

**Biochemische, strukturelle und funktionelle
Untersuchungen der Tyrosinase aus
*Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202***

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Tim Jacobs

Geb. in Troisdorf

Mainz, 2011

Die Promotion wurde von der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert.

Dekan:

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung:

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind im Literaturverzeichnis vollständig aufgeführt. Ich versichere alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen übernommen wurde.

Mainz, 15. März 2011

Tim Jacobs

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tyrosinase – eine Phenoloxidase	1
1.2	Die diverse Familie der Tyrosinasen und die Tyrosinase aus <i>Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202</i>	3
1.3	Reaktionsmechanismus der Tyrosinase und Melanogenese	7
1.4	Ziel der Arbeit	11
2	Material	12
2.1	Bakterienstämme	12
2.2	Plasmide	12
2.3	Primer	12
2.4	Enzyme	13
2.5	Marker	13
2.6	Medien	13
2.7	Antibiotika	14
2.8	Chemikalien	14
2.9	Reagenzienkits	15
2.10	Geräte	15
3	Methoden	17
3.1	Molekularbiologische Methoden	17
3.1.1	Sterilisation	17
3.1.2	DNA Extraktion	17
3.1.3	Design von Oligonukleotiden	17
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.1.5	Restriktion und Ligation von DNA	19
3.1.6	Transformation durch Elektroporation	19
3.1.7	Plasmid-Isolierung	19
3.1.8	Sequenzierung	20
3.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	20
3.1.10	Gel-Extraktion	21
3.1.11	Reinigung von PCR-Produkten	21
3.2	Proteinbiochemische Methoden	21
3.2.1	Kultivierung von <i>Streptomyces castaneoglobisporus HUT 6202</i>	21
3.2.2	Überexpression von Tyrosinase und ORF378 im Komplex	21
3.2.3	Herstellung von Glycerin-Stocks	22
3.2.4	Zellernte und Zellaufschluss	22

3.2.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.2.6	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>Blue Native</i> PAGE)	23
3.2.7	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	24
3.2.8	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels Gelelektrophorese	25
3.2.9	Coomassie- und Silberfärbung von Polyacrylamid Gelen	26
3.2.10	Western Blot	27
3.2.11	Affinitätschromatographie	28
3.2.12	Gelfiltration	28
3.2.13	Massenspektrometrie	29
3.2.14	UV/VIS-Spektroskopie	29
3.2.15	Analytische Ultrazentrifugation	30
3.2.16	Proteinkonzentrationsbestimmung	32
3.3	Biophysikalische Methoden	33
3.3.1	Circulardichroismus Spektroskopie	33
3.3.2	Dynamische Lichtstreuung (<i>Dynamic Light Scattering, DLS</i>)	34
3.3.3	Kristallisation	35
3.4	Bioinformatische Methoden	39
3.4.1	Moleküldynamik-Simulationen und Docking	39
3.4.2	Berechnung der Liganden Bindungsenergie	40
3.4.3	Programme	41
3.4.4	Datenbanken	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Isolierung und Analyse genomischer DNA aus <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> HUT620243	
4.2	Plasmid Design	49
4.3	Expression und Reinigung des binären Tyrosinase-Komplexes	52
4.4	Biochemische Untersuchungen des binären Tyrosinase-Komplexes	54
4.5	Enzymatik	58
4.6	Dynamische Lichtstreuung	63
4.7	Analytische Ultrazentrifugation	65
4.8	<i>In silico</i> Untersuchungen der strukturellen Eigenschaften der Tyrosinase aus <i>S.castaneoglobisporus</i>	68
5	Diskussion	77
5.1	Klonierung des Tyrosinase-ORF378 Komplexes	77
5.2	Expression und Reinigung des binären Tyrosinase-Komplexes	78
5.3	Biochemie und Enzymatik der Tyrosinase	78
5.4	Bioinformatische Untersuchungen	82
6	Zusammenfassung	89

7	Ausblick	90
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	V
	Abkürzungen	VI
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang	XX
	Danksagung	XXV
	Lebenslauf	XXVI

1 Einleitung

In nahezu allen Organismengruppen von den Bakterien und Pflanzen bis hin zu den Wirbeltieren findet man kupferhaltige Enzyme, die an der oxidativen Umsetzung von Phenolen beteiligt sind (Mason, 1956; Solomon et al. 1996; van Gelder et al. 1997). Diese oft als Polyphenoloxidasen (PPO) bezeichnete Gruppe von Enzymen beinhaltet Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Laccasen, deren gemeinsames Merkmal ein zweikerniges Typ-3-Kupferzentrum ist (Solomon et al. 1992). Bei allen Organismen bewirken Tyrosinasen die Bildung von hoch reaktiven Chinonen. Diese polymerisieren zu Melanin, einem gelben bis schwarzen Pigment. Es ist für die Bräunung von verletztem Pflanzengewebe ebenso verantwortlich wie für die Farbgebung von Haut, Haaren und Augen beim Menschen. Außerdem ist es unentbehrlich für den UV-Schutz.

1.1 Tyrosinase – eine Phenoloxidase

Die Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) katalysiert als Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese zwei unterschiedliche Reaktionen, bei denen molekularer Sauerstoff verbraucht wird. Zum einen ist dies die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen (Creolase-Aktivität), zum anderen die Zweielektronen-Oxidation der entstehenden *o*-Diphenolen zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen (Catecholoxidase-Aktivität) (Abb.1.1).

Beide Reaktionen laufen am gleichen aktiven Zentrum ab (Decker et al. 2006; Mason, 1956; Mason et al. 1955). Namensgebend für das Enzym ist das Monophenol L-Tyrosin, dessen Hydroxylierungs-Produkt 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) gleichzeitig Substrat für die Diphenol-Oxidation ist. Das hierbei entstehende Dopachinon (4-(2-Carboxy-2-aminoethyl)-1,2-aenzochinon) bildet dann den Ausgangspunkt der Melaninbildung. Die Tyrosinase-Reaktion stellt somit den limitierenden Schritt dieses Stoffwechsel-Prozesses dar.

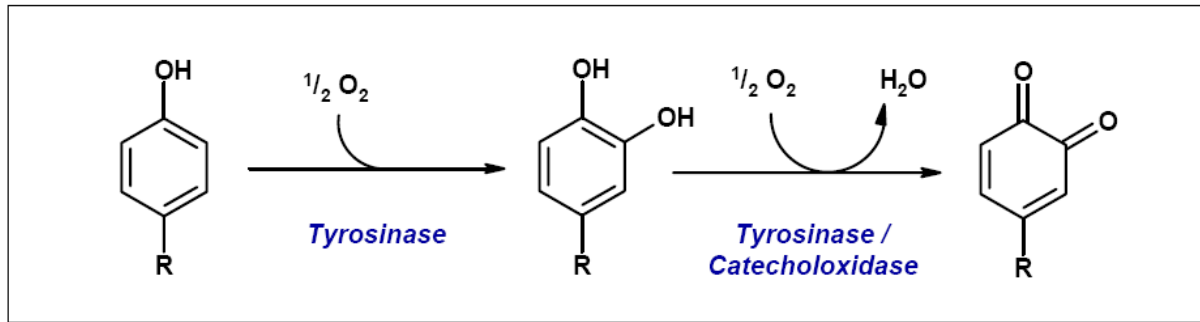


Abbildung 1.1: Reaktionen der Tyrosinase. Katalysiert wird die *o*-Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen, sowie die Oxidation von *o*-Diphenolen zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen wahrscheinlich in einem Schritt (Decker et al. 2006). In beiden Reaktionen wird molekularer Sauerstoff verbraucht. Durch anschließende autokatalytische Polymerisierung der *o*-Dichinone erfolgt die Bildung von Melanin.

Die vor allem in Pflanzen und Pilzen vorkommende Catecholoxidase (E.C. 1.10.3.1) katalysiert ebenso wie die Tyrosinase die Oxidation von *o*-Diphenolen zu *o*-Dichinonen, jedoch ist sie nicht in der Lage, Monophenole zu hydroxylieren (Klabunde et al. 1998; Decker und Tuzcek 2000; Decker et al. 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die Tyrosinase gleichzeitig auch eine Catecholoxidase darstellt, kam es mit der Zeit in der Literatur zu einer recht uneinheitlichen Benennung dieser Enzyme, zumal eine eindeutige Unterscheidung bisweilen schwierig ist.

Tyrosinasen sind essentiell für die Sklerotisierung des Exoskeletts der Arthropoden (Peter, 1993), sowie für den Wundverschluss und die Immunabwehr bei Invertebraten (Ashida und Brey, 1995; Nagai et al. 2001; Sugumaran, 2002; Adachi et al. 2005). Gebildetes Melanin wird am Ort der Verwundung abgelagert und minimiert, beziehungsweise verhindert den Verlust von Hämolymphe und das Eindringen von Pathogenen (Lai-Fook, 1966; Kuznetsov et al. 1984; Sugumaran, 1996).

Das durch die Tyrosinase-Aktivität entstehende Melanin erfüllt zahlreiche physiologische Schutzfunktionen. So werden durch dieses dunkle Pigment Bakterien und Sporen vor der UV-Strahlung geschützt (Butler et al. 1998; Nosanchuk et al. 2003; Ruan et al. 2002; Ruan et al. 2004). Melanin bindet für Zellen giftige Schwermetalle (Butler et al. 1998). Das Pigment wirkt sich inhibierend auf Oxidantien, enzymatische Hydrolyse, antimikrobielle Verbindungen und Phagozytose aus, was zur mikrobiellen Pathogenese beiträgt (Bell und Wheeler, 1986; Nosanchuk et al. 2003).

Im Boden ist Melanin an der Polymerisation und Detoxifikation pflanzlicher phenolischer Verbindungen involviert und dadurch an der Bildung von Humus-Verbindungen beteiligt (Claus et al. 1990).

Die Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität der Tyrosinase ist des Weiteren die Grundlage für verschiedene biotechnologische Anwendungen, wie zum Beispiel die für die Umwelt wichtige Entgiftung phenolhaltiger Abwasser (Atlow et al. 1984) und kontaminierter Böden. In der pharmazeutischen Industrie wird die Tyrosinase unter anderem für die Herstellung von *o*-Diphenolen

(z.B. L-Dopa, Dopamin) zur Behandlung von Morbus-Parkinson (Carvalho et al. 2000) und anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Asanuma et al. 2003, Hasegawa 2010) eingesetzt. Ebenso finden Tyrosinasen breite Anwendungen in der Lebensmittel- (Thalman und Lötzbeyer, 2002) und Kosmetikindustrie, wo sie primäre Ziele der Hemmung von oxidativen Bräunungsreaktionen sind. Darunter fallen beispielsweise die Haarfärbung, sowie die altersbedingte Graufärbung der Haare, welche durch fehlende Pigmentbildung verursacht wird (Wood et al. 2009).

1.2 Die diverse Familie der Tyrosinasen und die Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202

Die Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 ist als bakterielle Tyrosinase nicht membranständig, sondern befindet sich als globuläres Protein im Cytosol. Die Besonderheit der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* ist ein assoziiertes Hilfsprotein (ORF378, oder Caddie-Protein genannt)(Ikeda et al. 1996), welches im gleichen Operon zu finden ist (siehe Abb. 1.2). Die Funktion des Hilfsproteins ist kontrovers diskutiert. Neben der Funktion als Faltungshelfer wurde vor allem die mögliche Rolle beim Kupfereinbau in das aktive Zentrum der Tyrosinase diskutiert (Chen et al. 1992; Claus und Decker, 2006; Matoba et al. 2006). Eine weitere wahrscheinliche Aufgabe des Hilfsproteins ist der Transport des Tyrosinasekomplexes über die Cytoplasmamembran, da es sich bei der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* um ein extrazelluläres Protein handelt. Die Tyrosinase selbst besitzt jedoch keine Signalsequenz, das Hilfsprotein hingegen schon (Claus und Decker, 2006; Claus, 2010). Das Hilfsprotein bildet zusammen mit der Tyrosinase einen inaktiven binären Komplex (Matoba et al. 2006; Decker et al. 2006). Diese spezielle Komplexbildung von Tyrosinasen ist nur bei *Streptomyces*-Tyrosinasen zu finden. So besitzen ausschließlich Tyrosinasen der *Streptomyces* Stämme sogenannte Hilfsproteine (siehe Abb. 1.2), welche wahrscheinlich ähnliche Komplexe bilden wie das Hilfsprotein ORF378 mit der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*.

Das Vorkommen von Hilfsproteinen an *Streptomyces*-Tyrosinasen erscheint nicht zwingend notwendig, wie man anhand der Sequenz der Tyrosinase aus *Streptomyces avermitilis* (Ikeda et al. 2003) sieht (Abb. 1.2 b). Neben Tyrosinasen, welche wie *S.castaneoglobisporus* zusätzliche Hilfsproteine besitzen, gibt es also etliche Beispiele für Tyrosinasen, welche deutlich kürzere aber teilweise zu ORF378 homologe Sequenzbereiche besitzen (Sequenzalignment verschiedener ORF aus *Streptomyces*, siehe Kap. 4.9, Abb. 4.26). Die Tyrosinase aus *Corynebacterium efficiens* YS-314 (Muzny et al. 2009) besitzt hingegen eine ähnliche Größe, sowie eine teilweise konservierte Aminosäuresequenz, die den Einschluss des Hilfsproteins vermuten lässt. Ebenso ist dies der Fall bei der Tyrosinase aus der Maus, welche zusätzlich N-terminale membrangebundene Bereiche

besitzt, welche in bakteriellen Tyrosinasen nicht vorhanden sind. Tyrosinasen von Säugern sind jedoch separat zu betrachten, da sie im funktionellen Zustand zu Tetrameren oligomerisieren (Garcia-Borron *et al.* 1985, Khan *et al.* 1984).

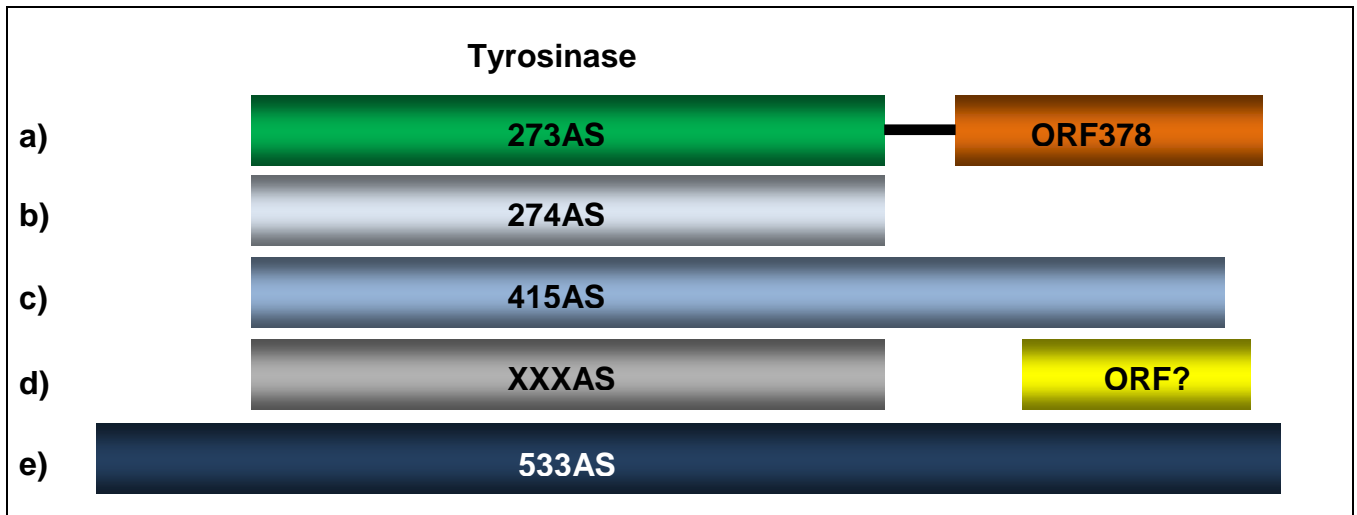


Abbildung 1.2: Genomische Struktur verschiedener Tyrosinasen ausgewählter Organismen. a) Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 (grün) mit Hilfsprotein ORF378 (orange); b) Tyrosinase aus *Streptomyces avermitilis* (grau); c) Tyrosinase aus *Corynebacterium efficiens* YS-314 (grau-blau); d) Tyrosinasen aus diversen Bakterien besitzen zusätzlich zum *tyrosinase*-Gen noch homologe Abschnitte des *orf378* aus *S.castaneoglobisporus* (gelb) wie beispielsweise aus *Streptomyces sviveus* ATCC 29083; e) Tyrosinase aus der Maus (*Mus Musculus*, dunkelblau).

Abbildung 1.2 zeigt die höchst diversen genomischen Strukturen von Tyrosinasen verschiedener Organismen. Als gemeinsames Merkmal besitzen alle Tyrosinasen – von Bakterien bis hin zu Säugetieren - einen auf Ebene der Proteinsequenz schwach konservierten Teil um das aktive Zentrum des Enzyms, sowie das das aktive Zentrum umgebende Milieu des Proteins. Dieser Bereich äußert sich jedoch strukturell in einem konservierten 4 α -Helix-Bündel (Magnus *et al.*, 1994, Cuff *et al.* 1998, Matoba *et al.* 2006, Li *et al.* 2009, Virador *et al.* 2010) (siehe Abb. 1.3). Die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums sowie der umgebenden Struktur motive ist maßgeblich für die Funktionalität der Tyrosinase, welche sich ursprünglich wahrscheinlich zusammen mit den Hämocyaninen aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein mit einem mononuklearen Kupferzentrum entwickelt hat (Jaenicke und Decker, 2004).

Strukturell ist die Tyrosinase ein Typ-3-Kupferprotein und besitzt als solches ein Typ-3-Kupferzentrum. Dies besteht aus 2 Kupferatomen, welche von jeweils 3 Histidinen koordiniert werden. Abbildung 1.3 b) zeigt, dass alle Typ-3-Kupferproteine einen strukturell hochgradig

konservierten Aufbau des aktiven Zentrums sowie dessen Umgebung, bestehend aus 4 α -Helices, besitzen (siehe auch Kap.5.4 Abb.5.1). Das aktive Zentrum setzt sich aus zwei Kupferionen (CuA und CuB) zusammen, welche von jeweils drei Histidinen koordiniert werden und molekularen Sauerstoff in einer *side-on*-Koordination binden können. Das bedeutet, dass jedes Kupferatom (CuA und CuB) des aktiven Zentrums jeweils jedes Sauerstoffatom mit bindet (Decker et al. 2000).

Trotz der zahlreichen enzymatischen, spektroskopischen und strukturellen Studien, die zur Untersuchung von Tyrosinasen durchgeführt wurden, ist der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme immer noch nicht vollständig aufgeklärt (Vanneste und Zuberbühler, 1974; Wilcox et al. 1985; Cabanes et al. 1987; Sanchez-Ferrer et al. 1995). Die gelöste Kristallstruktur aus *Streptomyces castaneoglobisporus* von Matoba et al. (2006) ließ es nicht zu, eine klare Aussage über den Reaktionsmechanismus des Proteins zu treffen. In Abbildung 1.3 a) ist das aktive Zentrum der Tyrosinase mit koordinierten Kupferatomen und dem *side-on* gebundenen Sauerstoff gezeigt.

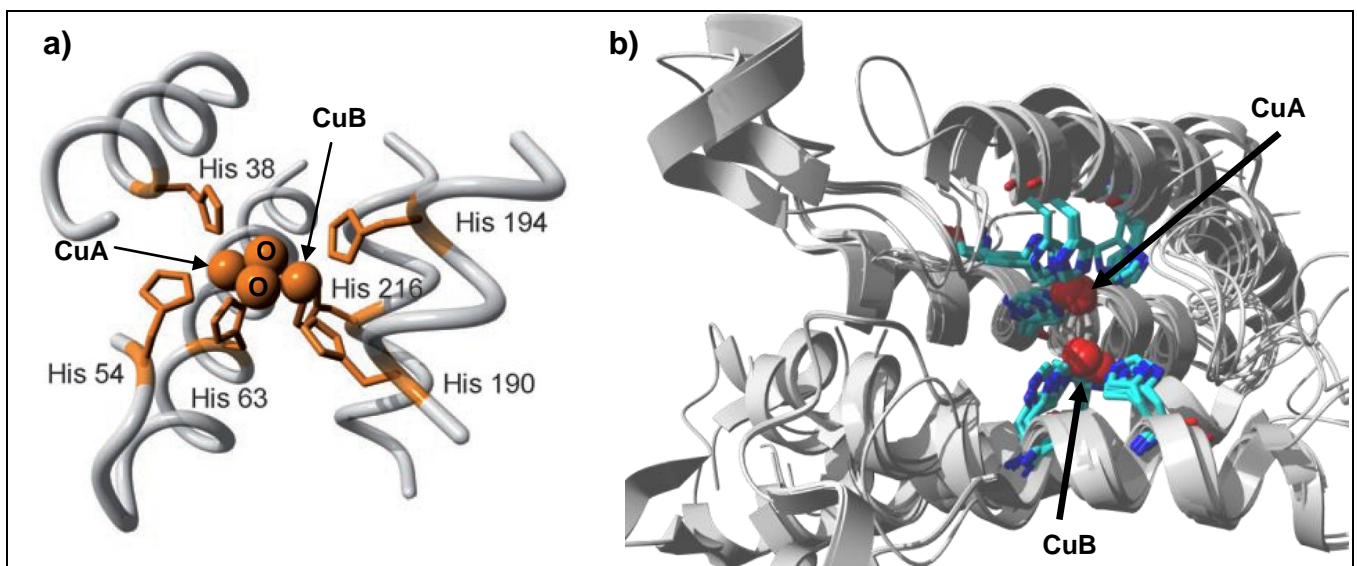


Abbildung 1.3: a) Aktives Zentrum der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* in der oxy-Form (modifiziert nach Decker et al. 2006). Die beiden Kupferionen (orange spacefill) werden jeweils von drei Histidinen koordiniert. Über die beiden Kupferatome ist molekularer Sauerstoff (orange spacefill mittig) in einer *side-on*-Koordination gebunden. b) Strukturüberlagerung der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* (1WX4), Catecholoxidase aus *I. batatas* (1BUG), *Octopus polyphemus* Hämocyanin (1JS8), *Limulus polyphemus* Hämocyanin (1OXY), sowie den modellierten Hämocyanin-Strukturen der Untereinheiten A, B, C aus *Eurypelma californicum*. Deutlich zu erkennen ist, dass die 4 α -Helix-Bündel, welche das aktive Zentrum aller Typ-3-Kupferproteine umgeben, sowie die Kupfer-koordinierenden Histidine ohne große Abweichung überlagert werden können.

Die Besonderheit der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 ist, dass es sich dabei um ein monomeres, lösliches Protein handelt. Auf Grund dessen ist die Untersuchung der Struktur und Funktion einfacher als beispielsweise bei der menschlichen Tyrosinase, welche als membrangebundenes Tetramer vorliegt. Das aktive Zentrum sowie das umgebende 4 α -Helix-Bündel

sind in der bakteriellen und menschlichen Tyrosinase gleich aufgebaut (Schweikardt *et al.* 2007), weshalb die biochemischen Eigenschaften und Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus vergleichbar sein sollten.

Wie bereits vorangehend erwähnt handelt es sich bei der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* um einen Proteinkomplex, bestehend aus der Tyrosinase selbst sowie einem assoziierten Hilfsprotein (ORF378). Bei nahezu allen bekannten Typ-3-Kupferproteinen ist der Zugang zum zweikernigen Kupferzentrum durch einen Aminosäurerest (meist ein Phenylalanin) blockiert, der für die Enzymaktivierung entfernt werden muss (Decker *et al.* 2000; Decker *et al.* 2007). Im Falle der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* stellt jedoch das assoziierte Hilfsprotein ein Tyrosin (Y98), welches in die Bindungstasche der Tyrosinase ragt und diese – wenn im Komplex gebunden – blockiert (Matoba *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass bei der Aktivierung des Enzyms der binäre Komplex dissoziiert und die Bindetasche dadurch freigelegt wird (Decker *et al.* 2006). Der Mechanismus der Tyrosinase-Aktivierung bzw. Abspaltung des Hilfsproteins wurde bislang noch nicht hinreichend untersucht bzw. dokumentiert.

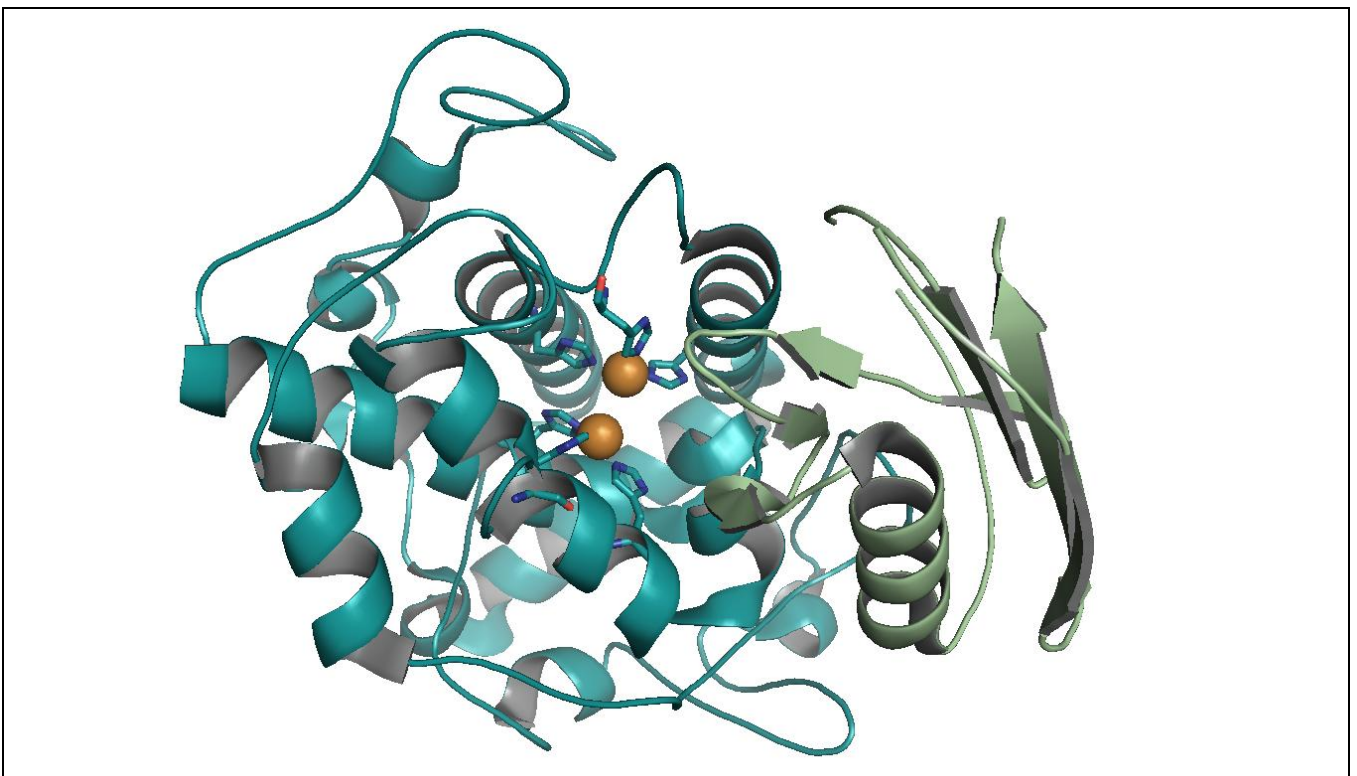


Abbildung 1.4: Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 (cyan) im Komplex mit dem Hilfsprotein ORF378 (grün). Die Proteine sind in der *Ribbon*-Darstellung gezeigt, die Kupferatome in orange in der *Spacefill*-Darstellung, die Kupfer koordinierenden Histidine sind in der *Stick*-Darstellung gezeigt. Im Komplex mit dem Hilfsprotein blockiert dieses den Zugang zum aktiven Zentrum.

Bisherige experimentelle Untersuchungen veranlassten zu der Hypothese, dass eine Dissoziation des Hilfsproteins von der Tyrosinase nach Zugabe von 5 μM Kupfersulfat (CuSO_4), erfolgt (Leu et al. 1992; Chen et al. 1992). Jedoch ist dieser Mechanismus unbewiesen und der physiologische Grund für diesen Reaktionsmechanismus ist unklar. Die verwendeten Konzentrationen an Kupfersulfat überstiegen bei den Versuchen bei weitem jede physiologisch vorkommende Konzentration, die das im Boden lebende *Streptomyces*-Bakterium antreffen könnte. Dies lässt die Frage nach dem physiologischen Faktor für den vorgeschlagenen Dissoziationsmechanismus offen.

1.3 Reaktionsmechanismus der Tyrosinase und Melanogenese

Basierend auf bisherigen Modellen, die zum katalytischen Mechanismus der Tyrosinasen entwickelt worden sind (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 2002), wurde kürzlich anhand auf der von Matoba *et al.* (2006) gelösten Kristallstruktur ein neues Modell zur Katalyse von monophenolischen Substraten vorgeschlagen (Decker et al. 2006). Dieses Modell muss jedoch noch experimentell bestätigt werden.

In Abbildung 1.1 und 1.5 ist der postulierte Reaktionsmechanismus der Tyrosinase nach Decker et al. (2006) gezeigt. Dieser zeigt das Zweikernige Kupferzentrum (CuA und CuB), welches molekularen Sauerstoff in einer *side-on*-Koordination bindet. Das monophenolische Substrat, welches analog zum Tyr98 des Hilfsproteins aus *S.castaneoglobisporus* orientiert ist, wird durch Stapelkräfte zwischen His194 und dem Substrat in Position gehalten (Abb.1.5).

Das aktive Zentrum bindet molekularen Sauerstoff und nimmt während der Reaktionskatalyse verschiedene funktionelle Zustände an. Dies ist zunächst der Deoxy-Zustand $[\text{Cu(I)}-\text{Cu(I)}]$ – die reduzierte Form, die molekularen Sauerstoff bindet, wodurch anschließend der Oxy-Zustand $[\text{Cu(II)}-\text{O}_2^{2-}-\text{Cu(II)}]$ entsteht (Metz et al. 2001; Tuczec et al. 2009). Im Oxy-Zustand bildet der Sauerstoff zwischen zwei Kupferatomen eine Peroxid-Bindung in einer $\mu-\eta^2:\eta^2$ -Anordnung (Cuff et al. 1998; Matoba et al. 2006). Diese Anordnung destabilisiert und aktiviert die Peroxid-Bindung. Weitere funktionelle Zustände des Proteins sind der *Halb-Met*-Zustand $[\text{Cu(I)}-\text{Cu(II)}]$, und der *Met*-Zustand $[\text{Cu(II)}-\text{OH}-\text{Cu(II)}]$, der vermutlich die ruhende Form des Proteins darstellt, hier sind die Cu(II)-Ionen durch ein H_2O -Molekül oder ein OH^- Ion überbrückt. Der *Met*- und der *Oxy*-Zustand der Tyrosinase ermöglichen die Diphenoloxidase-Aktivität, während für die Monohydroxylase-Aktivität der *Oxy*-Zustand benötigt wird (Decker et al. 2006; Matoba et al. 2006; Tuczec et al. 2009).

Nachdem das Substrat weiter in die Bindetasche geschoben wird, erfolgt ein 'Flip' des Sauerstoffs, wodurch sich dieser um seine Achse rotiert und sich nach dem phenolischen Ring des Substrates ausrichtet. Dies ermöglicht den elektrophilen Angriff des Cu_2O_2 Restes auf den aromatischen Ring, wobei parallel die Bindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen gespalten wird (Ross und Solomon, 1991; Solomon et al. 1994; Decker et al. 2006).

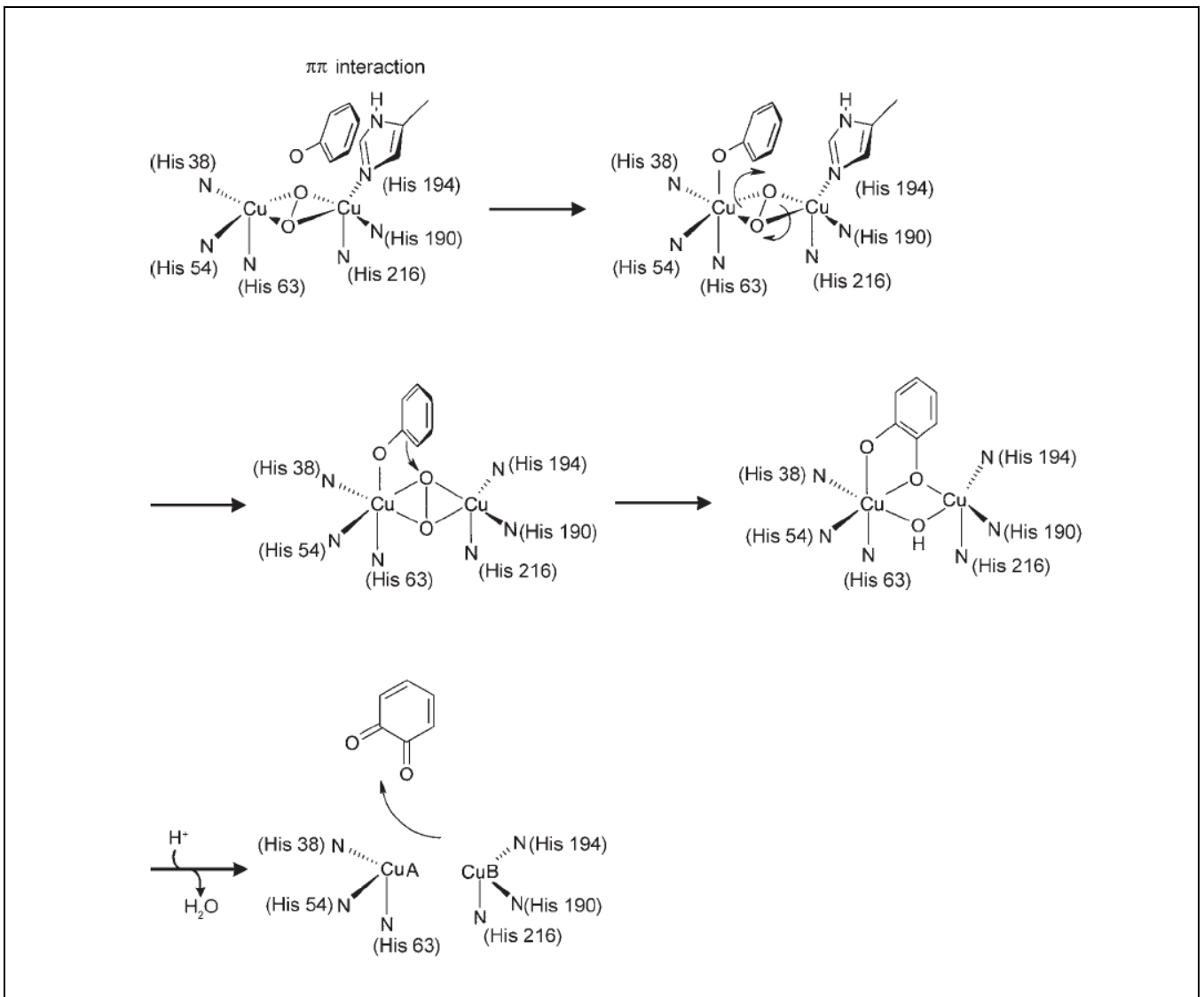


Abbildung 1.5: *ortho*-Hydroxylierung und anschließende Oxidation von Monophenolen durch Tyrosinasen. (Decker et al. 2006).

Die Bildung einer stabilen bidentaten Cresolase-Zwischenstufe mit dem CuA-Ion ist bei der Catecholoxidase sterisch durch Phe261 gehemmt (Klabunde et al. 1998). Aus diesem Grund weisen Catecholoxidasen keine monophenolase-Aktivität auf. Im Kupferzentrum der Catecholoxidase ist der axiale CuA-Ligand His109 durch eine Thioether-Bindung zwischen dem Histidin und dem Schwefelatom des Cys92 fixiert, wodurch die Bildung der bidentaten Zwischenstufe verhindert wird.

(Gerdemann et al. 2002). Das CuA Atom ist aus diesem Grund nur eingeschränkt zugänglich. Somit lassen sich die Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften der Tyrosinase und Catecholoxidase durch die Beweglichkeit der Konfiguration des CuA-Liganden His54 in Tyrosinase und die Unbeweglichkeit des CuA-Liganden His109 in Catecholoxidase erklären. Diese Beschränkung wird zusätzlich durch die direkt über dem CuA-Ion positionierte Seitenkette des Phe261, das bei der Catecholoxidase gefunden wurde, begünstigt (Klabunde et al. 1998). Im Gegensatz zur Catecholoxidase wird die Substratbindungstasche der Tyrosinase sowie der Zugang zum CuA Atom während der Reaktionskatalyse vollständig freigelegt, was einen freien Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum ermöglicht (Land et al. 2008; Claus und Decker, 2006). So gibt es in der Struktur der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* kein entsprechendes Phenylalanin zur sterischen Abschirmung des CuA-Atoms. (Decker et al. 2000).

Die Tyrosinase als Schlüssel-Enzym der Melanogenese katalysiert die geschwindigkeitsbestimmende *ortho*-Hydroxylierung von L-Tyrosin zu Dopa sowie die Oxidation von Dopa zu Dopachinon (Graham und Jeffs, 1977; Land et al. 2003). Bei Anwesenheit von Cystein sowie Glutathion reagiert Dopachinon weiter zu Cysteinyl-dopa und den Benzothiazine-Derivaten des Pheomelanin (Ebanks et al. 2009, Abb. 1.6).

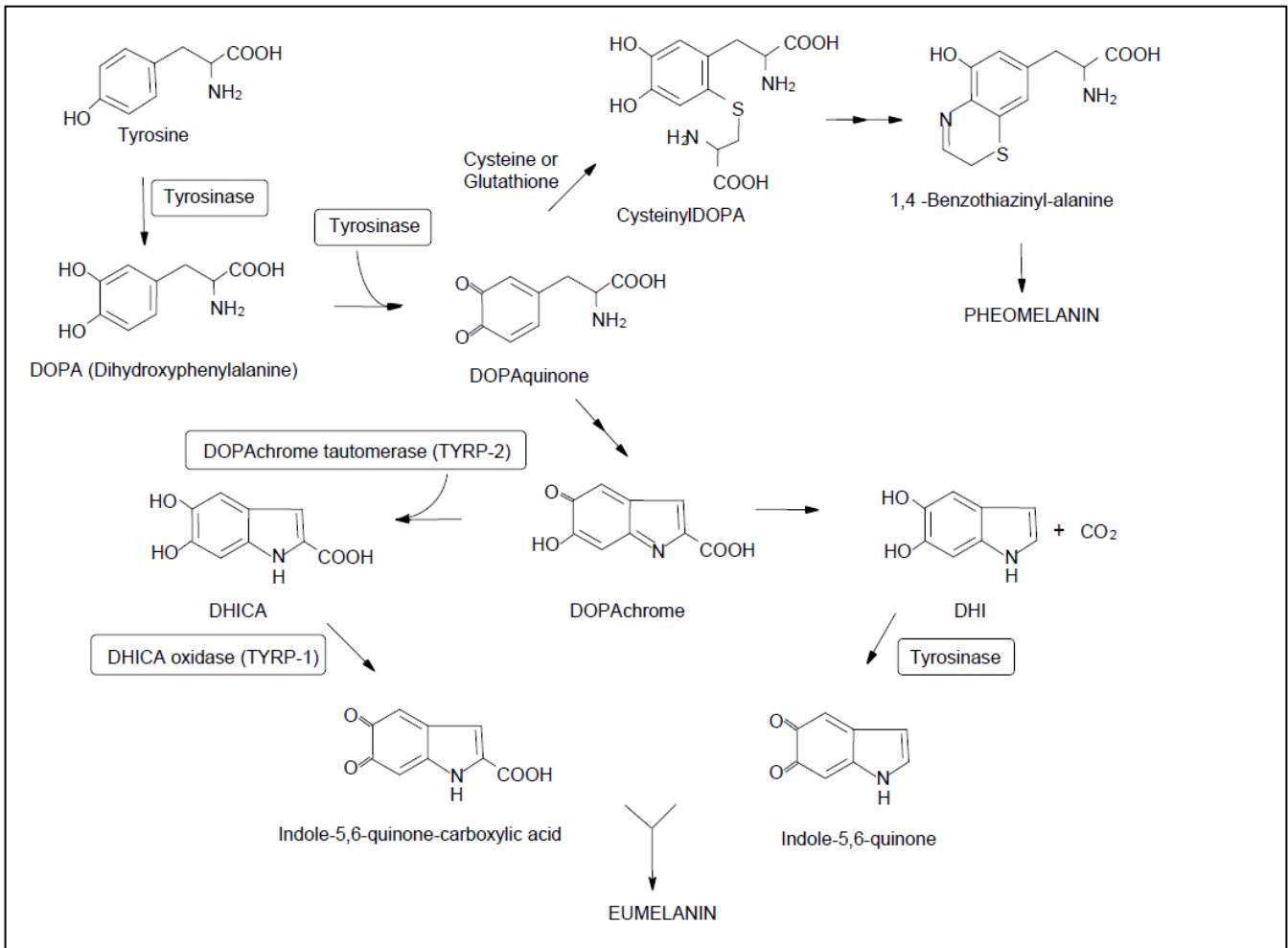


Abbildung 1.6: Prozess der Melanogenese. Bildung von Pheo- und Eumelanin in Säugeteieren durch Tyrosinase sowie *Tyrosinase-related-protein-1* (TYRP-1) und *Tyrosinase-related-protein-2* (TYRP-2) (Ebanks et. al. 2009).

In Säugetieren zyklisiert Cystein unter Abwesenheit von DOPachinon zu DOPachrom. In Säugern katalysiert TYRP-2 die Tautomerisation von DOPachrom zu 5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure (DHICA), welches folgend zu DHICA-Melanin Untereinheiten oxidiert wird. Es wird angenommen, dass die Oxidation von DHICA zu Eumelanin von TYRP-1 katalysiert wird (Ebanks et al. 2009; Abb.1.6).

Unter Abwesenheit von TYRP-2 wird der Carbonsäurerest des DOPachrom spontan bzw. autokatalytisch gespalten und es entsteht 5,6-Dihydroxyindole (DHI). DHICA bildet zusammen mit DHI Untereinheiten von Eumelanin (Ito et al. 2003; Yamaguchi et al. 2007).

1.4 Ziel der Arbeit

Die Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202* ist für biochemische und strukturelle Untersuchungen besonders gut geeignet, da sie als globuläres binäres Protein vorliegt. Als bakterielles Protein lässt sich die Tyrosinase aus *Streptomyces* in einen *E.coli*-Expressionsstamm klonieren und exprimieren.

Um den bislang hypothetischen Aktivierungsmechanismus der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202* zu untersuchen wurde geplant, den binären Tyrosinasekomplex, bestehend aus Tyrosinase und Hilfsprotein (ORF378) polycistronisch zu klonieren, heterolog in *E.coli* zu exprimieren und affinitätschromatographisch zu reinigen. Darauf aufbauend sollte der Komplex sowie seine monomeren Bestandteile biochemisch charakterisiert werden. Weiterführend wurde die enzymatische Untersuchung des Proteins vorgesehen. Es sollte geklärt werden, welche mono- bzw. dipehnolischen Substrate umgesetzt werden können, sowie die Untersuchung einer möglichen Substratspezifität.

Besonderer Schwerpunkt sollte die Frage nach der Aktivierung der Tyrosinase bzw. einer möglichen Dissoziation von Tyrosinase und Hilfsprotein (ORF378) sein, welche konkret überprüft werden sollte. Bis zu Beginn der Arbeit wurde eine Dissoziation des Komplexes als Bedingung für seine Aktivierung vorgeschlagen, konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden.

Als methodische Vorarbeit für die Kristallisation sollte der Tyrosinase-Komplex, bestehend aus Tyrosinase und Hilfsprotein, in großen Mengen exprimiert und gereinigt werden, um Kristallisationsansätze zu machen.

Basierend auf bereits existierenden Proteinstrukturen wurde beabsichtigt parallele bioinformatische Arbeiten durchzuführen um die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Katalyse zu identifizieren. Anhand der bereits vorhandenen Struktur der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* sollte eine mögliche substratspezifische Bindung an das aktive Zentrum der Tyrosinase mit Hilfe von Substratdocking untersucht werden. Moleküldynamik-Simulationen sollten Aufschluss über einen möglichen molekularen Aktivierungsmechanismus geben.

2 Material

Die verwendeten Materialien und Geräte sind nachfolgend tabellarisch zusammengefasst.

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Tabelle der verwendeten Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	pLysS	Institut für Molekulargenetik (Mainz)
<i>Streptomyces</i>	(genauer Stamm unbekannt)		Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN (Ibaraku, Japan)

2.2 Plasmide

Tabelle 2.2: Tabelle der verwendeten Plasmide

pET-21a(+)	Novagen
pET-21a(+) (<i>orf378+tyr aus S.casta.</i>)	GenScript

2.3 Primer

Tabelle 2.3: der verwendeten Primer

Mel_for	5'- CAC CAT ATG CCC GAG ATC ACC CGC CGC CGC -3'	Invitrogen
Mel_rev	5'- CAC CTC GAG GGC GTC GAA CGT GTA GTA GGC -3'	Invitrogen
Mel_for2	5'- CAC CAT ATG CCC GAG ATC ACC CGC C -3'	Invitrogen
Mel_rev2	5'- CCG TGT TCG TGG TGG TGC G -3'	Invitrogen
MycT_1_f	5'- GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)
MycT_1.1_r	5'- TAT TAC CGC GGC TGC TGG -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)
MycT_2.1_f	5'- GTG CAT GGT TGT CGT CAG -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)
MycT_2.2_r	5'- CCA TTG TAG CAC GTG TGT -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)
MycT_2_f	5'- CAG CAG CCG CGG TAA TAC -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)
MycT_2.1_r	5'- TGA CGA CAA CCA TGC ACC -3'	Institut für Molekulargenetik (Uni Mainz)

2.4 Enzyme

Tabelle 2.4: Tabelle der verwendeten Enzyme

<i>NdeI</i>	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Platinum Taq-DNA Polymerase	Invitrogen
TrueStart Taq-DNA Polymerase	Invitrogen
Alkalische Phosphatase	Roche
Tyrosinase (<i>Agaricus</i>)	AbD

2.5 Marker

Tabelle 2.5: Tabelle der verwendeten Marker

Precision Plus Dual color Standards	Biorad
Precision Plus unstained Standards	Biorad
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
250 bp DNA Leiter	Roth

2.6 Medien

Tabelle 2.6: Tabelle der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung	Menge
Glucose, Yeast, and Malt (GYM)		
	Glukose	4 g/l
	Hefeextrakt	4 g/l
	Malzextrakt	10 g/l
	Kalziumkarbonat (CaCO ₃)	2 g/l

Luria Bertani (LB)	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
Terrific Broth (TB)	Trypton	12,0 g/l
	Hefeextrakt	24,0 g/l
	Glycerin	4,0 ml/l
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2,13 g/l
	Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	12,54 g/l
2xYT	Trypton	16 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	5 g/l
Agarplatten	Agar	15 g/l (LB/GYM Med)
	Antibiotikum (Ampicillin / Chloramphenicol)	50 µg/ml / 100µg/ml

2.7 Antibiotika

Tabelle 2.7: Tabelle der verwendeten Antibiotika

Ampicillin	50 µg/ml	Roth
Chloramphenicol	50 µg/ml	Roth

2.8 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Biorad (München), Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt), Nord-Wald (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Greiner bio one (Kremsmuenster, Österreich), Gerbu (Garberg), Fermentas (St. Leon-Rot), Stratagene (La Jolla, USA) und Gradipore (Australia) verwendet.

2.9 Reagenzienkits

Tabelle 2.8: Tabelle der verwendeten Reagenzienkits

Kit	Firma
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
PureLink Genomic DNA Kit	Invitrogen
HighPure PCR Product Purification Kit	Roche
QIA prep Spin Miniprep Kit	Qiagen
GeneEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis System	Promega

2.10 Geräte

Tabelle 2.9: Tabelle der verwendeten Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Firma
Analytische Waage	excellence	Sartorius
Autoklave	3850 EL	Tuttnauer
Brutschrank Heraeus	Typ B6	Kendro
Sonifikator	SONOPLUS HD2200	Bandelin
CD-Photospektrometer	CD6	Jobin Yvon
Demineralisierungsanlage		Millipore
Elektroporator	EquiBio Easyject	Wolf Laboratories
Geldoc	2000	Biorad
Gelgießkammer	Mighty Small SE200 series	Hofer
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle		Bosch
Nanodrop	ND-1000	Peqlab
PAGE-Apparatur	Mighty Small SE250/SE260	Hofer
pH-Meter	766 Calimax	Knick
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
Spektrophotometer	U-3000	Hitachi
Powersupply	Power Pac 300	Biorqad
Schüttler	Centromat	Braun Biotech International
Ultraschallgerät	SUPER RK102P	Sonorex
Ultrazentrifuge	Optima L-70K	Beckman

UV-Lampe		MWG Biotech
Wasserbad	Julabo U3	Julabo
Zentrifuge	Avanti J-30 I	Beckman
Zentrifuge	Universal 32 R	Hettich
Zentrifuge	Z 233 MK-2	Hermke
Zetasizer	Nano-ZS	Malvern Instruments

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Gefäße, Medien und Lösungen bei 121°C und 1bar Überdruck autoklaviert. Bei hitzeempfindlichen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration (Porendurchmesser 0,22 µm).

3.1.2 DNA Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces castaneoglobisporus* wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben nach den Protokollen *Pretreatment for Gram-positive Bacteria* sowie *Purification of Total DNA from Animal Tissues*. Eine erneute Reinigung der extrahierten DNA erfolgte mittels des PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen).

3.1.3 Design von Oligonukleotiden

Zur Amplifikation ausgewählter DNA Abschnitte wurden Oligonukleotide designt, welche sich am 3'-Ende bzw. 5'-Ende des cDNA-Templates anlagern und dessen Amplifikation durch PCR ermöglichen. Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden mit Hilfe der „OligoCalc“ (Oligo Calc, Lurie, 2007) Onlineanwendung berechnet (Liste der erstellten Oligonukleotide siehe Material).

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Segmenten erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion. Über die 5'- und 3'- flankierenden Oligonukleotide wurden Restriktionsschnittstellen eingefügt. Dies ermöglichte die spezifische Integration in den Expressionsvektor. Zur Amplifikation wurde neben verschiedenen *Taq*-Polymerasen (Invitrogen) die *Pfu*-Polymerase (Stratagene) verwendet, da sie keine 3'-Terminale Transferase-Aktivität besitzt, eine hohe Polymerisations- und eine niedrige Fehlerrate aufweist.

Für die PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden speziell geeignete PCR-Programme geschrieben. Diese bestanden aus fünf Schritten, beginnend mit einer Eingangsdenaturierung für vier Minuten und startet dann die insgesamt 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (Schritt 2), Primer Anlagerung (Schritt 3) und Elongation (Schritt 4). Nach einem einmaligen finalen Elongationsschritt (Schritt 5) erfolgte der Abschluss des Programms, indem die Proben bei 4°C gehalten wurden (Schritt 6).

PCR Ansatz		PCR Programm		
Volumen	Reagenzien	Schritt	Temperatur	Zeit
3 µl	DNA	1.	94 °C	4:00 min
4 µl	dNTP's (2mM jeweils)	2.	94 °C	1:00 min
5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	3.	65 °C	1:00 min
5 µl	Oligo 1	4.	72 °C	2:00 min
5 µl	Oligo 2	5.	72 °C	10:00 min
1 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase	6.	4 °C	∞
27 µl	Aqua dest.			
50 µl	Gesamtvolumen			

} x 40

Die Anlagerungstemperatur kann stark variieren und ist von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer abhängig. Um die entsprechende Anlagerungstemperatur zu berechnen wurde die von Thein et al. (1986) etablierte Formel verwendet:

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Um eine spezifische und effiziente Amplifikation der Zielsequenz zu erreichen, wurden die Anlagerungstemperaturen für die Primer sowie die Polymeraseschritte variiert sowie die finale Elongationszeit und -temperatur verändert (Primersequenzen siehe Materialien).

Um die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA aus *S.castaneoglobisporus* zu testen wurden PCR-Ansätze mit *Myc-Primern* angesetzt (Primersequenzen siehe Materialien), welche die 16 S ribosomale DNA von Bakterien amplifizieren. Hier wurde eine Anlagerungstemperatur von 58 °C gewählt. Der PCR-Ansatz blieb unverändert.

3.1.5 Restriktion und Ligation von DNA

Für die sequenzspezifische Spaltung von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* verwendet. In der Regel wurde mit einem Ligationsansatz von 10 µl gearbeitet. Es wurden 50-100 ng DNA eingesetzt, wobei das molare Verhältnis von Vektor und Insert 1:2 betrug. Für alle Ligationsschritte wurde die T4-DNA Ligase verwendet. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich aus dem jeweils zuvor mit Restriktions- Endonukleasen geschnittenen Vektor, Insert, Ligase-Puffer, H₂O und der T4-DNA Ligase zusammen. Die Ligationsansätze wurden für eine Stunde bei 18 °C inkubiert und anschließend für die Transformation eingesetzt.

3.1.6 Transformation durch Elektroporation

Ein Transformationsansatz umfasste jeweils 1 µl Ligationsansatz sowie 50 µl elektrisch kompetente *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen. Vor der Transformation wurden die verwendeten Küvetten zirka 30 min unter UV-Licht sterilisiert. Für die Transformation wurden die *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10-500 ng Plasmid DNA für 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation (Equi Bio Easyject) erfolgte mit 2500 V für 30 Sekunden. Anschließend wurden unverzüglich 300 µl LB-Medium zum Ansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum (Ampicillin [50 µg/ml] / Chloramphenikol [100 µg/ml]) ausplattiert. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.1.7 Plasmid-Isolierung

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um kleine Mengen von Plasmid DNA zu erhalten, wurden *E.coli* Kulturen in 2 ml LB-Medium angesetzt und über Nacht kultiviert. Nach Abzentrifugation und Lyse des Zellpellets in SDS-haltigem Puffer, wurde das Lysat in eine NukleoSpin-Säule mit einer Silica-Membran transferiert. Das im Ladepuffer enthaltene chaotrope Salz zerstört die Hydrathülle der Plasmid DNA, was dessen Bindung an die Membran erlaubt. Nach dem Entfernen von Kontaminationen durch mehrere Waschschrte wird die Plasmid DNA mit Wasser oder Tris-Puffer pH 8,0 eluiert. Das gereinigte Plasmid kann für Restriktionsanalysen, PCR, Sequenzierung sowie andere molekularbiologische Methoden verwendet werden.

3.1.8 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten generell nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1975, Sanger et al. 1992). Die Methode beruht auf dem „Cycle-Sequencing“-Verfahren nach der „BigDye“-Terminator-Methode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden und AmpliTaq-Polymerase (Applied Biosystems, Langen).

Die Sequenzierung gereinigter und in Vektoren inkorporierter DNA wurde von der Firma GENterprise Genomics (Mainz) durchgeführt.

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung und Visualisierung von DNA-Proben wurde Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Die auf das Agarosegel aufgetragenen DNA Proben werden der Größe nach getrennt. Dies wird erreicht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, in welchem sich die auf Grund ihres Phosphatrückgrats negativ geladene DNA zur Anode bewegt. Dabei bewegen sich die DNA-Moleküle durch die Agarose-Matrix, wobei die Migrationsgeschwindigkeit durch die Länge und Konformation der DNA, sowie die Agarosekonzentration des Gels, die Spannung und den Laufpuffer bestimmt wird.

Agarose Gelelektrophorese kann für die Trennung von DNA Molekülen von 50 Basenpaaren (Bp) bis zu 20.000 Bp verwendet werden, wobei die Agarose Konzentration (w/v) zwischen 0,8 % und 1,5 % liegt. Für die verwendete gelelektrophoretische Auftrennung wurden 1,2 %ige Agarose-Gele gegossen. Die Gele wurden bei 40-80 V laufen gelassen. Zur Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit Ladepuffer versetzt, welcher die spätere Sedimentation in der Geltasche sowie bei der Auswertung eine Visualisierung unter UV-Licht ermöglicht. Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer verwendet. Für die Visualisierung unter UV-Licht wurde Ethidiumbromid (EtBr) verwendet.

Tabelle 3.1: Agarose Gelelektrophoresepuffer

10x TAE-Laufpuffer	40 mM Tris, 4 mM EDTA, 40 mM Essigsäure
10x Probenpuffer	50 % v/v Glycerol, 0,4 % w/v Bromphenolblau, 0,4 % v/v Xylencyanol

3.1.10 Gel-Extraktion

Nach erfolgreicher Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *QIA quick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gereinigt. Die im Kit enthaltenen Säulen besitzen eine Silica-Membran, welche die DNA bindet. Es lassen sich folgend Kontaminationen wie Salze und lösliche makromolekulare Komponenten durch Waschschrirte mit Ethanol enthaltendem Puffer entfernen. Die gereinigte DNA wird schließlich mit Wasser oder leicht alkalischem Puffer (5 mM Tris, pH 8,5) eluiert.

3.1.11 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande unter UV-VIS aus dem Gel geschnitten. Die anschließende Reinigung erfolgte mit Hilfe des „*High pure PCR Product Purification Kits*“ (Roche). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT 6202

Die Kultivierung von *Streptomyces* Bakterien erfolgte in GyM-Medium. Die Aufzucht erfolgte auf GYM-Agarplatten bei 28 °C über einen Zeitraum von 7 Tagen. In dieser Zeit bildete sich ein weißes Mycel, welches genug Sporen für die Inokulierung von 100-500 ml Flüssigmedium enthielt. Das Mycel wurde mit Wasser abgespült und zur Animpfung der Flüssigkultur verwendet. Die Kultivierung in GYM-Flüssigmedium erfolgte ebenfalls bei 28 °C, 160 rpm über einen Zeitraum von 3-7 Tagen.

3.2.2 Überexpression von Tyrosinase und ORF378 im Komplex

Die Kultivierung von *E.coli* Bakterien, die das jeweilige rekombinante Plasmid zur Expression von *Tyrosinase* und *orf378* aus *S.castaneoglobisporus* enthielten, erfolgte in LB-, TB-, und 2xYT Medium, sowie auf Agarplatten. Zur Anzucht auf Agarplatten wurden entsprechende *E.coli*-Zellen ausgestrichen. Nach zirka 7 h bei 37 °C wurde eine isolierte Kolonie gepickt und eine 100 ml Vorkultur mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Chloramphenikol angesetzt. Diese wurde bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Hauptkultur wurde in 2 L Erlenmeyer-Schikane-Kolben mit jeweils 1 L Medium und 50 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Chloramphenikol angesetzt und mit 10 ml

Vorkultur angeimpft. Beim Erreichen einer OD_{600} von 1-2 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Zugabe von IPTG aktiviert den T7-Promotor, damit die Transkription des im Plasmid enthaltenen Lac-Operons und damit die Expression der Zielproteine. Die Proteinexpression erfolgte im Schüttler bei 20 °C, sowie 28 °C über verschiedene Zeiträume. Es wurden Expressionszeiten zwischen 4, 6 und 8 h bei 28 °C, sowie 18, 20 und 22 h bei 20 °C getestet.

3.2.3 Herstellung von Glycerin-Stocks

Glycerin-Stocks zur dauerhaften Lagerung von Mikroorganismen wurden sowohl für *Streptomyces*-, als auch *E.coli*-Kulturen angelegt. Dabei wurden 770 μ l Zellkultur bzw. Sporensuspension mit 330 μ l Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4 Zellernte und Zellaufschluss

Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C mit 4.200 rpm in einer Beckman Optima L-70K Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit Zellaufschlusspuffer versetzt und mit einem Potter homogenisiert. Um die Spaltung des Proteins durch Proteasen einzuschränken, wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte im Sonifikator. Dieser zerstört die Zellen durch Ultraschallimpulse. Die gewählten Einstellungen für den Aufschluss von *E.coli* BL21-Zellen waren 20 min bei 0,5 s Puls, 70 % Amplitude. Der verwendete Zellysepuffer enthielt 20 mM Tris pH 7,9, 500 mM NaCl und 5 mM Imidazol. Das aufgeschlossene Zellmaterial wurde für 60 min bei 4 °C und 12.000 rpm abzentrifugiert. Dabei sammeln sich die nicht aufgeschlossenen Zellen sowie Zelltrümmer im Pellet, welches im folgenden Schritt verworfen wird. Der Überstand wurde zur Affinitätschromatographischen Reinigung verwendet.

3.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die angewandte Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht auf der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Durch chemische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Crosslinker, N, N'-Methylenbisacrylamid, erhält man ein klares, stabiles Gel. APS (Ammoniumperoxosulfat) dient dabei als Radikalbildner und TEMED (Tetraethylmethyldiamin) als Katalysator. Durch die Zugabe dieser beiden Reagenzien wird die Polymerisierung eingeleitet. Die Porengröße wird durch die Acrylamidkonzentration definiert. Die Proteine in den Proben wurden mit SDS-Laufpuffer denaturiert und danach direkt in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 40 mA und

Raumtemperatur in einer BioRad-Gelelektrophoreseapparatur durchgeführt. Als Laufpuffer diene 1x SDS-Puffer.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Polyacrylamid Gele. Angabe im ml/Gel

Komponente	5 %iges Sammelgel	12 %iges Trenngel	15 %iges Trenngel
H ₂ O	0,68 ml	1,6 ml	1,1 ml
30% Acrylamid-Bisacryl- Amid Mix	0,17 ml	2,0 ml	2,5 ml
1.5M Tris pH 8.8	0,13 ml (pH 6.8)	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml	0,002 ml

Tabelle 3.3: SDS-PAGE Puffer

10x SDS-Puffer	25 mM Tris pH 7,0, 200 mM Glycin, 0,1 % w/v SDS
4x Probenpuffer	25 mM Tris pH 8,0, 2,5 % w/v SDS, 2.5 % w/v Mercaptoethanol, 12,5 % w/v Glyzerin, 0,4 % Bromphenolblau

3.2.6 Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Blue Native PAGE*)

Bei der Nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden native (gefaltete) Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Wichtig bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen ist einerseits, dass die physiologischen Eigenschaften der Proteine erhalten bleiben, um deren Konformationen aufzeigen zu können. Um dies zu bewerkstelligen, ist ein geeignetes Puffersystem, welches die gefaltete Proteinstruktur in ihrer Stabilität und Aktivität (z.B. Zugabe von Nukleotiden) unterstützt, erforderlich. Andererseits, um die Proteine in ihrer gefalteten Struktur zu halten, muss die Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter einer konstanten Kühlung (4 °C) ablaufen, da sonst die Wärme, die bei der Elektrophorese entsteht, die Proteine denaturieren würde. Die Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist auf die Eigenladung der Proteine

angewiesen, im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der die Proteine denaturiert und deren Eigenladung durch negative Ladungen überdeckt wird. Der Kathodenpuffer wurde in die vertikale, der Anodenpuffer in die untere horizontale Gelkammer gefüllt. Als Marker wurde ein Hämocyanin-Untereinheitengemisch aus *Eurypelma californicum* sowie der Serva Liquid Mix 3-10 Marker verwendet.

Die jeweilige Proteinprobe (ca. 4 – 5 µg Protein) wurde mit 5 µl Probenauftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief erst 30 min bei 80 V und anschließend ca. 4 Stunden bei 200 V. Zum anschließenden Fixieren und Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in Entfärberlösung (10 % Essigsäure, 10 % Ethanol) inkubiert. Je nach Intensität der Proteinbanden wurde das entfärbte Gel mittels Coomassie- oder Silberfärbung angefärbt.

Tabelle 3.4: Puffer für die native Gelelektrophorese

Anodenpuffer	50 mM BisTris pH 7,0
Kathodenpuffer	15 mM BisTris pH 7,0, 50 mM Trizine, 0,02 % w/v Coomassie G-250
10x Probenpuffer	100 mM BisTris pH 7,0, 10 % v/v Glycerin, 5 % w/v Coomassie G-250

3.2.7 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Technik zur Fraktionierung amphoterer Moleküle, wie z. B. Proteine und Peptide, auf der Basis ihrer Nettoladung (Awdeh et. al. 1968; Wellner et al. 1973). Die IEF lässt sich als Elektrophorese in einem pH-Gradienten beschreiben, in dem zwitterionische Makromoleküle nur bis zu einem bestimmten pH-Wert, ihrem isoelektrischen Punkt wandern. Am isoelektrischen Punkt (pI) liegt das native Protein mit gleicher Anzahl positiver und negativer Ladungen vor. Die Nettoladung beträgt Null und in einem elektrischen Feld ist folglich keine Wanderung möglich. Entfernt sich das Protein infolge von Diffusion von seinem pI, erhält es unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wieder eine Ladung und kehrt zum pI zurück, es fokussiert. Mit der IEF können Proteine aufgetrennt werden, die sich in ihren isoelektrischen Punkten um weniger als 0,02 pH-Einheiten unterscheiden (Garfin, 1990).

Der pH-Gradient wird mittels kommerziell erhältlichen synthetischen Trägerampholyten mit aufeinander folgenden isoelektrischen Punkten hergestellt. Bei den Ampholyten handelt es sich um kleine, 300 - 600 Da große, geladene, amphotere Moleküle mit hoher Leitfähigkeit und hoher Pufferkapazität.

Die analytische IEF zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte von Tyrosinasen wurde mit gebrauchsfertigen Polyacrylamid-Gelen (Servalyt PreCoats, Serva, Heidelberg) von 0,3 mm Dicke in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Gele hatten ein Format von 125 x 125 mm. Das Gel wurde auf die mittels Tischkryostat auf 4 °C vorgekühlte Platte der Kammer luftblasenfrei aufgelegt und die beiden gleichmäßig mit Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit befeuchteten Elektrodendochte (Serva, Heidelberg) quer zur Längsachse auf das Gel gelegt. Der Applikatorstreifen wurde parallel zu den Elektrodendochten in der Mitte des Gels platziert. Die Proben wurden anschließend in die Taschen des Applikatorstreifens pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C für 3500 Voltstunden mit einer Anfangsspannung von >200 V und einem Spannungs-Limit von 1000 V. Verwendet wurde der IEF-Marker (Serva Liquid Mix 3-10, Serva, Heidelberg).

Anodenpuffer: Anodenlösung 3 (Serva, Heidelberg)

Kathodenpuffer: Kathodenlösung 10 (Serva, Heidelberg)

Marker-Protein	Isoelektrischer Punkt (pI)
Cytochrom C	10,7
Ribonuclease A	9,5
Lectin	8,3 / 8,0 / 7,8
Myoglobin	7,4 / 6,9
Carboanhydrase	6,0
β-Lactoglobulin	5,3 / 5,2
Trypsin-Inhibitor	4,5
Glucoseoxidase	4,2
Amyloglucosidase	3,5

3.2.8 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 17,5 %ige SDS-PAGE Gele nach Färbung mit Coomassie nach Kang, mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Verwendet wurde das Plugin „Mol Weight“ (PHASE, Lübeck), welches anhand der Abstände der Markerbänder zueinander das Molekulargewicht einer angefärbten Proteinbande berechnen kann. Die Berechnungen erfolgten jeweils für die Tyrosinase, sowie das Hilfsprotein ORF378.

3.2.9 Coomassie- und Silberfärbung von Polyacrylamid Gelen

Coomassiefärbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese in zirka 50 ml Entwicklungspuffer 1 gegeben und für 60 Sekunden auf der höchsten Stufe in der Mikrowelle erhitzt. Dieser Schritt bewirkt auf Grund des Wasserentzugs ein Schrumpfen des Gels. Eine folgende Inkubation auf dem Schüttler für 5-10 Minuten folgte. Folgend wurde der Puffer verworfen und zirka 50 ml Entwicklungspuffer 2 zum Gel gegeben. Zusätzlich wurde zirka 0,5-1 ml Coomassie Brilliant Blue G250 hinzugegeben. Der zweite Entwicklungspuffer bewirkt eine Volumenzunahme des Gels, wobei das Coomassie ebenfalls aufgenommen wird und mit den im Gel befindlichen Proteinen Komplexe bildet.

Tabelle 3.5: Puffer für die Coomassie Färbung

Coomassie Färber	0,25 % (w/v) Coomassie G250 in Ethanol
Entwicklungspuffer 1	50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entwicklungspuffer 2	5 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat-, und Cysteinresten der Proteine. Die Silberfärbung wurde nach Nesterenko (1994) durchgeführt. Hierzu wurde das Nativgel für 5 min in zirka 60 ml Fixierlösung (10 % Aceton, 1,5 ml 50 % TCA, 25 μl 37 % Formaldehyd) gegeben und anschließend drei Mal mit H_2O für wenige Sekunden gewaschen. Ein vierter Waschschrift mit H_2O für 5 min wurde außerdem vor der Vorbehandlung mit Azeton (5 min Inkubation) durchgeführt. Als zweiter Schritt der Vorbehandlung wurde das Gel mit Vorbehandlungspuffer (100 μl $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 60 ml H_2O) für 1 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit H_2O für je 5 Sekunden, wurde das Gel mit zirka 60 ml Silbernitratlösung (0,8 ml 20 % AgNO_3 , 0,6 ml 37 % CH_2O) für 8 Minuten inkubiert. Hierbei lagern sich die Silberionen an die Proteine an und überschüssiges Silber wird anschließend in einem Waschschrift mit Wasser entfernt. Danach wurde das Gel für etwa 2 min in 60 ml Entwicklerlösung (1,2 g Na_2CO_3 , 25 μl 37 % CH_2O , 25 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) leicht hin und her geschwenkt. Der Formaldehyd reduziert die Silberionen zu elementarem Silber, wodurch die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, schwarz gefärbt werden. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe einer 60 ml Stopplösung (1 % Eisessig).

3.2.10 Western Blot

Beim Western Blotting werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung zuerst gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der getrennten Mischung spezifisch ist. Das Blotting der aufgetrennten Proteine auf eine Membran bietet dabei den Vorteil, dass die Membran als Trägermatrix viel einfacher zu handhaben ist als ein Gel und die Proteine auf der Oberfläche der Membran immobilisiert sind. Bei der Membran handelt es sich um eine PVDF Membran aus Polyvinylidenelektrolyt. Diese wird vor Start des Blots in Methanol „aktiviert“. Dieser Schritt ist von Bedeutung, um die Hydrophobizität der Membran zu verringern und das Übertragen der Proteine von Gel auf die Membran zu erleichtern. Die PVDF Membran sowie auch die Filterpapiere wurden in Transfer-Puffer getränkt. Der Zusammenbau des „Blotting-Sandwiches“ erfolgte in folgender Reihenfolge, von unten nach oben (dabei wurde die Bildung von Luftblasen im „Sandwich“ vermieden):

- Extra dickes Filterpapier (Bio-Rad)
- Aktivierte PVDF-Membran (Porengröße, 0,45 µm, Millipore)
- Gel (10-18 % Acrylamid)
- Extra dickes Filterpapier (Bio-Rad)

Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 145 mA für 50 min in einer *semi-dry* Western-Apparatur (Bio-Rad). Nach dem Blotting wurde die Membran für 30-60 Minuten in Blockingpuffer (5 % Magermilchpulver in TBS) inkubiert und dann drei Mal für eine Minute in TBS-Puffer gewaschen. Des Weiteren wurde die Membran für mindestens eine Stunde mit einer 1:1000 anti-His Antikörperlösung (Monoclonal Anti-polyHistidine, Antikörper produziert in Maus, Sigma) in TBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver behandelt. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran nochmals drei Mal für eine Minute mit TBS gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit einer 1:10000 anti-Maus Antikörperlösung (mit alk. Phosphatase) [Anti-Maus IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase, Antikörper produziert in Kaninchen, Sigma] in TBS-Puffer behandelt wurde. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper, an welchen das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wurde die Membran drei Mal für eine Minute in TBS-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung der Signale wurde die Membran in Entwicklungslösung mit BCIP/NBP (Tabletten, Sigma) inkubiert und die Reaktion mit H₂O gestoppt nachdem Signale sichtbar wurden.

3.2.11 Affinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) wurde 1975 zum ersten Mal beschrieben, um Proteine zu reinigen (Porath et al., 1975). Die Methode beruht auf der Affinität funktioneller Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen (z.B. Histidin als Ligand) zu Metallionen (z.B. Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}). Die funktionellen Gruppen des Proteins binden an die zwei bzw. drei freien Koordinationsstellen des Metallions. Die Elution des so gebundenen Proteins erfolgt entweder durch Lewis-Basen (z.B. Imidazol), die eine höhere Affinität zu dem Metallion haben, oder durch Absenken des pH-Wertes. Dabei wirken die Protonen als stärkere Lewis-Säuren als die Metallionen. Die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen, die eine hohe Affinität zu Metallionen aufweisen, sind Histidinseitenketten. Um ein heterolog produziertes Protein mit hoher Effizienz reinigen zu können, kann durch C- oder N-terminale Fusion von Oligo-Histidinpeptiden (2-10 Histidine) eine zusätzliche Affinität zu Metallionen erzielt werden (Hochuli, 1988).

Zur Reinigung der Zielproteine wurde die affinitätschromatographische Nickel-NTA-Chromatographie (Sigma) verwendet, die bei 4 °C durchgeführt wurde. Die Volumina des Nickel-Materials für die Säule variierten je nach aufgetragener Probe. Vor dem Auftragen der Probe wurde das Nickel-Material mit H_2O , bzw. TBS ausgiebig gewaschen und anschließend mit Probenpuffer äquilibriert. Das Nickel-Material wurde anschließend mit der Proteinprobe für 2-12 Stunden auf dem Magnetrührer inkubiert. In diesem Zeitraum soll das Zielprotein mit dem angebrachten Tag an das jeweilige Material binden. Nach Beladung der Säule mit der Proteinprobe wurde mit verschiedenen Waschpuffern gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu lösen. Das Zielprotein wurde mit Elutionspuffer eluiert.

3.2.12 Gelfiltration

Das Prinzip der Gelfiltrations- oder auch Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Moleküle einer zu analysierenden Probe in die poröse Matrix der stationären Phase. Dabei werden die Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Standardmäßig wurde eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR Säule (GE Healthcare) verwendet. Es wurde für analytische, ebenso wie für präparative Experimente mit kleinen Proteinmengen ein FPLC-System (BIO-RAD) verwendet. Vor dem Auftragen einer Proteinprobe auf die Säule wurde die Säule mit mindestens fünf Säulenvolumina gefiltertem und entgastem H_2O gewaschen und mit zwei Säulenvolumina ebenfalls gefiltertem und entgastem Puffer äquilibriert. Dabei spielt das Entgasen eine bedeutende Rolle, da ansonsten Luftblasen in die Säule gelangen und es zum Kollaps des Säulenmaterials kommen kann. Die Läufe wurden bei 4°C durchgeführt und das Protein mit Hilfe der Absorption bei 280 nm detektiert. Die Laufgeschwindigkeit betrug zwischen 0,5-1 ml pro Minute. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionsvolumina von 100 μl (bei analytischen Läufen) bzw. 1-3 ml (bei präparativen Läufen) gesammelt. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.13 Massenspektrometrie

Zur Identifizierung von Proteinproben wurden diese mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Dazu werden die zu identifizierenden Proben zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und die zu analysierenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend werden die Proben durch tryptischen Verdau fragmentiert. Die weitere Analyse erfolgt durch eine Kopplung einer kapillaren HPLC (nanoACQUITY UPLC [Waters GmbH] mit einer nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Umkehrphasensäule) mit dem Q-TOF Premier System Massenspektrometer (Waters GmbH). Hierbei werden die Proben durch Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert. Als Analysator zur Trennung und zum Nachweis der Analyt-Ionen wird eine Kombination aus Quadrupol und Flugzeitanalysator eingesetzt.

Alle Versuche wurden von Dr. Stefan Tenzer in der AG Schild am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

3.2.14 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Tyrosinase-Aktivität wurden Absorptionsspektren diverser Substrate gemessen, welche von der Tyrosinase gut, schlecht oder nicht umgesetzt wurden. Gemessen wurde von 230-680 nm (1 nm Schritte).

Die Messungen erfolgten bei 25 °C in Gegenwart von 1 mM bis 10 µM Substrat in Tris-Puffer (20 mM Tris pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol. Als monophenolische Substrate wurden Tyramin, L-Tyrosin und p-Cumarsäure verwendet, während L-Dopa, Dopamin und Kaffeesäure als diphenolische Substrate getestet wurden.

Zur Aktivierung der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* wurde eine Lösung mit Puffer, Substrat, Tyrosinase sowie 5 µM CuSO₄ angesetzt. Bei der Absorption von sichtbarem oder UV-Licht werden Elektronen angeregt, die in höher gelegene, unbesetzte Orbitale übergehen. Bei energiereichem kurzwelligem UV-Licht mit Wellenlängen von < 200 nm werden σ-Elektronen angeregt.

Durch UV-Licht und sichtbares Licht in Wellenlängenbereich von 200-800 nm werden die schwächer gebundenen π-Elektronen in antibindende π*-Orbitale angehoben. Die Absorption der Reaktionsprodukte, die durch die Monophenolase und Catecholoxidase-Aktivität der zu untersuchenden Tyrosinase entstehen, ist auf die π→π*-Übergänge im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm zurückzuführen. Dies sind Dopachinon und Dopachrom ($\epsilon_{475} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), die sichtbares Licht bei 340 nm bzw. 475 nm absorbieren. Die Absorption bei 280 nm ist charakteristisch für Proteine, die in der Polypeptidkette über konjugierte π-Elektronensysteme - also aromatische Ringsysteme - verfügen.

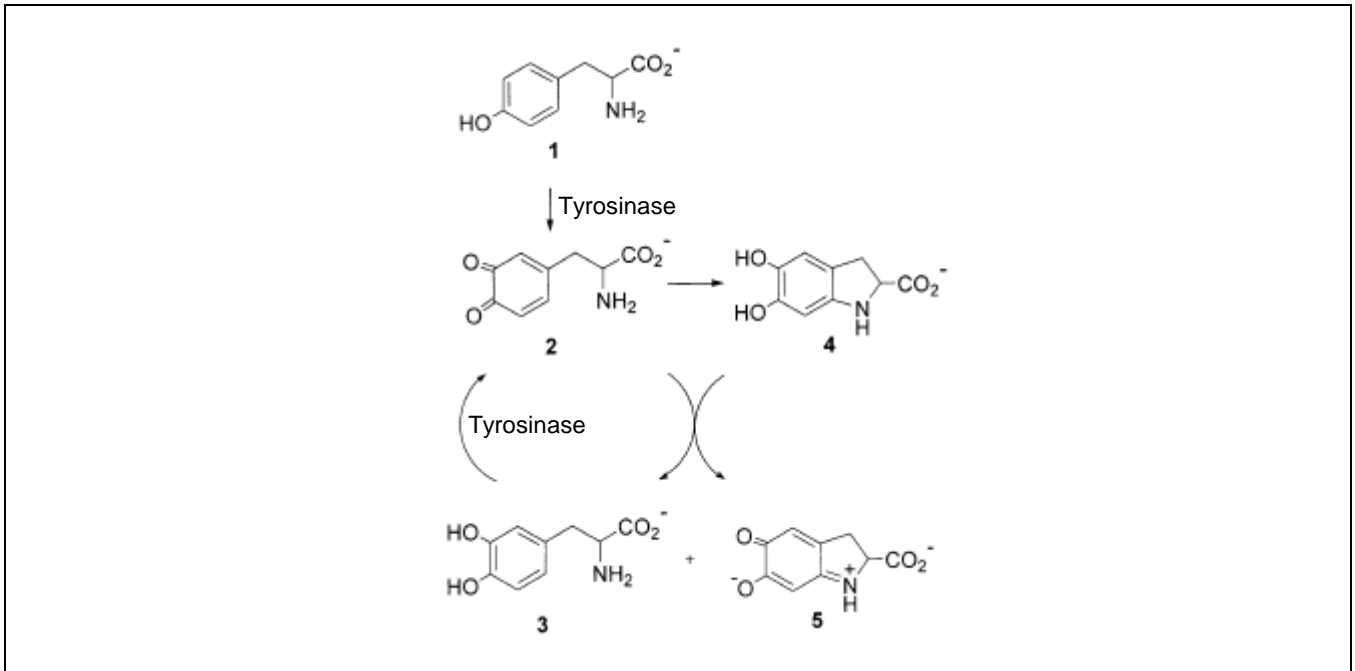


Abbildung 3.1: Oxidation von L-Tyrosin und L-DOPA durch die Tyrosinase. 1 – Tyrosin, 2 – Dopachinon, 3 –L- DOPA, 4 – CycloDOPA, 5 – Dopachrom (Modifiziert nach Land et al., 2003).

Die Tyrosinase oxidiert L-Tyrosin (1) zu L-DOPA (3), das durch das Enzym weiter zu Dopachinon (2) oxidiert wird. Die Anreicherung von Dopachinon (2) führt zu dessen Zyklisierung, wodurch CycloDOPA (4) entsteht. Zwischen dem bizyklischen Catechol (Cyclodopa) (4) und seiner Vorstufe (Dopachinon) (2) erfolgt eine schnelle nichtenzymatische Redoxreaktion, infolge dessen L-DOPA (3) und die Eumelanin-Vorstufe – Dopachrom (5) entstehen (Abb. 3.1 modifiziert nach Land et al. 2003). Die Absorptionzunahme bei 340 nm und 475 nm weist auf die Bildung von Dopachinon bzw. Dopachrom und dementsprechend auf die Tyrosinase-Aktivität hin.

3.2.15 Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation lassen sich durch einen Sedimentationslauf der Sedimentationskoeffizient sowie das Molekulargewicht bestimmen. In dieser Arbeit wurde der Sedimentationslauf verwendet, um durch Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten Aussagen über den Zustand des Tyrosinase-Caddie Komplexes sowie dessen Dissoziation zu treffen (van Holde, Weischet, 1978).

In der Ultrazentrifuge sedimentieren die Proteine aufgrund der hohen Zentrifugalbeschleunigung, der sie ausgesetzt sind, viel schneller als unter normalen Schwerkraftbedingungen. Auf das zu untersuchende Protein wirken aufgrund des sich in der Ultrazentrifuge drehenden Rotors verschiedene Kräfte (siehe Abb. 3.2), wie die zur Rotormitte gerichtete Auftriebskraft und

Reibungskraft, sowie die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, welche der Zentripetalkraft entgegengerichtet ist.

Wirkende Kräfte:

$F_z = \text{Zentrifugalkraft}$
 $F_z = \omega^2 r \cdot m_p$

$F_b = \text{Auftriebskraft}$
 $F_b = -\omega^2 r \cdot m_{Lm}$
 $m_{Lm} = V_p \cdot \rho_{Lm} = m_p V_p \rho_{Lm}$

$F_f = \text{Reibungskraft}$
 $F_f = -f \cdot u$
 $f = \frac{kT}{D}$

Abbildung 3.2:
Wirkende Kräfte bei der analytischen Ultrazentrifugation.
 Schematische Darstellung und Berechnung des Sedimentationskoeffizienten.

$$F_z + F_b + F_f = 0$$

<p>m_p = Partikelmasse ω = Winkelgeschwindigkeit V_p = Teilchenvolumen v = partielles spezif. Volumen des Teilchens f = Reibungskoeffizient T = Temperatur</p>	<p>r = radialer Abstand Partikel/Rotationsachse m_{Lm} = Masse des verdrängten Lsg.mittels ρ_{Lm} = Lösemitteldichte v = Geschwindigkeit des Teilchens k = Boltzmann Konstante D = Diffusionskoeffizient</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Um den Verlauf der Sedimentation verfolgen zu können, verfügt die analytische Ultrazentrifuge über ein spezielles Detektionssystem. Im Falle der hier verwendeten *Optima XL-1 Analytical Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, Krefeld) handelt es sich um eine Interferenz- und Absorptionsoptik. Die durchgeführten Sedimentationsläufe wurden mittels Absorptionsoptik verfolgt. Gemessen wurde ein Proben- bzw. Referenzvolumen von ca. 120 µl, bei einer Absorption von 280 und 220 nm, 42.000 rpm, 20 °C über verschiedene Zeiträume.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der freien Software *Ultrascan II V. 9.9* (University of Texas).

Das Molekulargewicht der Moleküle wurde mit Hilfe der Svedberg Gleichung berechnet:

$$M_r = \frac{sRT}{D(1 - v\rho)}$$

<p>M_r = molekulare Masse D = Diffusionskoeffizient v = partiell spezifisches Volumen</p>	<p>ρ = Pufferdichte R = Gaskonstante T = Temperatur</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für nahezu alle Arbeiten mit gereinigtem Protein ist die Bestimmung der Proteinkonzentration maßgebend. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Konzentrationsbestimmung nach Bradford und mittels der Edelhoch Methode verwendet. Nachteil des Bradford-Tests ist die Interaktion der Bradford Lösung mit Detergenzmolekülen. Dies ist beim aufwändigeren Edelhoch Verfahren nicht der Fall. Das Edelhoch Verfahren ist jedoch nur anwendbar, sofern die Aminosäuresequenz des absorbierenden Proteins bekannt ist.

3.2.16.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Sie basiert auf photometrischer Messung der Komplexierung von Proteinen mit dem im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G250. 1 μl Protein wurde auf 1 ml Bradford-Reagenz gegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Anwesenheit von Protein verfärbt sich die Mischung blau und absorbiert stärker als die Eichlösung (Bradford 1976). Sowohl die Referenz als auch die Proteinlösung wurde bei 465 nm und 595 nm gemessen (465 nm ohne Protein zu 595 nm mit gebundenem Protein).

Der Proteingehalt wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Extinktionsfaktor} \cdot \text{Bradfordfaktor}}{\text{Volumen der Probe} [\mu\text{l}]} = \text{Proteinkonzentration} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right]$$

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Circular dichroismus Spektroskopie

Beim Circular dichroismus (CD) handelt es sich um eine chiroptische Methode, welche Varianten der Absorptionsspektroskopie sind und die Chiralität von Molekülen nutzen. Voraussetzung ist das Vorliegen von optischer Aktivität der Probe. In erster Linie sind dafür das asymmetrische C α -Atom der Aminosäuren und die Carbonylgruppe der Peptidbindung entscheidend. Dabei wird links- bzw. rechtspolarisiertes Licht nach Durchstrahlen der Probe elliptisch um den Winkel α gegenüber dem eingestrahlten linear polarisierten Licht gedreht. Gemessen wird die Absorptionsdifferenz ΔA , die sich aus dem Lambert-Beer Gesetz ergibt, wobei statt dem spezifischen Extinktionskoeffizienten die Differenz desselben ($\Delta\varepsilon$) einzusetzen ist.

$$\Delta A = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{für} \quad \Delta\varepsilon = \Delta\varepsilon_L - \Delta\varepsilon_R$$

ε_L = spezifischer Extinktionskoeffizient von links polarisiertem Licht (ml/mg·cm)

ε_R = spezifischer Extinktionskoeffizient von rechts polarisiertem Licht (ml/mg·cm)

c = Konzentration des Chromophors (mg/ml)

d = Weglänge des Lichts durch die Probe (cm)

Die Differenz $\Delta\varepsilon$ kann positiv oder negativ sein, je nachdem ob der links oder rechts polarisierte Strahl stärker absorbiert wird. Mit Hilfe von CD kann die Sekundärstruktur von Proteinen bestimmt werden. Dabei ist nicht nur die intrinsische optische Aktivität aufgrund der Chiralität der einzelnen Aminosäuren wichtig, sondern vor allem die Kopplung von Chromophoren durch Ausbildung von Sekundärstrukturen wie α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel. Diese zeigen sich in unterschiedlichen CD-Spektren, die sich entsprechend der Struktur zuordnen lassen [59-61].

In der praktischen CD-Spektroskopie wird die Elliptizität Θ_λ gemessen, die wie folgt definiert ist:

$$\tan \Theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L}$$

Die Elliptizität ist wellenlängenabhängig, weshalb Θ den Index λ trägt. $I_{R,L}$ ist die Intensität des rechts bzw. links polarisierten Lichtes nach dem Absorptionvorgang. Bei der experimentellen Bestimmung der Elliptizität muss die Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht gemessen werden. Dazu wird zunächst linear polarisiertes Licht erzeugt, welches mit Hilfe eines $\lambda/4$ -Plättchens aus doppelbrechendem Material (z.B. Kaliumdihydrogenphosphat, Quarz, oder Glimmer) zu zirkular polarisiertem Licht umgeformt wird.

Gemessen wurde mittels des CD-Spektrometers CD6 (Jobin Yvon) mit einem über ein Wasserbad temperierbaren Küvettenhalter bei 4 °C mit Küvetten mit einer optischen Weglänge von 0,1 cm. Die Proben wurden gegen das Pufferspektrum korrigiert. Gemessen wurden die Wellenlängenbereiche von 200-260 nm mit einer Integrationszeit von 3 s.

3.3.2 Dynamische Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode zur Messung der Größe von suspendierten Partikeln im Bereich von 3 nm bis 3 μ m (Chu, 1991). Thermische Bewegungen der Flüssigkeitsmoleküle führen unter den Partikeln zu einer Brown'schen Molekularbewegung, so dass auf diese Teilchen treffendes monochromatisches Licht gestreut wird und eine Frequenzverschiebung relativ zur primären optischen Frequenz aufweist. Mittels der Photokorrelationsspektroskopie (PKS) wird durch eine geeignete experimentelle Versuchsanordnung das Spektrum des gestreuten Lichtes auf Intensitätsfluktuationen des Streusignals untersucht. Durch Berechnung einer Autokorrelationsfunktion der Intensitätsfluktuationen lassen sich Aussagen über physikalische Eigenschaften der Partikel treffen, wie z.B. Größe oder Molekulargewicht (Schulze 1996). Mit der Dynamischen Lichtstreuung lassen sich die physikalischen Eigenschaften sofort, das heißt unmittelbar nach oder während der Messung, bestimmen. Die Meßmethode kommt mit verhältnismäßig geringen Mengen für einen Ansatz aus und ist weitgehend störungsunempfindlich (Schulze 1996). Anwendungsbereiche erschließen sich z.B. bei biologischen und biomedizinischen Fragestellungen. Biologische Makromoleküle sind gewöhnlich hinreichend groß, um auch bei geringen Konzentrationen ausreichende Streulichtintensitäten zu bewirken. Es wurden z.B. Untersuchungen an lebenden Zellen und Viren durchgeführt und die Bewegungsgeschwindigkeit von Bakterien aus DLS-Messungen abgeleitet (Schulze 1996).

Für die Auswertung der Daten wurde die geräteeigene Software verwendet. Zur Interpretation der gemessenen Daten wird der *Z-Average* Wert verwendet, um die Polydispersität der Probe zu beschreiben. Dieser gibt die Halbwertsbreite der Partikelpopulation an und ist ein Maß für die

Streuung innerhalb einer Population. Ebenso wie der Pdl (Polydispersitätsindex), welcher jedoch nur für Intensitätsmessungen zu verwenden ist. Der Pdl gibt die Homogenität der Probe an und sollte möglichst klein sein ($\leq 0,3$) um einen möglichst hohen Reinheitsgrad der Probe zu gewährleisten. Im Gegensatz zum Z-Average Wert bezieht sich der Pdl auf die gesamte Probe.

Das eingesetzte Probenvolumen betrug 60 μl . Die Messungen wurden bei 25 °C und einer Äquilibrationszeit von 2 min vorgenommen. Das verwendete Gerät war ein Zetasizer Nano-S Size mit einem He-Ne Laser 633 nm (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien). Die hydrodynamischen Durchmesser der gemessenen Partikel wurden mit Hilfe der Stokes-Einstein Gleichung berechnet:

$$D = kT/f = kT/6\pi\eta r$$

Mit der Boltzmann-Konstante k ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K), dem Reibungskoeffizient f , der Viskosität des Mediums η für den verdünnten Puffer (0.89×10^{-4} Pa sec) bei 298 K und dem Radius r (nm).

Der berechnete Radius r wurde für die Bestimmung des Molekulargewichts der Partikel nach Tyn und Gusek (1990) verwendet. Die Ausgabe erfolgte in der *Number*-Verteilung, welche die Anzahl der Partikel berücksichtigt, sowie als *Volume*-Verteilung welche die Partikel ihrer Größe nach gewichtet (Friskens 2001; Koppel 1972).

3.3.3 Kristallisation

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann mit röntgenkristallographischen Methoden in atomarer Auflösung bestimmt werden. Dabei wird anhand des Beugungsmusters eines Proteineinkristalls ein Strukturmodell mit den Positionen der einzelnen Atome berechnet. Neben der Kenntnis über die Faltung einer Polypeptidkette ermöglicht die Untersuchung einer Proteinstruktur auch das Verständnis der Proteinfunktion auf molekularer Ebene, wie zum Beispiel spezifische Interaktionsmechanismen mit einem Interaktionspartner. Die Kristallisation und anschließende Analyse der erhaltenen Proteinkristalle stellen eine führende Methode zur Strukturaufklärung von Proteinen dar.

Kristalle bilden geschlossene Körper, die sich auf reguläre Polyeder zurückführen lassen. Flächen und Kanten, die einen Kristall begrenzen, bestimmen seine Morphologie, die durch das Kristallwachstum entsteht. Bei der Proteinkristallisation gehen Proteinmoleküle aus einer übersättigten Lösung, die eine Abweichung vom thermodynamischen Gleichgewicht bedeutet, in

einen festen Phasenzustand über, der idealerweise ein kristalliner Zustand ist. Bei der Proteinkristallisation handelt es sich demnach um eine geordnet ablaufende Form der Präzipitation. Zu diesem Zweck wird eine konzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Dabei wird mit zunehmender Fällungsmittelkonzentration das Löslichkeitslimit des Proteins überschritten, was zu einer Übersättigung des Systems führt (Abb.3.3). Dieser übersättigte Zustand beinhaltet eine metastabile und eine labile Phase. In der metastabilen Phase können sich spontan keine Kristallisationskeime bilden, aber bereits vorhandene Keime können weiter wachsen. In der labilen Phase hingegen entstehen spontan stabile Keime, die entweder aggregieren und als Niederschlag ausfallen oder aber zu Kristallen weiterwachsen. Ideales Kristallwachstum beginnt mit Keimen, die gerade oberhalb der metastabilen Phase, in der labilen Phase gebildet werden. Das Kristallwachstum vollzieht sich langsam und die Proteinkonzentration nimmt ab, so dass das System in die metastabile Phase übergeht. Hier können die gebildeten Keime zu Kristallen heranwachsen, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet sind.

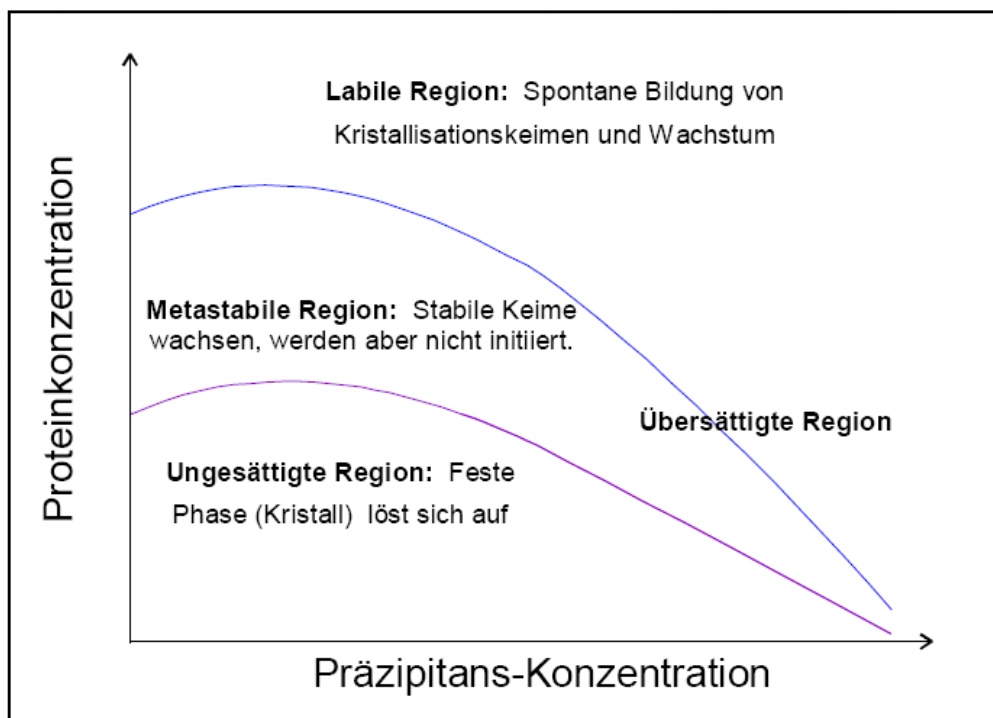


Abbildung 3.3: Phasendiagramm der Kristallisation nach McPherson, 1990. Aufgetragen ist die Proteinkonzentration gegen die Präzipitanzkonzentration. Es sind vier verschiedene Phasen zu unterscheiden: die labile, die metastabile, die ungesättigte, sowie die übersättigte Region.

Als Fällungsmittel werden zum Beispiel Salze wie Ammoniumsulfat oder organische Verbindungen wie Polyethylenglycol (PEG) oder Alkohole verwendet. Bei höheren Konzentrationen konkurrieren diese hydrophilen Verbindungen mit dem Protein um dessen Wasser in der Hydrathülle. Durch diesen Vorgang kommt es zu verstärkten Protein-Protein-Wechselwirkungen und im Idealfall zur

Kristallbildung. Dabei muss der Prozess der Übersättigung langsam erfolgen, um bei der Aggregation der Proteine statt amorphem Niederschlags geordnete dreidimensionale Kristalle zu erhalten. Des Weiteren wird der Kristallisationsvorgang von Bedingungen wie Proteinkonzentration, Reinheitsgrad, Temperatur, pH-Wert sowie Art und Konzentration des Fällungsmittels beeinflusst.

3.3.3.1 Prinzip des hängenden Tropfen

Die Kristallisation erfolgte nach dem Prinzip des hängenden Tropfens. Bei dieser Methode findet eine Erhöhung der Fällungsmittelkonzentration in der Proteinlösung in langsamen Schritten nach dem Prinzip der Dampfdiffusion statt. Dazu wird ein kleines Volumen der Proteinlösung auf ein zuvor gesäubertes Deckglas pipettiert und mit der Reservoirlösung als Fällungsmittel versetzt. Das Deckglas wird anschließend kopfüber auf eine Vertiefung gesetzt, die zuvor mit der entsprechenden Reservoirlösung gefüllt wurde (Abb.3.4). Für die Ansätze wurden 96er, sowie 24er Kristallisationsplatten der Firma Hampton Research verwendet. Um eine luftdicht verschlossene Kammer zu bilden, wurde zwischen Deckglas und Kammerrand ein Silikonfettfilm aufgetragen.

Das Volumen des Tropfens verringert sich durch Dampfdiffusion, da die Präzipitantskonzentration im Vergleich zum Reservoir nur halb so groß ist. Dadurch erhöht sich langsam die Konzentration von Protein und Fällungsmittel im Tropfen, bis eine Übersättigung und im Idealfall eine Kristallisation des Proteins eintritt. Zum ersten Testen von möglichen Kristallisationsbedingungen wurden erworbene Screens (Hampton 1/2, Hampton Index) eingesetzt, die auf bekannten Kristallisationsbedingungen vieler Proteine beruhen. Bei dieser Strategie handelt es sich um ein sogenanntes „*sparse matrix sampling*“, bei dem verschiedene Fällungsmittel, pH-Werte und Salze kombiniert und auf Proteinkristallbildung getestet werden. Die Basis dieser Kombinationen ist eine statistische Auswertung typischer Kristallisationsbedingungen für Proteine (Cudney et al. 1994, Jancarik J. et al. 1991).

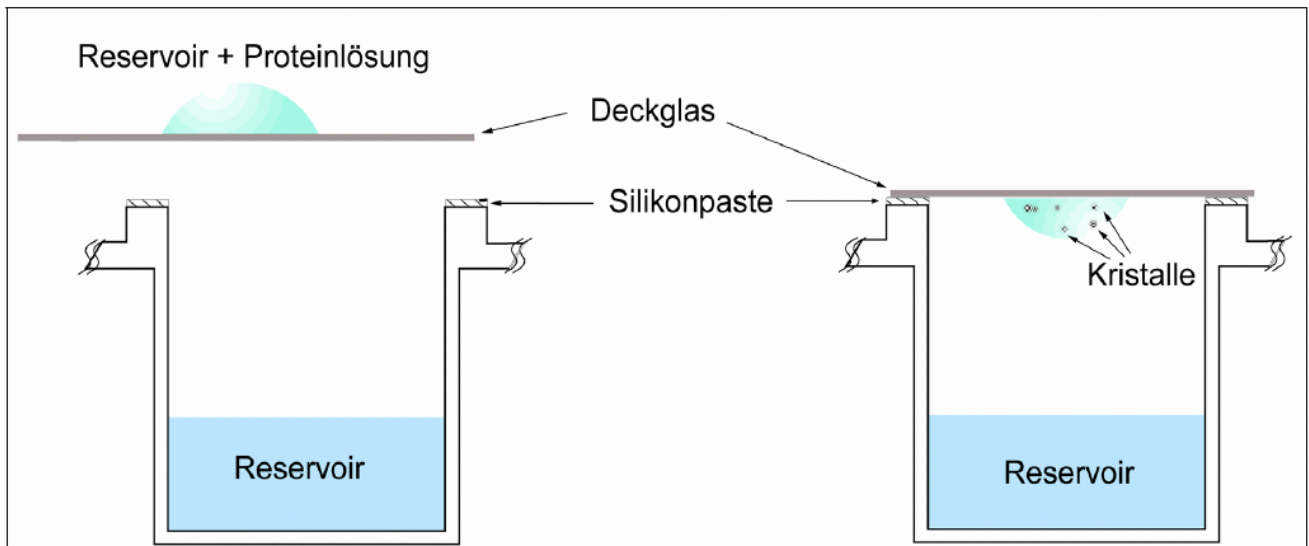


Abbildung 3.4: Prinzip des hängenden Tropfen. Proteinlösung und Fällungsmittel werden auf einem Deckglas zusammengemischt. Das kopfüber gedrehte Deckglas wird verwendet, um eine mit Fällungsmittel gefüllte Kammer luftdicht zu verschließen.

Zur Optimierung gefundener Anfangsbedingungen, in denen sich Sphärolite, sowie erste Proteinkristalle gebildet haben, wurden weiterführende, selbst hergestellte Screens benutzt. Dabei wurden verschiedene Parameter wie Temperatur, pH, Salz- und Proteinkonzentration variiert.

3.4 Bioinformatische Methoden

3.4.1 Moleküldynamik-Simulationen und Docking

Mit Hilfe des Programms Yasara (Version 10.5.14) wurden Moleküldynamik-Simulationen vorgenommen um zu testen, welche Substrate an das aktive Zentrum der Tyrosinase binden können bzw. in der Substratbindetasche des Enzyms stabil liegen und an das aktive Zentrum binden können. Dazu wurden die Ladungsverteilungen der Kupferatome, sowie des gebundenen Sauerstoffs manuell verändert (siehe *add-springs.mcr* Skript, geschrieben von Dr. H. Hartmann), sowie manuell Bindungen am aktiven Zentrum eingefügt bzw. ersetzt. Verwendet wurde die pdb Datei 1WX4 der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*, wobei das Hilfsprotein entfernt wurde und die Substrate auf das Tyr98 des Hilfsproteins *aligniert* wurden. Für die Simulationen wurden die Kraftfelder YASARA2 und AMBER03 verwendet, als Spezifikationen wurde ein pH von 7,0, eine NaCl Konzentration von 0,9%, sowie eine Wasserdichte von 0,997 g/ml gewählt. Die Simulationen erfolgten jeweils über einen Zeitraum von 1-15 ns bei 298 K und 373 K.

Add-springs.mcr Skript:

```
#Setzt springs zwischen den beiden Kupfer Atomen und zwische CU und HIS-Ne2-Atomen
#!! Aminosäure Nummern gelten nur für die Kette hc2 von Pandinus imperator !!

renameres CU,CUO

#
#AddSpring Cu1-Cu2
#=====

laenge=3.6
staerke=50

#
#AddSpring Cu1-His Cu2-His
#=====

laenge=2.1
staerke=100

AddSpring res 400 and atom Cu,res 38 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
ShowArrow Start=AtAtom,res 400 and atom Cu ,End=AtAtom,res 38 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

AddSpring res 400 and atom Cu,res 54 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
ShowArrow Start=AtAtom,res 400 and atom Cu ,End=AtAtom,res 54 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

AddSpring res 400 and atom Cu,res 63 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
```

```
ShowArrow Start=AtAtom,res 400 and atom Cu ,End=AtAtom,res 63 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

AddSpring res 401 and atom Cu,res 190 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
ShowArrow Start=AtAtom,res 401 and atom Cu ,End=AtAtom,res 190 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

AddSpring res 401 and atom Cu,res 194 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
ShowArrow Start=AtAtom,res 401 and atom Cu ,End=AtAtom,res 194 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

AddSpring res 401 and atom Cu,res 216 and atom ne2,Len=(laenge),SFC=(staerke)
ShowArrow Start=AtAtom,res 401 and atom Cu ,End=AtAtom,res 216 and atom
ne2,Radius=0.2,Heads=0,Color=Magenta

#
#Show his
#=====

ShowRes 38 54 63 190 194 216
Stickres 38 54 63 190 194 216
```

Ebenfalls mit Yasara wurden Dockingexperimente von Substraten durchgeführt. Dafür wurde eine Simulationszelle von $16 \times 16 \times 16 \text{ \AA}$ um das Substrat als *Dockingspace* angegeben und das Yasara eigene Skript *dock_runlocal.mcr* verwendet. Weil das verwendete AutoDoc-Skript keine Kupferatome erkennt, wurden die Kupferatome CuA und CuB des aktiven Zentrums der Tyrosinase durch Magnesiumatome ersetzt, welchen eine Ladung von +0,5 (oxy-Zustand) gegeben wurde (persönlicher Kommentar H.Hartmann). Amber03 wurde als Kraftfeld verwendet. In einer Docking Simulation wurden 250 Modelle generiert und deren Bindungsenergien, Bindungskonstanten, sowie die Kontakte des Rezeptormoleküls berechnet.

3.4.2 Berechnung der Liganden Bindungsenergie

Um weiterführend Substrate zu identifizieren, welche für den enzymatischen Umsatz durch die Tyrosinase gut geeignet sind, wurden die Bindungsenergien ausgewählter Phenole berechnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms Yasara Version 10.5.14. Das jeweilige Substrat wurde in die Bindetasche der Tyrosinase anhand des Tyrosin98 des Hilfsproteins *aligniert* und dieses danach verworfen. Nach der Energieminimierung wurden die Bindungsenergien in Wasser sowie ohne zusätzlich eingefügtes Wasser in verschiedenen Kraftfeldern gemessen. Als Spezifikationen wurde ein pH von 7,0, eine NaCl Konzentration von 0,9 % sowie eine Wasserdichte von 0,997 g/ml gewählt. Die finalen Messungen erfolgten mit YASARA2 und YAMBER3 Kraftfeldern.

3.4.3 Programme

Gene Doc 2.6.02

BioEdit 7.0.9

ClustalW2

Die aufgezählten Programme wurden zur Analyse von Gen- und Proteinsequenzen sowie zur Erstellung von Sequenzvergleichen verwendet.

MOSFILM

XDS

Phenix 1.4-3

Wurden zur Strukturbestimmung und anschließenden Verfeinerung benutzt.

STRAP

(Interactive Structure based Sequences Alignment Program)

Das aufgezählte Programm wurde zur Strukturanalyse sowie für strukturbasierende Aminosäure-Alignments verwendet.

VMD 1.08.6

Yasara 10.5.14

UCSF Chimera 1.3.2577

Swiss-PdbViewer Deep View 4.0

Die aufgezählten Programme wurden zur Proteindarstellung und -modifizierung sowie für Modelling- und Simulationsversuche verwendet.

3.4.4 Datenbanken

ExpASy Proteomics Server (expasy.org)

Wurde zum Modelling verschiedener Tyrosinase Strukturen verwendet. Außerdem wurde die Software zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI), sowie weiterer biochemischer Eigenschaften verwendet.

NCBI (ncbi.nlm.nih.gov)

NCBI wurde zur Datenbanksuche verwendet. Es wurden sowohl genomische, als auch proteomische Daten verwendet.

RSCB Protein Data Bank (rscb.org)

Aus der Proteindatenbank wurden 3D-Strukturen von Proteinen geladen und für weitere Analysen verwendet.

KEGG Ligand Database (genome.jp/ligand)

PDBeChem (ebi.ac.uk/msd-srv/msdchem)

Die beiden Ligandendatenbanken enthalten detaillierte Informationen sowie pdb-Dateien, welche für *Docking*-, und Moleküldynamik-Simulationen verwendet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Analyse genomischer DNA aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202

Zur Expression der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 im Komplex mit dem assoziierten Protein ORF378 wurde der Bakterienstamm, bezogen von der *Japan Collection of Microorganisms* (JCM), Japan, auf GYM-Agarplatten ausgestrichen und bis zur Ausbildung eines weißen Mycels bzw. Sporenbildung (zirka 7 Tage, siehe Abb.4.1) bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Kultivierung erfolgte in GYM-Flüssigmedium ebenfalls bei 28 °C über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen. In diesem Zeitraum kam es zur Sporenbildung durch das Bakterium.

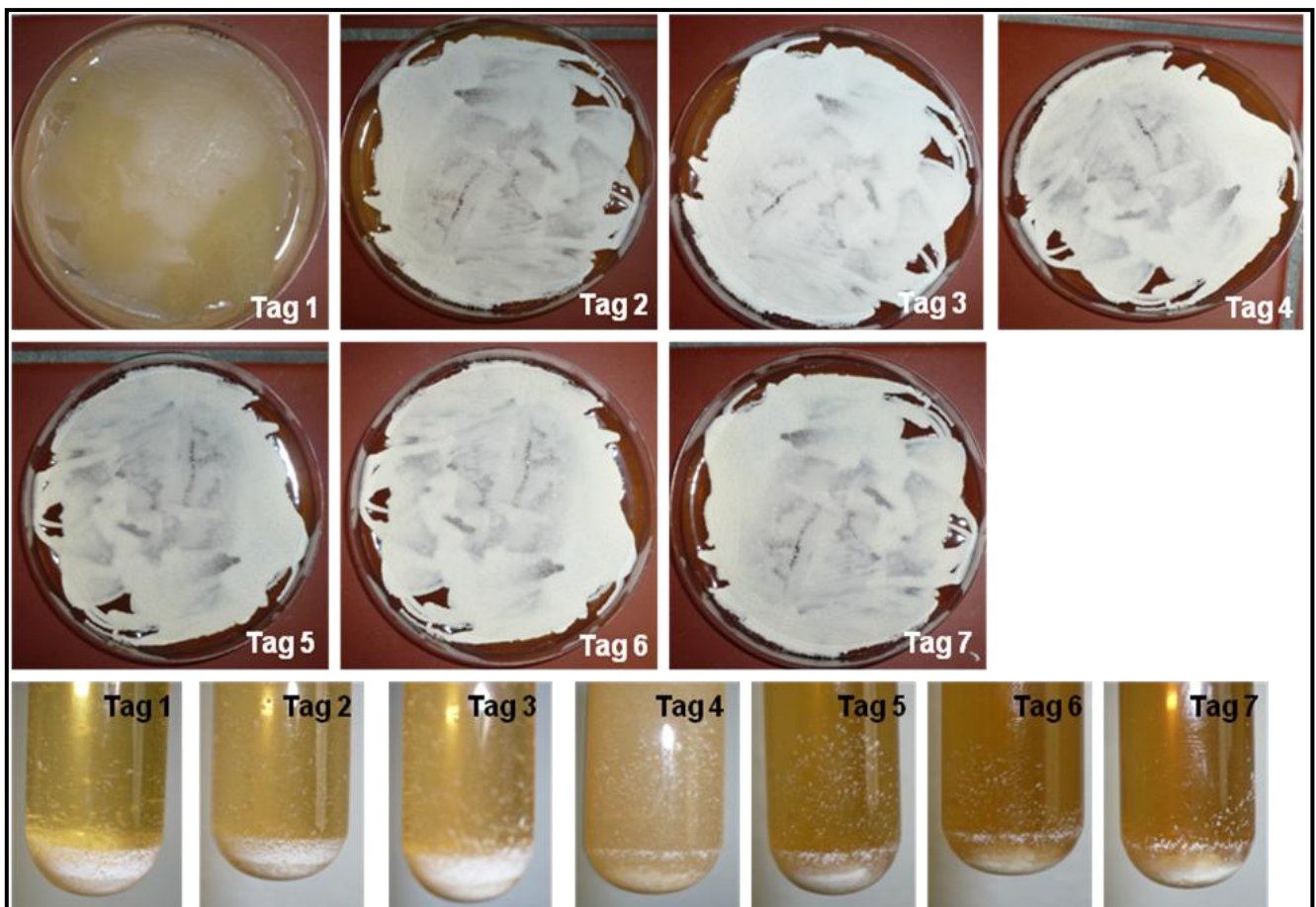


Abbildung 4.1: Anzucht von *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 auf GYM-Agarplatten bzw. Flüssigmedium bei 28 °C über einen Zeitraum von jeweils 7 Tagen.

Zur anschließenden DNA-Extraktion wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Hilfe des „*DNeasy Blood and Tissue Kit*“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgeschlossen und die DNA gereinigt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: DNA-Extraktion aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202*. A260: Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA), A280: Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), 260/280: Verhältnis von 1,8 wird als eine reine DNA Probe gewertet, 260/230: Verhältnis von 2,0 wird als eine reine DNA Probe gewertet.

Probe	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
A	87,55	1,751	0,95	1,84	1,35
B	108,82	2,176	1,105	1,97	1,41

Die photometrischen Messungen zeigen, dass in beiden Extraktionen DNA in ausreichender Menge mit einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden konnte. Dabei sind die Werte aus Tabelle 4.1 wie folgt zu interpretieren:

- A260 Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA)
- A280 Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen)
- 260/280 Verhältnis von 1,8 wird als eine reine DNA-Probe gewertet.
- 260/230 Verhältnis von 2,0 wird als eine reine DNA-Probe gewertet.

Um die isolierte und gereinigte DNA weiter zu charakterisieren, wurden die Proben auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 4.2)

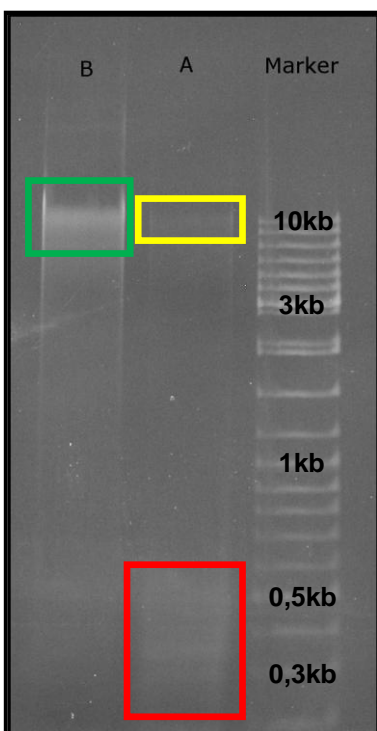


Abbildung 4.2: 1,2 %iges Agarosegel mit aufgetragenen DNA-Extraktionen A und B. Verwendeter Marker: „DNA Ladder Mix“ (GeneRuler). Angaben in Kilobasen (kb).

Man sieht deutlich, dass Probe A größtenteils degeneriert ist (roter Kasten) und im Gegensatz zu Probe B nicht mehr in hochmolekularer Form vorliegt (schwache Bande im hochmolekularen Bereich, gelber Kasten)), sowie RNA-Verunreinigungen aufweist (niedermolekularer Bereich, roter Kasten). Ein wahrscheinlicher Grund für die Degradierung könnte eine Kontamination der Probe mit DNasen sein. Die Spur von Probe B zeigt dagegen eine deutliche Bande bei über 10.000bp, was auf hochmolekulare DNA schließen lässt (grüner Kasten). Aufgrund der Gelanalyse wurde Probe A verworfen und folgend mit Probe B weitergearbeitet.

Um das „*melanin synthesizing operon*“ (*melC*) - bestehend aus Tyrosinase und ORF378 - in den gewählten Vektor pET21-a(+) zu klonieren, wurden Primer zur Amplifizierung des Genabschnitts designt (Oligo Calc, Lurie, 2007). Es konnten jedoch auch nach mehreren PCR Ansätzen keine positiven Ergebnisse erhalten werden. Auch nach durchgeführter *Touchdown-PCR* wurde kein Amplifikat erzeugt. Um dennoch eine Amplifikation des Operons zu ermöglichen, wurden erneut Primer mit optimierten Anlagerungstemperaturen designt, welche sich ideal an die sehr GC-reiche Streptomyceten-DNA anlagern sollten. Jedoch wurden auch hier keine Ergebnisse erhalten.

Aufgrund der Fehlversuche sollte deshalb zunächst verifiziert werden, dass es sich bei der verwendeten DNA um die aus *S.castaneoglobisporus HUT6202* handelt. Hierzu wurden PCR-Primer verwendet, welche sich an die 16 S RNA-Gene von Prokaryoten anlagern. Auf diese Weise konnten Genamplifikate mit erwarteten Längen von 550 bp und 1,2 kb erhalten werden (siehe Abb. 4.3).

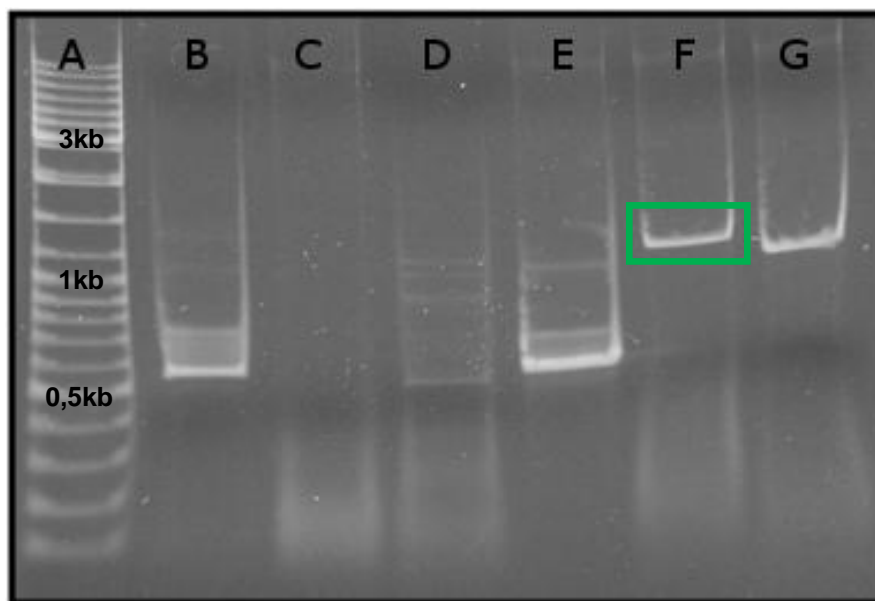


Abbildung 4.3: Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten einer PCR mit 16S RNA-Primern (erwartete Fragmente: 500 bp und 1,2 kb). Verwendeter Marker: „*DNA Ladder Mix*“ (GeneRuler) auf Spur A. B: 2.1f/2.2r; C: Negativkontrolle; D: Negativkontrolle; E: 2.f/2.1r; F: 1f/1.1r; G: 1f/2.1r. Angaben in Kilobasen (kb).

Die Bande aus Spur F (grüner Kasten) wurde ausgeschnitten, mit Hilfe des „*High Pure PCR Product Purification Kit*“ (Invitrogen) gereinigt und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind im Sequenzalignment in Abb 4.4 gezeigt.

Myc_Seq : * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 : -
S. casta : -----GCGCGGCTTAAACACATGCAACTTCGAAAGATGAACCTTCGG-CGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 75
S. litmicioid : -----CTACCATGCAAAAGTCGA-CGATGAACCACTTCGG-TTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 63
S. parvulus : -----TCCATGCAA-TCGA-CGATGAACCACTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 60
S. pactum : -----TGCTACCATGCAAAAGTCGA-CGATGAACCACTTCGG-TGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 63
S. rubrogri : -----AAGCA-TCGA-CGATGAACCACTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 56
S. fradiae : -----CCATGAGGTACTGTAGCA-TCGA-CGATGAACCACTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 70
S. naganish : GAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTTAAACACATGCAACTTCGAAAGATGAACCTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 104
S. coeruleus : -----ACCACCTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 40
S. griseoau : -----GGGGCGGCGAGCTTACCATGCAACTTCGAAAGATGAACCACTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 76
S. sp. : -----CTGGCGGGGAGCTTACCATGCAACTTCGAAAGATGAACCACTTCGG-TGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA : 75
gtcga cgatgaacc cttcgg t ggattagtggcgaaacgggtgagtaaca

Myc_Seq : * 120 * 140 * 160 * 180 * 200 *
S. casta : ---AAAGCTCTAGAGCGTACTGCCGCTTCTCCCTCCAAAGCGGTTAATACCGGATA-CGAGTTTACCGGCATCGGTATCTGTTAAAGCTCCGGCGGTG : 97
S. litmicioid : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 178
S. parvulus : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 166
S. pactum : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 164
S. rubrogri : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 167
S. fradiae : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 160
S. naganish : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 204
S. coeruleus : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 143
S. griseoau : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 180
S. sp. : CGTGGCAACTCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACCGGTTAATACCGGATA-TCAGTGTGACCGCATGGTCCGTGCTGAAAGCTCCGGCGGTG : 179
cgtgggcaactctgccctgcaactctgggacaagccctgaaacggggttaataccgggata gA GCAT g g T gAAAGCTCCGGCGGTG

Myc_Seq : * 220 * 240 * 260 * 280 * 300 *
S. casta : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 202
S. litmicioid : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 283
S. parvulus : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 271
S. pactum : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 272
S. rubrogri : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 265
S. fradiae : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 279
S. naganish : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 312
S. coeruleus : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 248
S. griseoau : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 285
S. sp. : CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC : 284
CAGGATGACCCCGGGCTATCAGCTTGTGTTGTTGAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGCGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC

Myc_Seq : * 320 * 340 * 360 * 380 * 400 * 420 *
S. casta : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 307
S. litmicioid : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 376
S. parvulus : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 374
S. pactum : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 377
S. rubrogri : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 370
S. fradiae : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 384
S. naganish : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 417
S. coeruleus : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 353
S. griseoau : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 390
S. sp. : ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC : 389
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGAAAGCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGAGCGGCTTCGGGTTGTAAAC

Myc_Seq : * 440 * 460 * 480 * 500 * 520 *
S. casta : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 412
S. litmicioid : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 481
S. parvulus : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 479
S. pactum : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 482
S. rubrogri : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 475
S. fradiae : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 489
S. naganish : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 522
S. coeruleus : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 458
S. griseoau : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 495
S. sp. : CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG : 494
CTCTTTCAGCAGGGAAGGCGAAGTGAACGTTACCTGCAGAAAGAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG

Myc_Seq : * 540 * 560 * 580 * 600 * 620 *
S. casta : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 517
S. litmicioid : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 598
S. parvulus : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 586
S. pactum : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 587
S. rubrogri : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 580
S. fradiae : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 594
S. naganish : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 563
S. coeruleus : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 627
S. griseoau : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 600
S. sp. : AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA : 599
AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA

Myc_Seq : * 640 * 660 * 680 * 700 * 720 *
S. casta : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 622
S. litmicioid : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 703
S. parvulus : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 691
S. pactum : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 689
S. rubrogri : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 692
S. fradiae : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 685
S. naganish : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 732
S. coeruleus : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 668
S. griseoau : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 705
S. sp. : GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 704
GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCGATACCTGACGCTGAGGAGCGAAA

Myc_Seq : * 740 * 760 * 780 * 800 * 820 * 840 *
S. casta : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 827
S. litmicioid : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 808
S. parvulus : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 796
S. pactum : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 794
S. rubrogri : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 797
S. fradiae : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 804
S. naganish : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 837
S. coeruleus : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 773
S. griseoau : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 810
S. sp. : GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT : 809
GCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCGCTAAACCGTTGGGACTAGGTGTGGGACACATTCCACGTTGTCCGTCGCCGAGCTAACGCATT

```

      *           860           *           880           *           900           *           920           *           940
Myc_Seq : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 832
S. casta : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 913
S. litmociid : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 901
S. parvulus : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 899
S. pactum : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 902
S. rubrogri : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 895
S. fradiae : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 853
S. naganish : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 942
S. coerules : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 878
S. griseoau : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 915
S. sp. : AAGT GCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGGAAG : 914
      AAGTgCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATgacggggggcccgcaaacgagcggcgagcatgtggcttaattgcagcgaacgcgcaag

      *           960           *           980           *           1000           *           1020           *           1040           *
Myc_Seq : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 937
S. casta : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1018
S. litmociid : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1006
S. parvulus : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1004
S. pactum : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1007
S. rubrogri : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1000
S. fradiae : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1047
S. naganish : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 983
S. coerules : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1020
S. griseoau : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1019
S. sp. : AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACGATTAGAGATAATGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT : 1019
      aaccttaccaggcttgacatacacccggaaa agagat gg ccccttgtggcgggtgtacaggtggcgcagcggcgagcatgtggcttaattgcagcgaacgcgcaag

      *           1060           *           1080           *           1100           *           1120           *           1140           *
Myc_Seq : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1041
S. casta : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1123
S. litmociid : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1109
S. parvulus : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1052
S. pactum : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1110
S. rubrogri : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1103
S. fradiae : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1151
S. naganish : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1087
S. coerules : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1124
S. griseoau : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1123
S. sp. : GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGGTGGGACTCACCGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAA : 1123
      gttgggtaagtcgcaacgagc caacccttgtcccggtgtgccagca c t g ggt tggggactcac ggagaccgcccgggtc actcgga gaa

      *           1160           *           1180           *           1200           *           1220           *           1240           *           1260
Myc_Seq : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1077
S. casta : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1228
S. litmociid : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1214
S. parvulus : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1215
S. pactum : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1208
S. rubrogri : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1256
S. fradiae : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1192
S. naganish : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1229
S. coerules : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1228
S. griseoau : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1228
S. sp. : GGTGGGACGCGCTCAAGCATGCTGCCCTATGTCCTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA : 1228
      ggtgggga c tcaag cat tg ccc tatgtc

      *           1280           *           1300           *           1320           *           1340           *           1360           *
Myc_Seq : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1333
S. casta : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1319
S. litmociid : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1320
S. parvulus : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1313
S. pactum : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1313
S. rubrogri : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1361
S. fradiae : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1297
S. naganish : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1334
S. coerules : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1333
S. griseoau : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1333
S. sp. : AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC : 1333

      *           1380           *           1400           *           1420           *           1440           *           1460           *
Myc_Seq : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1436
S. casta : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1424
S. litmociid : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1424
S. parvulus : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1418
S. pactum : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1466
S. rubrogri : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1358
S. fradiae : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1426
S. naganish : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1423
S. coerules : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1426
S. griseoau : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1423
S. sp. : TTGTACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAAACCCCAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGAGCTGTGGAAGGTTGGACTGGCGATTGGGACG : 1423

```

Abbildung 4.4: Sequenzalignment der sequenzierten 16S RNA mit verwandten Streptomyceten. Die Sequenz der amplifizierten RNA ist in Zeile 1 mit Myc_Sec bezeichnet und mit den vergleichbaren Sequenzen verwandter Streptomyceten *aligniert*. In Zeile 2 ist die 16S RNA Sequenz aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202* aufgetragen. Schwarze Hinterlegung: 100 % Identität, Dunkelgrau: 90 % Identität, Hellgrau: 80 % Identität, Weiß: <80 % Identität.

```

Myc_Seq : ----- : -
S. casta : AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCG----- : 1461
S. litmociid : AAGTCGAACAAG----- : 1436
S. parvulus : ----- : -
S. pactum : AAGTCGACAA----- : 1434
S. rubrogri : AAGTCGA----- : 1425
S. fradiae : ----- : -
S. naganish : AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTCCGG : 1501
S. coerules : ----- : -
S. griseoau : ----- : -
S. sp. : ----- : -

```

Prokaryotische 16 S RNA gilt als hoch konserviert (Case et al., 2007; Clarridge, 2004; Weisburg et al., 1991). Im Alignment sollte die sequenzierte DNA also identisch zu dem Datenbankeintrag von *S.castaneoglobisporus* sein. Das Alignment der 16S RNA Sequenzen zeigt jedoch deutlich die Abweichung der Sequenzen in einigen Positionen, wohin die Sequenz Myc_Seq mehr Ähnlichkeit zu anderen *Streptomyceten* aufweist als zur Sequenz aus *S.castaneoglobisporus*. Abbildung 4.5 zeigt einen Ausschnitt des Alignments aus Abbildung 4.4. Die signifikanten Positionen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

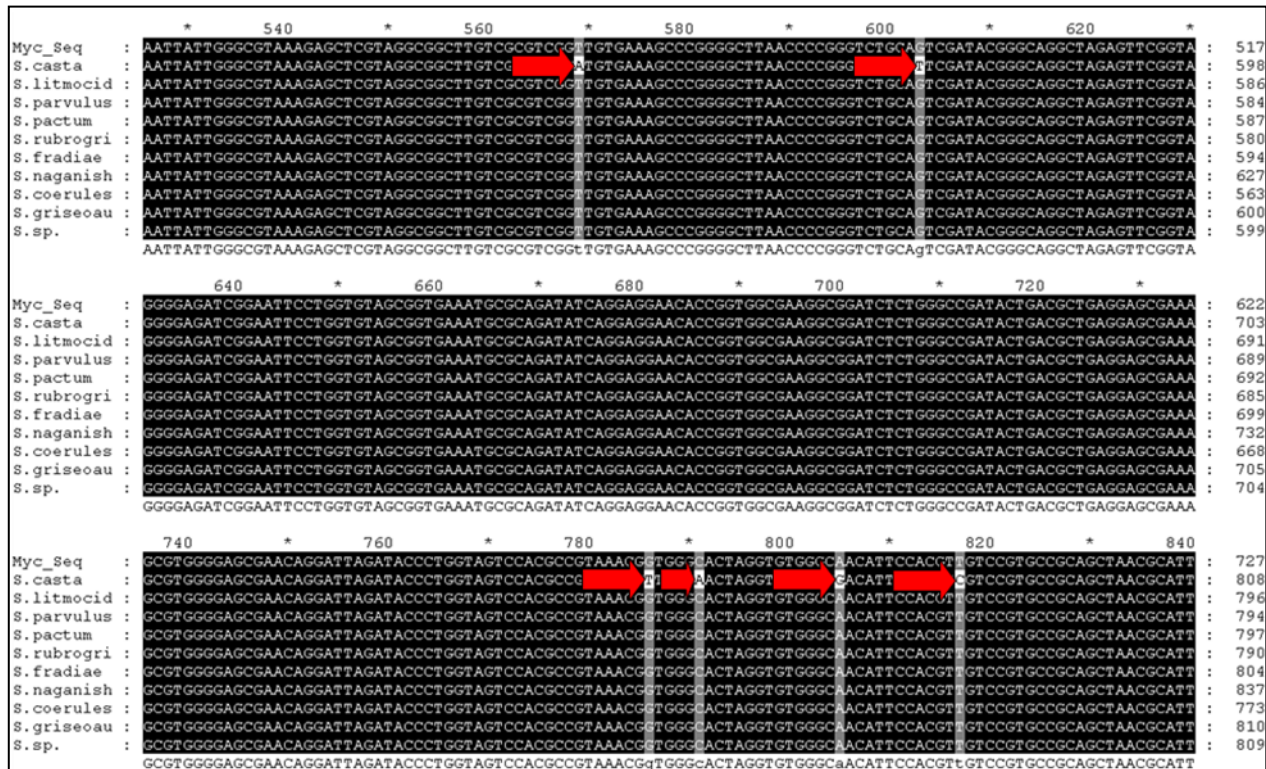


Abbildung 4.5: Sequenzalignment Ausschnitt aus Abbildung 4.4. 16 S RNA Sequenzen verwandter *Streptomyceten* aligniert mit der amplifizierten und sequenzierten Sequenz. Die signifikanten Unterschiede zur Sequenz aus *S.castaneoglobisporus* sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Bei dem von der *Japan Collection of Microorganisms* (JCM) bezogenen *Streptomyces*-Stamm handelt es sich daher höchstwahrscheinlich nicht um *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202, sondern um einen anderen *Streptomyces*-Stamm. Auf den Hinweis einer fehlerhaften Sendung seitens der JCM wurde nicht eingegangen. Ebenso wurde kein Ersatz zur Verfügung gestellt. Eine alternative Bezugsquelle für *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 gab es nicht.

4.2 Plasmid Design

Um die Expression der Tyrosinase dennoch durchführen zu können, wurde ein Konstrukt entwickelt (Abb. 4.6), welches durch chemische Gensynthese hergestellt wurde (GenScript, USA). Die Klonierung erfolgte ebenfalls kommerziell über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NdeI*.

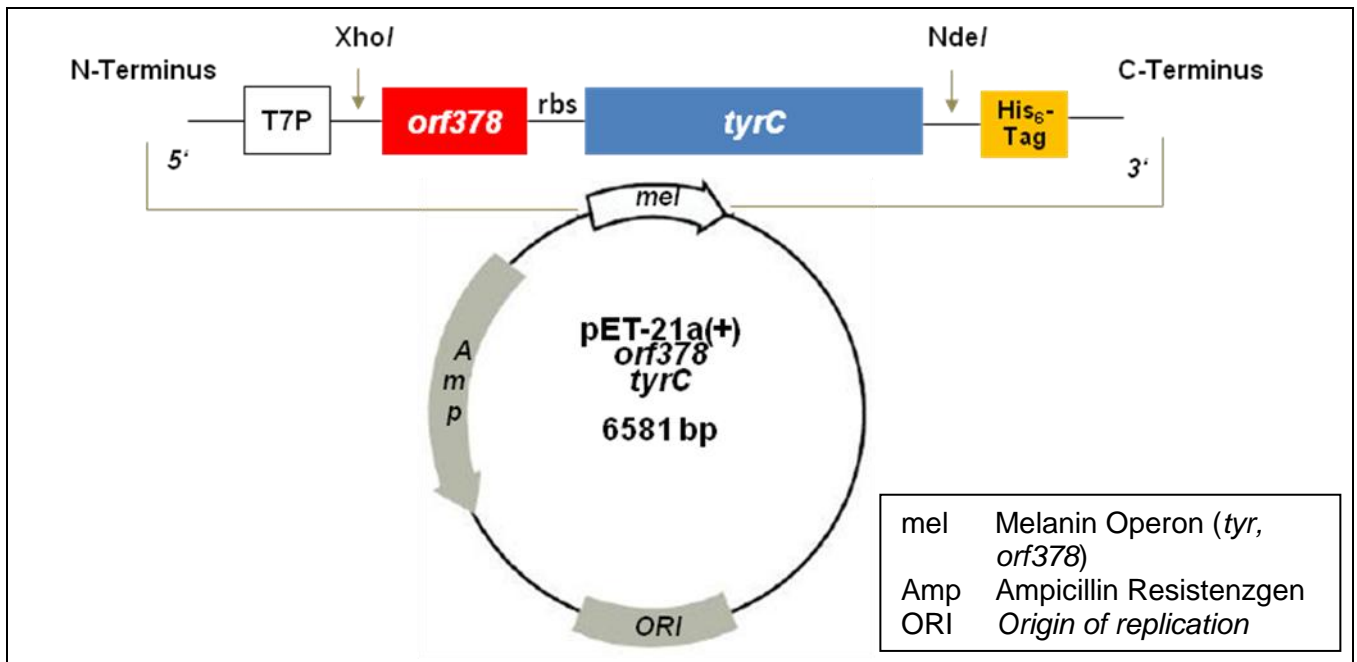


Abbildung 4.6: Konstrukt zur heterologen Expression der Tyrosinase im Komplex mit ORF378. T7P (weiß): T7-Promotor; orf378 (rot): „Hilfsprotein“ *open reading frame 378*; tyrC (blau): Tyrosinase; His₆-Tag (gelb): C-terminaler Histidin₆-Tag; rbs: ribosomale Bindestelle. *XhoI*, *NdeI*: Restriktionsschnittstellen der jeweiligen Enzyme.

Der Aufbau des synthetisch hergestellten polycistronischen Operons ist identisch mit der Struktur im Genom von *S.castaneoglobisporus HUT6202* und unterscheidet sich damit grundlegend von dem monocistronischen Expressionsansatz von Sugiyama et al. (2006). Das Operon setzt sich aus einem T7-Promotor, der Sequenz für das „Hilfsprotein“ ORF378, sowie dem *Tyrosinase*-Gen selbst zusammen. Letzteres besitzt noch einen C-terminalen Histidin₆-Tag, über den der Proteinkomplex später gereinigt werden soll.

Zur Optimierung der heterologen Expression in *Escherichia coli* wurden die Gensequenzen – entnommen aus NCBI – (NCBI Accession Number Tyrosinase: AY254101, Accession Number: *orf378* AY254102) verändert und für die heterologe Expression in *E.coli*-Zellen optimiert. Die „Optimierung“ der Nukleotidsequenz wird anhand sog. „Codon usage“-Tabellen für den jeweiligen Expressionsorganismus durchgeführt und trägt zu einer gesteigerten Proteinexpression bei.

Die vorgenommenen Änderungen erfolgten somit ausschließlich auf DNA-Ebene und führten zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz der Proteine. Die zwei charakteristischen Werte für die Optimierung genetischer Sequenzen sind der *CAI* (*Codon adaption Index*) sowie die *FOP* (*Frequency of optimal codons*). Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die Indizes vor bzw. nach der Optimierung. In grün sind jeweils die Werte nach der durchgeführten Optimierung gezeigt, in blau vorher. Allgemein gilt ein *CAI* von 1,0 als optimal für die heterologe Expression, wohingegen die Frequenz optimaler Codons im Idealfall bei 100 % liegt. Für die Tyrosinase sowie den ORF378 ist eine deutliche Verbesserung der Indizes zu beobachten, welches eine gesteigerte Proteinexpression erwarten lässt.

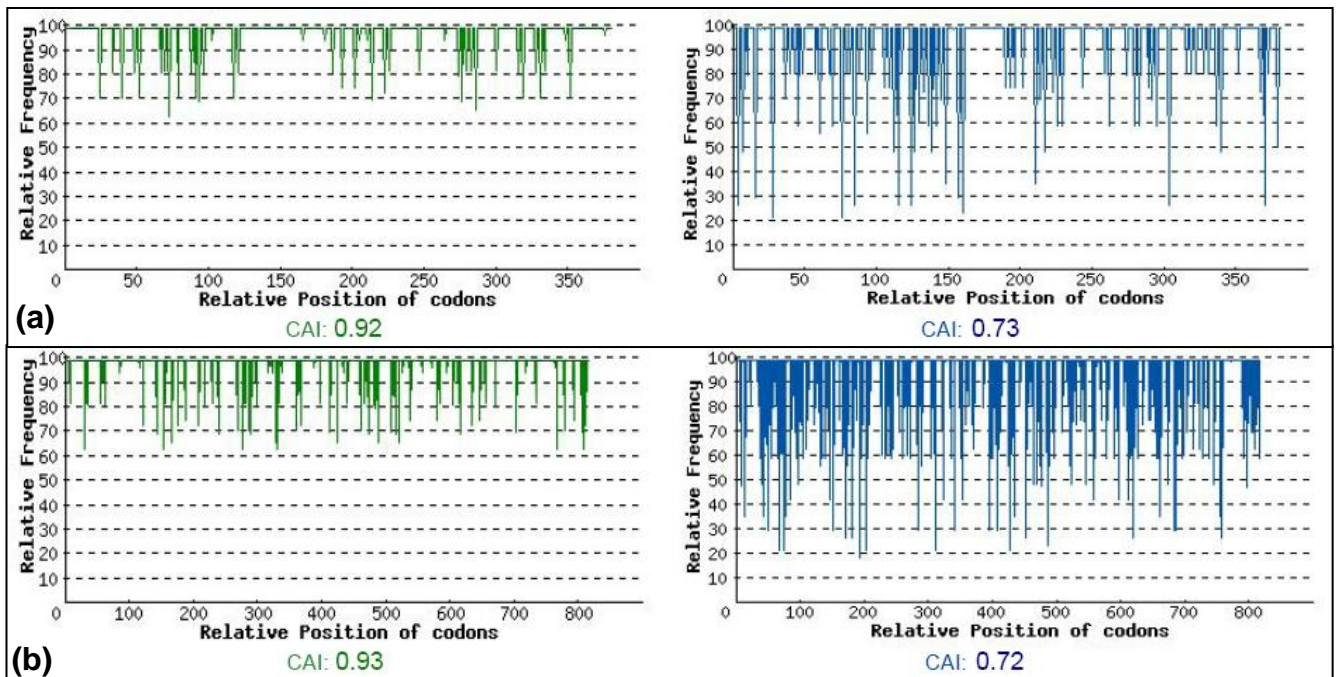


Abbildung 4.7: *CAI* Werte für orf378 (a) und Tyrosinase (b) nach (grün), und vor (blau) der Sequenzoptimierung.

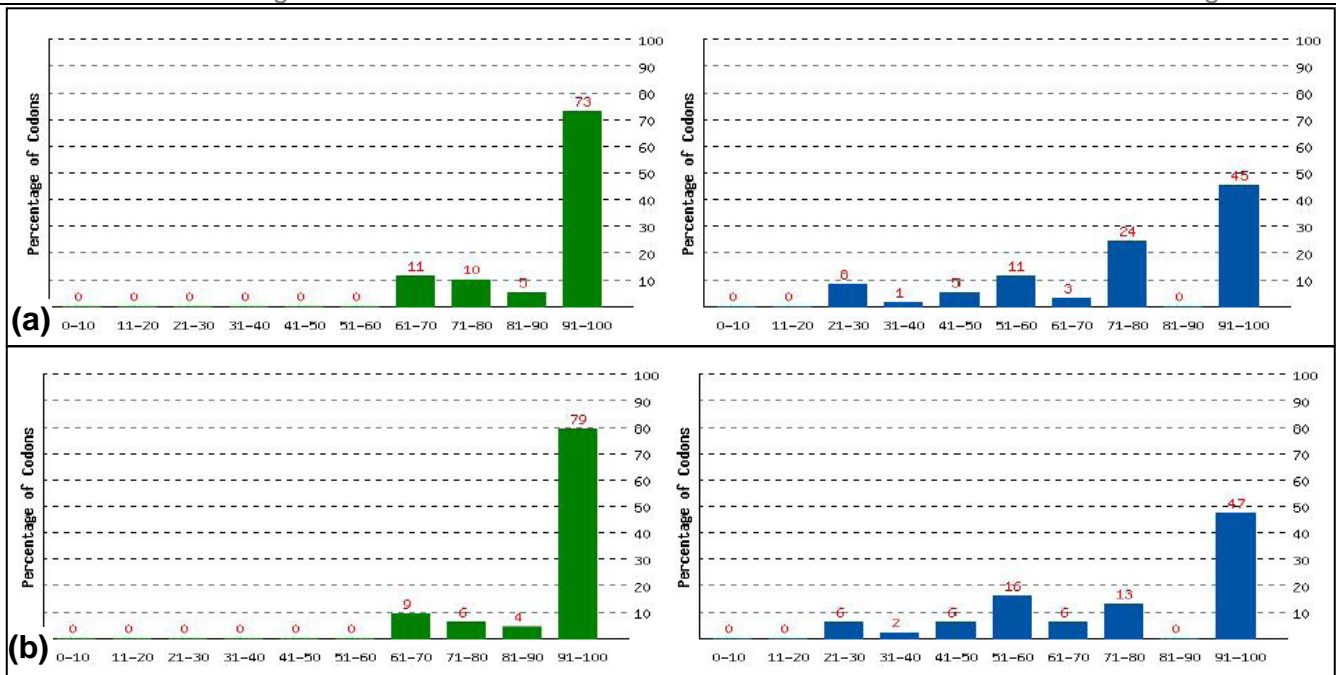


Abbildung 4.8: FOP Werte für orf378 (a) und Tyrosinase (b) nach (grün), und vor (blau) der Sequenzoptimierung.

Die optimierten Sequenzen wurden von GenScript synthetisiert, in den gewählten Vektor pET21a(+) kloniert und anschließend Kontroll-sequenziert (siehe Anhang). Das Plasmid enthält zwei Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI*, welche das klonierte Operon flankieren sowie ein Resistenzgen für Ampicillin, um eine spätere Selektion zu ermöglichen. Das entstandene Konstrukt ist in Abbildung 4.9 gezeigt.

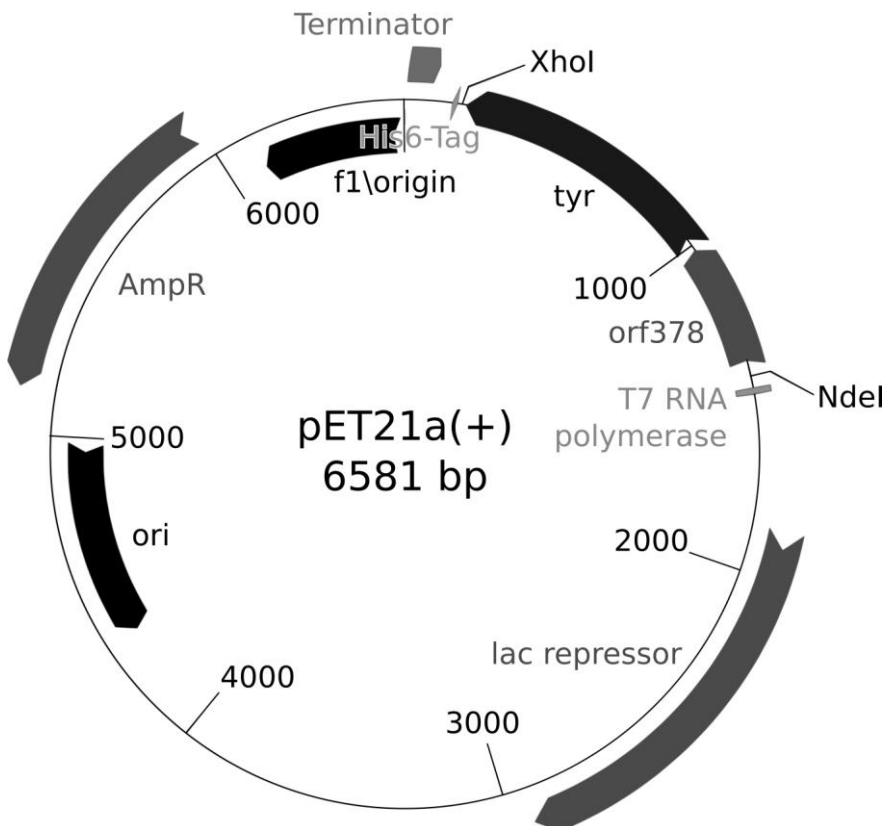


Abbildung 4.9: pET21a(+) mit kloniertem Melanin-Operon, bestehend aus orf378 und Tyrosinase. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors werden beide Proteine polycistronisch exprimiert, wobei die Tyrosinase mit einem C-terminalen Histidin₆-Tag versehen wird.

4.3 Expression und Reinigung des binären Tyrosinase-Komplexes

Die transformierten Zellen wurden in TB-Medium kultiviert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-2 wurde die Überexpression mit 1 mM IPTG induziert. Tests verschiedener Expressionsbedingungen (siehe Tabelle 4.2) ergaben eine gesteigerte Proteinexpression/-ausbeute nach 20 Stunden bei 20 °C. Im Vergleich zu den anderen Expressionsbedingungen konnte die Proteinausbeute um die 7-fache Menge gesteigert werden.

Tabelle 4.2: Tests verschiedener Expressionsbedingungen. Getestet wurde die Proteinexpression bei 28 °C und 20 °C nach verschiedenen Zeiträumen. Bei 20 °C und 20-stündiger Expressionszeit wurde die mit Abstand höchste Proteinausbeute erreicht.

Expressionsbedingung		mg/L Tyrosinase / Zellkultur
Temperatur (°C)	Zeit (h)	
28	4	0,121
	6	0,432
	8	0,114
20	20	0,802
	22	0,166

Nach 20-stündiger Expression bei 20 °C wurden die Zellen aufgebrochen und über mehrere Zentrifugationsschritte vom Zellysate getrennt. Der verbleibende Überstand wurde auf eine Nickel-Säule gegeben und mit Imidazol gewaschen. Ein beispielhaftes Elutionsprofil ist in Abbildung 4.10 gezeigt.

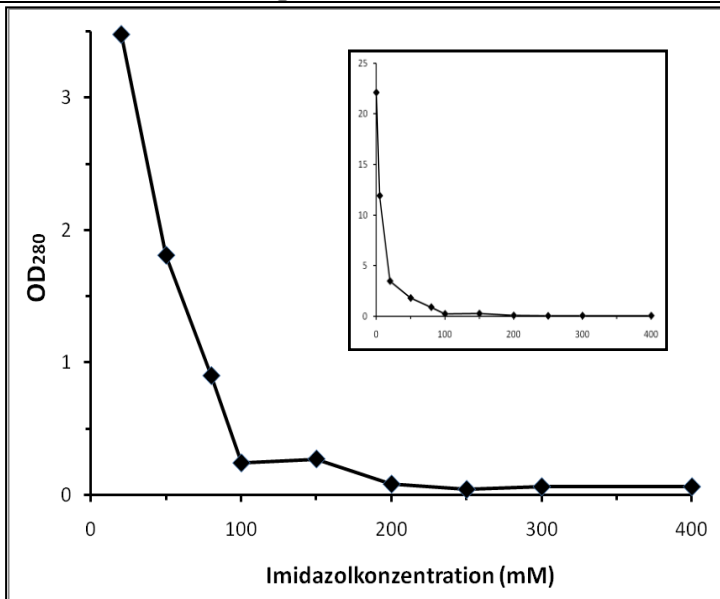


Abbildung 4.10: Elutionsprofil der Ni-NTA Säule nach dem Auftragen des aufgeschlossenen Zellysats. Die Gesamtproteinmenge wurde durch Absorption bei 280 nm gemessen. Das Insert zeigt die Elution ab 0 mM Imidazol und damit die Elution unspezifisch oder nicht gebundener Proteine.

Die eluierten Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert, um zu identifizieren, bei welchen Imidazolkonzentrationen der an die Nickel-Säule gebundene Tyrosinase-Komplex eluiert wird. Die in Abbildung 4.11 aufgetragenen Proben entsprechen den jeweiligen Fraktionen aus Abbildung 4.10. Während das Eluat der Nickel-Säule mit 50 mM Imidazol noch einen hohen Grad an Verunreinigung in der SDS-PAGE aufweist (eluiertes Gesamtprotein: OD₂₈₀ ~ 1,9, Abb.4.10), zeigt das Eluat bei 80mM Imidazol deutlich weniger Verunreinigungen in der SDS-PAGE (Abb.4.11). Das eluierte Gesamtprotein entsprach hier einer OD₂₈₀ ~ 0,8 (Abb.4.10). Die als TYR und ORF378 eingezeichneten Bande wurden als Tyrosinase und ORF378 angenommen (Literatur: Tyr: 31 kDa, ORF378: 13 kDa) und später über enzymatische Aktivität bestätigt.

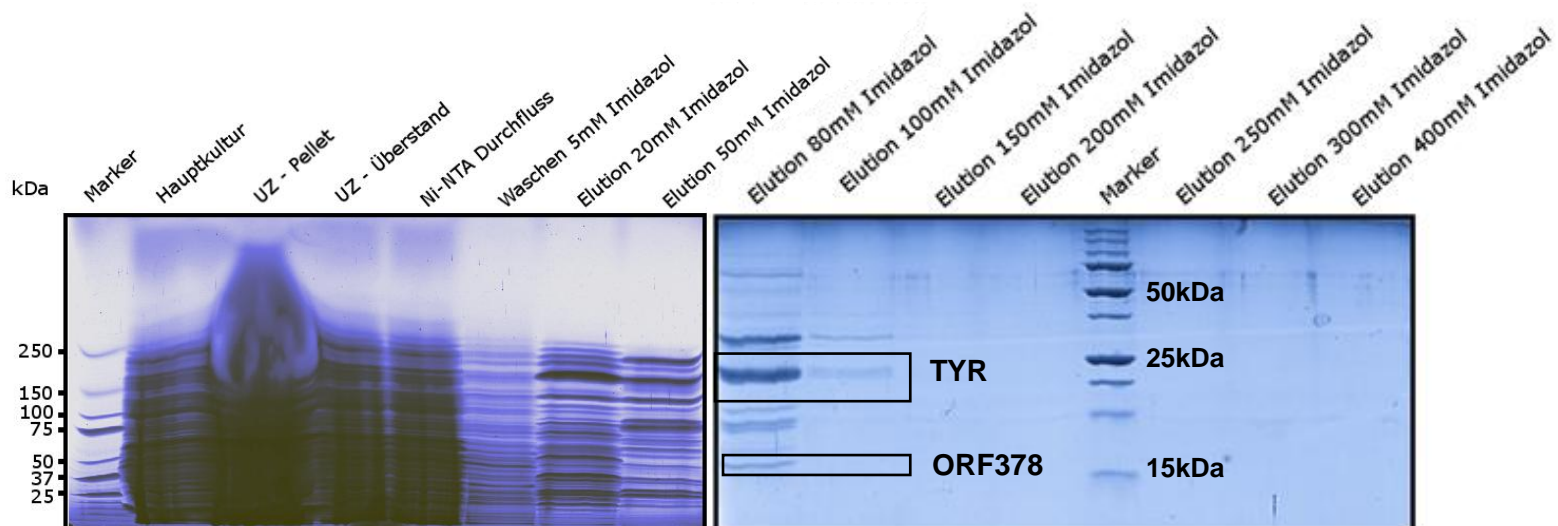


Abbildung 4.11: 17,5 % SDS-PAGE der Reinigungsschritte des Tyrosinase-Komplexes. Spalte 1, 13: Marker *PreScission Protein Standards* (Biorad), Spalte 2: Hauptkultur, Spalte 3: Pellet der Ultrazentrifugation nach Zellaufschluss, Spalte 4: Überstand der Ultrazentrifugation, Spalte 5: Durchfluss der Ni-NTA Säule, Spalten 6-12, 14-16 Elutionsschritte der Nickel Säule mit steigender Imidazolkonzentration. Erwartete Banden für Tyrosinase (31kDa) und ORF378 (13kDa), wurden mit leicht verändertem Laufverhalten vermutet, da die Proben nicht bei 95 °C inkubiert wurden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt, welches einen ausgeprägten Waschschrift der Nickelsäule mit 60 mM Imidazol, sowie die anschließende Elution mit 500 mM Imidazol vorsieht. Diese Vorgehensweise führte zu entsprechend vorgereinigtem Tyrosinase-Komplex mit nur noch geringfügigen Verunreinigungen.

4.4 Biochemische Untersuchungen des binären Tyrosinase-Komplexes

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung des binären Proteinkomplexes wurden Gelfiltrationsläufe vorgenommen. Eine der Affinitätschromatographie nachgeschaltete Gelfiltration (HiPrep 16/60 Sephacryl S100 HR) ergab einen monodispersen Peak bei etwa 75-minütiger Laufzeit. Bei weiterer Analyse konnte mittels nativer sowie denaturierender Gelelektrophorese gezeigt werden, dass es sich dabei um die Tyrosinase sowie das assoziierte Hilfsprotein ORF378 handelt.

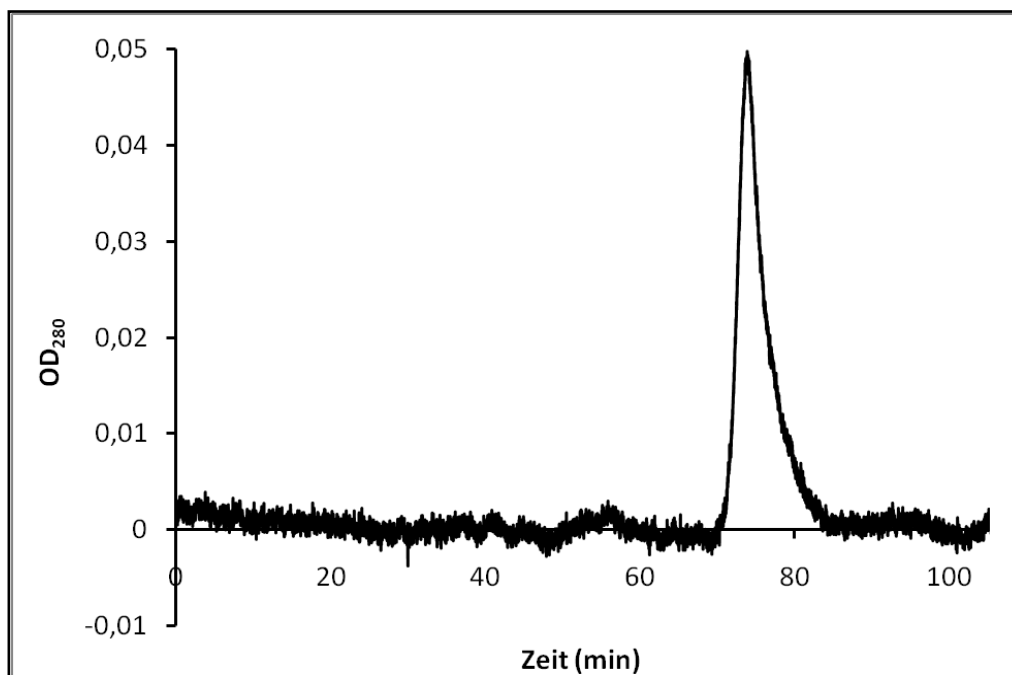


Abbildung 4.12: Gelfiltration (Sephacryl-100 Säule). Nach zirka 75-minütiger Laufzeit konnte ein monodisperser Peak beobachtet werden.

Die Tyrosinase, ebenso wie das Hilfsprotein, besitzen nur sehr wenige aromatische Aminosäuren, was die geringe Absorption bei 280nm erklärt, bei der die Proteinkonzentration bestimmt wird. Demnach ist die Absorption (OD_{280}) auch bei größeren Proteinmengen noch immer gering. Für die gezeigte Gelfiltration wurden 2,1 mg vorgereinigtes Protein verwendet, was in einem monodispersen Peak mit einer Absorption von 0,05 resultierte. Die Unregelmäßigkeiten der Grundlinie sind auf die

Messapparatur zurückzuführen. Die Asymmetrie des Peaks ist eventuell durch die geringe Dissoziation des Tyrosinase-Caddie-Komplexes in seine Monomere zu erklären.

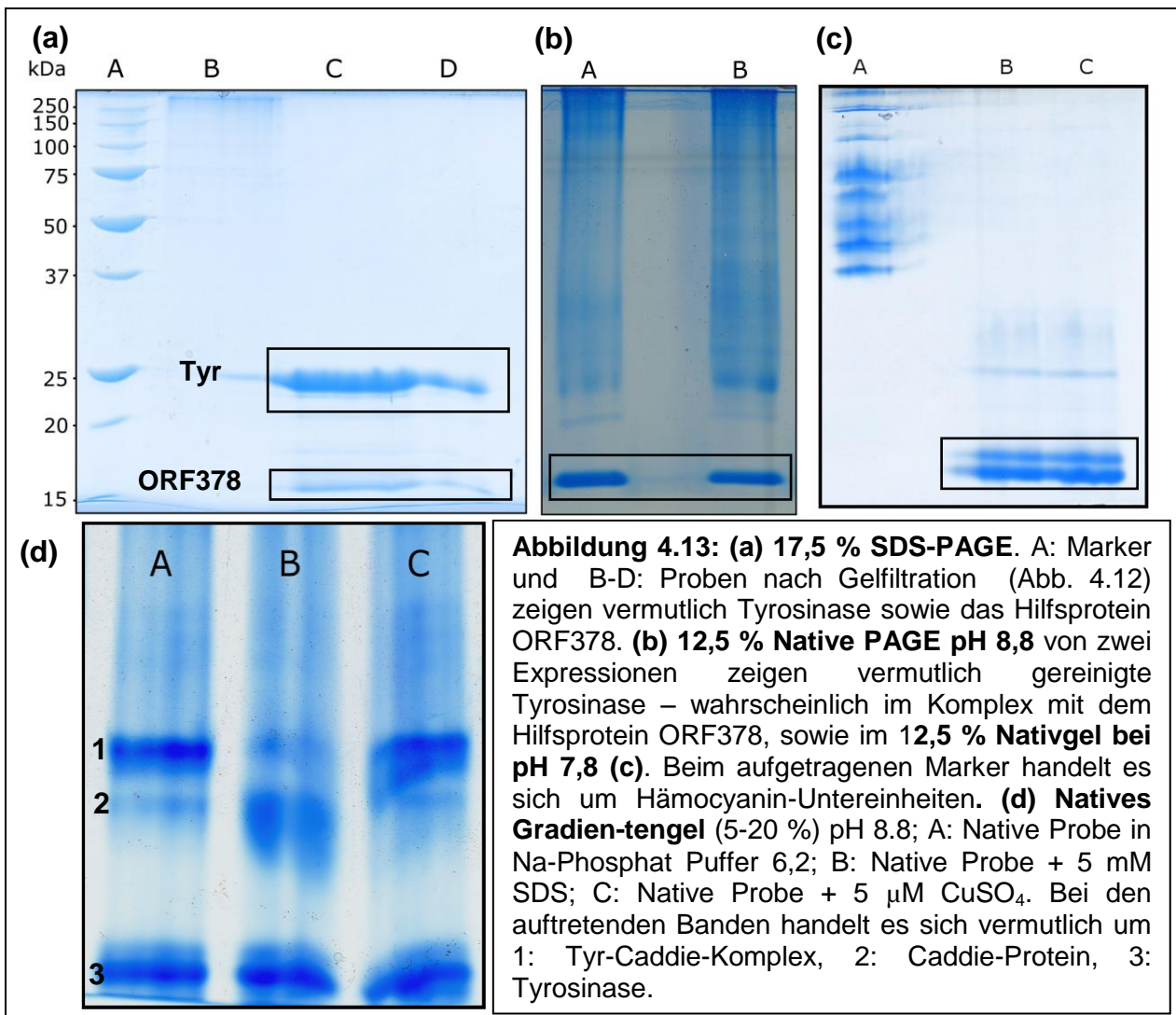


Abbildung 4.13 zeigt, dass die Tyrosinase im Komplex mit ORF378 bis auf geringfügige Verunreinigungen gereinigt werden konnte. Es wurde beobachtet, dass die Tyrosinase in Fällen, in denen die mit SDS-versetzte Probe nicht gekocht wurde (95 °C für 6 min) meist bei 25 kDa in der SDS-PAGE lief, im Gegensatz zu den erwarteten ~31 kDa (Abb. 4.14 a). Die veränderte Laufgeschwindigkeit ist damit auf die eventuell nicht vollständige Entfaltung des Proteins zurückzuführen. Damit einhergehend ist ein weiterer Grund für ein verändertes Laufverhalten die mögliche erhöhte und damit nicht stöchiometrische Bindung von SDS (normal: 1,4 g SDS/g Protein), aufgrund hydrophober Regionen eines Proteins.

Die auftretende Doppelbande in Nativgelen mit pH 7,8 deutet möglicherweise auf die teilweise Dissoziation der Tyrosinase vom Hilfsprotein hin, wodurch eine Bande vermutlich dem Tyrosinase-Komplex zuzuordnen ist und die Zweite eventuell der dissoziierten Tyrosinase. Zur Identifizierung

wurden Proteinbanden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt. Es wurden jedoch bislang keine Ergebnisse erhalten.

In Nativgelen bei pH 8,8 trat hingegen nur eine Proteinbande auf - der heterodimere Komplex bleibt also vermutlich erhalten. Eine mögliche Begründung für den Zerfall bei pH 7,8 könnte die Destabilisierung des Komplexes durch Protonierung einzelner Aminosäuren in weniger basischem Puffer sein. Diese Vermutung wird durch spätere enzymatische Untersuchungen (Kap. 4.5), welche die Aktivierung der Tyrosinase bei leicht saurem (pH 6,2), nicht aber in basischem Puffer zeigen, bestätigt.

Mit Hilfe nativer Gradientengele wurde die Dissoziation des Komplexes weiterführend untersucht (Abb. 4.13). Die Zugabe von 5 mM SDS (Abb. 4.13 d)) zeigt vermutlich ebenso wie die Zugabe von 5 μ M CuSO₄ eine teilweise Dissoziation des binären Tyrosinase Komplexes (1) in Tyrosinase (3) und Hilfsprotein (2). Diese Angaben sind jedoch mutmaßlich, da die Proteinbanden aufgrund fehlender massenspektroskopischer Analyse nicht eindeutig zugewiesen werden können. Unterstützend ist jedoch aus Kapiteln 4.6 und 4.7 vorzugreifen, wo die Dissoziation des Komplexes durch Zugabe von SDS und Kupfersulfat bei Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung sowie analytischer Ultrazentrifugation ebenfalls beobachtet werden konnte.

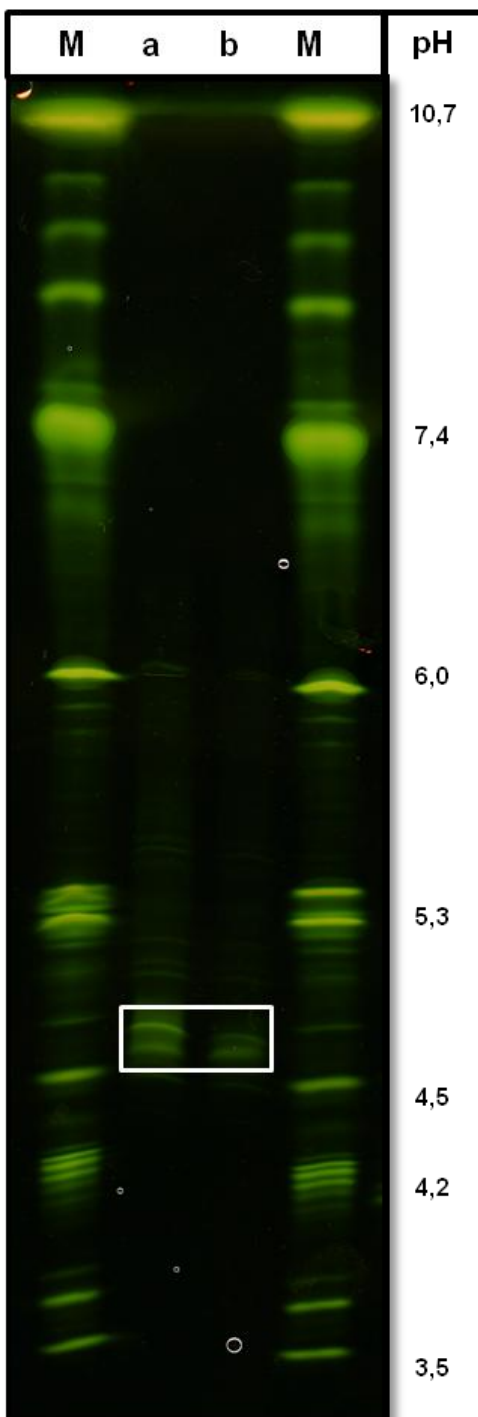
Um die gereinigten Proteine weiter zu charakterisieren und als Tyrosinase und ORF378 zu identifizieren, erfolgte eine Berechnung der molekularen Masse (M_w) anhand mehrerer SDS Gele. Unter Verwendung des Programms *ImageJ* sowie des PlugIns *MolWeight* (Leipzig), wurde die molekulare Masse anhand der Markerbanden berechnet.

Aus Tabelle 4.3 ist zu entnehmen, dass die Literaturwerte von 31,0 kDa für die Tyrosinase sowie 13,3 kDa für den ORF378 in guter Näherung berechnet werden konnten. Die Differenzen im Molekulargewicht liegen in beiden Fällen unter 0,5 kDa, was für die Berechnung anhand von SDS-Gele erstaunlich genau ist (Originalgele siehe Anhang).

Tabelle 4.3: Berechnete Molekulargewichte von Tyrosinase und ORF378 auf der Basis einzelner SDS-Gele (Angaben in kDa). Die den Literaturangaben (bestimmt über die Primärsequenz) am besten entsprechende Berechnung ist blau hinterlegt. Die jeweiligen Durchschnittswerte sind grün hinterlegt, während die Literaturangaben mit roter Hinterlegung gekennzeichnet sind. Die Proben wurden hierzu für 6 min bei 95 °C inkubiert.

Tyrosinase	ORF378
35,3	12,8
30,0	13,8
28,7	16,3
31,1	14,2
30,5	14,0
31,0	13,3

Zur vollständigen biochemischen Charakterisierung des Proteinkomplexes sowie der Tyrosinase wurde das gereinigte Protein einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Es ist anzunehmen, dass es während der Fokussierung zur Dissoziation des gereinigten binären Tyrosinase-Komplexes kam, denn es sind sowohl das Hilfsprotein als auch die Tyrosinase getrennt voneinander zu sehen. Die isoelektrischen Punkte der Tyrosinase sowie des Hilfsproteins wurden nach Färbung des Gels mit SERVA Violett mit Hilfe der Software ImageJ und eines Plugins von Christian Kreuzfeldt, PHASE GmbH, Lübeck, Germany berechnet. Die aus der IEF berechneten pI-Werte (isoelektrischer Punkt) ergaben 4,8 für die Tyrosinase bzw. 4,9 für das Hilfsprotein.



Anhand der Aminosäuresequenz wurde für die Tyrosinase aus *Streptomyces* ein pI von 6,2 vorhergesagt (expasy.org), während für das Hilfsprotein ein pI von 6,4 berechnet wurde. Die experimentell anhand der isoelektrischen Fokussierung ermittelten Werte zeigen eine deutliche Abweichung von den theoretischen Werten.

Wie die Fokussierung zeigte, liegen die isoelektrischen Punkte der beiden Proteine eng beieinander. Ein Unterschied zwischen den experimentell ermittelten und den errechneten Werten mag daran liegen, dass in letzterem Fall der Durchschnitt der pI-Werte aller einzelnen Aminosäuren errechnet wird. Bei der isoelektrischen Fokussierung behalten die Proteine hingegen ihre Tertiärstruktur, so dass lediglich die Außen liegenden Aminosäuren zum Tragen kommen.

Abbildung 4.14: Isoelektrische Fokussierung des binären Tyrosinase-Komplexes. Die Fokussierung erfolgte bei 1.000 V, 3 mA, 12 W, 3 h, sowie 3.500 Vh. Die beiden auftretenden Banden (weißer Kasten) entsprechen wahrscheinlich der monomeren Tyrosinase sowie dem Hilfsprotein ORF378. Aufgetragen wurden 10 µl **a)** und 5 µl **b)** Probenvolumen. Die verwendete Probe besaß einen Reinheitsgrad von >90 %. Als Marker (**M**) wurde der *IEF Marker liquid Mix* von SERVA verwendet. Die Färbung erfolgte mit SERVA Violett. Zur deutlicheren Darstellung wurden die Farben am Computer invertiert.

4.5 Enzymatik

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der Tyrosinase im Komplex mit dem Hilfsprotein ORF378 erfolgten Tests zur Funktionalität. Bei Tests verschiedener Substrate zeigte die Tyrosinase jeweils keine Aktivität. Erst durch Zugabe von CuSO_4 in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ zeigte die Tyrosinase einen Umsatz von sowohl mono- als auch diphenolischen Substraten. Durch die Zugabe von SDS in verschiedenen Konzentrationen konnte in meinen Ansätzen keine Aktivität gezeigt werden.

Die getesteten Substrate sind in Abbildung 4.15 gezeigt. Es zeigte sich, dass verschiedene Substrate unterschiedlich gut umgesetzt werden konnten. Als exemplarisches Beispiel ist der sehr geringe Umsatz von L-DOPA zu nennen, der dem hohen Umsatz von Kaffeesäure als natürlichem Substrat der Tyrosinase entgegensteht (persönlicher Kommentar H.Claus). Weitere Tyrosinase-Substrate wie L-Tyrosin oder Tyramin wurden gar nicht umgesetzt.

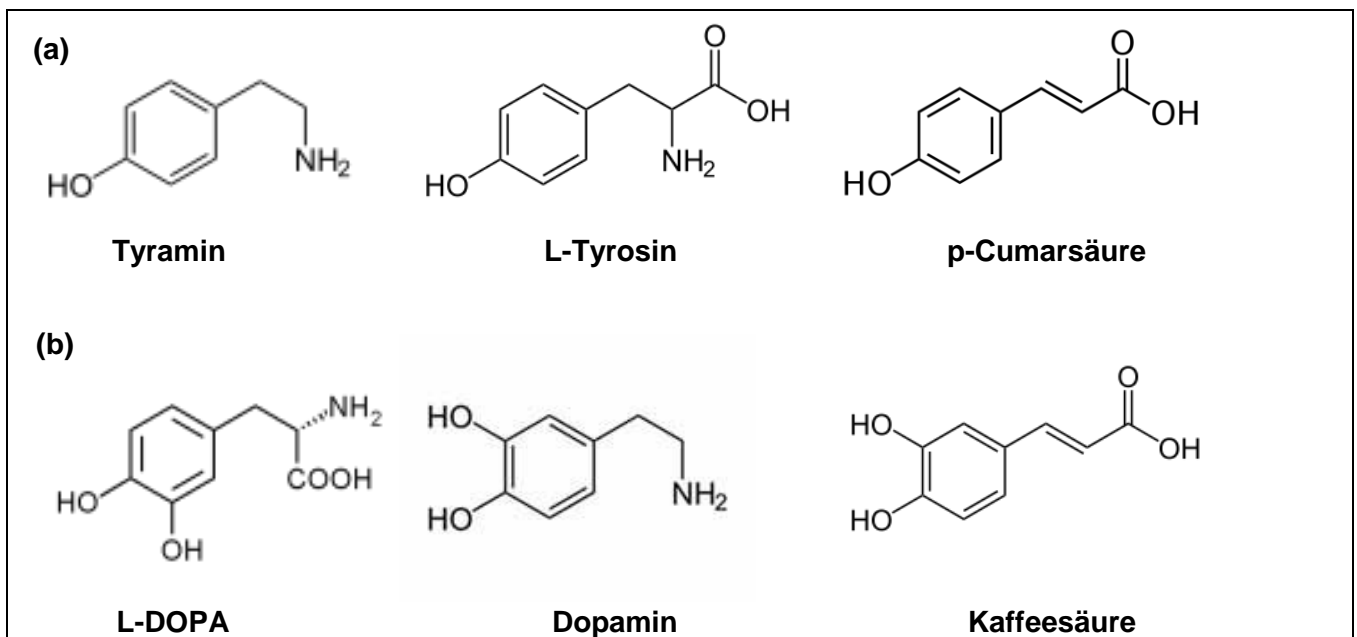


Abbildung 4.15: Getestete mono- (a), und diphenolische (b) Substrate der Tyrosinase.

Tabelle 4.4: Getestete mono- (blau hinterlegt), und diphenolische (rot hinterlegt) Substrate für die Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*. Eine Aktivität der Tyrosinase und der quantitative Umsatz des Substrats wurde mit (+) indiziert, während mit (---) gekennzeichnete Substrate nicht umgesetzt werden konnten. Die Aktivierung erfolgte mit jeweils 5 μM CuSO_4 bei pH 6.2, bei 25 °C.

Substrat	Aktivität
Tyramin	---
L-Tyrosin	---
p-Cumarsäure	+++
L-DOPA	+
Dopamin	---
Kaffeensäure	+++

Tabelle 4.4 zeigt eine Übersicht der getesteten Substrate sowie ihren quantitativen Umsatz. In Abbildung 4.16 sind die dazugehörigen Messungen der auf Aktivität getesteten Substrate gezeigt (jeweils das Produkt- [links], Referenz- [Mitte] und Differenzspektrum [rechts]). Die Messung der Produktspektren erfolgte mit zugegebenem Substrat, sowie gereinigtem Enzym und 5 μM CuSO_4 , während den Referenzspektren zugrundeliegenden Ansätzen kein Enzym zugegeben wurde. Als Puffersysteme wurde NaPO_4 -Puffer sowie Tris-Puffer verwendet. Die Differenzspektren resultieren aus den Produktspektren, von welchen das jeweilige Referenzspektrum abgezogen wurde um autokatalytische Effekte durch den Puffer vom enzymatischen Umsatz zu unterscheiden.

Die von Harald Claus (Institut für Mikrobiologie, Uni Mainz) vorgeschlagenen von Lignin abgeleiteten Substrate, Kaffeensäure (Absorptionsmaxima bei 296 und 316 nm) und p-Cumarsäure (Absorptionsmaxima bei 288 und 307 nm) wurden katalytisch umgesetzt (Abb. 4.16 a),b)), während das Substrat L-Dopa (Absorptionsmaxima bei 305 und 475 nm) in nur geringen Mengen umgesetzt wurde (Abb. 4.16 c)). Auffällig ist der autokatalytische Umsatz von L-Dopa aufgrund des Puffers. Es wurde bereits beobachtet, dass L-Dopa autoxidativ umgesetzt werden kann (Migheli et al. 1999; Basma et al. 1995.).

Tyramin, L-Tyrosin und Dopamin wurden enzymatisch nicht umgesetzt. Die jeweiligen Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 zusammengefasst. Die bei L-Tyrosin beobachtete Veränderung der Absorption bei zirka 280nm (Abb. 4.16 d)) ist auf Löslichkeitseffekte des Substrats zurückzuführen, welches in diesem Fall nicht ausreichend verdünnt verwendet wurde. Die Tyramin-Spektren (Abb. 4.16 e)) zeigen außer einer geringen Messungenauigkeit, welche sich am offensichtlichsten im Differenzspektrum zeigt, weder autoxidative Wirkung noch Lösungsmittelleffekte, sowie keinen Umsatz durch die Tyrosinase.

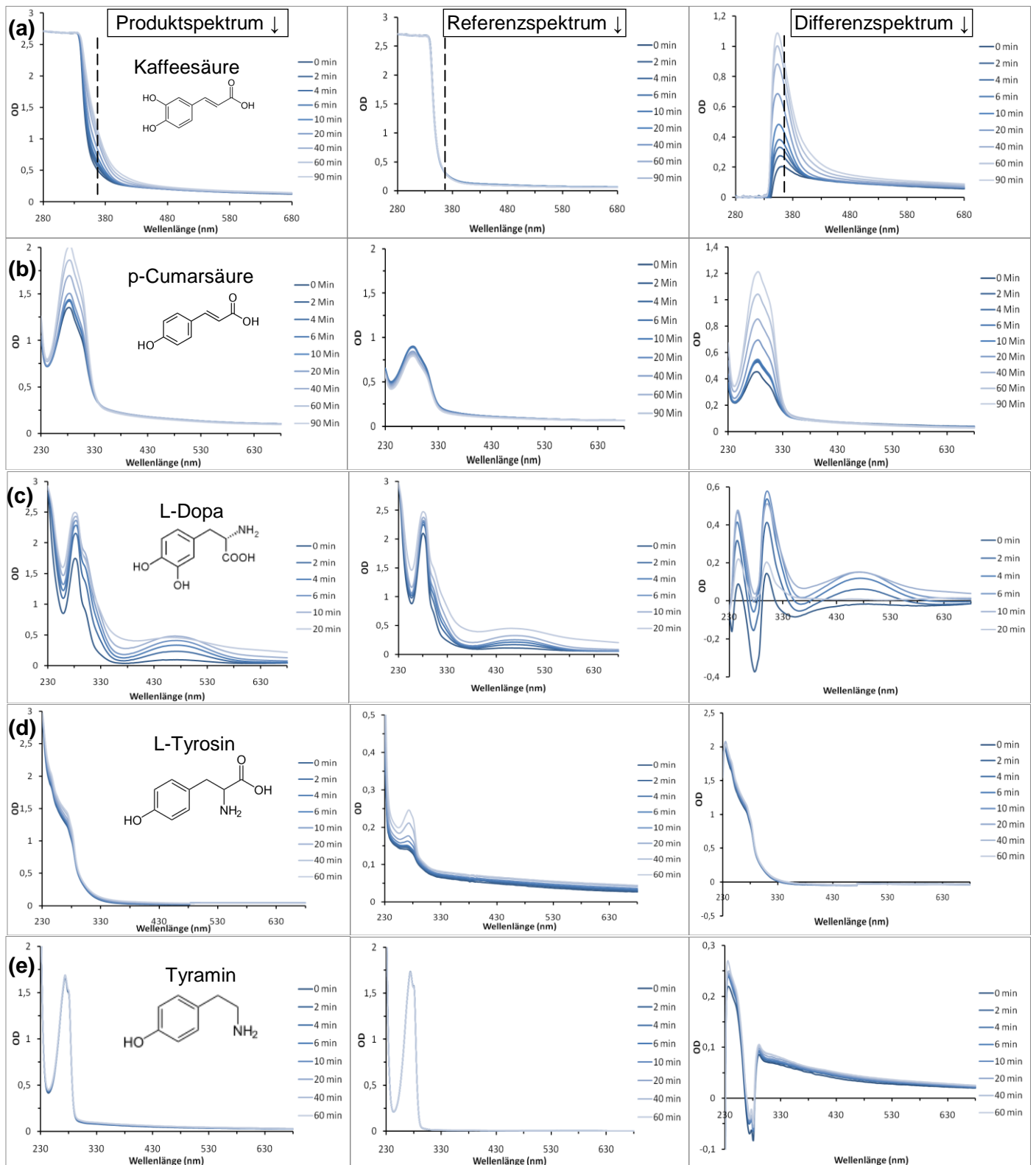


Abbildung 4.16: Enzymatische Messungen der heterolog exprimierten Tyrosinase. Gezeigt ist jeweils das Produkt-, Referenz- und Differenzspektrum für den enzymatischen Umsatz. Für alle Messungen wurde eine Endkonzentration an 44 $\mu\text{g/ml}$ Tyrosinasekomplex eingesetzt. **a)** 1 mM Kaffeesäure in 0,1 M NaPO_4 pH 6,2 mit 5 μM CuSO_4 ; Zur Orientierung ist die schwarz gestrichelte Linie hinzugefügt; **b)** 50 μM p-Cumarsäure in 0,1 M NaPO_4 pH 6,2 mit 5 μM CuSO_4 ; **c)** 1 mM L-Dopa in Tris-Puffer pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 μM CuSO_4 ; **d)** 1 mM

Tyrosin in Tris/HCl pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 μM CuSO_4 ; **e)** 1 mM Tyramin in Tris/HCl pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 μM CuSO_4 .

Abbildung 4.17 zeigt den Umsatz von Kaffeesäure a), b) und d), sowie p-Cumarsäure c). In Abbildung d) ist außerdem gezeigt, dass ohne die Zugabe von Kupfersulfat keine Aktivierung der Tyrosinase erfolgt. Deutlich zu erkennen ist die charakteristische *Lag-Phase* (10 min) bei der Umsetzung des monophenolischen Substrats p-Cumarsäure c). Die gewählten Wellenlängen entsprechen jeweils der maximalen Absorption des jeweiligen Substrats.

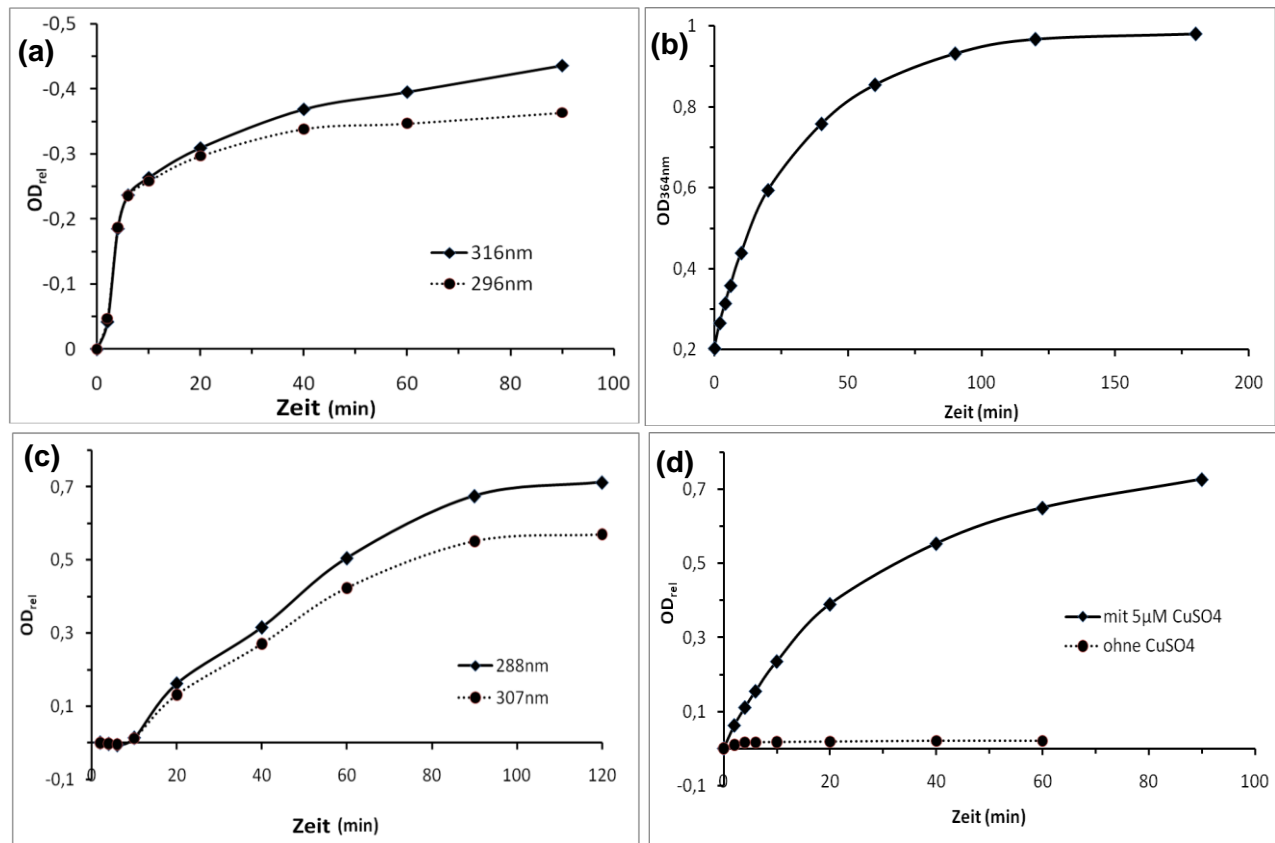


Abbildung 4.17: Enzymatische Messungen des Umsatzes an diphenolischem Substrat Kaffeesäure **a)** 50 μM und **b)** 1 mM. **c)** Umsatz an monophenolischem Substrat p-Cumarsäure (4-Hydroxy-Zimtsäure) [50 μM]. **d)** Umsatz von 1 mM Kaffeesäure bei Zugabe von 5 μM Kupfersulfat sowie ohne Kupfersulfat.

Aufgrund der hohen Eigenabsorption von p-Cumarsäure und Kaffeesäure, welche schon ab 2 mM oberhalb einer optischen Dichte von 2 bei 288 nm, bzw. 316 nm lag (was sich außerhalb des linearen Messbereichs befindet), konnten kinetische Untersuchungen der Tyrosinase nur begrenzt durchgeführt werden. Wellenlängen mit niedrigerer Absorption erwiesen sich als nicht geeignet und konnten nicht kinetisch verwendet werden. Für Kaffeesäure konnte anhand niedriger Substratkonzentrationen (0,1-2 mM) in grober Näherung ein K_M von $1,45 \pm 0,2 \mu\text{M}$ sowie ein V_{MAX} von $21,4 \pm 2,0 \mu\text{M}$ im Michaelis-Menten Diagramm bestimmt werden (siehe Abb. 4.18). Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

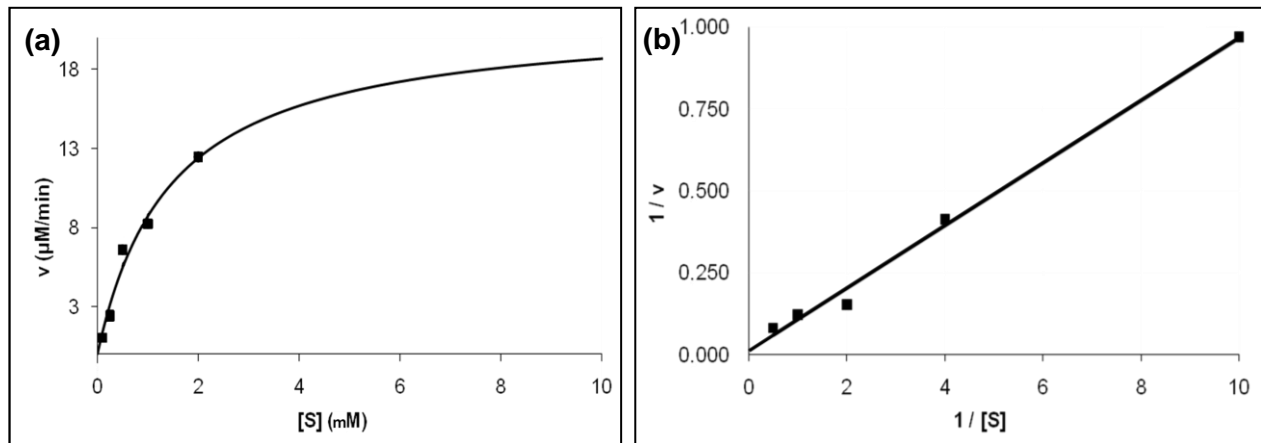


Abbildung 4.18: Kinetik der Tyrosinase. a) Michaelis-Menten Darstellung b) Lineweaver-Burk Diagramm. Verwendetes Substrat: Kaffeesäure. Bedingungen: $C_{\text{Tyr-Caddie}} = 44 \mu\text{g/ml}$, 25°C , $0,1 \text{ M NaPO}_4$ pH 6,2 mit $5 \mu\text{M CuSO}_4$.

Weiterhin wurde die autoxidative Wirkung verschiedener Puffer bei pH 6,2 (NaPO_4), 7,9 (Tris-Puffer), und 10,4 (Glyzin) auf die verwendeten Substrate untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf L-Dopa gerichtet (siehe Abb. 4.19), welches in bisherigen Experimenten durch seinen autoxidativen Umsatz aufgefallen war (Abb. 4.16 c)). Die Zunahme der Gesamtabsorption ist bezeichnend für die Bildung von Melanin (Abb. 4.19 a)), welches einen breiten Absorptionsbereich besitzt. Dieser beginnt im roten Bereich des sichtbaren Lichtes ($\sim 700 \text{ nm}$) und steigt von dort zunehmend und stetig an bis zum violetten Ende des Spektrums ($\sim 400 \text{ nm}$).

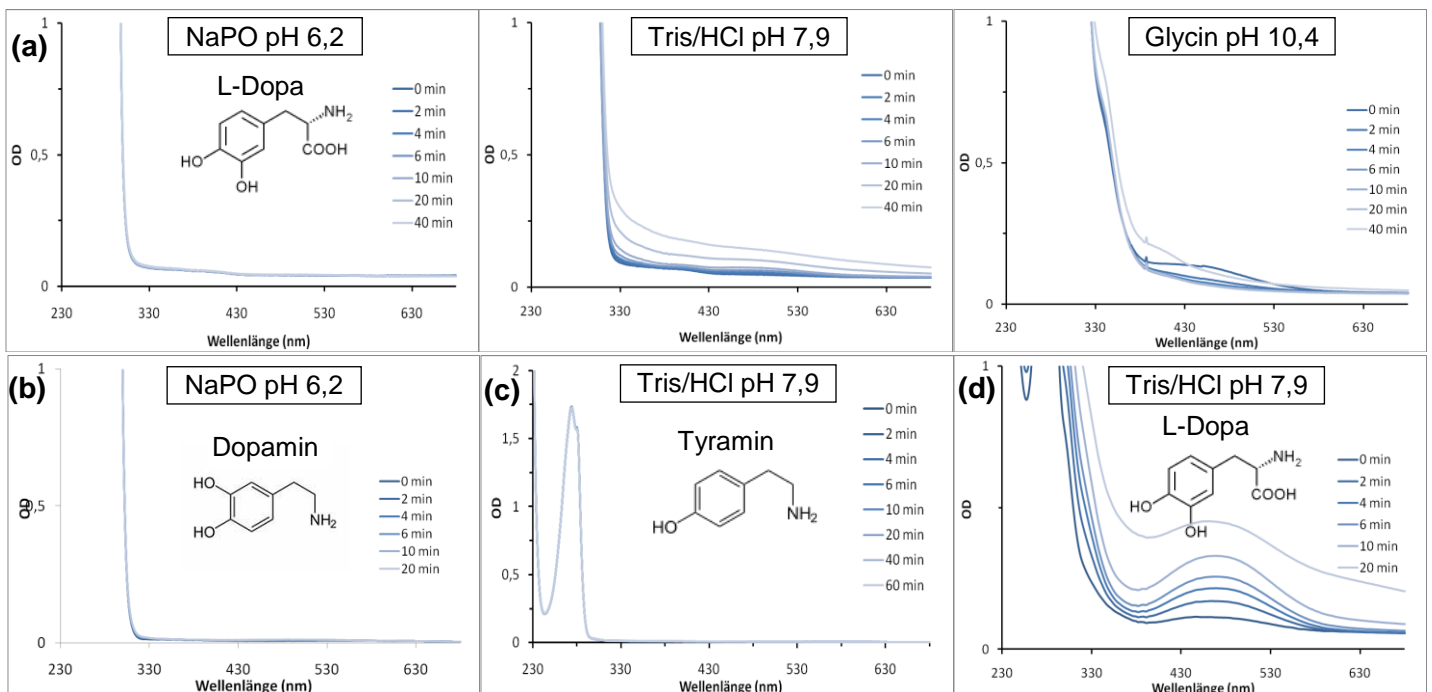


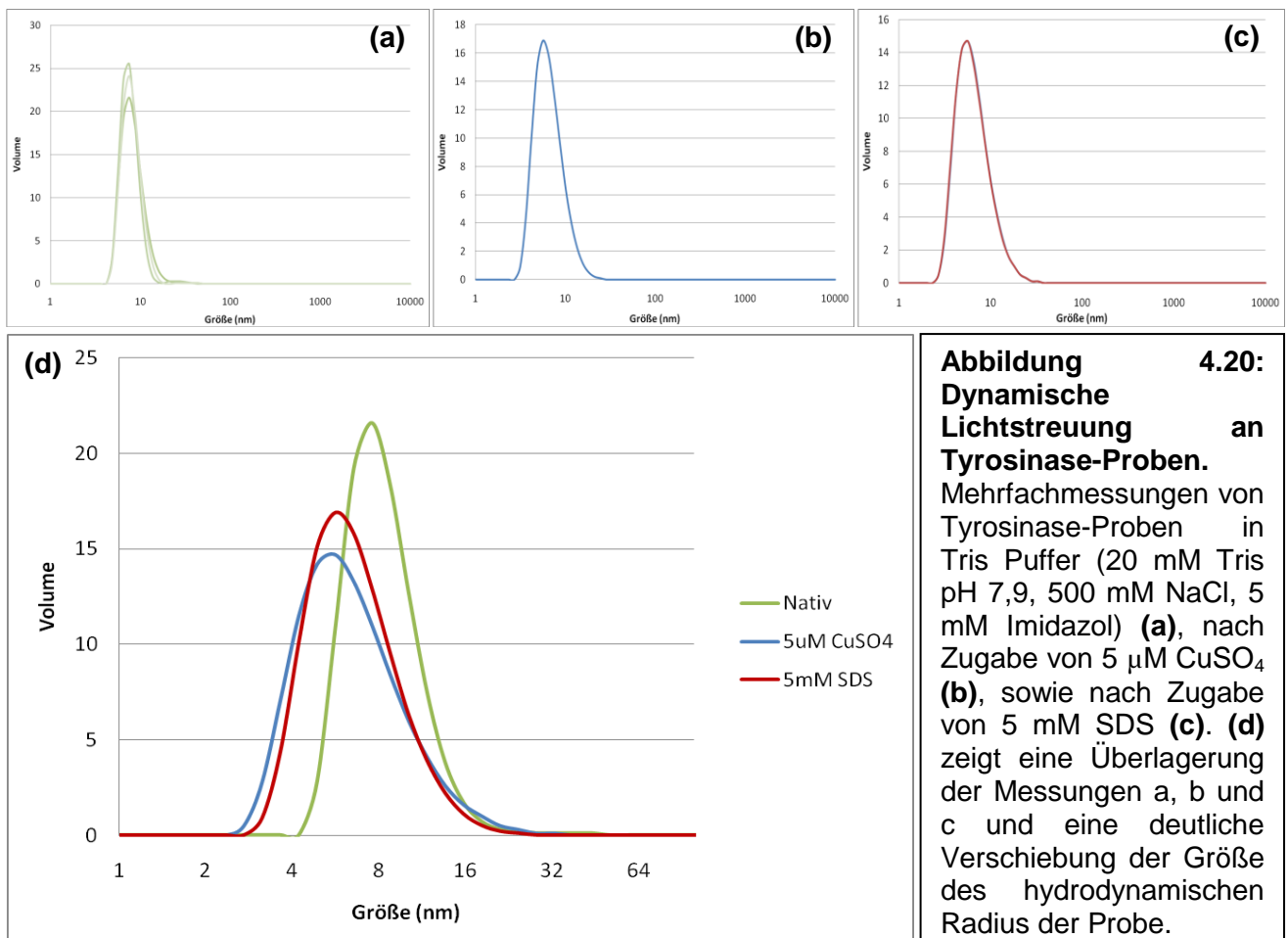
Abbildung 4.19: Autooxidation von Tyrosinase-Substraten. a) 1 mM L-DOPA in $0,1 \text{ M NaPO}$ Puffer pH 6,2; 20 mM Tris-Puffer pH 7,9; $0,1 \text{ M Glycin}$ Puffer pH 10,4 **b)** 20 mM Dopamin in $0,1 \text{ M NaPO}_4$ Puffer pH 6,2 **c)** 1 mM Tyramin in 20 mM Tris/HCl pH 7,9; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol **d)** 1 mM L-Dopa in 20 mM Tris-Puffer pH 7,9; 5 mM Imidazol; $5 \mu\text{M CuSO}_4$.

Die starke Zunahme der Absorption bei 475 nm ist Charakteristisch für die Bildung von Dopachrom und wurde in Tris-Puffer unter Zugabe von CuSO_4 beobachtet (Abb. 4.19 d)). Tyramin und Dopamin zeigten keine Autoxidation, unabhängig vom verwendeten Puffer (Abb. 4.19 b),c)).

Die Beobachtete Autoxidation von Substraten wurde schon früher dokumentiert (Migheli et al. 1999). Catechol-Derivate können autooxidiert werden (Basema et al. 1995) und o-Semichinone bilden, welche nach Disproportionierung die korrespondierenden o-Chinone sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden.

4.6 Dynamische Lichtstreuung

Um den Komplex aus Tyrosinase und ORF378 bzw. die Trennung der beiden Proteine voneinander zu untersuchen wurden Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung durchgeführt. Gemessen wurde der hydrodynamische Radius der Proteine in Lösung in nm. Bei der Tyrosinase, dem Hilfsprotein ORF378 sowie dem Komplex aus beiden handelt es sich um angenähert globuläre Proteine – was Voraussetzung für die folgenden Versuche ist.



Die Messung einzelner Peaks für die monomere Tyrosinase, sowie das dissoziierte Hilfsprotein waren aufgrund der Auflösungsbegrenzung des Gerätes nicht möglich. Die Dissoziation kann jedoch in der Halbwertsbreite der Peaks beobachtet werden (siehe Abb. 4.20). Die *Peakbreite* der mit CuSO₄ und SDS versetzten Proben, welche die Peaks zweier Proteine beinhalten (Hilfsprotein und Tyrosinase) ist größer als die der nativen Tyrosinase Probe, welche nur ein Protein(-komplex) aufweist.

Die zu Abbildung 4.20 zugehörigen Messwerte sind in Tabelle 4.5 gezeigt. Bei den Messungen der nativen Tyrosinase-Proben befindet sich der hydrodynamische Durchmesser der gemessenen Probe bei zirka 7 nm. Der Durchmesser verkleinert sich nach Zugabe von CuSO₄ sowie SDS auf ~5 nm. Die gemessenen Durchmesser für den binären Komplex, sowie das Tyrosinase- und ORF378-Monomer entsprechen in guter Näherung den anhand der pdb-Datei (1WX4) bestimmten Durchmessern von 6,8 nm (Komplex), 5,1 nm (Tyrosinase-Monomer) und 2,1 nm (ORF378-Monomer). Die Berechnung erfolgte über die Volumenberechnung einer Kugel ($V = \frac{4}{3}\pi r^3$). Das Volumen wurde mit Hilfe des Programms *Yasara* bestimmt. Es ist also davon auszugehen, dass unter Zugabe von Kupfersulfat, sowie SDS der Komplex aus Tyrosinase und Hilfsprotein dissoziiert.

Tabelle 4.5: Auswertung der Daten der dynamischen Lichtstreuung. Die gezeigten Daten beruhen auf der *Numbers*-Verteilung.

	<i>Pdl</i>	<i>Pdl Width</i> (d.nm)	<i>Z-Average</i> (d.nm)	<i>Width</i> (nm) - <i>Numbers</i>	Durchmesser (nm) - Numbers	Durchmesser (nm) Berechnung aus Volumen der pdb-Datei
Nativ	0,38	8,48	13,78	1,71	7,14	6,8
	0,32	6,79	12,27	1,41	6,96	
	0,30	6,44	11,79	1,57	7,16	
	0,32	6,92	12,27	1,41	6,96	
CuSO ₄	0,28	5,10	9,609	1,53	5,19	5,1
SDS	0,25	5,95	11,97	1,57	4,79	
	0,30	6,75	12,33	1,56	4,75	

Die Verteilungen können auf zweierlei Weisen angegeben werden, als *Number*- und als *Volume*-Werte. Bei *Numbers* sind die Peaks proportional zur Anzahl der Partikel, d.h. kleine Partikel fallen in gleicher Weise ins Gewicht wie große Partikel. In der *Volume*-Verteilung entspricht die Peak-Größe dagegen der Partikelgröße. Somit werden kleinere Partikel bei gleicher Anzahl als schwächerer Peak dargestellt (Pecora, 1985). Die auf der *Volume*-Verteilung basierenden Werte wurden verworfen, da diese aufgrund des Einbezugs von Verunreinigungen durch große Partikel – makromolekulare Partikel wie Staub - überschätzt sind (*Technical note*, Malvern).

Zur Interpretation der gemessenen Daten wird der *Z-Average* Wert verwendet, um die Polydispersität der Probe zu beschreiben. Dieser gibt die Halbwertsbreite der Partikelpopulation an und ist ein Maß für die Streuung innerhalb einer Population. Ebenso gibt der Pdl (Polydispersitätsindex), welcher jedoch nur für Intensitätsmessungen zu verwenden ist, an wie hoch die Dispersität der Probe ist. Der Pdl gibt die Homogenität der Probe an und sollte möglichst klein sein ($\leq 0,3$) um einen Mindestreinheitsgrad der Probe zu gewährleisten. Im Gegensatz zum *Z-Average* Wert bezieht sich der Pdl auf die gesamte Probe.

4.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die Dissoziation des Tyrosinase-Caddie-Komplexes wurde zusätzlich mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Durch Sedimentationsläufe wurden Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten des Tyrosinase-Caddie-Komplexes sowie der aus der Dissoziation des Komplexes hervorgehenden Monomere aufgezeigt.

Die Zentrifugation erfolgte bei 42.000 rpm bei 4 °C. Der Tyrosinase-Caddie-Komplex ($c = 0,5$ mg/ml) sedimentierte nach zirka 5-stündiger Laufzeit (siehe Abb. 4.21 (a)); Die Daten konnten ausgewertet werden (Kriterien der Auswertung siehe Abb. 4.21) sowie das Molekulargewicht der sedimentierten Probe mit Hilfe der Svedberg-Gleichung und den durch dynamische Lichtstreuung ermittelten hydrodynamischen Radien berechnet werden.

$$M_r = sRT/[D(1-v\rho)]$$

M_r : Molekulargewicht, D : Diffusionskoeffizient, v : Volumen ($0,72$ cm³/g), ρ : Dichte ($0,9982$ g/cm³), R : Gaskonstante ($8,31$ J/molK), T : Temperatur (277 K).

Aus dem Sedimentationslauf der nativen Probe konnte ein Sedimentationskoeffizient von $2,8 S_{w,20}$ ermittelt werden (siehe Abb. 4.21a)). Mit Hilfe der Svedberg-Gleichung konnte ein Molekulargewicht von 49 kDa errechnet werden, was dem Tyrosinase-Caddie-Komplex in guter Näherung entspricht. Das anhand der Primärsequenz errechnete Molekulargewicht des binären Komplexes entspricht 44 kDa (Tabelle 4.6).

Die native Probe wurde im Anschluss an den Sedimentationslauf bei 4 °C und unter Zugabe von 5 μ M CuSO₄ für 3 Tage inkubiert und anschließend erneut durch analytische Ultrazentrifugation untersucht (Abb. 4.21b)).

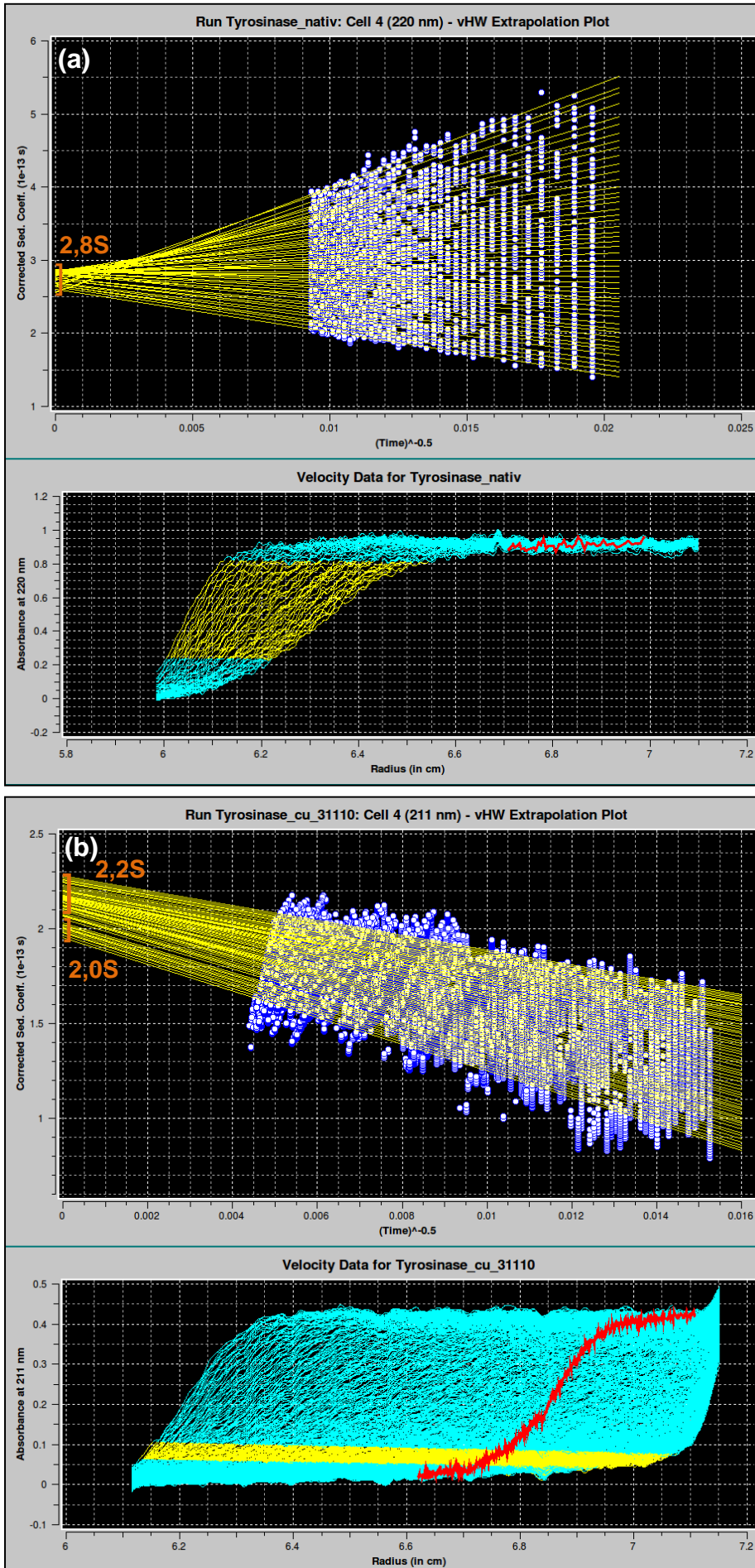


Abbildung 4.21: Extrapolations-Plot und Geschwindigkeitsdaten

für (a) den Tyrosinase-Caddie Komplex (nativ) mit folgenden Einstellungen: *Back diffusion tolerance*: 0,002; *Divisions*: 50; *Data smoothing*: 10; *% of Boundary*: 63; *Boudary position*: 26.

(b) zeigt die gleiche Probe nach 3-tägiger Inkubation mit 5 μM CuSO_4 . Verwendete Einstellungen: *Back diffusion tolerance*: 0,21; *Divisions*: 60; *Data smoothing*: 15; *% of Boundary*: 10; *Boudary position*: 15.

Obere Bildhälften: weiße Punkte: Divisions, gelbe Linien: Extrapolationen. Orange eckige Klammern zeigen die für die Berechnung des Sedimentationskoeffizienten verwendeten Extrapolationen. Die jeweiligen Sedimentationskoeffizienten sind in orange eingezeichnet.

Untere Bildhälften: gelbe Linien: Für die Extrapolation verwendete Sedimentationsfronten, blaue Linien: Für die Extrapolation aus geschlossene Sedimentationsfronten, rot: Rückdiffusions-Toleranz.

Die Sedimentation nach Inkubation mit CuSO_4 zeigte deutliche Unterschiede zur nativ sedimentierten Probe (Abb. 4.21). Nach Inkubation mit Kupfersulfat konnten 2 Sedimentationsfronten mit Sedimentationskoeffizient von $\sim 2,2 S_{W,20}$ und $\sim 2,0 S_{W,20}$ isoliert werden. Mit Hilfe der Svedberg-Gleichung konnte wie bereits für den nativen Tyrosinase-Caddie-Komplex anhand des Sedimentationskoeffizienten das Molekulargewicht der sedimentierten Probe berechnet werden. Die resultierenden Werte von ~ 29 kDa und ~ 12 kDa wurden mit den anhand der Primärsequenz errechneten Literaturwerten verglichen und konnten der Tyrosinase und dem Caddie-Protein zugeordnet werden (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Auswertung der analytischen Ultrazentrifugation.

	Sedimentations-Koeffizient	Diffusions-Koeffizient	M_w (berechnet)	M_w (Literatur)
Tyrosinase-Caddie-Komplex	$2,7 \pm 1 S_{W,20}$	$4,83 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	$48 \pm 4 \text{ kDa}$	44 kDa
Tyrosinase	$2,2 \pm 1 S_{W,20}$	$6,76 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	$29 \pm 2 \text{ kDa}$	31 kDa
Caddie	$2,0 \pm 2 S_{W,20}$	$16,90 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	$12 \pm 1 \text{ kDa}$	13 kDa

Für die Auswertung des Sedimentationslaufs der mit CuSO_4 inkubierten Probe wurden lediglich 10 % der Sedimentations-Geschwindigkeitsdaten verwendet, da es sich um eine sehr heterogene Probe handelte. Das Caddie-Protein ließ sich nicht vollständig sedimentieren (Daten siehe Anhang). Zusätzlich waren in der mit CuSO_4 inkubierten Probe noch binäre Tyrosinase-Caddie-Komplexe zu finden (siehe Anhang). Zur Vereinfachung der Analyse von Sedimentations-Geschwindigkeitsdaten von Proteinkomplexen ist es möglich, Spezies auszuschließen, welche außerhalb des Interessenbereichs liegen (Brown et al. 2009; Philo, 2011). Die Qualität der Daten wird dadurch nicht geschmälert.

4.8 *In silico* Untersuchungen der strukturellen Eigenschaften der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*

Um die Enzymatik der Tyrosinase näher zu untersuchen sowie speziell die *in vitro* festgestellte Substratspezifität und die Dissoziation des Komplexes zur Aktivierung des Enzyms näher zu untersuchen, wurden Moleküldynamik-Simulationen, Substrat-Docking-Experimente, sowie strukturbasierende Untersuchungen der Tyrosinase anhand der bekannten Struktur (Tyrosinase-Caddie-Proteinkomplex aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202, pdb 1WX4) vorgenommen.

Moleküldynamik-Simulationen

Alle Moleküldynamik-Simulationen wurden mit Yasara durchgeführt. Es wurden die Kraftfelder Amber03 und YASARA2 verwendet. Amber03 ist weit verbreitet und wird allgemein für Proteindynamiksimulationen verwendet, während YASARA2 ein Yasara-eigenes Kraftfeld ist, welches maßgeblich von Elmar Krieger programmiert wurde. Als Substrate wurden die Substrate p-Cumarsäure und Kaffeesäure, sowie Tyrosin und L-Dopa (*KEGG Ligand Database*) verwendet. Die Simulationen wurden auf 4 CPU's mit jeweils 2,67 GHz gerechnet und betragen zwischen 100 ps und 100 ns.

Vor Start der Simulation wurde das Hilfsprotein ORF378 aus der Simulationsszene gelöscht um den Zugang zum aktiven Zentrum freizulegen. An die Stelle des Tyr89 des Hilfsproteins wurden jeweils die Substrate Tyrosin oder L-Dopa in die Bindetasche des aktiven Zentrums der Tyrosinase gelegt (Abb. 4.22, grüne Substrate). Es konnte beobachtet werden, dass die Substrate Tyrosin und L-Dopa nach 5 ns aus der Bindungstasche des Enzyms „geworfen“ werden (Abb. 4.22, rote Substrate) bzw. nach 200 ps eine Umorientierung des Substrates erfolgte (siehe Abb. 4.22, gelbe Substrate). Während der Simulation werden interatomare Wechselwirkungen zwischen allen in die Simulation hinzugefügten Atomen simuliert. Dies geschieht anhand der Vergabe von Skalarvektoren zu jedem einzelnen Atom, welche dessen Bewegung im dreidimensionalen Raum beschreiben. Die simulierte Reaktion zeigt, dass das jeweilige Substrat nicht fest in der Bindungstasche bindet. Dementsprechend legt die Simulation nahe, dass eine enzymatische Reaktion nicht ermöglicht würde.

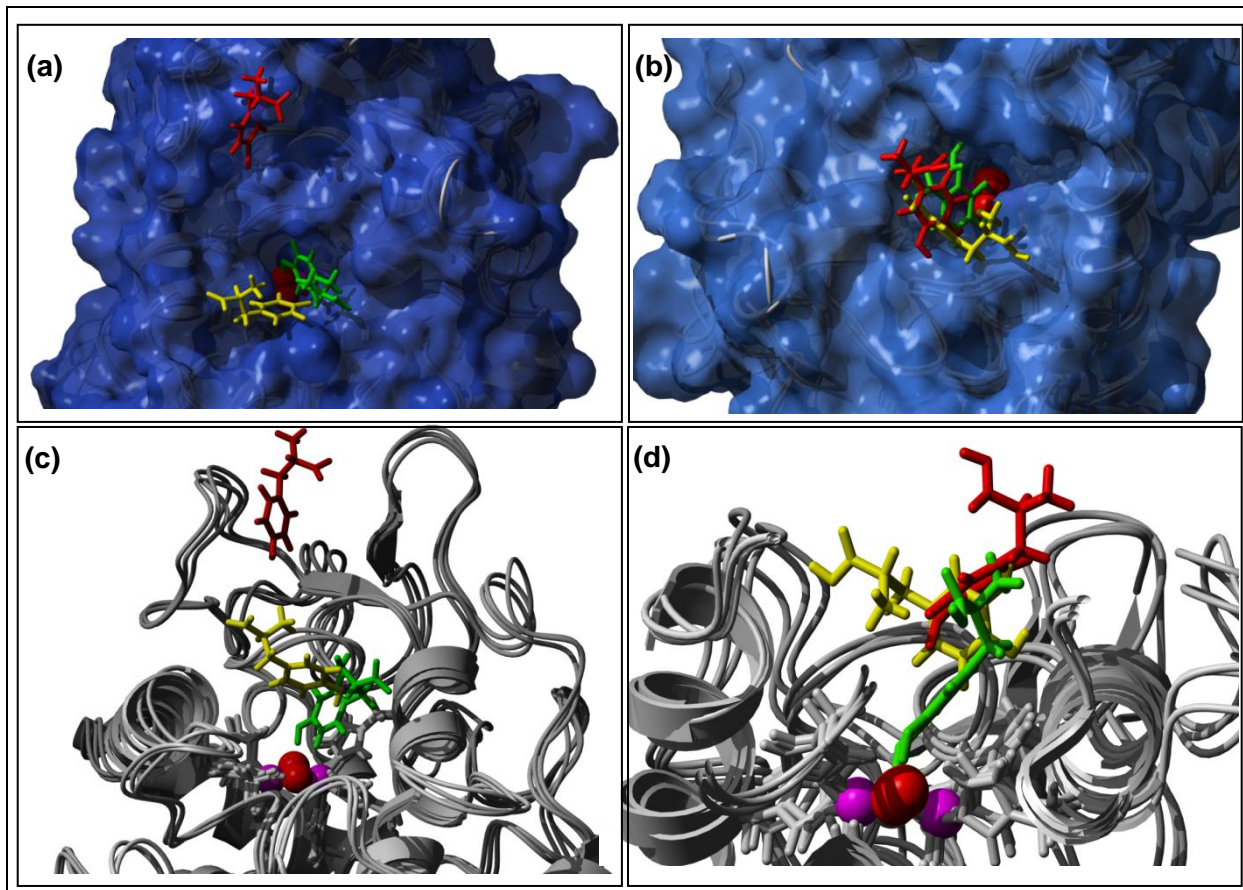


Abbildung 4.22: Superposition einzelner Simulations-Snapshots. a) und c) zeigen *Snapshots* der Simulationen mit Tyrosin, b) und d) L-Dopa. a) und b) zeigen die frontale Aufsicht, auf das aktive Zentrum der Tyrosinase, c) und d) zeigen die Seitenansicht der überlagerten *Snapshots*. Verwendetes Kraftfeld: Amber03, Simulationszeit 6 bzw. 15 ns. Grün: Substrat nach 0 ps Simulationszeit, gelb: Substrat nach 200 ps, rot: nach 5000 ps. Tyrosinase in *Ribbon*-Darstellung in grau, Oberflächenfärbung der Tyrosinase in blau.

Weiterführende Molekulardynamik-Simulationen wurden mit der Tyrosinase im Komplex mit seinem Hilfsprotein durchgeführt. Der Simulation wurden außerdem Kaffeesäure bzw. p-Cumarsäure als Substrate und Kupferatome hinzugefügt. Die ursprüngliche Intention des Experiments war es, die Dissoziation des binären Proteinkomplexes *in silico* zu zeigen, weshalb eine theoretische Kupferkonzentration 5 μM angenommen wurde. Über einen Simulationszeitraum von 100ns lagerten sich Kaffeesäure und p-Cumarsäure spezifisch an der gleichen Position an das Hilfsprotein an, wo sie während der verbleibenden Simulationszeit durch bis zu 3 Wasserstoffbrückenbindungen gebunden wurden (Siehe Abb. 4.23). Die Dissoziation des Komplexes konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die zentralen in die Bindung des Substrates an das Hilfsprotein involvierten Aminosäuren sind Y49, D99, P100, P102, T103, R109 und D113. Diese Restgruppen bilden eine Bindungstasche für das Substrat, in welcher es fixiert wird. Die feste, spezifische Bindung des Substrats an das Hilfsprotein wurde bislang noch nicht beschrieben und ist in Bezug auf die

Aktivierung der Tyrosinase als interessanter Punkt zu sehen, da nach der Aktivierung unmittelbar ein Substratmolekül zur Verfügung steht.

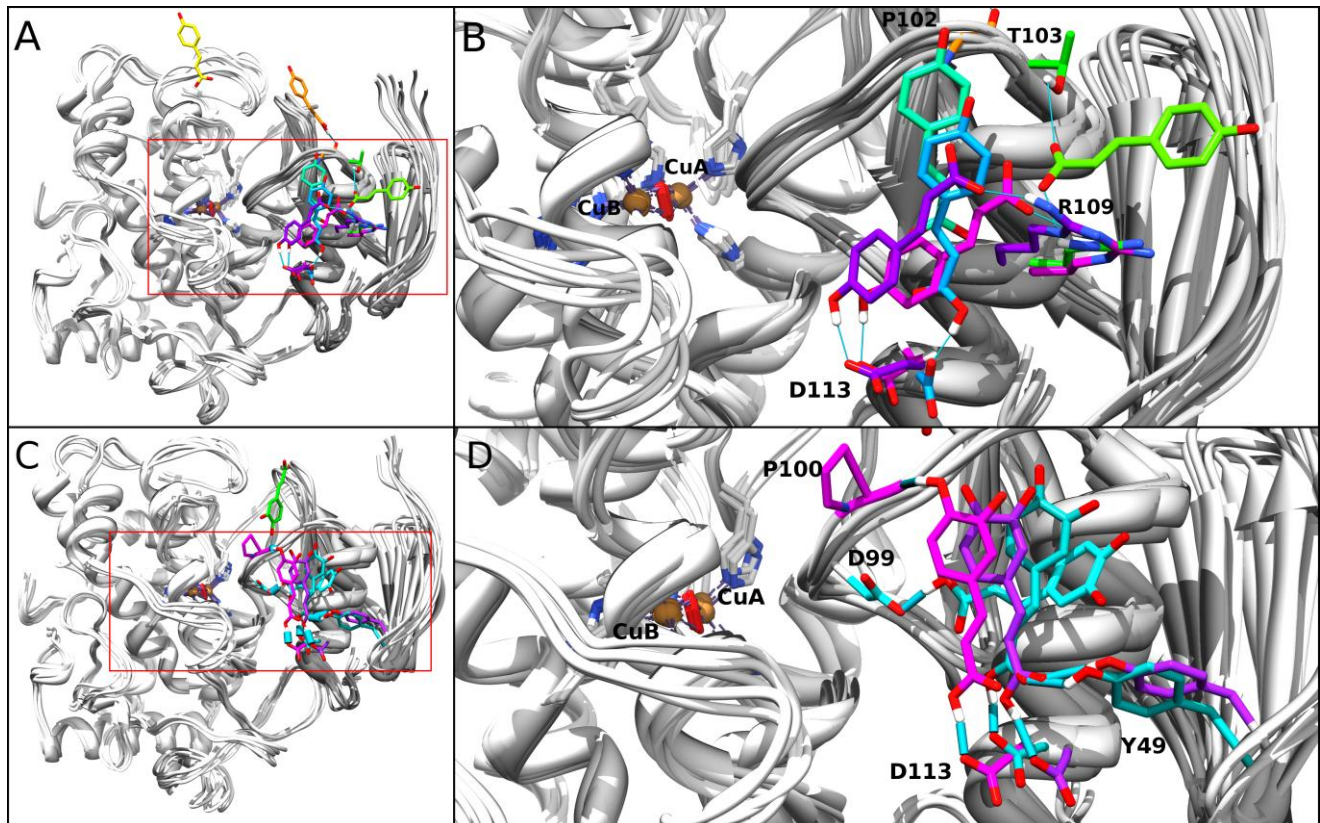


Abbildung 4.23: Superposition einzelner Simulations-Snapshots. Simulation mit Kaffeesäure: **A** Übersicht, **B** Detailansicht der fixierten Substrate während der fortschreitenden Simulation. Simulation mit p-Cumarsäure in der Übersicht **C**, und Detailansicht **D**. *Ribbon*-Darstellung von Tyrosinase (weiß), ORF378 (grau) und Kaffeesäure (orange [0 ns], gelb [6 ns], grün [8,75 ns], cyan [10 ns], blau [12,5 ns], violett [15 ns], magenta [17,5 ns]).

Analyse des Tyrosinase-ORF378-Interface

Um die durch dynamische Lichtstreuung und analytische Ultrazentrifugation festgestellte Dissoziation des Komplexes aus Tyrosinase und ORF378 zu untersuchen, wurde das *Interface* der beiden Proteine mit Hilfe des *European Molecular Biology Library* (EMBL) Service *PDBe service eMotif* auf Kupferbindungsstellen untersucht, von denen insgesamt 4 identifiziert werden konnten (siehe Abb. 4.24). Diese Bindungsstellen sind Strukturmodule, welche sich durch ihre Polarität auszeichnen und Kupferionen binden können. Drei dieser Bindungsstellen sind an der Oberfläche des Hilfsproteins, in der *Interface*-Region zwischen Tyrosinase und ORF378 lokalisiert. Der Grenzbereich der beiden Proteine wird maßgeblich durch 14 Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (*PDBe service eMotif*-

Analyse, Abb. 4.24). Es wäre möglich, dass durch Bindung von Kupfer an die polaren Kupferbindungsstellen die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen größtenteils abgeschirmt werden und es zur Dissoziation des Komplexes kommt (Detailanalyse eines Kupferaffinitäts-Motivs, Abb. 4.25). Allein durch das Kupferaffinitäts-Motiv 1 (Abb. 4.25) werden 5 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, welche durch die Anlagerung von Kupfer wegfallen würden. Zusätzlich sind im Interface zwei Histidine (orange) lokalisiert, welche zusätzlich Kupferatome koordinieren könnten.

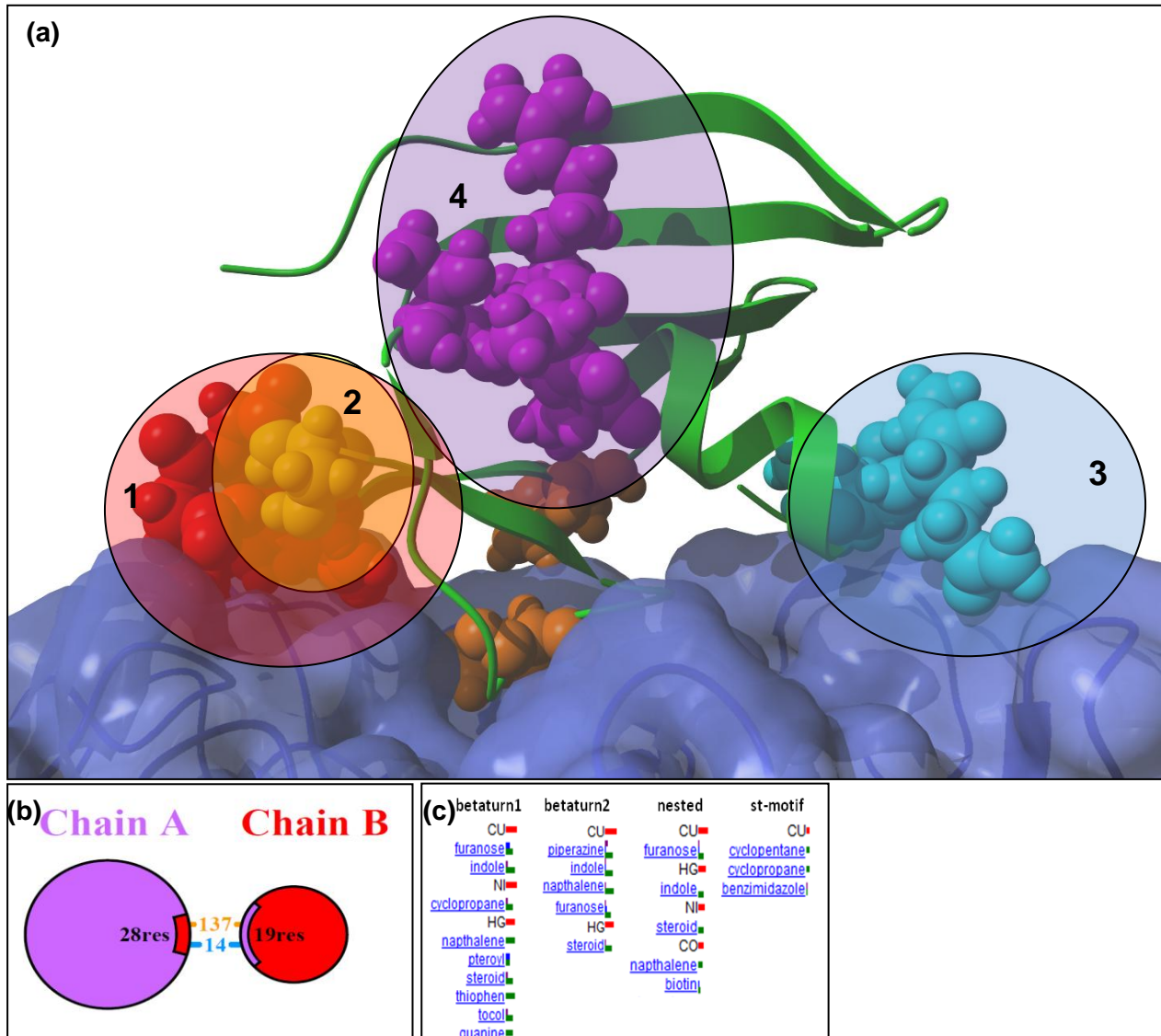


Abbildung 4.24: Analyse der Interfaceregion von Tyrosinase und ORF378.
a) Kupferbindungsstelle des Hilfsproteins (grün) in der Interfaceregion (Oberflächeneinfärbung der Tyrosinase in dunkelblau). Kupferbindungsstelle 1 [betaturn1], rot (Sequenz N86, A87, D88, G87), Motiv 2 [nested], gelb (Sequenz D88, G89, S90) und Motiv 3, cyan [betaturn2](L115, Q116, G117, A118). Motiv 4 [stmotif], magenta (T103, P104, R105, A106, A107) ist nicht im Interface lokalisiert. Histidine sind orange eingefärbt. **b), c)** Affinität der 4 Motive bezüglich verschiedener Substanzen. Die Balkengröße gibt die relative Affinität des Motivs zur jeweiligen Substanz an.

Bei den vier Kupferbindenden Motiven handelt es sich gemäß der *PDBe service eMotif*-Analyse (Abb. 4.24) um zwei *beturns*, ein *nested* Motiv und ein *st-motif*, welches jedoch im Vergleich zu den ersten drei eine relativ schwache Bindungsaffinität zu Kupfer aufweist (Abb. 4.24 d)). In Abbildung 4.25 ist Kupferaffinitätsmotiv 1 (Abb. 4.24a)) im Detail gezeigt. Im inaktiven Komplex wird die Bindung von Tyrosinase und Hilfsprotein dort durch 5 Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Durch die Anlagerung eines Kupferatoms, welches sich in den inneren Bereich des in Abbildung 4.25 gezeigten Loops anlagern könnte, würden die Wasserstoffbindungen wegfallen und die Dissoziation des Komplexes würde begünstigt.

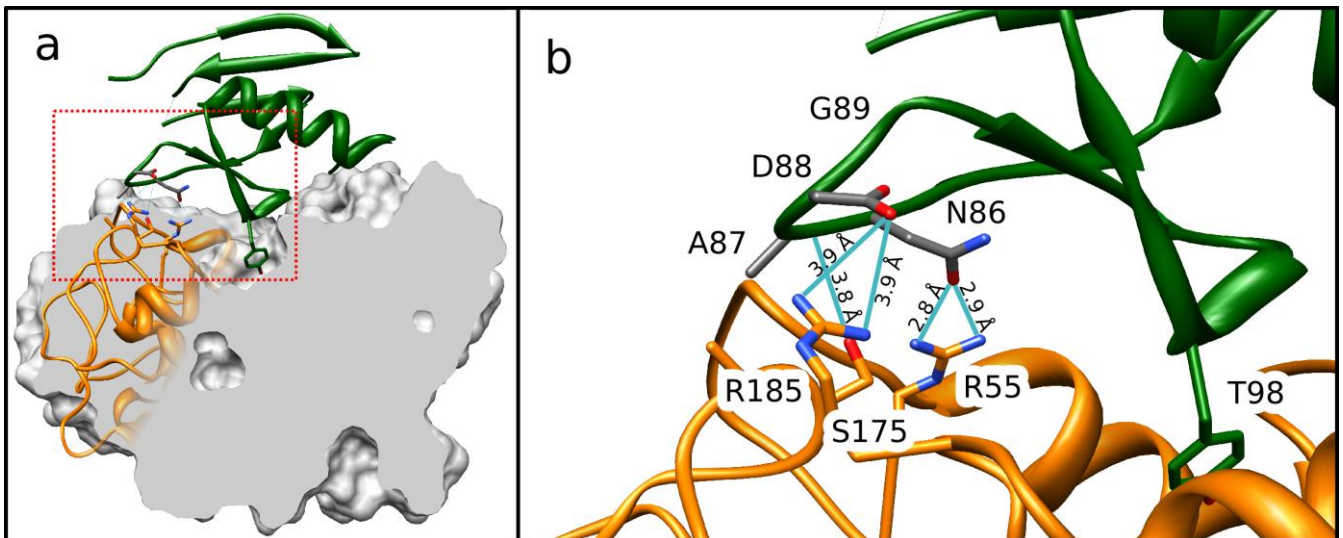


Abbildung 4.25: Detailansicht des Tyrosinase-ORF378 Komplexes. Kupferaffinitätsmotiv (grau) des Hilfsproteins (grün), sowie Wasserstoffbrückenbindungen (blau) zur Tyrosinase (orange).

Ein Sequenzvergleich (siehe Abb. 4.26) des Hilfsproteins ORF378 mit verwandten Proteinen anderer *Streptomyces* zeigt, dass die kupferbindenden Motive (blau hinterlegt) des Hilfsproteins ebenso wie die Aminosäuren, welche die Bindung von Kaffeesäure und p-Cumarsäure an das Hilfsprotein ermöglichen und stabilisieren (rot), in allen *Streptomyces* konserviert sind. Dies ist ein weiteres Indiz für eine mögliche funktionelle Rolle einzelner Aminosäuren und unterstützt die These der Dissoziation des Komplexes aufgrund der Anlagerung von Kupferatomen an Kupferaffinitäts-Motive im *Interface*-Bereich sowie die spezifische Bindung des Substrates an das Hilfsprotein.

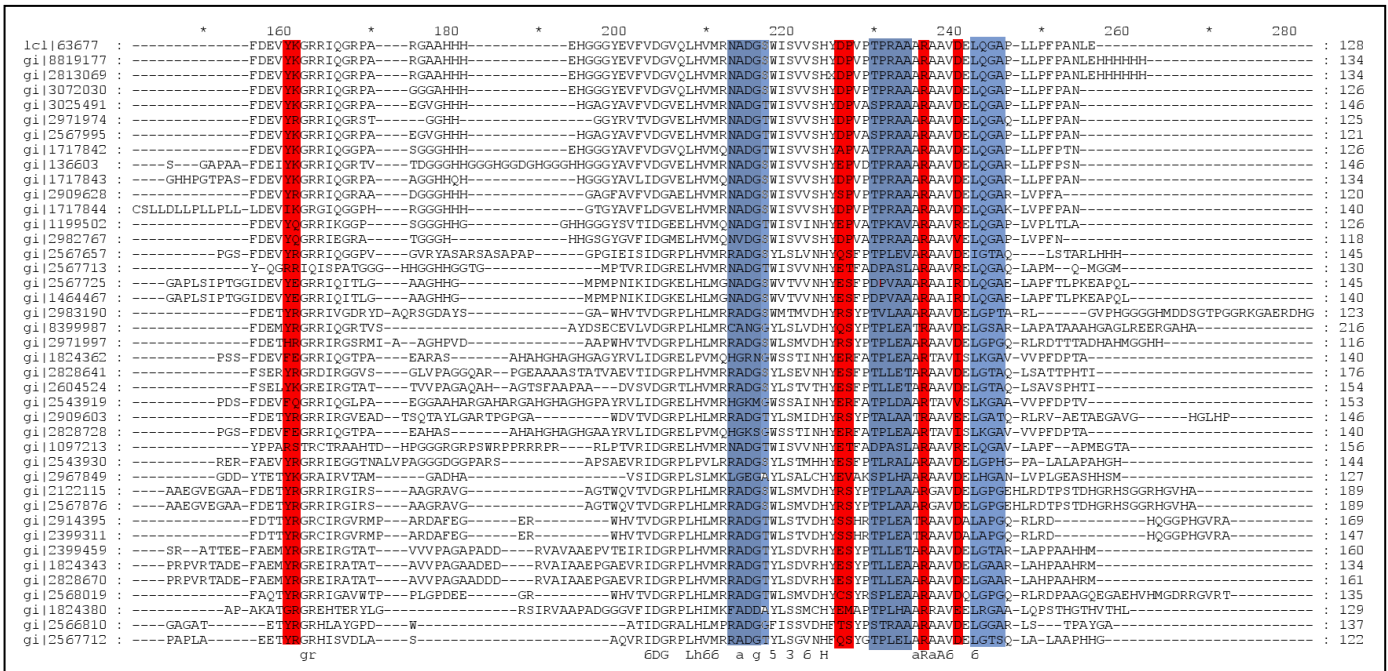


Abbildung 4.26: Sequenzalignent des Hilfsproteins ORF378 verschiedener *Streptomyces*. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Alignments, für welches die Aminosäuresequenz des Hilfsproteins ORF378 verwendet wurde. In blau sind die Kupferbindenden Motive hinterlegt, in rot die Aminosäuren, welche für die Substratbindung verantwortlich sind. Die Benennung der Sequenzen erfolgte anhand der *NCBI accession numbers*.

Substrat Docking

Um die in Laborexperimenten beobachtete Substratspezifität der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus in silico* zu untersuchen, wurden *Docking*-Simulationen von Substraten durchgeführt. Dabei wurden die Substrate Kaffeesäure, p-Cumarsäure sowie Tyrosin und L-DOPA verwendet (bezogen auf die KEGG Liganden-Datenbank). Ein Dockinglauf legt 250 Moleküle in eine festgelegte Simulationszelle, welche manuell um das aktive Zentrum positioniert wird. Für jedes „gedockte“ Molekül wird die Bindungsenergie an die Proteinmatrix berechnet. Die einzelnen gedockten Substratmoleküle werden folgend gemäß ihrer Bindungsenergie geordnet, wobei fest gebundene Substrate eine möglichst niedrige Bindungsenergie besitzen, ungünstige Konformationen sich hingegen durch größere Bindungsenergien auszeichnen.

Anhand ihrer Bindungsenergie lassen sich Substrate, welche sich energetisch günstig in den Bereich des aktiven Zentrums *docken* lassen (niedrige Bindungsenergie) von solchen unterscheiden, die eine weniger affine Bindung aufweisen (hohe Bindungsenergie). Das Docking erfolgte bei einem pH von 6.0, damit lagen die Substrate in protonierter Form vor. Die Docking-Versuche wurden mit Yasara sowie dem Programm AutoDock durchgeführt um die Ergebnisse zu verifizieren.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Substrat-Docking-Experimente.

Substrat	Bindungsenergie* (kcal/mol)	Bindungskonstante* (μM)	Bindungsenergie** (kcal/mol)
Kaffeensäure	-5,98	41	-4.11
p-Cumarsäure	-5,23	147	-4.34
Tyrosin	-4,46	539	-3.57
L-DOPA	-4,19	847	-3.85

*Berechnung erfolgte mit YASARA 10.5.14

** Berechnung erfolgte mit AutoDock 4.2

Die Ergebnisse der Docking-Simulationen sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Die Bindungsenergien für die Substrate wurden mit Yasara 10.5.14 und AutoDock 4,2 berechnet und sind jeweils nur relativ zu den jeweiligen anderen Substraten zu werten – es handelt sich bei den angegebenen Werten um keine absoluten Bindungsenergien (persönlicher Kommentar H.Hartmann). Die Ergebnisse beider Programme sind vergleichbar und zeigen niedrigere Bindungsenergien, also eine energetisch günstigere Bindung von Kaffeensäure und p-Cumarsäure, während Tyrosin und L-Dopa höhere Bindungsenergien besitzen. Dies bestätigt die Laborergebnisse (siehe Kap. 4.5), nach denen Kaffeensäure und p-Cumarsäure im Gegensatz zu Tyrosin und L-Dopa geeignete Substrate für die Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* sind, welche einen hohen katalytischen Umsatz zeigen. Ein möglicher Grund für eine energetisch günstigere Bindung von Kaffeensäure und p-Cumarsäure ist die sterisch etwas hinderlichere und weniger flexible sekundäre Aminogruppe, welche sich in den Restgruppen von Tyrosin und L-Dopa befindet (detaillierte Diskussion Kap. 5.4).

Die jeweils energetisch am besten *gedockten* Moleküle sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Die Resultate zeigen, dass Tyrosin und L-Dopa eine alternative Orientierung gegenüber Kaffeensäure und p-Cumarsäure in der Bindungstasche einnehmen.

Ein Nachteil von Substratdocking-Versuchen ist, dass das Substrat von dem verwendeten Programm in einer energetisch günstigen Konformation in den freien Raum der Simulationszelle gelegt wird. Dabei wird die Zugänglichkeit zu diesem Freiraum vom Programm jedoch nicht berücksichtigt. Die für Tyrosin und L-Dopa energetisch am besten (niedrigste Bindungsenergien) gefundenen Dockingpositionen sind von ihrer Zugänglichkeit eher unwahrscheinlich. An dieser Stelle sollte betont

werden, dass eben dieser Umstand der ungünstigen Docking-Versuche ein Indiz für die ungünstige molekulare Beschaffenheit von Tyrosin und L-Dopa für die Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* ist. Würde man die gedockten Substrate (Tyrosin und L-Dopa) mit der nächst höheren Bindungsenergie, aber ähnlich gedockten Position wie Kaffeesäure, bzw. p-Cumarsäure für den Vergleich innerhalb der gedockten Substrate heranziehen, wäre der Unterschied der Bindungsenergien zu Kaffeesäure und p-Cumarsäure noch gravierender, oder aufgrund von sterischer Blockaden gar nicht möglich. Dies bestätigt den im Labor beobachteten fehlenden Umsatz von Tyrosin, sowie den geringen Umsatz von L-Dopa.

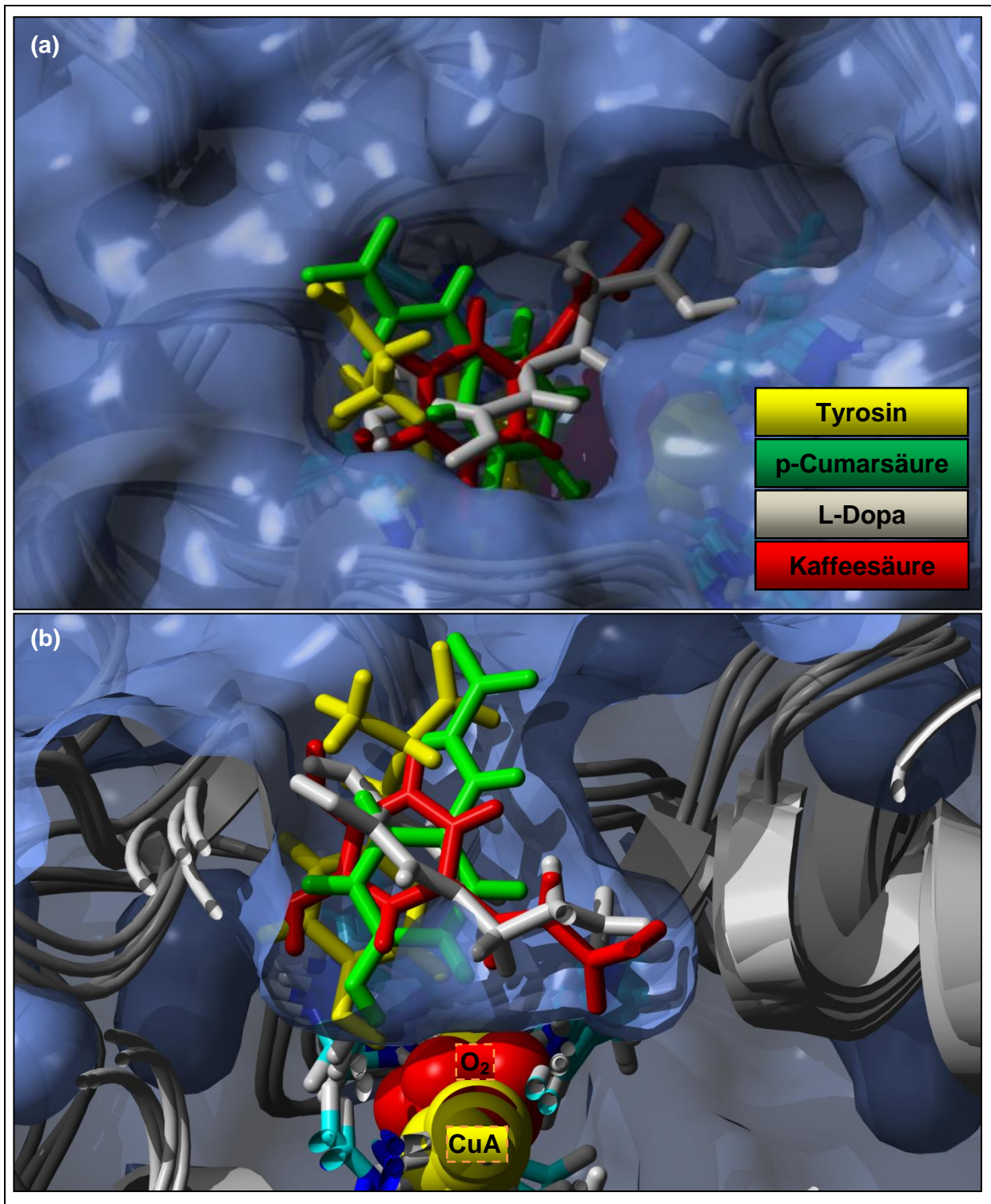


Abbildung 4.27: Superposement Substratdocking. Aufsicht a) und gezoomte Seitenansicht b) der Bindungstasche der Tyrosinase sowie der „gedockten“ Substrate. Monophenolische Substrate: Tyrosin (gelb), p-Cumarsäure (grün); Diphenolische Substrate: L-Dopa (grau), Kaffeesäure (rot). Sekundärstrukturen sind grau in Cartoondarstellung gezeigt. Kupfer (gelb) und Sauerstoff (rot) sind in der Spacefilldarstellung gezeigt.

5 Diskussion

Aufgrund ihrer breiten Anwendungsbereiche sind Tyrosinasen seit langer Zeit Ziel intensiver Forschungsarbeiten. Trotz tiefgreifender Erkenntnisse und bereits vorhandener Proteinstrukturen sind bislang Einblicke in die *in vivo*-Aktivierung sowie die dahinterstehenden molekularen Mechanismen von Typ-3-Kupferproteinen weitgehend unklar. Der molekulare Reaktionsmechanismus sowie die Suche nach einem möglichen Protonenakzeptor, der für die am aktiven Zentrum ablaufende *ortho*-Hydroxylierung nötig ist, werden kontrovers diskutiert, sind jedoch bislang nicht vollständig verstanden.

5.1 Klonierung des Tyrosinase-ORF378 Komplexes

Die Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* wurde bereits von Kohashi et al. (2004) rekombinant exprimiert. Kurz darauf konnte die erste Kristallstruktur einer Tyrosinase gelöst werden (Matoba et al. 2006). Die in dieser Arbeit angewandte Klonierungsstrategie unterscheidet sich von der von Kohashi et al. durch die gemeinsame Klonierung der *Tyrosinase* und *orf378* Gene als Operon unter der Kontrolle eines T7-Promotors (siehe Kap. 4.2). Dadurch entsteht eine polycistronische mRNA, wohingegen Kohashi et al. eine separierte Expression, also eine monocistronische Klonierungsstrategie angewendet haben. Bei der in dieser Arbeit angewandten polycistronischen Klonierungsstrategie bleibt die native Operonstruktur aus *S.castaneoglobisporus* erhalten, was – nach heterologer Expression - die Komplexbildung der beiden Proteine (Tyrosinase und ORF378) unmittelbar nach deren Translation ermöglicht.

Ein Risiko der separierten Expression, wie sie von Kohashi et al. durchgeführt wurde, ist die Expression von Tyrosinase und ORF378 in nicht-stöchiometrischen Mengen, da sich die beiden Proteine maßgeblich in ihrer Größe unterscheiden (Tyrosinase: 31 kDa, ORF378: 13 kDa). Die Expressionsraten der beiden Proteine während der heterologen Expression sind sicherlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen verschieden, so dass das Risiko einer Proteinaggregation sehr hoch ist. Dieses wird bei der hier gewählten polycistronischen Strategie *a priori* eliminiert.

Der Vorteil der Proteinexpression unter Verwendung eines polycistronischen Vektors gegenüber der individuellen Expression einzelner Proteine ist, dass alle Proteine des späteren Komplexes zur gleichen Zeit in gleichen Mengen translatiert werden und dementsprechend in äquimolaren Mengen im Cytosol vorliegen. (Selleck & Tan 2008; Kukhitna, 2006).

5.2 Expression und Reinigung des binären Tyrosinase-Komplexes

Die Tyrosinase wurde als binärer Komplex in *Escherichia coli* BL21 (DE3) koexprimiert. *E. coli* wird bei der homologen und heterologen Expression von Proteinen häufig eingesetzt, da es molekularbiologisch und genetisch gut untersucht ist, sich genetisch leicht manipulieren lässt und sich zudem durch hohe Proteinausbeuten auszeichnet. Auch bei der Herstellung von prokaryotischen Membranproteinen für funktionelle und strukturelle Untersuchungen, wie beispielsweise im Falle von Gltp aus *Pyrococcus horikoshii* (Yernool et al. 2004) oder BetP aus *Corynebacterium glutamicum* (Rübenhagen et al. 2000; Ressler et al. 2009), wurde *E. coli* als Expressionssystem gewählt.

Nach erfolgreicher Expression wurde der binäre Tyrosinase-Komplex über Tandemaffinitätschromatographie gereinigt. Dabei erfolgte der erste Reinigungsschritt über eine Nickel Säule welche den Histidin₆-Tag bindet. Die Immobilisierung an die Nickel-Säule erwies sich jedoch als relativ unspezifisch, was auch schon bei anderen Proteinreinigungen beobachtet werden konnte (Tropea et al. 2009; Pan et al. 2008), und wodurch wahrscheinlich auch Histidin-reiche Regionen anderer Proteine an die Säule immobilisiert wurden (siehe Kap. 4.3). Durch den zweiten Reinigungsschritt – eine Größenausschlusschromatographie – konnten die meisten Verunreinigungen sowie Abbauprodukte und Aggregationen des Tyrosinase-Komplexes entfernt werden. Es konnte ein Reinigungsprotokoll etabliert werden, wodurch sich reproduzierbar konstante Mengen von Tyrosinase reinigen lassen.

Als Nachteil an der Reinigung über zwei Schritte ist vor allem der Verlust an Protein zu nennen (~40-80 %), Verunreinigungen und aggregiertes Protein eingeschlossen. Das über Ni-NTA gereinigte Protein konnte im zweiten Reinigungsschritt nicht komplett gewonnen werden. Jedoch konnte der Tyrosinase-Komplex auf einen Reinheitsgrad von >95 % isoliert werden (siehe Abb. 4.13 a,c)).

5.3 Biochemie und Enzymatik der Tyrosinase

Der gereinigte binäre Tyrosinase-Komplex zeigte in der SDS-Gelelektrophorese zwei Banden, welche dem dissoziierten Komplex der Tyrosinase und dem Hilfsprotein entsprechen (Abb. 4.13 a)). Die Zuordnung wurde durch die Berechnung der Molekulargewichte (David & Neville 1971) der beiden Banden bestätigt (Tab. 4.3). Wurde der binäre Tyrosinase-Komplex mit Hilfe nativer Gelelektrophorese untersucht, zeigten sich abhängig vom pH-Wert des Gels eine bzw. zwei Proteinbanden. Bei pH-Werten von 7,8 wurden zwei Banden in alkalischer PAGE beobachtet, während bei pH 8,8 nur eine Bande auftrat.

Eine Begründung für den Zerfall des binären Komplexes bei pH 7,8 könnte die mögliche pH-abhängige Destabilisierung des Komplexes durch Protonierung einzelner Aminosäuren (Beispielsweise Arg [pK-Wert: 12,5], Lys [pK-Wert: 10,5] und Tyr [pK-Wert: 10,1] im Proteininterface von Tyrosinase und ORF378 in weniger basischem Puffer sein. Diese Vermutung wird durch spätere enzymatische Untersuchungen (Kap. 4.5), welche die Aktivierung der Tyrosinase bei leicht sauren (pH 6.2) nicht aber in basischem Puffer zeigen, bestätigt. Demnach begünstigt ein niedriger pH, eventuell durch die Protonierung einzelner Aminosäurereste im Interface von Tyrosinase und Hilfsprotein, dessen Dissoziation (siehe Kap. 5.4). Dass schwach saure pH-Werte die enzymatische Aktivität von Phenoloxidasen begünstigen, wurde unter anderem für die Polyphenoloxidase aus *Camellia sinesis* gezeigt (Liu et al., 2010).

Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht der enzymatischen Eigenschaften (K_m -Werte), verschiedener Tyrosinasen aus Bakterien und Pflanzen. Auffällig sind die großen Differenzen der katalytischen Eigenschaften schon innerhalb der *Streptomyces*.

Tabelle 5.1: Vergleich der K_m -Werte von Tyrosinasen unterschiedlicher Organismen.

	Kaffeesäure (mM)	L-DOPA (mM)	Dopamin (mM)	L-Tyrosin (mM)	Referenz
<i>Bacillus megaterium</i>		0,35		0,075	Shuster & Fishman (2009)
<i>Agaricus bisporus</i>		0,26	1,4		Diss. Uwe Salzbrunn
<i>Musa cavendishii</i>	0,018		0,94		Nematpour et al. (2009)
<i>Solanum tuberosum</i>		12,6			Yang & Wu (2006)
<i>Streptomyces albus</i>		7,8		0,5	Dolashki et al. (2009)
<i>Streptomyces antibioticus</i>		8,0	17,8		Diss. Uwe Salzbrunn
<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	1,4				Jacobs et al. (2011)

Enzymatische Tests zeigten, dass die Tyrosinase nur Substratumsatz zeigt, wenn geringe Konzentrationen (5 μ M) an CuSO_4 zugegeben werden (Kap. 4.5, Abb. 4.17), während höhere Konzentrationen an Kupfersulfat erfahrungsgemäß die Denaturierung der Proteine bewirkten. Ohne diesen Zusatz an Kupfer erfolgte kein enzymatischer Umsatz, ganz gleich welches Substrat verwendet wurde.

Natriumdodecylsulfat (SDS) wird oft als Phenoloxidase-Aktivator verwendet, wie zum Beispiel für den Sauerstofftransporter Hämocyanin (Decker & Rimke, 1998; Salvato et al. 1998; Pless et al. 2003;

Jaenicke & Decker, 2004), welcher nach Zugabe von SDS Catecholoxidase- und Tyrosinase-Aktivität zeigt. Die Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* konnte durch die Zugabe von SDS (1-5 mM) jedoch nicht aktiviert werden (Daten siehe Anhang).

Fairhead und Thörny-Meyer (2010) haben die Genloki von Typ-3-Kupferproteinen analysiert und die Aktivierung der Phenoloxidase-Aktivität der Gegenwart einer C-terminalen Domäne zugeordnet. Diese zusätzliche Domäne soll durch posttranslationale Modifikation Konformationsübergänge von Tyrosinasen und Catecholoxidasen induzieren, was außerdem schon für die Konvertierung von Hämocyaninen zu Phenoloxidasen vorgeschlagen und beobachtet wurde (Blair et al., 2007; Cong et al., 2009; Decker et al., 2001). Diese aktivierende Domäne ist jedoch nur in Tyrosinasen von Eukaryoten vorhanden. In Prokaryoten wie *S.castaneoglobisporus* ist diese Domäne in einigen Fällen durch ein Hilfsprotein (ORF378) ersetzt (Decker et al. 2001). Ungeklärt ist bislang die Aktivierung bakterieller Tyrosinasen ohne C-terminale Domäne, sowie ohne Caddie-Protein, wie beispielsweise im Fall von *Bacillus megaterium* (Sendovski et al. 2010).

Unter Zugabe von Kupfersulfat (Chen et al. 1992) wurden mehrere mono- und diphenolische Substrate auf ihren Umsatz durch die Tyrosinase getestet, was eine starke Substratspezifität zeigte. Lediglich Kaffeesäure und p-Cumarsäure wurden effizient umgesetzt. Dieser spezifische Umsatz an Substraten wurde bislang nicht beobachtet. Der Umsatz von L-Dopa war nach Abzug des pufferbezogenen Umsatzes (~80 %) minimal (siehe Abb. 4.16 c)). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen (Matoba et al. 2006) die eine deutliche Katalyse des Substrats L-Dopa ergaben. Es wurden jedoch keine Spektren gezeigt, anhand derer sich ein autokatalytischer Effekt ausschließen lassen könnte. Andere getestete Substrate wie L-Tyrosin, Tyramin oder Dopamin wurden nicht umgesetzt.

Ein möglicher Grund für den spezifischen Substratumsatz ist in den Seitenketten der Substrate zu suchen, da die aromatischen Ringsysteme in Mono- und Diphenolen jeweils den gleichen Aufbau besitzen. Alle nicht katalysierten Substrate – Mono- wie Diphenole – haben gemein, dass sie eine primäre (L-Tyrosin: sekundäre) Aminogruppe besitzen (Kap. 4.5, Abb. 4.15). Diese stärker elektronegative Gruppe schränkt die Flexibilität der Seitenkette ein und könnte vermutlich den Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum sterisch verhindern. Ebenso ist die Verhinderung des Zugangs durch positiv geladene Aminosäureseitenketten wie z.B. die von Arg55 möglich (siehe Kap. 5.4, Abb. 5.3). Dadurch würden positiv geladene Substrate abgestoßen werden. Die katalysierten Substrate Kaffeesäure und p-Cumarsäure besitzen hingegen keine solche Aminogruppe im Rest.

Dass der Zugang zum aktiven Zentrum den Schlüssel zur Aktivität der Tyrosinase bildet, legt die sterische Abschirmung des Hilfsproteins nahe, welches das aktive Zentrum der Tyrosinase im gebundenen Zustand abschirmt sowie die Substratbindestelle blockiert (Decker et al. 2006).

Die Grundlage der Aktivierung der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* ist jedoch bislang unbekannt. Von Chen et al. (1992) wurde Kupfersulfat als Aktivator vorgeschlagen, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Es wurde bislang lediglich vermutet, dass zur Aktivierung der Tyrosinase der binäre Komplex aus Tyrosinase und Hilfsprotein dissoziieren muss (Matoba et al. 2006; Claus und Decker 2006).

Der Mechanismus der Aktivierung durch eine Dissoziation des Tyrosinase-ORF378-Komplexes wurde in dieser Arbeit mit Hilfe mehrerer Methoden untersucht. Anhand dynamischer Lichtstreuung sowie analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass der Tyrosinase-Caddie-Komplex durch Zugabe von 5 μM CuSO_4 in 0,1 M NaPO_4 -Puffer in seine Monomere dissoziiert. Diese Erkenntnisse konnten mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung aus der Analyse der hydrodynamischen Radien gewonnen werden, welche sich von ~ 7 nm für den Komplex aus Tyrosinase und ORF378 auf ~ 5 nm (für die Tyrosinase) nach der Dissoziation verringern. Die experimentell ermittelten Radien wurden anhand der Kristallstruktur (pdb 1WX4) durch Berechnung der jeweiligen Durchmesser für den Tyrosinase-Caddie-Komplex (6,8 nm), sowie die Monomere (Tyrosinase 5,1 nm, Caddie-Protein 2,1 nm) aufgrund ihrer Volumina und der Annahme eines globulären Proteins (also einer Kugelform) bestätigt werden. Die separate Detektion des dissoziierten Hilfsproteins (als separater *Peak*) war nicht möglich, da dies die Auflösung der verwendeten Methode übersteigt (Friskens 2001; Koppel 1972), da der Unterschied der Durchmesser von Tyrosinase und Hilfsproteine lediglich ~ 3 nm beträgt.

Mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation konnte die Dissoziation des binären nativen Komplexes durch den Aktivator Kupfersulfat gezeigt werden. Anhand der Sedimentationskoeffizienten konnten mit Hilfe der Svedberg-Gleichung die Molekulargewichte der sedimentierten Proben berechnet werden, welche in grober Näherung den Literaturwerten des nativen Komplex aus Tyrosinase und Hilfsprotein (berechnet: 47 kDa, Literatur: 44 kDa) sowie den dissoziierten Monomeren (Tyrosinase: berechnet: 29 kDa, Literatur: 31 kDa; Caddie-Protein: berechnet 12 kDa, Literatur: 13 kDa) entsprechen (Kap. 4.7). Diese Ergebnisse beweisen die bisherigen Vermutungen einer der enzymatischen Aktivität vorangehenden Dissoziation des binären Komplexes aus Tyrosinase und Hilfsprotein (Decker et al. 2006).

Bedenkt man, dass es sich bei *S.castaneoglobisporus* um ein im Boden lebendes Bakterium handelt, lassen sich die Ergebnisse in Bezug zu Claus et al. (2006) und Claus (2009) setzen, wonach eine Funktion des Hilfsproteins die Sekretion der Tyrosinase mittels des TAT (*twin-arginine translocation*)-*pathways* darstellt. Dieser Weg ermöglicht es dem nativen Tyrosinase-Caddie-Komplexes mittels eines Signalpeptids, welches Teil des Hilfsproteins ist, die Cytoplasmamembran zu passieren. Extrazellulär erfolgt die Dissoziation durch das im Erdreich in höheren Konzentrationen enthaltene Kupfersulfat und die Tyrosinase wird extrazellulär aktiviert. Das extrazellulär gebildete Melanin dient

dem Schutz vor UV-Strahlung, bindet Schwermetallionen und dient der Detoxifikation (Butler & Day, 1998; Claus & Filip, 1988, Claus & Filip, 1990; Ruan et al. 2002; Ruan et al. 2004).


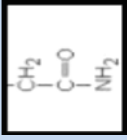
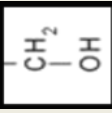

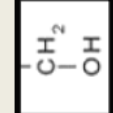
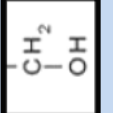

5.4 Bioinformatische Untersuchungen

Um den bislang hypothetischen Katalyse-Mechanismus zu untersuchen erfolgten bioinformatische Untersuchungen der bekannten Tyrosinase-Struktur aus dem Bakterium *S.castaneoglobisporus* (Matoba et al. 2006) sowie intensive Untersuchungen der Proteinstrukturen der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *I.batatas* (Klabude et al. 1998), der Polyphenoloxidase aus *M.sexata* (Li et al. 2009), sowie diverser Proteinstrukturen von Hämocyaninen aus *L.polyphemus* (Hazes et al. 1993), *E.californicum* (Voigt et al. 2000) und *O.dofleini* (Cuff et al. 1998). Alle genannten Proteine gehören zur Gruppe der Typ-3-Kupferproteine, welche alle ein 4α -Helix-Bündel besitzen, welche das aktive Zentrum umgibt (Magnus et al. 1994; Cuff et al. 1998; Virador et al. 2010; Sendovski et al. 2010).

Zur strukturellen Analyse des Bereichs um das aktive Zentrum wurden die oben genannten Proteine anhand der konservierten 4α -Helix Bündel, welche die aktiven Zentren umgeben, überlagert (Abb. 5.1), so dass Unterschiede bzw. die Konservierung einzelner Aminosäuren leicht zu erkennen sind. Auffällig wurde dabei ein strukturell konserviertes Glutamat, welches in nahezu allen verglichenen Typ-3 Kupferproteinen zu finden ist (Tab. 5.2, Abb. 5.1). Glutamat kommt aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften (pK_{s-COOH} Seitenkette: 4,3, zwei primäre Aminogruppen) als möglicher Protonenakzeptor in Frage, ist jedoch in allen verglichenen Strukturen über 6 Å vom gebundenen Sauerstoff des aktiven Zentrums entfernt. Diese Tatsache schließt eine direkte Beteiligung am Katalyse-Mechanismus aus.

Des Weiteren erschien eine Aminosäure-Position strukturell besonders auffällig, in welcher sich die ansonsten stark konservierten Bereiche der 4α -Helix-Bündel der Proteine maßgeblich voneinander unterscheiden (Tab. 5.2, Abb. 5.1, 5.2).

Tabelle 5.2: Vergleich ausgewählter Aminosäuren mit möglicher katalytischer Bedeutung sowie ihrer Eigenschaften im strukturell konservierten 4 α -Helix-Bündel von Typ-3-Kupferproteinen sowie der enzymatischen Aktivität. Der entsprechende strukturelle Vergleich ist in Abbildung 5.2 gezeigt.

Protein	Position des konservierten Glutamats (Abb. 5.2)	AS Position mit möglicher katalytischer Bedeutung	AS Seitenkette	AS Eigenschaften	Enzymatische Aktivität
Tyrosinase (1WX4)	182	ARG 55		pKa ~12 pI 10,76 Flexibel, geladen Crystal density 1,1	CO-Aktivität TYR-Aktivität
Catecholoxidase (1BUG)	236	ASN 110		pI 5,41 Starr, polar Cryst. dens. 1,54	CO-Aktivität
HC Eury UEa (modelliert [Voit et al. (2000)])	311	SER 184		pI 5,68 Kurz, polar Cryst. Dens. 1,537	TYR-Aktivität (schwach) nach SDS-Induktion
HC Eury UEb (modelliert [Voit et al. (2000)])	309	ALA 182		pI 6,10 Kurz, aliphatisch Cryst. dens. 1,40	CO-Aktivität TYR-Aktivität nach SDS-Induktion
HC Eury UEc (modelliert [Voit et al. (2000)])	311	SER 184		pI 5,68 Kurz, polar Cryst. Dens. 1,537	CO-Aktivität TYR-Aktivität Nach SDS-Induktion
HC Limulus (1OXY)	---	SER 182		pI 5,68 Kurz, polar Cryst. Dens. 1,537	CO-Aktivität (schwach) nach SDS-Induktion
HC Octopus (1JS8)	2668	GLY 2563		pI 6,06 Keine Seitenkette Cryst. Dens. 1,60	CO-Aktivität (sehr schwach) nach SDS-Induktion

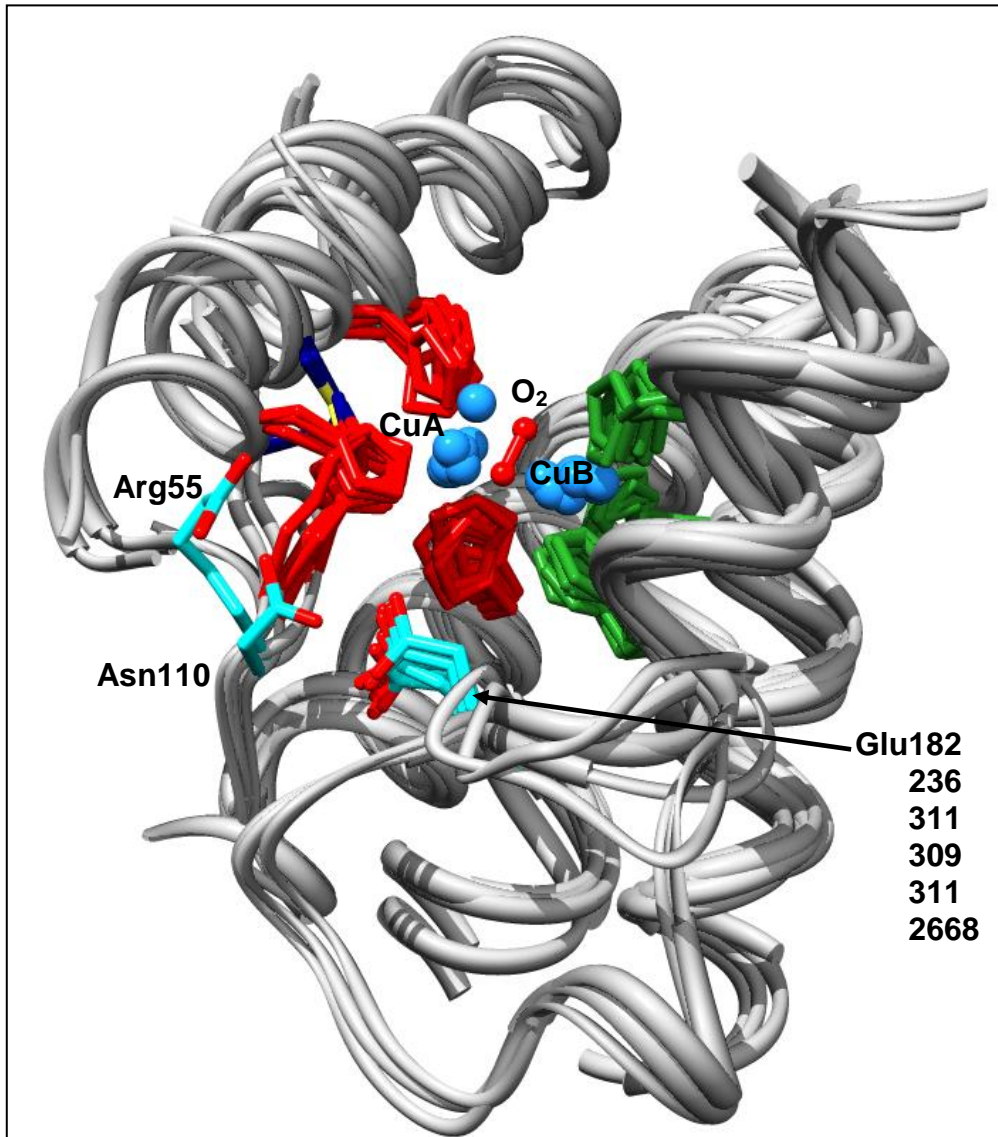


Abbildung 5.1: Struktur Superposement. Überlagert wurden die Strukturen der Catecholoxidase (1BUG) aus *I.batatas*, *Oktopus* Hämocyanin (1JS8), *Limulus* Hämocyanin (1OXY), Tyrosinase (1WX4) aus *S.castaneoglobisporus*, Polyphenoloxidase (2P3X) aus *V.vinifera* und 3HHS aus *M.sexta* sowie der *E.californicum* Hämocyanin Untereinheiten a,b,c. Die Kupferatome sind in der Spacefilldarstellung in blau, die Sauerstoffatome der Tyrosinase rot eingefärbt. Die koordinierenden Histidine von CuA sind rot, koordinierende Histidine von CuB grün gefärbt. Disulfidbrücken sind dunkelblau eingefärbt. Die in der Stickdarstellung und CPK-Farben gezeigten Glutamate unterhalb des aktiven Zentrums sind mit Ausnahme des *Limulus*-Hämocyanins in allen Typ-3 Kupferproteinstrukturen zu finden. Arg55 aus der Tyrosinase (*S.castaneoglobisporus*) und Asn110 der Catecholoxidase (*I.batatas*) sind am linken Bildrand ebenfalls in CPK-Farben dargestellt (Rolff et al. 2011, persönliche Mitteilung H.Decker).

Die in Tabelle 5.2 und Abbildung 5.1 verglichene diverse Aminosäure-Position, an welcher sich unter anderem Arg, Asn, Ser usw. finden, liegt im Zugang zum aktiven Zentrum (Abb. 5.1, Aufsicht durch den Zugang). Durch Aminosäurereste unterschiedlicher räumlicher Ausdehnung im Zugangsbereich des aktiven Zentrums ist es möglich die Katalyse des Enzyms zu beeinflussen, indem Substrate

sterisch am Zugang zum aktiven Zentrum gehindert werden. Dies ist beispielsweise der Fall in der Catecholoxidase aus *I.batatas*. Dort besitzt das Phe261 eine *gatekeeping*-Funktion und kann die Bindung von Substraten blockieren (Gerdemann et al. 2002). In der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* ist kein solcher *shielding-residue* zu finden, da es sich um einen binären Komplex aus Tyrosinase und Hilfsprotein handelt, welches den Zugang zum aktiven Zentrum ebenfalls sterisch blockiert (Matoba et al. 2006; Decker et al. 2006). Die Existenz eines *shielding-residues* wurde ebenfalls bei der Phenoloxidase aus *M.sexata* beobachtet (Li et al. 2009; Abb. 5.2).

Bezüglich des Katalyse-Mechanismus wird nach einem potentiellen Protonenakzeptor gesucht, welcher die bei der Oxidation des Substrates entstehenden Protonen aufnehmen kann. Die Suche nach einem solchen Rest besteht schon länger und wurde erst kürzlich von Li et al. (2009) und Virador et al. (2009) anhand kürzlich publizierter Strukturen von Polyphenoloxidasen (PPO) aus *M.sexata* diskutiert. Dort wurde in PPO2 der dimeren Phenoloxidase ein Glutamatrest (Glu359) als möglicher katalytischer Rest für die Deprotonierung monophenolischer Substrate identifiziert (Abb. 5.2). Eine vergleichbare katalytisch aktive Aminosäure lässt sich jedoch in sonst keinem anderen Typ-3 Kupferprotein finden.

Die in Tabelle 5.2 aufgeführte Aminosäureposition ist in allen Typ-3-Kupferproteinen höchst divers und stellt mit Arginin – im Falle der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* – einen möglichen Protonenakzeptor dar. Dieser ist in der verwendeten Struktur für die Katalyse aufgrund seiner Entfernung zum aktiven Zentrum (Abb. 5.1, 5.3; Distanz zwischen NH₂ Arg55 – CuA: 10 Å) jedoch als Akzeptor uninteressant. Nichtsdestoweniger ist Arg55 in der Lage, seinen Protonierungsgrad je nach pH-Wert des umgebenden Milieus zu ändern. Die verwendete Struktur der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* wurde im Komplex mit seinem Hilfsprotein (ORF378) gelöst (Matoba et al. 2006). Es ist also unklar, inwiefern sich die Struktur der Tyrosinase und damit auch Arg55 (Abb. 5.1) nach Dissoziation, also im aktiven Zustand, verändert. Möglicherweise erfolgt eine Konformationsänderung, welche die Aminogruppen des Arg55 näher an das aktive Zentrum der Tyrosinase bringt. Dies ist jedoch hypothetisch.

Bei der Catecholoxidase aus *I.batatas* (Klabunde et al. 1998) besetzt ebenfalls eine basische Aminosäure die verglichene Aminosäure-Position - ein Asparagin (Asn110) – welche sich mit dem Arginin (Arg55) der Tyrosinase (*S.castaneoglobisporus*) überlagern lässt (Abb. 5.1). Dieses besitzt einen weniger basischen pK als das Arginin der Tyrosinase (siehe Tab. 5.2). Ebenfalls von Bedeutung ist die Fähigkeit, das aktive Zentrum sterisch für Substrate zu verdecken. Dies ist nur mit Hilfe großer sperriger Aminosäuren möglich.

Im Falle der Hämocyanine wird die diskutierte Position von meist schwach sauren Aminosäuren mit kleinen Seitenketten besetzt, oder wie im Fall von Glycin, welches ein Wasserstoffatom als Rest besitzt (siehe Tab. 5.2). Dies entspricht der These von Decker et al. (2008), dass Hämocyanine dem Sauerstofftransport dienen und Catecholase- bzw. Tyrosinase-Aktivität erst nach Teildenaturierung mit SDS zeigen (Decker & Rimke, 1998; Pless et al. 2003; Decker et al. 2001; Jaenicke & Decker, 2004). Dort ist kein spezifischer katalytischer Rest notwendig, da die Quartär- bzw. Tertiärstruktur des Proteins im Falle der Catecholase- bzw. Tyrosinase-Aktivität schon fortschreitend denaturiert ist (Baird et al. 2007; Cong et al. 2009).

Bei der Polyphenoloxidase aus *M.sexata* (Li et al. 2009) ist zusätzlich zur diskutierten Aminosäureposition (hier Glu353 in PPO1) ein katalytisches Glutamat vorhanden (Abb. 5.2; E395 in PPO1), welches als Base für die Deprotonierung des Substrates verantwortlich sein könnte. Ein vergleichbarer Rest lässt sich jedoch in keiner anderen bekannten Typ-3-Kupferproteinstruktur finden. Die durch Virador et al. 2009 publizierte Struktur der Polyphenoloxidase aus *V.vinifera* besitzt ebenfalls einen Glutamatrest, welcher innerhalb des 4 α -Helix-Bündels lokalisiert ist. Dieser Rest lässt sich bei allen anderen bekannten Strukturen von Typ-3 Kupferproteinen finden, kommt aber als möglicher katalytischer Rest aufgrund seiner Entfernung (>6 Å) zum aktiven Zentrum nicht in Frage.

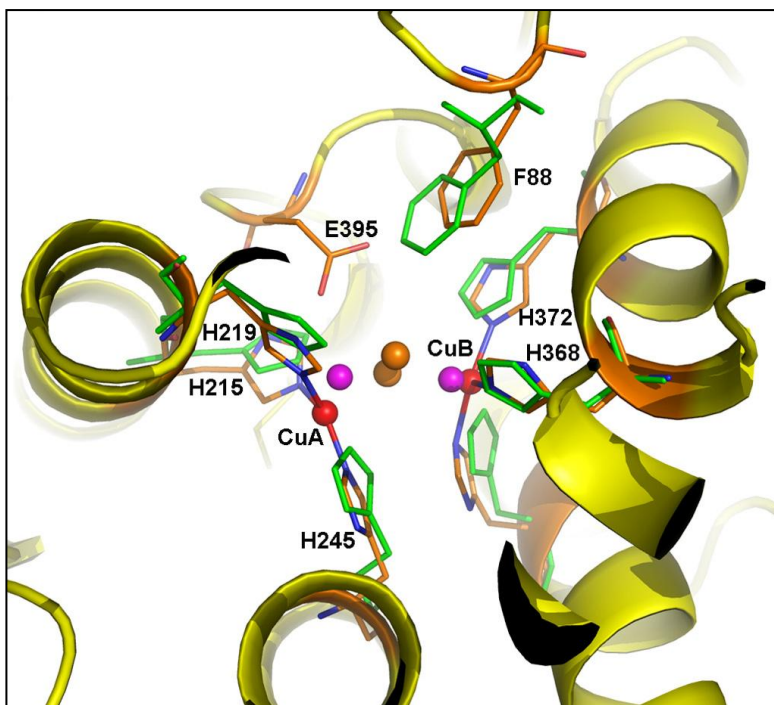


Abbildung 5.2: Aktives Zentrum der *M.sexata* PPO2 in Superposition mit *L.polyphemus* Hämocyanin (1OXY). Sekundärstrukturen in der Ribbondarstellung (gelb). Koordinierende *L.polyphemus*-Histidine (grün), *M.sexata*-Histidine und Glu395 (orange) in Stickdarstellung. Kupfer und Sauerstoffatome sind als Kugeln gezeigt. Einfärbung: Kupfer *M.Sexata*: rot, *L.polyphemus*: magenta, Sauerstoff: braun. Der katalytische Rest E395 befindet sich nahe des Substratplatzhalters F88. Abbildung entnommen aus Li et al. (2009).

Die Übereinstimmung der aktiven Zentren sowie des umgebenden 4 α -helikalen Milieus ist in allen Typ-3-Kupferproteinen identisch weshalb ein wichtiger Faktor die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Substrate darstellt. Dieser Zugang ist in Hämocyaminen durch sperrige Aminosäuren wie beispielsweise Phenylalanin blockiert (Hazes et al. 1993; Magnus et al. 1994).

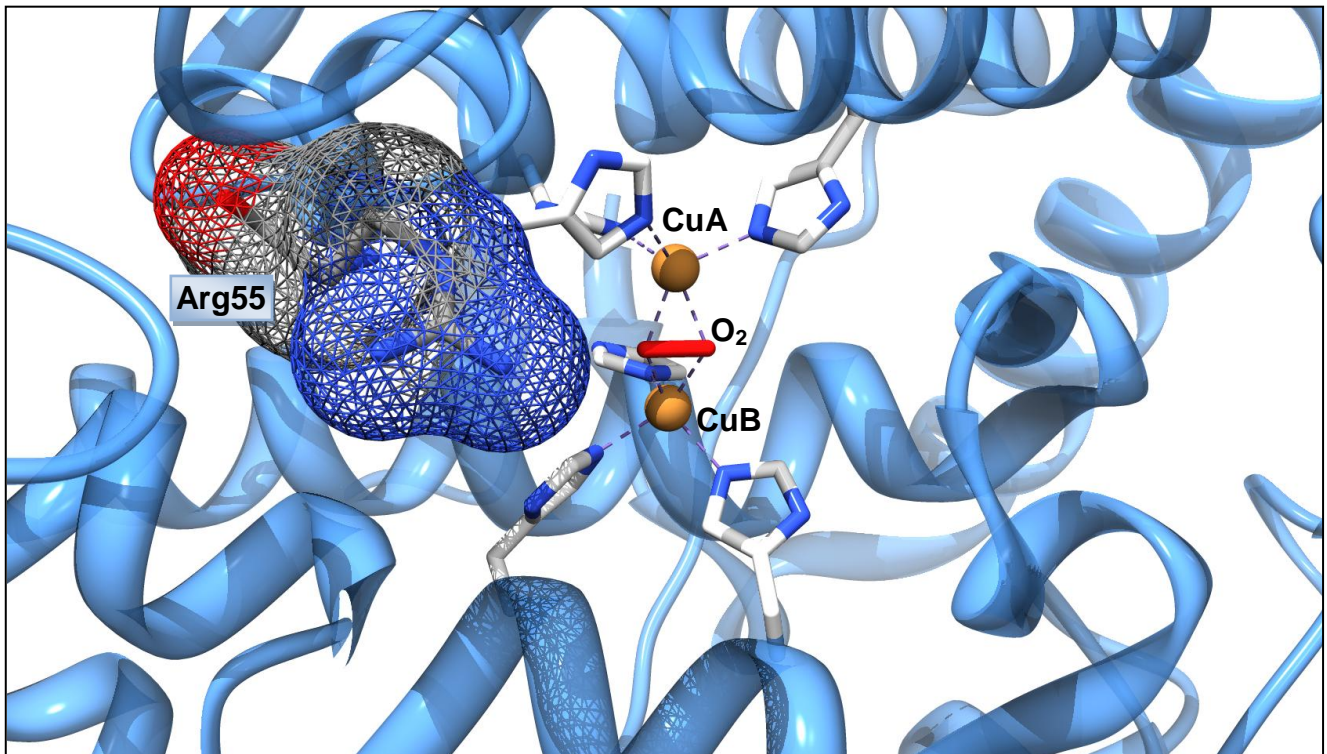


Abbildung 5.3: Zugang zum aktiven Zentrum der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*. Tyrosinase in Ribbon-Darstellung (hellblau), Kupferatome (kupferfarben) in der *Spacefill*-Darstellung, Sauerstoffatome (rot), koordinierende Histidine, Arg55 (grau) in der Stick-Darstellung in CPK-Farben und *molecular surface*.

Eine Möglichkeit, die Substratspezifität der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus HUT6202* zu erklären, ist der sehr polare und durch Arg55 positiv geladene Zugang zum aktiven Zentrum des Proteins (Abb. 5.3).

Substrate, die experimentell keinen, oder nur geringfügigen enzymatischen Umsatz zeigten, wie Tyrosin, L-Dopa oder Dopamin, besitzen innerhalb ihrer Restgruppe alle eine primäre oder sekundäre Aminogruppe ($-NH_2$), welche dem Substrat basische Eigenschaften verleiht. In Bezug auf den Zugang zum aktiven Zentrum der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* bedeutet dies eine sterisch stark eingeschränkte Flexibilität des Substrats, da die primären Aminogruppen des Arg55 die Aminogruppe der Substrate abstoßen. Dies könnte den Eintritt des Substrates in die Bindungstasche des Enzyms verhindern. Allen Substraten, die katalytisch umgesetzt werden konnten, ist gemein, dass sie keine Aminogruppe in ihrem Rest aufweisen, also weniger polar sind und demnach am Eintritt in die Bindungstasche weniger gehindert werden. Im Gegenteil könnte eine Bindung der

Carboxylgruppe (-COOH) der Substrate an die Aminogruppen von Arg55 erfolgen, wodurch die Substrate in der Bindungstasche der Tyrosinase während der Katalyse fixiert werden könnten.

Dieser Mechanismus bevorzugt natürliche Substrate - wie Kaffeesäure und p-Cumarsäure - welche von pflanzlichem Lignin abgeleitete Phenole darstellen. Diese Feststellung erscheint logisch, da es sich bei *S.castaneoglobisporus* um ein bodenlebendes Bakterium handelt (Claus & Decker, 2006; Claus, 2010) sowie bei der Tyrosinase um ein extrazelluläres Enzym, dass die im Boden frei zugänglichen Substrate dem Bakterium nutzbar macht. In diesem Kontext erscheint die Katalyse nicht physiologischer Substrate wie Tyrosin und L-Dopa nicht notwendig.

Ein Vergleich der Zugänge der aktiven Zentren verschiedener Typ-3-Kupferproteine (Catecholoxidase [1BUG] aus *I.batatas*, *Oktopus* Hämocyanin [1JS8], und *Limulus* Hämocyanin [1OXY]) zeigte, dass in Hämocyaninen der Zugang zum aktiven Zentrum stets durch eine angrenzende Domäne blockiert ist, jedoch einen Zugang für die Bindung von molekularem Sauerstoff offen lässt (Cong et al., 2009; Cuff et al., 2001; Hazes et al., 1993; Volbeda & Hol, 1989), während die Catecholoxidase aus *I.batatas* einen deutlich weiteren Zugang zum aktiven Zentrum besitzt (Klabunde et al., 1998), in dem sich die jeweilige Bindungstasche für Substrate befindet.

6 Zusammenfassung

Die Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202* ist für biochemische und strukturelle Untersuchungen besonders gut geeignet, da sie als globuläres binäres Protein vorliegt. Als bakterielles Protein lässt sich die Tyrosinase aus *Streptomyces* in einen *E.coli* Expressionsstamm klonieren und exprimieren.

In dieser Arbeit wurde die Tyrosinase zusammen mit seinem Hilfsprotein (ORF378) polycistronisch in *Escherichia coli BL21 (DE3)*-Zellen heterolog exprimiert. Das Produkt der Expression ergab einen funktionellen binären Proteinkomplex, welcher mit einer Ausbeute von bis zu 0,8 mg/L über einen C-terminalen His-Tag sowie eine anschließende Größenausschlusschromatographie auf bis 95 % gereinigt werden konnte.

Der gereinigte binäre Komplex aus Tyrosinase und Hilfsprotein wurde mit Hilfe isoelektrischer Fokussierung untersucht um die jeweiligen isoelektrischen Punkte der beiden Proteine zu bestimmen (pI 4,8 für die Tyrosinase sowie 4,9 für das Hilfsprotein), welche stark von den anhand der Aminosäuresequenz errechneten pIs abweichen (6,2 und 6,4). Des Weiteren wurde die Tyrosinase auf ihre Substratspezifität getestet, wobei sich ein bevorzugter Umsatz von Kaffeesäure (K_m 1,4 mM; V_{max} 21.5 $\mu\text{M min}^{-1}$) und p-Cumarsäure zeigte. Es erfolgte keine Katalyse von Tyrosin und Tyramin sowie nur in geringem Maß von L-Dopa. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein enzymatischer Umsatz nur stattfindet, nachdem die Tyrosinase mit CuSO_4 aktiviert wurde. Eine Aktivierung mit SDS konnte nicht beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Aktivierung des binären Komplexes lässt sich mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung und analytischer Ultrazentrifugation eine Dissoziation des Komplexes in seine monomeren Komponenten nach Aktivierung mit CuSO_4 vermuten. Dies würde den bislang hypothetisch angenommenen Mechanismus der Aktivierung der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* bestätigen.

In silico-Arbeiten wurden durchgeführt um ein tieferes Verständnis der Substratspezifität zu bekommen. Substrat-Docking-Experimente bestätigten die im Labor erhaltenen Ergebnisse. Eine Strukturanalyse deutet auf eine sterische Hinderung der Substrataufnahme für Substrate mit sekundären Aminogruppen hin.

Analysen des Protein-Interface von Tyrosinase und Hilfsprotein konnten kupferfixierende Faltungsmotive an der Oberfläche des Hilfsproteins aufzeigen. Bei diesen handelt es meist um 3-4 polare Aminosäuren, welche in der Lage sind, ein Kupferatom zu fixieren. Durch die Bindung der Kupferatome an die fixierenden Motive werden wahrscheinlich zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen getrennt, welche den Komplex in seiner inaktiven Form stabilisieren.

7 Ausblick

Im Zuge der weiteren Untersuchung der enzymatischen Katalyse der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* wurden im Zuge dieser Arbeit mögliche Mutationsstellen für eine seitenspezifische Mutagenese identifiziert:

Ile42

Arg55

Glu182

Asn191

His215

Die Mutationsstellen liegen vor allem im Bereich des aktiven Zentrums und sollen durch ihren Austausch Aufschluss über die Frage nach einem potentiellen Protonenakzeptor sowie die Möglichkeiten der sterischen und ladungsspezifischen Substratspezifität geben.

Als Grundlage für die Klonierungsarbeiten kann das im Zuge dieser Arbeit hergestellte Plasmid pET21a(+) inklusive polycistronischer Tyrosinase verwendet werden.

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der Mutanten soll deren enzymatische Untersuchung weitere Einblicke in die Biochemie der Tyrosinase bringen. Durch Überexpression des binären Proteinkomplexes in großen Mengen wäre die Kristallisation und anschließende strukturelle Untersuchung von großem Interesse.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Reaktionen der Tyrosinase.** Katalysiert wird die *o*-Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen, sowie die Oxidation von *o*-Diphenolen zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen wahrscheinlich in einem Schritt (Decker et al. 2006). In beiden Reaktionen wird molekularer Sauerstoff verbraucht. Durch anschließende autokatalytische Polymerisierung der *o*-Dichinone erfolgt die Bildung von Melanin. 2
- Abbildung 1.2: Genomische Struktur verschiedener Tyrosinasen ausgewählter Organismen.** a) Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 (grün) mit Hilfsprotein ORF378 (orange); b) Tyrosinase aus *Streptomyces avermitilis* (grau); c) Tyrosinase aus *Corynebacterium efficiens* YS-314 (grau-blau); d) Tyrosinasen aus diversen Bakterien besitzen zusätzlich zum *tyrosinase*-Gen noch homloge Abschnitte des *orf378* aus *S.castaneoglobisporus* (gelb) wie beispielsweise aus *Streptomyces sviveus* ATCC 29083; e) Tyrosinase aus der Maus (*Mus Musculus*, dunkelblau). 4
- Abbildung 1.3: a) Aktives Zentrum der Tyrosinase** aus *Streptomyces castaneoglobisporus* in der *oxy*-Form (modifiziert nach Decker et al. 2006). Die beiden Kupferionen (orange spacefill) werden jeweils von drei Histidinen koordiniert. Über die beiden Kupferatome ist molekularer Sauerstoff (orange spacefill mittig) in einer *side-on*-Koordination gebunden. **b) Strukturüberlagerung** der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus* (1WX4), Catecholoxidase aus *I.batatas* (1BUG), *Octopus polyphemus* Hämocyanin (1JS8), *Limulus polyphemus* Hämocyanin (1OXY), sowie den modellierten Hämocyanin-Strukturen der Untereinheiten A, B, C aus *Eurypelma californicum*. Deutlich zu erkennen ist, dass die 4 α -Helix-Bündel, welche das aktive Zentrum aller Typ-3-Kupferproteine umgeben, sowie die Kupfer-koordinierenden Histidine ohne große Abweichung überlagert werden können. 5
- Abbildung 1.4: Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 (cyan) im Komplex mit dem Hilfsprotein ORF378 (grün).** Die Proteine sind in der *Ribbon*-Darstellung gezeigt, die Kupferatome in orange in der *Spacefill*-Darstellung, die Kupfer koordinierenden Histidine sind in der *Stick*-Darstellung gezeigt. Im Komplex mit dem Hilfsprotein blockiert dieses den Zugang zum aktiven Zentrum. 6
- Abbildung 1.5: ortho-Hydroxylierung und anschließende Oxidation von Monophenolen durch Tyrosinasen.** (Decker et al. 2006). 8
- Abbildung 1.6: Prozess der Melanogenese.** Bildung von Pheo- und Eumelanin in Säugeteieren durch Tyrosinase sowie *Tyrosinase-related-protein-1* (TYRP-1) und *Tyrosinase-related-protein-2* (TYRP-2) (Ebanks et. al. 2009). 10
- Abbildung 3.1: Oxidation von L-Tyrosin und L-DOPA durch die Tyrosinase.** 1 – Tyrosin, 2 – Dopachinon, 3 –L- DOPA, 4 – CycloDOPA, 5 – Dopachrom (Modifiziert nach Land et al., 2003). 30
- Abbildung 3.2: Wirkende Kräfte bei der analy-tischen Ultra-zentrifugation.** Schematische Darstellung und Berechnung des Sedimentations- koeffizienten. 31
- Abbildung 3.3: Phasendiagramm der Kristallisation nach McPherson, 1990.** Aufgetragen ist die Proteinkonzentration gegen die Präzipitanzkonzentration. Es sind vier verschiedene Phasen zu unterscheiden: die labile, die metastabile, die ungesättigte, sowie die übersättigte Region. 36
- Abbildung 3.4: Prinzip des hängenden Tropfen.** Proteinlösung und Fällungsmittellösung werden auf einem Deckglas zusammengemischt. Das kopfüber gedrehte Deckglas wird verwendet, um eine mit Fällungsmittel gefüllte Kammer luftdicht zu verschließen. 38
- Abbildung 4.1: Anzucht von *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202** auf GYM-Agarplatten bzw. Flüssigmedium bei 28 °C über einen Zeitraum von jeweils 7 Tagen. 43
- Abbildung 4.2: 1,2 %iges Agarosegel mit aufgetragenen DNA-Extraktionen A und B.** Verwendeter Marker: „DNA Ladder Mix“ (GeneRuler). Angaben in Kilobasen (kb). 44
- Abbildung 4.3: Agarose-Gelelektrophorese von Amplifikaten einer PCR mit 16S RNA-Primern (erwartete Fragmente: 500 bp und 1,2 kb).** Verwendeter Marker: „DNA Ladder Mix“

- (GeneRuler) auf Spur A. B: 2.1f/2.2r; C: Negativkontrolle; D: Negativkontrolle; E: 2.f/2.1r; F: 1f/1.1r; G: 1f/2.1r. Angaben in Kilobasen (kb). 45
- Abbildung 4.4: Sequenzalignment der sequenzierten 16S RNA mit verwandten Streptomycceten.** Die Sequenz der amplifizierten RNA ist in Zeile 1 mit Myc_Sec bezeichnet und mit den vergleichbaren Sequenzen verwandter Streptomycceten *aligniert*. In Zeile 2 ist die 16S RNA Sequenz aus *Streptomyces castaneoglobisporus HUT6202* aufgetragen. Schwarze Hinterlegung: 100 % Identität, Dunkelgrau: 90 % Identität, Hellgrau: 80 % Identität, Weiß: <80 % Identität. 47
- Abbildung 4.5: Sequenzalignment Ausschnitt aus Abbildung 4.4.** 16 S RNA Sequenzen verwandter *Streptomycceten aligniert* mit der amplifizierten und sequenzierten Sequenz. Die signifikanten Unterschiede zur Sequenz aus *S.castaneoglobisporus* sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. 48
- Abbildung 4.6: Konstrukt zur heterologen Expression der Tyrosinase im Komplex mit ORF378.** T7P (weiß): T7-Promotor; orf378 (rot): „Hilfsprotein“ *open reading frame 378*; tyrC (blau): Tyrosinase; His₆-Tag (gelb): C-terminaler Histidin₆-Tag; rbs: ribosomale Bindestelle. XhoI, NdeI: Restriktionsschnittstellen der jeweiligen Enzyme. 49
- Abbildung 4.7: CAI Werte für orf378 (a) und Tyrosinase (b) nach (grün), und vor (blau) der Sequenzoptimierung.** 50
- Abbildung 4.8: FOP Werte für orf378 (a) und Tyrosinase (b) nach (grün), und vor (blau) der Sequenzoptimierung.** 51
- Abbildung 4.9: pET21a(+)** mit kloniertem Melanin-Operon, bestehend aus orf378 und Tyrosinase. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors werden beide Proteine polycistronisch exprimiert, wobei die Tyrosinase mit einem C-terminalen Histidin₆-Tag versehen wird. 51
- Abbildung 4.10: Elutionsprofil der Ni-NTA Säule nach dem Auftragen des aufgeschlossenen Zelllysats.** Die Gesamt-proteinmenge wurde durch Absorption bei 280 nm gemessen. Das Insert zeigt die Elution ab 0 mM Imidazol und damit die Elution unspezifisch oder nicht gebundener Proteine. 53
- Abbildung 4.11: 17,5 % SDS-PAGE der Reinigungsschritte des Tyrosinase-Komplexes.** Spalte 1, 13:Marker *PreScission Protein Standards* (Biorad), Spalte 2: Hauptkultur, Spalte 3: Pellet der Ultrazentrifugation nach Zellaufschluss, Spalte 4: Überstand der Ultrazentrifugation, Spalte 5: Durchfluss der Ni-NTA Säule, Spalten 6-12, 14-16 Elutionsschritte der Nickel Säule mit steigender Imidazolkonzentration. Erwartete Banden für Tyrosinase (31kDa) und ORF378 (13kDa), wurden mit leicht verändertem Laufverhalten vermutet, da die Proben nicht bei 95 °C inkubiert wurden. 53
- Abbildung 4.12: Gelfiltration (Sephacryl-100 Säule).** Nach zirka 75-minütiger Laufzeit konnte ein monodisperser Peak beobachtet werden. 54
- Abbildung 4.13: (a) 17,5 % SDS-PAGE.** A: Marker und B-D: Proben nach Gelfiltration (Abb. 4.12) zeigen vermutlich Tyrosinase sowie das Hilfsprotein ORF378. **(b) 12,5 % Native PAGE pH 8,8** von zwei Expressionen zeigen vermutlich gereinigte Tyrosinase – wahrscheinlich im Komplex mit dem Hilfsprotein ORF378, sowie im **12,5 % Nativgel bei pH 7,8 (c)**. Beim aufgetragenen Marker handelt es sich um Hämocyanin-Untereinheiten. **(d) Natives Gradientengel (5-20 %) pH 8,8;** A: Native Probe in Na-Phosphat Puffer 6,2; B: Native Probe + 5 mM SDS; C: Native Probe + 5 µM CuSO₄. Bei den auftretenden Banden handelt es sich vermutlich um 1: Tyr-Caddie-Komplex, 2: Caddie-Protein, 3: Tyrosinase. 55
- Abbildung 4.14: Isoelektrische Fokussierung des binären Tyrosinase-Komplexes.** Die Fokussierung erfolgte bei 1.000 V, 3 mA, 12 W, 3 h, sowie 3.500 Vh. Die beiden auftretenden Banden (weißer Kasten) entsprechen wahrscheinlich der monomeren Tyrosinase sowie dem Hilfsprotein ORF378. Aufgetragen wurden 10 µl **a)** und 5 µl **b)** Probenvolumen. Die verwendete Probe besaß einen Reinheitsgrad von >90 %. Als Marker (**M**) wurde der *IEF Marker liquid Mix* von SERVA verwendet. Die Färbung erfolgte mit SERVA Violett. Zur deutlicheren Darstellung wurden die Farben am Computer invertiert. 57
- Abbildung 4.15: Getestete mono- (a), und diphenolische (b) Substrate der Tyrosinase.** 58

Abbildung 4.16: Enzymatische Messungen der heterolog exprimierten Tyrosinase. Gezeigt ist jeweils das Produkt-, Referenz- und Differenzspektrum für den enzymatischen Umsatz. Für alle Messungen wurde eine Endkonzentration an 44 µg/ml Tyrosinasekomplex eingesetzt. **a)** 1 mM Kaffeesäure in 0,1 M NaPO₄ pH 6,2 mit 5 µM CuSO₄; Zur Orientierung ist die schwarz gestrichelte Linie hinzugefügt; **b)** 50 µM p-Cumarsäure in 0,1 M NaPO₄ pH 6,2 mit 5 µM CuSO₄; **c)** 1 mM L-Dopa in Tris-Puffer pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 µM CuSO₄; **d)** 1 mM Tyrosin in Tris/HCl pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 µM CuSO₄; **e)** 1 mM Tyramin in Tris/HCl pH 7,9 (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 5 µM CuSO₄. 60

Abbildung 4.17: Enzymatische Messungen des Umsatzes an diphenolischem Substrat Kaffeesäure **a)** 50 µM und **b)** 1 mM. **c)** Umsatz an monophenolischem Substrat p-Cumarsäure (4-Hydroxy-Zimtsäure) [50 µM]. **d)** Umsatz von 1 mM Kaffeesäure bei Zugabe von 5 µM Kupfersulfat sowie ohne Kupfersulfat. 61

Abbildung 4.18: Kinetik der Tyrosinase. a) Michaelis-Menten Darstellung b) Lineweaver-Burk Diagramm. Verwendetes Substrat: Kaffeesäure. Bedingungen: C_{Tyr-Caddie} = 44 µg/ml, 25 °C, 0,1 M NaPO₄ pH 6,2 mit 5 µM CuSO₄. 62

Abbildung 4.19: Autooxidation von Tyrosinase-Substraten. a) 1 mM L-DOPA in 0,1M NaPO₄ Puffer pH 6,2; 20 mM Tris-Puffer pH 7,9; 0,1M Glycin Puffer pH 10,4 **b)** 20 mM Dopamin in 0,1 M NaPO₄ Puffer pH 6,2 **c)** 1 mM Tyramin in 20 mM Tris/HCl pH 7,9; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol **d)** 1 mM L-Dopa in 20 mM Tris-Puffer pH 7,9; 5 mM Imidazol; 5 µM CuSO₄. 62

Abbildung 4.20: Dynamische Lichtstreuung an Tyrosinase-Proben. Mehrfachmessungen von Tyrosinase-Proben in Tris Puffer (20 mM Tris pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) **(a)**, nach Zugabe von 5 µM CuSO₄ **(b)**, sowie nach Zugabe von 5 mM SDS **(c)**. **(d)** zeigt eine Überlagerung der Messungen a, b und c und eine deutliche Verschiebung der Größe des hydrodynamischen Radius der Probe. 63

Abbildung 4.21: Extra-polations-Plot und Geschwindigkeitsdaten für **(a)** den Tyrosinase-Caddie Komplex (nativ) mit folgenden Einstellungen: *Back diffusion tolerance*: 0,002; *Divisions*: 50; *Data smoothing*: 10; *% of Boundary*: 63; *Boundary position*: 26. 66

Abbildung 4.22: Superposement einzelner Simulations-Snapshots. a) und c) zeigen *Snapshots* der Simulationen mit Tyrosin, **b) und d)** L-Dopa. a) und b) zeigen die frontale Aufsicht, auf das aktive Zentrum der Tyrosinase, c) und d) zeigen die Seitenansicht der überlagerten *Snapshots*. Verwendetes Kraftfeld: Amber03, Simulationszeit 6 bzw. 15 ns. Grün: Substrat nach 0 ps Simulationszeit, gelb: Substrat nach 200 ps, rot: nach 5000 ps. Tyrosinase in *Ribbon*-Darstellung in grau, Oberflächenfärbung der Tyrosinase in blau. 69

Abbildung 4.23: Superposement einzelner Simulations-Snapshots. Simulation mit Kaffeesäure: **A** Übersicht, **B** Detailansicht der fixierten Substrate während der fortschreitenden Simulation. Simulation mit p-Cumarsäure in der Übersicht **C**, und Detailansicht **D**. *Ribbon*-Darstellung von Tyrosinase (weiß), ORF378 (grau) und Kaffeesäure (orange [0 ns], gelb [6 ns], grün [8,75 ns], cyan [10 ns], blau [12,5 ns], violett [15 ns], magenta [17,5 ns]). 70

Abbildung 4.24: Analyse der Interfaceregion von Tyrosinase und ORF378. **a)** Kupferbindungsmotive des Hilfsproteins (grün) in der Interfaceregion (Oberflächeneinfärbung der Tyrosinase in dunkelblau). Kupferbindungsmotiv 1 [betaturn1], rot (Sequenz N86, A87, D88, G87), Motiv 2 [nested], gelb (Sequenz D88, G89, S90) und Motiv 3, cyan [betaturn2](L115, Q116, G117, A118). Motiv 4 [stmotif], magenta (T103, P104, R105, A106, A107) ist nicht im Interface lokalisiert. Histidine sind orange eingefärbt. **b), c)** Affinität der 4 Motive bezüglich verschiedener Substanzen. Die Balkengröße gibt die relative Affinität des Motivs zur jeweiligen Substanz an. 71

Abbildung 4.25: Detailansicht des Tyrosinase-ORF378 Komplexes. Kupferaffinitätsmotiv (grau) des Hilfsproteins (grün), sowie Wasserstoffbrückenbindungen (blau) zur Tyrosinase (orange). 72

Abbildung 4.26: Sequenzalignement des Hilfsproteins ORF378 verschiedener Streptomycesen. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Alignements, für welches die

- Aminosäuresequenz des Hilfsproteins ORF378 verwendet wurde. In blau sind die Kupferbindenden Motive hinterlegt, in rot die Aminosäuren, welche für die Substratbindung verantwortlich sind. Die Benennung der Sequenzen erfolgte anhand der *NCBI accession numbers*. 73
- Abbildung 4.27: Superposement Substratdocking. Aufsicht a) und gezoomte Seitenansicht b) der Bindungstasche der Tyrosinase sowie der „gedockten“ Substrate.** Monophenolische Substrate: Tyrosin (gelb), p-Cumarsäure (grün); Diphenolische Substrate: L-Dopa (grau), Kaffeesäure (rot). Sekundärstrukturen sind grau in Cartoondarstellung gezeigt. Kupfer (gelb) und Sauerstoff (rot) sind in der Spacefilldarstellung gezeigt. 76
- Abbildung 5.1: Struktur Superposement.** Überlagert wurden die Strukturen der Catecholoxidase (1BUG) aus *I.batatas*, *Oktopus* Hämocyanin (1JS8), *Limulus* Hämocyanin (1OXY), Tyrosinase (1WX4) aus *S.castaneoglobisporus*, Polyphenoloxidase (2P3X) aus *V.vinifera* und 3HHS aus *M.sexta* sowie der *E.californicum* Hämocyanin Untereinheiten a,b,c. Die Kupferatome sind in der Spacefilldarstellung in blau, die Sauerstoffatome der Tyrosinase rot eingefärbt. Die koordinierenden Histidine von CuA sind rot, koordinierende Histidine von CuB grün gefärbt. Disulfidbrücken sind dunkelblau eingefärbt. Die in der Stickdarstellung und CPK-Farben gezeigten Glutamate unterhalb des aktiven Zentrums sind mit Ausnahme des *Limulus*-Hämocyanins in allen Typ-3 Kupferproteinstrukturen zu finden. Arg55 aus der Tyrosinase (*S.castaneoglobisporus*) und Asn110 der Catecholoxidase (*I.batatas*) sind am linken Bildrand ebenfalls in CPK-Farben dargestellt (Rolff et al. 2011, persönliche Mitteilung H.Decker). 84
- Abbildung 5.2: Aktives Zentrum der *M.sexta* PPO2 in Superposition mit *L.polyphemus* Hämocyanin (1OXY).** Sekundärstrukturen in der Ribbondarstellung (gelb). Koordinierende *L.polyphemus*-Histidine (grün), *M.sexta*-Histidine und Glu395 (orange) in Stickdarstellung. Kupfer und Sauerstoffatome sind als Kugeln gezeigt. Einfärbung: Kupfer *M.Sexta*: rot, *L.polyphemus*: magenta, Sauerstoff: braun. Der katalytische Rest E395 befindet sich nahe des Substratplatzhalters F88. 86
- Abbildung 5.3: Zugang zum aktiven Zentrum der Tyrosinase aus *S.castaneoglobisporus*.** Tyrosinase in Ribbon-Darstellung (hellblau), Kupferatome (kupferfarben) in der Spacefill-Darstellung, Sauerstoffatome (rot), koordinierende Histidine, Arg55 (grau) in der Stick-Darstellung in CPK-Farben und *molecular surface*. 87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Tabelle der verwendeten Bakterienstämme	12
Tabelle 2.2: Tabelle der verwendeten Plasmide	12
Tabelle 2.3: der verwendeten Primer	12
Tabelle 2.4: Tabelle der verwendeten Enzyme	13
Tabelle 2.5: Tabelle der verwendeten Marker	13
Tabelle 2.6: Tabelle der verwendeten Medien	13
Tabelle 2.7: Tabelle der verwendeten Antibiotika	14
Tabelle 2.8: Tabelle der verwendeten Reagenzienkits	15
Tabelle 2.9: Tabelle der verwendeten Geräte	15
Tabelle 3.1: Agarose Gelelektrophoresepuffer	20
Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Polyacrylamid Gele. Angabe im ml/Gel	23
Tabelle 3.3: SDS-PAGE Puffer	23
Tabelle 3.4: Puffer für die native Gelelektrophorese	24
Tabelle 3.5: Puffer für die Coomassie Färbung	26
Tabelle 4.1: DNA-Extraktion aus <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> HUT6202. A260: Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA), A280: Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), 260/280: Verhältnis von 1,8 wird als eine reine DNA Probe gewertet, 260/230: Verhältnis von 2,0 wird als eine reine DNA Probe gewertet.	44
Tabelle 4.2: Tests verschiedener Expressionsbedingungen. Getestet wurde die Proteinexpression bei 28 °C und 20 °C nach verschiedenen Zeiträumen. Bei 20 °C und 20-stündiger Expressionszeit wurde die mit Abstand höchste Proteinausbeute erreicht.	52
Tabelle 4.3: Berechnete Molekulargewichte von Tyrosinase und ORF378 auf der Basis einzelner SDS-Gele (Angaben in kDa). Die den Literaturangaben (bestimmt über die Primärsequenz) am besten entsprechende Berechnung ist blau hinterlegt. Die jeweiligen Durchschnittswerte sind grün hinterlegt, während die Literaturangaben mit roter Hinterlegung gekennzeichnet sind. Die Proben wurden hierzu für 6 min bei 95 °C inkubiert.	56
Tabelle 4.4: Getestete mono- (blau hinterlegt), und diphenolische (rot hinterlegt) Substrate für die Tyrosinase aus <i>S.castaneoglobisporus</i>. Eine Aktivität der Tyrosinase und der quantitative Umsatz des Substrats wurde mit (+) indiziert, während mit (---) gekennzeichnete Substrate nicht umgesetzt werden konnten. Die Aktivierung erfolgte mit jeweils 5 µM CuSO ₄ bei pH 6.2, bei 25 °C.	59
Tabelle 4.5: Auswertung der Daten der dynamischen Lichtstreuung. Die gezeigten Daten beruhen auf der <i>Numbers</i> -Verteilung.	64
Tabelle 4.6: Auswertung der analytischen Ultrazentrifugation.	67
Tabelle 4.7: Ergebnisse der Substrat-Docking-Experimente.	74
Tabelle 5.1: Vergleich der K_m-Werte von Tyrosinasen unterschiedlicher Organismen.	79
Tabelle 5.2: Vergleich ausgewählter Aminosäuren mit möglicher katalytischer Bedeutung sowie ihrer Eigenschaften im strukturell konservierten 4α-Helix-Bündel von Typ-3-Kupferproteinen sowie der enzymatischen Aktivität. Der entsprechende strukturelle Vergleich ist in Abbildung 5.2 gezeigt.	83

Abkürzungen

% (v/v)	Prozentualer Volumenanteil (volume per volume)
% (w/v)	Prozentualer Gewichtsanteil (weight per volume)
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
Å	Angström
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BN	Blue Native
DNA	Deoxynukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eury	<i>Eurypelma californicum</i>
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GYM	Glucose, yeast and malt medium
HC	Hämocyanin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
M _w	Molekulargewicht
min	Minuten
mM	Millimolar

nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotide
orf	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Peak</i>	Im Elutionsdiagramm das Volumen der Fraktionen innerhalb der Gaußschen Verteilungskurve
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
PPO	Polyphenoloxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat Puffer
TAT	<i>twin-arginine translocation</i>
TB-Medium	Terrific Broth-Medium
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-hydroxymethylpropan-1,3-diol
Tyr	Tyrosinase
TYRP	<i>Tyrosinase-related-protein</i>
µm	Mikrometer
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett

Literaturverzeichnis

Adachi K., Wakamatsu K., Ito S., Miyamoto N., Kokubo T., Nishioka T. and Hirata T. (2005) An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Res.* 19; 214-219.

Abdel-Malek Z.A., Ruwe A., Kavanagh-Starner R., Kadekaro A.L., Swope V., Haskell-Luevano C.H., Koikov L. and Knittel J.J. (2009) α -MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22; 635-644.

Andberg M., Hakulinen N., Auer S., Saloheimo M., Koivula A., Rouvinen J. and Kruus K. (2009) Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *FEBS Journal.* 21; 6285-300.

Ando H., Kondoh H., Ichihashi M. and Hearing V.J. (2007) Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology.* 127; 751-761.

Arakelyan A. (2010) Heterologe Expression und biochemische Untersuchungen der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Bachelorarbeit*, Universität Mainz, FB Biologie.

Armand W., Tepper J.W., Bubacco L. and Canters G.W. (2004) Interaction between the Type-3 Copper Protein Tyrosinase and the Substrate Analogue p-Nitrophenol Studied by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 127; 567-575.

Asanuma M., Miyazaki I. and Ogawa N. (2003) Dopamine- or L-DOPA-Induced Neurotoxicity: The Role of Dopamine Quinone Formation and Tyrosinase in a Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research.* 53; 165-176.

Ashida M. and Brey P.T. (1995) Role of the integument in insect defense: prophenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92; 10698-10702.

Atlow S.T., Bonadonna-Aparo L. and Klibanov A.M. (1984) Dephenolization of industrial waste waters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol Bioeng.* 26; 599-603.

Baird S., Kelly S.M., Price N.C., Jeanicke E., Meesters C., Nillius D., Decker H. and Nairn J. (2007) Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1774; 1380-1394.

Banci L., Bertini I., Cantini F., Inagaki S., Migliardi M. and Rosato A. (2009) The Binding Mode of ATP Revealed by the Solution Structure of the N-Domain of Human ATP7A. *J. of Biol. Chem.* 4; 2537-44.

Basma R.B., Morris E.J., Niklas W.J. and Geller M.H. (1995) L-DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J Neurochem.* 64; 825-832.

- Bell A.A. and Wheeler M.H. (1986)** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev Phytopathol.* 24; 411-451
- Bernan V., Filpula D., Herber W., Bibb M. and Katz E. (1985)** The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene*, 37; 101-110.
- Brack A., Hellmann N. and Decker H. (2008)** Kinetic Properties of Hexameric Tyrosinase from the Crustacean *Panulirus elephas*. *Photochemistry and Photobiology.* 84; 692-699.
- Brown P.H., Balbo A. and Schuck P. (2009)** On the analysis of sedimentation velocity in the study of protein complexes. *Eur. Biophys. J.* 38; 1079-1099.
- Butler M.J. and Day A.W. (1998)** Fungal melanins: a review, *can. J. Microbiol.* 44; 1115-36.
- Cabanes J., Garcia-Canovas F., Lozano J.A. and Garcia-Carmona F. (1987)** A kinetic study of melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim Biophys Acta.* 923, 187-195.
- Carmona F.G., Pedreno E., Galindo J.D. and Canovas F.G. (1978)** A New Spectrophotometric Method for the Determination of Cresolase Activity of Epidermis Tyrosinase. *Anal. Biochem.* 95; 433-435.
- Carvalho G.M.J., Alves T.L.M. and Freire D.M.G. (2000)** L-Dopa production by immobilized tyrosinase. *Appl Biochem Biotechnol.* 84; 791-800.
- Case R.J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W.F. and Kjelleberg S. (2007)** Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as molecular markers for microbial ecology studies. *App. Environ. Microbiol.* 1; 278-288.
- Chen L.H., Leu W.M., Wang K.T. and Lee Y.H.W. (1992)** Copper Transfer and Activation of the *Streptomyces* Apotyrosinase Are Mediated Through a Complex Formation between Apotyrosinase and Its trans-Activator MelC1. *Journal of Biological Chemistry.* 28; 20100-20107.
- Clarridge J.E. (2004)** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4; 840-862.
- Claus H. and Filip Z. (1988)** Behaviour of phenoloxidases in the presence of clays and other soil-related adsorbents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28; 506-511.
- Claus H. and Filip Z. (1990)** Enzymatic oxidation of some substituted phenols and aromatic amines, and the behavior of some phenoloxidases in the presence of soil related adsorbents. *Water Sci. Technol.* 22; 69-77.
- Claus H. and Decker H. (2006)** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 3-14.

Claus H. (2010) Copper containing oxidases: occurrence in soil microorganisms, properties and applications. In: *Shermati I. and Varma A. (eds) Soil Heavy Metals, Soil Biology Vol. 19*, Springer Berlin Heidelberg; 281-313.

Cong Y., Zhang Q., Woolford D., Schweikardt T., Khant H., Dougherty M., Ludtke S.J., Chiu W. and Decker H. (2009) Structural mechanism of SDS-induced enzyme activity of scorpion hemocyanin revealed by electron microscopy. *Structure*. 17; 749-58.

Cuff M., Miller K., van Holde K. and Hendrickson W. (1998) Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278; 855-870.

David M. and Neville Jr. (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* 20; 6328-6334.

Decker H. and Rimke T. (1998) Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273; 25889-25892.

Decker H., Dillinger R. and Tuczec F. (2000) How does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology. *Angew. Chem. Int.* 9; 1591-1595.

Decker H. and Tuczec F. (2000) Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS*, 25; 392-397.

Decker H., Schweikardt T. and Tuczec F. (2006) The first Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45; 4546-4550.

Decker H., Schweikardt T., Nillius D., Salzbrunn U., Jeanicke E. and Tuczec F. (2007) Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*. 398, 183-191.

Deeth R.J. and Diedrich C. (2009) Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *J. Biol. Inorg. Chem.* DOI 10.1007/s00775-009-0577-6.

Dolashki A., Gushterova A., Voelter W. and Tchorbanov B. (2009) Purification and Characterization of Tyrosinases from *Streptomyces albus*. *Z. Naturforsch.* 64c; 724-732.

Ebanks J.P., Wickett R.R. and Boissy R.E. (2009) Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. *Int. J. Mol. Sci.* 10; 4066-4087.

Eicken C., Krebs B. and Sacchettini J.C. (1999) Catechol oxidase – structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology.* 9; 677-683.

Eicken C., Gerdemann C. and Krebs B. (2001) Catechol oxidase. *Handbook of Metalloproteins*.

Espin J.C., Garcia-Ruiz P.A. Tudela J. and Garcia-Canovas F. (1998) Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem. J.* 331; 547-551.

Fairhead M. and Thöny-Meyer L. (2010) Role of the c-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS J.* 277; 2083-2095.

Fais A., Corda M., Era B., Fadda M.B., Matos M.J., Quezada E., Santana L., Picciau C., Podda G. and Delogu G. (2009) Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrids. *Molecules.* 14; 2514-2520.

Fan T., Li M., Wang J., Yang L. and Cong R. (2009) Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*. *Acta. Biochem. Biophys. Sin.* 865-872.

Flurkey W.H. and Inlow J.K. (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 102; 2160-2170.

Forsythe E.L., Maxwell D.L. and Pusey M. (2002) Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. *Acta Cryst.* D58; 1601-1605.

Frangipani E. and Haas D. (2009) Copper acquisition by the SecC protein regulates aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiology Letters* II; 1-7.

Friskén BJ (2001) Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics.* 40; 4087-91.

Garcia-Borron J.C., Solano F., Iborra J.L. and Lozano J.A. (1985) Aggregation equilibria of tyrosinases of Harding-Passey mouse melanoma. *Biochem. J.* 228; 95-101.

Garcia-Molina F., Muonz-Muonz J.L., Garcia-Molina M., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Garcia-Canovas F. and Rodriguez-Lopez J.N. (2010) Melanogenesis Inhibition Due to NADH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 9; 1-11.

Gangi Setty S.R., Tenza D., Sviderskaya E.V., Bennett D.C., Raposo G. and Marks M.S. (2008) Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature letters.* 454; 1142-1146.

Gerdemann C., Eicken C. and Krebs B. (2002) The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. *Acc. Chem. Res.* 35; 183-191.

Germanas J.P., Wang S., Miner A., Hao W. and Ready J.M. (2007) Discovery of small-molecule inhibitors of tyrosinase. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters.* 17; 6871-6875.

Gill T., Sreenivasulu Y., Kumar S. and Ahuja P.S. (2010) Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Phys.* 176; 757-760.

Graham D.G. and Jeffs P.W. (1977) The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 252; 5729-5734.

Haghbeen K. and Tan E.W. (2003) Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Analytical Biochemistry.* 312; 23-32.

Haghteen K., Saboury A.A. and Karbassi F. (2004) Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675; 139-146.

Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.C., Hamdi M. and Komasclo A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*. 100; 219-232.

Hasegawa T. (2010) Tyrosinase-Expressing Neuronal Cell Line as *in Vitro* Model of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 11; 1082-1089.

Hazes B., Magnus K.A., Bonaventura C., Dauter Z., Kalk K.H. and Hol W.G. (1993) Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* 4; 597-619.

Ikeda K., Masujima T. and Sugiyama M. (1996) Effects of Methionine and Cu²⁺ on the Expression of Tyrosinase Activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*. *J. Biochem.* 120; 1141-1145.

Ikeda K., Masujima T., Suzuki K. and Sugiyama M. (1996) Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45; 80-85.

Ikeda K., Suzuki K., Yoshioka H., Miyamoto K., Masujima T. and Sugiyama M. (1998) Construction of a new cloning vector utilizing a cryptic plasmid and the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *FEMES Microbiology Letters*. 168; 195-199.

Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M and Omura S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 5; 526-31.

Inomata K., Aoto T., Binh N.T., Okamoto N., Tanimura S., Wakayama T., Iseki S., Hara E., Masunaga T., Shimizu H. and Nishimura E.K. (2009) Genotoxic Stress Abrogates Renewal of Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation. *Cell* 137; 1088-1099.

Jeanicke E. and Decker H. (2004) Functional Changes in the Family of Taper 3 Copper Proteins During Evolution. *Chem.Bio.Chem.* 5; 163-169.

Jeanicke E. and Pairet B. (2008) Crystallization of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig. *Prot. Pept. Lett.* 16; 444-446.

Jeanicke E., Fraune S., May S., Irmak P., Augustin R., Meesters C., Decker H. and Zimmer M. (2009) Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Developmental and Comparative Immunology*. 33; 1055-1063.

Jeanicke E., Büchler K., Markl J., Decker H. and Barends T.R.M. (2010) Cupredoxin-like domains in heamocyanins. *Biochem J.* 426; 373-378.

Jiang H., Wang Y., Ma C. and Kanost M.C. (1997) Subunit Composition of Pro-phenol Oxidase from *Manduca sexta*: Molecular Cloning of Subunit ProPO-P1. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 27; 835-850.

Khan I.S. and Ali R. (1984) On the conformational state of photoinactivated tyrosinase: possibility of structural segments in enzyme molecule. *J. Radiat. Res.* 26; 109-122.

Kang H.W., Vitko I., Lee S.S., Perez-Reyes E. and Lee J.H. (2010) Structural Determinants of the High Affinity Extracellular Zinc Binding Site on Cav3.2 T-type Calcium Channels. *J. of Biol. Chem.* 285; 3271-3281.

Kibbe W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research.* 35; 43-6.

Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C. and Krebs B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature structural biology.* Vol. 5 Number 12.

Kohashi P.Y., Kumagai T., Matoba Y., Yamamoto A., Maruyama M. and Sugiyama M. (2004) An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Protein Expression and Purification.* 34; 202-207.

Koppel D.E. (1972) Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *J Chem Phys.* 57; 4814.

Kosman D.J. (2009) Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J. Biol. Inorg. Chem.* DOI 10.1007/s00775-009-0590-9.

Kukhitna V. (2006) Expression from polycistronic vectors as a novel approach to study multimeric protein complexes – insights from the nicotinic acetylcholinereceptor. *Int J Biol Macromol.*

Kuznetsov V.D., Filippova S.N., Rybakova A.M. (1984) Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. *Mikrobiologija.* 53; 251-256

Lancaster K.M., George S.D., Yokoyama K., Richards J.H. and Gray H.B. (2009) Type-zero copper proteins. *Nature Chemistry.* Vol. 1.

Land E.J., Ito S., Wakamatsu K. and Riley P.A. (2003) Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Res.* 16; 487-493.

Land E.J., Ramsden C.A. and Riley P.A. (2007) The Mechanism of Suicide-Inactivation of Tyrosinase: A Substrate Structure Investigation. *J. Exp. Med.* 212; 341-348.

Land E.J., Ramsden C.A., Riley P.A. and Stratford M.R.L. (2008) Evidence Consistent with the Requirement of Cresolase Activity for Suicide Inactivation of Tyrosinase. *J. Exp. Med.* 216; 231-238.

- Lee J., Jung E., Lee J., Huh S., Boo Y.C., Hyun C.G., Kim Y.S. and Park D. (2007)** Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *British Journal of Dermatology*. 157; 242-248.
- Le Mellay-Hamon V. and Criton M. (2008)** Phenylethylamide and Phenylmethylamide derivatives are new Tyrosinase inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.* 32; 301-303.
- Li Y., Wang Y., Jiang H. and Deng J. (2009)** Crystal structure of Manduca sexta prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *PNAS*. 106; 17001-17005.
- Liu J.W., Huang Y.Y., Ding J., Liu C., Xiao X.D. and Ni D.J. (2010)** Prokaryotic expression and purification of Camellia sinensis polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 14; 2490-4.
- Magnus K.A., Hazes B., TonThat H., Bonaventura C., Bonaventura J. and Hol W.G. (1994)** Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins*. 4; 302-9.
- Maisuthisakul P. and Gordon M.H. (2009)** Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*. 117; 332-341.
- Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H. and Inlow J.K. (2006)** Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100; 108-123.
- Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H. and Sugiyama M. (2006)** Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 13; 8981-8990.
- McNaughton B.R., Gareiss P.C., Jacobs S.E., Fricke A.F., Scott G.A. and Miller B.L. (2009)** A Potent Activator of Melanogenesis Identified from Small-Molecule Screening. *Chem.Med.Chem.* 4; 1583-1589.
- Migheli R., Godani C., Sciola L., Delogu M.R., Serra P.A., Zangani D., De Natale G., Miele E. and Desole M. (1999)** Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J Neurochem*. 73; 1155-1163.
- Mirica L.M., Vance M., Rudd D.J., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I. and Stack T.D.P. (2005)** Tyrosinase Reactivity in a Model Complex: An Alternative Hydroxylation Mechanism. *Science*, Vol. 308.
- Nematpour F.S., Haghbeen K., Babaei M.K., Jazii F.R., Nouraeen O. and Yancheshmeh M.B. (2008)** The Banana Pulp Polyphenol Oxidase is a Tyrosinase. *Journal of Biological Sciences*. 3; 526-533.
- Nillius D. (2007)** Aktivierung von Hämocyanin zur Tyrosinase. *Dissertation*, Universität Mainz, FB Biologie.

- Nillius D., Jeanicke E. and Decker H. (2008)** Switch between tyrosinase and catecholoxidase activity of scorpion hemocyanin by allosteric effectors. *FEBS Letters*. 582; 749-754.
- Norris B.J. (2008)** Riding 'white' horses reveals new insights into pigmentation and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21; 596-597.
- Olivares C. and Solano F. (2009)** New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22; 750-760.
- Op't Holt B.T., Vance M.A., Mircia L.M., Heppner D.E., Stack T.D.P. and Solomon E.I. (2009)** Reaction Coordinate of a Functional Model of Tyrosinase: Spectroscopic and Computational Characterization. *JACS*. 131; 6421-6438.
- Pan Q., Li J., Cong Y., Liu L., Zhu J. and Hu F. (2008)** Cloning, expression and characterization of a heterotrimeric beta-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Wei Shend Wu Xue Bao*. 10; 1339-43.
- Parveen I., Threadgill M.D., Moorby J.M. and Winters A. (2010)** Oxidative Phenols in Forage Crops Containing Polypehnol Oxidase Enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 58; 1371-1382.
- Pati S., Losito I., Palmisano F. and Zambonin P.G. (2006)** Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*. 1102; 184-192.
- Pawson T., Gish G.D. and Nash P. (2001)** SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *TRENDS in Cell Biology* Vol. 11 No. 12.
- Pecora R. (1985)** Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy. *Plenum Press*.
- Philo J.S. (2011)** Limiting the sedimentation coefficient for sedimentation velocity data analysis: Partial boundary modeling and $g(s^*)$ approaches revisited. *Anal. Biochem. In Press*.
- Pless D.D., Aguillar M.B., Falcon A., Lozano-Alvarez E. and Heimer de la Coteria E.P. (2003)** Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch. Biochem. Biophys.* 15; 402-10.
- Ramsden C.A., Stratford M.R.L. and Riley P.A. (2009)** The influence of catechol structure on the suicide-inactivation of tyrosinase. *Org. Biomol. Chem.* 7; 3388-3390.
- Ressel S., Terwisscha van Scheltinga A.C., Vonrhein C., Ott V. and Ziegler C. (2009)** Molecular basis of transport and regulation in the Na(+)/betaine symporter BetP. *Nature*. 458; 47-52.
- Rolff M., Schottenheim J., Peters G. and Tuczec F. (2010)** The First Catalytic Tyrosinase Model System Based on a Mononuclear Copper(I) Complex: Kinetics and Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49; 1-6.

- Ross P.K. and Solomon E.I. (1991)** An electronic structural comparison of copper-peroxid complexes of relevance to hemocyanin and tyrosinase active sites. *J. Am. Chem. Soc.* 113; 3246-3259.
- Ruan L., Huang Y., Zhang G., Yu D. and Ping S. (2002)** Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34; 244-248.
- Ruan R., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y. and Shen P. (2004)** Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* 27; 286-289.
- Rübenhagen R., Rönsch H., Jung H., Krämer R. and Morbach S (2000)** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 275; 735-741.
- Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G. and Casella L. (1998)** The enzymatic properties of Octopus vulgaris hemocyanin: o-diphenolase activity. *Biochemistry.* 37; 14065-14077.
- Salzbrunn K.U. (2007)** Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus Streptomyces antibioticus. *Dissertation*, Universität Mainz, FB Biologie.
- Sanchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F. and Garcia-Carmona F. (1995)** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1247; 1-11.
- Sander O., Henß A., Näther C., Würtele C., Holthausen M.C., Schindler S. and Tuczek F. (2008)** Aromatic Hydroxylation in a Copper Bis(imine) Complex Mediated by a $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ Peroxo Dicopper Core: A Mechanistic Scenario. *Chem. Eur. J.* 14; 9714-9729.
- Sarode B. and Beermann F. (2009)** Mysteries of salt and pepper. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22; 380-381.
- Sato T., Kanda K., Okawa K., Takahashi M., Watanabe H., Hirano T., Yaegashi K., Sakamoto Y. and Uchimiya H. (2009)** The Tyrosinase-Encoding Gene of *Lentinula edodes*, *Letyr*, Is Abundantly Expressed in the Gills of the Fruit-Body during Post-Harvest Preservation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 5; 1042-1047.
- Selleck W. & Tan S. (2008)** Recombinant protein complex expression. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Unit-5.12.
- Sendovski M., Kanteev M., Ben-Josef V.M., Adir N. and Fishman A. (2010)** Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Cryst. C.* 66; 1101-1103.
- Schweikardt T., Jeanicke E. and Decker H. (2004)** Homology modelling of hemocyanins and tyrosinases: pitfalls in automated approaches. *Micron.* 35; 97-98.

Schweikardt T., Olivares C., Solano F., Jeanicke E., Garcia-Borron J.C. and Heinz Decker (2007) A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Res.* 20; 394-401.

Selleck W. and Tan S. (2008) Recombinant protein complex expression in *E.coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* Unit 5.21.

Sendovski M., Kanteev M., Ben-Josef V.M., Adir N. and Fishman A. (2010) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Cryst. Sec. F66*; 1101-1103.

Sergeyeva T.A., Slinchenko O.A., Gorbach L.A., Matyushov V.F., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeeva L.M. and Elska G.V. (2010) Catalytic molecularly imprinted polymer membranes: Development of the biomimetic sensor for phenols detection. *Analytica Chimica Acta.* 659; 274-279.

Setaluri V. (2008) How tyrosinase got its copper' – not a Just So Story! *Pigment Cell Melanoma Res.* 21; 594-595.

Shuster V. and Fishman a. (2009) Isolation, Cloning and Characterization of a Tyrosinase with Improved Activity in Organic Solvents from *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 17; 188-200.

Siluvai G.S., Nakano M.M., Mayfield M., Nilges M.J. and Blackburn N.J. (2009) H135A Controls the Redox Activity of the Sco Copper Center. Kinetic and Spectroscopic Studies of the His135Ala Variant of *Bacillus subtilis* Sco. *Biochemistry.*

Snell E.H. and Helliwell J.R. (2005) Macromolecular crystallization in microgravity. *Rep. Prog. Phys.* 68; 799-853.

Solomon E.I., Tuzek F., Root D.E. and Brown C.A. (1994) Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes. *Chem Rev.* 94; 827-856.

Sugumaran M. (2002) Comparative Biochemistry of Eumelanogenesis and the Protective Roles of Phenoloxidase and Melanin in Insects. *Pigment Cell Res.* 15; 2-9.

Takahashi S., Kamiya T., Saeki K., Nezu T., Takeuchi S.I., Takasawa R., Sunaga S., Yoshimori A., Ebizuka S., Abe T. and Tanuma S.I. (2010) Structural insights into the hot spot amino acid residues of mushroom tyrosinase for the bindings of thujaplicins. *Bioorganic and Medical Chemistry.* 22; 8112-8.

Thalman C.R, and Lötzbeyer T. (2002) Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *Eur Food Res Technol.* 214; 276-281.

Thomas A.J. and Erickson C.A. (2008) The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21; 598-610.

Tropea J.E., Cherry S. and Waugh D.S. (2009) Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease. *Methods Mol. Biol.* 489; 297-307.

- Tyn M.T. and Gusek T.W. (1990)** Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 35; 327-38.
- Van Gelder C.W.G., Flurkey W.H. and Wichers H.J. (1997)** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45; 1309-1323.
- Van Holde K.E., Miller K.I. and Decker H. (2001)** Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *Journal of Biological Chemistry.* 19; 15563-15566.
- Vanneste W.H. and Zuberbühler A. (1974)** Molecular mechanism of oxygen activation. Academic Press, New York. 371-402.
- Virador V.M., Reyes Grajeda J.P., Blanco-Labra A., Mendiola-Olaya E., Smith G.M., Moreno A. and Whitaker J.R. (2010)** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 58; 1189-1201.
- Voit R., Feldmaier-Fuchs G., Schweikardt T., Decker H. and Burmester T. (2000)** Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Biol. Chem.* 275; 39339-44.
- Volbeda A. and Hol W.G. (1989)** Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209; 249-79.
- Wang Y. and Jiang H. (2010)** Binding properties of the regulatory domains in *Manduca sexta* hemolymph proteinase-14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system. *Developmental and Comparative Immunology* 34; 316-322.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* Vol. 2; 697-703.
- Wilcox D.E., Porras A.G., Hwang Y.T., Lerch K., Winkler M.E. and Solomon E.I. (1985)** Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J Am Chem Soc.* 107; 4015-4027.
- Winters A., Heywood S., Farrar K., Donnison I., Thomas A. and Webb J. (2009)** Identification of an extensive gene cluster among a family of PPOs in *Trifolium pratense* L. (red clover) using a large insert BAC library. *BMC Plant Biology.* 9; 94.
- Wood J.M., Decker H., Hartmann H., Chavan B., Rokus H., Spencer J.D., Haase S., Thornton M.J., Shalhaf M., Paus R. and Schallreuter K.U. (2009)** Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *FASEB J.* 23.
- Yan Q., Cao R., Yi W., Chen Z., Wen H., Ma I. and Song H. (2009)** Inhibitory effects of 5-benzylidene barbiturate derivatives on mushroom tyrosinase and their antibacterial activities. *European Journal of Medical Chemistry.* 44; 4235-4243.
- Yernool D., Boudker O., Jin Y. and Gouaux E. (2004)** Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature.* 432; 811-8.

Yoon J., Fujii S. and Solomon E.I. (2009) Geometric and electronic structure differences between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase. *PNAS*. 16; 6585-6590.

Anhang

Gensequenz Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 NCBI Accession Number AY254101

```
1 atgaccgtac gcaagaacca ggccaccctg accgccgacg agaagcgccg gttcgtcgcc
61 gccgtcctcg aactcaagcg cagcggggcg tacgacgagt tcgtccgcac gcacaacgaa
121 ttcacatgt cggacaccga cagcggggaa cggaccggcc accgctcccc ctcgttcctg
181 ccctggcacc gcagattcct gctcgacttc gaacaggcgc tgcagtccgt ggactcctcc
241 gtcacgctgc cgtactggga ctggtccgcc gaccgcaccg tgcgggctc gctgtgggcg
301 ccggacttcc tcggcggcac cgggcgcagc accgacggcc gggatgatgga cgggcccgttc
361 gccgcgttca cgggcaactg gccgatcaac gtgcgggtcg acagccggac gtacctgcgc
421 cgctcgctcg gcggaagcgt ggccgaactg cccacgcgcg ccgaggtgga gtcggtactg
481 gcgatatcgg cgtacgacct gccgccgtac aacagcgcct cggagggctt ccgcaatcac
541 ctggagggct ggcgcggggt caatctgcac aaccgcgtcc acgtgtgggt cggcgggcag
601 atggccaccg ggtctcccc caacgaccgg gtgttctggc tgcaccacgc ctacgtcgac
661 aagctgtggg ccgagtggca gcggcggcac ccggactccg cgtacgtgcc gacgggcggc
721 acgccggacg tggtagacct gaacgagacc atgaagccct ggaacaccgt gcgcccggcg
781 gatctgctgc accacactgc ctactacacg ttcgacgcct ga
```

Sequenzierte Gensequenz der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 nach *Codon usage*-Optimierung. Die Sequenzierung erfolgte durch Genscript (Piscataway, USA).

```
CATATGCCGAAATTACCCGTCGCCGTGCACTGACCGCCGCGGCAGCGGTGGCCGCAACCGCAGTGGCGCCGTT
ACCCTGGCAGCCCCGGCGGCAAGCGCCGAGGCCATCACGAACCGGCAGCGCCGGAATCTTTTGATGAAGTGAT
AAAGGTCGCCGTATTCAGGGTCGTCCGGCAGCGGTGGCGCGCATCACCATGAACACGGTGGCGGTTACGAAGTG
TTCGTTGATGGCGTGCAGCTGCATGTTATGCGCAACCGGATGGTAGCTGGATCTCTGTTGTTAGTCATTATGAT
CCGTTTCCGACCCCGCGTGCCGACGCGGTGCGGCAGTTGATGAACTGCAGGGTGCCCCGCTGCTGCCGTTTCCG
GCAAATTAACCGCCGACGAGGGTCTGCGTAGCACCACCACCATGATCGCACCCAGGAACCGGGTCATCCGGAT
CGCCGTCGCGAAGCACCGGTGCGTGCCTGCGCCGCTACGCAGGCCAGCGCGCACTGCGTGCCTGCGTCCG
CATGCCAGCGTATTCACCATGTTGGCCATCGTCAGCGCGGTACCGATCGTCCGCCGCTGCCGCTGGTGCCGGCC
CTGGCCCCGAGATCCCGGCGCGTCTGCGCACCGGCGCGCCGTTCTGTTGCTGCTGCGCCACGCAGCGGTGCTG
GGCCTGGTTTCGTCGCCCCGATCGTGCCGGTCTGGCGGTGGGTGCAGGTCGCGCGTCCGACCGTCCCAGCAT
CGTCGCCCCGGCGATGGTGCAGCGGTGCGTGCCTTCATGGTCAGCTGGCGGATCAGCGTGCAGGTCGTCAGCCG
GATGTGCCGGCGCCGCTGGCACGTCGCAAACGTGGTTCGTACCGCACATGCCCGTCGCGGCGGTGTTGGCACGGGT
GATATTGGTGTTCGCCCCGGCGGAGTGCAGCAGCGTCTGGGCGGTCTGCCGACAGCCCGGGCGGTCTGGCGCGT
GGCCAGTCTGCCAGCCGCGTCCGCGCGTGGGTGCTGCGCGGATGGCCACCGTGGTCTGCCGACGCGTCCGGGT
GTTCTGGCCGCCCCGCGTCTGCGTGCACAGGCGGTGGGCCGCGTTGCAGCGGCCGCACCGGGTCTGCGCGTTCGT
GCAGATGGTTCGTATGCCGGTTCGCGGCGGTCCGGAACGTGATCATGAAGCACTGGAACATCGTGCACCGGGCGGT
AGCGCCGGTCCGCACTGCCTGCTGCATGTTTCGTCGCTCGCCTCGAG
```

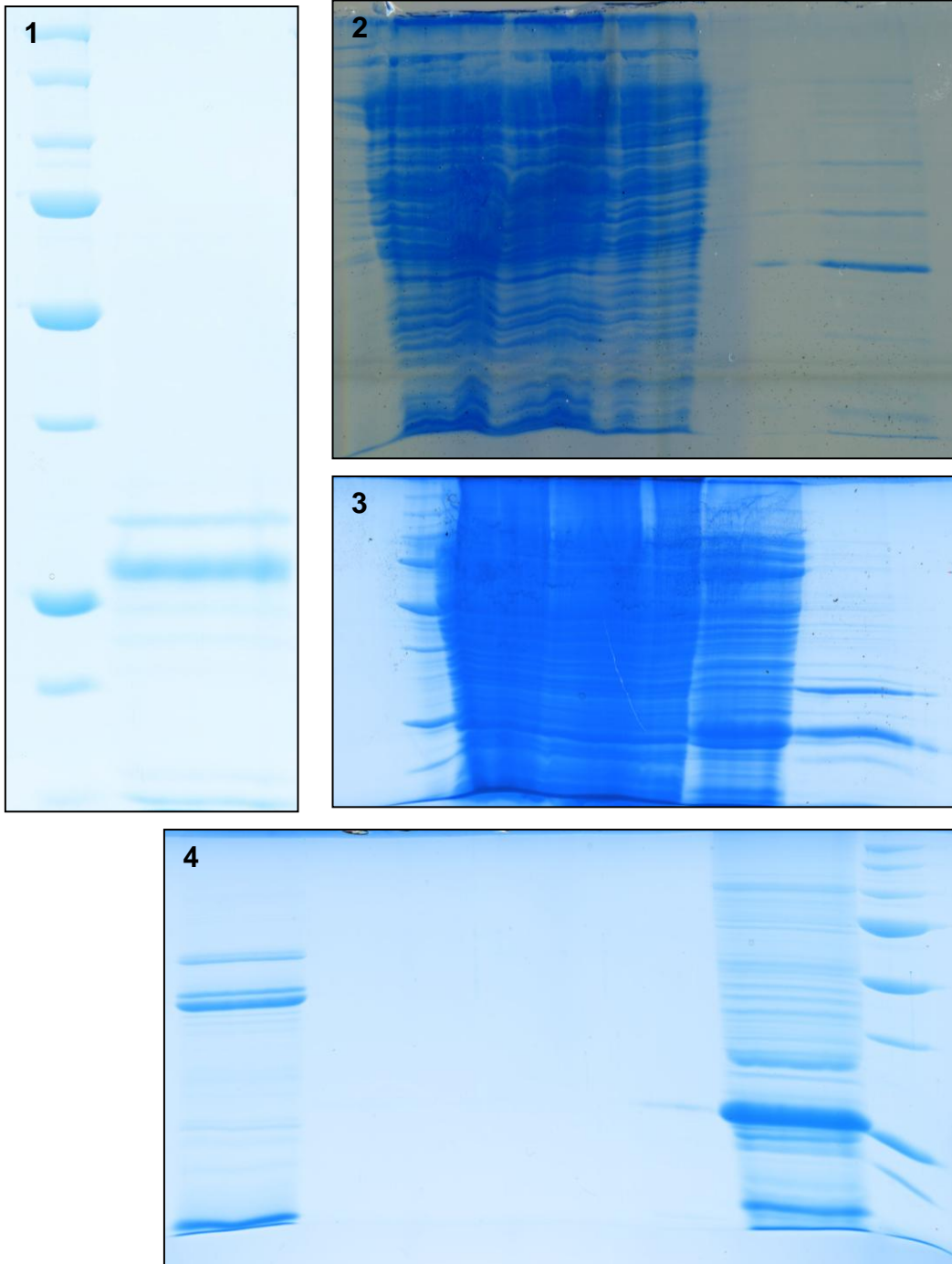
**Gensequenz *orf378* aus *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202. NCBI
Accession Number AY254102**

```
1 atgcccgaga tcacccggcg ccgcgcgctc accgcggcag ccgccgtcgc cgcgaccgcc
61 tcggcgcccg tcaccctcgc cgcccccgcc gcgtcggccg cgggccacca cgagcccgcc
121 gcgcccagat ccttcgacga ggtctacaag ggccgcccga tacagggccg tccggcgggc
181 ggcggcgcgc accaccacga acacggcggc ggatacgagg tgttcgtega cggcgtgcag
241 ctgcacgtga tgcgcaacgc cgacggcagc tggatcagcg tcgtcagcca ctacgaccgc
301 gtgcccacc cgcgcgccgc cgcccgtgcc gccgtggacg agctgcaggg cgccccgctg
361 ctgccgttcc ccgccaactg a
```

**Sequenzierte Gensequenz des *orf378* aus *Streptomyces castaneoglobisporus*
HUT6202 nach *Codon usage*-Optimierung. Die Sequenzierung erfolgte durch
Genscript (Piscataway, USA).**

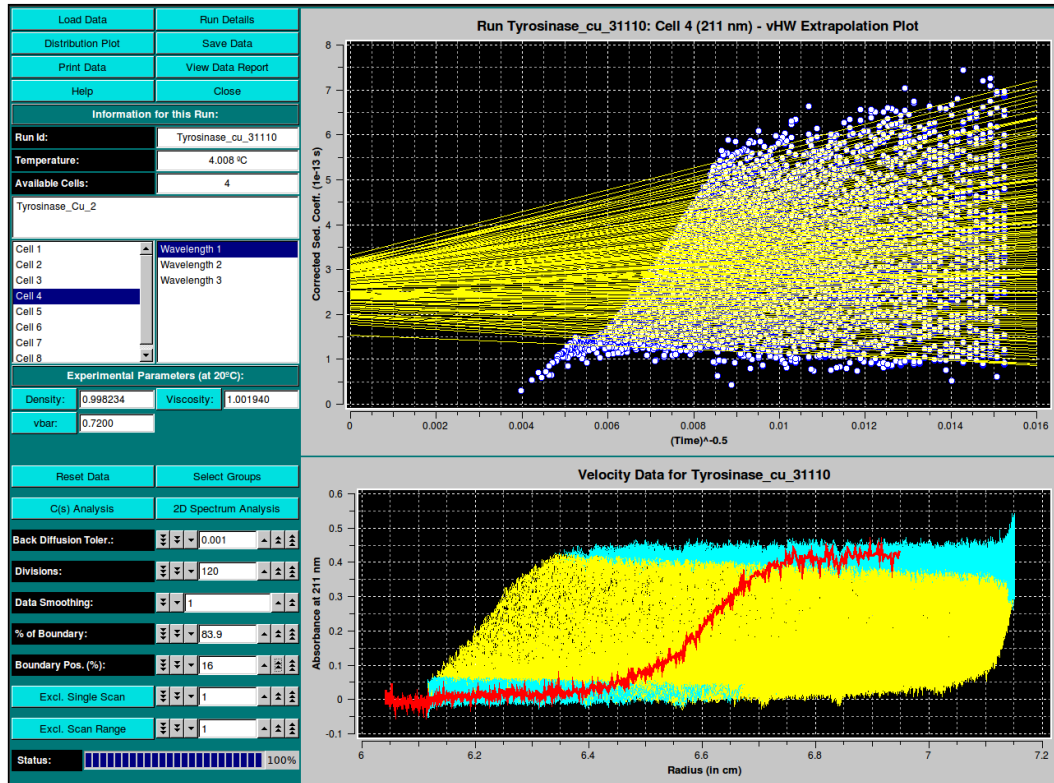
```
ATGACCGTTTCGCAAAAACCAGGCGACCCTGACGGCCGATGAAAAACGTCGCTTTGTTGCGGCCGTGCTGGAAC TG
AAACGTAGCGGTCGCTATGATGAATTTGTGCGTACCCATAATGAATTCATTATGAGCGATAACCGATTCTGGCGAA
CGTACGGGTCATCGCAGTCCGAGCTTCCCTGCCGTGGCACCCTCGCTTTCTGCTGGATTTCTGAACAGGCCCTGCAG
AGCGTTGATAGCTCTGTGACCCTGCCGTATTGGGATTGGAGCGCAGATCGTACGGTTCGCGCATCTCTGTGGGCC
CCGATTTTCTGGGCGGTACCGGTCGTAGTACGGATGGTCGCGTGATGGATGGCCCCTTTCAGCGTTCCACCGGC
AACTGGCCGATTAATGTGCGTGTTGATAGCCGCACCTACCTGCGTCGCAGTCTGGGCGGTAGCGTTGCGGAACTG
CCGACCCGCGCAGAAGTTGAATCTGTGCTGGCCATCAGTGCATATGATCTGCCGCCGTACAACCTGCGAGTGAA
GGTTTTTCGTAATCACCTGGAAGGCTGGCGCGGTGTGAACCTGCATAATCGTGTGCACGTTTGGGTGGGCGGTCAG
ATGGCCACCGGCGTTTCTCCGAACGATCCGGTGTCTGGCTGCATCACGCGTATGTTGATAAACTGTGGGCCGAA
TGGCAGCGTCGCCATCCGGATAGCGCGTACGTGCCGACCGGCGGTACCCCGGATGTGGTTGATCTGAACGAAACC
ATGAAACCGTGGAATACGGTGCCTCCGGCAGATCTGCTGGATCACACCGCGTATTACACGTTTCGATGCCTCGAG
```

Zur Berechnung des Molekulargewichts verwendete SDS-PAGEs:

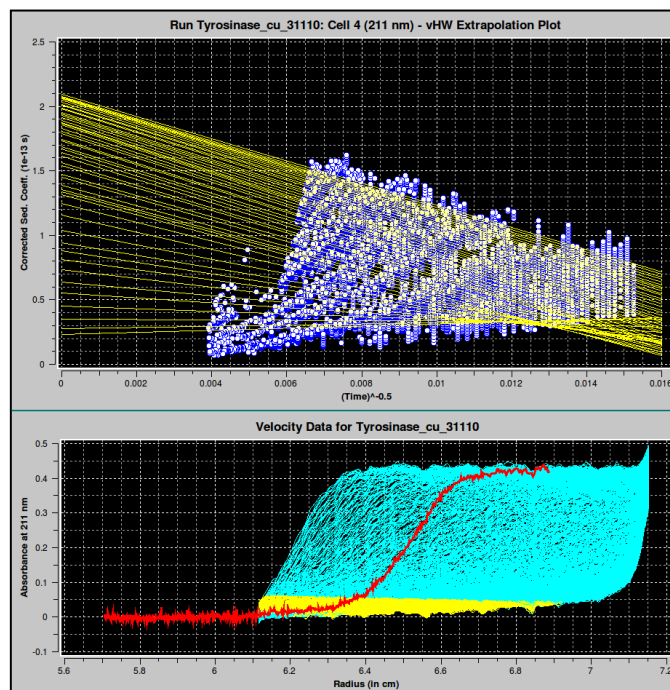


Analytische Ultrazentrifugation

Van Holde-Weischet Analyse der für 3 Tage bei 4 °C mit 5 µM CuSO₄ inkubierten Tyrosinase-Caddie Probe unter Verwendung von 83,4 % der Sedimentations-Geschwindigkeitsdaten.



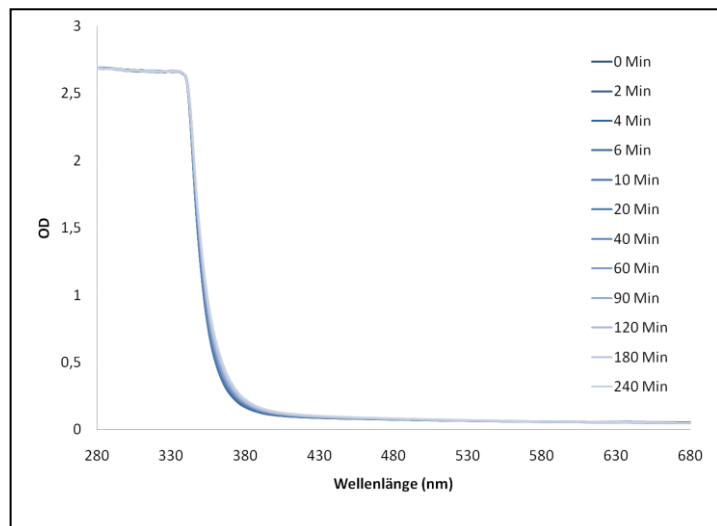
Van Holde-Weischet Analyse der für 3 Tage bei 4 °C mit 5 µM CuSO₄ inkubierten Tyrosinase-Caddie Probe unter Verwendung von 10 % der Sedimentations-Geschwindigkeitsdaten (*Boundary position 10 %*).



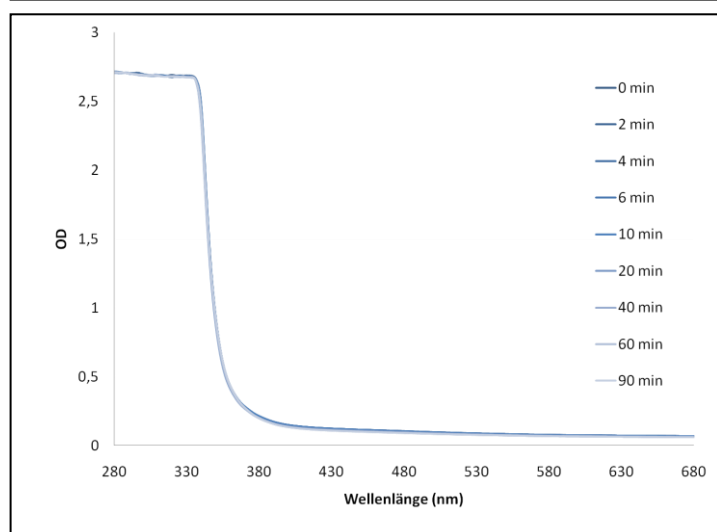
Enzymatische Untersuchungen der Tyrosinase unter Zugabe von SDS:

Bedingungen: 1 mM Kaffeesäure in 0,1 M NaPO₄-Puffer mit 5 % SDS und 44 µg/ml Tyrosinase-Caddie-Komplex.

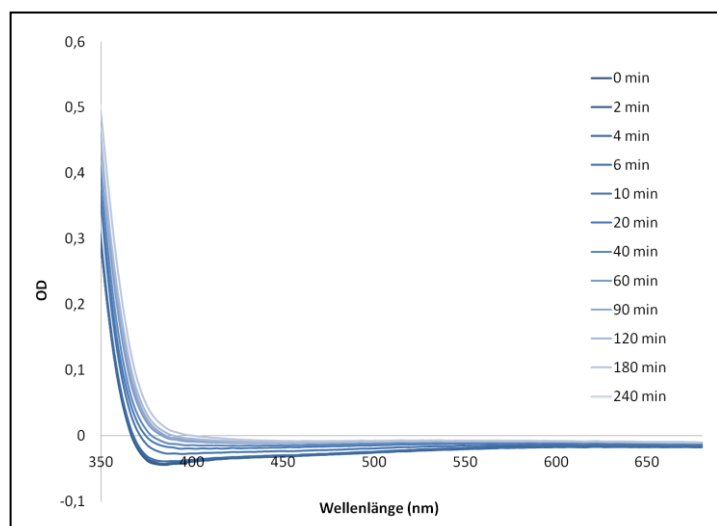
Produktspektrum



Referenzspektrum



Differenzspektrum



Danksagung

Lebenslauf