (1) und vor (2) der Histidin-Rest Abspaltung	77
Abbildung 31:	Erste selbst hergestellte PNAE Kristalle (A), erster erhaltener Einkristall (B)	80
Abbildung 32:	Ausgefallene PNAE bei der Kristallisation in Dialyseknöpfen.....	83
Abbildung 33:	Auswahl von PNAE Kristalle in kompakter Form, (A: nicht polarisiertes Licht; B,C,D polarisiertes Licht)	85
Abbildung 34:	Topologisches Diagramm der Polyneuridinaldehyd-Esterase	88
Abbildung 35:	Die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>	89
Abbildung 36:	Die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>	106
Abbildung 37:	Die Cap-Domäne der Polyneuridinaldehyd-Esterase	107

-
- Abbildung 38: Struktureller Vergleich einer „Backbone“-Teilsequenz der Cap-Domäne der HNL, des daraus erstellten PNAE-Modells und der Röntgenstruktur der PNAE 110
- Abbildung 39: Struktureller Vergleich des Zugangs zum aktiven Zentrum der Polyneuridinaldehyd-Esterase 111
- Abbildung 40: Vergleich der Aminosäuren der katalytischen Triade zwischen Polyneuridinaldehyd-Esterase, Hydroxynitril-Lyase und Salizylsäure-Bindeprotein 2 112
- Abbildung 41: Vergleich der Lage des Serin 87 zwischen Polyneuridinaldehyd-Esterase, Hydroxynitril-Lyase und Salizylsäure-Bindeprotein 2 und dem *in silico*-Modell der Polyneuridinaldehyd-Esterase 113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	12
Tabelle 2: Puffer	14
Tabelle 3: Kits, Enzyme und Zubehör.....	15
Tabelle 4: Säulen und Säulenmaterial	16
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	16
Tabelle 6: Verwendete Geräte	17
Tabelle 7: Vorliegende Konstrukte der putativen Vomilenin- und 2 β -(<i>R</i>)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase	51
Tabelle 8: Verwendete Puffer-Kits für das „High-Troughput-Screening“ zur Kristallisation der PNAE	79
Tabelle 9: Statistik des PNAE Datensatzes	86
Tabelle 10: Statistik der aufgeklärten PNAE Struktur	89
Tabelle 11: Vergleich der Molekülmassen der putativen Vomilenin-Reduktasen ..	91

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
°K	Kelvin
% (m/V)	Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung)
% (V/V)	Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung)
A	Adenin
Å	Ångstrom
Ac-CoA	Acetyl Coenzym A
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Amp	Ampicillin
ANAMT	Acetylnorajmalan-Methyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAPase	Dipeptidyl-Amino-peptidase I
DC	Dünnschichtchromatographie
DHVR	Dihydrovomilenin-Reduktase
DMAB	Dimethylaminoboran
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
G	Guanin
GDH	Geissoschizin-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GOI	Gene of Interest
h	Stunde
HNL	Hydroxynitril-Lyase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflussigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basen
Kpi	Kaliumphosphat
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
m	Meter
mA	Milli-Ampere
mRNA	messenger RNA
ms	Milli-Sekunden
N	Normal

min	Minute
MSH	β -Mercaptoethanol
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
NADPH ₂	Reduziertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PNA	Polyneuridinaldehyd
Rf	relative Laufstrecke
RMSD	root mean square distance
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBE	Sarpagan-Brückenzym
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
SG	Strictosidin-Glucosidase
STR	Strictosidin-Synthase
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
U	Unit (1U = 16.67 nkat)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VH	Vinorin-Hydroxylase
VR	Vomilenin-Reduktase
VS	Vinorin-Synthase
z. B.	zum Beispiel
ZKBS	Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

I Einleitung

1. Sekundärstoffwechsel

Der Begriff Sekundärstoffwechsel beschreibt einen Metabolismus, der sich hauptsächlich in Pflanzen aber auch in anderen meist festsitzenden Lebewesen (z. B. Schwämme) abspielt. Im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels wie Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren stellen die Sekundärstoffwechselprodukte keine direkt essentiellen Bestandteile des Organismus dar. Die Moleküle des primären Stoffwechsels werden in allen Zellen produziert, wogegen diejenigen des sekundären meist nur in ganz bestimmten ausdifferenzierten Zellen vorkommen. So zählen viele Blütenfarbstoffe, Duftstoffe, Scharf- und Aromastoffe zu den Sekundärmetaboliten. Sehr viele Sekundärstoffwechselprodukte sind aber auch äußerst toxisch. So zählt beispielsweise der gefleckte Schierling (*Conium maculatum*) neben dem blauen Eisenhut (*Aconitum napellus*) zu den giftigsten bekannten Pflanzen (TALATY N *et al.*, 2005). Seine Wirkung lässt sich auf das Alkaloid Coniin zurückführen, und die unreifen Früchte wurden zu früheren Zeiten für Hinrichtungen benutzt (beispielsweise bei Sokrates 399 v. Chr.). Andererseits wurden in verschiedensten Kulturkreisen Pflanzen zu Heilzwecken eingesetzt. Auch heute noch sind solche Pflanzen für Ethnopharmakologen eine reiche Quelle potenzieller Wirkstoffe. Praktisch ausnahmslos handelt es sich dabei um Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Zurzeit sind etwa 200.000 verschiedene Sekundärmetabolite bekannt (HARTMANN T und OBER D, 2003). Die Verbreitung der verschiedenen Stoffe ist dabei sehr eingeschränkt. Sie kommen häufig nur in Untergruppen, Gattungen oder sogar nur in einzelnen Arten vor.

Evolutionär ergibt sich die enorme Vielfalt dieser giftigen Substanzen aus einer Wechselwirkung zwischen den jeweiligen Pflanzen und ihren Fraßfeinden und Pathogenen. Die Entwicklung herbivorer Insekten ist meist an ganz bestimmte Wirts- oder Futterpflanzen gekoppelt. Die Pflanzen versuchen sich über chemische Abwehrmechanismen vor ihren Feinden zu schützen, da sie kein Immunsystem besitzen. Diese wiederum passen sich an die veränderten Bedingungen an. Über Jahrmillionen entstand so auf beiden Seiten eine große Artenvielfalt. Einige Fraßfeinde sind über Sequestration sogar in der Lage sich gegen ihre Feinde zu

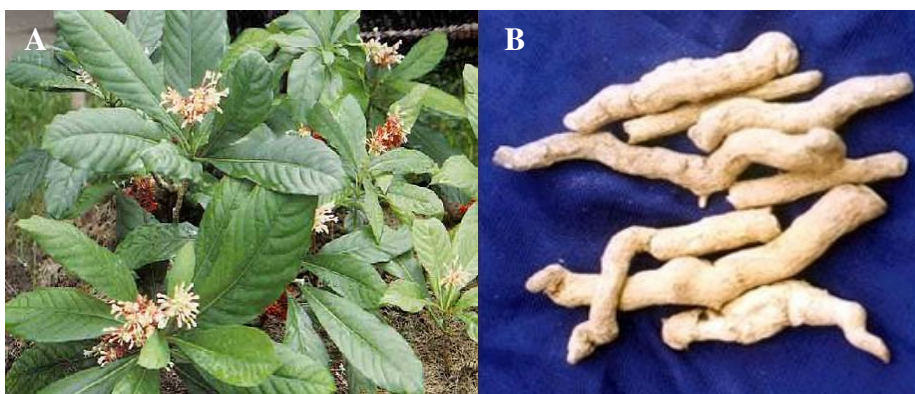
schützen. Andererseits locken Sekundärmetabolite als Farb- und Aromastoffe pollenverbreitende Insekten und samenverbreitende Fruchtfresser an.

Eine der Hauptgruppe unter den sekundären Pflanzenstoffen sind die Alkaloide mit ca. 15000 Vertretern. Alkaloide sind meist basische Verbindungen mit heterozyklisch gebundenen Stickstoffatomen. Ihr Name geht auf den Apotheker C. F. M. Meissner zurück, der den Begriff 1819 einführte. Die meisten Alkaloide sind Derivate von Aminosäuren und haben auf den menschlichen Körper häufig eine charakteristische Wirkung. Die Alkaloide werden nach im Molekül befindlichen Grundstrukturen eingeteilt.

2. *Rauvolfia serpentina* und das Indolalkaloid Ajmalin

Ein Forschungsobjekt mit einem breiten Spektrum von Alkaloiden ist die indische Schlangenzwurzel *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. Diese Pflanze wird in Indien bereits seit 3000 Jahren als pflanzliches Heilmittel verwendet. Es handelt sich um einen bis zu 1 m hohen Strauch aus der Familie der Apocynaceae. Die pharmazeutisch genutzten Pflanzenteile sind die Wurzeln. Sie enthalten nach DAB einen Alkaloidgehalt von 1 % berechnet als Reserpin. Abbildung 1 zeigt die Pflanze *Rauvolfia serpentina* und deren getrocknete Wurzeln.

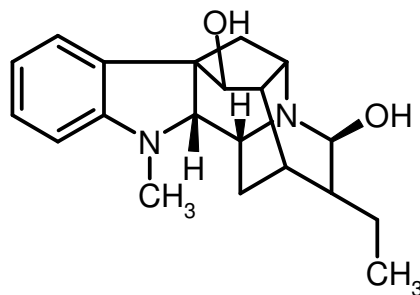
Abbildung 1: Die indische Schlangenzwurzel *Rauvolfia serpentina* (A) und deren pharmazeutisch genutzte Wurzeln (B)



In der heutigen Zeit finden hauptsächlich drei monoterpene Indolalkaloide aus *R. serpentina* therapeutische Anwendung. Hierbei handelt es sich um das erwähnte Reserpin, Ajmalicin und Ajmalin.

Ajmalin (ATC-Code: C01B A05) ist ein Antiarrhythmikum der Klasse I (a/c) (MUTSCHLER E *et al.*, 2001). Es hemmt an den Herzmuskelzellen den schnellen Natriumeinstrom und reduziert die Geschwindigkeit der Depolarisation während der Phase 0 des Aktionspotentials. Seit 1959 ist Ajmalin unter dem Produktnamen Gilurytma[®] (Solvay Arzneimittel) auf dem Markt. Die Struktur des Ajmalins wurde abschließend von Bartlett beschrieben (BARTLETT M *et al.*, 1962). Abbildung 2 zeigt die dreidimensionale Struktur des Ajmalin.

Abbildung 2: Struktur des monoterpenoiden Indolalkaloids Ajmalin

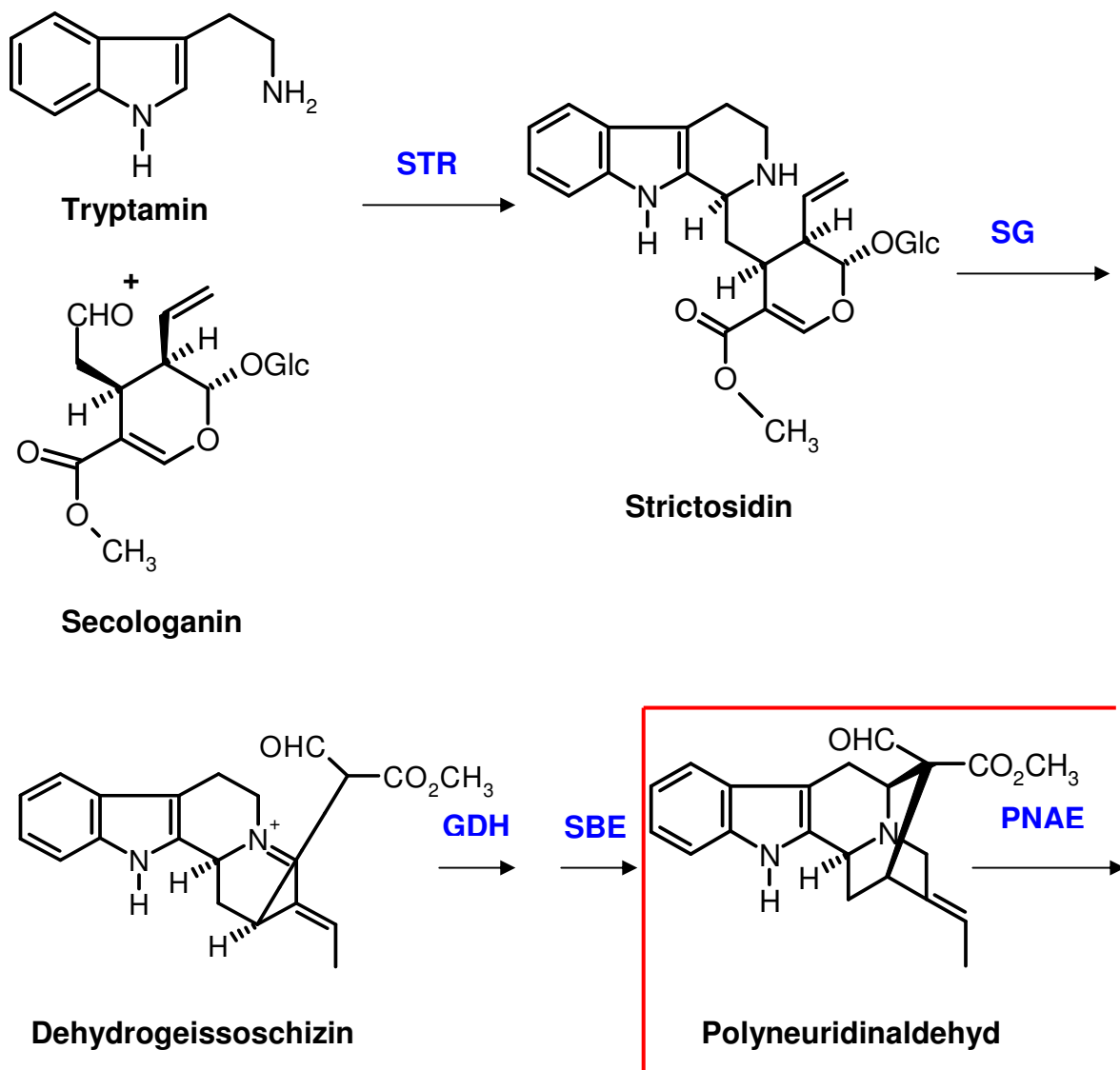


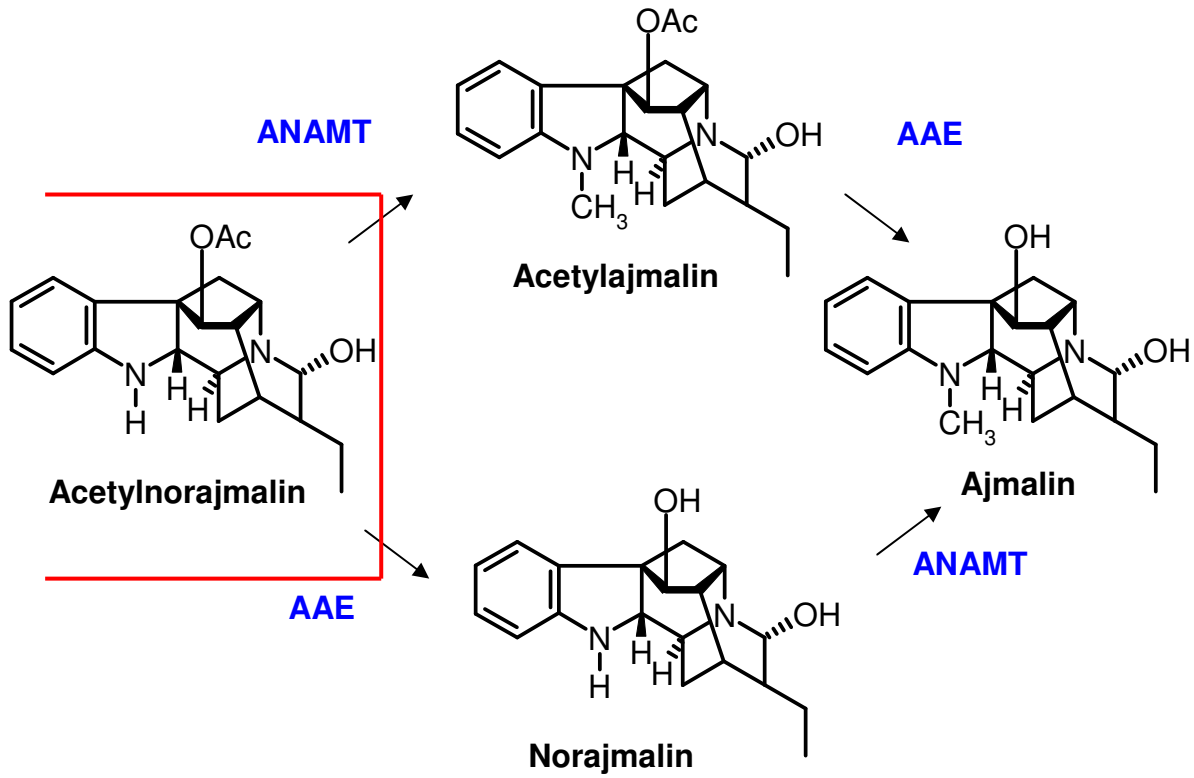
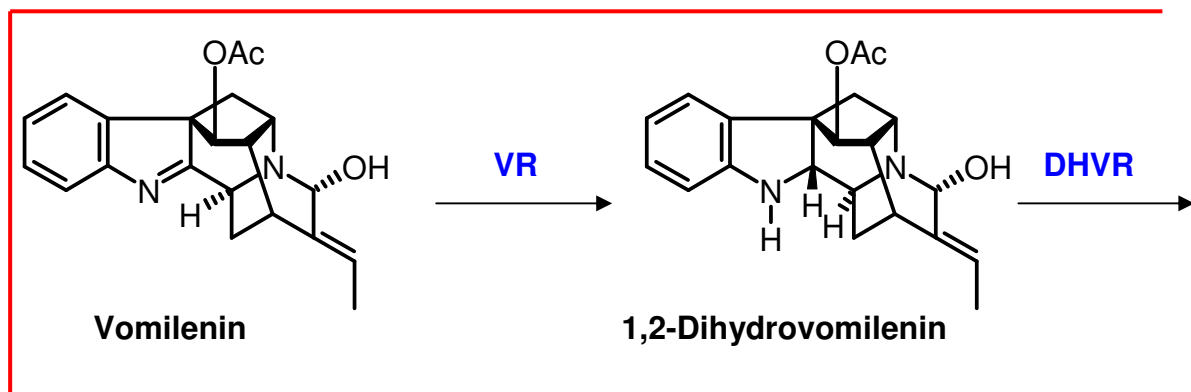
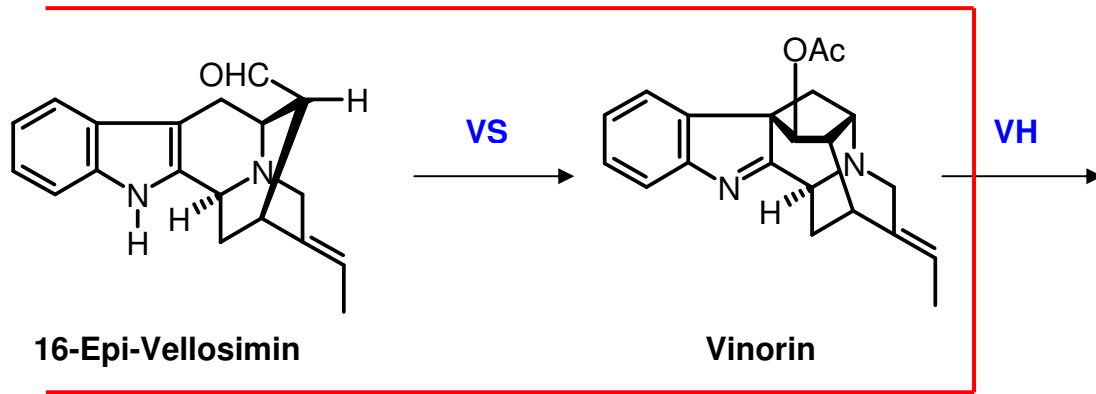
Die Biosynthese dieses äußerst komplexen Moleküls erfolgt über eine Vielzahl enzymatischer Schritte. Die Aufklärung des Biosynthesewegs begann 1977 (STÖCKIGT J und ZENK M, 1977), nachdem es Zenk gelungen war, eine schnell wachsende, stabile Zellsuspensionskultur von *R. serpentina* zu etablieren (STÖCKIGT J *et al.*, 1981). In den darauf folgenden Jahren konnte durch Isolierung der beteiligten Enzyme eine weitgehende Aufklärung des Stoffwechselwegs vollzogen werden. Im ersten Schritt werden Tryptamin, das Decarboxylierungsprodukt des Tryptophans, und das Iridoid Secologanin zum Strictosidin kondensiert. Dieses Strictosidin bildet die Vorstufe zur Bildung von mehr als 2000 monoterpenoiden Indolalkaloiden (STÖCKIGT J und ZENK M, 1977; RUEFFER M *et al.*, 1978; NAGAKURA N *et al.*, 1979). Abbildung 3 zeigt den kompletten Stoffwechselweg vom Tryptamin und Secologanin hin zum Ajmalin.

Abbildung 3: Der Biosyntheseweg des Ajmalins in *Rauvolfia serpentina*

Die beteiligten Enzyme sind in blau gekennzeichnet: **STR**: Strictosidin-Synthase, **SG**: Strictosidin-Glucosidase, **GDH**: Geissoschizin-Dehydrogenase, **SBE**: Sarpagan-Brückenzym, **PNAE**: Polyneuridinaldehyd-Esterase, **VS**: Vinorin-Synthase, **VH**: Vinorin-Hydroxylase, **VR**: Vomilenin-Reduktase, **DHVR**: Dihydrovomilenin-Reduktase, **AAE**: Acetyljmalan-Esterase, **ANAMT**: Acetylnorajmalan-Methyltransferase

Die rot umrandeten Bereiche markieren die Schritte des Biosynthesewegs, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit näher behandelt werden.





3. Bearbeitete Enzyme der Ajmalin-Biosynthese

Wie der Abbildung 3 zu entnehmen ist, sind an der Biosynthese des Ajmalins eine große Anzahl verschiedener Enzyme beteiligt. Diese Enzyme befinden sich in unterschiedlichen Stufen der Erforschung. So konnten die Strictosidin-Synthase, die Strictosidin-Glucosidase, die Polyneuridinaldehyd-Esterase, die Vinorin-Synthase, die Cytochrom P450-Reduktase und die Acetyljmalan-Esterase bereits aktiv heterolog exprimiert werden. Weiterhin konnten die dreidimensionalen Strukturen der Strictosidin-Synthase, der Strictosidin-Glucosidase und der Vinorin-Synthase durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit weniger gut charakterisierten Enzymen der Biosynthese des Ajmalins in der Pflanze *Rauvolfia serpentina*.

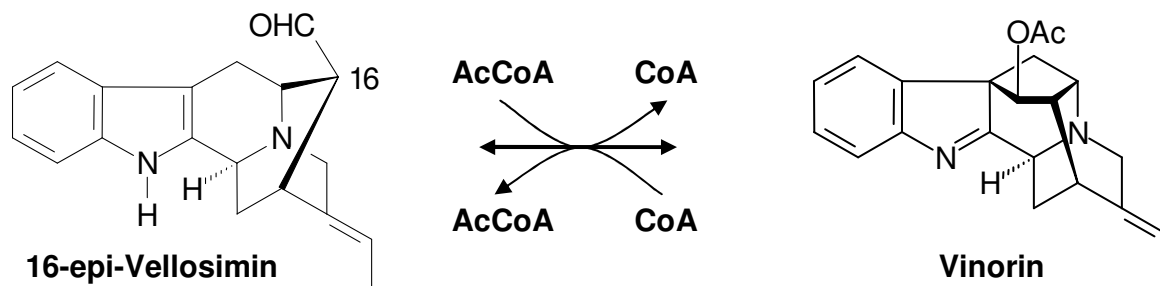
3.1 Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Die Oxidoreduktasen (EC 1) stellen die größte Untergruppe von klassifizierten Enzymen dar. Nach dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) werden die Oxidoreduktasen in 20 Untergruppen aufgeteilt. Die beiden NADPH₂-abhängigen Reduktionsschritte vom Vomilenin zu Acetylnorajmalin (Abbildung 3) werden durch die beiden Enzyme Vomilenin-Reduktase (VR) (EC 1.5.1.32) und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase (DHVR) (EC 1.3.1.73) katalysiert. Beide Reduktasen konnten über chromatographische Verfahren aus Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* aufgereinigt werden (VON SCHUMANN G, 2003). Über *reverse genetics* war es gelungen, die vollständigen cDNAs beider Enzyme zu generieren und heterolog zu exprimieren (VON SCHUMANN G, 2003). Eine aktive Expression konnte mit den bis dahin angewendeten Methoden allerdings nicht durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit werden weiterführende Versuche beschrieben, mit denen eine aktive Expression der beiden beschriebenen Reduktasen des Ajmalin-Stoffwechselwegs in unterschiedlichen Expressionssystemen erreicht werden sollte.

3.2 Vinorin-Synthase

Die Vinorin-Synthase (EC 2.3.1.160) katalysiert die reversible Reaktion vom 16-epi-Vellosimin zum Vinorin. Diese Reaktion beinhaltet einen Acetyl-Transfer vom Cosubstrat Acetyl-CoA auf das 16-epi-Vellosimin und einen Ringschluss, der zu einer Umwandlung des Alkaloidgrundkörpers vom Sarpagan- zum Ajmalantyp führt (GERASIMENKO I *et al.*, 2004; BAYER A *et al.*, 2004). Abbildung 4 zeigt den Mechanismus dieser Reaktion.

Abbildung 4: Die enzymatische Reaktion der Vinorin-Synthase aus *R. serpentina*



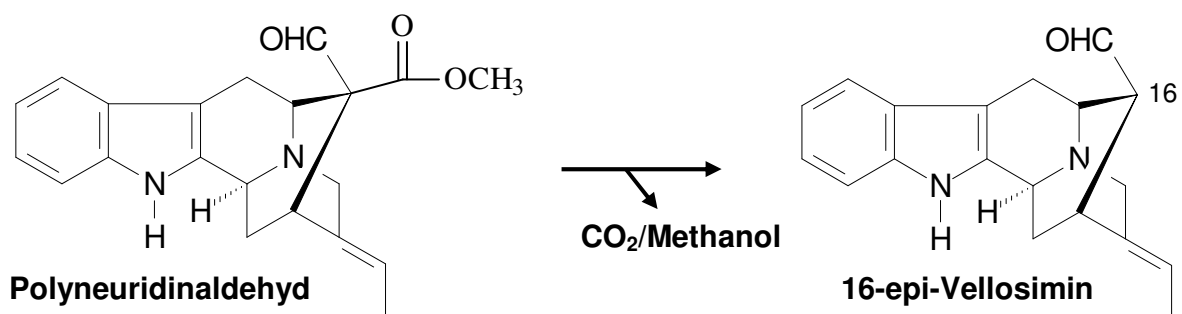
Die Vinorin-Synthase wurde aus Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* durch Proteinfällung und chromatographische Methoden aufgereinigt (BAYER A, 2003). Über *reverse genetics* konnte die cDNA der Vinorin-Synthase amplifiziert, und das Enzym aktiv heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Die Vinorin-Synthase besteht aus 421 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 46,8 kDa. Mutagenesestudien und Sequenzanalysen ergaben, dass es sich bei der Vinorin-Synthase um ein Enzym der BAHD-Superfamilie der Acetyltransferasen handelt (GERASIMENKO I *et al.*, 2004; BAYER A *et al.*, 2004). Die Enzyme dieser Unterfamilie weisen zwei konservierte Regionen auf. Zum einen handelt es sich um ein Motiv bestehend aus His-xxx-Asp (HxxxD), welches sich im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase befindet. Des Weiteren befindet sich das konservierte Motiv Asp-Phe-Gly-Trp-Gly (DFGWG) im C-terminalen Bereich dieser Enzymfamilie. Die BAHD-Superfamilie wurde erstmals von ST-PIERRE B und DE LUCA V (2000) beschrieben. Benannt wurden die BAHD-Acetyltransferasen nach den ersten vier charakterisierten Enzymen dieser Familie (Benzylalkoholacetyl-Transferase, Anthocyanin-O-Hydroxycinnamoyl-Transferase, Anthranilat-N-Hydroxycinnamoyl/benzoyl-

Transferase und Deacetylvindolinacetyl-Transferase). Ein Durchbruch im katalytischen Verständnis der BAHD-Familie ergab sich aus der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Vinorin-Synthase (MA X *et al.*, 2004; MA X *et al.*, 2005a; MA X *et al.*, 2005b). So wurde gezeigt, dass die Vinorin-Synthase aus zwei etwa gleichgroßen Domänen besteht, die über einen Loop miteinander verbunden sind. Die Struktur weist 14 β -Faltblätter und 13 α -Helices auf. Das aktive Zentrum des Enzyms (HxxxD) liegt in einem durchgängigen Kanal zwischen den beiden Domänen und ist von beiden Seiten her zu erreichen. Der genaue Ablauf der katalysierten Reaktion und die Lage des Cosubstrates (Acetyl-CoA) konnten bis jetzt allerdings nur theoretisch beschrieben werden (siehe IV.2.2.1) (MA X *et al.*, 2004). Im Folgenden werden u. a. Mutagenesestudien und Komplexierungsversuche behandelt, die zu einem detaillierten Einblick in den Ablauf der enzymatischen Reaktion der Vinorin-Synthase führen sollten.

3.3 Polyneuridinaldehyd-Esterase

Die Polyneuridinaldehyd-Esterase (EC 3.1.1) katalysiert die der Vinorin-Synthase vorgeschaltete Reaktion vom Polyneuridinaldehyd zum 16-epi-Vellosimin. Dabei wird die Esterfunktion am C-16 des Polyneuridinaldehyds hydrolysiert. Abbildung 5 zeigt den Verlauf dieser Reaktion.

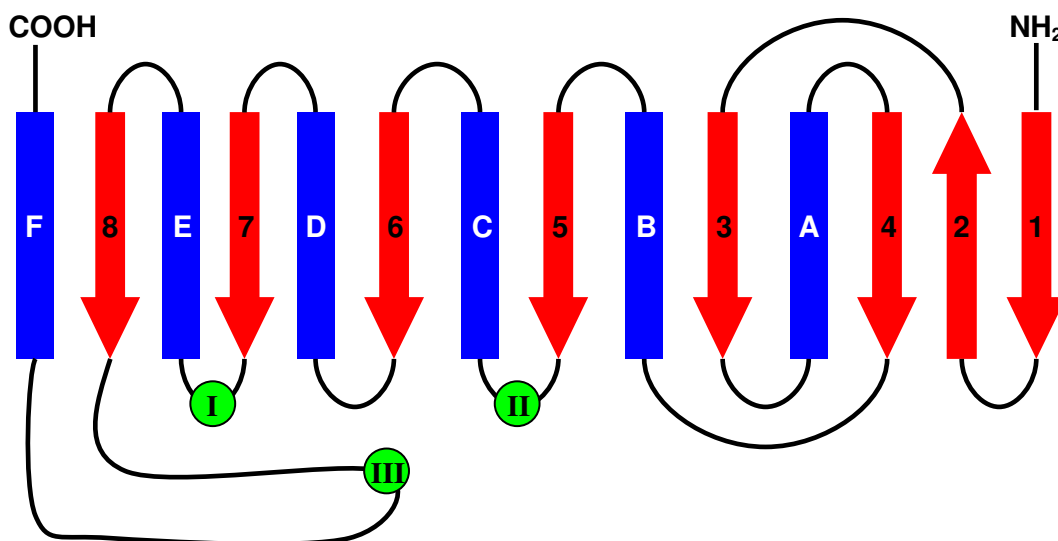
Abbildung 5: Enzymatische Reaktion der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus *R. serpentina*



Die Polyneuridinaldehyd-Esterase gehört zur Enzymfamilie der α/β -Hydrolasen. Diese Enzymfamilie wurde erstmals von OLLIS D *et al.* (1992) beschrieben. Dabei handelt es sich um eine strukturell verwandte Enzymfamilie, die eine Vielzahl von Substraten in unterschiedlichen Reaktionen umsetzt (HOLMQUIST M, 2000), jedoch

kaum Sequenzübereinstimmungen zeigt. Auch die Anzahl der Aminosäuren der Enzyme dieser Familie kann sehr unterschiedlich sein (197 Aminosäuren bei der Kutinase aus *Fusarium solani* und 582 Aminosäuren bei der Acetylcholin-Esterase der Maus). Der Aufbau des Kerns der jeweiligen Enzyme innerhalb der Familie stellt sich jedoch als sehr ähnlich dar. Dabei handelt es sich um ein „ β -sheet“ bestehend aus fünf bis acht β -Faltblättern, die über α -Helices miteinander verbunden sind (NARDINI M *et al.*, 1999). Alle zugehörigen Enzyme weisen eine katalytische Triade auf, wobei deren Aminosäureabfolge immer nukleophil - sauer - Histidin ist. Die Lage dieser an der Katalyse beteiligten Aminosäuren zueinander stellt sich innerhalb der α/β -Hydrolasen als äußerst konserviert dar. Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der α/β -Hydrolase-Faltung.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der α/β -Hydrolase-Faltung. Die β -Faltblätter sind als rote Pfeile (1-8) und die α -Helices als blaue Balken (A-F) dargestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind als grüne Punkte gezeigt (I: saure Aminosäure, II: nukleophile Aminosäure, III: Histidin)



Die Lage der α -Helices im Raum variiert zwischen einzelnen α/β -Hydrolasen sehr stark. Eine Ausnahme stellt die Helix C dar. Sie ist ein Teil der als „nucleophilic elbow“ bezeichneten Region, die sie zusammen mit dem β -Faltblatt 5 bildet. In ihrer Verbindung liegt die nukleophile Aminosäure (Abbildung 6: II) in einer weitgehend konservierten Sequenz (Gly-X-Nukleophil-X-Gly) vor (OLLIS D *et al.*, 1992). Als nukleophile Aminosäuren wurden bei verschiedenen Vertretern dieser Enzymfamilie hauptsächlich Serin, aber auch Cystein und Aspartat gefunden (LAWSON D *et al.*,

1994). Die für die Katalyse wichtige saure Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) ist in einem Loop nach dem β -Faltblatt 7 positioniert. Das Histidin befindet sich in einem Loop nach β -Faltblatt 8. Beide Aminosäuren stehen über eine Wasserstoffbrückenbindung miteinander in Kontakt (SCHRAG J *et al.* 1995).

Eine weitere wichtige Untereinheit der α/β -Hydrolasen ist die „cap region“. Diese Domäne wird durch Insertionen gebildet, die nach den β -Faltblättern 3, 4, 6 und 7 eingefügt sein können (HEIKINHEIMO P *et al.* 1999). Sie weist innerhalb der Enzymfamilie eine überaus große Varianz auf, was die Sequenz, Struktur und Funktion betrifft. Die „cap region“ formt den Eingang zur Bindetasche, und somit zum aktiven Zentrum der α/β -Hydrolasen, und hat daher entscheidenden Einfluss auf die Bindung und Akzeptanz der umzusetzenden Substrate.

Die Polyneuridinaldehyd-Esterase wurde erstmals 1983 in Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* charakterisiert (PFITZNER A und STÖCKIGT J 1983). In den Jahren 1995 und 1998 konnte das Enzym mittels chromatographischer Verfahren aus den Zellkulturen aufgereinigt werden. Durch Partialsequenzierung und die „reverse genetics“-Methode ist es schließlich gelungen, einen Vollängenklon der Polyneuridinaldehyd-Esterase zu generieren, und das Protein aktiv heterolog in *E. coli* zu exprimieren (DOGRU E *et al.*, 2000). Aufgrund von Sequenzalignments wurden 15 dreidimensionale Modelle der Esterase erstellt (MATERN-DOGRU E *et al.*, 2002). Als Vergleichsmodell diente hierbei die Struktur der Hydroxynitril-Lyase aus *Hevea brasiliensis*, die mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (WAGNER U *et al.*, 1996). Durch die strukturellen Unterschiede in den 15 errechneten Modellen konnte keine definitive Aussage über den tatsächlichen Aufbau der Polyneuridinaldehyd-Esterase getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird nun behandelt, wie die Polyneuridinaldehyd-Esterase über verschiedenen Verfahren kristallisiert, und eine genaue Bestimmung ihrer dreidimensionalen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse erstmals vorgenommen wurde.

II Material

1. Biologisches Material

1.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme waren nach der Einstufung der ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) für die Verwendung in Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 zugelassen.

Escherichia coli:

Stamm: Top10F'

Genotyp: F'*{lacI^qTn10(Tet^R)}* *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15
 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nup

Stamm: M15[pREP4]

Genotyp: *E. coli* K12 (Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺)

Agrobacterium tumefaciens:

Stamm: GV3101

1.2 Eukaryotische Expressionssysteme und Pflanzenmaterial

Zur Expression rekombinanter Gene kamen neben Bakterien auch eukaryotische Organismen zum Einsatz.

Pichia pastoris:

Stamm: GS115

Genotyp: *his4*

***Nicotiana benthamiana* (L.)**

Rauvolfia serpentina: Wurzelkulturen (hairy roots)

1.3 Vektoren

Im Folgenden werden die verwendeten Vektoren mit Hersteller und Funktion aufgelistet, die für die Klonierungs- und Expressionsexperimente zum Einsatz kamen.

Tabelle 1: Klonierungs- und Expressionsvektoren

pGEM-T easy (Promega, Mannheim)	- linearer Klonierungsvektor mit Thymidinüberhang (ca. 3,0 kb) - Einklonierung von PCR-Produkten, Selektion und Vermehrung in <i>E. coli</i>
pPIC 3.5 (Invitrogen, Karlsruhe)	- Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz und ColE1 ori (ca. 7,8 kb) zur Selektion und Vermehrung in <i>E. coli</i> - intrazelluläre Expression in <i>Pichia pastoris</i>
pQE-2 (Qiagen, Hilden)	- Expressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem (His) ₆ -Anhang zur Aufreinigung über Ni-NTA (ca. 4,8 kb) - Expression in <i>E. coli</i> M15 nach Induktion mit IPTG - Abspaltung des (His) ₆ -Anhangs durch DAPase
pQE-60 (Qiagen, Hilden)	- Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminalem (His) ₆ -Anhang zur Aufreinigung über Ni-NTA (ca. 3,4 kb) - Expression in <i>E. coli</i> M15 nach Induktion mit IPTG
pICH10990 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 3`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 6,4 kb) - Träger des Gene of Interest (GOI) - Resistenz gegen Carbenicillin
pICH 7410 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 3`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 7,1 kb) - Träger des Green Fluorescent Proteins (GFP), - Resistenz gegen Carbenicillin
pICH11280 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 5`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 12,6 kb) - exprimiert Fusionsproteine mit N-terminalem (His) ₆ -Anhang zur Aufreinigung über Ni-NTA - Resistenz gegen Carbenicillin
pICH8420 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 5`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 12,6 kb) - Träger einer Apoplast-Zielsequenz - Resistenz gegen Carbenicillin

pICH13480 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 5`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 10,9 kb) - Träger einer Apoplast-Zielsequenz - Resistenz gegen Kanamycin
pICH10530 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 5`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 12,7 kb) - Träger einer Chloroplast-Zielsequenz - Resistenz gegen Carbenicillin
pICH10570 (Icon Genetics, Halle)	- Expressionsvektor für 5`-Modul in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 12,5 kb) - Unveränderte Zielsequenz des GOI - Resistenz gegen Carbenicillin
pICH10881 (Icon Genetics, Halle)	- Integrasemodul zum Zusammenbau der 5`- und 3`-Module in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 12,2 kb) - Rekombinase, Arabidopsis actin 2 Promotor - Resistenz gegen Kanamycin
pICH14313 (Icon Genetics, Halle)	- Integrasemodul zum Zusammenbau der 5`- und 3`-Module in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ca. 11 kb) - Rekombinase, Spm transposase Promotor - Resistenz gegen Kanamycin

2. Nährmedien

2.1 Bakterienmedium

Sowohl die verwendeten *Escherichia coli* Stämme Top10 und M15 als auch *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurden in „lysogeny broth“-Medium (LB-Medium) nach BERTANI (1951) kultiviert.

Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 1 g/l NaCl, pH 7,0

Für LB-Kulturplatten wurden dem Medium 15 g Agar je Liter hinzugefügt. Selektives Wachstum der Bakterien wurde durch Zugabe von Antibiotika gewährleistet (Ampicillin 50 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Carbenicillin 50 µg/ml).

2.2 Hefemedien

YPD: 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Dextrose (Kulturplatten: Zugabe von 20 g/l Agar)

MD: 13,4 g/l YNB, 4×10^{-5} % Biotin, 20 g/l Dextrose

MGY: 13,4 g/l YNB, 1% (V/V) Glycerol, 4×10^{-5} % Biotin

MM: 13,4 g/l YNB, 4×10^{-5} % Biotin, 0,5 % (V/V) Methanol

RD: 13,4 g/l YNB, 4×10^{-5} % Biotin, 186 g/l Sorbitol, 20 g/l Dextrose, 0,005% Aminosäuren (Kulturplatten: Zugabe von 20 g/l Agar)

2.3 Sterilisation der Medien

Die Medien wurden im gesättigten Wasserdampf bei 121 °C für 30 min sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten (Antibiotika, IPTG) wurden mit Hilfe von Sterilisationsfiltern (Porengröße 0,22 µm) entkeimt.

3. Puffer

Die aufgelisteten Puffer wurden zum Teil in einer zehnfachen oder fünfzigfachen Konzentration angesetzt und bei Bedarf mit entsalztem Wasser verdünnt. Sterilisiert wurden sie durch Autoklavieren oder Sterilfiltration analog zu den Nährmedien. Die Einstellung von pH-Werten erfolgte mittels NaOH, KOH, HCl oder H₃PO₄. Einige Puffer wurden vor Gebrauch frisch angesetzt, da einige Inhaltsstoffe nicht stabil sind. KPi-Puffer wurden aus Stammlösungen von 1M K₂HPO₄ und 1M KH₂PO₄ durch Mischen und Verdünnen auf den gewünschten pH-Wert und die Konzentration hergestellt. Puffer für SDS- und Agarosegele werden im Methodenteil beschrieben.

Tabelle 2: Puffer

TAE	40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0
Ni-NTA Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Ni-NTA Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Ni-NTA Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
TAGZyme Puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,0
Infiltrationspuffer	10 mM MES, 10 mM MgSO ₄ , pH 5,5

Lysepuffer für Pflanzenzellen	150 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0,05% Triton-X-100
-------------------------------	---

4. Kits, Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie und Proteinkristallisation

Tabelle 3: Kits, Enzyme und Zubehör

Kristallisation	
Crystal Screen I/II	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Crystallization Basic Kit for Proteins, Crystallization Extension Kit for Proteins	Sigma (München)
TAGZyme DAPase Enzyme	Qiagen (Hilden)
EasyXtal Tool X-Seal OptiSalt Suite	Qiagen (Hilden)
VDX Plate	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Crystallization Tool	Nextal (Montreal, Kanada)
Siliconized Cover Slides Square	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Baysilone-Paste	Bayer (Leverkusen)
Molekularbiologie	
NucleoSpin Extract	Macherey & Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey & Nagel (Düren)
Oligonukleotide (Primer)	MWG Biotech (Ebersberg)
dNTP's	Promega (Mannheim)
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagen (Heidelberg)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Taq-DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
T ₄ -DNA Ligase	Promega (Mannheim)
Restriktionsenzyme	New England BioLabs (Frankfurt, Main)
λ-DNA Marker	New England BioLabs (Frankfurt, Main)

5. Säulen und Säulenmaterialien

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Produkte dienen der Aufreinigung und Umpufferung der heterolog exprimierten Enzyme oder der Auswertung durchgeführter Aktivitätstests mittels HPLC.

Tabelle 4: Säulen und Säulenmaterial

Leersäulen:	
HR 10/10 XK 16/20	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) (GE healthcare)
Fertigsäulen:	
MonoQ 5/5 HisTrap HP 1ml HiTrap Desalting 5ml	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) (GE healthcare)
LiChropher 60 RP select B column (HPLC)	Macherey & Nagel (Düren)
Säulenmaterial:	
Ni-NTA Superflow	Qiagen (Hilden)

6. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Produkt	Bezugsquelle
Microcon-, Centricon- und Centriprep-Konzentratoren (YM-10)	Amicon (Witten)
Antibiotika und Feinchemikalien v. a. für Molekulare Biologie, Agarose	AppliChem (Darmstadt)
PCR-Gefäße, Reaktionsgefäße	Biozym (Hess. Oldendorf)
Falkon-Röhrchen	Fischer Scientific (Schwerte)
Ampuwa (Wasser für die Molekular-Biologie)	Fresenius (Bad Homburg)
SDS	ICN (Eschwege)
Halbmikroküvetten	Intermedica (Klein-Winternheim)
Hefe-Extrakt, Pepton, Agar	Life Technologies (Eggenstein)
Acetonitril für die HPLC, Feinchemikalien, Greiner-Röhrchen	Merck (Darmstadt)
Sterile Kultur- und Zentrifugenröhrchen	Nalgene (Hamburg)
Trypton, Lagerboxen für Eppendorf-Caps	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Rundfilter Protran 0.45 µm	Schleicher & Schüll (Dassel)
Nitrocellulosemembranen, Servapor Dialyseschläuche, Coomassie Brilliant Blue G-250/R-250	Serva (Heidelberg)
Feinchemikalien	Sigma (München)

Alkaloide (Vinorin, Polyneuridinaldehyd, Gardneral)	Alkaloidsammlung der Pharmazeutischen Biologie (Mainz)
---	--

7. Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerätetyp und Herkunft	Verwendung
UV-Transilluminator (302 nm), <u>Bachhofer</u> , Reutlingen Canon Powershot G5 Digitalkamera	Agarosegeldokumentation
Aufreinigung mittels Äkta-Explorer: <u>Amersham Pharmacia</u> , Freiburg: Pumpen P-900 Durchflusszellen zur Messung von pH, Temperatur und Leitfähigkeit (22 µl, 88 µl) UV/VIS-Monitor UV-900 Auswertungssoftware: UNICORN Control System Betrieb der Anlage im MaxiColdLab-Kühlschrank, <u>LKB</u> , Schweden Aufreinigung mittels Peristaltikpumpe: IPC-Pumpe, <u>Ismatec</u> , Basel UV/VIS-Detektor 2158 UVICORD SD, <u>LKB Brommer</u> , Schweden Schreiber REC 102, <u>Pharmacia LKB</u> , Freiburg	Aufreinigung von Proteinen
Sonoplus Homogenisator HD 2070, <u>Bandelin</u> , Berlin	Aufschluss von Bakterien
Biophotometer, <u>Eppendorf</u> , Hamburg	Bestimmung der optischen Dichte, Bradfordtest
pH-Meter 537 und DIGI 500, <u>WTW</u> , Weilheim, 761 Calmatic, <u>Bacherhofer</u> , Reutlingen	Einstellung von pH-Werten
Elektrophoresekammern: BlueMarine 100 und 200 (horizontal), <u>Serva</u> , Heidelberg; SE 600 Hofer, <u>Amersham Pharmacia</u> ,	Elektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen

Freiburg; Netzgeräte: PowerPac 3000, <u>Biorad</u> , München; E835 und E844, <u>Consort</u> , Turnhout	
Easyject Optima, <u>Equibio</u> , Ashford, UK	Elektroporation
Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6, <u>Christ</u> , Osterode; Vakuumpumpe ADEB71N4R3, <u>AEG</u>	Gefriertrocknung
HPLC-System, <u>Merck-Hitachi</u> , Darmstadt: Pumpe L-6500, UV/VIS-Detektor L-4250, Autosampler AS-2500, Integrator D-2500	HPLC-Untersuchungen
Massenspektrometer Modell MAT 44 S, <u>Finnigan</u> , Bremen	Massenspektrometrie
Laborlux S, <u>Leitz</u> , Wetzlar, Stereomikroskop SM22-GT-14OF Polarisationseinrichtung WP II Dokumentation: Nikon Coolpix 4500	Mikroskopie
Mastercycler personal, <u>Eppendorf</u> , Hamburg Pyrogene Thermocycler, <u>thermo-DUX</u> , Wertheim	Polymerase-Kettenreaktion
Laminar-Flow-Box, <u>Fröbel Labortechnik</u> , Lindau NU 440 – 400E, <u>Zapf</u>	Sterilarbeiten
Thermoshake, <u>Gerhardt</u> , Bonn Thermomixer 5437, <u>Eppendorf</u> , Hamburg Brutschrank, <u>Memmert</u> , Schwabach Schüttelinkubatoren 1083 und 3032, <u>GFL</u> , Burgwedel Wasserbad F20 HC, <u>Julabo</u> , Seelbach	Temperieren
SONOREX RK 510 S, <u>Bandelin</u> , Berlin	Ultraschall-Wasserbad
Kühlzentrifuge J2-21, <u>Beckmann</u> , München Kühlzentrifuge Z 320K <u>Hermle</u> , Gosheim Kühlzentrifuge Universal 16/16 R, Rotanta/RP, <u>Hettich</u> , Tuttlingen Tischzentrifuge Biofuge 15, <u>Heraeus/Sepatech</u> , Osterode	Zentrifugation

III Methoden

1. Aufreinigung und Analyse von Proteinen

1.1 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus Bakterienkulturen

Um einen Enzymrohextrakt mit einer ausreichenden Konzentration des Zielproteins zu erhalten, wurden *E. coli* Zellen des Stamm M15, welche den pQE2 Vektor mit dem Zielgen enthielten, über Nacht in 10 ml LB Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) (LB-Kan, Amp) bei 37°C kultiviert. Diese Kulturen wurden je nach späterer Verwendung in unterschiedlichen Mengen LB-Kan, Amp überimpft. Nachdem die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten, erfolgt die Induktion der Zielgenexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Hierbei wurde die Expression der Vinorin-Synthase bei einer IPTG-Konzentration von 0,7 mM IPTG und die der Polyneuridinaldehyd-Esterase bei 1 mM IPTG durchgeführt. Die Expression erfolgte für 24 Stunden bei 24°C oder 37°C. Anschließend wurden die Bakterienkulturen bei 8000 x g für 7 min zentrifugiert. Die Pellets wurden je nach Verwendung in verschiedenen Puffern resuspendiert und unter Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Aufschluss mit Ultraschall von 5 x 10 Impulsen bei einer Nennleistung von 70 % des Ultraschallgerätes und Abzentrifugieren der Zelltrümmer für 25 min bei 32000 x g lag ein Proteinrohextrakt zur Weiterverarbeitung vor, welcher bei 4°C gelagert wurde.

1.2 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus *Pichia pastoris*

Einzelkolonien wurden in 20 ml MGY-Medium für 24 h bei 30 °C im Schüttler kultiviert. 300 ml MGY-Medium wurden mit 100 µl der Kultur angeimpft und wiederum für 24 h schüttelnd wachsen gelassen. Anschließend wurden 30 ml frisches MGY-Medium hinzugegeben und für weitere 18 h kultiviert, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 2,5 erreichten. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (1500 x g, 10 min), in 160 ml MM-Medium (Induktion durch Methanol) aufgenommen und in 1 l Schikanekolben überführt. Die Kultivierung wurde zur guten Versorgung mit Sauerstoff bei einer Schüttelfrequenz von 240 rpm bei 30°C durchgeführt. Bei einer erreichten OD₆₀₀ von 2 (nach etwa 24 h) wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 x g, 10 min), und der

Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 150 ml Aufschlusspuffer (10 mM KPi -Puffer (pH 7,5), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Hefezellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser zu sehr feinem Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in 10 ml Aufschlusspuffer aufgenommen, für 1 h auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (18000 x g, 15 min). Der Überstand wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert. Geringe Mengen für Tests mit SDS-Gelen wurden auch unter Verwendung von Glaskügelchen (0,5 mm) aufgeschlossen. Hierzu wurden 0,5 ml der Aufschlusspuffersuspension mit einer Spatelspitze Glaskügelchen vermischt, 5-mal „gevortext“ und zwischendurch auf Eis inkubiert (1 min). Anschließend wurden die Zelltrümmer sowie die Glaskügelchen abzentrifugiert (18000 x g, 5 min), und der Überstand weiter verwendet.

1.3 Gewinnung von Enzymrohextrakten aus *Nicotiana benthamiana*

Die nach bis zu zwei Wochen nach der Infiltration geernteten Blätter der Tabakpflanzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem abgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver homogenisiert. Das Pflanzenzellmaterial wurde in Lysepuffer aufgenommen und 15 min inkubiert. Nach Aufschluss mittels Ultraschall (siehe III.1.1) wurde die Suspension bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Nutschflasche vakuumfiltriert, um noch verbliebene Zelltrümmer abzutrennen. Der Durchfluss wurde wiederum zentrifugiert (60 min, 16000 x g), und so letzte feste Bestandteile aus der Lösung entfernt. Der entstandene Proteinrohextrakt wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

1.4 Affinitätschromatographie an einer Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA)

Das Prinzip dieser Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen, reversiblen Bindung der Aminosäure Histidin an Nickel²⁺-Ionen. Die Expression des Zielgens im Vektor pQE2 führt zu einem Fusionsprotein mit einem N-terminalen 6fach Histidin-Rest. Die verwendeten Nickel-Ionen sind über einen Chelatkomplex mit Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarosematrix gebunden. Durch den Histidin-Rest des exprimierten Enzyms bindet dieses im Vergleich zu Nicht-Fusionsproteinen aus einem Proteinrohextrakt besonders stark an die Oberfläche der Matrix. Als

Chromatographiesäulen wurden die Fertigsäule HisTrap HP oder die Leersäulen HR 10/10 und XK 16/20 verwendet, und mit 2 bis 5 ml Ni-NTA-Superflow beladen. Die Säulen wurden mit Ni-NTA-Lysepuffer äquilibriert. Für die Proteinrohextrakte wurde ebenfalls dieser Puffer verwendet. Die Flussrate lag bei etwa 1 ml/min. Nachdem der Rohextrakt auf die Säule geladen wurde, wurde diese mit Ni-NTA-Waschpuffer (Tabelle 2) so lange gespült, bis mittels UV-Absorption kein Protein im Durchfluss mehr detektiert werden konnte. Die Elution der noch gebundenen Proteine erfolgte kompetitiv über einen ansteigenden Imidazolgradienten durch kontinuierliche Erhöhung der Konzentrationen des Ni-NTA-Elutionspuffers oder durch direkten Wechsel vom Wasch- zum Elutionspuffer. Das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Detektion von Proteinen erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.

1.5 Aufreinigung von Enzym durch Anionenaustauscher- chromatographie

Zur letzten Entfernung von Proteinverunreinigungen nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde gegebenenfalls die Anionenaustauschersäule MonoQ 5/5 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen stark basischen Anionenaustauscher, der positiv geladene Tetraalkylammoniumgruppen als funktionelle Gruppen enthält. Die Säule wurde mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 äquilibriert. Die zu ladende Proteinlösung lag ebenfalls in diesem Puffer vor. Es wurde eine Flussrate von 1 ml/min benutzt. Nach Beladung der Säule mit der Proteinlösung wurden die gebundenen Proteine mittels eines ansteigenden linearen KCl-Gradienten (0 M – 0,5 M KCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) innerhalb von 60 min eluiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

1.6 Umpufferung von Proteinlösungen

Je nachdem wofür eine Proteinlösung verwendet werden sollte, war es notwendig die Proteine nach der Ni-NTA-Aufreinigung in einen anderen Puffer zu überführen. Hierzu wurden je nach Volumen der vorliegenden Lösung zwei unterschiedliche Verfahren angewendet, Dialyse und Entsalzungssäulen.

1.6.1 Dialyse

Um größere Mengen (ab 5 ml) an Proteinlösungen umzupuffern, wurden Dialyseschläuche benutzt. Diese Schläuche wiesen eine Molekulargewichtsausschlussgröße von 12 – 14 kDa auf und hatten einen Durchmesser von 16 oder 29 mm. Die Umpufferung erfolgte über Nacht bei 4°C gegen 5 l des gewünschten Puffers, wobei dieser stets 1 mM EDTA zur Komplexbildung eventuell vorliegender Ni-Ionen (außer bei der Dialyse in TAGZyme-Puffer) und 2,5 mM β -Merkaptoethanol (MSH) enthielt.

1.6.2 Umpufferung mit einer Entsalzungssäule

Geringe Mengen an Proteinlösung (weniger als 5 ml) wurden mit der Entsalzungssäule HiTrap Desalting[®] 5 ml umgepuffert. Die Matrix dieser Säule weist Poren einer so geringen Größe auf, dass Salze und andere Pufferbestandteile, aber nicht Proteine in sie eindringen können. Somit haben die niedermolekularen Substanzen eine längere Retentionszeit als die hochmolekularen Proteine. Zuerst wird die Säule mit dem Puffer äquilibriert, in dem das Protein nach der Umpufferung vorliegen soll. Anschließend kann sie mit bis zu 1,2 ml Proteinlösung beladen werden. Bei der Elution befinden sich die Proteine in dem 2. bis 4. ml.

1.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Bei verschiedenen Anwendungen von Proteinlösungen war es notwendig, die vorliegende Konzentration an Protein zu erhöhen (Kristallisation, SDS-Gel, Aktivitätstests). Die Konzentrierung erfolgte über Membranen mit definierter Ausschlussgröße. Salze und andere Pufferbestandteile, nicht aber Proteine können durch diese Membranen gelangen. Hierzu wurden je nach Volumen zwei unterschiedliche Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10000 Da benutzt. Lösungen von unter 2 ml wurden mit Hilfe der Centriprep YM10 Einwegkonzentratoren in einer Zentrifuge bei 3000 x g eingeengt. Größere Mengen wurden mittels Microcon YM10 oder YM30 Konzentratoren bei 10000 x g aufkonzentriert.

1.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen wurde modifiziert nach BRADFORD M (1976) durchgeführt. Bei dieser Methode macht man sich die Bindung von Coomassie Brillant Blue G 250 an kationische und unpolare Seitenketten von Aminosäuren zunutze. Das Absorptionsmaximum des Indikators verschiebt sich durch diese Bindung vom bräunlichen in den blauen Bereich. 50 µl Proteinlösung werden mit 950 µl Coomassie-Reagenz (MEYERS T und LAMBERTS B, 1965) für 5 min in einer Halbmikroküvette inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgt in einem Photometer bei 595 nm gegen eine Negativkontrolle. Die Proteinkonzentration wird anhand einer mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade berechnet. Die zu vermessende Lösung sollte einen Proteingehalt von 10 – 100 µg/ml aufweisen.

Coomassie-Reagenz: 50 mg Coomassie Brillant Blue G 250 in 50 ml Ethanol (96%) und 100 ml Essigsäure (85%) lösen. Im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnen und filtrieren. Lagerung bei 4 °C über mehrere Monate möglich.

1.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung und Größenbestimmung von Proteinen

1.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei einer elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen durch eine SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SHAPIRO A *et al.*, 1967). Sie dient der Überprüfung der Reinheit und Konzentration von gesammelten Proteinfractionen. Hierbei handelt es sich um eine denaturierende Gelelektrophorese, bei der das verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Detergenz die Eigenladung der Proteine überdeckt. Es lagert sich mit dem hydrophoben Teil in die Aminosäurekette ein, wodurch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen im Protein gespalten werden. Zusammen mit Hitzeeinwirkung und MSH, zur Spaltung von Disulfidbrücken, kommt es zur Auflösung der dreidimensionalen Struktur der Proteine. Somit entstehen Polypeptide mit konstanter, negativer Ladung pro Masseneinheit. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt daher fast

ausschließlich von der Größe der Aminosäureketten ab. Die Größe und ungefähre Mengen der eingesetzten Proben lassen sich anhand eines mitlaufenden Standards abschätzen.

Gelherstellung:

Das verwendete SDS-Gel besteht aus zwei Bereichen. Das Sammelgel, in dem sich die Proben befinden, ist so grobmaschig, dass hier die eingesetzten Proben zu einer scharfen Bande aufkonzentriert werden. Im engmaschigen Trenngel kommt es schließlich zur Auftrennung nach Molekülgröße. Zwischen zwei Glasplatten (16 x 18 cm; Distanz 1,5 mm) der Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur wurde zunächst die Trenngellösung gegossen und mit Wasser überschichtet, um bei der Polymerisation (45 min) eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Anschließend wurde das Wasser abgegossen und die Sammelgellösung aufgeschichtet. In diese wurde der Probenkamm eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation konnte das Gel mit den Proben beladen werden.

Verwendete Lösungen (LAEMMLI U, 1970):

Acrylamid-Stammlösung:

29,2 % (m/V) Acrylamid

0,8 % (m/V) Bis-Acrylamid

Sammelgellösung (5 %ig):

2,5 ml Acrylamid-Stammlösung

3,7 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

8,5 ml H₂O

(Sterilfiltriert und mittels Ultraschall entgast)

Direkt vor Gebrauch:

75 µl 20 % (m/V) SDS-Lösung

10 µl TEMED

200 µl 10 % (m/V) APS-Lösung

Trenngellösung (11 %ig):

11 ml Acrylamid-Stammlösung

7,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

11,2 ml H₂O

(Sterilfiltriert und mittels Ultraschall entgast)

Direkt vor Gebrauch:

150 µl 20 % (m/V) SDS-Lösung

20 µl TEMED

150 µl 10 % (m/V) APS-Lösung

Aufbereitung der aufzutragenden Proben:

Die Proteinlösungen wurden im Verhältnis 2:1 mit einem Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Das eingesetzte Gesamtvolumen lag zwischen 50 und 80 µl je Probentasche. Von der Markerproteinmischung wurden 20 µl aufgetragen.

Probenpuffer:

0,2 M Tris/HCl, pH 6,8
20 % (V/V) MSH
40 % (V/V) Glycerol
8 % (m/V) SDS
0,02 % (m/V) Bromphenolblau

Proteingrößenstandard (Marker):

Phosphorylase b	97 kDa
Albumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carbonic anhydrase	30 kDa
Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

Elektrophoreseablauf:

Eine SDS-PAGE mit einem 11 %igen Trenngel wurde meist über Nacht bei einer Stromstärke von 12 mA laufengelassen. Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreicht hatte. Diese Front entspricht in etwa einer Proteingröße von 15 kDa. Das Gel konnte für 4 h bei 35 mM laufen gelassen werden, was jedoch zu einem deutlich schlechteren Laufverhalten führte. Um auftretende Wärme bei der Elektrophorese abzuführen, wurde die Apparatur bei 4 °C gelagert.

1.9.2 Färbung von SDS-Gelen

Anfärbung von SDS-Gelen mittels Coomassie-Färbelösung:

Durch die Coomasie-Färbung (BLAKESLAY R und BOEZI J, 1977) können noch Banden mit bis zu 0,1 µg Protein sichtbar gemacht werden. Hierzu legt man das SDS-Gel für 1 h unter leichtem Schütteln in die Färbelösung, welche aus 0,25 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R 250, 45 % (V/V) Methanol und 9 % (V/V) Essigsäure in Wasser bestand. Anschließend folgte die Entfärbung des Gels durch eine Lösung aus 30 % (V/V) Methanol, 10 % Essigsäure und 60 % Wasser. Hierbei wurde die Entfärbelösung erwärmt und mehrfach gewechselt. Nach Beendigung hoben sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom fast vollständig entfärbten Hintergrund ab.

1.10 Abspaltung des N-terminalen Histidin-Restes durch Dipeptidyl-Aminopeptidase (DAPase)

Für die Kristallisation der Vinorin-Synthase war es notwendig den N-terminalen Histidin-Rest, welcher aus der Expression des Fusionsproteins durch den pQE2 Vektor entstand, abzuspalten. Diese Abspaltung wurde mittels des Kits TAGZyme DAPase Enzyme (Tabelle 3) vorgenommen. Hierzu musste die über Ni-NTA aufgereinigte Proteinlösung in TAGZyme Puffer (Tabelle 2) umgepuffert werden. Je mg Protein, das in der Lösung vorlag, wurden 5 µl DAPase (10 U/µl) zum Verdau hinzugefügt. Zur Aktivierung der DAPase wurde diese vor Gebrauch mit dem gleichen Volumen an Cysteamin-HCl-Lösung für 10 min inkubiert. Die DAPase spaltet schrittweise immer zwei Aminosäuren vom N-terminalen Ende der Proteine ab, bis ein interner Stopppunkt (eine unverdauliche Aminosäure) erreicht wird. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurde die DAPase und die abgespaltenen Histidine über eine Ni-NTA-Säule von der restlichen Proteinlösung abgetrennt. Diese Trennung ist möglich, da die DAPase selbst einen C-terminalen Histidin-Rest aufweist.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Verschiedene Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach MULLIS (SAIKI R *et al.*, 1988) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA. Als Matrize wurde vorliegende Plasmid-DNA verwendet. Die für die verschiedenen Anwendungen der PCR verwendeten Bestandteile können der Tabelle 3 entnommen werden und werden bei der näheren Beschreibung spezifiziert.

2.1.1 PCR zur Umklonierung von Zielgenen aus pQE60 in pQE2

Vorliegende pQE60 Plasmide, welche Gene für die putative Vomilenin-Reduktase und die 2β-(R)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase enthielten, zeigten in *E. coli* M15 Zellen keine Expression, bzw. konnten über eine Affinitätschromatographie durch Ni-NTA nicht aufgereinigt werden. pQE60 exprimiert ein Fusionsprotein mit C-

terminalem Histidin-Rest. Diese Plasmide dienten als Template für eine Umklonierung der Reduktasegene in pQE2 (N-terminaler Histidin-Rest). Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die komplementäre Sequenzen zum 5'- bzw. 3'-Ende der Reduktase-Inserts und überhängende Bereiche mit der Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen der „multiple cloning site“ des pQE2 Vektors aufwiesen. Als Polymerase wurde das Enzym *Pfu*-Turbo (Tabelle 3) verwendet. Beim letzten Amplifizierungsdurchgang erfolgte eine Zugabe von *Taq*-Polymerase, um einen 3'-Adenosinüberhang an die Enden der vervielfältigten DNA-Fragmente anzufügen. Hierdurch wurde die Ligation in den Vektor pGEM-T easy (5'-Thymidinüberhang) ermöglicht (III.2.2).

PCR-Ansatz:

1 µl	Matrizen-DNA
1 µl	Primer (forward) (10 µM)
1 µl	Primer (reverse) (10 µM)
1 µl	dNTP-Mix (20 mM/dNTPs)
2 µl	10 x <i>Pfu</i> -Puffer
1 µl	<i>Pfu</i> Turbo-Polymerase (<i>Taq</i> -Polymerase)
13 µl	Ampuwa-Wasser

Die PCRs wurden als „Hotstart“-Reaktionen durchgeführt. Unter „Hotstart“ versteht man, dass die verwendete Polymerase erst dann den Ansätzen hinzugefügt wird, wenn die gesamte vorliegende doppelsträngige DNA geschmolzen ist. Hierzu wurden die Proben vor dem ersten PCR-Zyklus für 2 min bei 98°C inkubiert. Dabei wird verhindert, dass es zu unerwünschten Amplifikationen durch unspezifische Bindung von Primern bei niedrigen Temperaturen kommt.

PCR-Verlauf:

98 °C	2 min	
98 °C	30 sek	} 35 x
52 °C-60 °C	30 sek	
72 °C	1 min 30 sek	
72 °C	10 min	

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Ansätze bei 4°C gelagert. Nach durchgeführter PCR erfolgte eine Aufreinigung der Amplifikate über ein Agarosegel (III.2.3.1), eine Ligation in das multi-copy-Plasmid pGEM-T easy (III.2.2) und die Transformation in Top10 *E. coli* Zellen (III.2.4). Die Plasmide wurden aus 10 ml einer Übernachtskultur isoliert und mit den in der Primersequenz festgelegten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Nach Aufreinigung der herausgeschnittenen Inserts und der restringierten pQE2-DNA wurden diese beiden Fragmente ligiert.

2.1.2 Einfügen von Punktmutationen durch PCR

Untersuchungen der Bedeutung einzelner Aminosäuren der Vinorin-Synthase wurden durch das Einfügen von Punktmutationen innerhalb des Inserts im pQE2 Vektor vorgenommen. Diese Mutagenese-PCRs wurden ähnlich der Anleitung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) durchgeführt. Als Primer dienten komplementäre, etwa 30-35 Basen lange Oligonukleotide, welche sich nur in dem Codon von der Matrizen-DNA unterschieden, welches für die gewünschte Mutation codiert. Bei dieser PCR-Methode wird der gesamte Vektor mit Insert amplifiziert. Nach durchgeführter PCR erfolgte ein Verdau der Template-DNA durch das Restriktionsenzym *DpnI*. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (III.2.3.1) und in *E. coli* Top10-Zellen transformiert (III.2.4.2.2).

2.2 Ligation und Restriktion von DNA

2.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch eine Ligation werden DNA-Fragmente miteinander verknüpft. Diese Ligationen wurden mit Hilfe der T₄-Ligase (Tabelle 3) durchgeführt. Es wurden sowohl PCR-Produkte, die einen durch die Taq-Polymerase angefügten 3'-Adenosinüberhang besaßen, mit dem pGEM-T easy Vektor ligiert, als auch durch Restriktionen geschnittene Inserts mit anderen Vektoren. Die Reaktionen wurden unter Verwendung des mitgelieferten 10 x Puffers über Nacht bei 12°C durchgeführt.

Ligationsansatz:

3 – 5 µl Insert-DNA (aus Agarosegel gereinigt (III.2.3.1))

2 µl 10 x Ligasepuffer

1 µl Vektor

1 µl T₄-Ligase (3 U/µl)

Add. 20 µl H₂O

2.2.2 Restriktionsverdau von DNA

Bei einem Restriktionsverdau werden Enzyme eingesetzt, die DNA sequenzspezifisch schneiden. Häufig wird hierbei ein spezifischer Einzelstrangüberhang generiert, der für gerichtete Ligationen verwendet wird. Für Restriktionen wurden aufgereinigte Plasmide verwendet (III.2.3). Die Inkubationen erfolgten für 2 h bei 37 °C.

Restriktionsansatz:

2 µl – 7 µl Plasmid-DNA (je nach Konzentration)

2 µl 10 x Puffer (speziell für verwendetes Enzym mitgeliefert)

1 µl Restriktionsendonuklease (Konzentration je nach Aktivität des Enzyms)

add. 20 µl Ampuwa-Wasser

2.3 Aufreinigung von DNA

Zur weiteren Verwendung von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten war es nötig, diese auf unterschiedliche Weise aufzureinigen. Hierzu zählen die Aufreinigung über Agarosegele (Plasmide, PCR-Produkte, Restriktionsfragmente) und die Isolation aus *E. coli* Top10-Zellen (Plasmide).

2.3.1 Aufreinigung und Analyse von DNA mittels Agarosegele

DNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dieses Gel wurde aus Agarose (1 g/100 ml) und TAE-Puffer (Tabelle 2) hergestellt, indem es aufgekocht, und der dabei entstandene Gewichtsverlust durch Zugabe von Wasser ausgeglichen wurde. Zur Visualisierung der DNA wurde der Lösung

Ethidiumbromid (3,5 µl einer 10 mg/ml Lösung je 100 ml) zugesetzt, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht (302 nm) fluoresziert. Bei einer Temperatur von etwa 55°C wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen und bis zur Erhärtung abgekühlt. Die DNA-Proben wurden in Geltaschen von 25 – 70 µl Volumen pipettiert. Die Elektrophorese lief je nach Größe der verwendeten Gelkammer bei einer Spannung von 75 bis 125 V. Anhand eines aufgetragenen Markers konnten sowohl die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente, als auch deren ungefähre Konzentration bestimmt werden.

Zur Aufreinigung der gewünschten DNA wurden die Banden der entsprechenden Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten, und die enthaltene DNA mit dem NucleoSpin Extract Kit (Tabelle 3) über Auflösung des Gelstücks und Bindung der DNA an eine Membran nach Anleitung des Herstellers eluiert. Die Lösung der DNA von der Membran erfolgte entgegen dem Protokoll mit sterilem Wasser (Ampuwa, Tabelle 5).

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Top10-Zellen

Je nach Menge der zu bearbeitenden Proben und der benötigten Reinheit der Plasmid-DNA wurden zwei unterschiedliche Methoden der Plasmidaufreinigung angewendet.

2.3.2.1 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA aus vielen Proben ohne einen hohen Anspruch an die Reinheit wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (BIRNBOIM H und DOLY J, 1997). Dazu werden 2 ml Bakterien-Übernachtskultur abzentrifugiert. Das entstandene Pellet in 125 µl Resuspendierungspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glukose) gelöst und nach Zugabe von 270 µl basischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH; 1 % (m/V) SDS) 5 min bei RT inkubiert. Hierbei wurden die Zellen lysiert. Die freigesetzten Proteine wurden mittels 200 µl kaltem 3 M Kaliumacetatpuffer (pH 5,5) gefällt und konnten zusammen mit den übrigen Zelltrümmern abzentrifugiert werden (14000 x g, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen, und die enthaltenen Nukleinsäuren mit 600 µl kaltem Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation (14000 x g, 20 min) pelletiert.

Der Niederschlag wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in einer RNase-Lösung (SAMBROOK *et al.*, 2001) aufgenommen.

2.3.2.2 Isolation hochreiner Plasmid-DNA

Die Isolation von hochreiner Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Tabelle 3) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Entgegen dem Protokoll erfolgte die Elution der Plasmide von der verwendeten Säulenmembran jedoch mit Ampuwa-Wasser (Tabelle 5). Die resultierenden hochreinen Plasmide wurden für Restriktionen mit empfindlichen Enzymen sowie für die DNA-Sequenzierungen bei der Firma Genterprise (Mainz) benötigt.

2.4 Herstellung kompetenter Wirtsorganismen und Einschleusung der Fremd-DNA

2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien und Hefen

Unter kompetenten Zellen versteht man solche, die in der Lage sind unter bestimmten Bedingungen fremde DNA aufzunehmen. Je nach Organismus und angewandeter Transformationstechnik (III.5.2) müssen diese Organismen unterschiedlichen Vorbehandlungen unterzogen werden.

2.4.1.1 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli*-Zellen zu befähigen fremde DNA durch einen Hitzeschock aufzunehmen, wurde 1 l einer Bakterienkultur (Top10, M15) bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert (HANAHAN D, 1985). Nach Abkühlung der Kultur auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 x g, 4°C). Das entstandene Bakterienpellet wurde in TfB-I-Puffer resuspendiert und auf Eis für 1 h gelagert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (5 min, 1000 x g, 4°C), der Überstand dekantiert, und das Pellet mit möglichst geringen Scherkräften in 2 - 4 ml TfB-II-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Verwendete Puffer:

TfB I: 100 mM RbCl	TfB II: 75 mM CaCl ₂
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM KOAc	10 mM MOPS
10 mM CaCl ₂	15 % (V/V) Glycerol
15 % (V/V) Glycerol	pH 6,8 mit KOH eingestellt
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt	

2.4.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Elektroporation ist eine Methode zur Transformation, bei der Zellen einer starken elektrischen Spannung ausgesetzt werden und dabei DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Um *E. coli* (Top10, M15) zu dieser Aufnahme zu befähigen, wurde die Herstellung nach DOWER *W et al.* (1988) angewendet. Hierbei wurde 1 l einer Bakterienkultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Nach Abkühlung auf Eis wurden die enthaltenen Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterien in 1 l autoklaviertem, salzfreiem und eiskaltem Wasser resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem Ampuwa-H₂O (Tabelle 5) mit 15 % (V/V) Glycerol gelöst, zu 50 µl Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.1.3 Herstellung von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens*

Um die Agrobakterien (Stamm GV3101) elektrokompetent zu machen, wurde eine 200 ml Bakterienkultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin) bei 28°C für 24 h unter Schütteln angezogen. Die Lösung wurde auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (10 min, 3000 x g, 4°C). Das entstandene Bakterienpellet wurde dreimal mit sterilem, eiskaltem 10 %igem Glycerol (V/V in H₂O) gewaschen (resuspendiert und abzentrifugiert). Die gereinigten Zellen wurden schließlich in 2 – 4 ml der Waschlösung aufgenommen, zu jeweils 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.1.4 Herstellung elektrokompetenter Hefezellen (*Pichia pastoris*, GS115)

Als eukaryotisches Expressionssystem wurde die Hefe *Pichia pastoris* (II.1.2) verwendet. Zur Transformation dieser Zellen mit dem Expressionsvektor pPIC 3.5 (Tabelle 1) mussten diese ebenfalls elektrokompetent gemacht werden. Hierzu wurden die Hefen auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C kultiviert. Einzelkolonien wurden gepickt und in 5 ml YPD-Flüssigmedium angezogen. Mit dieser Lösung wurden 500 ml YPD-Medium angeimpft und in Schikanekolben unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 wachsen gelassen. Die Nährlösung wurde auf Eis abgekühlt und 50 ml abzentrifugiert (1500 x g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde erst in 500 ml und anschließend in 250 ml autoklaviertem, salzfreiem und eiskaltem Wasser gewaschen (gelöst und zentrifugiert). Die gereinigten Hefezellen wurden zuletzt in 20 ml 1 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Zur Elektroporation wurden nur frisch hergestellte, elektrokompetente Hefezellen verwendet.

2.4.2 Transformation

Die angewendeten Transformationstechniken dienen dazu, Fremd-DNA in einen Wirtsorganismus einzuführen. Für diese Transformationen wurden entweder Verdünnungen von Plasmidisolaten oder Teile von Ligationsansätzen benutzt. Als Methoden wurden die Elektroporation oder der Hitzeschock gebraucht.

2.4.2.1 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die hitzekompetenten Bakterienaliquots wurden auf Eis lagernd aufgetaut. 2 - 10 µl Plasmidlösung wurden unter weitgehender Vermeidung auftretender Scherkräfte mit den Zellen vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Ansätze für 90 s einem Hitzeschock von 39°C ausgesetzt und direkt für 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration der Zellen und anlaufenden Expression der mit den Plasmiden eingeführten Resistenzgene (pGEM-T easy und pQE2 enthalten Gen für die β-Lactamase und codieren somit für eine Ampicillinresistenz) wurden die Zellen

für 2 h in 400 µl LB-Medium bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden sie auf Selektiv-LB-Agarplatten ((II.2.1) Top10: LB-Amp und M15 LB-Kan+Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen.

2.4.2.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die elektrokompenten Bakterien (Top10, M15) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 – 5 µl Plasmidlösung vermennt. Nach 1 min Lagerung auf Eis wurde die Mischung in vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvetten pipettiert und im Elektroporationsgerät platziert (Tabelle 6). Es wurde ein Puls von 5,5 ms bei einer angelegten Spannung von 2500 V ausgelöst. Sofort wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und für 2 h bei 37°C regeneriert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der in III.2.4.2.1 beschriebenen.

2.4.2.3 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* durch Elektroporation

Nachdem die kompetenten Bakterien aufgetaut und mit der Fremd-DNA (5 µl) vermischt waren, wurden sie für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Ansätze in kalten 2 mm-Elektroporationsküvetten einem Puls von 2200 V ausgesetzt und mit LB-Medium versetzt. Die Bakteriennährlösung wurde für 3 h bei 28°C im Schüttler inkubiert. Je nach Vektor wurden die Agrobakterien auf Carbenicillin (50 µg/ml)- oder Kanamycin (25 µg/ml)-haltigen Selektiv-LB-Agarplatten ausgestrichen.

2.4.2.4 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation

Die Fraktionen der frisch hergestellten, elektrokompenten Hefezellen wurden mit 2 -10 µg durch Restriktion linearisierter und aufgereinigter Vektor-DNA gemischt und nach kurzer Inkubation auf Eis in 2 mm-Elektroporationsküvetten pipettiert. Die Zellen wurden für 10 ms einem Puls von 1500 V ausgesetzt und direkt in 1 ml kaltes 1 M Sorbitol überführt. Die Lösung wurde auf RD-Agarplatten ausgestrichen und für 4 bis 5 Tage bis zum Auftreten von Einzelkolonien bei 30°C inkubiert.

2.5 Infektion von *Nicotiana benthamiana* durch Infiltration von Tabak-Mosaikvirus basierenden Modulen über *Agrobacterium tumefaciens*

Für eine erfolgreiche Infiltration der Tabakpflanzen wurden Kulturen der mit den jeweiligen 3´-, 5´- und Integrasemodulen (Tabelle 1) transformierten Agrobakterien im jeweils selektivem, antibiotikahaltigem LB-Medium angezogen. Hierbei trugen die verwendeten 3´-Module das zu untersuchende Zielgen (pICH10990) oder das Gen für GFP (pICH 7410) als Positivkontrolle. Die *tool*-Charakter (Zielsequenz, His-Fusionssequenz) der 5´-Module sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Als Träger der Integrasegene (sequenzspezifische Rekombinase) wurden die Module pICH10881 und pICH14313 benutzt. Je nach der Menge der zu infiltrierenden Pflanzen (-teilen) wurden unterschiedliche Volumina der Kulturen angezogen. Um erste Tests durchzuführen, wurden Einzelkolonien der rekombinanten Zellen in jeweils 10 ml Selektionsmedium für etwa 36 h bei 28 °C kultiviert. Von den zu kombinierenden 3´- und 5´-Modul tragenden Kulturen und der Integrasekultur wurden jeweils 500 µl vereinigt und abzentrifugiert (4000 x g, 5 min). Das aus der Zellmischung entstandene Pellet wurde in 2 ml Infiltrationspuffer (Tabelle 2) aufgenommen und mittels einer Spritze in die Unterseiten der Tabakblätter injiziert.

3. Durchgeführte Aktivitätstests

Für alle durchgeführten Expressionsvarianten der untersuchten Enzyme wurden unterschiedliche Aktivitätstests durchgeführt. Hierbei erfolgten diese Tests anhand von Proteinrohextrakten oder aufgereinigten Proteinlösungen. Der Umsatz der eingesetzten Substrate zu den jeweiligen Produkten wurde durch eine anschließende HPLC überprüft.

3.1 Durchführung des Aktivitätstest für die putative Vomilenin-Reduktase

Das als Substrat eingesetzte Vomilenin wurde teilweise der Alkaloidsammlung der Pharmazeutischen Biologie (Mainz) entnommen, aber auch selbst aus Wurzelzellkulturen von *Rauvolfia serpentina* isoliert (III.4). Vomilenin-Reduktase setzt

Vomilenin mit dem Cosubstrat NADPH₂ in 1,2-Dihydrovomilenen um. Diese beiden Alkaloide lassen sich durch ein HPLC-Verfahren auftrennen, und so eine eventuelle Aktivität des Enzyms nachweisen.

Testansätze:

20 µl	0,5 M KP _i -Puffer, pH 7,0
20 µl	20 mM NADPH ₂ (in H ₂ O)
5 µl	5,65 mM Vomilenin (in Methanol)
variabel	Enzymmenge
add. 200 µl mit H ₂ O	

Die Ansätze wurden für Zeiträume von 5 min bis zu 2 h beim Temperaturoptimum der Vomilenin-Reduktase von 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Methanol gestoppt, und die dadurch ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (18000 x g, 5 min). Der Überstand wurde für die HPLC verwendet.

HPLC-Parameter:

Vorsäule:	RP-Select B (4 x 4 mm)		
Trennsäule:	LiChrospher 60 RP-Select B (250 x 4 mm)		
Inj.-Volumen:	50 µl		
Laufmittel A:	Acetonitril		
Laufmittel B:	25 mM K ₂ HPO ₄ , 0,45 % (V/V) 85 %ige Phosphorsäure (entgast)		
Flussrate:	1,68 ml/min		
Wellenlänge:	250 nm		
Gradient:	Minuten	Laufmittel A	Laufmittel B
	0	28 %	72 %
	4	30 %	70 %
	6	35 %	65 %
	6,1	28 %	72 %
	10	28 %	72 %

Die aufgetretene Aktivität wurde durch die Absorption der Alkaloide bei 250 nm Wellenlänge und automatischer Integration der aufgezeichneten Peakflächen ermittelt.

3.2 Durchführung des Aktivitätstest für die putative 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Aktivitätstests für die 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase konnten nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden, da das Substrat erst am Ende der durchgeführten Arbeiten und in sehr geringer Konzentration in einer Alkaloidmischung zur Verfügung stand.

Testansätze:

5 μ l	0,5 M KP_i -Puffer, pH 7,0
5 μ l	20 mM NADPH ₂ (in H ₂ O)
5 μ l	Alkaloid-Mischlösung (in Methanol)
variabel	Enzymmenge
add. 50 μ l	mit H ₂ O

Die weitere Durchführung entspricht der für die Vomilenin-Reduktase angewendeten.

3.3 Durchführung des Aktivitätstests für die Polyneuridinaldehyd-Esterase

Der verwendete Polyneuridinaldehyd wurde der Alkaloidsammlung der Pharmazeutischen Biologie (Mainz) entnommen. Die Polyneuridinaldehyd-Esterase katalysiert die Reaktion von Polyneuridinaldehyd zu 16-epi-Vellosimin unter der Abspaltung von CO₂ und Methanol. Das Produkt 16-epi-Vellosimin ist sehr instabil und epimerisiert am C-16 spontan zu Vellosimin.

Testansätze:

5 µl	50 mM KP_i -Puffer, pH 7,0
5 µl	Polyneuridinaldehyd (1 mg/ml in Ethanol)
variabel	Enzymmenge
add. 50 µl	mit H_2O

Die Ansätze wurden unter leichtem Schütteln für 30 min bei 35°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 0,1 N HCl und 5 µl einer 1 %igen $NaBH_4$ Lösung (10 mM NaOH) zugegeben. Hierbei wurde Polyneuridinaldehyd zu Polyneuridin und 16-epi-Vellosimin und Vellosimin zu 16-epi-Deoxysarpagin bzw. 10-Deoxysarpagin reduziert, was zu einer schärferen Auftrennung im HPLC-Chromatogramm führte. Die Denaturierung der enthaltenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 90 µl Methanol. Nach Zentrifugation (18000 x g, 5 min) wurde der Überstand für die HPLC verwendet.

HPLC-Parameter:

Vorsäule:	RP-Select B (4 x 4 mm)		
Trennsäule:	LiChropher 60 RP-Select B (250 x 4 mm)		
Inj.-Volumen:	100 µl		
Laufmittel A:	Acetonitril		
Laufmittel B:	steriles Wasser, pH 2,3 (entgast)		
Flussrate:	1,5 ml/min		
Wellenlänge:	225 nm		
Gradient:	Minuten	Laufmittel A	Laufmittel B
	0	28 %	72 %
	9	35 %	65 %
	9,5	80 %	20 %
	11,5	80 %	20 %
	12	28 %	72 %
	20	28 %	72 %

Die aufgetretene Aktivität wurde durch die Absorption der Alkaloide bei 225 nm Wellenlänge und automatischer Integration der aufgezeichneten Peakflächen ermittelt.

3.4 Durchführung des Aktivitätstests für die Vinorin-Synthase

In vivo setzt die Vinorin-Synthase das bei der enzymatischen Reaktion der Polyneuridinaldehyd-Esterase entstehende 16-epi-Vellosimin mit dem Cosubstrat Acetyl-CoA zu Vinorin um. Da das 16-epi-Vellosimin durch seine Instabilität für Aktivitätstests nicht zur Verfügung stand, und Vellosimin als Substrat von der Vinorin-Synthase nicht akzeptiert wird, wurde Gardneral (11-Methoxy-derivat des 16-epi-Vellosimins) verwendet (GOLDHAMMER A, 2001). Gardneral zeigt eine wesentlich geringere Tendenz zur Epimerbildung am C-16 und ist somit stabiler.

Testansätze:

- 20 µl Acetyl-CoA (4 mM)
- 5 µl Gardneral (0,723 mM in Methanol)
- variabel Enzymmenge
- add. 100 µl mit 0,1 M KP_i , pH 7

Die Proben wurden für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden 2 µl 0,1 N HCl und 5 µl 1 %ige $NaBH_4$ Lösung (10 mM NaOH) beigemischt, um das Substrat zu 16-epi-11-Methoxy-10-Deoxysarpagin und das Produkt zu 11-Methoxy-Vinorin zur schärferen Trennung zu reduzieren. Danach wurden die Proteine mit 200 µl Methanol denaturiert, zentrifugiert (18000 x g, 5 min) und der Überstand durch HPLC analysiert.

HPLC-Parameter:

Vorsäule:	RP-Select B (4 x 4 mm)		
Trennsäule:	LiChropher 60 RP-Select B (250 x 4 mm)		
Inj.-Volumen:	20 µl		
Laufmittel A:	Acetonitril		
Laufmittel B:	steriles Wasser, pH 2,3 (entgast)		
Flussrate:	1 ml/min		
Wellenlänge:	225 nm		
Gradient:	Minuten	Laufmittel A	Laufmittel B
	0	28 %	72 %
	6	35 %	65 %
	6,5	80 %	20 %
	8,5	80 %	20 %
	9	28 %	72 %
	14	28 %	72 %

Die Aktivität der Vinorin-Synthase konnte anhand der integrierten Peaks untersucht werden.

4. Aufreinigung und Identifizierung von Alkaloiden

4.1 Isolation von Vinorin und Vomilenin aus Wurzelzellkulturen

Die verwendeten Alkaloide für die durchgeführten Aktivitätstests und Kristallisationsversuche wurden hauptsächlich der Alkaloidsammlung der Pharmazeutischen Biologie (Mainz) entnommen. Des Weiteren erfolgte aber auch eine eigenständige Aufreinigung der Alkaloide Vinorin und Vomilenin aus Wurzelzellkulturen (hairy roots) von *Rauvolfia serpentina* (RUPPERT M, 2001, FALKENHAGEN H *et al.*, 1993). Die Wurzelkulturen wurden bei Dunkelheit und Raumtemperatur angezogen. Durch ihr langsames Wachstum erfolgte die Ernte erst nach zwölf Wochen nach Überimpfung. Die Kultivierung erfolgte in B5-Medium nach GAMBORG O *et al.* (1986). Nach der Ernte wurden die Wurzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet, wobei sie einen Gewichtsverlust von über 90

% aufwiesen. 40 g getrocknete Wurzeln wurden in einem abgekühlten Mörser zu feinem Pulver homogenisiert und in 1 l Methanol aufgenommen. Diese Suspension wurde für 1 h im Ultraschallbad inkubiert und anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert. Der Rückstand wurde wiederum in 1 l Methanol im Ultraschallbad extrahiert und erneut filtriert. Der dritte Extraktionsschritt wurde über Nacht in 500 ml Methanol durchgeführt. Die drei methanolischen Alkaloidextrakte wurden vereinigt, und das Methanol im Rotationsverdampfer entfernt. Es entstand ein Rückstand von etwa 1 g. Dieser wurde in 1 l 0,1 M Natrium-Bicarbonat-Puffer aufgenommen. Es folgten drei Ausschütteldurchgänge der Lösung mit Ethylacetat (2 x 1 l und 1 x 0,5 l). Die Ethylacetatfraktionen wurden vereinigt und auf 500 ml eingeeengt. Das Konzentrat wurde wiederum dreimal mit 500 ml schwefelsaurem Wasser (pH 2) ausgeschüttelt. Der saure Extrakt wurde mit 5 M NaOH auf pH 9 eingestellt und dreimal mit Toluol extrahiert (1 x 2 l und 2 x 1 l). Nach jedem Durchgang wurde der pH-Wert erneut auf 9 eingestellt. Das Toluol der vereinigten Extrakte wurde im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wurde in 150 ml Methanol / Dichlormethan / Ammoniak (1 / 9 / 0,2) aufgenommen. Eine durchgeführte Dünnschichtchromatographie als Kontrolle zeigte deutliche Banden von Vinorin und Vomilenin. Hierfür wurden Kieselgel DC-Platten 60 F₂₅₄ (0,2 mm Schichtdicke) mit Methanol gewaschen, und die Proben punktförmig aufgetragen. Als Fließmittel wurde Methanol / Dichlormethan / Ammoniak (1 / 9 / 0,2) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung der DC-Platten) und nach Besprühen mit 5 % Ammonium-Cer-Sulfat-Lösung in 85 %iger Schwefelsäure bei Tageslicht und 366 nm. Um nun eine präparative Isolierung der beiden Alkaloide durchzuführen, wurde eine Flash-Chromatographie durchgeführt (STILL W *et al.*, 1978). Hierzu wurde eine Glassäule (Durchmesser 4 cm) gleichmäßig mit Kieselgel (Silicagel 60, Korngröße 40 – 63 µm) bis zu einer Höhe von 40 cm beladen. Das Gelbett wurde mit gewaschenem Sand überschichtet, um Verwirbelungen des Kieselgels zu vermeiden, und mit Dichlormethan äquilibriert. Die verwendete Flussrate von etwa 5 ml/min wurde über einen angelegten Überdruck gesteuert. Die Alkaloidlösung wurde in drei Fraktionen von jeweils 50 ml auf die Säule aufgetragen. Nachdem eine Fraktion in das Gelbett eingesickert war, wurde die Säule mit 250 ml Dichlormethan gewaschen. Die Elution erfolgte durch ein Fließmittel aus 1,5 % und zuletzt 2,5 % Methanol in Dichlormethan. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf ihren Gehalt und die Reinheit an Vinorin und

Vomilenin hin untersucht. Die jeweils reinen Fraktionen wurde vereinigt, und die verunreinigten erneut der Säulenchromatographie unterzogen. Diejenigen Fraktionen, die reines Vinorin bzw. Vomilenin aufwiesen, wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer eingedampft. Die Alkaloide wurden mittels HPLC (III.3) und das Vinorin zusätzlich durch Massenspektrometrie identifiziert.

4.2 Massenspektrometrie

Die Bande einer Dünnschichtchromatographieplatte, die vermutlich Vinorin entsprach, wurde ausgekratzt. Das alkaloidhaltige Kieselgel wurde in eine mit Watte als Filtermaterial gefüllte Pipettenspitze gefüllt. Die Elution des Vinorins aus dem Gel erfolgte mit 250 µl Dichlormethan / Methanol (7 / 3). Durch Inertgas (Stickstoff) wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Alkaloid wurde in 25 µl Dichlormethan aufgenommen, und 5 µl dieser Lösung in einen Aluminiumtiegel gefüllt und eingetrocknet. Über einen Direkteinlass zwischen 100 °C und 320 °C wurde die Probe bei einer Ionenquellentemperatur von 200 °C verdampft. Das Massenspektrum wurde durch Elektronenstoß-Ionisation bei 70 eV aufgenommen.

5. Proteinkristallisation

Die Kristallisation von Proteinen ist eine Voraussetzung, um eine Röntgenstrukturanalyse durchführen zu können. Über diese Röntgenstrukturanalyse lässt sich der dreidimensionale Aufbau eines Proteins auf molekularer Ebene mit einer Auflösung im niedrigen Ångstroem-Bereich vornehmen. Zur Herstellung solcher Kristalle ist eine hohe Reinheit und Menge des verwendeten Proteins notwendig. Die zu kristallisierenden Enzyme, Vinorin-Synthase und Polyneuridinaldehyd-Esterase, wurden hierfür in *E. coli*-Zellen heterolog exprimiert und aufgereinigt.

5.1 Angewendete kristallographische Methoden

Im Verlauf der durchgeführten Proteinkristallisationen wurden unterschiedliche Techniken angewendet.

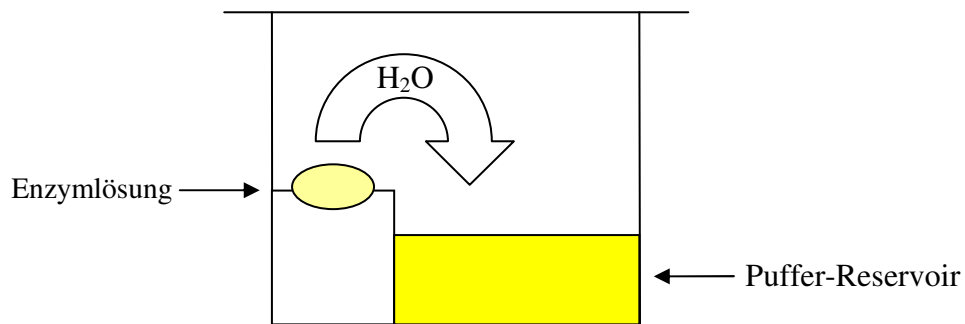
5.1.1 Hanging- und Sitting-Drop

Bei der Hanging- und Sitting-Drop-Methode handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Kristallisation aufgrund eines Konzentrationsausgleichs zwischen zwei unterschiedlich konzentrierten Puffern über eine Gasphase zustande kommt. Hierbei erfolgt die Diffusion von Wasser aus einem proteinhaltigen Tropfen mit geringerer Pufferkonzentration hin zu einem Reservoir mit einem höher konzentrierten Puffer. Nach Ausgleich der Konzentrationen besteht bei der Verwendung von Silikonöl zur Abdichtung noch ein länger andauernder Prozess der Pufferkonzentrierung durch Verdunstung aus der Kammer. Bei beiden Vorgängen erhöht sich zwangsläufig die Protein- und Pufferkonzentration in dem Tropfen. Unter günstigen Bedingungen kann es so zu einer Keimbildung und zum Wachstum von Proteinkristallen kommen.

Für die durchgeführten Kristallisationsversuche mit der Vinorin-Synthase wurde ausschließlich die Hanging-Drop-Methode angewendet. Für die Kristallisation der Polyneuridinaldehyd-Esterase wurden, neben den weiter unten beschriebenen Methoden, sowohl das Sitting- als auch das Hanging-Drop-Verfahren benutzt.

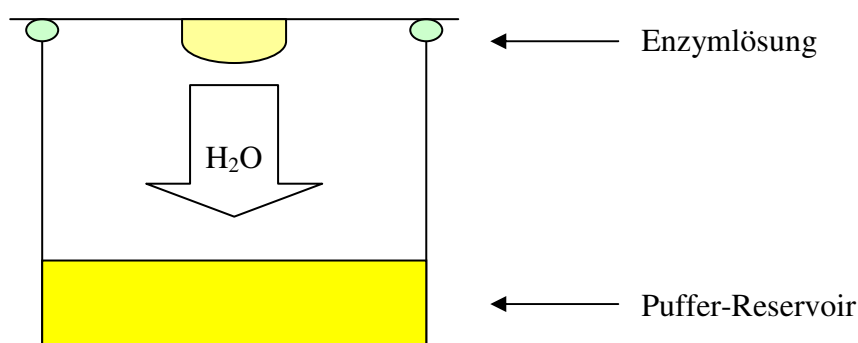
5.1.1.1 Sitting-Drop

Die Sitting-Drop-Methode wurde hauptsächlich bei roboterbetriebenen „High Throughput“-Screenings, aber auch bei handpipettierten Kristallisationsansätzen verwendet. Diese Methode wurde bei von Robotern pipettierten Ansätzen der Polyneuridinaldehyd-Esterase, bei denen hunderte von verschiedenen Pufferbedingungen getestet wurden, angewendet. Diese Tests wurden im European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Hamburg durchgeführt, wobei es möglich war, sehr geringe Lösungsmengen (200 nl Tropfen- und 1000 nl Reservoir-Volumen) zu verwenden. Die Inkubation erfolgte bei 20°C. Eine regelmäßige Kontrolle der Kristallplatten mit jeweils 96 Einzelkammern erfolgte teilweise über ein automatisiertes Videosystem. Alle verwendeten Puffer stammten aus käuflichen Kits. Die Sitting-Drop-Methode wurde auch mit größeren Volumina angewendet und per Hand pipettiert. Dabei erfolgte eine Übersichtung der Proteinlösung mit Silikonöl oder einer Mischung aus Parafin- und Silikonöl (Al's Oil (D'ARCY *et al.* (1996))). Hierdurch wurde die Diffusionsgeschwindigkeit herabgesetzt.

Abbildung 7: Sitting-Drop-Proteinkristallisation

5.1.1.2 Hanging-Drop

Für die Proteinkristallisation mit dem Hanging-Drop-Verfahren wurden 24-Kammer VDX-Kristallisationsplatten und silikonisierte Deckgläschen verwendet. Die Abdichtung der Kammern erfolgte mit Silikonölen unterschiedlicher Viskosität. Alle von Hand pipettierten Platten wurden nach dieser Methode angesetzt. Das Puffer-Reservoir wurde je nach Ansatz mit 500 μ l bis 1 ml Puffer gefüllt. Die Tropfen setzten sich aus 2 μ l Enzymlösung und 2 μ l Puffer zusammen. Die Platten wurden bei Temperaturen von 4, 18, 20, 23, 25, 30 oder 32 °C gelagert und regelmäßig unter dem Mikroskop auf gebildete Kristalle hin untersucht.

Abbildung 8: Hanging-Drop-Proteinkristallisation

5.1.2 Mikrodialyse und Kristallisation in Kapillaren

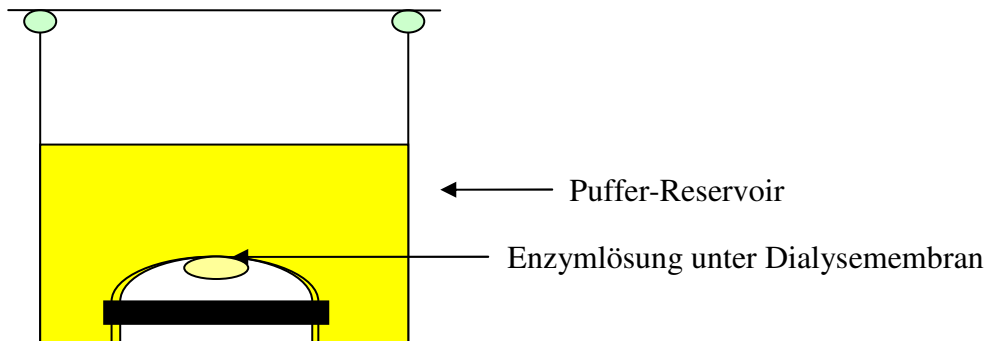
Bei der Mikrodialyse und der Proteinkristallisation in Kapillaren erfolgt der Ausgleich der Pufferkonzentrationen nicht über eine Gasphase, sondern über eine Membran oder Silikonöl. Dabei ist der Konzentrationsausgleich nicht allein auf die Diffusion von

Wasser wie bei den Hanging- und Sitting-Drop-Methoden beschränkt, sondern läuft auch über den Austausch anderer Pufferbestandteile, nicht aber des Proteins selbst.

5.1.2.1 Dialyseknöpfe

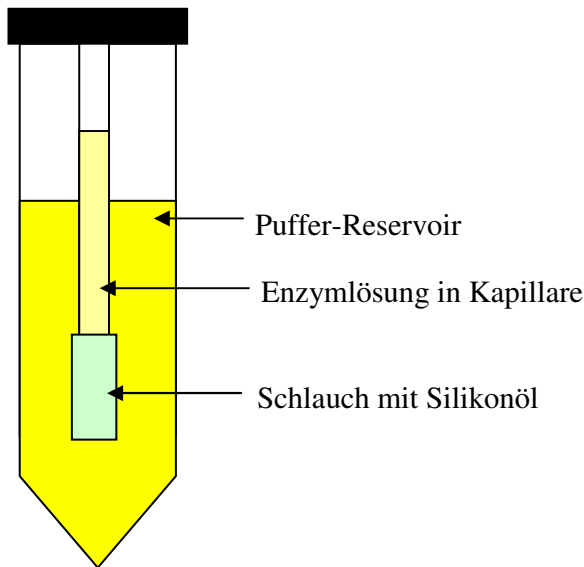
Die Kristallisationsversuche mit Dialyseknöpfen wurden in 24-Kammer VDX-Kristallisationsplatten durchgeführt. Die Enzymlösung und die höher konzentrierte Pufferlösung standen über eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa in Kontakt. Diese Membran wurde mittels eines Gummiringes über die im Dialyseknopf befindliche Proteinlösung gespannt. Die Dialyseknöpfe wurden mit 12 μ l Proteinlösung beladen. Das Reservoirvolumen lag bei 2 ml. Die Kammern wurden mit hoch viskosem Silikonöl und Deckgläschen verschlossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 23°C. Eine regelmäßige Kontrolle auf Kristallbildung wurde mikroskopisch durchgeführt.

Abbildung 9: Proteinkristallisation mit Dialyseknöpfen



5.1.2.2 Proteinkristallisation in Kapillaren

Bei der Proteinkristallisation in Kapillaren erfolgte der Pufferaustausch über einen mit Silikonöl gefüllten Schlauch. Dieser wurde über eine mit Proteinlösung gefüllte 0,5 mm Kapillare gestülpt. Die Kapillaren wurden in mit Puffer gefüllte Reaktionsgefäße gehängt und bei 23°C gelagert. Die Kontrolle auf Kristallwachstum erfolgte erstmals nach vier Wochen, da bei diesem Verfahren ein sehr langsamer Austausch von Pufferbestandteilen stattfindet.

Abbildung 10: Proteinkristallisation in Kapillaren

5.2 Cokristallisation und „Soaking“

Um die genaue Lage eines Liganden in einem Protein zu bestimmen, ist es notwendig, Kristalle vorliegen zu haben, welche aus Komplexen von Protein und Ligand bestehen. Diese Kristalle können dann einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden, und somit die Positionen von Substrat, Cosubstrat, Produkt oder anderen Liganden im aktiven Zentrum aufgezeigt werden.

5.2.1 Cokristallisation

Bei der Cokristallisation wurden Kristalle in Lösungen gezüchtet, die zusätzlich zum Enzym auch den gewünschten Liganden enthielten. Dabei handelte es sich um Vinorin-Synthase Kristalle, die zusammen mit den Liganden Coenzym A und Acetyl-Coenzym A angesetzt wurden. Es wurden Versuche mit einer Ligandenkonzentration von 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 7,5 mM und 10 mM durchgeführt. Die übrigen Kristallisationsbedingungen entsprachen denen für die reine Vinorin-Synthase angewendeten (MA X *et al.*, 2005).

5.2.2 „Soaking“ von Proteinkristallen

Beim Soaking wurden Vinorin-Synthase Kristalle aus dem Kristallisationstropfen „gefischt“ und anschließend in einer Lösung inkubiert, die die Liganden Coenzym A oder Acetyl-Coenzym A enthielt. Diese Lösung bestand aus dem für die Kristallisation der Vinorin-Synthase verwendeten Puffer, Vinorin-Synthase und Ligand. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen von Enzym und Ligand verwendet. Es wurden Versuche mit einer Enzymkonzentration von 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml sowie einer Ligandenkonzentration von 1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM durchgeführt. Die Kristalle wurden für eine Dauer von 10 sek bis zu 5 h inkubiert. Als weitere Soaking-Methode wurde die Überschichtung der Tropfen, welche Vinorin-Synthase Kristalle enthielten, mit vinorinhaltigem Oktanol durchgeführt. Da das Alkaloid Vinorin eine sehr schlechte Löslichkeit in Wasser zeigt, konnten keine Soaking-Experimente mit in Puffer gelöstem Vinorin durchgeführt werden. Stattdessen wurde das Vinorin in Oktanol gelöst. Nach der Überschichtung der Kristalltropfen mit dieser Lösung konnte das Vinorin durch Diffusion an die Kristalle gelangen und sich einlagern.

5.3 Identifikation von Proteinkristallen

Bei Screening-Tests mit verschiedenen Puffern war es möglich, dass in den Proteinlösungen Kristalle auftraten, bei denen es sich allerdings nicht um Proteinkristalle handelte. Je nach verwendetem Puffer konnten auch Salzkristalle entstehen. Um diese Salzkristalle von Proteinkristallen zu unterscheiden, wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen wurden identische Kontrollansätze pipettiert, die allerdings ohne Protein angesetzt wurden. Entstanden hier ebenfalls Kristalle, handelte es sich um auskristallisierte Puffersalze und nicht um Proteinkristalle. Des Weiteren wurde ein Bruchtest durchgeführt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Kristalle mit einer dünnen Nadel zerdrückt. Niedermolekulare Salzkristalle sind wesentlich stabiler als Proteinkristalle und erforderten bei diesem Test einen höheren Kraftaufwand. Weiterhin zeigen Salzkristalle gerade Bruchkanten, wogegen Proteinkristalle sehr leicht in kleine Fragmente zerfallen. Als dritte Identifizierungsmethode wurde eine Anfärbung von Proteinkristallen durchgeführt. Durch ihre großen Solventkanäle war es für den verwendeten Farbstoff

möglich, in die Gitterstruktur der Kristalle einzudringen. Bei den wesentlich dichter gepackten Salzkristallen war das nicht möglich. Als Färbelösung wurde IZIT Crystal Dye (Hampton Research) verwendet. Die Kristalltropfen wurden mit 0,5 bis 1 μl der unverdünnten oder verdünnten (1/10) Färbelösung vermischt. Nach einer Inkubation von 2 h waren Proteinkristalle deutlich stärker gefärbt als Salzkristalle.

5.4 Einfrieren von Proteinkristallen

Der Transport von den sehr empfindlichen Vinorin-Synthase Kristallen war nur möglich, nachdem diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert wurden. Bei einem Transport dieser Kristalle in den VDX-Platten wurden die Kristalle durch Erschütterungen und insbesondere durch Temperaturschwankungen beschädigt oder lösten sich komplett auf. Um die Kristalle einzufrieren, wurden sie mittels einer Nylonschleife aus dem Kristalltropfen „gefischt“ und für einige Sekunden in einer Kryoprotektant-Lösung inkubiert, welche aus dem Kristallpuffer und 10 – 25 % (V/V) Glycerol bestand. Anschließend wurden die Kristalle, in der Nylonschleife hängend, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Die weniger labilen Polyneuridinaldehyd-Esterase Kristalle konnten problemlos in den Platten transportiert werden. Um bei der Vermessung der Kristalle jedoch Strahlenschäden zu verringern, wurden diese Kristalle ebenfalls in Kryoprotektant-Lösung inkubiert und mit der Nylonschleife in den kalten Stickstoffstrahl (100°K) der Vermessungsapparatur gehängt.

5.5 Vermessung von Proteinkristallen

Die Vermessung der gezüchteten Proteinkristalle erfolgte an der Beamline X11 des EMBL in Hamburg bei 100°K. Zur Überprüfung der Qualität der Kristalle wurden Einzelaufnahmen durchgeführt. Aus den hieraus erhaltenen Daten konnten zusätzlich weitere Parameter für die komplette Datensatzaufnahme optimiert werden. Aus dem Abstand der Einzelreflexe dieser Einzelaufnahme konnte der verwendete Drehwinkel pro Aufnahme eines Datensatzes angepasst werden. Die Distanz zwischen Kristall und Detektor ergab sich aus der maximalen Auflösung der Einzelaufnahme. Aus der Intensität der Reflexe ließ sich eine Optimierung der angewendeten Belichtungszeit vornehmen.

Komplette Datensätze wurden bei einer Gesamtdrehung des Kristalls von 180° oder 360° mit Drehwinkeln von 0,5° - 1° pro Messdurchgang aufgenommen. Da die Strahlungsquelle keine konstant gleiche Leistung aufwies, wurde die Belichtungszeit der jeweilig freigesetzten Strahlendosis angepasst. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Parameter erfolgt bei der Betrachtung der einzelnen Datensätze (IV.4.3).

6. Computerprogramme und Online-Tools

6.1 Bearbeitung der Rohdaten einer Kristallvermessung

Die aufgezeichneten Daten der Einzelbilder eines Datensatzes wurden zuerst mittels der Programme DENZO und SCALEPACK (HKL-Suite, OTOWINOWSKI und MINOR (1997)) bearbeitet. Hierbei erfolgt die Bestimmung der Einheitszelle (Abmessungen und Winkel der kleinsten, symmetrischen Untereinheit im Kristall), der Raumgruppe (Symmetrieverhältnisse zwischen den Einzelzellen) und der Kristallorientierung. Weiterhin kommt es zu einer Integrierung der aufgenommenen Reflexe sowie einer Verfeinerung der Parameter des Detektors, des Kristalls und der Strahlungsquelle. Die Einzeldaten werden zu einem Datensatz im hkl-Format (Miller-Indices) zusammengefasst.

6.2 Strukturaufklärung und Verfeinerung

Die Strukturaufklärung der Polyneuridinaldehyd-Esterase erfolgte über ein „Molecular Replacement“. Hierzu wurde die „Automated Crystal Structure Determination Platform“ Auto-Rickshaw (PANJIKAR S *et al.*, 2005) verwendet. Beim „Molecular Replacement“ wird über die inverse Fourier-Transformation eine bekannte Struktur eines Proteins mit möglichst hoher Aminosäuresequenzidentität zum vermessenen Protein in seine Strukturamplituden zurückgerechnet. Diese werden anschließend mit den gemessenen Daten verglichen und in zwei Schritten, erst die Rotations-, dann die Translationsfunktion bestimmt. Dadurch wird das Phasenproblem gelöst, und gleichzeitig erhält man eine erste strukturelle Vorstellung des Proteins. Die Phase des gebrochenen Röntgenstrahls geht bei der Messung verloren, ist aber für die Strukturaufklärung erforderlich und muss daher anderweitig bestimmt werden.

Strukturverfeinerungen wurden durch die Programme Xfit aus dem Xtalview-Package (MCREE D, 1999) und REFMAC (MURSHUDOV G *et al.*, 1997 und WINN M *et al.*, 2001) durchgeführt. Die abgebildeten Darstellungen der Enzymstrukturen wurden mit dem Programm Pymol (DELANO W (2002)) erstellt.

6.3 Verwendete Online-Tools

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/; ALTSCHUL S *et al.*, 1990)

- Literatursuche
- Sequenzalignments zwischen zwei Sequenzen (DNA und Aminosäuren)
- Sequenzalignments anhand von Datenbanken (DNA und Aminosäuren)

ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/; THOMPSON J *et al.*, 1994)

- paarweiser Sequenzvergleich

ExPasy (Expert Protein Analysis System):

- ExPasy-Enzyme (www.expasy.org/enzyme; BAIROCH A, 2000)
Enzymklassifizierung
- ExPasy-Translate tool (us.expasy.org/tools/dna.html)
Übersetzung von DNA- in Aminosäurecode
- ExPasy-Prosite (www.expasy.org/prosite; FALQUET L *et al.*, 2002; BUCHER P und BAIROCH A, 1994)
Identifikation von Proteinfamilien und Domänen
- ExPasy SWISS-PROT (www.ebi.ac.uk/swissprot; BOECKMANN B *et al.*, 2003)
Datenbank für Sequenzvergleiche und zur Berechnung von Proteineigenschaften

Oligonucleotide Properties Calculator (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)

Verwendung beim Primerdesign

Protein Data Bank (www.wwpdb.org)

Datenbank mit dreidimensionalen Strukturen von Proteinen

IV Ergebnisse

1. Expressionsversuche mit der putativen Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Um eine genauere Untersuchung und Identifizierung der unter I.3.1 beschriebenen vorliegenden putativen Klone der Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase vorzunehmen, sollte eine heterologe Expression mit anschließender Aufreinigung der Reduktasen erfolgen. Nach VON SCHUMANN (2003) lagen die jeweiligen Reduktase-cDNAs in den Expressionsvektoren pSE280, pQE60 und pQE70 vor. Mittels dieser Vektoren sollte es möglich sein, Fusionsproteine mit C-terminalem (pQE60 und pQE70) oder N-terminalem (pSE 280) Histidin-Rest zu exprimieren, und eine Aufreinigung über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie durchzuführen.

Tabelle 7: Vorliegende Konstrukte der putativen Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Konstrukt	putative Funktion
40 kDa - pSE 280	Vomilenin-Reduktase
43/1 kDa - pQE60	Vomilenin-Reduktase
43/2 kDa - pQE60	Vomilenin-Reduktase
48/kurz kDa - pQE70	Vomilenin-Reduktase
48/lang kDa - pQE70	2 β -(<i>R</i>)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Durchgeführte Experimente von VON SCHUMANN zeigten jedoch, dass keine funktionale Expression der putativen Vomilemin-Reduktasen in *E. coli* M15 erfolgte. Die putative 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase konnte zwar überexprimiert, allerdings keine positiven Aktivitätstests mit 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin durchgeführt werden. Durch Umklonierungen in andere Vektoren und die Verwendung verschiedener Expressionssysteme sollten eine Expression und Aufreinigung dieser putativen Reduktasen vorgenommen werden.

1.1 Umklonierung der Reduktase-cDNAs in pQE2

Um eine Expression der Reduktasen in *E. coli* durchführen zu können, wurden die unterschiedlichen cDNAs in den pQE2 Vektor umkloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression des Zielgens als Fusionsprotein mit N-terminalem 6 x Histidin-Rest und somit die Aufreinigung des Proteins über eine Affinitätschromatographie. Weiterhin ist die Abspaltung des Histidin-Restes durch DAPase möglich. Die Umklonierung erfolgte durch eine PCR mit Primern, die die 3'- und 5'-Endsequenzen der cDNAs, Überhänge für pQE2 entsprechende Restriktionsschnittstellen sowie Abspaltungsstoppsequenzen enthielten (III.2.1.1). Als Matrizen-DNA dienten isolierte pQE60 und pSE280 Plasmide mit den Reduktase-Inserts. Beim letzten PCR-Zyklus wurde den Ansätzen *Taq*-DNA-Polymerase hinzugefügt, um einen Adenosin-Überhang für die Ligation in den pGEM-T easy Vektor zu ermöglichen. Die verwendeten Primer sind der Abbildung 11 zu entnehmen. Die Bezeichnungen der Reduktase-Klone wurden von VON SCHUMANN übernommen und entsprechen den ungefähren Molekülmassen der isolierten, putativen Reduktasen aus *R. serpentina*.

Abbildung 11: PCR-Primer für die Umklonierung der putativen Reduktase cDNAs in pQE2

<p>40 kDa:</p> <p>forward-Primer 5'-<u>G</u>CATGCGCAAATGGCCGGAAAATCACCTG</p> <p>reverse-Primer 5'-<u>CCGCGG</u>TTAAGGAGCTTTCAAGGTGT</p>
<p>43/1 kDa und 43/2 kDa:</p> <p>forward-Primer 5'-<u>G</u>CATGCGCAAATGGCGAAGTCACCAGAAGT</p> <p>reverse-Primer 5'-<u>CCGCGG</u>TTAGGCAGATTTCAATGTGTT</p>
<p>48 kDa:</p> <p>forward-Primer (kurz) 5'-<u>G</u>CATGCGCAAATGGCTGGAAAGTCTCCAGA</p> <p>forward-Primer (lang) 5'-<u>G</u>CATGCGCAGATGCGTTTTCGCTAAACTTTGA</p>

reverse-Primer

5'-CCGCGGTTAGGACTCAGGTGGAGTTAA

G = eingefügt für Einhaltung des Leserahmens

CAA (G) = Stoppcodon für Abspaltung des Histidin-Restes

GCATGC = Restriktionsschnittstelle für Sph I

CCGCGG = Restriktionsschnittstelle für Sac II

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgereinigt (III.2.3.1) und in das multi-copy Plasmid pGEM-T easy ligiert. Nach erfolgter Transformation und Vermehrung der Plasmide in *E. coli* Top10 wurden die Plasmide aufgereinigt und einem Restriktionstest unterzogen. Anschließend wurden die Inserts der isolierten Plasmide sequenziert (III.2.3.2.2). Die Plasmide, die die korrekten Sequenzen aufwiesen, wurde mit den Restriktionendonukleasen Sph I und Sac II geschnitten (III.2.2.2). Die Inserts sowie der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen geschnittene Vektor pQE2 wurden mit einem Agarosegel aufgereinigt und ligiert. Nach Vermehrung der Plasmide in Top10-Zellen erfolgte die Transformation in das Expressionssystem *E. coli* M15.

1.2 Expression und Aktivitätstests

Einzelkolonien der rekombinanten Bakterien wurden überimpft und kultiviert. Die Zellen wurden in 10 l LB-Medium (Kanamycin, Ampicillin) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, und die Expression der Reduktasen mit 0,5 - 1 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubationszeit von 18 - 36 h bei 24°C wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (III.1.1). Der Proteinrohextrakt wurde auf eine Ni-NTA Chromatographiesäule geladen, und Fraktionen des Durchflusses und des Eluats gesammelt. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden mittels einer HiTrap Säule in 0,5 M KP_i – Puffer (pH 7) umgepuffert und Aktivitätstests durchgeführt (III.3.1 und III.3.2). Aus Mangel an vorliegendem 2β-(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin konnten keine Tests auf 2β-(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase-Aktivität durchgeführt werden. Ausführliche Tests wurden speziell für den Umsatz von Vomilenin vorgenommen. So erfolgten Inkubationen mit Proteinrohextrakt, Säulendurchfluss und Eluat für eine Zeit von bis zu 6 h. Weiterhin wurden die Proteinlösungen auf den Umsatz von 2α-(*S*)-1,2-Dihydrovomilenin, Perakin, Raucaffrinolin und Acetylnorajmalin hin untersucht. In

keinem Fall konnte eine Aktivität festgestellt werden. Überprüfungen der Expression der Reduktasegene auf einem SDS-Gel zeigten nur bei dem Reduktaseklon „48 kDa kurz“ eine überexprimierte Bande im erwarteten Bereich. Bei den übrigen konnten im Eluat nur geringe Verunreinigungen, aber kein Protein der erwarteten Größe, gefunden werden. Auch im Rohextrakt und im Durchfluss konnte keine auffallend starke Expression der Zielgene nachgewiesen werden. Um zu testen, ob die pQE2 Plasmide mit den gewünschten Inserts überhaupt in den M15 Zellen vorlagen, wurden PCRs mit Primern durchgeführt, die auch für die Sequenzierung der Inserts angewendet werden. Das Template entstammte M15 Zellen, die den PCR-Ansätzen hinzugefügt wurden. In allen Fällen konnten die cDNAs nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, dass eine aktive Expression der Ziel-cDNAs weder über den Vektor pQE60 noch über pQE2 möglich zu sein scheint. Als alternatives Expressionssystem wurde die Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt.

1.3 Umklonierung der putativen Reduktaseklone in pPIC3.5 und Expression in *Pichia pastoris*

Da die Expression der Reduktasegene in dem prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde zum eukaryotischen System *Pichia pastoris* (GS115) gewechselt. Um eine Expression in den Hefezellen durchzuführen, war eine Umklonierung der in pQE2 vorliegenden cDNAs in den Vektor pPIC3.5 nötig. Der verwendete forward-Primer bestand aus der Sequenz für den N-terminalen 6 x Histidin-Rest und konnte somit für alle pQE2 Klone verwendet werden. Als Überhang wies der Primer die Sequenz für eine BamH I Schnittstelle sowie die Kozak-Konsensussequenz auf. Die eingefügte Kozak-Sequenz spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation der Translation in Eukaryoten (KOZAK M, 1992).

Abbildung 12: PCR-Primer für die Umklonierung der putativen Reduktase-cDNAs in pPIC3.5

pPIC3.5-His-forward:

5'-GGATCCACCATGGCCCACCACCATCACCATCACCAT

pPIC3.5-40-reverse:

5'-GCGGCCGCTTAAGGAGCTTTCAAGGTGTT

pPIC3.5-43-reverse:5'-GCGGCCGCTTAGGCAGATTTCAATGTGTT**pPIC3.5-48-reverse:**5'-GCGGCCGCTTAGGACTCAGGTGGAGTTAAACCATGG = Kozak-SequenzGGATCC = Restriktionsschnittstelle für BamH IGCGGCCGC = Restriktionsschnittstelle für Not I

Die PCR wurde mit der Polymerase *Pfu*-Turbo durchgeführt. Als Template wurden die aufgereinigten Reduktase-cDNA tragenden pQE2 Plasmide verwendet. Vor der letzten Amplifikation wurde zu jedem Ansatz *Taq*-Polymerase hinzugefügt, um einen Adenosin-Überhang für die Ligation in pGEM-T easy zu generieren. Die über ein Agarosegel aufgereinigten und ligierten PCR-Produkte wurden in *E. coli* Top10-Zellen vermehrt. Nachdem die Plasmide isoliert wurden, erfolgte eine Sequenzierung der eingefügten Inserts. Vektoren mit der korrekten, inserierten cDNA und der Vektor pPIC3.5 wurden mit den Restriktionsenzymen BamH I und Not I geschnitten und nach Aufreinigung der gewünschten Fragmente über ein Agarosegel miteinander ligiert. Die Vermehrung der entstandenen Konstrukte erfolgte wiederum in *E. coli* Top10-Zellen. Die Transformation der Vektoren in *Pichia pastoris* erfolgte mittels Elektroporation (III.2.4.1.4 und III.2.4.2.4). Vor dieser Transformation mussten die Reduktase-pPIC3.5 Konstrukte linearisiert werden, da nur in diesem Zustand eine homologe Rekombination in das Hefegenom stattfinden kann. Erfolgt diese Restriktion mit Sac I, kommt es zu einer Rekombination in den *AOX1*-Lokus. Erfolgt sie mit Sal I, wird das Konstrukt in den *HIS4*-Lokus des Genoms integriert. Bei der Wahl des verwendeten Expressionslokus spielte die Sequenz der putativen Reduktasen eine Rolle, da in dieser die entsprechende Restriktionsschnittstelle nicht vorkommen durfte. So wurden die Vektoren mit den 40 kDa und 48 kDa (kurz und lang) Inserts mit Sac I und die Konstrukte 43 kDa (1 und 2) mit Sal I restringiert. Als Kontrollen wurden jeweils pPIC3.5 Vektoren ohne Insert verwendet. Die Expression und Aufreinigung erfolgte wie beschrieben (III.2.4.2.4 und III.1.2).

Es wurden Aktivitätstests auf Vomilenin-Reduktase-Aktivität mit den erhaltenen Rohextrakten durchgeführt und eine Aufreinigung der erwarteten Fusionsproteine über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie vorgenommen. In keinem Fall wurde eine Aktivität festgestellt. Auch SDS-Gele, zur Überprüfung auf Expression, zeigten

keine Banden der entsprechenden Größen nach der chromatographischen Aufreinigung. Somit schien genau wie in *E. coli* M15 keine aktive Expression der putativen Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktasen möglich zu sein. Neu durchgeführte Alignments der von VON SCHUMANN ermittelten Sequenzen der putativen Vomilenin-Reduktase cDNAs (40, 43/1, 43/2 und 48 kurz) ergaben eine Identität von bis zu 91 % (Homologie 97 %) mit einer 10-Hydroxygeraniol-Oxidoreduktase (Accession No. AY352047) aus *Catharanthus roseus*. Aufgrund dieser Sequenzübereinstimmung und der nicht detektierbaren Aktivität wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den von VON SCHUMANN beschriebenen putativen Vomilenin-Reduktase cDNAs nicht um solche handelte. Daher wurden die daraufhin abzielenden Untersuchungen abgebrochen. Weitere Expressionsversuche wurden allerdings mit der putativen 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase vorgenommen. Um ein ähnliches Expressionssystem verglichen mit dem Organismus *Rauvolfia serpentina* einzusetzen, wurde die Pflanze *Nicotiana benthamiana* gewählt.

1.4 Umklonierung der putativen 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase und Expression in *Nicotiana benthamiana*

Die Tabakpflanze wurde als Expressionssystem verwendet, da es sich um einen Organismus handelt, der mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit posttranslationale Modifikationen wie die Herkunftspflanze *Rauvolfia serpentina* durchführt, als die zuvor benutzten Bakterien- und Hefesysteme. Solche posttranslationalen Modifikationen können entscheidend für die Aktivität und Stabilität der exprimierten Enzyme sein.

1.4.1 Prinzip der heterologen Expression in *Nicotiana benthamiana* und der verwendeten Module

Die Infektion der Pflanzenzellen beruht auf einem Expressionsvektor, der auf dem Tabak Mosaik Virus basiert (MARILLONNET S *et al.*, 2004). Dieser Expressionsvektor setzt sich aus verschiedenen Modulen zusammen, wobei eines dieser Module (3'-Modul) das Zielgen oder als Positivkontrolle das Gen des *Green Fluorescent Protein* (GFP) trägt. Die anderen Module (5'-Module) weisen verschiedene Eigenschaften auf. So tragen sie Zielsequenzen, die für den Transport der exprimierten Proteine in

bestimmte Zellkompartimente verantwortlich sind. Andere 5'-Module kodieren für Sequenzen, welche als Werkzeug zur Aufreinigung der Proteine dienen (Histidin-Rest). Die verwendeten Module sowie deren Funktionen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Ein weiterer Vorteil des verwendeten Systems ist, dass eine schnelle Kombination des Zielgens mit den verschiedenen 5'-Modulen möglich ist, und so Fusionsproteine aus dem Zielprotein mit verschiedenen Eigenschaften exprimiert werden können. Die Kombination der 3'- und 5'-Module erfolgt über die Integrase, eine sequenzspezifische Rekombinase. Die verwendeten 5'-Module (pICH 8430, pICH 13480, pICH 10530, pICH 11280 und pICH 10570), das 3'-Modul mit GFP (pICH 7410) und die Integrasemodule (pICH 10881 und pICH 14313) lagen in *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) vor und mussten vor der Infiltration in die Tabakpflanzen nur angezogen und umgepuffert werden. Die cDNA der putativen 2 β -(R)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase musste in das entsprechende 3'-Modul einkloniert werden. Die Umklonierung erfolgte, wie oben beschrieben, mittels PCR, Vermehrung und Sequenzierung über pGEM-T easy in *E. coli*-Top10, Restriktion (Bsa I und Sal I) und Ligation in das ebenfalls restringierte Modul für das Zielgen (pICH 10990). Das so erhaltene Konstrukt wurde in Top10-Zellen transformiert und wegen des auf der Vektorsequenz liegenden Carbenicillin-Resistenzgens auf LB-Carbenicillin Agarplatten angezogen. Anschließend wurden die Plasmide isoliert und nach Restriktionstests mittels Elektroporation in kompetente *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen transformiert (III.2.4.2.3).

Abbildung 13: PCR-Primer für die Umklonierung der putativen 2 β -(R)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase cDNA in pICH 10990

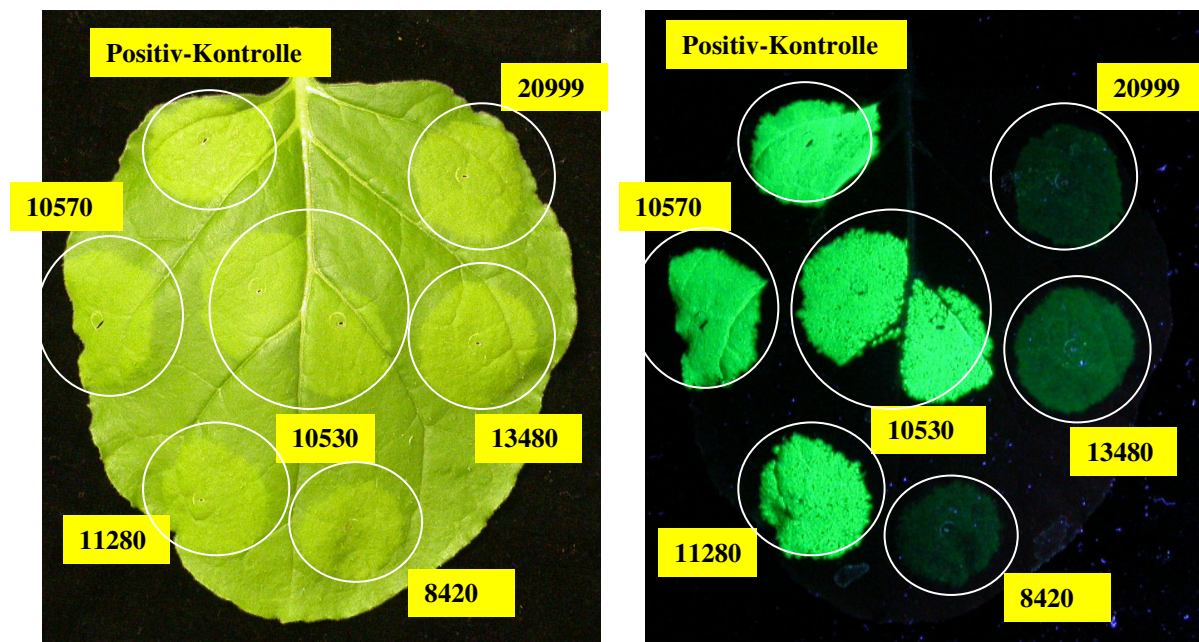
pICH 10990-48kDa-forward 5'- <u>GGTCTC</u> CAGGTATGCGTTTCGCTAACTTTGAGG
pICH 10990-48kDa-revers 5'- <u>GTCGAC</u> TTAGGACTCAGGTGGAGTTAAGG
<u>GGTCTC</u> = Erkennungssequenz für Bsa I
<u>GTCGAC</u> = Restriktionsschnittstelle für Sal I

Somit lagen alle benötigten Module in den Agrobakterien vor. Die Infiltration der Tabakpflanzen erfolgte wie in III.2.5 beschrieben. Durch die Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt ein Transfer der 5'- und 3'-Module in den

Zellkern. Die Integrase sorgt für die Fusion der beiden Module. Die Rekombinationssequenzen der beiden Module entstehen beim Spleißen von Introns während der Ausschleusung der Module aus dem Zellkern. Durch die herausgespleißten Introns entstehen solche Sequenzen, dass sich die vorgeschalteten 5'-Sequenzen und die Sequenz des Zielgens in einem Leserahmen befinden. Somit liegt das fertige Expressionskonstrukt im Cytosol der Pflanzenzelle vor, und das Zielgen wird als Fusionsprotein mit einer N-terminalen-Zusatzsequenz exprimiert.

Als Positivkontrolle wurde das GFP verwendet, um die Funktionsweise des angewendeten Systems und die angewendeten Module zu überprüfen. Hierzu wurden einzelne Blätter punktweise mit dem Modul pICH 7410 (GFP), dem Modul pICH 10881 (Integrase) und den jeweiligen 5'-Modulen infiziert. Nach 10 Tagen erfolgte die Kontrolle der Expression visuell bei UV Licht (302 nm).

Abbildung 14: GFP-Kontrolle der durchgeführten Expressionsversuche in *Nicotiana benthamiana*



Der Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass der durchgeführte Versuchsablauf positiv verlaufen ist. Als Positivkontrolle wurde ein Modul mit cytosolischer Zielsequenz verwendet, das vom Hersteller als Kontrolle angeboten wird. Eine starke Expression

zeigen aber auch die Fusionsproteine mit pICH 10570 (enthält keine Zielsequenz), pICH 10530 (Chloroplast-Zielsequenz) und pICH 11280 (N-terminaler Histidin-Rest).

1.4.2 Aktivitätstests mit Proteinextrakten aus infiltrierten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen

Da durch die GFP-Kontrolle gezeigt werden konnte, dass die Fusion der eingesetzten Module und die heterologe Expression in den Tabakpflanzen funktionierte, erfolgte nach einer Expressionszeit von 14 Tagen die Aufreinigung der putativen 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase, die als Fusionsprotein mit N-terminalem Histidin-Rest (5'-Modul pICH 11280) exprimiert wurde. Für die Aufreinigung wurden 19,5 g infiltriertes Blattmaterial verwendet, was der Ernte von zwei Tabakpflanzen entsprach. Ein Proteinrohextrakt wurde wie unter III.1.3 beschrieben hergestellt. Anschließend erfolgten eine Umpufferung des Extraktes und die Aufreinigung des exprimierten Enzyms über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie. Bei der Elution konnte ein schwacher Proteinpeak detektiert werden, und eine Messung auf Proteinkonzentration ergab einen Gehalt von 110 μ g/ml Protein. Die Kontrolle auf einem SDS-Gel zeigte eine deutliche Bande in dem für die 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase erwarteten Molekulargewichtsbereich. Daraus ergab sich, dass eine Expression und Isolierung der putativen 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase mit dem Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* möglich war. Nachfolgend wurden Aktivitätstests durchgeführt. Da das native Substrat 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin vorerst nicht zur Verfügung stand, wurden alternative Substrate gewählt, mit denen eine mögliche Reduktaseaktivität des isolierten Proteins nachgewiesen werden könnte. Diese Tests wurden wie in III.3.1 und III.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Substrate wurden Zimtaldehyd, Vomilenin, Perakin und Raucaffrinolin eingesetzt. Sowohl der getestete Rohextrakt als auch die über Ni-NTA aufgereinigten Fraktionen zeigten eine starke Zimtaldehyd-Reduktase Aktivität. Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich bei dem exprimierten Protein um ein Enzym mit Reduktasepotential handelte.

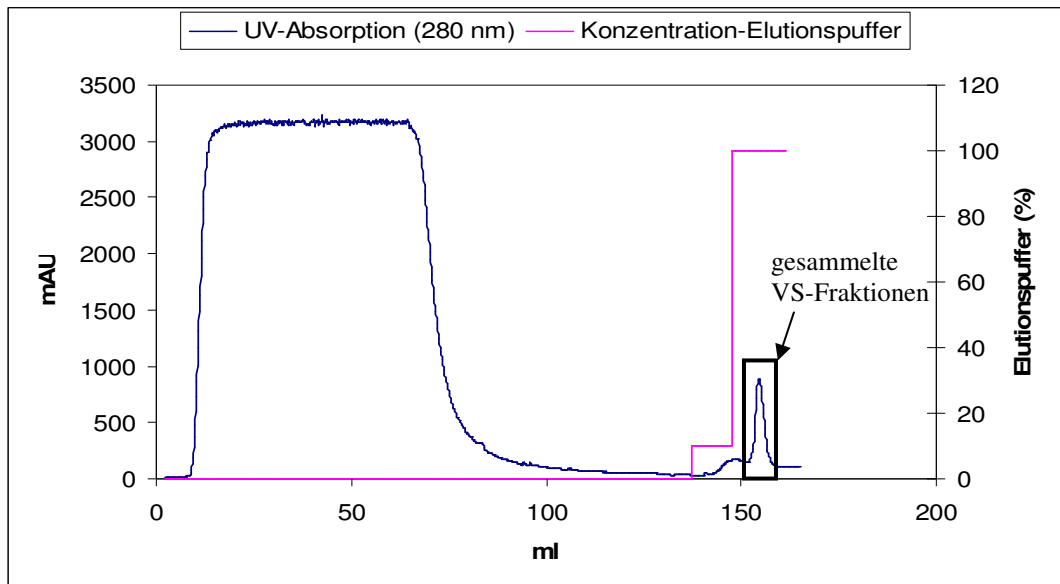
Später durchgeführte Aktivitätstests mit einem Alkaloid-Mischisolat, welches 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenin enthielt, ergaben allerdings keinen Umsatz des 2 β -(*R*)-1,2-Dihydrovomilenins.

2. Kristallisation und Komplexierungsversuche der Vinorin-Synthase (VS)

Die Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina* wurde durch GERASYMENKO I *et al.* (2004) über chromatographische Verfahren aufgereinigt, und Peptidfragmente sequenziert. Anhand der erhaltenen Sequenzen gelang es BAYER A *et al.* (2004), einen Vollängenklon der Vinorin-Synthase zu generieren, und eine aktive Expression in *E. coli* M15 Zellen durchzuführen. Die Expression erfolgte mittels des pQE2 Vektors, wodurch es ermöglicht wurde, die heterolog exprimierte Vinorin-Synthase wegen ihres N-terminalen 6 x Histidin-Restes über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie aufzureinigen.

2.1 Expression und Aufreinigung der Vinorin-Synthase

Eine *E. coli* M15 Einzelkolonie, die das Vinorin-Synthase/pQE2 Konstrukt enthielt, wurde gepickt und über Nacht in 10 ml LB-Medium (Kanamycin/Ampicillin) angezogen. Die entstandene Kultur wurde in 500 ml des gleichen LB-Mediums überimpft und für weitere 6 h bei 37°C im Schüttler wachsen gelassen. Anschließend erfolgte eine Überimpfung in 10 l LB-Medium (Kanamycin/Ampicillin). Nachdem diese Kultur bei 24°C eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht hatte, wurde die Expression der Vinorin-Synthase durch Zugabe von 0,7 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Kulturen wurden für 18 h bis 36 h inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Herstellung eines Proteinrohextraktes wurde, wie in III.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Aufreinigung der Vinorin-Synthase wurde mittels einer Ni-NTA Affinitätschromatographie vorgenommen (III.1.4). Der Verlauf der Aufreinigung ist der Abbildung 15 zu entnehmen. Aus der 10 l Bakterienkultur konnten etwa 10 mg Vinorin-Synthase gereinigt werden.

Abbildung 15: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Vinorin-Synthase lag nach der Aufreinigung über Ni-NTA als isoliertes Fusionsprotein mit dem N-terminalen Histidin-Rest vor. Für die Aufreinigung müssen die Histidine an der Oberfläche des Moleküls liegen und sind oft sehr flexible Bereiche. Daher ist es für die Kristallisation von Proteinen häufig nötig, den Histidin-Rest abzuspalten. Versuche zur Kristallisation der Vinorin-Synthase haben gezeigt, dass für die Röntgenstrukturanalyse verwendbare Kristalle nur entstehen, wenn die N-terminalen Histidine entfernt werden (MA X *et al.*, 2004). Diese Abspaltung wurde wie in III.1.10 mittels der DAPase durchgeführt. Abbildung 17 zeigt ein SDS-Gel, auf dem die aufgereinigte Vinorin-Synthase (Molekulargewicht 46,8 kDa) mit und ohne Histidin-Rest aufgetragen wurde. Deutlich ist die Verringerung des Molekulargewichts nach der Abspaltung zu erkennen. Für eine erfolgreiche Kristallisation von Proteinen ist weiterhin eine sehr hohe Reinheit des jeweiligen Proteins erforderlich. In Abbildung 17 sind in der Probe A noch Verunreinigungen nach der Ni-NTA Aufreinigung zu erkennen. Um diese zu entfernen, wurde nach der Abspaltung des Histidin-Restes noch eine Anionen-Austauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule vorgenommen (III.1.5, Abbildung 16). In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass die Vinorin-Synthase in Probe B absolut rein vorlag. Durchgeführte Aktivitätstests mit der so gereinigten Vinorin-Synthase (III.3.4) zeigten eindeutig, dass das eingesetzte Substrat Gardneral umgesetzt wurde.

Abbildung 16: Aufreinigung der Vinorin-Synthase durch Anionen-Austauschchromatographie

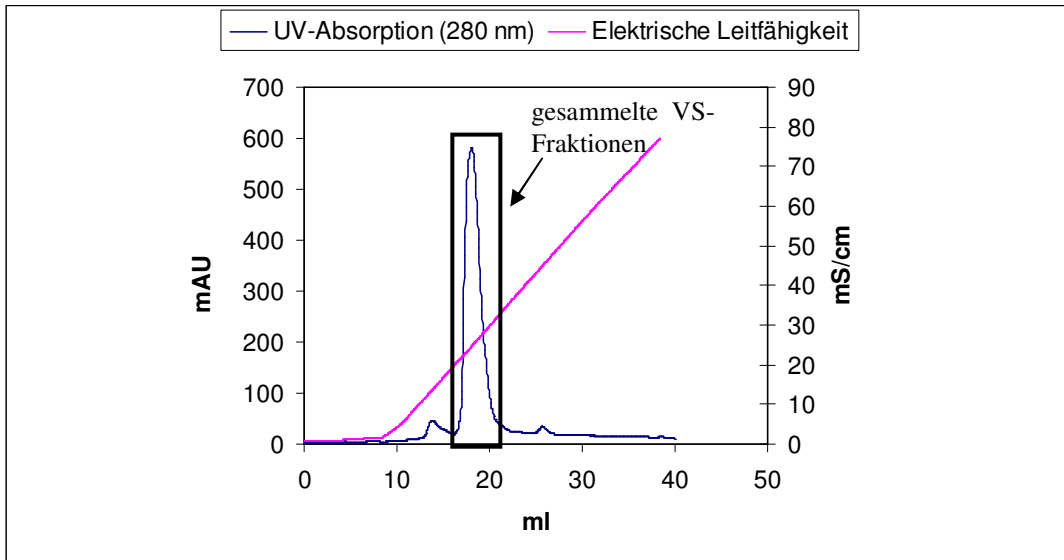
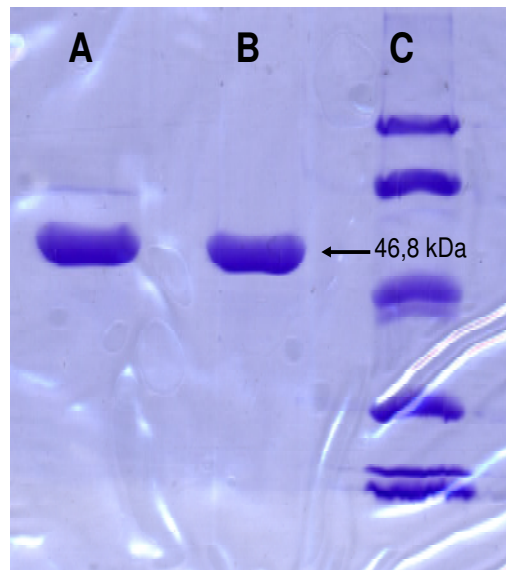


Abbildung 17: SDS-Gel der aufgereinigten Vinorin-Synthase: A) Nach Ni-NTA, B) Nach His-Abspaltung und MonoQ, C) Marker (III.1.9.1)

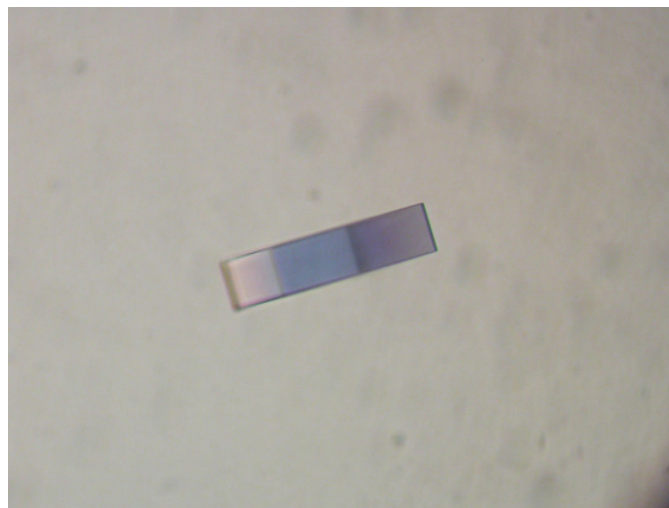


2.2 Kristallisation der Vinorin-Synthase

Um nun Proteinkristalle der Vinorin-Synthase darzustellen, erfolgte eine Umpufferung der reinen Enzymlösung in den Kristallisationspuffer (20 mM Tris, pH 7,5; 10 mM β -Merkaptoethanol; 1 mM EDTA) durch Dialyse. Die Proteinkonzentration wurde mit

Centripep YM10 Einwegskonzentratoren (III.1.7) auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt. Die Kristallisation erfolgte nun nach der Hanging-Drop-Methode (III.5.1.1.2). Als Präzipitant-Puffer (Puffer-Reservoir) wurde eine Lösung aus 2 M Ammoniumsulfat, 2 % (V/V) Polyethylenglycol 400 und 100 mM Tris HCl, pH 8,7 eingesetzt (MA X *et al.*, 2004). Es wurden je 2 μ l der Proteinlösung und des Präzipitant-Puffers auf einem silikonisierten Deckgläschen vermischt. Zur Abdichtung der Kristallisationkammer wurde hochviskoses Silikonöl verwendet. Die Kristallzüchtung erfolgte bei einer Temperatur von 32 °C. Nach einer Zeit von 3 bis 5 Tagen konnten Vinorin-Synthase Kristalle unter dem Mikroskop beobachtet werden (Abbildung 18).

Abbildung 18: Kristall der Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina*



Die Struktur der Vinorin-Synthase war mittels Röntgenstrukturanalyse durch MA X *et al.* (2004) aufgeklärt worden (Abbildung 19). Nun sollte die Position von Liganden der Vinorin-Synthase bestimmt werden, um ein genaueres Bild über den Ablauf der Katalyse zu erhalten.

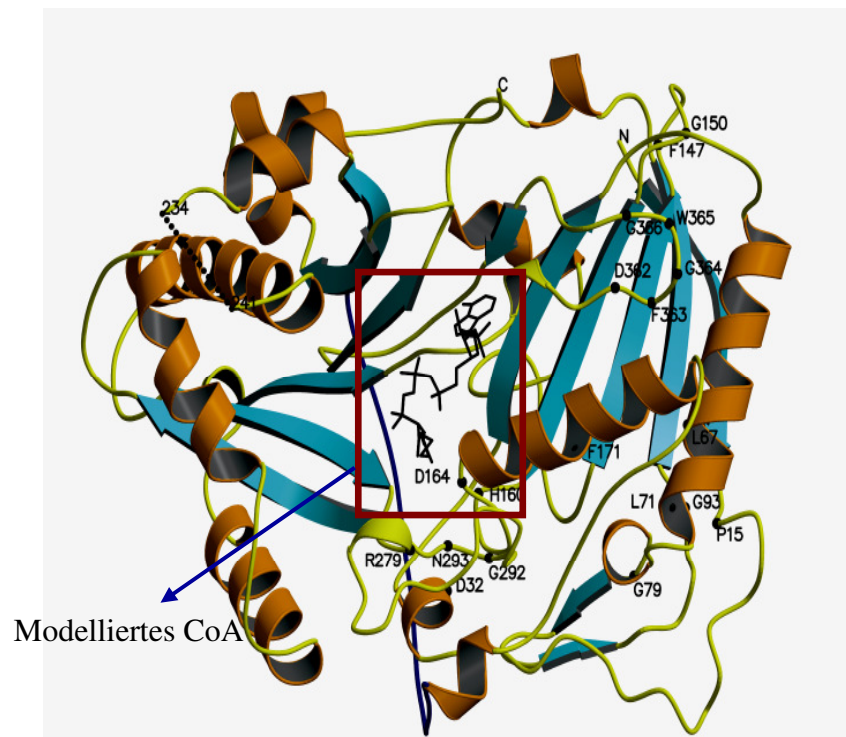
Eine gängige Methode, um gebundene Liganden (Substrat, Cosubstrat oder Produkt) zu detektieren, ist, diese zusammen mit dem Protein zu kristallisieren. Hierbei soll sich der Ligand an die Stelle des aktiven Zentrums binden, an dem er auch während des katalytischen Umsatzes zu finden ist. Da jedoch kein Reaktionspartner zur Verfügung steht, löst sich dieser Ligand nicht mehr so leicht aus seiner Bindung. Zumeist können bei solchen Cokristallisationen identische oder sehr ähnliche

Kristallisationsbedingungen wie für die Kristallisation von reinem Enzym gewählt werden.

2.2.1 Cokristallisation der Vinorin-Synthase mit Coenzym A (CoA) und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA)

Der Ligand Acetyl-CoA dient der Vinorin-Synthase als Cosubstrat für die Acetylierung des 16-*epi*-Vellosimins zum Vinorin (*in vivo*) und des Gardnerals zum 11-methoxy-Vinorin (durchgeführte Aktivitätstests). Ein Modell der Lage des Coenzym A war von MA X *et al.* (2004) erstellt worden (Abbildung 19).

Abbildung 19: Erstelltes Modell der Vinorin-Synthase mit dem Liganden CoA (Ma X *et al.*, 2004)



Um jedoch die tatsächliche Position zu bestimmen, ist es notwendig, einen Kristall mit einem Komplex aus der Vinorin-Synthase und Acetyl-CoA (oder CoA) zu generieren. Hierzu wurden, wie oben beschrieben, Kristalle angesetzt, wobei der Proteinlösung verschiedene Konzentrationen an Acetyl-CoA oder CoA beigefügt wurden. So wurden in den angesetzten Kristallisationstropfen Ligandenkonzentrationen von 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 7,5 mM und 10 mM eingestellt. Im

Verhältnis zur eingesetzten Molekülmenge des Enzyms (bei 3 mg/ml liegt eine Konzentration von 0,064 mM vor) wurde somit in jedem Fall ein hoher Überschuss an Acetyl-CoA und CoA hinzugefügt. Vereinzelt entstanden bei diesen Ansätzen nur bei einer Konzentration von 0,5 mM – 2 mM. Visuell zeigten diese eine wesentlich geringere Qualität als diejenigen, die ohne Ligand gewachsen waren. Trotzdem wurde eine Röntgenstrukturanalyse dieser Kristalle im EMBL/Hamburg vorgenommen, wobei als Cryoprotektant Präzipitant-Puffer mit der entsprechenden Konzentration des Liganden und 20 % (V/V) Glycerol verwendet wurde. Der visuelle Eindruck der Kristalle bestätigte sich in der Qualität der aufgenommenen Daten. So konnte nur eine Auflösung von 3,5 Å erreicht werden. Im Vergleich zur Struktur der reinen Vinorin-Synthase konnte keine zum Acetyl-CoA passende zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum des Enzyms nachgewiesen werden. Versuche, bei denen die Kristallisationsparameter verändert wurden, um Cokristalle mit einer besseren Auflösung und einem Wachstum bei höheren Ligandenkonzentrationen zu ermöglichen, führten zu keinem positiven Ergebnis.

Eine andere Möglichkeit, einen Komplex aus Enzym und Ligand herzustellen, ist das Soaking.

2.2.2 Soaking der Vinorin-Synthase mit Coenzym A (CoA) und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA)

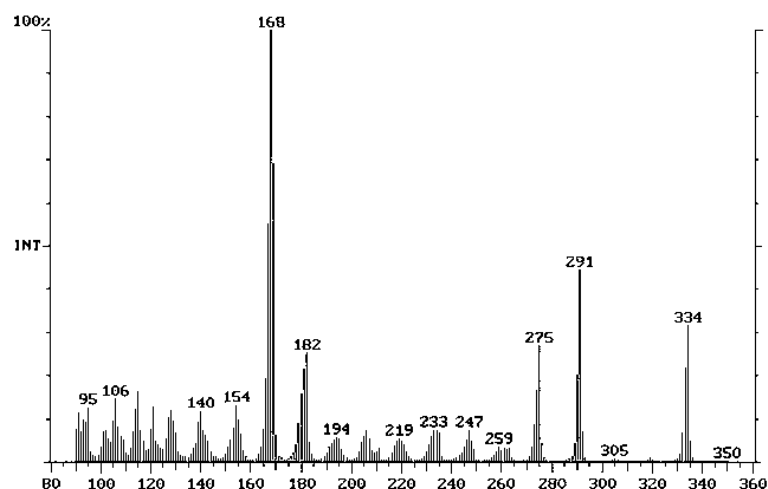
Bei Soaking-Experimenten werden Proteinkristalle vor ihrer Vermessung in einer Lösung inkubiert, welche den Liganden enthält, der mit dem Protein komplexiert werden soll. Der Ligand diffundiert in den Kristall hinein und bindet an seine natürliche Position im aktiven Zentrum des Enzyms. Für die durchgeführten Soaking-Experimente wurden Vinorin-Synthase Kristalle verwendet, die wie unter IV.2.2 beschrieben gezüchtet wurden. Es stellte sich heraus, dass die Kristalle sehr empfindlich auf Temperaturveränderungen und die Enzymkonzentration im Puffer reagierten. Vortests, bei denen die Kristalle aus ihrem Wachstumstropfen in eine Inkubationslösung ohne Ligand überführt wurden, zeigten, dass die Proteinkonzentration in der Lösung nicht unter 0,4 mg/ml liegen durfte, und eine Temperatur von 32°C eingehalten werden musste (entspricht der Wachstumstemperatur). Andernfalls kam es innerhalb von etwa 10 sek zu Auflösungserscheinungen des Kristalls. In der Praxis stellte besonders das strikte

Einhalten der Temperatur ein Problem dar, da kein gewärmter Raum zur Verfügung stand. Wurde der Inkubationslösung nun auch noch das CoA bzw. das Acetyl-CoA beigemischt, zeigte sich eine noch drastischere Beschädigung der Vinorin-Synthase Kristalle. Selbst bei einer Ligandenkonzentration von 2 mM, was für Soaking-Versuche eine geringe Konzentration darstellt, zeigten die Kristalle nach etwa 30 sek optische Schäden. Einzelaufnahmen dieser Kristalle mittels Synchrotronstrahlung ergaben, dass die bestmögliche Auflösung und die starke Mosaizität keine Strukturaufklärung zuließen. Kristalle, bei denen eine auswertbare Datensatzaufnahme möglich war, konnten nur unter folgenden Soaking-Bedingungen erhalten werden. Als Inkubationslösung diente ein Cryopuffer (Präzipitant-Puffer mit 0,4 mg/ml Vinorin-Synthase und 20 % (V/V) Glycerol), der 5 mM CoA bzw. Acetyl-CoA enthielt. In diesem wurden die Kristalle für wenige Sekunden inkubiert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit diesen Kristallen konnte eine Auflösung von 3,2 Å erreicht werden. Die Auswertung der im EMBL/Hamburg aufgenommenen Datensätze zeigte jedoch, dass die höchstmögliche Soaking-Zeit oder die Konzentration der Liganden nicht ausreichte, um eine Lokalisation des Cosubstrats vorzunehmen. Im Vergleich zur nativen Kristallstruktur konnte im Kanal der Vinorin-Synthase eine zusätzliche Elektronendichtewolke nachgewiesen werden, welche in ihrer Ausdehnung aber nicht zweifelsfrei mit dem eingesetzten Liganden in Übereinstimmung zu bringen war. Die kleinste asymmetrische Einheit im Kristallgitter besteht aus zwei Vinorin-Synthase Molekülen. Die detektierte Elektronendichte konnte jedoch nur in einem dieser Moleküle nachgewiesen werden. Zusätzlich stimmt die mögliche Position nicht mit der modellierten überein, und die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoAs befindet sich nicht im direkten Kontakt mit den für die Katalyse essentiellen Aminosäuren im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase. All diese Ergebnisse lassen erheblichen Zweifel daran aufkommen, dass es sich bei der aufgetretenen Elektronendichte der gesoakten Vinorin-Synthase Kristalle tatsächlich um die lokalisierte natürliche Position des Acetyl-CoAs während der enzymatischen Umsetzung des 16-epi-Vellosimin zum Vinorin handelt.

2.2.3 Komplexierungsversuche der Vinorin-Synthase mit ihrem natürlichen Produkt Vinorin

Es wurden weitere Komplexierungsversuche mit der Vinorin-Synthase durchgeführt. Hierbei sollte die Lage des aus der Katalyse der Vinorin-Synthase resultierenden Produkts Vinorin im aktiven Zentrum aufgezeigt werden. Da in der Alkaloidsammlung der Pharmazeutischen Biologie (Mainz) keine ausreichenden Mengen des Vinorins vorhanden waren, wurde das Alkaloid aus Wurzelkulturen von *R. serpentina* isoliert. Die Durchführung dieser Isolation ist in III.4 beschrieben. Als Nebenprodukt der Vinorinaufreinigung wurde zusätzlich Vomilenin isoliert. Die Identität und Reinheit der beiden Alkaloide wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Hierbei wurden Rf-Werte mit Angaben in der Literatur verglichen, und Positivkontrollen auf den DC-Platten mit aufgetragen. Das für die Komplexierungsversuche verwendete Vinorin wurde zusätzlich durch Massenspektrometrie identifiziert. Abbildung 20 zeigt das aufgenommene Massenspektrum des isolierten Alkaloids. Vinorin besitzt eine molekulare Masse von 334. Der entsprechende Massenpeak ist im Spektrum deutlich auszumachen. Letztendlich konnten aus dem Wurzelmaterial (40 g Trockengewicht) etwa 40 mg Vinorin und 140 mg Vomilenin isoliert werden. Die gereinigten Alkaloide wurden bei -20 °C gelagert.

Abbildung 20: Gemessenes Massenspektrum des isolierten Vinorins



Die Löslichkeit des Vinorins in Wasser ist äußerst gering. Somit konnte keine direkte Cokristallisation wie mit Acetyl-CoA oder CoA vorgenommen werden, da die

notwendige Konzentration des Produktes in dem Kristallisationspuffer nicht zu erreichen war. Aus dem gleichen Grund wurden auch keine Soaking-Experimente auf herkömmlichem Weg durchgeführt. Da das Alkaloid eine deutlich bessere Löslichkeit in Ethanol oder Methanol aufweist (in dieser Form findet es auch bei den Aktivitätstests Anwendung), wurde es im Überschuss in 50 µl der Alkohole über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 30°C gelöst, um eine möglichst hohe Konzentration in der Lösung zu erhalten. Nachdem das überschüssige Vinorin abzentrifugiert wurde, wurden unterschiedliche Mengen der Lösung mit der Proteinkristallisationslösung gemischt. Hierbei kam es jedoch schon bei geringen Mengen zum Ausfallen des Vinorins. Ebenso war es nicht möglich, die Vinorin-Synthase Kristalle in der alkoholischen Alkaloidlösung zu soaken, da sich diese direkt auflösten. Alternativ wurde eine Methode angewendet, bei der das Vinorin in Oktanol gelöst wurde. Die Tropfen, in denen bereits Proteinkristalle gewachsen waren, wurden mit dieser Lösung überschichtet, wobei ein Tropfen aus zwei Phasen entstand, die sich nicht mischten. Als Negativkontrolle erfolgte eine Überschichtung von kristallhaltigen Tropfen mit reinem Oktanol. Im Vergleich mit der Kontrolle konnte eine Diffusion des Vinorins durch die wässrige Phase hin zum Kristall nachgewiesen werden. So kam es nach einer Inkubationszeit von 48 h bei den Ansätzen mit Vinorin zu einer deutlich sichtbaren Beschädigung der Kristalle, was bei der Negativkontrolle nicht zu beobachten war. Es wurden Kristalle, die für 18 h, 24 h und 36 h mit der Vinorinlösung inkubiert wurden, eingefroren und im EMBL/Hamburg mittels Synchrotronstrahlung vermessen. Diejenigen Kristalle, die länger als 18 h inkubiert wurden, zeigten ein schlechtes Brechungsverhalten (Mosaizität, Auflösung), was auf eine Schädigung des Kristallgitters durch eingedrungenes Vinorin zurückzuführen zu sein scheint. Kristalle, die 18 h inkubiert wurden, ließen sich vermessen. Allerdings konnte kein Vinorin im aktiven Zentrum des Enzyms nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde versucht, Vinorin-Synthase Kristalle in Tropfen zu züchten, die mit der Vinorin/Oktanol-Lösung überschichtet waren. Diese Versuche führten jedoch in keiner Variante zu Kristallwachstum.

Wie bei den Komplexierungsversuchen mit CoA und Acetyl-CoA scheinen die Vinorin-Synthase Kristalle sehr empfindlich auf das Eindringen des Liganden in das Kristallgitter zu reagieren. Mittels der durchgeführten Soaking- und Cokristallisationstechniken war es nicht möglich, komplexierte Kristalle mit dem

Cosubstrat Acetyl-CoA (CoA) oder dem Produkt Vinorin zu erhalten, die eine ausreichende Qualität zur Strukturaufklärung lieferten.

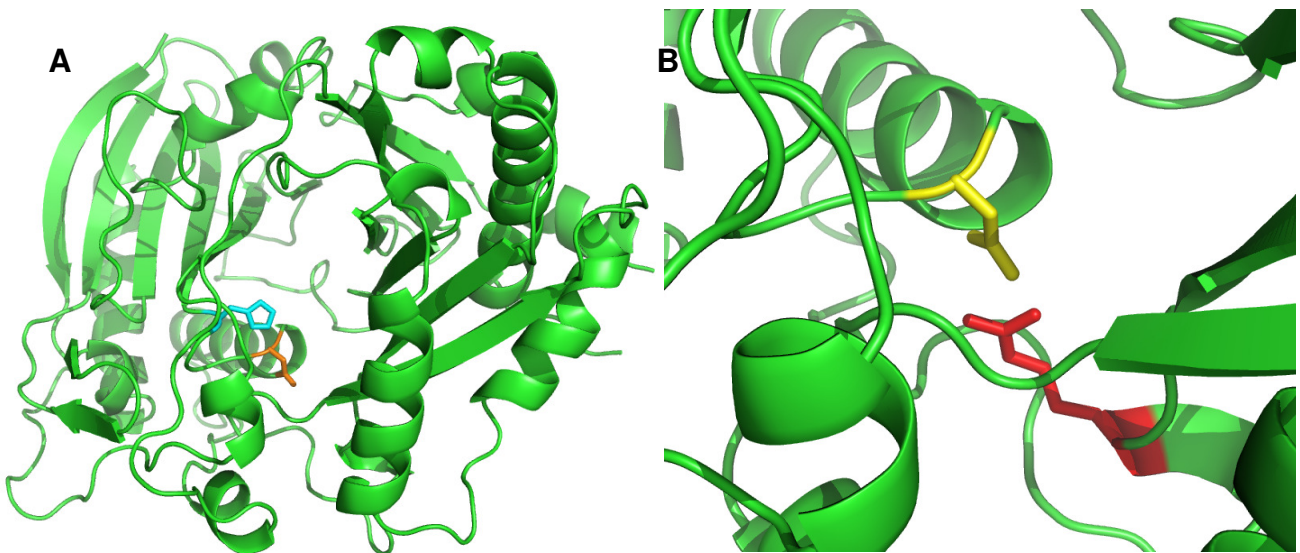
3. Mutagenesestudien der Vinorin-Synthase

Die Vinorin-Synthase gehört zur BAHD-Familie, einer großen Unterfamilie der pflanzlichen Acetyltransferasen. So konnten beispielsweise im Genom von *Arabidopsis thaliana* 64 Gene für Enzyme der BAHD-Familie identifiziert werden (D'AURIA J, 2006). Jedoch wurden bisher nur zwei Funktionen dieser Gene beschrieben. Das HCT-Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese des Lignins (D'AURIA J *et al.*, 2002). Die (Z)-3-Hexen-1-ol O-Acetyl-Transferase synthetisiert das (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetat (HOFFMANN L *et al.*, 2003). Im Genom von *Oryza sativa* wurden sogar 119 Gene für BAHD-Acetyltransferasen gefunden, aber noch nicht näher biochemisch untersucht (D'AURIA J, 2006). Hieraus ist ersichtlich, wie wichtig diese Familie von Enzymen im Pflanzenreich zu sein scheint. Eine Aussage über die Substratspezifität der verschiedenen Acetyltransferasen anhand von Sequenzvergleichen zu bereits näher untersuchten, gestaltet sich als sehr schwierig (BEEKWILDER J, *et al.*, 2004). Die Vinorin-Synthase ist das einzige Mitglied dieser Enzymfamilie, dessen dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde (MA X *et al.*, 2004). Durch ausgewähltes Austauschen von Aminosäuren, die sich aus der Struktur der Vinorin-Synthase und Sequenzvergleichen mit anderen BAHD-Mitgliedern ergaben, könnten möglicherweise Aussagen über Funktionen getroffen werden, die die gesamte BAHD-Familie betreffen.

Eine zu 100 % konservierte Region dieser Enzymfamilie ist das Motiv HisXXXAsp (HXXXD). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin zu einem totalen Verlust der Vinorin-Synthase Aktivität führte (BAYER A *et al.*, 2004). Aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Proteins ist ersichtlich, dass sich dieses Motiv im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase befindet (Abbildung 21). Dadurch wird die essentielle Bedeutung des Motivs HxxxD unterstrichen. Der funktionale Rest der Asparaginsäure befindet sich allerdings nicht in Richtung des aktiven Zentrums geneigt, sondern in Richtung der Seitenkette vom Arginin 279. Eine direkte Rolle von Asp 164 bei der enzymatischen Reaktion kann daher ausgeschlossen werden. Eine strukturelle Bedeutung über eine Salzbrücke zu Arg 279 konnte nachgewiesen werden (MA X *et al.*, 2004). Mutationen von Asp 164 zu

ähnlichen Aminosäuren sollten nun näher untersucht werden. Hierzu zählen eine Verlängerung der Seitenkette des Asp 164 durch eine zusätzliche CH_2 -Gruppe (Glu) und leichte Veränderungen der funktionellen Gruppe. So wurde die Hydroxylgruppe des Asparaginsäurerestes durch eine Aminogruppe ersetzt (Asparagin) und der doppelt gebundene Sauerstoff durch eine Methylgruppe (Threonin). Durch diese Mutationen sollte ein näherer Einblick in die strukturelle Bedeutung des in der BAHD-Gruppe konservierten Asp 164 erzielt werden.

Abbildung 21: A) Lage des Motivs **HXXXD** im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase
B) Nähere Betrachtung der Salzbrücke zwischen den Aminosäuren **Asp 164** und **Arg 279**

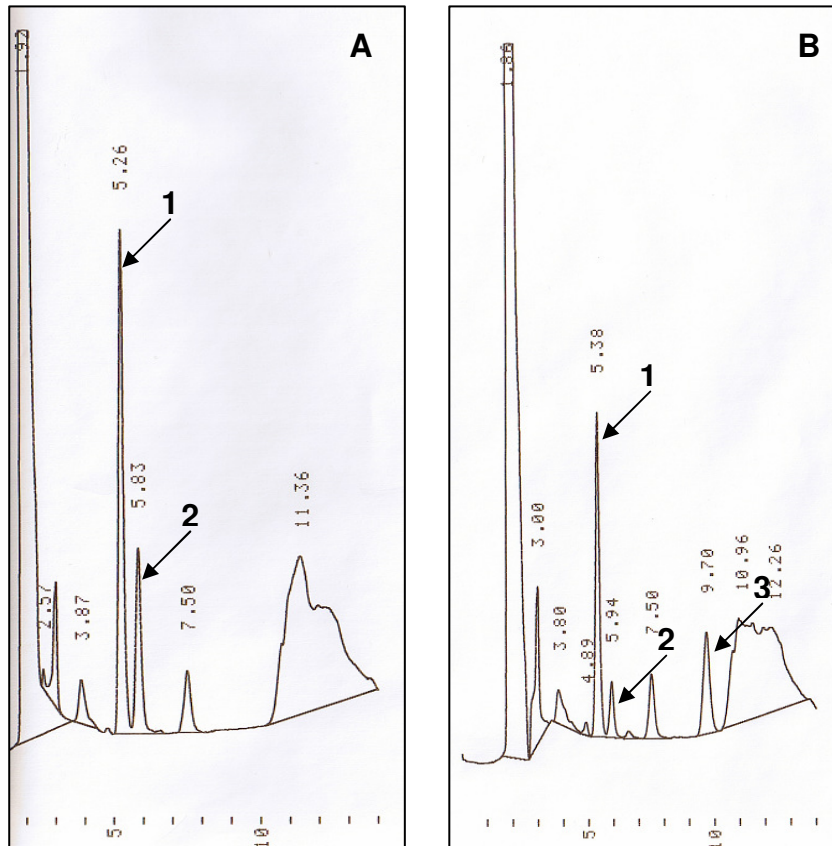


Um die Bedeutung der Aminosäure Asparaginsäure 164 näher zu untersuchen, wurden Mutationen wie unter III.2.1.2 beschrieben in das Vinorin-Synthase/pQE2-Konstrukt eingeführt. Als Matrizen-DNA diente isoliertes Plasmid mit dem Insert der Vinorin-Synthase cDNA. Die verwendeten komplementären Primer entsprachen der Sequenz der Matrizen-DNA und unterschieden sich nur in dem Codon, welches für den Aminosäureaustausch verantwortlich war. Folgende Primer wurden für die Mutations-PCRs verwendet (Abbildung 22):

Abbildung 22: Verwendete Primer für Mutagenesestudien der Asparaginsäure 164 der Vinorin-Synthase

<p>Mutation Asp 164 zu Glutaminsäure: D164E-forward 5'-CGCATAAGATAGCTGAAGTATTGTCCCTGGCC-3' D164E-reverse 5'-GGCCAGGGACAATACTTCAGCTATCTTATGCG-3'</p>
<p>Mutation Asp 164 zu Threonin: D164T-forward 5'-CGCATAAGATAGCTACCGTATTGTCCCTGGCC-3' D164T-reverse 5'-GGCCAGGGACAATACGGTAGCTATCTTATGCG-3'</p>
<p>Mutation Asp 164 zu Asparagin: D164N-forward 5'-CGCATAAGATAGCTAACGTATTGTCCCTGGCC-3' D164N-reverse 5'-GGCCAGGGACAATAGTTAGCTATCTTATGCG-3'</p>
<p>XXX = Codon für Aminosäureaustausch</p>

Nach erfolgter PCR wurde die Template-DNA mittels *Dpn* I verdaut, das PCR-Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt und in *E. coli* Top10-Zellen transformiert. Hier wurden die noch offenen Vektoren geschlossen und vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide isoliert, sequenziert und in M15 Zellen transformiert. Die Expression und Reinigung der mutierten Vinorin-Synthase wurde wie unter III.1 beschrieben durchgeführt. Nachdem die Mutanten und die native Vinorin-Synthase über Ni-NTA und MonoQ Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden, wurden alle Lösungen mittels Bradfordtest (III.1.8) und Konzentratoren auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Mit den erhaltenen Enzymlösungen wurden vergleichende Aktivitätstests durchgeführt (III.3.4). Abbildung 23 zeigt zwei HPLC-Chromatogramme nach einem durchgeführten Aktivitätstest. Hierbei ist deutlich der Umsatz vom Gardneral (als Abnahme der Peaks von 16-epi-11-Methoxy-10-Deoxysarpagin und 11-Methoxy-10-Deoxysarpagin und dem Auftreten von 11-Methoxy-Vinorin) beim Test mit dem nativen Enzym (B) zu erkennen. Als Beispiel für einen Aktivitätstest mit einer inaktiven Mutante ist hier das Chromatogramm von D164N (A) dargestellt. Dieser Test wurde mit einer hohen Enzymkonzentration (5 µg/Ansatz) für 2 h durchgeführt.

Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme nach vergleichendem Aktivitätstest**A) Mutante D164N; B) Native Vinorin-Synthase****1: 16-epi-11-Methoxy-10-Deoxysarpagin; 2: 11-Methoxy-10-Deoxysarpagin;****3: 11-Methoxy-Vinorin**

Die Mutationen der Asparaginsäure 164 zu Glutaminsäure, Asparagin und Threonin zeigten eindeutig, dass keine Vinorin-Synthase Aktivität mehr nachzuweisen war. Selbst bei großen Mengen von eingesetztem Enzym (10 mg/ml) und langen Inkubationszeiten (3 h) zeigte sich keinerlei Umsatz des Gardnerals.

Die Aminosäure Arg 279 stellt den Bindungspartner von Asp 164 für die strukturell entscheidende Salzbrücke der Vinorin-Synthase dar. Diese Mutation sollte ebenfalls zu einem absoluten Verlust der Aktivität führen, da die Salzbrücke nicht mehr zustande kommen kann. Diese Mutation wurde wie oben beschrieben mit folgenden Primern durchgeführt (Abbildung 24).

Abbildung 24: Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Arginin 279 der Vinorin-Synthase

Mutation von Arg 279 zu Alanin:

R279A-forward

5'-GCAGTGAACCTG**GCG**TCAAGAATGAATCCG-3'

R279A-reverse

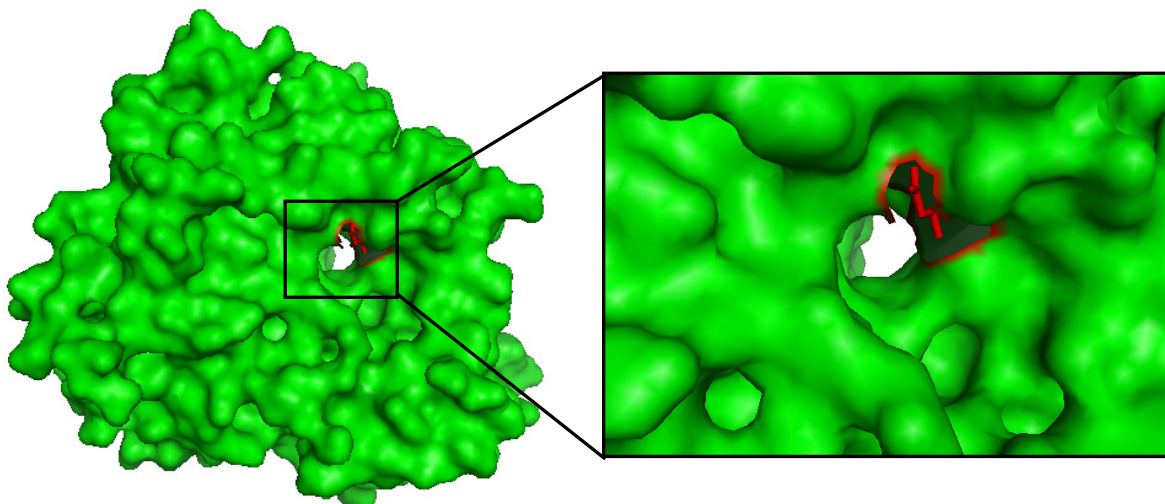
5'-CGGATTCATTCTTGA**CGC**CAGGTTCACTGC-3'

XXX = Codon für Aminosäureaustausch

Bei Aktivitätstests mit dieser Mutante konnte ebenfalls keine Aktivität nachgewiesen werden.

Eine weitere untersuchte Aminosäure der Vinorin-Synthase ist das Asparagin 277. In der BAHD-Superfamilie ist an dieser Position in den allermeisten Fällen entweder ein Asparagin oder eine Asparaginsäure zu finden (Abbildung 25). Die phylogenetische Untergruppe aller biochemisch untersuchten BAHD-Mitglieder, zu der auch die Vinorin-Synthase gehört, weist an dieser Position grundsätzlich ein Asparagin auf und verwendet als Cosubstrat mit nur einer Ausnahme Acetyl-CoA (D'AURIA J, 2006). Da diese Aminosäure direkt am Eingang der engen Seite des Vinorin-Synthase Kanals liegt, und seine reaktive Gruppe anhand der dreidimensionalen Struktur keine strukturelle Bedeutung zu haben scheint, könnte die Möglichkeit gegeben sein, dass sie für die Bindung des Acetyl-CoAs eine wichtige Rolle übernimmt.

Abbildung 25: Lage der Aminosäure **Asparagin 277 am engen Eingang des VS-Kanals**



Um die Möglichkeit einer generellen Funktion zu überprüfen, wurde diese Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht. Zusätzlich erfolgte ein Austausch gegen Asparaginsäure, da andere phylogenetische Untergruppen an dieser Stelle diese Aminosäure aufweisen.

Folgende Primer wurden für die Mutations-PCRs verwendet (Abbildung 26).

Abbildung 26: Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Asparagin 277 der Vinorin-Synthase

<p>Mutation von Asn 277 zu Asparaginsäure: N277D-forward 5'-GGTAGTTCAAGCAGTGGATCTGAGGTCAAGAATG -3' N277D-reverse 5'-CATTCTTGACCTCAGATCCACTGCTTGA ACTACC -3'</p>
<p>Mutation von Asn 277 zu Alanin: N277A-forward 5'-GGTAGTTCAAGCAGTGGCGCTGAGGTCAAGAATG -3' N277A-reverse 5'-CATTCTTGACCTCAGGCGCACTGCTTGA ACTACC -3'</p>
<p>XXX = Codon für Aminosäureaustausch</p>

Bei beiden Mutationen konnte eine Aktivität nachgewiesen werden. Eine generelle Bedeutung der Aminosäure Asparagin 277 für die Bindung der Substrate (Acetyl-CoA und 16-epi-Vellosimin (Gardneral)) an das Enzym kann somit ausgeschlossen werden.

Um experimentell zu klären, ob die von MA *et al.* (2004) über Modellierung postulierte Position des Liganden CoA der tatsächlichen entspricht, wurde eine Mutation hergestellt, bei der der Zugang zum aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase blockiert wurde. Hierzu wurde die Aminosäure Valin 165 zum Tryptophan mutiert. Tryptophan weist eine wesentlich größere Seitenkette auf als Valin. Modellierungsversuche zeigten, dass sich diese große Gruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt in den Kanal der Vinorin-Synthase legt und somit den Zugang zum aktiven Zentrum von dem engen Eingang her blockiert. Über Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen der Mutante, konnte diese Lage bestätigt werden. Aktivitätstests zeigten auch, dass es sich um eine Knockout-Mutante handelte. Über Cokristallisations- oder Soaking-Experimente könnte nun möglicherweise geklärt werden, welcher der beiden Liganden (Acetyl-CoA oder 16-

epi-Vellosimin) sich von welcher Seite des Enzymkanals her dem aktiven Zentrum nähert, indem eventuell auftretende Elektronendichten interpretiert werden. Für diese Mutation wurden folgende Primer verwendet (Abbildung 27).

Abbildung 27: Verwendete Primer für Mutagenesestudien des Valin 165 der Vinorin-Synthase

<p>Mutation von Val 165 zu Tryptophan: V165W-forward 5'-CGCATAAGATAGCTGATTGGTTGTCCCTGGCC -3' V165W-reverse 5'-GGCCAGGGACAACCAATCAGCTATCTTATGCG -3'</p>
<p>XXX = Codon für Aminosäureaustausch</p>

4. Kristallisation und Strukturaufklärung der Polyneuridin-aldehyd-Esterase (PNAE) aus *Rauvolfia serpentina*

Die Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNAE) wurde erstmals von PFITZNER und STÖCKIGT (1983) charakterisiert. Später gelang es, das Enzym über chromatographische Verfahren aus Pflanzenzellkulturen aufzureinigen, und Peptidfragmente zu sequenzieren (DOGRU E *et al.*, 2000). Über „reverse genetics“ gelang es schließlich, die komplette cDNA der PNAE zu identifizieren, und das Enzym aktiv heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Es wurde durch „homology modeling“ ein Modell der dreidimensionalen Struktur der PNAE erstellt (MATERN-DOGRU E *et al.*, 2002). Als Vorlage für die Modellierung wurde die bekannte Struktur der Hydroxynitril-Lyase aus *Hevea brasiliensis* (PDB-Nr.: 1YAS) verwendet, die eine Sequenzidentität von 43 % zur PNAE aufweist und ebenfalls zu den α/β -Hydrolasen zählt (WAGNER U *et al.*, 1996). Um allerdings den genauen dreidimensionalen Aufbau der Polyneuridinaldehyd-Esterase zu bestimmen, sollte eine Kristallisation und Strukturaufklärung des Enzyms vorgenommen werden.

4.1 Umklonierung der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus pQE70 in pQE2

Die heterologe Expression der PNAE wurde mittels eines Konstrukts aus PNAE cDNA und dem Expressionsvektor pQE70 durchgeführt. Somit konnte das Enzym

durch seinen C-terminalen Histidin-Rest über eine Ni-NTA Chromatographie aus einem Proteinrohextrakt aufgereinigt werden (III.1.1 und III.1.4). Für die Kristallisation von Proteinen stellt sich ein vorhandener Histidin-Rest allerdings sehr häufig als hinderlich heraus. Aus diesem Grund erfolgte eine Umklonierung der PNAE cDNA in den Vektor pQE2. Dieser Vektor erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen 6 x Histidin-Rest, der nach der Aufreinigung mit der Exonuklease DAPase abgespalten werden kann (III.1.10). Diese Umklonierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung folgender Primer (Abbildung 28).

Abbildung 28: Verwendete Primer zur Umklonierung der PNAE in den Vektor pQE2

PNAE/pQE2:

forward-Primer

5'-GCATGC**CAG**ATGCATTCTGCTGCAAACGC-3'

reverse-Primer

5'-AAGCTTTATGAATCTGATATATCAA-3'

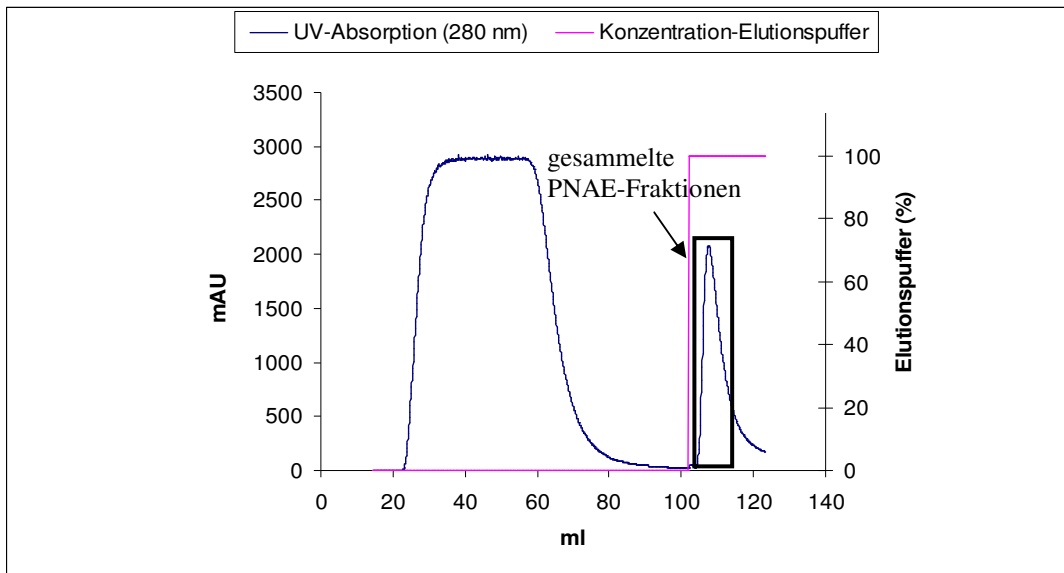
G = eingefügt für Einhaltung des Leserahmens

CAG = Stoppunkt für Abspaltung des Histidin-Restes

GCATGC = Restriktionsschnittstelle für Sph I

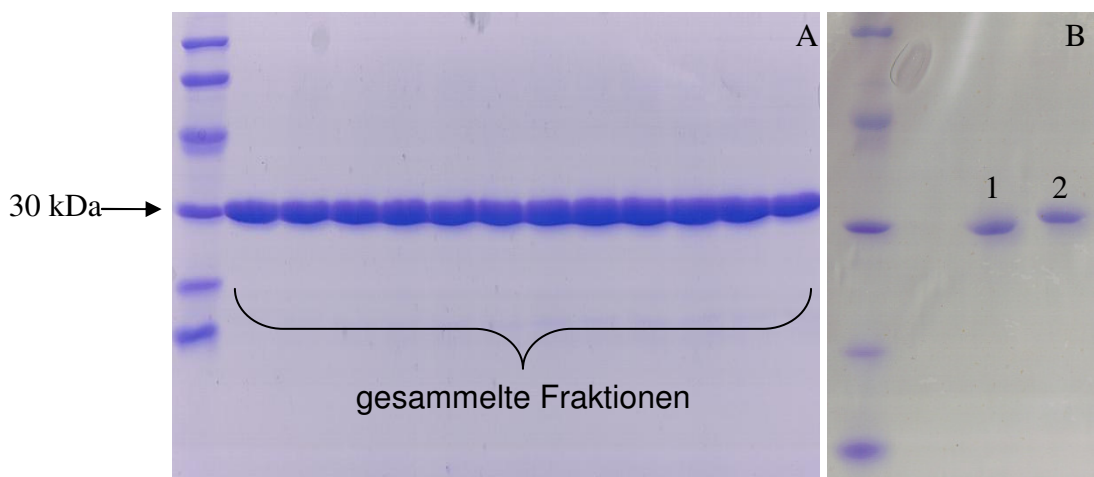
AAGCTT = Restriktionsschnittstelle für Hind III

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel gereinigt (III.2.3.1) und in das multi-copy Plasmid pGEM-T easy ligiert. Nach erfolgter Transformation und Vermehrung der Plasmide in *E. coli* Top10 wurden die Plasmide gereinigt und sequenziert (III.2.3.2.2). Die Plasmide, die die korrekten Sequenzen aufwiesen, wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sph I und Hind III geschnitten (III.2.2.2). Die Inserts und der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen geschnittene Vektor pQE2 wurden mit einem Agarosegel aufgereinigt und ligiert. Nach Vermehrung der Plasmide in Top10-Zellen erfolgte die Transformation in das Bakterium *E. coli* M15. Die Zellen wurden in 5 l LB-Medium (Kan + Amp) angezogen und bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bei 24°C. Anschließend wurde ein Proteinrohextrakt hergestellt (III.1.1), und die PNAE über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt (Abbildung 29).

Abbildung 29: Aufreinigung der PNAE durch Ni-NTA Affinitätschromatographie

Nach der Aufreinigung der PNAE wurde ein SDS-Gel angefertigt, um die Reinheit des isolierten Proteins zu bestimmen. Es zeigte sich, dass in allen gesammelten Fraktionen eine hohe Reinheit der Polyneuridinaldehyd-Esterase zu finden war (Abbildung 30 A). Die Aktivität des isolierten Enzyms konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnten aus 1 l LB-Medium etwa 28 mg PNAE aufgereinigt werden.

**Abbildung 30: A) SDS-Gel der homogenen PNAE nach der Ni-NTA Chromatographie
B) SDS-Gel der PNAE nach (1) und vor (2) der Histidin-Rest Abspaltung**



4.2 Kristallisation der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Die isolierte PNAE wurde durch Dialyse in einen Puffer bestehend aus 20 mM Tris, pH 7,5, 10 mM β -Merkaptoethanol und 1 mM EDTA überführt. Die Kristallisationsversuche wurden anfangs sowohl mit als auch ohne Histidin-Rest durchgeführt (Abbildung 30 B). Es wurden Enzymkonzentrationen von 2,5 mg/ml, 3,5 mg/ml, 5 mg/ml und 10 mg/ml getestet. Zuerst wurden Kristallisationsansätze in VDX-Platten angesetzt, wobei 750 μ l Präzipitantpuffer in die Reaktionskammer gegeben wurden. Die Kristallisationstropfen setzten sich aus 2 μ l dieser Puffer und 2 μ l Enzymlösung zusammen. Die Präzipitantpuffer entstammten den Screening-Kits Crystal Screen I und Crystal Screen II (Hampton Research). Diese Kits enthalten jeweils 48 verschiedene Puffer, die aus Erfahrungswerten heraus bei vielen anderen Proteinen zur Kristallbildung führten und eine breite Masse von Salzen, pHs und Präzipitanten abdecken. Die Platten mit den unterschiedlichen Puffern und Proteinkonzentrationen (mit und ohne Histidin-Rest) wurden bei Temperaturen von 4°C, 23°C, 30°C und 32°C über Wochen gelagert und anfangs täglich, später im Abstand von einigen Tagen, auf Kristallbildung hin untersucht. Somit wurden mehr als 1500 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen getestet.

In keinem Fall konnte eine Kristallisation nachgewiesen werden. In den allermeisten Ansätzen präzipitierte das Protein. Bei der verwendeten Enzymkonzentration von 10 mg/ml trat das bei allen Bedingungen auf, sodass keine weiteren Versuche mit einer so hohen PNAE-Konzentration unternommen wurden. In den übrigen Fällen blieben die Kristallisationstropfen auch noch nach Wochen klar. Da keinerlei Tendenz zur Kristallisierbarkeit der PNAE zu erkennen war, wurde ein weitergehendes „High-Throughput-Screening“ mit 720 verschiedenen Puffern (Tabelle 8) am EMBL in Hamburg mittels eines Pipettierroboters durchgeführt (III.5.1.1.1).

Tabelle 8: Verwendete Puffer-Kits für das „High-Throughput-Screening“ zur Kristallisation der PNAE

Verwendete Kristallisations-Kits	Bedingungen
Hampton Research Grid Screen Ammonium Sulfate	24
Hampton Research Grid Screen MPD	24
Hampton Research Grid Screen PEG 6000	24
Hampton Research Grid Screen Sodium Malonate	24
Hampton Research Index	96
Hampton Research SaltRX	96
Molecular Dimensions JCSG- <i>plus</i>	96
Jena Bioscience JBScreen Classic 1-10	240
Jena Bioscience Emerald BioSystems Wizard Screens I und II	96

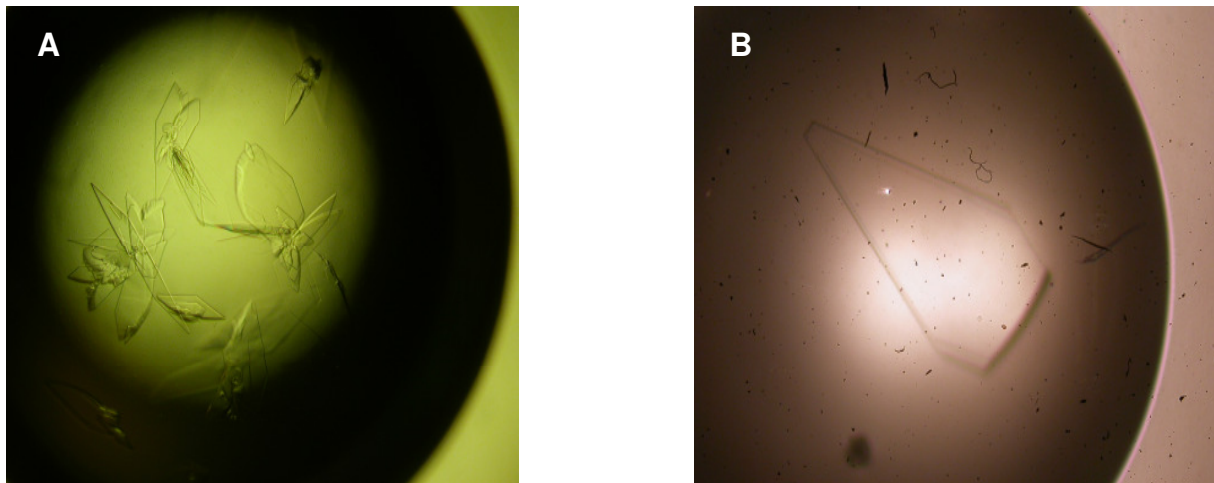
Die ersten hexagonalen Einkristalle konnten mit einem Puffer bestehend aus 1,6 M Ammoniumsulfat und 0,1 M Bicin, pH 9,0 (Hampton Research Grid Ammonium Sulfate B 6) hergestellt werden. Hierbei lag eine Enzymkonzentration von 5 mg/ml vor. Der verwendete Präzipitantpuffer wurde sowohl selbst hergestellt als auch von Hampton Research bezogen. Es wurde versucht, die Kristalle mit der „Hanging-Drop“ Methode zu reproduzieren. Dieses gelang jedoch auch nach vielfachen Versuchen mit veränderter Ammoniumsulfatkonzentration sowie unterschiedlichen pH-Werten nicht.

Weitere PNAE-Kristalle entstanden bei einem Ansatz mit 0,2 M Lithiumsulfat, 0,1 M Bis Tris pH 5,5 und 25 % (W/V) Polyethylenglycol 3350 (Molecular Dimensions JCSG-*plus* H 9). Dieser Puffer wurde ebenfalls selbst hergestellt, und die Kristalle mit der „Hanging-Drop“ Methode reproduziert. In diesem Fall konnten die Proteinkristalle problemlos in großer Zahl bei einem erhöhten pH von 6,8 und einer Inkubationstemperatur von 23 °C produziert werden. Die Kristalle traten nach 2 bis 3 Tagen auf (Abbildung 31 A) und entstanden nur bei einer Kristallisation der PNAE mit N-terminalem Histidin-Rest.

Anschließend erfolgten weitere Optimierungsversuche, um kompakte Einkristalle zu erhalten, die für die Röntgenstrukturanalyse verwendet werden konnten. So konnten vereinzelt solche Kristalle gezüchtet werden, die im Vergleich zu den zuerst erhaltenen Kristallen keine Verzweigungen aufwiesen (Abbildung 31 B). Erste Analysen dieser noch sehr flachen Einkristalle wurden in der „Protein Structure

Factory“ bei der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Kristalle eine Auflösung von 3,4 Å erreichten. Es ergab sich allerdings das Problem, dass alle bisher erhaltenen Kristalle eine große Ausdehnung in zwei Dimensionen aufwiesen, die dritte allerdings so klein ausfiel, dass keine Aufnahme eines Datensatzes möglich war. Somit war es zur Strukturaufklärung der PNAE also unausweichlich, kompaktere Proteinkristalle zu generieren. Hierzu wurde auf verschiedene Verfahren zurückgegriffen.

Abbildung 31: Erste selbst hergestellte PNAE Kristalle (A), erster erhaltener Einkristall (B)



4.2.1 Variationen von Kristallisationstemperatur, Proteinkonzentration und Pufferzusammensetzung

Zunächst erfolgten Optimierungsversuche, bei denen Bereiche eingegrenzt wurden, in denen es zum Kristallwachstum der PNAE kam. Hierzu wurden Kristallisierungsversuche angesetzt und die Grenzen der Temperatur, der Proteinkonzentration, der Konzentration an Lithiumsulfat und Polyethylenglykol 3350 sowie des pH-Wertes bestimmt, zwischen denen es zu einem Kristallwachstum kam. Innerhalb dieser Toleranzbereiche wurde nach Tendenzen für ein Wachstum für kompakte Einkristalle der PNAE gesucht.

Es zeigte sich, dass Kristalle bei Temperaturen von 4°C bis zu 30°C wuchsen. Über 30°C kam es zu keinerlei Wachstum. Die beste visuelle Qualität der Kristalle wurde bei 23°C erreicht. Bei niedrigeren Temperaturen traten vermehrt sehr kleine Kristalle

auf. Kompaktere Kristalle konnten in Abhängigkeit von der Temperatur jedoch nicht erzeugt werden.

Die eingesetzte Proteinkonzentration zur Kristallisation lag im Bereich von 2,5 mg/ml bis 7,5 mg/ml. Unterhalb von 2,5 mg/ml konnten keine Kristalle beobachtet werden, und oberhalb einer Konzentration von 7,5 mg/ml bildete das Enzym über Nacht ein Präzipitat. Die besten Ergebnisse wurden in einem Konzentrationsbereich von 3 mg/ml bis 5 mg/ml erreicht. Allerdings konnte auch so keine Verbesserung der Kristallform erreicht werden.

Ebenso wurden die Bereiche der Lithiumsulfat-, PEG 3350- und Bis Tris (pH 6,8)-Konzentration bestimmt, in denen Kristalle erzeugt werden konnten. Auch hierbei wurde keine Tendenz erkannt, die zu verwertbaren Kristallen führen könnte. Letztlich wurden auch noch der pH-Wert und das Molekulargewicht des eingesetzten Polyethylenglycols variiert.

Die zusammengefassten Ergebnisse zeigten, dass die visuell betrachtet besten Kristalle bei einer Pufferzusammensetzung von 0,25 M Lithiumsulfat, 0,1 M Bis Tris (pH 6,8) und 25 % (W/V) Polyethylenglycol 3350 zustande kamen. Des Weiteren wurde eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml bis 5 mg/ml eingesetzt, und die Kristallplatten bei 23°C inkubiert. Vorerst konnten jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Kristalle für die Strukturanalyse gezüchtet werden.

Als weiterer Optimierungsschritt wurde das „EasyXtal Tool X-Seal Opti Salt Suite“ (Qiagen) benutzt. Hierbei handelt es sich um Kristallisationsplatten, in deren Wells 100 µl Lösung unterschiedlicher Salze mit verschiedenen pH-Werten vorgelegt sind. Zu diesen Lösungen wurden 900 µl des Puffers für die PNAE Kristallisation gegeben, und anschließend Kristalle mit dem jeweiligen Puffergemisch als Präzipitant-Puffer angesetzt. Dieses System eignet sich besonders für die Optimierung von Proteinkristallen in Nadel- oder 2D-Form. Für die PNAE konnte allerdings kein Fortschritt mittels dieser Versuchsreihe erzielt werden.

4.2.2 Reduktive Methylierung der Oberflächen-Lysine der PNAE

Eine weitere Möglichkeit die Kristallisierbarkeit von Proteinen zu verbessern, stellt die Veränderung ihrer Oberflächen dar. So können beispielsweise langkettige, hydrophile Seitenketten, wie sie bei Lysinen auftreten, die Kristallisation verhindern oder erschweren. Durch reduktive Methylierung aller primären Amine an der

Oberfläche der Proteine, wie sie bei Lysinen und dem N-Terminus auftreten, werden diese hydrophober und die Oberflächenentropie der Proteine herabgesetzt. Somit verringert sich die Interaktion der Seitenketten mit der wässrigen Lösung, und es kommt zu einer geordneteren Konformation. Diese Gegebenheit kann zu einer erleichterten Kristallisation oder auch einer besseren Zusammenlagerung der Einzelzellen in eine Richtung des Kristalls führen, wie es bei der PNAE wünschenswert wäre. Die reduktive Methylierung wurde mittels Formaldehyd/Dimethylaminoboran (DMAB) durchgeführt, was in zwei Schritten zu einer Dimethylierung der primären Amine führt (SCHUBOT F und WAUGH D, 2004). Hierzu wurde die PNAE aus einem Proteinrohextrakt über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt und durch Dialyse in einen Puffer bestehend aus 50 mM NaP_i, pH 7 überführt. Die Proteinkonzentration wurde auf 5 mg/ml eingestellt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung 1: 1 M DMAB in 50 mM NaP_i pH 7,0

Lösung 2: 1 M Formaldehyd in 50 mM NaP_i pH 7,0

Lösung 3: 1 M Ammoniumsulfat in 50 mM NaP_i pH 7,0

Die Enzymlösung wurde mit 2 % (V/V) Lösung A gemischt, 4 % (V/V) Lösung 2 hinzugefügt und für 2 h inkubiert. Anschließend wurde dieser Schritt wiederholt. Es folgte eine Inkubation mit 1 % (V/V) Lösung 1 für 18 h. Der überschüssige Formaldehyd wurde durch Zugabe von 10 % (V/V) Lösung 3 gebunden. Die PNAE mit dimethylierten Oberflächen-Lysinen (und N-terminalem Ende) wurde nun durch zweifache Dialyse in den standardmäßig verwendeten Proteinkristallisationspuffer (20 mM Tris, pH 7,5, 10 mM β-Merkaptoethanol und 1 mM EDTA) überführt. Anschließend wurden Kristallisationen angesetzt. In allen Ansätzen bis zu einer Enzymkonzentration von 2,5 mg/ml kam es über Nacht zu einem Proteinpräzipitat. In keinem Fall konnte eine Kristallbildung der PNAE beobachtet werden.

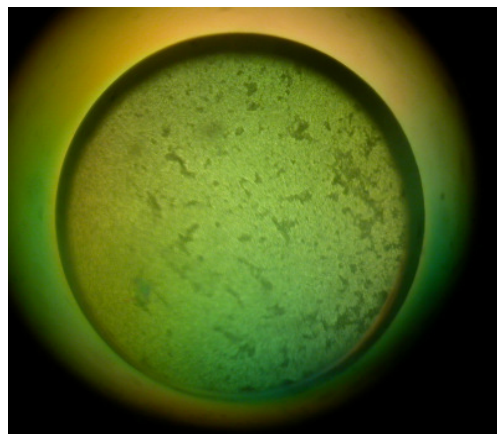
4.2.3 Anwendung unterschiedlicher Verfahren zur Kristallisation der PNAE

Da alle bisherigen Optimierungsbemühungen keinen Fortschritt in der Kristallform der PNAE gebracht hatten, wurden zwei weitere Kristallisationstechniken

angewendet. Zum einen wurde die Kristallisation mit Dialyseknöpfen (III.5.1.2.1) und zum anderen eine Kristallisation in Kapillaren (III.5.1.2.2) durchgeführt. Bei beiden Techniken erfolgt der Austausch zwischen Kristalllösung und Präzipitantpuffer nicht über eine Gasphase, wie bei der Hanging- und Sitting-Drop Methode, sondern über eine semipermeable Membran bzw. ein Silikonöl.

Bei der Kristallisation in Dialyseknöpfen wurde eine semipermeable Membran verwendet, die eine Ausschlussgröße von 10 kDa aufwies. Somit konnten alle Pufferingredienzien frei durch diese Membran diffundieren, ein Austritt des eingesetzten Enzyms war allerdings nicht möglich. Ein entscheidender Unterschied zur Hanging- und Sitting-Drop Methode ist weiterhin, dass die Proteinkonzentration innerhalb der Dialyseknöpfe gleich bleibt und nicht mit fortschreitender Dauer ansteigt. Anfangs wurden Enzymkonzentrationen von 5 mg/ml eingesetzt, wobei Beobachtungen ergaben, dass es innerhalb von wenigen Minuten zu einem Ausfallen des Proteins kam (Abbildung 32).

Abbildung 32: Ausgefallene PNAE bei der Kristallisation in Dialyseknöpfen



Selbst bei einer eingesetzten Enzymkonzentration von 2 mg/ml und veränderten Mischungsverhältnissen zwischen Proteinlösung und Präzipitantpuffer denaturierte das Protein. In keinem Fall konnten PNAE Kristalle beobachtet werden.

Bei der Kristallisation in Kapillaren erfolgt der Austausch zwischen den beiden flüssigen Phasen über eine Schicht aus Silikonöl. Die Diffusion der Pufferbestandteile geschieht aufgrund der Dicke dieser Schicht sehr langsam, was den Hauptunterschied zur Mikrodialyse in Dialyseknöpfen darstellt. Allerdings können bei dieser Methode Ergebnisse auch erst nach Wochen erwartet werden. Sie eignet

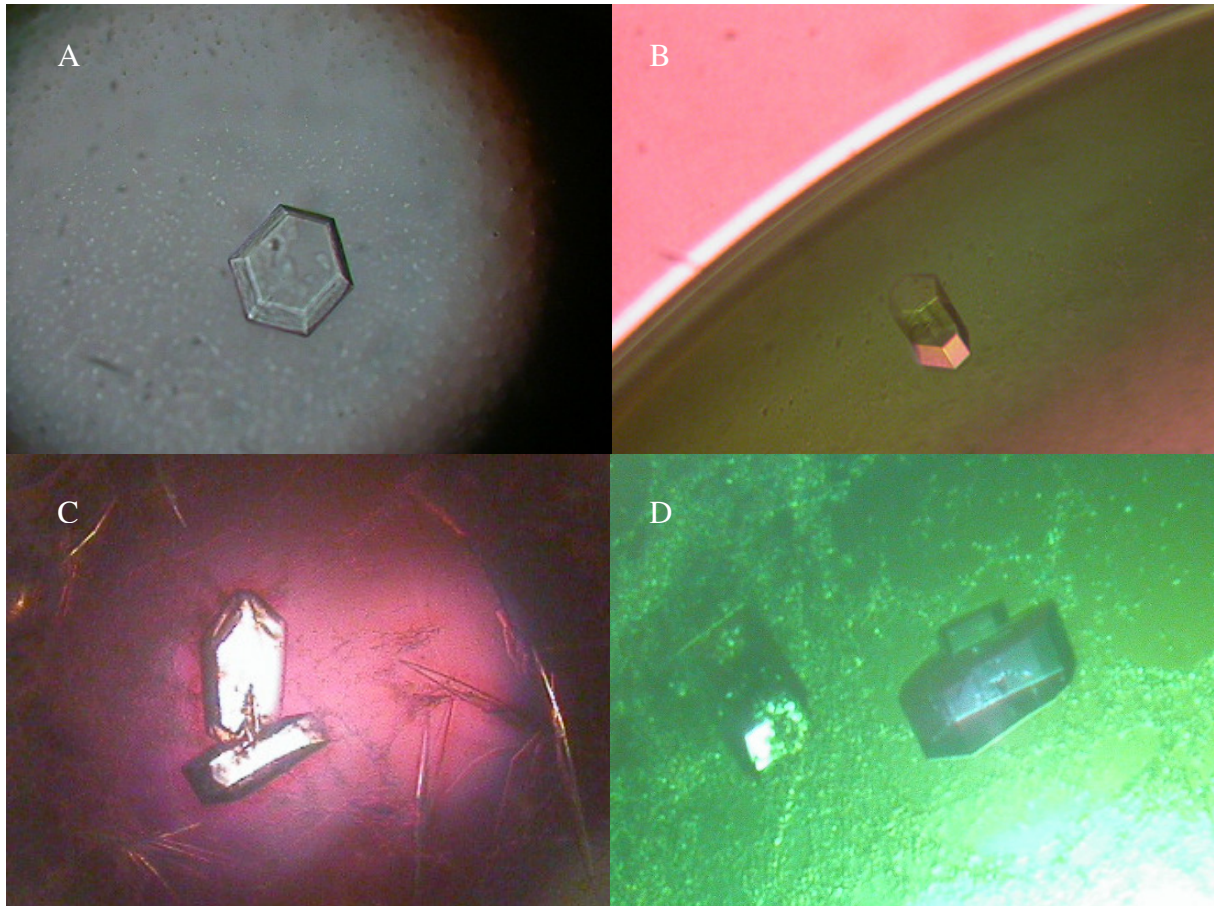
sich wegen der schwierigen Handhabung nicht für eine große Anzahl von Ansätzen. Es wurden Proteinkonzentrationen von 2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 7,5 mg/ml eingesetzt. Als Präzipitantpuffer wurde der gleiche wie bei den übrigen Verfahren angewendet. Selbst nach einer Inkubationszeit von drei Monaten konnte weder eine Bildung von Kristallen noch ausgefallenes Protein gefunden werden.

Als eine Abwandlung des Sitting-Drop Verfahrens wurde die Kristallisation unter Öl durchgeführt. Je nach verwendetem Öl wird hierbei die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers aus dem Tropfen hin zum Präzipitantpuffer mehr oder weniger verlangsamt. Das verwendete Silikonöl lässt eine recht schnelle Diffusion zu. Je höher jedoch der Anteil des zugesetzten Parafinöls ist, umso langsamer geht sie von statten. Die Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Hanging-Drop Ansätze durchgeführt. Zusätzlich wurden die Tropfen mit 3 µl reinem Silikonöl oder mit einer Mischung aus Parafin- und Silikonöl (50/50) (Al`s Oil (D`ARCY *et al.* (1996)) überschichtet. Eine Kristallbildung konnte in keinem der Ansätze beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von einigen Tagen kam es bei den mit reinem Silikonöl überschichteten Tropfen zu einer Präzipitatbildung. Gleiches passierte nach etwa einer Woche in den Tropfen, die mit Al`s Oil überschichtet waren.

4.3 Röntgenbeugungsmuster und Strukturaufklärung der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Die rund 120 angesetzten VDX-Platten zur Kristallisation der Polyneuridinaldehyd-Esterase wurden innerhalb der ersten Tage täglich und später im Abstand von Wochen mit einem Mikroskop auf ein Wachstum kompakter Kristalle hin untersucht. Da in jedem Well der Platten zwei bis drei Kristalltropfen inkubiert wurden, waren so über 6000 Tropfen allein bei der Hanging-Drop Methode unter Beobachtung. In 5 bis 10 dieser Tropfen konnten nach einer Inkubation über mehrere Wochen Kristalle gefunden werden, die eine deutlich kompaktere Form aufwiesen als die ansonsten durchweg flachen, eher zweidimensionalen Kristalle. All diese Kristalle ergaben sich aus der PNAE mit Histidin-Rest und unter Kristallisationsbedingungen, die sehr nah an den aus den Vortests ermittelten lagen. Die Kristalle konnten allerdings nicht einer bestimmten Kristallisationsbedingung zugeordnet werden und waren auch nicht reproduzierbar zu generieren. Die Abbildung 33 zeigt eine Auswahl der erhaltenen, kompakten Einkristalle.

Abbildung 33: Auswahl von PNAE Kristalle in kompakter Form, (A: nicht polarisiertes Licht; B,C,D polarisiertes Licht)



Diese Kristalle traten sowohl in Tropfen auf, die ansonsten weder Kristallbildung noch ein Präzipitat aufwiesen (Abbildung 33 A und B), als auch in solchen mit flachen Kristallen (Abbildung 33 C) oder Präzipitat (Abbildung 33 D). Ebenso konnte keine einheitliche Kristallform erkannt werden. Die PNAE Kristalle wurden nicht in flüssigem Stickstoff eingefroren, da noch keine Klarheit über den zu verwendenden Cryopuffer bestand. Tests mit einigen flachen PNAE Kristallen ergaben, dass ein Cryopuffer bestehend aus Reservoirpuffer und 20 % (V/V) Glycerol benutzt werden konnte. Die Kristalle wurden mittels eines Loops aus dem jeweiligen Tropfen „gefischt“, für einige Sekunden in dem Cryopuffer geschwenkt und anschließend in einem Strom aus kaltem Stickstoff (-173°C) in dem Loop eingefroren. Die Messungen wurden an der Beamline X11 im EMBL in Hamburg bei einer Wellenlänge von $0,81 \text{ \AA}$ durchgeführt. Der in Abbildung 33 D (blau) gezeigte Kristall zeigte scharfe Reflexe bis zu einer Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$.

Tabelle 9: Statistik des PNAE Datensatzes. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchstauflösende Schale

Beamline	X11 EMBL Hamburg
λ (Å)	0,8062
Raumgruppe	C222
Einheitszelle	a=92.660 Å b=176.826 Å c=75.638 Å $\alpha=\beta=\lambda=90^\circ$
Gemessene Reflektionen	306582
Unabhängige Reflektionen	32082
Redundancy	9,6 (9,0)
Bereich der Auflösung (Å)	20,0 -2,20 (2,24 -2,20)
$I/\sigma(I)$	29,6 (3,8)
R_{sym} (%)	5,6 (50,3)
Vollständigkeit (%)	99,9 (98,7)
Mosaizität (°)	0,66

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der PNAE erfolgte durch „Molecular Replacement“. Als Vergleichsmodell diente das Salizylsäure-Bindeprotein 2 (SABP2) (pdb-Code: 1XKL) aus *Nicotiana tabacum* (FOROUHAR F *et al.*, 2005). Die Sequenz weist eine Aminosäureidentität von 54 % zur PNAE auf.

Die Daten der erhaltenen Röntgendiffraktionsbilder wurden durch die Programme DENZO und SCALEPACK (HKL-Suite, OTOWINOVSKI Z und MINOR W, 1997) integriert und zusammengefasst. Nach Berechnungen mit dem Matthews-Koeffizienten konnten zwei PNAE Moleküle in der asymmetrischen Einheit erwartet werden (MATTHEWS B, 1968). Das Molecular Replacement wurde mittels der „Automated Crystal Structure Determination Platform“ Auto-Rickshaw (PANJIKAR S *et al.*, 2005) durchgeführt und lieferte die zwei erwarteten Moleküle in der asymmetrischen Untereinheit. Zur ersten Verfeinerung der Struktur wurde ein „Rigid Body Refinement“ (Verschiebung und Drehung des starren Modells) mit dem Programm CNS von Dr. Santosh Panjikar durchgeführt (BRÜNGER A *et al.*, 1998). Der Umbau der Sequenz des Vergleichsmodells (1XKL) zur PNAE und weitere Anpassungen des PNAE Modells an die erhaltene Elektronendichte wurden mit Xfit

aus dem Xtalview-Package (MCREE D, 1999) vorgenommen. Immer wieder wurden das Modell und die Elektronendichtekarte mit Hilfe des Programms REFMAC (MURSHUDOV G *et al.*, 1997 und WINN M *et al.*, 2001) verfeinert. Der Histidin-Rest, die ersten acht Aminosäuren des N-terminalen Endes und die letzte Aminosäure des C-Terminus wurden bei der Strukturaufklärung nicht berücksichtigt. Diesen Bereichen konnten keine Elektronendichten zugeordnet werden. Als Grund ist die große räumliche Flexibilität dieser Abschnitte zu sehen. Somit spielen sie auch keine Rolle für die dreidimensionale Struktur des Enzyms. Im Zuge der Verfeinerung wurden insgesamt 286 Wassermoleküle, ein Sulfat sowie drei β -Merkaptoethanol-Moleküle den eindeutig nicht proteineigenen Elektronendichten in der asymmetrischen Untereinheit zugeordnet. Die Abbildung 34 stellt ein topologisches Diagramm der Polyneuridinaldehyd-Esterase dar. Die Kerndomäne setzt sich aus den β -Faltblättern $\beta 1$ bis $\beta 6$ und den α -Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 6$ zusammen. Die β -Faltblättern $\beta 4a$, $\beta 4b$ und $\beta 4c$ sowie die α -Helices $\alpha 3a$, $\alpha 3b$ und $\alpha 3c$ bilden die Cap-Domäne. Abbildung 35 zeigt die aus den Röntgendaten errechnete dreidimensionale Struktur eines einzelnen PNAE-Moleküls.

Abbildung 34: Topologisches Diagramm der Polyneuridinaldehyd-Esterase. Die Cap-Domäne, die für die Substratakzeptanz der α/β -Hydrolysen von entscheidender Bedeutung ist, befindet sich zwischen dem β -Faltblatt 4 und der α -Helix 4 der Kerndomäne. Die Lage der Aminosäuren Serin 87, Asparaginsäure 216 und Histidin 244 der katalytischen Triade ist durch einen grünen Punkt gekennzeichnet. Die Faltblätter werden durch rote Pfeile und die Helices durch blaue Balken gekennzeichnet.

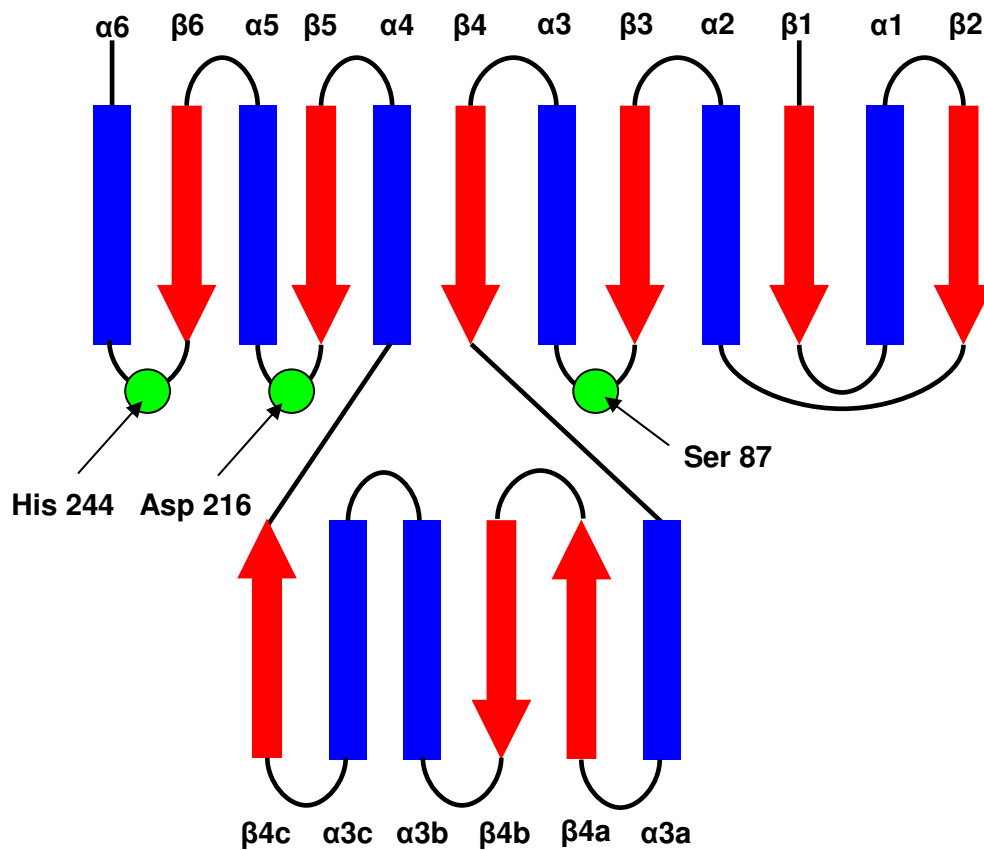
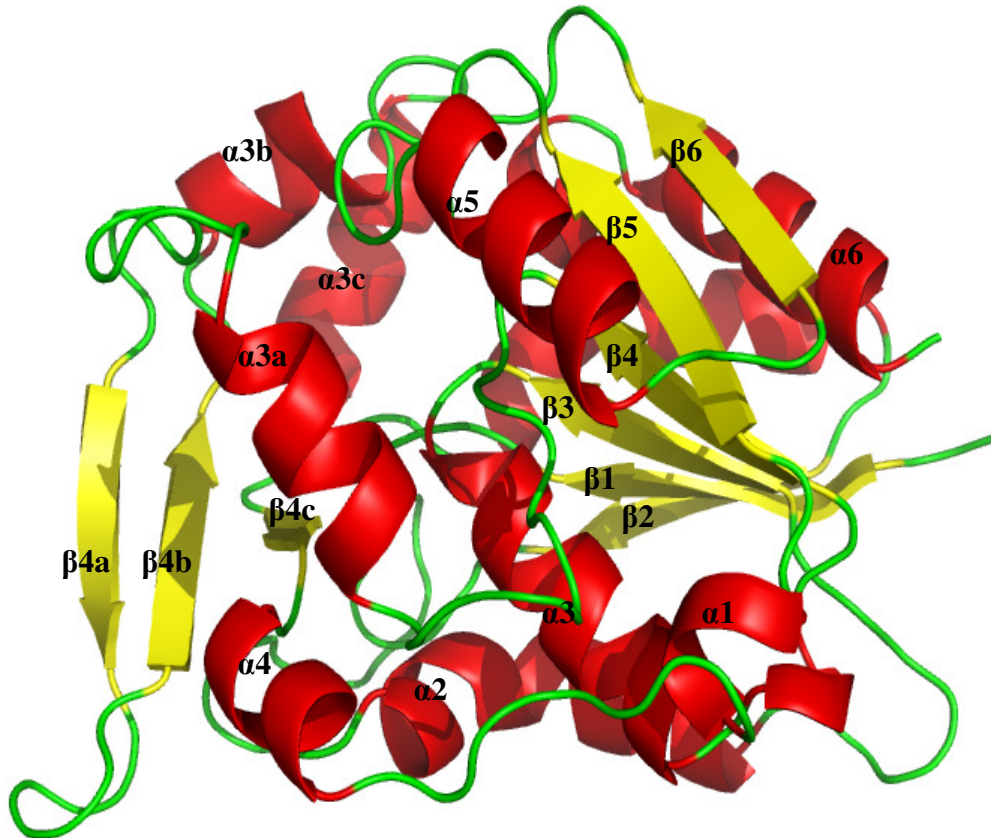


Abbildung 35: Die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus *Rauvolfia serpentina*. Die Kerndomäne des Enzyms setzt sich aus den β -Faltblättern $\beta 1$ bis $\beta 6$ und den α -Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 6$ zusammen. Die β -Faltblätter $\beta 4a$, $\beta 4b$ und $\beta 4c$ sowie die α -Helices $\alpha 3a$, $\alpha 3b$ und $\alpha 3c$ bilden die Cap- Domäne.



Die Tabelle 10 zeigt statistische und qualitative Eigenschaften der erhaltenen dreidimensionalen Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase.

Tabelle 10: Statistik der aufgeklärten PNAE Struktur

Auflösung (Å)	20,0-2,20
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%)	18,17/23,18
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Proteins	40,40
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Wassers	41,40
Anzahl der Atome:	
Nicht-Wasserstoff	4296
Wasser (ohne Wasserstoff)	286
Standardabweichung:	
Bindungen (Å)	0,016
Winkel (°)	1,642

V Diskussion

1. Versuche zur aktiven Expression der Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase

Die Abläufe der meisten Reaktionen der Ajmalin-Biosynthese konnten schon vor Jahren aufgeklärt und deren beteiligte Enzyme beschrieben werden (Strictosidin-Synthase von STÖCKIGT J (1979), Strictosidin-Glucosidase von GERASYMENKO I *et al.* (2002), Geissoschizin-Dehydrogenase von PFITZNER A und STÖCKIGT J (1982), Sarpagan-Brückenzym von SCHMIDT D *et al.* (1995), Polyneuridinaldehyd-Esterase von PFITZER A und STÖCKIGT J (1983), Vinorin-Synthase von PFITZER A *et al.* (1986), 2 β -(*R*)-17-O-Acetyljmalan-Esterase von POLZ L *et al.* (1987), Vinorin-Hydroxylase von FALKENHAGEN H *et al.* (1995)). Es konnte jedoch lange nicht eindeutig geklärt werden, ob die Reduktion des Vomilenins zum 17-O-Acetylnorajmalin lediglich durch eine oder durch zwei beteiligte Reduktasen durchgeführt wird. Mittels chromatographischer Verfahren war es VON SCHUMANN (2003) erstmals gelungen, die Beteiligung von zwei Enzymen und deren Abfolge im Ajmalinbiosyntheseweg nachzuweisen. Er konnte nach einer Proteinauftrennung über eine SOURCE 30Q Anionenaustauscherchromatographie Fraktionen nachweisen, die ein Enzym enthielten, das Vomilenin lediglich zum 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin reduzierte. Eine vollständige Isolierung der Vomilenin-Reduktase aus Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* über Chromatographie gestaltete sich nach VON SCHUMANN (2003) als nicht möglich, da innerhalb von drei Tagen ein Aktivitätsverlust auftrat. Die bestmögliche Auftrennung innerhalb dieser Zeit lieferten Fraktionen, die auf einem SDS-Gel Banden zeigten, von denen zwei (40 kDa und 43 kDa) als mögliche Vomilenin-Reduktase in Frage kamen. Die 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase erwies sich als wesentlich stabiler und konnte vollständig aufgereinigt werden. Es ergab sich eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Über „reverse genetics“ (43 kDa und 48 kDa) bzw. Durchmusterung einer *Rauvolfia* cDNA-Bank (40 kDa) konnten die vollständigen cDNAs der Proteine identifiziert werden, wobei für das 43 kDa Enzym zwei Isoformen (43/1 kDa und 43/2 kDa) generiert wurden. Berechnungen des Molekulargewichts anhand der Sequenzdaten der putativen Vomilenin-Reduktasen ergaben jedoch,

dass die reinen Aminosäuresequenzen ein wesentlich geringeres Molekulargewicht zulassen als die experimentell bestimmten (VON SCHUMANN G, 2003).

Tabelle 11 : Vergleich der Molekülmassen der putativen Vomilenin-Reduktasen. Die isolierten Enzyme weisen ein wesentlich höheres Molekulargewicht auf, als sich aus ihrer Aminosäuresequenz berechnen lässt.

Isoliertes Enzym	berechnetes Molekulargewicht
40 kDa	38,5 kDa
43/1 kDa	38,8 kDa
43/2 kDa	39,9 kDa

Alle auch weiterführenden Untersuchungen von VON SCHUMANN wiesen darauf hin, dass diese Enzyme *in vivo* posttranslational modifiziert werden. Eine heterologe Expression der putativen Vomilenin-Reduktasen in *E. coli* mit den Expressionsvektoren pSE280, pQE60 und pQE70 konnte durch VON SCHUMANN nicht erfolgreich durchgeführt werden. So konnte weder vor noch nach der Aufreinigung über Ni-NTA eine entsprechende Bande auf einem SDS-Gel noch eine Vomilenin-Reduktase Aktivität nachgewiesen werden. Die putative 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase (48 kDa) konnte mit diesem Expressionssystem hingegen überexprimiert und aufgereinigt werden. Allerdings führte VON SCHUMANN keine abschließenden Aktivitätstests durch, da das Substrat 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin nicht mehr zur Verfügung stand.

Die bis hierhin vorliegenden Ergebnisse lassen keine eindeutigen Schlussfolgerungen auf Isolation oder die Identität der Vomilenin- und 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase zu. Geht man allerdings davon aus, dass es sich um die korrekten cDNAs für diese Reduktasen handelt, muss versucht werden, diese aktiv heterolog zu exprimieren, um deren Identität zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht diese Expression in unterschiedlichen Organismen vorzunehmen.

1.1 Expressionsversuche der Reduktasen mit dem Vektor pQE2

Ein Versuch, eine aktive heterologe Expression der Vomilenin-Reduktase (zusätzlich auch der 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase, obwohl eine Überexpression mit

pQE70 möglich war (V.I)) vorzunehmen, bestand darin, einen anderen Expressionsvektor zu wählen. Es wurde der Vektor pQE2 verwendet, der im Gegensatz zu den von VON SCHUMANN genutzten Vektoren ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen und nicht C-terminalen 6 x Histidin-Rest erzeugt. Die Expression von Konstrukten mit einem N-terminalen Histidin-Rest läuft zwei- bis viermal effizienter ab als bei solchen mit einem C-terminalen (The QIAexpressionist, 2003). Möglicherweise war die Expression der Reduktasen unter den von VON SCHUMANN gewählten Bedingungen zu gering, um eine Überexpression im Proteinrohextrakt auf einem SDS-Gel zu erkennen. Zusätzlich könnte eine Aufreinigung über die Affinitätschromatographie aufgrund der Lage des C-terminalen Histidin-Restes verhindert worden sein. Die Umklonierung der entsprechenden cDNAs erfolgte wie unter III.2.1.1 beschrieben.

Eine Expression der putativen Reduktasen konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Selbst eine Aufreinigung der von VON SCHUMANN mit C-terminalem Histidin-Rest überexprimierten β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase war mit dem pQE2 Konstrukt nicht möglich. Nachträglich durchgeführte Sequenzierungen der verwendeten Konstrukte zeigten, dass keine Fehler in deren DNA-Sequenzen vorlagen. Geht man davon aus, dass eine Expression des pQE2/Reduktase-Konstrukts stattgefunden hat, müsste eine entsprechende Proteinbande auf einem SDS-Gel nach Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie zu finden sein. Gegebenenfalls könnte es zu einer solchen Proteinfaltung gekommen sein, dass der Histidin-Rest nicht an der Oberfläche, sondern im Inneren der Proteine zu finden war. Diese Erklärung ist aber unwahrscheinlich, da, wenn man die Ergebnisse von VON SCHUMANN mit berücksichtigt, sowohl der N- als auch der C-terminale Histidin-Überhang ins Innere der Proteine ragen müssten. Wesentlich wahrscheinlicher ist es, dass es zu keiner oder zumindest nicht vollständigen Expression der Fusionsproteine gekommen ist. Eine mögliche Erklärung stellt das Auftreten von Arginin-Tandems mit den Codons AGG und AGA innerhalb der Sequenzen der putativen Reduktasen dar. Im *E. coli*-Genom kommen diese Codons nur mit einer Häufigkeit von 2 % bzw. 4 % vor (GURVICH O *et al.*, 2005). Eine Abfolge dieser Codons führt bei der Expression mit hohen mRNA Mengen in *E. coli* häufig zu einer Verschiebung des Leserahmens (SPANJAARD R *et al.*, 1990). Diese Verschiebung lässt sich auf die sehr geringen Mengen an entsprechenden Arginin-tRNAs in den Bakterien zurückführen. In allen behandelten Reduktase-cDNAs sind solche Wiederholungen der Arginin-Codons zu

finden. Ein Beispiel für eine verhinderte Expression durch im Wirtsorganismus unterrepräsentierte Codons stellt das Gen für das Maus c-Fos Protein dar. Erst durch gerichtete Mutation der jeweiligen Abschnitte konnte eine heterologe Expression dieses Gens durchgeführt werden (DENG T, 1997). Auch andere Beispiele für Expressionsprobleme durch verwendete Codons von eukaryotischen Genen in *E. coli* wurden beschrieben (JANA S und DEB J, 2005). Weitere Möglichkeiten für die fehlende Expression der putativen Reduktasen könnte eine verminderte Stabilität der transkribierten mRNAs (HANNIG G und MAKRIDES S, 1998) oder eine Faltung und somit Translationshemmung der mRNA (BUCHELER U *et al.*, 1992) sein. Weiterhin könnten die verwendeten Expressionsbedingungen wie Temperatur und IPTG-Induktion ungünstig für diese spezielle Expression sein, wobei sowohl von VON SCHUMANN als auch bei der hier vorgestellten Arbeit ein breites Spektrum unterschiedlicher Wachstums- und Expressionsparameter getestet wurde.

1.2 Expressionsversuche der Reduktasen im eukaryotischen Expressionssystem *Pichia pastoris*

Da eine heterologe Expression der putativen Vomilenin-Reduktase und 2β -(R)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase mit dem pQE2 Vektor in *E. coli* nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde zu einem eukaryotischen Expressionssystem gewechselt. Die verwendete Hefe *Pichia pastoris* vereinigt bei ihrer Anwendung sowohl die Vorteile des schnellen Wachstums, wie bei Bakterien, als auch die von eukaryotischen Organismen. Im Gegensatz zu *E. coli* sind die Hefezellen in der Lage, posttranslationale Prozessierungen und Modifikationen der Proteine vorzunehmen (BUCKHOLZ R *et al.*, 1991). Nach den Vergleichen der Molekülmassen der isolierten Proteine mit deren berechneten (Tabelle 11) war davon auszugehen, dass *in vivo* eine posttranslationale Modifikation der putativen Vomilenin-Reduktasen erfolgte. Somit war die Möglichkeit einer Expression von aktivem Enzym in den Hefezellen wesentlich höher als in den prokaryotischen Bakterienzellen. *Pichia pastoris* ist, wie andere eukaryotische Organismen auch, in der Lage Disulfidbrücken auszubilden und Lipide anzuheften. Ebenso können Glycosylierungen durchgeführt werden. Die Zuckerketten bestehen aus Mannoseeinheiten und werden an die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr angefügt. Sie können sehr unterschiedliche Längen aufweisen. So hatte eine in *P. pastoris* heterolog exprimierte Invertase

Zuckerketten von meist 8 bis 12 Untereinheiten (SREEKRISHNA K und KROPP K, 1996). Es wurden aber auch Proteine nachgewiesen, die Oligosaccharidketten von bis zu 150 Mannoseeinheiten aufwiesen (SCORER C *et al.*, 1993). Eine Expression der putativen Vomilenin-Reduktase und der 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase konnte in keinem Fall belegt werden. In Enzymrohextrakten der induzierten Hefezellen konnten im Vergleich mit Extrakten aus Negativkontrollen keine zusätzlichen, überexprimierten Proteinbanden im erwarteten Molekulargewichtsbereich auf SDS-Gelen nachgewiesen werden. Durchgeführte Aktivitätstests mit diesen Rohextrakten zeigten, dass kein Umsatz durch Vomilenin-Reduktase erfolgte. PCRs mit Gesamt-DNA der transformierten Hefezellen als Template zeigten, dass eine Insertion der Reduktase-cDNAs ins Hefegenom stattgefunden hat. Somit traten bei der Verwendung dieses Expressionssystems die gleichen Schwierigkeiten wie bei den *E. coli* Bakterien auf. Eine Möglichkeit zu überprüfen, ob es Probleme bei der Translation der Reduktase-mRNAs in den bisher verwendeten Expressionssystemen gibt, oder ob es erst gar nicht zur Bildung einer ausreichenden Menge an stabiler mRNA kommt, wäre die Detektion der mRNAs mittels eines Northern-Blots. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass zwar eine Expression der Gene stattfindet, die Enzyme aber durch die in den Hefezellen durchgeführten posttranslationalen Modifikationen nicht aktiv sind, und die Expression in sehr geringen Mengen erfolgt. Es sind Beispiele beschrieben, bei denen die Expressionsraten in *P. pastoris* deutlich unter 0,1 mg/l Kulturmedium lagen (WEISS S *et al.*, 1995). Weiterhin wäre es möglich, dass die heterolog exprimierte Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften einer raschen intrazellulären Proteolyse zum Opfer fallen.

Neu durchgeführte Sequenzalignments der putativen Reduktase-cDNAs ergaben eine außerordentlich hohe Übereinstimmung der Vomilenin-Reduktasen mit einer 10-Hydroxygeraniol-Oxidoreduktase (Accession No. AY352047) aus *Catharanthus roseus* (91 % Identität, 97 % Homologie). Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten und der Annahme, dass es sich bei den von VON SCHUMANN isolierten putativen Vomilenin-Reduktase cDNAs eher um Hydroxygeraniol-Oxidoreduktasen aus *R. serpentina* handeln könnte, wurden die Expressionsversuche für diese Gene abgebrochen.

1.3 Expression der putativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase in *Nicotiana benthamiana*

Die höchste ermittelte Sequenzidentität der putativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase lag bei 65 % Aminosäureidentität zur oben beschriebenen Oxidoreduktase. Da VON SCHUMANN zeigen konnte, dass die Expression dieser cDNA möglich war, wurden Expressionsversuche in der Pflanze *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Indem als Expressionssystem eine Pflanze verwendet wurde, bestand eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit, dass in diesem Organismus eine aktive Expression erfolgt, als in den bisher verwendeten. Das verwendete System, mit der Kombination der unterschiedlichen Module (siehe Tabelle 1), erlaubt die Passage des Exprimats durch verschiedene Zellkompartimente, sodass die für die Aktivität des Enzyms notwendigen posttranslationalen Modifikationen vollzogen werden können. Andere pflanzliche Expressionssysteme zeigen gegenüber dem verwendeten, auf Pflanzenviren basierenden, einige Nachteile. Transgene Pflanzen benötigen viele Monate, bis sie als stabile vollwertige Pflanzen verwendet werden können. Häufig verringert sich die Expression des Zielgens auch durch „gene silencing“ (VAUCHERET H, *et al.*, 1998). Ein häufig verwendetes transientes Expressionssystem beruht auf dem Einbau des Zielgens ins Wirtsgenom über ein modifiziertes Ti-Plasmid, welches mittels *Agrobacterium tumefaciens* in die Pflanzenzellen eingeschleust wird. Hier können ebenfalls Probleme mit „gene silencing“ auftreten, welche unterdrückt werden müssen. Das verwendete transiente Expressionssystem beruht vollständig auf dem Tabakmosaik-Virus und wird somit nicht vom „gene silencing“ beeinflusst (MARILLONNET S *et al.*, 2004). Über die zur Verfügung stehenden 5'-Module lässt sich ein Fusionsprotein, bestehend aus dem exprimierten Zielgen und Hilfssequenzen, herstellen. Diese Hilfssequenzen erleichtern entweder die Aufreinigung (pICH11280 für C-terminalen 6 x Histidin-Rest) oder beeinflussen die subzelluläre Lokalisation über eine Zielsequenz für ein bestimmtes Zellkompartiment. Bei der Passage des Fusionsproteins in die entsprechende Organelle kommt es zu verschiedenen Modifikationen und somit möglicherweise zu einer Initiation der Aktivität des Enzyms. Als Positivkontrolle wurden Fusionsproteine aus den 5'-Modulen und dem *green fluorescent protein* (GFP) generiert. Den Ergebnissen (IV.1.4.1) der durchgeführten Expression ist zu entnehmen, dass die verwendete

Methode generell funktioniert hat (Expression des GFP), und auch eine heterologe Expression der putativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase möglich war. Das aufgereinigte Enzym ließ auf dem SDS-Gel eine Bande im Bereich von 44 - 45 kDa erkennen. Das entspricht dem Molekulargewicht, welches sich aus der reinen Aminosäuresequenz (44610 Da) der von VON SCHUMANN isolierten putativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase ergibt. Aktivitätstests zeigten, dass das heterolog in der Tabakpflanze exprimierte Enzym eindeutig Reduktaseaktivität aufwies, indem Zimtaldehyd umgesetzt wurde. Da kein reines 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin zur Verfügung stand, mussten die Aktivitätstests mit einem Mischisolat, welches neben 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin auch noch verschiedene andere Alkaloide enthielt (OELRICH K, nicht veröffentlicht), durchgeführt werden. Ein Umsatz des enthaltenen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenins konnte nicht nachgewiesen werden. Berechnungen anhand der Aminosäuresequenz ergaben, dass die 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase mit hoher Wahrscheinlichkeit (97 %) im Cytoplasma lokalisiert ist (BHASIN M und RAGHAVA G, 2004). Daher erscheint die Möglichkeit, dass eine entscheidende Veränderung zur aktiven Expression mit dem Chloroplast-Zielmodul (pICH10530) oder den Apoplast-Zielmodulen (pICH8420 und pICH13480) bewerkstelligt werden könnte, als recht gering. Die verwendeten Module, die keine Zielfunktion aufwiesen (pICH10570) oder ein Fusionsprotein mit N-terminalem Histidin-Rest generierten, sollten somit eher zur aktiven Expression im Pflanzensystem führen. Die Gründe, warum es nicht zu einer aktiven Expression der 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase kam, können unterschiedlich sein. Möglicherweise handelte es sich bei der von VON SCHUMANN isolierten Reduktase nicht um eine 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase. Dass es sich um ein Enzym mit Reduktaseaktivität handelt, konnte durch den Umsatz des Zimtaldehyds zu Zimtalkohol nachgewiesen werden. Außerdem ergaben Sequenzalignments die Zugehörigkeit des Enzyms zu dieser Familie. Zimtaldehyd wird allerdings von vielen Reduktasen umgesetzt und lässt nur einen Schluss auf die generelle Funktion des Enzyms zu. Grundsätzlich hat das exprimierte Enzym, besonders wenn es sich tatsächlich um die 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase handeln sollte, eine sehr hohe Substratspezifität. Tests mit unterschiedlichen Substraten ergaben, dass weder Vomilenin, welches sich vom 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin strukturell nur durch eine Doppelbindung im Indolteil des Moleküls unterscheidet, noch Perakin oder Raucaffrinolin, welche ebenfalls eine nahe strukturelle Verwandtschaft zum

natürlichen Substrat aufweisen, umgesetzt wurden. Auffällig ist weiterhin die Größe des aufgereinigten Enzyms. Sollte es sich um die 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase handeln, unterscheidet sich das Molekulargewicht der reinen Aminosäuresequenz vom aus *R. serpentina* Suspensionskulturen aufgereinigten Enzym um etwa 3,5 kDa. Obwohl man mit dem Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* möglichst nah an den natürlichen Organismus des Enzyms herangerückt ist, wird das Molekulargewicht des aus *R. serpentina* isolierten Proteins nicht erreicht. Alle Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine posttranslationale Modifikation des Enzyms in *R. serpentina* stattfinden muss, die in keinem der drei verwendeten Expressionssysteme (*E. coli*, *Pichia pastoris* und *N. benthamiana*) erfolgt. Es sind über 300 verschiedene posttranslationale Modifikationen bekannt (JENSEN O, 2004). Im Vergleich zu den posttranslationalen Modifikationen in Tieren wurden allerdings erst verhältnismäßig wenige Studien über die Modifikationen in Pflanzen vorgenommen, die sich hauptsächlich auf Phosphorylierungen, Glycosylphosphatidylinositol-Modifikationen und Ubiquitinierung beziehen (KWON S *et al.*, 2006). Um die möglichen Modifikationen in der nativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase zu detektieren, müsste eine erneute Aufreinigung des Enzyms aus Zellkulturen von *R. serpentina* erfolgen. Eine bekannte Methode zur Identifikation unterschiedlicher posttranslationaler Veränderungen besteht in verschiedenen radioaktiven und nichtradioaktiven Färbemethoden. Über Autoradiographie mit ³²P oder Western Blots mit anti-Phosphoaminosäure Antikörpern lassen sich Phosphorylierungen nachweisen (ASTOUL E *et al.*, 2003). Ähnliche Methoden wurden für Glycoproteine, Methylierungen, proteolytische Modifikationen und Nitrosylierungen beschrieben (PATTON W, 2002). Genauere Untersuchungen der posttranslationalen Modifikationen ließen sich auch mittels verschiedener massenspektroskopischer Methoden durchführen (MANN M und JENSEN O, 2003). Ein Test auf Glycosylierung der putativen 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase wurde bereits durch VON SCHUMANN durchgeführt. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob es sich um ein Glycoprotein handelt.

2. Komplexierungsversuche und Mutagenesestudien mit der Vinorin-Synthase

2.1 Die Vinorin-Synthase und die Position ihrer Liganden

Die Vinorin-Synthase ist ein zentrales Enzym der Ajmalin-Biosynthese in *Rauvolfia serpentina*. Sie katalysiert die Umwandlung des Alkaloidgrundkörpers vom Sarpagan-Typ zum Ajmalan-Typ (Abbildung 4). Sequenzalignments ergaben, dass die Vinorin-Synthase zur BAHD-Superfamilie der Acetyltransferasen gehört (BAYER, A *et al.*, 2004). Die BAHD-Superfamilie wurde erstmals von ST-PIERRE B und DE LUCA V (2000) beschrieben. Seitdem wurden hunderte von Acetyltransferase-Genen identifiziert, die zu dieser Untergruppe gehören. Der exakte Mechanismus der durchgeführten Reaktion ist bis jetzt nicht abschließend geklärt. Ein großer Schritt zu einem tieferen Verständnis der Vinorin-Synthase und damit der gesamten BAHD-Familie ergab sich aus der Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung dieses Enzyms (MA X *et al.*, 2004, 2005). Die Vinorin-Synthase besteht aus zwei etwa gleich großen Domänen, welche über einen Loop miteinander verbunden sind. Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich in einem durchgehenden Kanal, der sich zwischen den beiden Domänen befindet. Alle konservierten Aminosäuren der BAHD-Superfamilie befinden sich in der Domäne 1. Die katalytische Aminosäure His160 des innerhalb der Familie gänzlich konservierten Motivs HxxxD ist von beiden Seiten des Kanals her erreichbar. Daraus ergibt sich, dass eine voneinander unabhängige Bindung des Substrats (16-epi-Vellosimine) und des Cosubstrats (Acetyl-CoA) am wahrscheinlichsten ist. Anhand von 3D-Strukturen anderer Acetyltransferasen, deren Strukturen in Komplexen mit Liganden bestimmt werden konnten, wurde ein Modell der Position des CoAs in der Vinorin-Synthase erstellt. Bei der Überlagerung eines Dihydrolipoyl-Transacetylase Monomers mit komplexiertem CoA aus *Azotobacter vinelandii* (PDB-Code: 1EAD) mit der Domäne 1 der Vinorin-Synthase zeigte sich eine identische Position der katalytischen Aminosäuren His160 (Vinorin-Synthase) und His610 (Dihydrolipoyl-Transacetylase). Aufgrund des so erstellten Modells ergibt sich, dass der Ligand CoA also auch das Cosubstrat Acetyl-CoA höchstwahrscheinlich über den engen Eingang des Kanals an das aktive Zentrum gelangt (Abbildung 19). Um allerdings diese Position des Liganden experimentell zu bestätigen, muss eine Röntgenstrukturanalyse des komplexierten CoAs (Acetyl-CoA)

mit der Vinorin-Synthase durchgeführt werden. Gleiches gilt für die Position des natürlichen Produkts Vinorin.

Die durchgeführten Cokristallisations- und Soaking-Experimente sind im Abschnitt III.5.2 beschrieben. Sowohl bei den Komplexierungsversuchen mit CoA als auch mit Vinorin traten Schwierigkeiten auf, die im Verlauf der weit reichenden Experimente nicht überwunden werden konnten. Die gezüchteten Vinorin-Synthase Kristalle (Abbildung 18) erwiesen sich als äußerst instabil. Diese Tatsache stellte sich als großes Problem bei Soaking-Experimenten heraus. Kristalle einer für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Qualität entstanden bei einer Inkubationstemperatur von 32°C. Kam es zu einem Absinken der Temperatur während der Handhabung der Kristalle oder beim Transport, entstanden binnen einer Minute sichtbare Schäden im Kristall. Es kam zu Auflösungserscheinungen und Rissbildung. Ebenfalls war die Stabilität der Kristalle sehr von der Pufferzusammensetzung abhängig, in der sich der Kristall befand. Wurden die Kristalle in eine andere Lösung überführt, kam es ebenfalls zu einer offensichtlichen Beschädigung, selbst wenn es sich um den Reservoir-Puffer handelte, dem Vinorin-Synthase in verschiedenen Konzentrationen beigemischt wurde. Eine Inkubation in CoA-haltigem Puffer war nur für wenige Sekunden möglich. Als einzige Möglichkeit, die Vinorin-Synthase Kristalle mit CoA zu „soaken“, schien die direkte Verwendung von Cryoprotektant zu sein, der selbst den Liganden enthielt. Auch in diesem Puffer waren die Kristalle nicht stabil, und so konnten sie nur für wenige Sekunden bei geringen Ligandenkonzentrationen inkubiert werden. Strukturanalysen dieser Kristalle zeigten allerdings, dass unter diesen Bedingungen keine eindeutige Komplexierung der Vinorin-Synthase mit CoA möglich war. Es gibt Beispiele, bei denen eine solche Inkubation vollkommen ausreichend war, um dem Liganden eine eindeutige Position im aktiven Zentrum zuordnen zu können. In anderen Fällen musste die Inkubation über Stunden oder Tage erfolgen, um eine ausreichende Sättigung der Kristalle mit dem Liganden zu erreichen (MC NAE I *et al.*, 2005; WU S *et al.*, 2001; JACKSON C *et al.* 2005). Um erfolgreiche Soaking-Experimente mit der Vinorin-Synthase und ihrem Liganden CoA durchführen zu können, ist es also unbedingt erforderlich, die Stabilität der Kristalle zu erhöhen. Hierbei wäre es von großem Vorteil, die Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen zu verringern, oder Kristalle von ausreichender Qualität bei Raumtemperatur zu züchten. Daher sollten in Zukunft zuerst Optimierungen der generellen Kristallisationsbedingungen durchgeführt werden. Möglicherweise ist

hierfür sogar ein vollkommen „neuer Ansatz“ zur Kristallisation der Vinorin-Synthase über die Durchführung eines „high-throughput screenings“ mit verschiedensten Kristallisationspuffern notwendig.

Bei der Cokristallisation also der Generierung von Kristallen, die in Anwesenheit von Liganden wachsen, traten ebenfalls Probleme auf. Die Konzentration von CoA, bei der es noch zu einem Kristallwachstum kam, schien nicht auszureichen, um einen gesättigten Vinorin-Synthase Kristall zu erhalten. Im Vergleich zur Kristallisation ohne CoA war die visuelle Qualität der Kristalle wesentlich schlechter. Bei CoA-Konzentrationen von 0,5 – 2 mM konnten zwar einige Kristalle gezüchtet werden, bei der Röntgenstrukturanalyse zeigten diese jedoch eine schlechte Auflösung, und es konnte kein Ligand im aktiven Zentrum nachgewiesen werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass mit den bisher angewendeten Kristallisationsbedingungen eine Komplexierung und Kristallisation von Vinorin-Synthase und dem Liganden CoA nicht durchgeführt werden konnte. Eine mögliche Erklärung könnte eine strukturelle Änderung der Vinorin-Synthase durch die Bindung des Liganden sein. Bei Soaking-Versuchen könnte eine solche Konformationsänderung zur Auflösung des bestehenden Kristallgitters führen und so zur direkten Beschädigung des Kristalls (DANLEY D, 2006). Während der Cokristallisation könnte eine Konformationsänderung dazu führen, dass es unter den gewählten Kristallisationsbedingungen für die Vinorin-Synthase ohne Ligand also nicht mehr oder nur zu einer schlechten Bildung von Kristallen kommt. Zwangsläufig kommt es bei der Cokristallisation zu einer Heterogenität aus Enzymmolekülen, die den Liganden gebunden haben, und solchen, die ohne Ligand vorliegen. Es wurden Fälle beschrieben, bei denen sich eine solche Heterogenität negativ auf die Qualität von Proteinkristallen ausgewirkt hat (MORENO A *et al.*, 2005).

Für eine erfolgreiche Cokristallisation aus CoA und der Vinorin-Synthase scheinen die bisher verwendeten Kristallisationsbedingungen generell nicht geeignet zu sein. Auch hier könnten, wie bei den Soaking-Experimenten, vollständig neue Kristallisationsbedingungen für den Komplex ein guter Ansatz sein, um die beschriebenen Probleme zu umgehen.

Bei Komplexierungsversuchen der Vinorin-Synthase mit ihrem Produkt Vinorin stellte sich die extrem schlechte Löslichkeit dieses Alkaloids in wässrigen Lösungen als Hindernis heraus. Eine Cokristallisation konnte nicht durchgeführt werden, da es nicht möglich war, eine ausreichende Vinorinkonzentration in den

Kristallisationslösungen zu erreichen, obwohl das im Kristallisationpuffer enthaltenen PEG (2 % (V/V) PEG 400) häufig zu einer besseren Löslichkeit von wasserunlöslichen Substanzen führt (AMINABHAVI T *et al.*, 2003). Eine bessere Löslichkeit lag in Methanol vor, wobei es nach einer Vermischung der methanolischen Vinorinlösung mit einem wässrigen Puffer sehr schnell zu einem Ausfällen des Vinorins kam. Durchgeführte Soaking-Experimente, bei denen reine Vinorin-Synthasekristalle in einer methanolischen Vinorinlösung inkubiert wurden, führten zu keinem Erfolg, da es direkt zur Auflösung der Kristalle kam. Diese Tatsache scheint nach den oben beschriebenen Problemen, die selbst bei Überführung der Kristalle in Puffer auftraten, die eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie der Kristallisationstropfen aufwiesen, nicht verwunderlich. Als alternative Methode erfolgte die Lösung des Vinorins in Oktanol (YUVANIYAMA J, RAMC 1999 Crystallization Tips). Tropfen, die unkomplezierte Vinorin-Synthasekristalle enthielten, wurden mit der Vinorin-Oktanollösung überschichtet und anschließend weiter bei 32°C inkubiert. Dass eine Diffusion des Vinorins aus dem Oktanol durch die wässrige Pufferlösung zum Kristall erfolgte, ließ sich daran erkennen, dass es nach etwa 20 Stunden zu Auflösungserscheinungen der Kristalle kam. Bei Negativkontrollen mit Oktanol, in dem kein Vinorin gelöst war, traten diese Beschädigungen nicht auf. Kristalle, die für 18 Stunden mit der Oktanollösung inkubiert und anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht wurden, zeigten keine Einlagerung des Vinorins im aktiven Zentrum. Neben den Schwierigkeiten mit der Löslichkeit scheinen daher bei Komplexierungsversuchen mit dem Produkt Vinorin ebenso wie bei dem Ligand CoA Probleme mit der Stabilität der Kristalle aufzutreten. Da diese Empfindlichkeit bei allen Bearbeitungsschritten (Transport, Handhabung, Soaking) immer der limitierende Punkt für erfolgreiche Versuchsdurchführungen zu sein scheint, wäre es ratsam, Experimente anzustellen, um stabilere Vinorin-Synthasekristalle zu generieren. Dabei könnte es sich um Veränderungen ausgehend von den unter IV.2.2 beschriebenen Kristallisationsbedingungen handeln oder aber auch um ein vollkommen neues Screening auf Pufferbedingungen, bei denen stabile Kristalle der Vinorin-Synthase entstehen.

2.2 Mutationen der Vinorin-Synthase

Um eine genauere Untersuchung der Bedeutung bestimmter Aminosäuren der Vinorin-Synthase vorzunehmen, wurden gezielte Mutationen durchgeführt. Durch diese Mutationen erfolgte die heterologe Expression der Vinorin-Synthase mit einem gewünschten Aminosäureaustausch. Besonders beachtet wurde hierbei die Stellung der Asparaginsäure 164 aus dem hochkonservierten Motiv HxxxD der BAHD-Superfamilie der Acetyltransferasen und dem Arginin 279. Die Bindung über eine Salzbrücke zwischen diesen beiden Aminosäuren (Abbildung 21 B; MA X *et al.*, 2004) ist essentiell für die Aktivität der Vinorin-Synthase. So konnte BAYER A (2003) nachweisen, dass die Mutation des Asp 164 zu Alanin zu einem völligen Aktivitätsverlust führte. In der vorliegenden Arbeit wurden nun differenziertere Mutationen des Asp 164 vorgenommen (zu Glutaminsäure, Asparagin und Threonin), um einen genaueren Einblick in die Funktion der Salzbrücke zu gewinnen. Ebenfalls wurde das Arg 279 gegen Alanin ausgetauscht, um auf jeden Fall die Ausprägung der von MA *et al.* (2004) postulierten Salzbrücke zu verhindern. Die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure unterscheiden sich nur dadurch, dass der funktionale Rest um ein Kohlenstoffatom verlängert wurde. Abgesehen von ihrer Größe weisen sie die gleichen, die Bindung betreffenden, Eigenschaften auf. Die Wahrscheinlichkeit, dass trotz dieses Austauschs ein funktionsfähiges Enzym gebildet wird, schien daher recht groß. Durchgeführte Aktivitätstests ergaben jedoch, dass es sich um eine Knockout-Mutante handelte. Die beiden anderen durchgeführten Mutationen führten zu einer Veränderung der reaktiven Gruppe der Asparaginsäure 164, so dass diese nicht mehr sauer reagieren konnten. Bei durchgeführten Aktivitätstests mit diesen beiden Mutanten konnte ebenfalls keine Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 23). Die Mutation D164N wurde bereits vorher in gleicher Form auch bei der Chloramphenikol-Acetyltransferase (EC 2.3.1.28) (D199N) durchgeführt (MICHAEL R *et al.*, 1990). Strukturelle Vergleiche der nativen und der mutierten Chloramphenikol-Acetyltransferase zeigten, dass es zu einer starken Veränderung in der Konformation des aktiven Zentrums kam. Der Imidazolrest des katalytisch essentiellen Histidins 195 zeigte eine deutlich andere Orientierung als im aktiven, unmutierten Wildtyp. Die Mutation des Arginin 279 der Vinorin-Synthase zu Alanin sollte gemäß den bisher erhaltenen Ergebnissen ebenfalls zu einem absoluten Verlust der Vinorin-Synthaseaktivität führen. Diese

Folgerung bestätigte sich bei durchgeführten Tests auf den Umsatz des Gardnerals. Die durchgeführten Experimente zur näheren Untersuchung der an der Strukturausbildung des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren Asp 164 und Arg 279 ergaben, dass zumindest das Asp 164 absolut essentiell für die Aktivität der BAHD-Acetyltransferasen zu sein scheint (BAYER A *et al.*, 2004) und auch nicht durch chemisch nah verwandte Aminosäuren ersetzbar ist. Um diese Tatsache noch näher zu begründen, könnten Kristallisationen der mutierten Vinorin-Synthasen, besonders der Mutation D164E, durchgeführt werden, um die Strukturänderungen trotz dieses homologen Aminosäureaustauschs zu beschreiben.

Als weitere Aminosäure wurde das Asparagin 277 und seine Bedeutung näher untersucht. Diese Aminosäure befindet sich am engen Eingang des durchgängigen Kanals der Vinorin-Synthase. D'AURIA J (2006) beschreibt die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der bisher biochemisch charakterisierten Mitglieder der BAHD-Superfamilie der Acetyltransferasen und unterteilt die Familie in fünf Untergruppen. Die Untergruppe, zu der auch die Vinorin-Synthase gehört, besteht aus elf Mitgliedern, welche an der Position 277 (bezogen auf die Vinorin-Synthase) immer ein Asparagin aufweisen. Die Position dieses Asparagins in der Vinorin-Synthase ist der Abbildung 25 zu entnehmen. Mit nur einer Ausnahme verwenden die Enzyme der beschriebenen Untergruppe als Cosubstrat grundsätzlich Acetyl-CoA. Innerhalb der anderen Untergruppen treten dagegen hauptsächlich Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA und einige andere Donatoren auf. Postuliert wurde, dass das Asparagin 277 in dieser Position einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung des Acetyl-CoAs haben könnte. Diese Aminosäure wurde in der Vinorin-Synthase deshalb einerseits durch Alanin ersetzt, um eine mögliche Bindung des Cosubstrats zu verhindern, und andererseits durch Asparaginsäure, da sehr viele Mitglieder der anderen phylogenetischen Untergruppen diese Aminosäure an gerade dieser Position aufweisen. Bei anschließenden Aktivitätstests konnten aber keinerlei Unterschiede der beiden Mutanten und des Wildtyps festgestellt werden. Einen direkten Einfluss des Asparagins 277 auf die Bindung und die Auswahl des akzeptierten Cosubstrats konnte somit experimentell ausgeschlossen werden.

Die Mutation von Valin 165 zum Tryptophan sollte einen möglichen Einblick in die bisher nicht eindeutig aufgeklärten Positionen der beiden Liganden CoA und Vinorin geben. Hierzu wurde eine Kristallisation des mutierten Enzyms durchgeführt. Röntgenstrukturanalysen von Kristallen dieser Mutante zeigten, dass es zu einer

Blockade des Vinorin-Synthasekanals durch das Ringsystem des Tryptophans vom engen Eingang her kam. Aktivitätstests zeigten, dass es sich wie erwartet um eine Knockout-Mutante handelte. Wäre es gelungen vergleichende Soaking-Experimente mit dieser Mutante und dem Wildtyp durchzuführen, bei denen es zumindest zur Detektion von undeutlichen Elektronendichtewolken gekommen wäre (welche bei einer nur teilweisen Sättigung des Kristalls mit Liganden entstehen), hätte abschließend geklärt werden können, welcher der beiden Liganden sich von welcher Seite des Kanals an das aktive Zentrum anlagert. Diese indirekte Methode wurde durchgeführt, da eine genaue Bestimmung der Ligandenpositionen mittels Komplexierungen, wie oben beschrieben, nicht möglich war (V.2.1). Allerdings konnten auch mit dieser Vorgehensweise keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Es kam zu einer zu deutlichen Beschädigung der Kristalle, wie sie auch bei anderen Soaking-Versuchen auftraten.

3. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase

3.1 Struktur und Merkmale der Polyneuridinaldehyd-Esterase

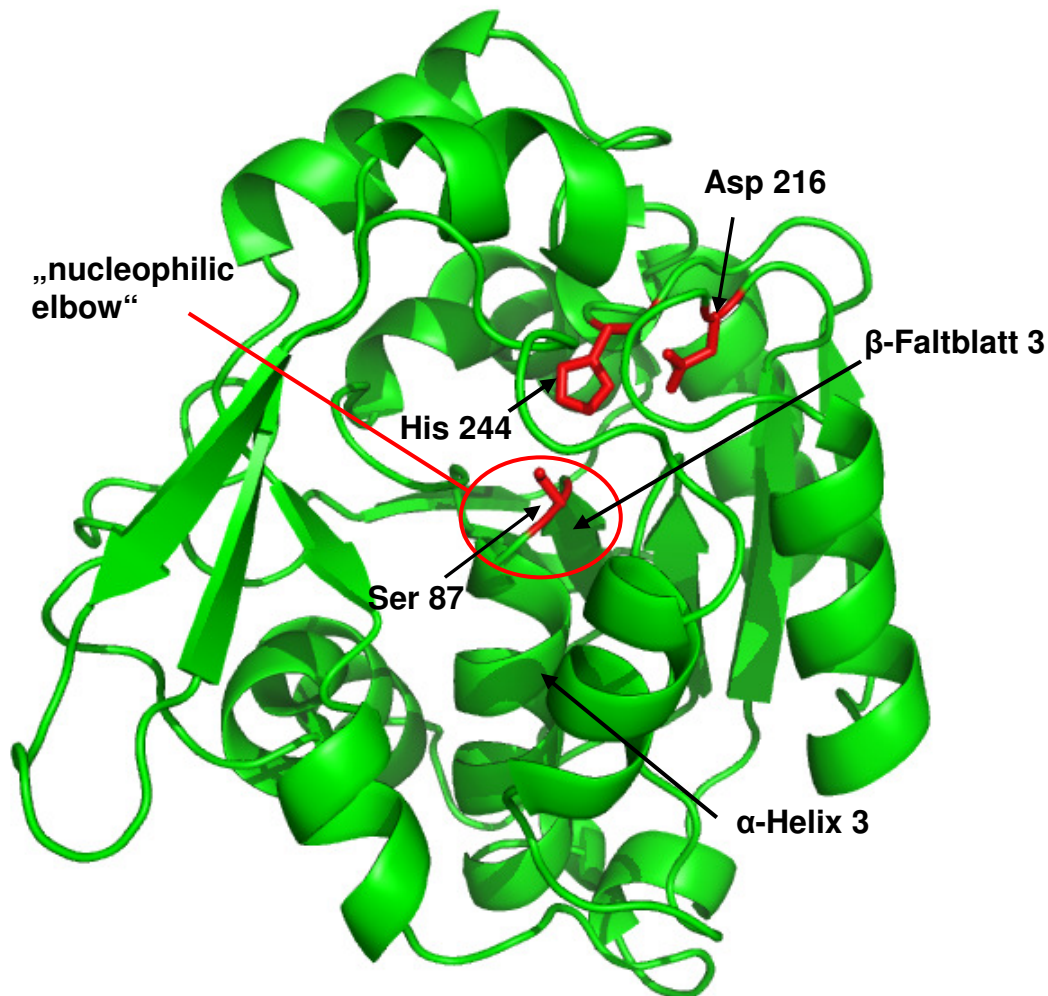
Die Polyneuridinaldehyd-Esterase katalysiert die der Vinorin-Synthase vorangehende Reaktion vom Polyneuridinaldehyd zum 16-epi-Vellosimin. Aufgrund ihrer Sequenz wurde die Polyneuridinaldehyd-Esterase der α/β -Hydrolase Superfamilie zugeordnet (DOGRU E *et al.*, 2000). Die α/β -Hydrolasen bilden eine der größten Enzymfamilien mit einer bisher beschriebenen Anzahl von mehr als 4250 Mitgliedern (ESTHER Database, 02. 2007). Die Polyneuridinaldehyd-Esterase gehört zu derjenigen Untergruppe der α/β -Hydrolasen, deren Kern-Domäne sechs Faltblätter enthält. Die höchste Aminosäuresequenz-Identität zeigt die Polyneuridinaldehyd-Esterase mit 54 % zum Salizylsäure-Bindeprotein 2 (SABP2) (pdb-Code: 1XKL) aus *Nicotiana tabacum* (FOROUHAR F *et al.*, 2005). SABP2 beeinflusst den über Salizylsäure vermittelten pflanzlichen Abwehrmechanismus gegen pathogene Infektionen. Eine Unterdrückung des SABP2 über RNAi führte zu einem Verlust der lokalen Abwehr gegenüber dem Tabak-Mosaik-Virus (KUMAR D und KLESSIG D, 2003). Die Struktur des SABP2 konnte mit einer Auflösung von bis zu 2,1 Å aufgeklärt werden und wies die typischen Merkmale der α/β -Hydrolasen auf. Während die Kerndomäne des

Enzyms aus sechs parallelen β -Faltblättern besteht, die von sechs Helices flankiert werden, setzt sich die Cap-Region aus drei antiparallelen β -Faltblättern und drei Helices zusammen.

Die Kristallisation der Polyneuridinaldehyd-Esterase erforderte einen hohen Aufwand an verschiedenen Screening-Methoden und Optimierungen der Kristallisationsbedingungen. Erste Kristalle konnten mittels eines „high throughput screenings“ hergestellt werden, wobei diese Kristalle aufgrund ihrer flachen Form nicht für eine Röntgenstrukturaufklärung geeignet waren. Um Polyneuridinaldehyd-Esterase-Kristalle zu erhalten, mit denen eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms durchgeführt werden konnte, wurden die initialen Kristallisationsbedingungen aus dem „high throughput screening“ verändert. Hierbei wurden mehrere hundert verschiedene Puffervarianten und unterschiedliche Kristallisationsverfahren angewendet. Schließlich konnten weniger als zehn Kristalle, gezüchtet werden, die von ihrer äußeren Form her für eine Röntgenstrukturaufklärung geeignet schienen. Hierzu wurden etwa 5000 Kristallisationsansätze per Hand pipettiert.

Diese Proteinkristalle wurden mit einer Auflösung von 2,2 Å mittels Röntgenstrukturanalyse vermessen. Anhand der dreidimensionalen Struktur des SABP2 war es möglich, eine Strukturaufklärung der Polyneuridinaldehyd-Esterase mittels eines „Molecular Replacement“ durchzuführen. Die Abbildung 36 zeigt erstmals die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase. Farblich herausgehoben ist die katalytische Triade bestehend aus Ser 87, Asp 216 und His 244, welche der konservierten Abfolge nukleophil – sauer – Histidin aller α/β -Hydrolasen entspricht. Das Serin 87 ist hierbei im „nucleophilic elbow“ positioniert, der sich zwischen dem β -Faltblatt 3 und der α -Helix 3 befindet. Dieser „nucleophilic elbow“ ist eine hochkonservierte Struktur innerhalb der Familie der α/β -Hydrolasen. Die katalytischen Aminosäuren Asp 216 und His 244 sind nach β -Faltblatt 5 bzw. β -Faltblatt 6 positioniert. Eine genaue Beschreibung der Faltblätter und Helices ist der Abbildung 35 zu entnehmen.

Abbildung 36: Die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase aus *Rauvolfia serpentina*. Die Aminosäuren der katalytischen Triade im aktiven Zentrum des Enzyms sind rot gekennzeichnet. Der „nucleophilic elbow“, in dem sich das Serin 87 der katalytischen Triade befindet, ist zwischen dem β -Faltblatt 3 und der α -Helix 3 positioniert



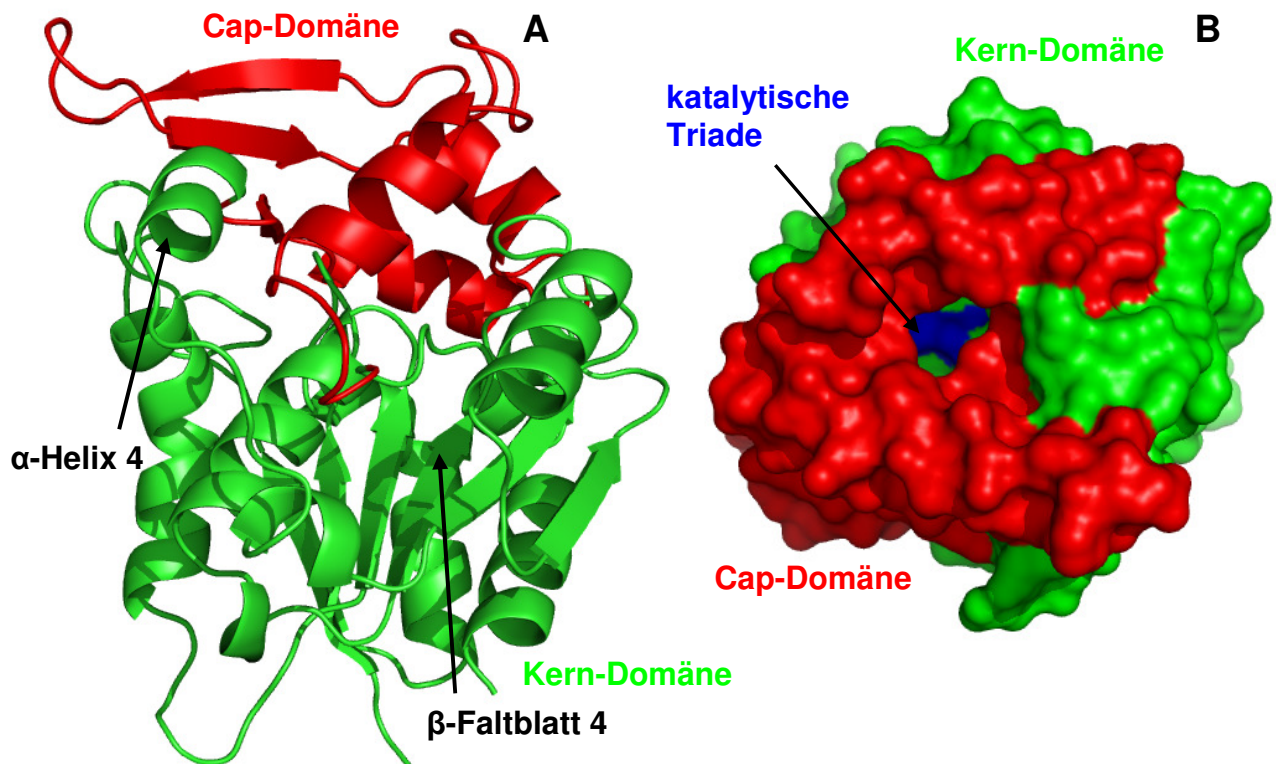
Eine Domäne, die von besonderer Bedeutung für die Substratspezifität der α/β -Hydrolasen ist, wird als Cap-Region bezeichnet (CAJAL Y *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur innerhalb der Hydrolasen-Familie strukturell ähnlichen kanonischen Kernregion ist die Cap-Region höchst flexibel. Durch ihre Struktur bestimmt die Cap-Region die Form des Zugangs zum aktiven Zentrum der α/β -Hydrolasen. Innerhalb der Hydrolasenfamilie kann diese Domäne an verschiedenen Positionen der Protein-Kernstruktur inseriert sein ($\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ und $\beta 7$) und unterschiedlichste Ausdehnungen und Strukturen aufweisen. Somit ist auch die enorme Vielfalt der durchgeführten

katalytischen Reaktionen und die beeindruckende Variabilität akzeptierter Substrate innerhalb der α/β -Hydrolasen verständlich.

Im Fall der Polyneuridinaldehyd-Esterase befindet sich die Cap-Region, wie auch beim SABP2, zwischen dem β -Faltblatt 4 und der α -Helix 4. Die Region setzt sich aus jeweils drei antiparallelen Faltblättern und Helices zusammen (Abbildung 37 A). In Abbildung 37 sind die beiden Domänen (Cap- und Kern-Struktur) der Polyneuridinaldehyd-Esterase farblich getrennt dargestellt. Die Polyneuridinaldehyd-Esterase besteht aus 264 Aminosäuren. Die Cap-Region wird durch den Abschnitt zwischen den Aminosäuren Asp 116 und Phe 187 gebildet und umfasst somit 71 Aminosäuren. Deutlich ist zu erkennen, dass der Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms von der Cap-Domäne geformt wird (Abbildung 37 B).

Abbildung 37: Die Cap-Domäne der Polyneuridinaldehyd-Esterase

A) (Seitenansicht) Die Cap-Domäne befindet sich bei der PNAE zwischen dem β -Faltblatt 4 und der α -Helix 4. Sie setzt sich aus drei Helices und drei Faltblättern zusammen. B) (Aufsicht) Die Cap-Domäne bildet den Zugang zum aktiven Zentrum und ist somit von zentraler Bedeutung für die Substratspezifität in der Familie der α/β -Hydrolasen.



3.2 Strukturelle Vergleiche zwischen der Röntgenstruktur und einem *in silico*-Modell der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Eine erste Vorstellung über die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase wurde durch MATERN-DOGRU E *et al.* (2002) beschrieben. Sie klärte im Verlauf ihrer Arbeiten über dieses Enzym seine Primärstruktur auf. Sequenzvergleiche ergaben, dass die PNAE eine Aminosäureidentität von 43 % zur Hydroxynitril-Lyase aus *Hevea brasiliensis* aufwies, deren dreidimensionale Struktur durch Röntgenstrukturanalyse bereits bekannt war (PDB-code: 1YAS) (WAGNER U *et al.*, 1996). Über ein „homology-modelling“-Programm (MODELLER 4, SALI A und BLUNDELL T, 1993) erstellten MATERN-DOGRU E *et al.* (2002), mit der Hydroxynitril-Lyase Struktur als Vorlage, Modelle für die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase. Da mit den hier beschriebenen Ergebnissen die Struktur dieses Enzyms über Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden konnte, besteht zum ersten Mal die Möglichkeit eine Bewertung der erstellten Modelle und einen Vergleich mit dem für die Modellierung verwendeten Enzym (Hydroxynitril-Lyase) anzustellen. Darüber hinaus erfolgt eine Gegenüberstellung mit dem für das „Molecular Replacement“ verwendeten Salizylsäure-Bindeprotein 2 (SABP2).

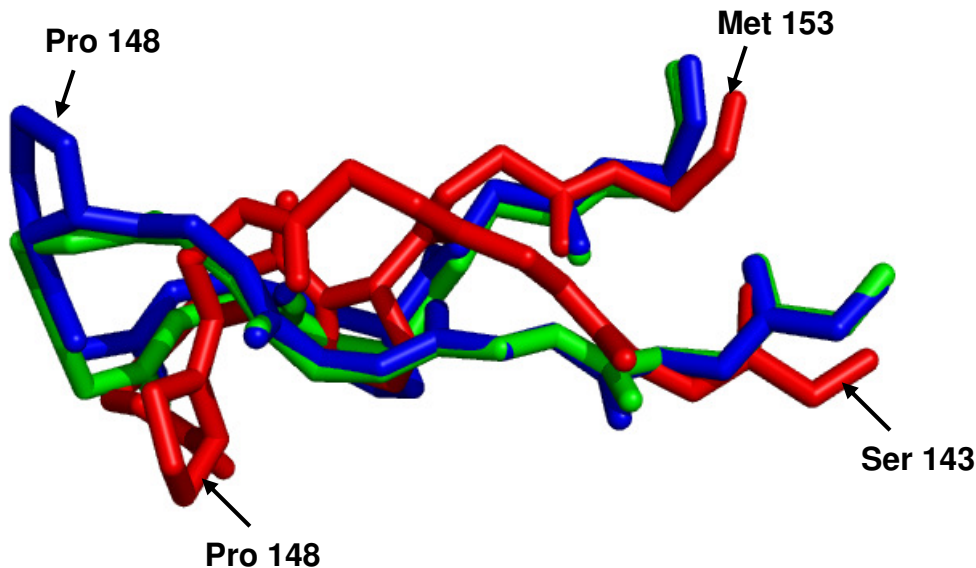
Um die Strukturvergleiche zu bewerten, wird die RMSD-Abweichung angegeben. RMSD (*root mean square distance*) bezeichnet hierbei den durchschnittlichen Abstand des Rückgrats zwischen zwei übereinander gelegten Proteinen. Die Distanz wird hierbei in Å angegeben. Je geringer der RMSD-Wert ist, je ähnlicher sind die beiden verglichenen Strukturen.

3.2.1 Die Cap-Domäne

Da der Cap-Domäne eine besondere Funktion bei der Bildung des Zugangs zum aktiven Zentrum und somit der Substratakzeptanz der α/β -Hydrolasen zugeschrieben wird, soll ein genauerer Vergleich dieser Struktur zwischen einem von MATERN-DOGRU E *et al.* (2002) erstellten Modell und der über Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase erfolgen. Als Vergleichsmodell wird eines verwendet, das die besten sterischen Eigenschaften von allen 15 erstellten Modellen aufwies (MATERN-DOGRU E, 2002). Ein weiteres von ihr erstelltes Modell, das die beste Orientierung der Aminosäuren der katalytischen

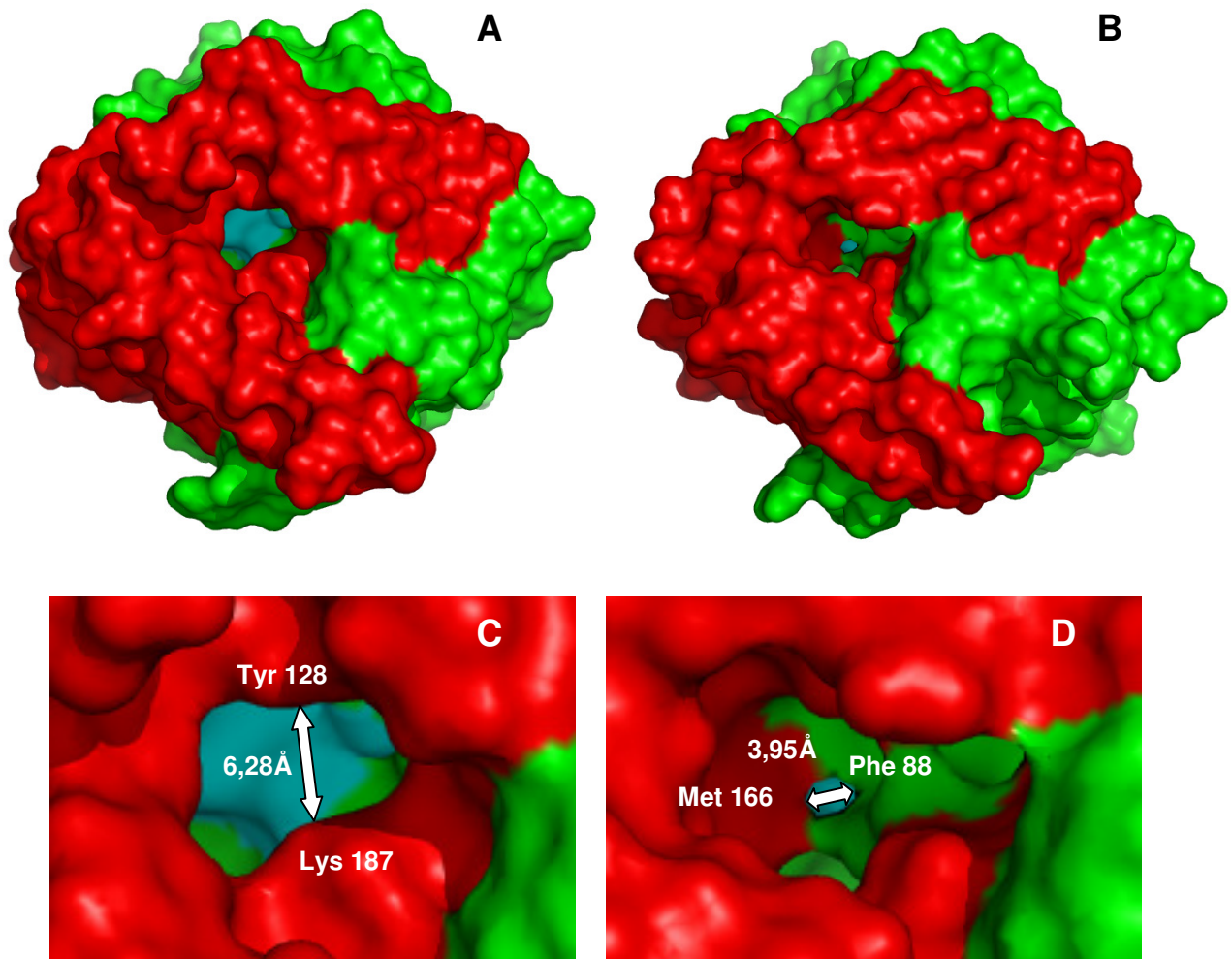
Triade aufwies, stand für einen Vergleich nicht zur Verfügung. Wenn man die Gesamtstruktur betrachtet, liegt der RMSD-Wert zwischen dem Modell und der tatsächlichen Struktur bei 0,916 Å. Im Vergleich hierzu liegt der RMSD-Wert der Kristallstruktur der PNAE und der für das „Molecular Replacement“ verwendeten Struktur von SABP2 nur bei 0,697 Å. Ein Vergleich der Cap-Domänen der PNAE-Kristallstruktur und dem *in silico*-Modell ergibt einen RMSD-Wert von 1,045 Å, wogegen die Kern-Domänen nur eine Differenz von 0,812 Å aufweisen. Aus diesen Werten ist ersichtlich, dass die Modellierung der beiden Regionen unterschiedlich effektiv durchgeführt werden konnte. Die Kern-Domänen zeigen sich innerhalb der gesamten Familie der α/β -Hydrolasen strukturell als konserviert, die Cap-Region dagegen nicht. Daher ist davon auszugehen, dass eine Modellierung eines strukturell konservierten Bereichs, in Hinblick auf die sterischen Werte, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen dreidimensionalen Struktur entspricht als die einer hoch flexiblen Region. Eine besondere Abhängigkeit ergibt sich dabei aus dem als Vorlage verwendeten Molekül. Betrachtet man beispielsweise einen Vergleich (Sequenzabschnitt Ser 143 bis Met 153 bezogen auf PNAE) zwischen einem Teil der Cap-Domäne der Hydroxynitril-Lyase (HNL) aus *H. brasiliensis* und des PNAE-Modells mit der erhaltenen Röntgenstruktur, ist zu erkennen, dass sich das Modell deutlich näher an der Struktur der HNL als am tatsächlichen Verlauf der Aminosäurekette orientiert (Abbildung 38). Bei dieser Teilsequenz liegt der RMSD Wert zwischen dem PNAE *in silico*-Modell und der Röntgenstruktur bei 1,118 Å. Vergleicht man hingegen das PNAE *in silico*-Modell mit der HNL-Struktur ergibt sich nur ein RMSD-Wert von 0,132 Å. Besonders auffällig ist die unterschiedliche Position des Prolins 148 der PNAE.

Abbildung 38: Struktureller Vergleich einer „backbone“-Teilsequenz der Cap-Domäne der HNL, des daraus erstellten PNAE-Modells und der Röntgenstruktur der PNAE. Der Ausschnitt zeigt die Sequenz zwischen den Aminosäuren Ser 143 und Met 153 (bezogen auf PNAE).



Vergleicht man die Oberflächenstrukturen des Modells mit der der Röntgenstruktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase, ist ein deutlicher Unterschied im Eingangsbereich zum aktiven Zentrum zu erkennen. Die katalytische Triade wird bei dem *in silico* modellierten Enzym von Teilen der Cap- und Kerndomänen teilweise verdeckt. Sehr deutlich sind die Unterschiede in der gesamten Oberflächenstruktur auszumachen. Die Abbildung 39 zeigt einen Vergleich der beiden Moleküle bei gleicher Orientierung. Der engste Bereich des Kanals der Kristallstruktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase befindet sich zwischen den Aminosäuren Tyr 128 und Lys 187 und beträgt 6,28 Å. Dieser Bereich befindet sich nah am Eingang des Kanals. Hingegen befindet sich die engste Stelle des *in silico*-Modells der PNAE nah an der katalytischen Triade im Inneren des Moleküls. Diese Engstelle weist nur eine Breite von 3,95 Å auf und befindet sich zwischen den Aminosäuren Phe 88 und Met 166.

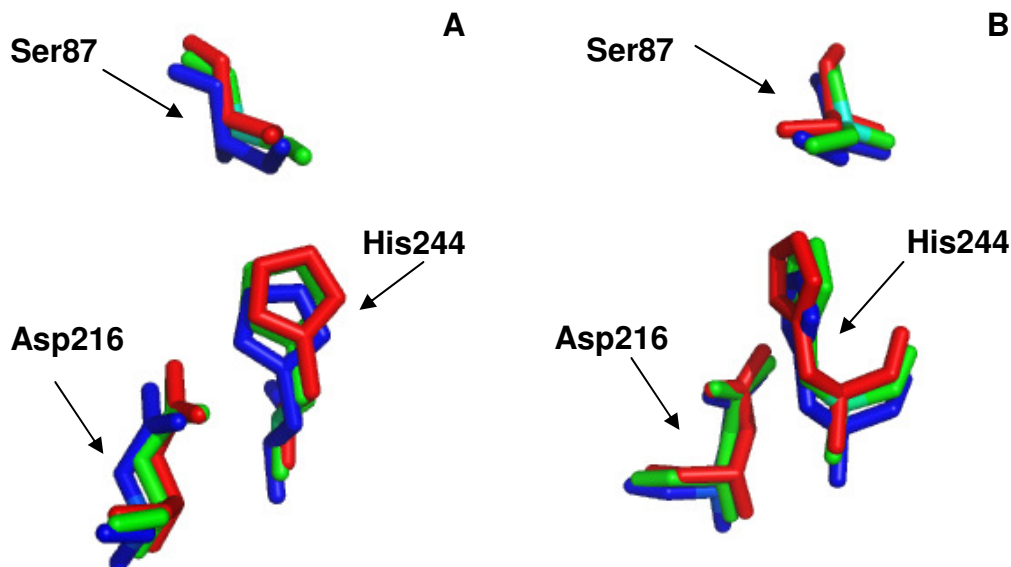
Abbildung 39: Struktureller Vergleich des Zugangs zum aktiven Zentrum der Polyneuridinaldehyd-Esterase. Die Cap-Domäne ist in **rot**, die Kern-Domäne in **grün** dargestellt. Die katalytische Triade ist **blau** gekennzeichnet. A) Struktur des Eingangs zur Bindetasche, wie er sich aus der Röntgenstrukturanalyse ergibt. B) Struktur des Zugangs anhand des Modells mit den besten sterischen Eigenschaften. C) Nahaufnahme des Zugangs von A); D) Nahaufnahme des Zugangs von B).



3.2.2 Die katalytische Triade

Die katalytischen Aminosäuren der Enzyme mit α/β -Hydrolase-Faltung bestehen stets aus einem Motiv nukleophil – sauer – Histidin, welches durch die konservierte Kern-Domäne in einer, innerhalb der Familie, stabilen Positionierung gehalten wird. Vergleicht man die katalytische Triade der Röntgenstrukturen der Polyneuridinaldehyd-Esterase mit den Strukturen der Hydroxynitril-Lyase und des Salizylsäure-Bindeprotein 2, ist die konservierte Position dieser Aminosäuren innerhalb der α/β -Hydrolasen zu erkennen (Abbildung 40). Es treten nur geringe Abweichungen auf (maximaler RMSD-Wert 0,191 Å), die sich aus der Auflösung der Röntgenstrukturen ergeben können.

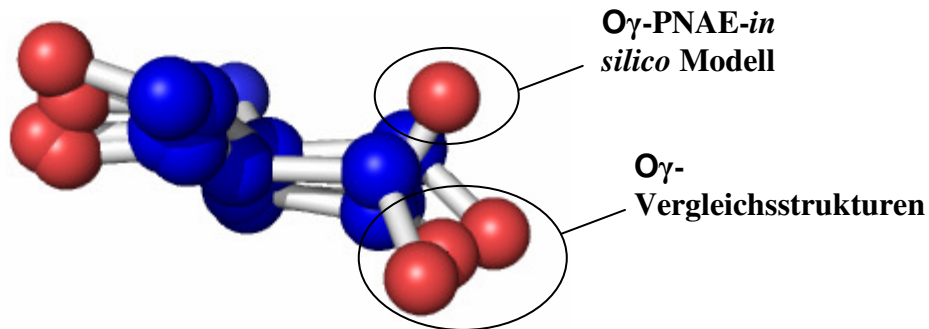
Abbildung 40: Vergleich der Aminosäuren der katalytischen Triade zwischen Polyneuridinaldehyd-Esterase, Hydroxynitril-Lyase und Salizylsäure-Bindeprotein 2. Die genauen Bezeichnungen der Aminosäuren beziehen sich auf die PNAE. A) und B) sind eine um 90° gedrehte Darstellung der gleichen Überlagerung.



Vergleicht man die Triade des durch „Molecular-Modelling“ erstellten PNAE-Strukturmodells mit dieser Aminosäurepositionierung, zeigt sich, dass das Asparagin 216 und das Histidin 244 wie erwartet in den konservierten Bereichen zu finden sind.

Das Sauerstoffatom O_γ des Serin 87 hingegen ist entgegen der für die α/β -Hydrolasen üblichen Richtung geneigt (Abbildung 41).

Abbildung 41: Vergleich der Lage des Serin 87 zwischen Polyneuridinaldehyd-Esterase, Hydroxynitril-Lyase und Salizylsäure-Bindeprotein 2 und dem *in silico*-Modell der Polyneuridinaldehyd-Esterase.



Hiermit konnte klar gestellt werden, dass die Orientierung der Aminosäuren im aktiven Zentrum der Polyneuridinaldehyd-Esterase der klassischen Ausrichtung der α/β -Hydrolasen entspricht. Insgesamt ist also zu sagen, dass das von MATERN-DOGRU E *et al.* (2002) erstellte Modell der Polyneuridinaldehyd-Esterase, welches die besten sterischen Werte aufweist, besonders in den Bereichen, welche für die Substratazeptanz und Katalyse von entscheidender Bedeutung sind, deutliche Unterschiede zur tatsächlichen dreidimensionalen Struktur des Enzyms zeigt. Es ist ersichtlich, dass sich die Röntgenstrukturaufklärung von Proteinen nicht durch ein „homology modelling“ ersetzen lässt.

Bemerkenswert bei der Polyneuridinaldehyd-Esterase ist ihre außerordentliche Substratspezifität, die für die Esterasen untypisch ist (DOGRU E *et al.*, 2000). Andere Esterasen akzeptieren zumeist ein breites Spektrum an Substraten, wogegen die Polyneuridinaldehyd-Esterase nur ihr natürliches Substrat Polyneuridinaldehyd und das nur *in vitro* vorliegende Ethylester-Derivat umzusetzen vermag. Das Derivat entsteht durch Trans-Esterifikation nach der enzymatischen Spaltung, wenn das Substrat in Ethanol gelöst vorliegt (MATERN-DOGRU E *et al.*, 2002). Um den Grund für diese Substratspezifität darzulegen, sollte ein Komplex aus dem Enzym und dem Polyneuridinaldehyd einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden. Somit könnten alle an der Bindung des Substrats beteiligten Aminosäuren daraufhin untersucht werden, ob sie für die Substratspezifität verantwortlich sind.

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Enzyme des Ajmalin-Biosynthesewegs aus der indischen Arzneipflanze *Rauvolfia serpentina* beschrieben und näher charakterisiert. Dabei handelt es sich einerseits um die Vomilenin-Reduktase und um die 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase. Zu diesen Reduktasen lagen die putativen cDNAs vor. Es wurden weit reichende Versuche unternommen, diese beiden Enzyme heterolog zu exprimieren, wobei die Expressionssysteme *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* und *Nicotiana benthamiana* verwendet wurden. Eine aktive heterologe Expression der Enzyme konnte nicht durchgeführt werden, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf posttranslationale Modifikationen in der Ursprungspflanze zurückzuführen ist. Allerdings bestehen auch berechnete Zweifel, ob es sich bei den zur Verfügung stehenden Vollängenklonen um die cDNAs der Vomilenin-Reduktase und der 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase handelte. Für die putative 2 β -(*R*)-1.2-Dihydrovomilenin-Reduktase konnte zumindest eine generelle Reduktaseaktivität nachgewiesen werden, indem durch sie Zimtaldehyd umgesetzt wurde.

Zum anderen sollte eine Strukturaufklärung der Vinorin-Synthase im Komplex mit ihrem Liganden CoA und dem Reaktionsprodukt Vinorin vorgenommen werden. Die aktive heterologe Expression und Kristallisation der Vinorin-Synthase konnte nachvollzogen werden. Die erhaltenen Proteinkristalle stellten sich allerdings als derart empfindlich gegenüber Schwankungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung) innerhalb ihrer Umgebung und das Eindringen von Liganden und dem Reaktionsprodukt in den Kristall dar, dass eine erfolgreiche Komplexbildung und somit strukturelle Beschreibung durch Röntgenstrukturanalyse nicht möglich war. Weiterhin wurden Mutagenesestudien mit der Vinorin-Synthase durchgeführt, die zu einer näheren Charakterisierung von konservierten Aminosäuren innerhalb der BAHD-Superfamilie der Acetyltransferasen führte, zu der auch die Vinorin-Synthase zählt. Die Asparaginsäure 164 des hochkonservierten Motivs HisXXXAsp bildet eine Salzbrücke mit dem Arginin 279. Alle durchgeführten Mutationen dieser Asparaginsäure führten zu einem absoluten Aktivitätsverlust der Vinorin-Synthase, selbst wenn es sich um einen homologen Austausch handelte. Eine postulierte Funktion des Asparagins 277, als mitverantwortliche Aminosäure zur Erkennung und Bindung des Co-Substrats Acetyl-CoA, konnte anhand der durchgeführten

Mutagenesestudien ausgeschlossen werden. Es wurden keinerlei Unterschiede in der Aktivität der Vinorin-Synthase nach durchgeführten Mutationen an dieser Position festgestellt.

Durch ein „Screening“ mit 720 unterschiedlichen Kristallisationspuffern ist es erstmals gelungen die Polyneuridinaldehyd-Esterase aus *Rauvolfia serpentina* zu kristallisieren. Um Kristalle zu generieren, die für eine Röntgenstrukturanalyse verwendet werden konnten, wurden mehr als 6000 Optimierungsansätze pipettiert. Schließlich konnte die dreidimensionale Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase mit einer Auflösung von 2,2 Å erfolgreich aufgeklärt werden. Nach Umklonierung der vorliegenden cDNA konnte eine aktive heterologe Expression in *E. coli* und eine Isolation des Enzyms vorgenommen werden. Die erhaltenen Daten aus der Röntgenstrukturanalyse führten über ein „Molecular Replacement“ zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Polyneuridinaldehyd-Esterase. Es folgte eine Beschreibung struktureller Eigenschaften der Polyneuridinaldehyd-Esterase im Vergleich zu einem vorliegenden Modell, welches durch ein „Molecular Modelling“ erstellt wurde. Es konnten deutliche Unterschiede in den für die Katalyse und Substraterkennung wichtigen Regionen des Enzyms aufgezeigt werden. Die Aminosäure Serin 87, die zur katalytischen Triade der Polyneuridinaldehyd-Esterase gehört, zeigt in der „Molecular Modelling“-Struktur eine andere räumliche Orientierung als in der experimentell bestimmten Röntgenstruktur. Auch die für die Substraterkennung der α/β -Hydrolasen entscheidende Cap-Domäne, die den Zugang zum aktiven Zentrum bildet, wies im Vergleich zwischen *in silico*-Modell und Röntgenstruktur deutliche Unterschiede auf.

VII Literatur

ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MYERS, EW und LIPMAN, DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410

AMINABHAVI, T., DESAI, K. und KULKARNI, A. *Polymer News* 28 (2003) 315-319

ASTOUL, E., LAURENCE, A., TOTTY, N., BEER, S., ALEXANDER, D. und CANTRELL, D. Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. *J. of Biol. Chem.* 278 (2003) 9267-9275

BAIROCH, A. The Enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 304-305

BARTLETT, M., SKLAR R., TAYLOR, W., SCHLITTER, E., AMAI, R., BEAK, P., BRINGI, N. und WENKERT, E. Rauwolfia Alkaloids XXXVIII. Stereospecific degradation leading to the absolute configurations and structure of ajmaline, sarpagine and corynantheidine. *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 622-630

BAYER, A. Charakterisierung der Vinorin-Synthase aus *Rauwolfia serpentina* durch Reinigung, Expression, Mutation und Kristallisation, Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Fachbereich Chemie und Pharmazie (2003)

BAYER, A., MA, X. und STÖCKIGT, J. Acetyltransfer in natural product biosynthesis – functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2787-2795

BEEKWILDER, J., ALVAREZ-HUERTA, M., NEEF, E., VERSTAPPEN, F., BOUWMEESTER, H. und AHARONI, A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* 135 (2004) 1865-1878

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62 (1951) 293-300

BHASIN, M. und RAGHAVA, G. ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W 414-419

BIRNBOIM, H. und DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* (1979) 1513-1523

BLAKESLY, R. und BOEZI, J. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82 (1977) 580-582

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

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254

BUCHELER, U., WERNER, D. und SCHIRMER, R. Generating compatible translation initiation regions for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by exhaustive periShine-Dalgarno mutagenesis. Human glutathione reductase cDNA as a model. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 3127-3133

BUCHER, P. und BAIROCH, A. A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. ISMB-94. Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman, R., Brutlag, D., Karp, P., Lathrop, R., Searls, D. Eds; AAAIPress, Menlo Park (1994) 53-61

BUCKHOLZ, R. und GLEESON, M. Yeast system for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 9 (1991) 1067-1072

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., BOLOS, J., PATKAR, S. und ALSINA, M. Effect of the liquid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. *Biochimie* 82 (2000) 1053-1061

DANLEY, D. Crystallization to obtain protein-ligand complexes for structure-aided design. *Acta Cryst.* D62 (2006) 569-575

D'ARCY, A., ELMORE, C., STIHL, M. und JOHNSTON, J.E. A novel approach to crystallising proteins under oil. *J. of Crystal Growth* 168 (1996) 175-180

D'AURIA, J., CHEN, F. und PICHERSKY, E. Characterization of an acetyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* 130 (2002) 466-476

D'AURIA, J. Acetyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 331-340

DELANO, W. *The PyMOL Molecular Graphics System* (San Carlos, CA: DeLano Scientific). (2002)

DENG, T. Bacterial expression and purification of biologically active mouse c-Fos proteins by selective codon optimization. *FEBS Lett.* 409 (1997) 269-272

DOGRU, E., WARZECHA, H., SEIBEL, F., HAEBEL, S., LOTTSPEICH, F. und STÖCKIGT, J. The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indol alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of alpha/beta hydrolase superfamily. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1397-1406

DOWER, W., MILLER, J. und RAGSDALE, C. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 6127-6145

FALKENHAGEN, H., KUZOVKINA, I., ALTERMAN, I., NIKOLAEVA, L. und STÖCKIGT, J. Alkaloid formation in hairy roots and cell suspensions of *Rauwolfia serpentina* Benth.. *Nat. Prod. Lett.* 3 (1993) 107-112

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

FALQUET, L., PAGNI, M., BUCHER, P., HULO, N., SIGRIST, CJ., HOFMANN, K., BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 235-238

FOROUHAR, F., YANG, Y., KUMAR, D., CHEN, Y., und FRIDMAN, E. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 1773-1778

GAMBORG, O., MILLER, A., OJIMA K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 (1968) 151-158

GERASYMENKO, I., MA, X., SHELUDKO, Y., MENTELE, R., LOTTSPREICH, F. und STÖCKIGT, J. Purification and partial amino acid sequences of the enzyme vinorine synthase involved in a crucial step of ajmaline biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2781-2786

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

GURVICH, O., BARANOV, P., GESTELAND, R und ATKINS, J. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arinine codons AGG_AGG and AGA_AGA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187 (2005) 4023-4032

HANAHAH, D. Techniques for transformation in *E. coli*. DNA Cloning Volume I -A practical Approach, GLOVER, D.M. (Ed.). Oxford – Washington D.C., IRL Press. (1985)

HANNIG, G. und MAKRIDES, S. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 54-60

HARTMANN, T. und OBER, D. Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. *Carola-Wilhelmina* 01/03 (2003) 26-32

HEIKINHEIMO, P., GOLDMAN, A., JEFFRIES C. und OLLIS, D. Off barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* 7 (1999) R141-R146

HOFFMANN, L., MAURY, S., MARTZ, F., GEOFFROY, P. und LEGRAND, M. Purification, cloning and properties of an acetyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 95-103

HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanism. *Curr. Protein Pept Sci.* 1 (2000) 209-235

JACKSON, C., KIM, H., CARR, P., LIU, J. und OLLIS, D. The Structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1752 (2005) 56-64

JANA, S. und DEB, J. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 289-298

JENSEN, O. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 8 (2004) 33-41

KISSINGER, CR., GEHLHAAR, DK. und FOGEL, DB. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst D* 55 (1999) 484-491

KOZAK, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115 (1991) 887-903

KUMAR, D. und Klessig, D. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 16101-16106

KWON, S., CHOI, E., CHOI, Y., AHN, J und PARK, O. Proteomic studies of post-translational modifications in plants. *J. of Experim. Botany* 57 (2006) 1547-1551

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685

LAWSON, D., DEREWENDA, U., SERRE, L., FERRI, S., SZITTNER, R., WEI, Y., MEIGHEN, E. und DEREWENDA, Z. Structure of a myristoyl-ACP-specific thioesterase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* 33 (1994) 9382-9388

MA, X., KOEPKE, J., BAYER A., FRITZSCH, G. MICHEL H. und STOECKIGT, J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of native and selenomethionyl vinorine synthase from *Rauvolfia serpentina*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 61 (2005) 694-696

MA, X., KOEPKE, J., PANJIKAR, S., FRITZSCH, G. und STOECKIGT, J. Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13576-13583

MA, X., KOEPKE, J., BAYER, A., LINHARD, V., FRITZSCH, G. ZHANG, B., MICHEL, H. und STOECKIGT, J. Vinorine Synthase from *Rauvolfia*: the first example of crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an enzyme of the BAHD superfamily. *Biochim. Biophys Acta* 1701 (2004) 129-132

MANN, M. und JENSEN, O. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* 21 (2003) 255-261

MARILLONNET, S., GIRITCH, A., GILS, M., KUNDZIA, R., KLIMYUK, V. und GLEBA, Y. *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. PNAS 101 (2004) 6852-6857

MATERN-DOGRU, E., MA, X., HARTMANN, J., DECKER, H. und STÖCKIGT, J. Potential active-site residues in polyneuridine aldehyde esterase, a central enzyme of indole alkaloid biosynthesis, by modeling and site-directed mutagenesis. Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2889-2896

MATTHEWS, B. Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33 (1968) 491-497

MCNAE, I., KAN, D., KONTOPIDIS, G., PATTERSON, A., TAYLOR, P., WORRALL, L. und WALKINSHAW, M. Studying protein-ligand interactions using protein crystallography. Crystallogr. Rev. 11 (2005) 61-71

MCREE, D. Practical Protein Crystallography. McRee DE. San Diego, Academic Press (1999)

MEYERS, TS und LAMBERTS, BL. Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamid-gel strips. Biochim. Biophys. Acta 10 (1965) 144-145

MICHAEL, R., MOODY, P. und LESLIE, A. Crystal Structure of the Aspartic Acid -199 – Asparagine Mutant of Chloramphenicol Acetyltransferase to 2.35 Å Resolution: Structural Consequences of Disruption of a Buried Salt Bridge. Biochemistry 29 (1990) 11261-11265

MORENO, A., THEOBALD-DIETRICH, A., LORBER, B., SAUTER, C. und GIEGE, R. Effects of macromolecular impurities and of crystallization method on the quality of eubacterial aspartyl-tRNA synthetase crystals. Acta Cryst. D61 (2005) 789-792

MURSHUDOV, G., VAGIN, A. und DODSON, E. Refinement of macromolecular structures by maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. D 53 (1997) 240-255

MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, H und SCHÄFER-KORTING, M. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (2001) 542-551

NAGAKURA, N., RUEFFER, M. und ZENK, M. The Biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids from strictosidine. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1 (1979) 2308-2312

NARDINI, M. und DIJKSTRA, B. α/β Hydrolase fold enzyme: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 732-737

OLLIS, D., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S., HAREL, M., REMINGTON, S., SILMAN, I., SCHRAG, J., SUSSMAN, J., VERSCHUEREN, K. und GOLDMANN, A. The α/β hydrolase fold. *Protein engineering.* 5 (1992) 197-211

OTOWINOWSKI, Z. und MINOR, W. Processing of X-Ray Diffraction Data Collection in Oscillation Mode. *Meth. Enzymol.* 276 (1997) 407-426

PANJIKAR S., PARTHASARATHY V., LAMZIN V., WEISS M und TUCKER P. Auto-Rickshaw; an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61 (2005) 449-457

PATTON, W. Detection technologies in proteom analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science.* 771 (2002) 3-31

PFITZNER, A. und STÖCKIGT J. Partial Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 21, (1982) 1585-1588

PFITZNER, A. und STÖCKIGT, J. Characterization of polyneuridine aldehyde esterase, a key enzyme in the biosynthesis of sarpagine/ajmaline type alkaloids. *Planta med.* 48 (1983) 221-227

PFITZNER, A. und STÖCKIGT, J. Polyneuridine aldehyde esterase: an unusually specifiv enzyme involved in the biosynthesis of sarpagine type alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1983) 459-460

PFITZNER, A., POLZ, L. und STÖCKIGT, J. Properties of Vinorine Synthase – the *Rauwolfia* Enzyme Involved in the Formation of the Ajmaline Skeleton. *Z. Naturforsch.*, 41c, (1986) 103-114

POLZ, L., SCHÜBEL H. und STÖCKIGT, J. Characterization of 2 β -(R)-17-O-Acetyljaman: Acetylerase – a Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia* Alkaloid Ajmaline. *Z. Naturforsch.*, 42c, 333-342 (1987).

RUEFFER, M., NAGAKURA, N. und ZENK, M. Strictosidine, the common precursor for monoterpene indole alkaloids with 3 α - and 3 β -configuration. *Tetrahedron Lett.* (1978) 1593-1596

RUPPERT, M. Cytochrom P450-Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus *Rauvolfia serpentina*. Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Fachbereich Chemie und Pharmazie (2001)

SAIKI, R., GELFUND, D., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G., MULLIS, K. und ERLICH, H. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491

SALI, A. und BLUNDELL, T. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779-815

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T Maniatis. New York, Cold Spring Harbour Press. (1989)

SCHMIDT, D. und STÖCKIGT J. Enzymatic Formation of the Sarpagan-Bridge, a Key Step in the Biosynthesis of Sarpagine- and Ajmaline-Type Alkaloids. *Planta Medica*, 61, (1995) 254 – 258

SCHRAG, J., VERNET, T., LARAMEE, L., THOMAS, D., RECKENWALD, A., OKONIEWSKA, M., ZIOMEK, E. Redesigning the active site of *Geotrichum candidum* lipase. *Protein Eng.* 8 (1995) 835-842

SCHUBOT, F. und WAUGH, D. A pivotal role for reductive methylation in the de novo crystallization of a ternary complex composed of *Yersinia pestis* virulence factors YopN, SycN and Ysc B. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 1981-1986

SCORER, C., BUCKHOLZ, R., CLARE, J. und ROMANOS, M. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136 (1993) 111-119

SHAPIRO, AL., VINUELA, E. und MAIZEL, J.V. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 815-820

SPANJAARD, R., CHEN, K., WALKER, J. und VAN DUIN, J. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5031-5036

SREEKRISHNA, K. und KROPP, K. *Pichia pastoris. Nonconventional Yeast in Biotechnology – A Handbook.* Springer Verlag Aachen. 1 (1996) 203-250

STÖCKIGT, J. und ZENK, M. Strictosidine (isovincoside): The key intermediate in the enzymatic formation the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids. *J. Chem. Soc.Chem. Commun.* (1977) 646-648

STÖCKIGT, J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine:Strictosidine and Cathenamine. *Phytochemistry*, 18, (1979) 965-971

STÖCKIGT, J., PFITZNER, A und ZENK, M. Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauvolfia serpentina* Benth. *Plant Cell Rep.* 1 (1981) 36-39

ST-PIERRE, B. und DE LUCA, V. In *Recent advances in phytochemistry evolution of metabolic pathways*; JOHN, R., ROMEO, T., VARIN, L., DE LUCA, V. Eds.; Elsevier Science: Oxford, 32, (2000) 285-315

TALATY, N., TAKATS, Z. und COOKS, R. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst.* 130 (2005) 1624-1633

THOMPSON, J., HIGGINS, D. und GIBSON, T. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 4673-4680

VAUCHERET, H., ELMAYAN, T., THIERRY, D., VAN DER GEEST, A., HALL, T., MLYNAROVA, L. und NAP, J. Flank Matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent trans-silencing in tobacco plants. *Mol Gen Genet.* 259 (1998) 388-392

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

WAGNER, U., HASSLACH, M., GRINGEL, H., SCHWAB, H. und KRATKY, C. Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Structure* 4 (1996) 811-822

WEISS, S., FAMULOK, M., EDENHOFER, F., WANG, Y., JONES, I., GROSCHUP, M. und WINNACKER, E. Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrP^c as glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J. Virol.* 69 (1995) 1087-1096

WINN, M., ISUPOV, M. und MURSHUDOV, G. Use of TLC parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D* 57 (2001) 122-133

WU, S., DORNAN, J., KONTOPIDIS, G., TAYLOR, P. und WALKINSHAW, M. The first direct determination of a Ligand binding constant in protein crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 582-586

YUVANIYAMA J, RAMC 1999 Crystallization Tips

<http://www.hamptonresearch.com/stuff/RAMC/RAMC1999Tips.aspx>