



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Proteolytische Aktivierung einer latenten pflanzlichen Polyphenoloxidase aus den Blättern der Weinrebe (*Vitis vinifera*)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

KATHARINA LUDWIG



Mainz, 2019

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Datum der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2019

*„Die gefährlichste aller Weltanschauungen ist die Weltanschauung der Leute,
die die Welt nie angeschaut haben.“*

(unbekannt, nachgesagt: Alexander von Humboldt, 1769-1859)

Zusammenfassung

Pflanzliche Polyphenoloxidasen (PPOs) sind eine Subklasse der ubiquitär verbreiteten Typ 3-Kupferproteine und katalysieren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff die Umsetzung phenolischer Substrate zu korrespondierenden Chinonen, die autokatalytisch zum Pigmentfarbstoff Melanin reagieren. Katalytisch wird innerhalb der PPOs zwischen Tyrosinasen und Catecholoxidasen unterschieden. Diese sind ursächlich für die Gewebsbräunung nach Läsionen, die durch Schädlinge oder im Verarbeitungsprozess von Obst und Gemüse entstehen können.

PPOs werden *in vivo* als dreiteilige, inaktive Vorstufenproteine synthetisiert und müssen somit aktiviert werden, bevor eine Katalyse erfolgen kann. *In vitro* gelingt die Aktivierung entweder durch Abspaltung der für die Latenz ursächlichen C-terminalen Domäne oder mittels Detergenzien wie SDS durch eine induzierte Konformationsänderung des Linkerbereiches, der die katalytische und die C-terminale Domäne verbindet. *In vivo* Aktivatoren sind bislang unbekannt. Ein weiteres prominentes Charakteristikum der PPOs ist eine funktionelle Aminosäure (*Gate-Residue*), die den Zugang für Substrate zum aktiven Zentrum beeinflusst.

Ziel der Arbeit war die Identifikation eines bislang unbekanntem proteolytischen Aktivators der rekombinanten latenten PPO-2 aus den Blättern der Weinrebe *Vitis vinifera* (L-VvPPOcs-2). Dazu wurde der Einfluss von sechs Proteasen auf die L-VvPPOcs-2 untersucht. Die entstandenen Spaltfragmente konnten mittels Massenspektrometrie den funktionellen Domänen der L-VvPPOcs-2 zugeordnet werden. Mit diesem Verfahren konnte Trypsin als proteolytischer Aktivator identifiziert werden, da es die L-VvPPOcs-2 kurz vor dem Linkerbereich hydrolysiert und einen Substratumsatz induziert.

Mittels Enzymkinetiken des Wildtyps und zweier im *Gate-Residue* substituierter Muteine konnte erstmals der Einfluss des *Gate-Residue* in unterschiedlichen Zustandsformen der L-VvPPOcs-2 (als latentes 59 kDa- und als aktives 38 kDa-Fragment) untersucht werden. Die Resultate deuten darauf hin, dass das *Gate-Residue* nach einer induzierten Konformationsänderung durch SDS als Abstandhalter zwischen N- und C-terminaler Domäne dient, wodurch die raumfordernde Eigenschaft des *Gate-Residue* F259 zu einer höheren Katalyserate führte. Mit kleiner werdendem *Gate-Residue* wird der Zugang für Substrate zum aktiven Zentrum erschwert. Fehlt nach Proteolyse die C-terminale Domäne, liegt das *Gate-Residue* oberflächenexponiert vor dem Eingang zur katalytischen Tasche und nimmt so abhängig von Größe und Polarität direkten Einfluss auf die Substratspezifität und Katalyse der L-VvPPOcs-2. Es zeigte sich, dass das nach SDS-Aktivierung als Catecholoxidasase geltende Mutein -F259G nach Trypsin-Aktivierung Tyrosinase-Aktivität aufweist, so dass der Aktivierungsmechanismus in der Kontroverse um die Einflussfaktoren der Suppression der Tyrosinase-Aktivität pflanzlicher PPOs künftig Berücksichtigung finden sollte.

Abstract

Plant polyphenol oxidases (PPOs) are a subclass of the ubiquitously distributed type 3-copper proteins and catalyze the conversion of phenolic substrates into corresponding quinones in the presence of molecular oxygen. The quinones react autocatalytically to the brown pigment melanin. Catalytically, tyrosinases and catechol oxidases are differentiated within the PPOs. These are thus the causes of tissue tanning following lesions that can be caused by pests or in the production process of fruit and vegetables.

PPOs are synthesized *in vivo* as three-part, inactive precursor proteins, i.e. they must be activated before catalysis can take place. During *in vitro* activation is achieved either by splitting the C-terminal domain responsible for latency or by means of detergents such as SDS by an induced conformational change of the linker region connecting the catalytic and C-terminal domains. *In vivo* activators are so far unknown.

Another prominent characteristic of PPOs is a functional amino acid (*Gate-Residue*), which influences the access of phenolic substrates to the active site.

The aim of the work was to identify a previously unknown proteolytic activator of recombinant latent PPO-2 from the vine leaves of *Vitis vinifera* (L-VvPPOcs-2). To this end, the influence of six proteases on L-VvPPOcs-2 was investigated. The resulting cleavage peptide-fragments could be assigned to the functional domains of L-VvPPOcs-2 by mass spectrometry. With this method, trypsin could be identified as a proteolytic activator because it hydrolyses the L-VvPPOcs-2 in the linker region and induces substrate turnover.

Using enzyme kinetics of the wildtype and two muteins, substituted in the *Gate-Residue*, the influence of the *Gate-Residue* in different states of L-VvPPOcs-2 (as a latent 59 kDa fragment and as an active 38 kDa fragment) could be investigated for the first time. The results suggest that after an induced conformational change by SDS, the *Gate-Residue* serves as a spacer between N- and C-terminal domains, whereby the space-consuming property of the bulky *Gate-Residue* F259 led to higher turnover numbers. As the *Gate-Residue* becomes smaller, substrate access to the active centre becomes more difficult. If the C-terminal domain is missing after proteolysis, the *Gate-Residue* is surface exposed in front of the entrance to the catalytic pocket and thus has a direct influence on the substrate specificity and catalysis of L-VvPPOcs-2 dependent on its size and polarity.

It was found that following Trypsin-activation, the mutein F259G shows tyrosinase activity, which is regarded as catechol oxidase after SDS-activation. So that in future, the activation mechanism should be taken into account in the controversy over the factors influencing the suppression of tyrosinase activity of plant PPOs.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Entwicklung und Funktion der Typ 3-Kupferproteine	1
1.2	Pflanzliche Polyphenoloxidase	5
1.2.1	Aufbau und Strukturmerkmale der pflanzlichen PPOs	5
1.2.2	Aktivierung latenter Polyphenoloxidasen	8
1.3	Die latente Isoform 2 aus <i>Vitis vinifera</i> Cabernet Sauvignon	9
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	
2.1	Material	13
2.1.1	Organismen und Plasmide	13
2.1.2	Enzyme und Proteasen	13
2.1.3	Antikörper	14
2.1.4	Medien	14
2.1.5	Substrate	14
2.1.6	Puffer und Lösungen	15
2.1.7	Geräte	17
2.1.8	Chemikalien und Verbrauchsgegenstände	17
2.1.9	Software	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur und Proteingewinnung	19
2.2.1.1	Sterilisation	19
2.2.1.2	Kultivierung der Produktionskulturen	19
2.2.1.3	Zellernte und Zellaufschluss	19
2.2.1.4	Proteingewinnung mittels Affinitätschromatographie	21
2.2.2	Konzentration und Umpuffern	21
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie	21
2.2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	22
2.2.4.1	SDS-PAGE	22
2.2.4.2	Native PAGE	23
2.2.5	Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung nach Kang	23
2.2.6	Western Blot	24
2.2.7	Proteolytische Aktivierung	25
2.2.8	Aktivitätsnachweis der L-VvPPOcs-2	27
2.2.8.1	Aktivitätsschnelltest	27
2.2.8.2	Aktivitätsfärbung nativer PAGE (Qualitativer Aktivitätsnachweis)	27
2.2.9	Größenausschlusschromatographie (<i>Size-Exclusion Chromatography</i> : SEC)	29
2.2.10	Abtrennung der C-terminalen Domäne mittels Harnstoff	29
2.2.11	Quantitative Bestimmung der katalytischen Aktivität	30
2.2.11.1	Aufnahme von Produktspektren	30
2.2.11.2	Bestimmung der pH-Optima	31
2.2.11.3	Bestimmung von K_M , v_{max} und k_{cat}	31
2.2.12	Massenspektrometrie	35
2.2.13	CD-Spektroskopie	37
2.2.14	Kristallisation der L-VvPPOcs-2wt	38
3	Ergebnisse	
3.1	Proteingewinnung	43

3.1.1	Reinheit und Menge der L-VvPPOcs-2	43
3.1.2	Proteinnachweis mittels Western Blot	45
3.1.3	Aktivitätsnachweis	46
3.1.4	Circulardichroismus-Spektroskopie	48
3.2	Aktivierung durch Proteolyse	49
3.2.1	Proteolyse durch Trypsin	49
3.2.2	Proteolyse durch Proteinase K	59
3.2.3	Proteolyse durch Chymotrypsin	63
3.2.4	Proteolyse durch Thermolysin	67
3.2.5	Proteolyse durch Endoproteinase V8	71
3.2.6	Proteolyse durch Calpain-1	73
3.2.7	Zusammenfassung der proteolytischen Aktivierung der L-VvPPOcs-2	75
3.3	Trennung der Spaltpeptide über Größenaustauschchromatographie	76
3.4	Abtrennung der C-terminalen Domäne mittels Harnstoff	79
3.5	Enzymatische Charakterisierung	81
3.5.1	pH-Abhängigkeit der Aktivität	82
3.5.2	Präzipitation der L-VvPPOcs-2 bei saurem pH und SDS	85
3.5.3	Bestimmung der Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte	86
3.5.4	Enzymkinetiken	87
3.5.5	Vergleich und Zusammenfassung der Enzymkinetiken	99
3.6	Kristallisation des L-VvPPOcs-2wt	102

4 Diskussion

4.1	Expression der L-VvPPOcs-2	105
4.2	Stabilität der L-VvPPOcs-2	107
4.3	Proteolytische Aktivierung der L-VvPPOcs-2	108
4.4	Pflanzliche PPOs zeigen über einen breiten pH-Bereich Aktivität	113
4.5	Die Katalyse pflanzlicher PPOs ist multifaktoriell beeinflusst	116
4.5.1	Aktivierungsmechanismen beeinflussen die Katalyserate und Substrataffinität	120
4.5.2	Das <i>Gate-Residue</i> übernimmt eine aktivierungsabhängige Funktion	123
4.6	Verwendung eines Polyoxometallates führt zur Bildung von Mikrokristallen	127
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	128

Literatur

Verzeichnisse

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

Eigenständigkeitserklärung

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Funktion der Typ 3-Kupferproteine

Der Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre ist einer der wichtigsten Faktoren der biologischen Evolution (Planavsky et al., 2014; Reinhard et al., 2016). Ursprünglich umgab die Erde eine reduzierende anaerobe Atmosphäre, die sich vor ca. 2,5 Milliarden Jahren am Übergang vom Archaikum zum Proterozoikum vor allem durch das Auftreten oxygener photosynthetischer Zellen zu einer aeroben Umwelt entwickelte (Lyons et al., 2014). Die bisher unter anaeroben Bedingungen lebenden Organismen entwickelten unterschiedliche Strategien, um den molekularen Sauerstoff und resultierende cytotoxische Substanzen wie Superoxid-Anionen, Hydrogen-Peroxide und Hydroxyl-Radikale unschädlich zu machen (Decker & Terwilliger, 2000; van Holde et al., 2001; Jaenicke & Decker, 2004). Unter anderem entstanden eine Vielzahl an Proteinen und Enzymen, die durch Bindung oder Umsetzung von molekularem Sauerstoff dem Schutz der Organismen dienten, wie Peroxidasen, Dismutasen und die sauerstoffbindenden Kupferproteine (Decker 2000), die zunächst in Form von Phenoloxidasen Sauerstoffatome in phenolische Substrate einsetzten und zusätzlich über die Bildung von Wasser unschädlich machten (Decker & Terwilliger, 2000). Mit fortschreitender Akkumulation von atmosphärischem Sauerstoff entstanden aerobe Stoffwechselwege, die den Organismus effizienter versorgen konnten als anaerobe Reaktionen. So entwickelte sich aus den angesprochenen Phenoloxidasen durch Einfügen von Aminosäuren, die durch ihre Eigenschaften die Substrataffinität senkten, gleichzeitig aber die O₂-Bindung nicht beeinflussten, das Sauerstofftransportprotein Hämocyanin (van Holde et al., 2001).

Generell werden in der Klasse der Kupferproteine drei Typen abgegrenzt, die sich in der Beschaffenheit und daraus resultierend der spektroskopischen Eigenschaften der Kupferzentren unterscheiden. Typ 1 und Typ 2-Kupferproteine besitzen ein einkerniges Kupferzentrum und unterscheiden sich vor allem in den Kupfer-koordinierenden Aminosäuren (Holland & Tolman, 1999). Während Typ 1-Kupferproteine die typische Blaufärbung aufweisen (z.B. Plastocyanin, Nitrit-Reduktase, Azurin) (Bagby et al., 1994; Godden et al., 1991; Nar et al., 1992), erscheinen Proteine vom Typ 2 aufgrund schwacher Absorption im sichtbaren Spektralbereich farblos (z.B. Dopamin-Monooxygenase, Galactose-Oxidase, Amin-Oxidasen; Ito et al., 1994; Prigge et al., 2000; McGrath et al., 2011).

Charakteristisch für die sauerstoffüberbrückten dimeren Typ 3-Kupferproteine ist ein zweikerniges Kupferzentrum (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Rolff et al., 2011). Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass in der evolutionären Entwicklung der Typ 3-Kupferproteine eine Vielzahl verschiedener Moleküle als Zwischen- bzw. Endprodukte auftraten. Eine Unterteilung in drei Subklassen (α , β , γ) differenziert Typ 3-Kupferproteine anhand auftretender Domänenstruktur und phylogenetischen Ursprungs (Aguilera et al., 2013). Der α -Subklasse zugehörige Typ 3-Kupferproteine sind sekretorische Proteine und tragen ein N-terminales Signalpeptid. Sie umfassen pflanzliche Polyphenoloxidasen

(PPO), bakterielle Tyrosinase (TY) und Hämocyanine (Hc) der Mollusken. Die Gene der Proteine der β -Subklasse leiten sich von den Genen der frühen Vertreter der α -Subklasse ab (Aguilera et al., 2013). Das N-terminale Signalpeptid fehlt und so treten die Proteine intrazellulär z.B. in Amoebozoen, Pilzen und Metazoen auf. Auch das Hämocyanin der Arthropoden entwickelt sich aus einer der β -Subklasse zugehörigen Tyrosinase (Gasparetti et al., 2010; Aguilera et al., 2013). Bei Proteinen der γ -Unterklasse, deren Gene sich ebenfalls von der α -Subklasse ableiten, tritt zusätzlich zum N-terminalen Signalpeptid eine definierte Transmembrandomäne und ein Cystein-reiches Motiv nahe dem katalytischen Zentrum auf. Zu den Vertretern dieser komplexesten Subklasse gehört u.a. die humane Tyrosinase (Aguilera et al., 2013).

Trotz unterschiedlicher Merkmale und topologischer Charakteristika ist den Typ 3-Kupferproteinen das zweikernige Kupferzentrum gemein, wobei jedes Kupferion (Cu_A , Cu_B) durch drei konservierte Histidine (H_{A1} , H_{A2} , H_{A3} , H_{B1} , H_{B2} , H_{B3}), die in insgesamt vier konservierten α -Helices lokalisiert sind, koordiniert wird (Volbeda & Hol, 1989; Magnus et al., 1994; Klabunde et al., 1998; Cuff et al., 1998; Decker et al., 2006; Rolff et al., 2011) (Abb. 1). Zwischen den Kupferionen, die sich in der Oxidationsstufe +I oder +II befinden können, kann molekularer Sauerstoff als Peroxid in einer μ - η^2 : η^2 *side-on* Verbindung reversibel gebunden werden (Magnus et al., 1994; Klabunde et al., 1998; Metz & Solomon, 2001; Matoba et al., 2006; Matoba et al. 2011; Pretzler & Rompel, 2018).

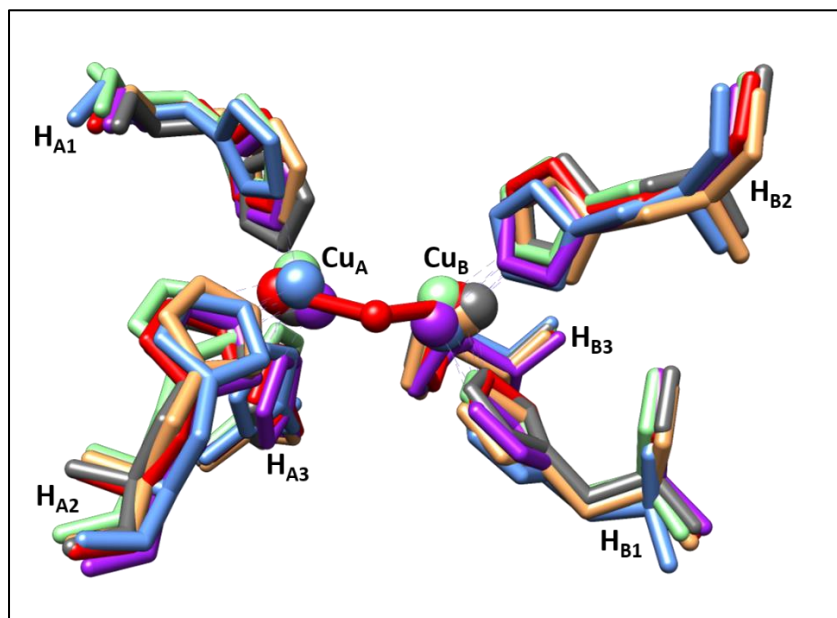


Abbildung 1: Überlagerung der konservierten aktiven Zentren von sechs kristallographisch strukturaufgeklärten Typ 3-Kupferproteinen. Dargestellt sind die aktiven Zentren der PPO aus *Vitis vinifera*, PDB: 2P3X (rot), *Ipomoea batatas*, PDB: 1BT3 (lila) *Malus domestica*, PDB: 6ELS (orange), *Solanum lycopersicum*, PDB: 6HQI (grau), des Hämocyanins aus *Octopus dofleini*, PDB: 1JS8 (blau) und der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*, PDB: 1WX2 (grün). Die sauerstoffbindenden Kupferionen werden jeweils durch drei Histidine H_{A1} , H_{A2} , H_{A3} , H_{B1} , H_{B2} , H_{B3} koordiniert.

Die erwähnten Polyphenoloxidasen katalysieren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff die Umsetzung phenolischer Substrate zu korrespondierenden Chinonen (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Whitaker & Lee, 1995; Solomon et al., 1996; Decker et al., 2006, Rolff et al., 2011). Innerhalb der Polyphenoloxidasen wird zwischen Tyrosinasen (EC 1.14.18.1) und Catecholoxidasen (EC 1.10.3.1) differenziert. Beide Enzymklassen katalysieren die Umsetzung von o-Diphenolen (Diphenolase-Aktivität, Abb. 2) (Mayer & Harel, 1979; Solomon et al., 1996), wobei Tyrosinasen durch ortho-Hydroxylierung und Zwei-Elektronen-Oxidation zusätzlich monophenolische Substrate umsetzen können (Naish-Byfield & Riley, 1992; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Claus & Decker, 2006). Die beiden Teilreaktionen sind gekoppelt, so dass keine o-Diphenole als Zwischenprodukte nachweisbar sind (Monophenolase-Aktivität) (Naish et al., 1988; Naish-Byfield & Riley, 1992) (Abb. 2).

Die entstehenden Chinone sind hochreaktiv und reagieren autokatalytisch weiter zum Pigmentfarbstoff Melanin (Monder et al., 1957; Solomon et al., 1996; García-Borrón & Solano, 2002; Weijn et al., 2013).

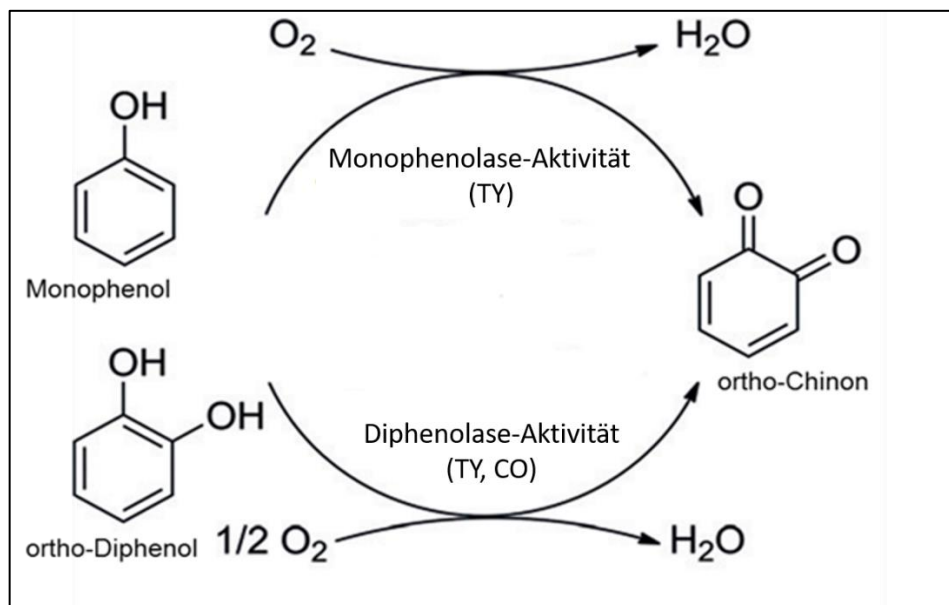


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen und Catecholoxidasen. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff katalysieren Tyrosinasen (TY) die Hydroxylierung von Monophenolen (Monophenolase-Aktivität) und Oxidation von ortho-Diphenolen (Diphenolase-Aktivität) zu korrespondierenden ortho-Chinonen. Catecholoxidasen (CO) fehlt die Monophenolase-Aktivität. Modifiziert nach Solem et al., 2016.

Außerhalb des katalytischen Zentrums zeigen Typ 3-Kupferproteine eine starke Variation der Primärstruktur, die unterschiedliche Proteineigenschaften und Charakteristika zur Folge hat (Markl, 1986; van Geldern et al., 1997; Jaenicke & Decker, 2004; Marusek et al. 2006; Kanteev et al., 2015). Sie treten als Monomere oder Multimere (TY, CO, PPO) oder als große molekulare Komplexe (Hc) auf (van Holde & Miller, 1995, Harris & Markl, 2000; van Holde et al., 2001; Jaenicke & Decker, 2003; Dirks-

Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2014). Demzufolge erfüllen sie vielfältige physiologische Aufgaben in allen drei Domänen des Lebens.

Die bislang bekannte Funktion von Tyrosinasen und Catecholoxidasen beruht auf ihrer Rolle in der Melaninsynthese. In Säugetierzellen ist Melanin ursächlich für die Färbung von Haut, Haaren und Iris (Hearing & Jiménez, 1987; Sugumaran, 2002; Land et al., 2003). Gendefekte, nach denen der Transport von Tyrosinasen in Melanosome fehlerhaft abläuft oder ganz ausbleibt, führen phänotypisch zu der Pigmentstörung Albinismus (Sturm et al., 2001; King et al., 2001; Kushimoto et al., 2003). In Bakterien und Pilzen beruht die Schutzfunktion vor UV-Strahlen auf einer von Tyrosinasen hervorgerufenen Gewebspigmentierung (Ruan et al., 2002; Ruan et al., 2004). Zusätzlich sind die gebildeten Chinone in immunologische Prozesse involviert (Kuznetsov et al., 1984; Bell & Wheeler, 1986). Ähnlich wird bei Invertebraten der Wundverschluss durch Bildung einer Melaninschicht unterstützt, und eindringende Keime und Erreger werden durch cytotoxische Chinone abgetötet (Vaughn et al., 1988).

Die Funktion der Polyphenoloxidasen in höheren Pflanzenzellen ist nicht abschließend geklärt. Die nach Gewebsverletzung entstehende Bräunung des Pflanzengewebes (Boss et al., 1995; van Geldern et al., 1997; Thaler et al., 1999; Mayer, 2006) bedingt die Bildung einer impermeablen Melaninschicht, die vor eindringenden Erregern schützen soll, und entstehende Chinone zeigen eine direkt toxische Wirkung gegenüber Pathogenen (Vaughn et al., 1988). Zusätzlich wird diskutiert, ob bei der Reaktion der Polyphenoloxidasen in Zellen, in denen keine Kompartimentierung (mehr) vorliegt, im Zusammenhang mit der Mehler-Reaktion reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können, aus deren Bildung eine Zerstörung von Wirtszelle und Pathogen resultieren könnte (Cohn et al., 2001). Auf diese Weise könnten Erreger schnell und effektiv abgewehrt werden. Eine wund-induzierte Expression von PPOs wurde in Kartoffeln, Äpfeln und Tomaten nachgewiesen (Boss et al., 1995; Thipyapong et al., 1995; Thipyapong & Steffens, 1997; Kampatsikas et al., 2017). Zusätzlich wird eine Beteiligung an der Biosynthese der chymochromen Pigmentklasse der Betalaine diskutiert (Gandía-Herrero et al., 2005). Als Hämocyanine, die hauptsächlich in der Hämolymphe von Mollusken und Arthropoden vorkommen (Bonaventura & Bonaventura, 1980; Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995; Decker & Tuczec, 2000; Decker et al., 2007; Markl, 2013), binden Typ 3-Kupferproteine Sauerstoff hochkooperativ und fungieren als Sauerstofftransportmoleküle.

1.2 Pflanzliche Polyphenoloxidasen

Pflanzliche PPOs sind ursächlich für die Gewebsbräunung nach Verletzungen, die im Produktionsweg von Obst und Gemüse entstehen können (Boss et al., 1995; Thaler et al., 1999; van Geldern et al., 1997, Mayer, 2006; Fang et al., 2007; Queiroz et al., 2008 Mishra et al., 2013). Da derartige Schadsymptome vom Endverbraucher schlecht akzeptiert werden, entstehen der Weltwirtschaft jährlich enorme finanzielle Einbußen (Martinez & Whitaker, 1995; Chang & Whitaker 1995; Nicolas et al., 1994; Yoruk und Marshall, 2003; Siddiq & Dolan, 2017). Demzufolge sind das Vorkommen und der Katalysemechanismus von PPOs seit Jahrzehnten aktuelle Forschungsschwerpunkte.

Pflanzliche PPOs treten in Multigenfamilien auf. So wurden beispielweise in *Taraxacum officinale* bislang elf Isoformen nachgewiesen (Dirks-Hofmeister et al, 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2014). ██████████ fand im Blattgewebe der Weinrebe *Vitis vinifera*, Carbernet Sauvignon sechs verschiedene Gene (Solem, 2017).

Verschiedene Isoformen werden in unterschiedlichen Geweben und in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen (z.B. Trockenheit, Hitze, Lichteinfall) exprimiert und im Cytoplasma translatiert. Sie tragen ein zweigeteiltes Signalpeptid, wodurch sie in einem zweistufigen Transportprozess über das Stroma der Chloroplasten ins Thylakoidlumen gelangen (Sommer et al., 1994; Koussevitzky et al., 2008; Boeckx et al., 2015).

Es sind eine Vielzahl an Primärstrukturdaten von pflanzlichen PPOs erhoben worden. In Relation dazu liegen allerdings nur wenige Kristallstrukturen vor und diese umfassen hauptsächlich die katalytische Domäne (*Ipomoea batatas*, PDB: 1BT3, Klabunde et al., 1997; *Vitis vinifera Grenache*, PDB: 2P3X, Virador et al., 2010; *Juglans regia*, PDB: 5CE9, Bijelic et al., 2015). Eine vierte Struktur zeigt eine latente pflanzliche PPO (die homologe Auresidin Synthase aus *Coreopsis grandiflora*, PDB: 4Z14 (großblütiges Mädchenauge)), d.h. einer PPO, die alle drei Domänen umfasst (Molitor et al., 2016). Ganz aktuell wurden die Strukturen zweiter latenter PPOs aus *Solanum lycopersicum* (PDB: 6HQI; Kampatsikas et al., 2019) und *Malus domestica* (PDB: 6ELS; Kampatsikas et al., 2019) veröffentlicht.

1.2.1 Aufbau und Strukturmerkmale der pflanzlichen PPOs

Pflanzliche PPOs sind dreiteilig aufgebaut. Sie setzen sich aus einer katalytischen N-terminalen Domäne, einer inhibierenden C-terminalen Domäne und einem verbindenden Linkerbereich zusammen (van Geldern et al., 1997; Marusek et al., 2006; Abb. 3). Der N-terminalen Domäne geht ein zweigeteiltes Signalpeptid voran (Sommer et al., 1994; Marusek et al., 2006). Wie genau die Grenzen zwischen den einzelnen Domänen definiert sind, wurde in der Literatur unterschiedlich gehandhabt. Diese Arbeit orientiert sich an den Angaben nach Marusek et al., 2006. Umfasst eine PPO alle drei Bereiche, ist sie inaktiv und wird auch als latente PPO bezeichnet. Aus Pflanzengewebe wurde die latente Form biochemisch aus dem Gewebe gewonnen (Goldbeck & Cammarata, 1981; Derardja et al.,

2017). Überwiegend fand aber eine Isolation von aktiven PPOs statt (Wong et al., 1971; Das et al., 1997; Espín et al., 1997; Klabunde et al., 1997; Virador et al., 2010; Mauracher et al., 2014; Fronk et al., 2015; Molitor et al., 2015). Diese umfassen die N-terminale Domäne und unter Umständen N-terminale Abschnitte des Linkerbereiches.

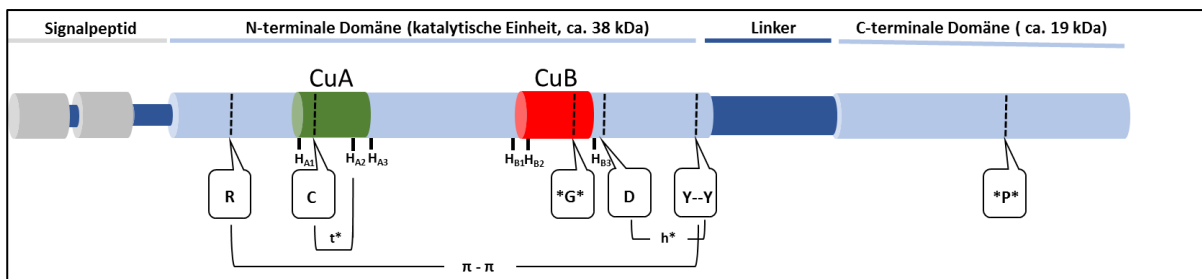


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus einer latenten pflanzlichen Polyphenoloxidase einschließlich funktionell wichtiger Aminosäuren. Der Transport der PPO wird nach der zytoplasmatischen Translation in das Thylakoidlumen der Chloroplasten durch das zweiteilige Signalpeptid vermittelt, was nach dem Transportprozess proteolytisch abgespalten wird. Die N-terminale Domäne (katalytische Einheit, ca. 38 kDa) trägt das aktive Kupferzentrum (Cu_A: grün, Cu_B: rot), das durch Histidine H_{A1}, H_{A2}, H_{A3}, H_{B1}, H_{B2}, H_{B3} koordiniert wird. Am C-terminalen Ende der katalytischen Einheit befindet sich ein Tyrosinmotiv (Y--Y). Das erste Tyrosin des Motivs wechselwirkt über eine π -Kationen-Wechselwirkung (π - π) mit einem Arginin am N-terminalen Ende der katalytischen Einheit (R). Das zweite Tyrosin bildet eine Wasserstoffbrückenbindung (h^*) zu einem konservierten Aspartatrest (D). Innerhalb des Cu_B-Zentrums liegt das Gate-Residue (*G), was im Falle der PPO aus *Vitis vinifera* von einem Phenylalanin gebildet wird. Ein innerhalb des Cu_A-Motiv liegendes Cystein kann eine Thioetherbindung (t^*) zum kupferkoordinierenden H_{A2} ausbilden. Der Linker verbindet die katalytische Einheit mit der C-terminalen Domäne, die das Platzhalter-Residue (*P*) beinhaltet. Die beiden Domänen haben eine Masse von 19 kDa. Nach Marusek et al., 2006.

Die N-terminale Domäne trägt das katalytische Zentrum, in dem die beiden Kupferionen (Cu_A, Cu_B), von je drei Histidinen H_{A1}, H_{A2}, H_{A3}, H_{B1}, H_{B2}, H_{B3} koordiniert sind, die in einem oberflächennahem hydrophoben 4 α -Helix-Bündel (α_4 , α_5 , α_2 , α_{14}) lokalisiert sind (Kap. 1.1). Die N-terminale Domäne aus *Vitis vinifera* Grenache wurde nach biochemischer Isolation aus dem Pflanzengewebe kristallisiert und mit einer Auflösung von 2,2 Å röntgenkristallographisch aufgeklärt (PDB: 2P3X; Virador et al., 2010). Diese Struktur besteht aus 16 α -Helices sowie fünf kurzen β -Faltblattstrukturen (Abb. 4). Am C-terminalen Ende sind neun AS des Linkerbereiches aufgelöst. Nachweisbar ist eine Thioetherbindung zwischen einem konservierten Cystein (C91) innerhalb des Cu_A-Motivs mit dem Imidazolring von H_{A2} (H108), die zu einer Stabilisierung führt (Klabunde et al., 1998; Abb. 3). Am Ende der N-terminalen Domäne liegt ein Tyrosinmotiv, das mit einem N-terminalen Arginin in eine π -Kationenwechselwirkung tritt (Abb. 3). Zusätzlich bildet ein konserviertes Aspartat eine Wasserstoffbrücke zum zweiten Tyrosin des Motivs (Marusek et al., 2006; Abb. 3).

Ein Fokus in den sich anschließenden Experimenten liegt auf der Funktion des *Gate-Residue*, einer in einer flexiblen Schleife oberhalb des Cu_A lokalisierten Aminosäure, die bei Pflanzen in den meisten Fällen ein Phenylalanin ist (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999; Marusek et al., 2006; Virador et

al., 2010; Kampatsikas et al., 2019; Abb. 4). Zunächst stand zur Diskussion, dass das *Gate-Residue* den Zugang zum Cu_A für Substrate versperrt und somit als Selektor zwischen Tyrosinase und Catecholoxidase dient (Decker & Rimke, 1998; Decker & Tuczec, 2000; Gerdemann et al., 2002; Olivares et al., 2002; Decker et al., 2006; Matoba et al., 2006; Rolff et al., 2011, Goldfeder et al., 2014). Dem aktuellen Forschungsstand nach, hat das *Gate-Residue* jedoch eine regulatorische Funktion und ist durch seine Flexibilität an der Orientierung von Substratmolekülen beteiligt (Fronk et al. 2015; Bijelic et al., 2015; Kampatsikas et al., 2019). In Pflanzen konnten an analoger Position neben Phenylalaninen vereinzelt auch Leucine und Tyrosine identifiziert werden (Marusek et al., 2006; Solem, 2017).

An die N-terminale Domäne schließt sich der Linkerbereich an, dessen genaue Struktur bislang nur in *in silico* Analysen (Marusek et al., 2006) und der Kristallstruktur der Auresidin Synthase aus *Coreopsis grandiflora* gezeigt ist (Molitor et al., 2016). Sehr aktuell veröffentlichten Kampatsikas et al (2019) die Kristallstruktur zweier latenter PPOs aus *Solanum lycopersicum* und *Malus domestica*.

Der Linkerbereich wird in dieser Arbeit von dem beschriebenen Tyrosinmotiv und der ersten Aminosäure des nächsten vorhergesagten Sekundärstrukturelementes begrenzt und besteht damit aus überwiegend unstrukturierten, oberflächenexponierten Abschnitten (Marusek et al, 2006; Molitor et al., 2016). Demzufolge könnte er Angriffsfläche für externe Substanzen (z.B. Fettsäuren) oder Proteasen bieten und damit ursächlich für intramolekulare Verschiebungen der C-terminalen Domäne relativ zur katalytischen Einheit sein (Marusek et al., 2006; Leufken et al., 2015).

Erkenntnisse über die Raumstruktur der C-terminalen Domäne stammen vor allem aus der Kristallstruktur der Auresidin Synthase aus *Coreopsis grandiflora* und aus Strukturanalysen, die sich an einer analogen Domäne aus der Kristallstruktur des Hämocyanins aus *Octopus dofleini* (PDB: 1JS8, Cuff et al., 1998; Decker et al., 2007; Molitor et al., 2015) orientieren. Im Gegensatz zu den Primärsequenzen der N-terminalen Domäne, liegt zwischen den C-terminalen Domänen aus verschiedenen Organismen nur eine geringe Sequenzidentität vor. Die C-terminalen Domäne besteht aus β -Faltblättern, die in zwei übereinanderliegenden Schlaufen angeordnet sind und dadurch eine sogenannte β -Sandwichstruktur bilden. Dazwischen befinden sich strukturell ungeordnete Bereiche (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1997; Gerdemann et al., 2002; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014; Bijelic et al., 2015; Molitor et al., 2016; Kampatsikas et al., 2019). Sie verdeckt den Zugang zum aktiven Zentrum und ist damit ursächlich für die Latenz der PPO und erfüllt durch Inhibition der Katalyse *in vivo* eine regulatorische Funktion (Marusek et al., 2006). Eine in der C-terminalen Domäne lokalisierte funktionelle Aminosäure, nimmt im aktiven Zentrum die räumliche Position eines potentiellen Substratmoleküls ein und blockiert dieses somit zusätzlich für potentielle Substrate (Platzhalter-*Residue*, Abb. 3) (Decker & Rimke, 1998; Gerdemann et al., 2002; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007; Rolff et al., 2011). Bei vielen pflanzlichen PPOs handelt es sich dabei um ein

Leucin. Laut der Strukturvorhersage findet sich an analoger Position der PPO aus *Vitis vinifera* ein Valin (Val446) (Marusek et al., 2006). Anhand der Lage des *Platzhalter-Residue* wurden Hypothesen zu Lagegeometrie der Substratmoleküle im aktiven Zentrum abgeleitet (Decker et al., 2006; Decker et al., 2007; Kaljunen et al., 2011; Hakulinen et al., 2013; Goldfeder et al., 2014).

1.2.2 Aktivierung latenter Polyphenoloxidasen

Pflanzliche PPOs werden als inaktive Vorstufenproteine synthetisiert, d.h. sie tragen eine inhibierende C-terminale Domäne, die ursächlich für diese Latenz ist und müssen aktiviert werden, bevor eine Katalyse erfolgen kann (Mayer, 2006; Boeckx et al., 2015). Dies erscheint *in vivo* sinnvoll, um unerwünschte Melaninbildung zu supprimieren.

Es werden grundsätzlich zwei Methoden zur Aktivierung von latenten PPOs unterschieden: Zum einen die proteolytische Abtrennung der C-terminalen Domäne (Robinson & Dry, 1992; van Geldern et al., 1997; Marusek et al., 2006), zum anderen eine induzierte Konformationsänderung des Linkerpeptids oder der C-terminalen Domäne, bei der die katalytische Tasche für Substrate zugänglich wird (Moore & Flurkey, 1990; Gandía-Herrero et al., 2005; Leufken et al., 2015). Durch seine ungeordnete oberflächenexponierte Struktur bietet der Lysin- und Argininreiche Linkerbereich Angriffsfläche für Proteasen und verschiedene Detergenzien (Marusek et al., 2006; Leufken et al., 2015).

Bereits etabliert ist die *in vitro* Aktivierung durch Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Tensid, das ab einer bestimmten Konzentration (CMC) Mizellen bildet (Moore & Flurkey, 1990; Espín & Wichers, 1999; Gandía-Herrero et al., 2005b; Gandía-Herrero et al., 2005c; Kanade et al., 2006; Baird et al., 2007; Naresh et al., 2015). An Hämocyaninen fungieren diese Mizellen als allosterische Effektoren und verändern so die Molekülkonformation (Baird et al., 2007; Rolff et al., 2011). Der genaue Mechanismus, der letztendlich zur Aktivierung führt, konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

Weitere Effektoren, die eine aktivierende Konformationsänderung hervorrufen können, sind langkettige Fettsäuren (Moore & Flurkey, 1990; Leufken et al., 2015), Hitzeeinwirkung (Gerdemann et al., 2002), Lipoproteine (Coates & Nairn, 2014; Schenk et al., 2015) oder ein saures pH-Milieu (Kenten, 1959; Rompel et al., 1999; Kanade et al., 2006; Cabanes et al., 2007; Dirks-Hofmeister et al., 2012; Leufken et al., 2015).

Aufgrund weniger verfügbarer Kristallstrukturen, sind Vorhersagen über aktivierende Proteasen schwierig. Für *in vitro* aktivierende Proteasen finden sich hauptsächlich ältere Studien, in denen vorwiegend Trypsin zu einer Aktivierung von latenten PPOs führte (Inouye et al., 1998; Harel et al., 1973; Sørensen et al., 1991; Büchler, 2008; Drapeau et al., 1972; Houmard and Drapeau, 1972; King and Flurkey, 1987; Sánchez-Ferrer et al., 1989; Mayer, 1966; Gandía-Herrero et al., 2005; Marusek et al., 2006; Kampatsikas et al., 2017).

Kürzlich wurde berichtet, dass die latente PPO-1 aus *Malus domestica* bei Lagerung durch Auto-Proteolyse in einer spezifischen Aminosäuresequenz im Linkerbereich in einen *Pre-Active-Stage* versetzt wurde. Die C-terminale Domäne sei abgetrennt worden, aber schirme das aktive Zentrum weiterhin so ab, dass eine externe Aktivierung über SDS oder hohe Salzkonzentrationen nötig sei (Kampatsikas et al., 2019). Diese Berichte sind sehr aktuell und es bleibt abzuwarten, ob dieser Effekt für weitere PPOs bestätigt werden kann und wie seine physiologische Relevanz zu bewerten ist.

Welche physiologischen Effektoren *in vivo* an der Aktivierung beteiligt sind, ist bislang unbekannt. Aufgrund ihres Vorkommens in höheren Pflanzenzellen kommen Lipoproteine und Fettsäuren in Betracht. Da PPOs in ihrer aktiven Form aus Pflanzengewebe isoliert wurden, gilt aber auch eine proteolytische Aktivierung als wahrscheinlich. Verantwortliche Proteasen konnten bislang nicht identifiziert werden.

1.3 Die latente Isoform 2 aus *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon

Um eine Strukturvorstellung von der in dieser Arbeit verwendeten latenten PPO (Isoform 2) aus *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon L-VvPPOcs-2 (59 kDa) zu erlangen, liegt ein Homologiemodell vor, für das die katalytische Einheit und der PPO aus *Vitis vinifera* Grenache und die C-terminale Domäne der Auresidin Synthase aus *Coreopsis grandiflora* genutzt wurde (Di Silvestre, 2018; Abb. 4 A-B)

Die N-terminale Domäne der Kristallstruktur aus *Vitis vinifera* Grenache (VvPPOg) weist eine > 95 % Sequenzidentität zur N-terminalen Domäne der L-VvPPOcs-2 auf und dient damit als gute Referenzstruktur.

Wie beschrieben sind in der N-terminalen Domäne typische strukturelle Charakteristika nachweisbar: Zum einen das katalytische Kupferzentrum, zum anderen die Thioetherbindung zwischen einem konservierten Cystein (C91) innerhalb des Cu_A -Motivs mit dem Imidazolring von H_{A2} (H108). Der L-VvPPOcs-2 sind N-terminal 20 Aminosäuren eingefügt, die das Strep-Tactin II[®] Peptid und Enterokinaschnittstellen enthalten, die der Isolation der L-VvPPOcs-2 aus dem Wirtsorganismus *E. coli* dienen und in dem Modell nicht berücksichtigt werden. Diese bilden wahrscheinlich einen flexiblen ungeordneten Bereich. Die modellierte N-terminale Domäne umfasst 330 AS (Ala1 – Tyr330, Abb. 4 A). Das *Gate-Residue* wird sowohl in der Struktur VvPPOg als auch in der L-VvPPOcs-2 von einem Phenylalanin gebildet (Abb. 4 A, C). Mittels PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese wurde das sperrige Phenylalanin gegen ein ungeladenes Leucin und ein kleines Glycin mutiert, um den Zugang zur katalytischen Tasche zu öffnen (Abb. 4 C-E).

Die C-terminale Domäne der L-VvPPOcs-2 zeigt, wie erwartet (Kap. 1.2.1), keine hohe Sequenzidentität zur C-terminalen Domäne der Auresidin Synthase aus *Coreopsis grandiflora*. Da diese jedoch zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation die einzige vorliegende Kristallstruktur einer pflanzlichen PPO war, wurde sie für die Erstellung des Homologiemodells ausgewählt. Im Homologiemodell umfasst die

C-terminale Domäne nach der Einteilung nach Marusek et al. (2006) 122 AS (Arg383 – Asp504, Abb. 4 A). Verbunden werden N- und C-terminale Domäne durch die 52 AS des überwiegend unstrukturierten Linkerbereiches (Gln331 – Ile382, Abb. 4 A-B).

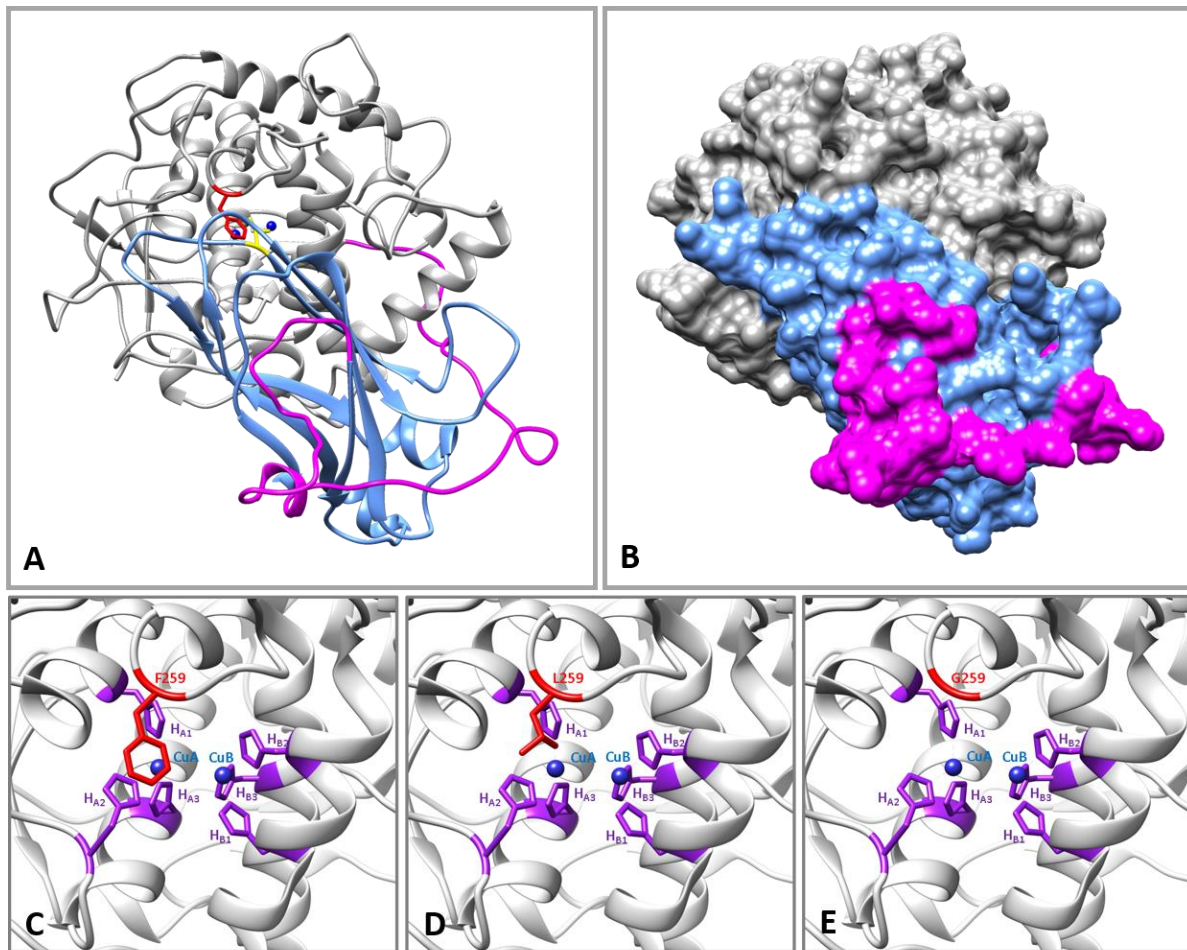


Abbildung 4: Homologiemodell der L-VvPPOcs-2. Als Vorlagestruktur für die N-terminale Domäne diente die PPO aus *Vitis vinifera* Grenache (VvPPOg, 2P3X) und für die C-terminale Domäne die latente Auresidin-Synthase aus *Coreopsis grandiflora* (4Z14). **A:** Der L-VvPPOcs-2wt. Die N-terminale Domäne (grau) trägt das aktive Zentrum mit den Kupferionen Cu_A und Cu_B (dunkelblau) zwischen den als Sauerstoffmolekül als Peroxid gebunden ist (weiß). Das Gate-Residue (rot) erschwert den Zugang zum Cu_A . Der Linkerbereich (magenta) weist eine ungeordnete Struktur auf und verbindet die katalytische Domäne mit der C-terminalen Domäne (hellblau), die den Zugang zur katalytischen Tasche verdeckt. Die Platzhalter-Aminosäure ist in der Struktur der L-VvPPOcs-2 ein Valin (gelb). **B:** Darstellung der Moleküloberfläche der L-VvPPOcs-2 in der gleichen Orientierung wie in A. Der Linkerbereich ist oberflächenexponiert. **C-E:** Darstellung des aktiven Zentrums und des Gate-Residue. Mit kleiner werdendem Aminosäurerest öffnet sich der Zugang zur katalytischen Tasche. Modifiziert nach Di Silvestre, 2018.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Identifikation eines bislang unbekanntem proteolytischen Aktivators der L-VvPPOcs-2. Dieser soll die L-VvPPOcs-2 im Linkerbereich spalten, so dass die inhibierende C-terminale Domäne abgetrennt wird und eine Substratkatalyse erfolgt. Der Erfolg der Aktivierung soll mittels massenspektrometrischer Schnittstellenanalyse und Aktivitätsschelltests nachvollzogen werden.

Weiterhin soll erstmals in kinetischen Experimenten ein Vergleich zwischen den Katalyseraten nach proteolytischer Aktivierung und Aktivierung durch induzierte Konformationsänderung (SDS) gezogen werden. Über die im *Gate-Residue* durch weniger raumfordernde Aminosäuren substituierten Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und -F259G soll durch Quantifizierung der Katalyserate nach den beiden unterschiedlichen Aktivierungsstrategien (SDS- bzw. proteolytische Aktivierung) neue Erkenntnisse über die Funktion des *Gate-Residue* gewonnen werden.

Zusätzlich sollen Kristallisationsexperimente durchgeführt werden, um die Bedingungen für eine erfolgreiche Kristallisation des L-VvPPOcs-2wt einzugrenzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen und Plasmide

Die L-VvPPOcs-2wt und die Muteine L-VvPPOcs-2-F259L, -F259G wurden in *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) pLysS - Zellen (Novagen; Darmstadt, Deutschland) überexprimiert. Dieser *E. coli* Stamm ist als BL21 Derivat für die Expression eukaryotischer Proteine besonders geeignet. Er enthält sieben seltene tRNA Codons (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG), die auf einem chloramphenicol-resistenten Plasmid lokalisiert sind und erlaubt somit durch die Bereitstellung der entsprechenden tRNAs die Expression von derart verschlüsselten Genen. Das Plasmid pLysS codiert T7-Lysozym, das ein Inhibitor der T7 RNA Polymerase ist, wodurch die basale Transkription gesenkt wird.

Der für die molekularbiologischen Vorversuche verwendete Vektor L-VvPPOcs-2_pET-51b(+) ist in Anhang A dargestellt (Ludwig, 2014; Solem; 2017).

Zellstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Rosetta™ 2(DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSpRARE2 (CamR)	Novagen (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Organismen.

2.1.2 Enzyme und Proteasen

Enzym / Protease	Hersteller; Artikelnummer
Benzonase® (Reinheit: 90 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland); 70750-3
Calpain-1 (human, wässrige Glycerinlösung)	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); C6108
Chymotrypsin, α-Chymotrypsin aus dem Rinderpankreas	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); C4129
Endoproteinase- Glu-C aus <i>Staphylococcus aureus</i> V8	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); P2922
Endoproteinase- Glu-C aus <i>Staphylococcus aureus</i> V8	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland); 20986.01
Proteinase K	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA) P8102S
Thermolysin (aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , Type X)	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); P1512
Trypsin Typ 2-S vom Schwein	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); T7409
Trypsin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland); 2193.1
Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland); T3824

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Proteasen.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-PPO (<i>Rabbit</i>)	1 : 10000	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Anti- <i>Rabbit</i> (alkalische Phosphatase gekoppelt)	1 : 4000	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

2.1.4 Medien

Autoinduktionsmedium:

Overnight Express™ Instant LB Medium;
Fertigmischung von Merck
(Darmstadt, Deutschland)

Zusätze:

10 ml/l Glycerol (99 %)
34 µg/l Chloramphenicol
700 µg/l Carbenicillin
200 µM CuCl₂

LB-Medium:

Fertigmischung von Carl Roth
(Karlsruhe, Deutschland)

Zusätze:

34 µg/l Chloramphenicol
100 µg/l Carbenicillin
1 % Glucose

2.1.5 Substrate

Substrat	Abkürzung	Reinheit	Hersteller
4-Methylcatechol	4-MC	≥ 95 %	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) M34200-5G
Pyro-Catechol	CAT	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) C9510-100G
Dopamin (Dopamin Hydrochlorid)	DA	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) H8502-10G
p-Tyrosol 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	p-Tyr	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) 188255-5G

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Substrate.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Pufferlösungen für die Zellkultur und Affinitätschromatographie:

Strep-Tactin®- Waschpuffer:	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Strep-Tactin®- Waschpuffer 2:	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl
Strep-Tactin®-Elutionspuffer:	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
Strep-Tactin®-Regenerationspuffer:	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA

Pufferlösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Denaturierungspuffer nach Laemmli (2x):	5 ml Sammelgelpuffer 8 ml SDS-Lösung (10 %) 1 ml Reinstwasser 4 ml Glycerin 2 ml β -Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer:	500 mM Tris-HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer für Gele (4x):	100 mM Tris 750 mM Glycin 0,4 % SDS

Pufferlösungen für die Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Nativer Probenpuffer:	0,15 g Bromphenolblau 10 g Saccharose 50 ml Reinstwasser
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer:	500 mM Tris-HCl pH 6,8
Nativer Laufpuffer (4x):	100 mM Tris 750 mM Glycin

Färbelösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Coomassie-Färbelösung (nach Kang):	0,02 % Coomassie G 250 5 % Aluminiumsulfat-Hydrat 10 % Ethanol (99 %) 2 % o-Phosphorsäure 83 % Reinstwasser
Entfärber (nach Kang):	10 % Ethanol (99 %) 2 % o-Phosphorsäure 88 % Reinstwasser

Färbelösungen für den Western Blot:

TBST:	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % Tween-20
P3-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 50 mM MgSO ₄

Lösungen für die Kristallisation:

Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄] · 22 H ₂ O	2 mM
Lithiumsulfat	2 M
Kaliumthiocyanat	1 M
Tris-Puffer pH 7/ 7,5/ 8/ 8,5	1M
Bicin pH 6/ 6,5/ 7/ 7,5	1 M
Bis-Tris-Propan 6/ 6,5/ 7	1 M
Polyethylenglycol (PEG) 400, 3359, 4000 5000, 6000, 8000, 10000, 20000	40 %
Ethylenglycol	40 %
Glycerol	40 %

Sonstige Lösungen:

Citratpuffer pH 3 - 3,5:	100 mM Citrat
Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 - 9:	50 mM Tris 50 mM Maleat
Chymotrypsin-Puffer pH 8:	100 mM Tris 10 mM CaCl ₂
Thermolysin-Puffer pH 8:	50 mM Tris 0,5 mM CaCl ₂
SDS-Stammlösung:	50 mM SDS

2.1.7 Geräte

Eine Liste der verwendeten Geräte und Messapparaturen findet sich im Anhang B.

2.1.8 Chemikalien und Verbrauchsgegenstände

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsgegenstände von Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland), Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland) und Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA).

Reinstwasser wurde von der Reinstwasseranlage Milli-Q Biocel von Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.9 Software

Software	Hersteller	Version
BioLogic Duo Flow	BioRad (München, Deutschland)	-
Cary WinUV	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)	-
Chimera	RBVI, University of California (San Francisco, CA, USA)	1.13.1
ClustalX	Conway Institute UCD Dublin (Dublin, Ireland)	2.1
EPSON Scan	SEIKO Epson CORPORATION (Tokyo, Japan)	-
GeneDoc	NRBSC (San Francisco/Pittsburgh, USA)	2.7
Image Lab™	BioRad (München, Deutschland)	4.1
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft (Washington, USA)	2010, 2013 2016
Origin®	OriginLab® (Northampton, USA)	7.5 G
PROSPER (PROtease Specificity Prediction server)	School of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Monash University (Melbourne, Australia)	-
ProtParam (SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal)	Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (Lausanne, Schweiz)	-
UV Solutions	Hitachi (Tokyo, Japan)	2.2

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Software und Analyseprogramme.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Proteingewinnung

2.2.1.1 Sterilisation

Alle für die Zellkultur und Proteingewinnung benötigten Geräte, wurden für 20 min bei 121 °C und 3,2 bar autoklaviert.

Da das Autoinduktionsmedium *Overnight Express™* Instant LB Medium (Merck; Darmstadt, Deutschland) bei zu starker Hitzeeinwirkung karamellisiert, wurde für die 15-minütige Sterilisation des Mediums ein Druckkochtopf (Opal B/R/K Vertriebs-GmbH; Wuppertal, Deutschland) verwendet, so dass sich Sterilisationszeit- und temperatur steuern ließen.

2.2.1.2 Kultivierung der Produktionskulturen

Alle verwendeten Organismen lagen bereits als *Kryo-Stocks* im Institut für Molekulare Physiologie (AG Molekulare Biophysik) vor und wurden im Rahmen der Dissertation von [REDACTED] und meiner Masterarbeit erstellt (Ludwig, 2014; Solem, 2017).

Für die Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium (34 µg/l Chloramphenicol, 100 µg/l Carbenicillin, 1 % Glucose) mit einem Keramikring aus der vorhandenen Kryo-Kultur angeimpft. Die Zellkultur wuchs 12 h bei 37 °C und 200 rpm unter aeroben Bedingungen.

Die Hauptkultur bestand aus 1 l Autoinduktionsmedium *Overnight Express™* Instant LB Medium und wurde mit 750 µl der Vorkultur angeimpft. Die Zellen wuchsen über 48 h bei 26 °C bei 130 rpm auf dem Schüttelinkubator. Da sich die *E. coli* Zellen in dem Autoinduktionsmedium zu schnell vermehrten, wurden die aeroben Kulturbedingungen nach 24 h auf anaerob umgestellt. Die Zellen wuchsen bis zu einer Kulturdichte von ca. OD 2.

2.2.1.3 Zellernte und Zellaufschluss

Die Kultivierung der Produktionskultur wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 4500 g beendet. Um Rückstände des CuCl₂ zu entfernen, wurden die Zellen mit Strep-Tactin®- Waschpuffer 2 gewaschen, in Strep-Tactin® Waschpuffer resuspendiert und bei -20 °C mit einem Rührmagneten eingefroren.

Der erste Zellaufschluss gelang durch langsames Auftauen der Zellen auf dem Magnetrührer (Frierlyse). Durch Zugabe von Benzonase® (187,5 U Benzonase® pro g Zellsuspension) und 45-minütige Inkubation bei RT wurden freierwerdende Nukleinsäuren abgebaut. Der vollständige Zellaufschluss fand mittels Sonifikation statt. Die Ultraschallwellen erzeugen Kavitationskräfte, die zu Scherwirkungen innerhalb der Zellmembran führen, die diese zerstören. Die Sonifikation erfolgt mit 3 x 13 und 1 x 5 Ultraschallpulsen (Bandelin sonopuls, LS7; ca. 60 % Amplitudenstärke). Kavitationskräfte führen zu

lokalen Temperaturerhöhungen in der Probe, so dass diese zwischen den Ultraschallserien bei 4 °C gelagert wurden, um Proteindenaturierung zu minimieren.

Zelltrümmer wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 17000 g abgetrennt und der Überstand, der u.a. lösliche Proteine (also auch das Zielprotein L-VvPPOcs-2) enthält, wurde zur Entfernung übriger Schwebeteilchen mittels eines sterilen Filters der Porengröße 0,22 µm filtriert. Der Überstand wird im Folgenden als *E. coli* Rohextrakt bezeichnet und zur affinitätschromatographischen Reinigung verwendet. Ein zusammenfassender Überblick über die Schritte der Proteingewinnung findet sich in Abb. 5.

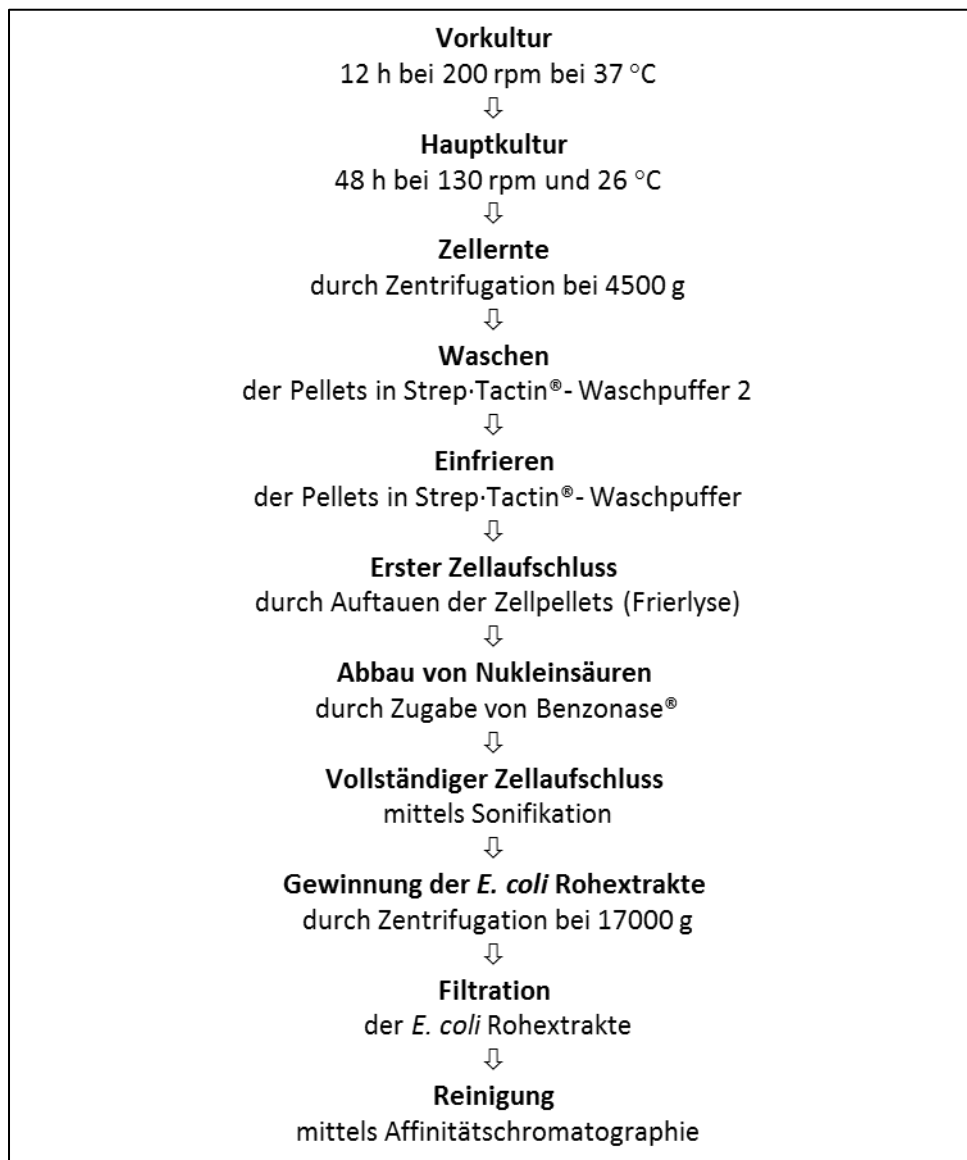


Abbildung 5: Übersicht über die experimentellen Schritte der Proteingewinnung.

2.2.1.4 Proteingewinnung mittels Affinitätschromatographie

Die L-VvPPOcs-2 trägt N-terminal ein Strep-Tactin®II-Peptid, so dass das Protein mittels Strep-Tag® gekoppelter Affinitätschromatographie aus dem *E. coli* Rohextrakt isoliert werden konnte. Für die Menge *E. coli* Rohextrakt, die aus einem Liter Kulturansatz gewonnen wurde, wurden 2 ml Strep-Tactin®Superflow™Agarose (Novagen®; Merck, Darmstadt), die eine Gesamtbindungskapazität von 6 mg/ml aufweisen (Merck, 2013), verwendet. An den Agarosekügelchen heftet immobilisiertes modifiziertes Streptavidin, an denen das Strep-Tactin®II-Peptid tragende Zielprotein binden kann.

Nach dem Durchfluss (*gravity flow*) von 10 ml *E. coli* Rohextrakt, wurde die Agarose mit 20 ml Strep-Tactin® Waschpuffer gewaschen, um unspezifische Bindungen an die Matrix zu minimieren. Die Elution der gebundenen L-VvPPOcs-2 erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin.

Die Strep-Tactin®Superflow™Agarose kann mittels 1 mM HABA regeneriert und bis zu fünf Mal wiederverwendet werden.

2.2.2 Konzentration und Umpuffern

Um die Pufferumgebung des Proteins zu ändern oder die Proteinproben zu konzentrieren, wurden 30 kDa-Cutoff-Amicon (Merck Millipore; Darmstadt, Deutschland) verwendet. Diese bestehen aus einer Membran, die nur für Teilchen der Größe bis 30 kDa durchlässig ist. Die Proteinprobe wurde bei 4500 rpm und 12 °C zentrifugiert. Die L-VvPPOcs-2 (59 kDa) verbleibt oberhalb der Membran und kann dort aufkonzentriert und umgepuffert werden.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung der L-VvPPOcs-2 erfolgte unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 1) mittels Absorptionsspektroskopie nach:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit

- A*: Absorption
- c*: Konzentration des absorbierenden Stoffes [M]
- d*: Dicke des durchstrahlten Körpers [cm]
- $\varepsilon(\lambda)$: molarer Absorptionskoeffizient bei bestimmter Wellenlänge [$M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon(280 \text{ nm})$ der L-VvPPOcs-2wt lässt sich mithilfe des Webtools *ProtParam* (Tab. 5) berechnen (Gleichung 2) und ergibt einen Wert von $82655 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$\varepsilon(\text{Protein}) = n_{\text{Tyrrosin}} \cdot \varepsilon_{\text{Tyrrosin}} + n_{\text{Tryptophan}} \cdot \varepsilon_{\text{Tryptophan}} + n_{\text{Cystin}} \cdot \varepsilon_{\text{Cystin}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit ε : molare Absorptionskoeffizienten der einzelnen Aminosäuren
 ($\varepsilon_{\text{Tyrrosin}} = 1490$; $\varepsilon_{\text{Tryptophan}} = 5500$; $\varepsilon_{\text{Cystin}} = 125$ (jeweils in $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$))
 n : Anzahl der jeweiligen Aminosäuren im Protein
 ($n_{\text{Tyrrosin}} = 22$; $n_{\text{Tryptophan}} = 9$; $n_{\text{Cystin}} = 3$)

Die L-VvPPOcs-2 lag stets in einer klaren Lösung vor, weshalb davon auszugehen ist, dass die Absorption bei $\lambda = 280$ nm nicht durch Aggregatbildung beeinflusst wurde.

2.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen in einem angelegten elektrischen Feld aufgrund verschiedener Ionenbeweglichkeiten. Es wurde sowohl die denaturierende (SDS-PAGE) als auch die native PAGE durchgeführt.

2.2.4.1 SDS-PAGE

Mittels der denaturierenden SDS-PAGE können Polypeptide eines Proteingemisches der Größe nach aufgetrennt werden. Für diese Dissertation wurde nach einer modifizierten Methode des diskontinuierlichen Puffersystems nach Laemmli gearbeitet (Laemmli, 1970), wobei zwischen einem weitporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem engporigen Trenngel (pH 8,8) unterschieden wird. Es wurden SDS-Minigele der Größe 10 x 12 x 0,4 cm verwendet. Die genaue Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist Tab. 6 zu entnehmen.

Vor dem Lauf der SDS-PAGE wurden in den Proteinproben vorhandene Disulfidbrücken durch Inkubation mit SDS-haltigem Denaturierungspuffer bei 95 °C für 10 min durch das enthaltene β -Mercaptoethanol (10 % (v/v)) reduziert. SDS (Natriumdodecylsulfat) maskiert die Gesamtladung des Proteins und führt zu einer negativen Nettoladung, die mit der Größe des Proteins korreliert. So wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung gemäß ihrer Größe im elektrischen Feld.

Als Größenmarker diente *Precision Plus Protein Standard Unstained* (BioRad; München, Deutschland), der zehn synthetische Referenzproteine der Massen 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa und 10 kDa enthält. Die angelegte Spannung betrug zwischen 90 und 110 V. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei Raumtemperatur statt.

Acrylamidkonzentration	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	3 %
Rotiphorese 30	4,67 ml	5,83 ml	1,0 ml
Trenngel-/ Sammelgelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	2,5 ml
TEMED	28 µl	28 µl	40 µl
APS 3 % (w/v)	420 µl	420 µl	400 µl
Reinstwasser	5,34 ml	4,18 ml	6,05 ml
SDS 10 % (w/v)	280 µl	280 µl	200 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.

2.2.4.2 Native PAGE

Für die native PAGE wurde ein analoges Gel- und Puffersystem verwendet, nur dass dem Trenngel-, Sammelgel- und Laufpuffer kein SDS zugesetzt ist (Tab. 7, Kap. 2.2.4.1), so dass die Proteine nicht denaturiert, sondern in ihrer nativen Form elektrophoretisch getrennt wurden. Dadurch ist die Auftrennung im Wesentlichen von der Form, Größe und Ladungsverteilung der Polypeptide beeinflusst. Aufgrund dessen kann aus der Auftrennung nicht auf das Molekulargewicht der Proteine geschlossen werden. Ein aufgetragener Größenmarker dient dennoch als interner Vergleichsstandard, um entstehende Bandenmuster vergleichen zu können.

Die Proteinproben wurden mit nativem Probenpuffer versetzt (Kap. 2.1.6), der lediglich dem Beschweren und Anfärben der Probe dient. Die native PAGE wurde bei 4 °C und 90 V durchgeführt.

Acrylamidkonzentration	Trenngel	Sammelgel
	10 %	3 %
Rotiphorese 30	4,67 ml	1,0 ml
Trenngel-/ Sammelgelpuffer	3,5 ml	2,5 ml
TEMED	28 µl	40 µl
APS 3 % (w/v)	420 µl	400 µl
Reinstwasser	5,62 ml	6,25 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die native Gelelektrophorese.

2.2.5 Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung nach Kang

Zur Detektion der Proteinbanden im Gel wurde die modifizierte Coomassie-Färbung nach Kang (Kang et al., 2002) eingesetzt. Der Vorteil dieser Färbemethode liegt in einer erhöhten Sensitivität gegenüber der herkömmlichen Coomassie-Färbung (Neuhoff et al., 1988), da Coomassie als Kolloid und in Gegenwart von Aluminiumsulfat und o-Phosphorsäure vorliegt, was zu einer stärkeren Färbung der Proteinbanden bei gleichzeitiger Reduktion der störenden Hintergrundfärbung führt.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele zur Entfernung von SDS-Rückständen 2 * 10 min gewässert und anschließend in die Färbelösung (Kap. 2.1.6) überführt. Nach ausreichender Bandenfärbung wurde die Hintergrundfärbung mittels einer Entfärbelösung reduziert.

2.2.6 Western Blot

Der gezeigte Western Blot wurde aus meiner Masterarbeit übernommen (Ludwig, 2014). Hier gelang mittels eines Antikörpers, der gegen ein Epitop auf der rekombinanten L-VvPPOcs-2 gerichtet ist (Abb. 6), der Nachweis, dass die im SDS-Gel sichtbare Bande bei ca. 60 kDa durch die L-VvPPOcs-2 hervorgerufen wird (Kap. 3.1.2).

50: AHLVSK**KEYLAKYKKA**IELQKALPDDPRSFK :80

Abbildung 6: Sequenzausschnitt des L-VvPPOcs-2wt. Fettgedruckt sind Aminosäuren, gegen die sich der Anti-PPO-Antikörper richtet.

Für den Western Blot wurden nach dem Protokoll aus dem [REDACTED] [REDACTED] 4 – 12 % Gradientengele des NuPAGE® MOPS – Systems der Firma Life Technologies™ verwendet. Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Gel für 10 min in Reinstwasser inkubiert und anschließend mittels des iBlot®-Systems von *Life Technologies™* auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Hierzu wurden die iBlot®-Transfer Stacks von Life Technologies™ (Darmstadt, Deutschland) verwendet, die aus der Kupferkathode, dem Kathoden-Stack, der Transfermembran, der Anode und dem Anoden-Stack bestanden. Der Blotting-Vorgang benötigte 6,5 min. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min in TBS-T gewaschen und in Blockierungslösung der Firma Roche® (Basel, Schweiz) für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert.

Für die Proteindetektion wurde folgender primärer Antikörper eingesetzt:

Anti-PPO (*Rabbit*) der Firma ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA);

Antikörperdesign: Matthias Riebel, Institut für Molekulare Physiologie, JGU Mainz (Abb. 6).

Die Membran wurde in einer 1:10000 Verdünnung des primären Antikörpers mit 0,5 %iger Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Dreimaligem 10-minütigem Waschen in TBS-T folgte die einstündige Inkubation mit einer 1:4000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (*Anti-Rabbit*; Sigma-Aldrich, Hamburg) in 0,5 %iger Blockierungslösung. An die sekundären Antikörper war alkalische Phosphatase gekoppelt.

Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und mit P3 – Puffer für 10 min auf dem Schüttler equilibriert.

Um die Banden anzufärben wurde eine Entwicklerlösung verwendet, die aus einer 1:50 Verdünnung von NBT/BCIP in P3 – Puffer bestand. NBT/BCIP dient hierbei der alkalischen Phosphatase als chromogenes Substrat, welches zu einem Indigo-Derivat reagiert. Bei ausreichender Bandenfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Citratpuffer pH 3 gestoppt, der Blot getrocknet und eingescannt.

2.2.7 Proteolytische Aktivierung

Latente pflanzliche PPOs können durch proteolytische Abspaltung der C-terminalen Domäne aktiviert werden (Marusek et al., 2006). Für die proteolytische Aktivierung der L-VvPPOcs-2 wurden verschiedene Proteasen getestet.

Eine genaue Schnittstellenvorhersage der einzelnen Proteasen an der L-VvPPOcs-2 ist aufgrund der unbekanntenen Raumstruktur der L-VvPPOcs-2 nicht möglich. Es kann lediglich eine theoretische Vorhersage anhand der Sequenz der L-VvPPOcs-2 und der Spezifität der Proteasen erfolgen. Die möglichen Schnittstellen wurden in der Sequenz der L-VvPPOcs-2wt markiert (Anhang C). Diese Schnittstellen können dann mit der Strukturvorhersage der L-VvPPOcs-2 abgeglichen und so eine Aussage über möglicherweise aktivierende Proteasen getroffen werden.

Die verwendeten Proteasen wurden aufgrund von Hinweisen aus der Literatur ausgewählt. Tab. 8 zeigte eine Übersicht der Proteasen, ihrer Spezifität und der verwendeten Puffersysteme, die das pH-Optimum und Ionenabhängigkeiten der jeweiligen Protease bedienen.

Die Serinprotease Trypsin hydrolysiert Proteine nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin und wurde bereits an anderen pflanzlichen PPOs als Aktivator beschrieben (Gandía-Herrero et al., 2005).

Zur Gruppe der Serinproteasen gehören ebenfalls Chymotrypsin und das thermostabile Thermolysin. Die Proteasen wurden als schwache Aktivatoren pflanzlicher PPOs beschrieben (Marusek et al., 2006) und sind Ca^{2+} -abhängig. Chymotrypsin spaltet die Peptidbindung hinter aromatischen Aminosäuren und Leucin, während die Proteolyse, die durch Thermolysin katalysiert wird, nach großen hydrophoben Aminosäuren stattfindet (Inouye et al., 1998).

Die Endoproteinase-Glu-C (im weiteren V8-Protease genannt) spaltet C-terminal nach Glutamat und Aspartat (Drapeau et al., 1972; Houmard and Drapeau, 1972). Sie wurde im Rahmen der Dissertation von Kay Büchler (Institut für Molekulare Physiologie (AG Molekulare Biophysik), JGU Mainz) zur Spaltung von KLH, dem Hämocyanin der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*, verwendet.

Von der Proteasendatenbank PROSPER (Monash University, 2014: PROSPER: *Protease Specificity prediction server*. Monash Bioinformatics Platform, School of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Monash University, Australia. <https://prosper.erc.monash.edu.au/>) wurde mittels eines Webtools die calciumabhängige Cysteinprotease Calpain-1 als Protease vorgeschlagen, die die L-VvPPOcs-2

spezifisch im Linkerbereich hydrolysiert. PROSPER ermittelt anhand einer eingegebenen Proteinsequenz eine Tertiärstrukturvorhersage und gleicht diese mit einer Proteasen-Datenbank ab. Proteasen, die das Protein spalten, werden inklusive der Schnittstellen angezeigt. Auch Chymotrypsin wurde von PROSPER als geeignete Protease eingestuft.

Proteinase K spaltet Peptidbindungen nach aliphatischen und aromatischen Aminosäuren mit blockierten alpha-Carboxylgruppen. Sie gehört zu den subtilisin-verwandten Serinproteasen, wirkt sowohl als Endo- als auch als Exopeptidase und stammt aus dem Schlauchpilz *Engyodontium album* (Ebeling et al., 1974; Bajorath et al., 1988). Proteinase K ist in der Literatur sowohl als starker Aktivator (Pretzler et al., 2017) als auch als schwacher Aktivator (King & Flurkey, 1987) pflanzlicher PPOs beschrieben.

Die Proteasen wurden nach Herstellerempfehlung in einem Konzentrationsverhältnis Protease : L-VvPPOcs-2 von 1 : 10 eingesetzt. Lediglich für Calpain-1 wurde aufgrund der Herstellerinformationen ein Verhältnis von 1 : 3 bzw. 1 : 5 gewählt. Da die Proteasen Thermolysin, Chymotrypsin und Calpain-1 Ca^{2+} -abhängig sind, wurde dem Puffer CaCl_2 zugesetzt (Tab. 8). Da Calpain-1 in gelöster Form in einem Puffer geliefert wurde, der sowohl EDTA als auch EGTA enthielt, die mit zweiwertige Kationen Chelatkomplexe bilden, wurde Ca^{2+} im Überschuss zugegeben.

Die Proben wurden bei 25 °C im Wärmeschrank inkubiert und nach definierten Zeitpunkten (0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h) Proben entnommen. Um die Proteolyse zu stoppen, wurden die Proben mit Denaturierungspuffer versetzt, bei 95 °C für 10 min denaturiert und eingefroren. Die Analyse der Proteolyse erfolgte über eine 12,5 % ige SDS-PAGE.

Protease	Puffer	Zusatz	Konzentrationsverhältnis Protease : L-VvPPOcs-2	Proteolytische Schnittstelle
Calpain-1	Gekauft in einer Kryo-Lösung: 20 mM Imidazol-HCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 % Glycerol	5 mM CaCl_2	1 : 3 1 : 5	PROSPER: Nach AS 37, AS 478
Chymotrypsin	100 mM Tris pH 8 10 mM CaCl_2	-	1 : 10	Nach Y, W, F, M, L
Proteinase K	Gekauft in: 50 mM Tris pH 8; 1,5 mM Calciumacetat	-	1 : 10	Nach G, A, I, L, M, P, V, H, F, W, Y
Thermolysin	100 mM Tris pH 8 0,5 mM CaCl_2	-	1 : 10	Nach F, L, M, I, V
Trypsin	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl	-	1 : 10	Nach R, K
V8-Protease	100 mM Tris pH 8 150 mM NaCl	-	1 : 10	Nach E, D

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Proteasen.

2.2.8 Aktivitätsnachweis der L-VvPPOcs-2

Die Aktivität der L-VvPPOcs-2 wurde im Rahmen dieser Dissertation in drei Verfahren nachgewiesen: In einem Schnelltest, durch die Aktivitätsfärbung einer nativen PAGE und durch Absorptionsspektroskopie. Alle Verfahren beruhen auf der Bildung farbiger Reaktionsprodukte.

2.2.8.1 Aktivitätsschnelltest

Zur Überprüfung der Diphenolase-Aktivität der L-VvPPOcs-2 wurde ein Aktivitätsschnelltest in einer Mikrotiterplatte (96 Well) durchgeführt. Die Aktivität der L-VvPPOcs-2 wurde qualitativ durch einen gelb-braunen Farbumschlag der Reaktionslösung nachgewiesen. Die Reaktionslösung enthielt je 10 mM 4-MC (Substrat), 50 mM Puffer (Citratpuffer pH 3, Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 oder pH 6) und 2,6 µg L-VvPPOcs-2. Zudem war in einigen Ansätzen 1,5 mM SDS als Aktivator enthalten.

Verwendete Kompositionen:

- (1) 50 mM Citratpuffer pH 3
- (2) 50 mM Citratpuffer pH 3 + 1,5 mM SDS
- (3) 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6
- (4) 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6 + 1,5 mM SDS
- (5) 100 mM Maleat-Tris-Puffer pH 4,5
- (6) 100 mM Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 + 1,5 mM SDS

Die Negativkontrollen enthielten alle in (1) bis (6) aufgeführten Komponenten und 10 mM 4-MC, aber keine L-VvPPOcs-2.

2.2.8.2 Aktivitätsfärbung nativer PAGE (Qualitativer Aktivitätsnachweis)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der L-VvPPOcs-2 in 10 % nativen Gelen (Kap. 2.2.4.2) wurden diese einer Aktivitätsfärbung unterzogen, um die Umsetzung verschiedener Substrate qualitativ aber bandenspezifisch nachzuweisen. Die Gele wurden in den entsprechenden Reaktionspuffern (50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 oder pH 6) für 15 min equilibriert und anschließend in die Färbelösung überführt. Die Färbelösungen enthielten:

- (1) 10 mM Substrat
10 mM MBTH
50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 4,5
1,5 mM SDS
- (2) 10 mM Substrat
10 mM MBTH
50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6

Sowohl im Falle der proteolytisch gespalteten (Trypsin-aktivierten) als auch der unverdauten L-VvPPOcs-2 ist in Färbelösung (1) ein Aktivitätsnachweis zu erwarten, da SDS als Aktivator vorliegt. In Färbelösung (2) fehlt SDS als Aktivator, wodurch die unbehandelte L-VvPPOcs-2 bei pH 6 nicht aktiv (Kap. 3.5), während die Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2 aktiv ist. Da in Färbelösung (2) weder SDS noch ein saurer pH-Wert als Aktivatoren vorliegen, kann eine Aktivierung der L-VvPPOcs-2 auf die Proteolyse durch Trypsin zurückgeführt werden.

Die Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich; Hamburg, Deutschland) dient im Aktivitätsgel als Positivkontrolle, da sie Mono- und Diphenole mit einer hohen Katalyserate umsetzt (Halaouli et al., 2006; Ismaya et al., 2011).

Die Gele wurden so lange in der Färbelösung inkubiert bis sich die Intensität der Bandenfärbung nicht weiter erhöhte. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Gele in Wasser überführt und zur Dokumentation eingescannt.

MBTH-Assay

Zur besseren Detektion der Aktivitätsbanden, wurde der MBTH-Assay verwendet (Pifferi und Baldassari, 1973; Winder und Harris, 1991). MBTH, 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazone, reagiert in einer Michaelis-Addition mit den aus der von der L-VvPPOcs-2 katalysierten Umsetzung von (Poly)Phenolen entstehenden Chinonen zu einem stabilen rosafarbenen Farbkomplex (Abb. 7). Vorteile des MBTH-Assays liegen in dem hohen molaren Extinktionskoeffizienten des Farbstoffkomplexes ($\epsilon(505 \text{ nm}) = 29000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Dadurch ist die Nachweisempfindlichkeit verglichen mit der Detektion der entstehenden Chinone, deren Extinktionskoeffizienten 10-fach geringer sind (Tab. 10), stark erhöht. Zusätzlich verhindert die Bildung des stabilen Farbstoffkomplexes die Weiterreaktion der entstehenden Chinone zu Melanin, so dass der Umsatz verschiedener Substrate gut vergleichbar sein müsste. Allerdings ist nur für die Reaktion von D,L-Dopa der molare Absorptionskoeffizient des Farbstoffkomplexes bekannt. Ein großer Nachteil ist die geringe Löslichkeit des MBTH in wässrigen Lösungen. Empfohlen ist, MBTH in höheren Konzentration als das Substrat einzusetzen, um die alle entstehenden Chinone in einem Farbkomplex binden zu können. Bei Konzentration $> 10 \text{ mM}$ müssen organische Lösungsmittel eingesetzt werden, die sich auf die Aktivität von Enzymen auswirken können. Aus diesem Grund wurde in den Experimenten dieser Arbeit wenn möglich auf MBTH verzichtet. Nur wenn die Substratumsätze eine zu geringe Absorption aufweisen, wurde MBTH aufgrund der erhöhten Nachweisempfindlichkeit des Reaktionskomplexes verwendet. In den entsprechenden Kapiteln ist dies explizit erwähnt.

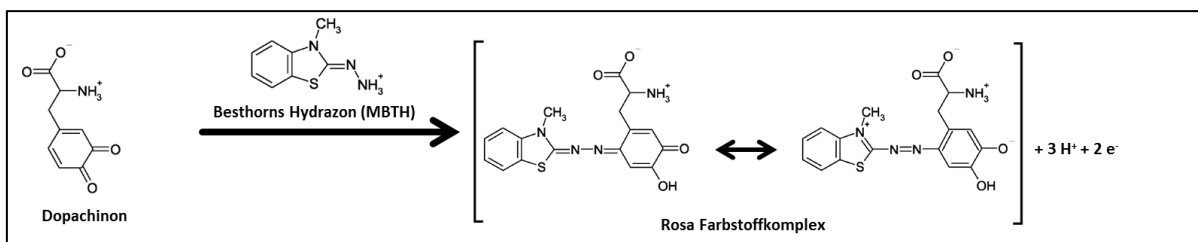


Abbildung 7: Farbreaktion des MBTH-Assays. Ein o-Chinon (z.B. Dopachinon) reagiert mit MBTH zu einem rosafarbenen Farbstoffkomplex.

2.2.9 Größenausschlusschromatographie (Size-Exclusion Chromatography: SEC)

Um zu untersuchen, ob das C-terminale Spaltfragment durch die Proteolyse vollständig abgetrennt wird und das katalytische N-terminale Fragment zu isolieren, sollten die Spaltprodukte der L-VvPPOcs-2wt (ca. 36 kDa, ca. 17 kDa) nach der Proteolyse durch Trypsin über Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt werden.

Diese fand an einer Superdex 75 10/300 GL Säule (GE Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Schweden) statt, die mit einer FPLC-Anlage *Biologic DuoFlow* (Bio-Rad Laboratories Inc.; CA, USA) verbunden war. Die Säule eignet sich für die Trennung von Proteinen zwischen 3 und 70 kDa, wobei kleine Proteine langsamer durch die poröse Matrix der Säule diffundieren (Mori & Barth, 1999).

Der Proteolyseansatz (Konzentrationsverhältnis Trypsin : L-VvPPOcs-2wt = 1 : 10) wurde nach 30-minütiger Inkubation bei 25 °C (Kap. 2.2.7) über eine 300 µl – Schleife in das System injiziert, gelang auf die Säule und wurde mit Strep-Tactin®- Waschpuffer 2 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in den kleinsten möglichen Fraktionen (400 µl) eluiert. Die Detektion der eluierenden Proteine fand mit einem Durchflussspektrometer mit einer optischen Weglänge von 5 mm bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ statt. Die Versuchstemperatur betrug 4 °C. Die Absorptionswerte wurden in einem Elutionsprofil gegen die Zeit aufgetragen.

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Analyse der Peptidgröße und Reinheit auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und einem Aktivitätstest unterzogen.

2.2.10 Abtrennung der C-terminalen Domäne mittels Harnstoff

Da sich die C-terminale Domäne und die katalytische Einheit des Trypsin-verdauten L-VvPPOcs-2wt nicht durch Größenausschlusschromatographie voneinander trennen ließen, wurde vermutet, dass die C-terminale Domäne zwar gespalten, aber nicht vollständig von der katalytischen Einheit abgetrennt wurde. Durch Denaturierung der Trypsin-verdauten L-VvPPOcs-2 mit dem chaotropen Agens Harnstoff in unterschiedlichen Molaritäten soll die C-terminale Domäne vollständig abgetrennt werden. Durch Denaturierung mit geringen Molaritäten Harnstoff kann die Funktion von Enzymen erhalten bleiben. Der Proteolyseansatz wurde im Konzentrationsverhältnis Trypsin : L-VvPPOcs-2 von 1 : 10 angesetzt und für 30 min bei 25 °C inkubiert (Kap. 2.2.7). Die Proteolyseansätze werden dann im Verhältnis 1 : 1

mit einer entsprechend konzentrierten Harnstoff-Stammlösung (Harnstoff in Reinstwasser gelöst) inkubiert. Die Harnstoffkonzentration in der Probe betrug 0 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 5 M, 8 M, 10 M und 12 M. In jeder Probe liegt der L-VvPPOcs-2wt in gleicher Konzentration vor. Die Proben des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt wurden als Kontrolle analog mit Harnstoff versetzt. Alle Proben wurden 30 min bei 25 °C inkubiert und anschließend auf eine 10 % ige native PAGE aufgetragen (Kap. 2.2.4.2). Die Proteinbanden wurden sowohl mittels Coomassie nach Kang detektiert (Kang et al. 2002) als auch einer Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC, 10 mM MBTH, 1,5 mM SDS in 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 unterzogen (Färbelösung 1; Kap. 2.2.8.2). Bei vollständiger Abtrennung der C-terminalen Domäne wurde eine zusätzliche Bande erwartet, die sich mittels Coomassie detektieren lässt, aber keine Aktivität zeigt.

2.2.11 Quantitative Bestimmung der katalytischen Aktivität

Die Reaktionsprodukte aus der Umsetzung von Phenolen durch die L-VvPPOcs-2 sind Chinone, die charakteristische Absorptionsmaxima im kurzwelligen VIS-Bereich aufweisen und deren Entstehung somit mittels Absorptionsspektroskopie detektiert werden kann. Alle Messungen fanden in einer Mikroküvette (Hellma; Mühlheim, Deutschland) mit einer optischen Weglänge von 1 cm statt. Im Folgenden wird die Absorption eines Stoffes bei einer Weglänge von 1 cm optische Dichte (OD) bezeichnet. Die Produktkonzentration zu jedem Zeitpunkt wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Kap. 2.2.3, Gleichung 2) bestimmt. Die Substrat-spezifischen Extinktionskoeffizienten sind Tab. 10 zu entnehmen. Das Probenvolumen betrug 300 µl. Die Messungen fanden bei 25 °C an den Zweistrahlphotometern Spectrophotometer U3000 (Hitachi; Tokyo, Japan) und Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies; Santa Clara, United States) statt. Alle Komponenten der Reaktionslösung außer der L-VvPPOcs-2 wurden temperiert. Jedes Experiment fand mindestens in Dreifachbestimmung statt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

2.2.11.1 Aufnahme von Produktspektren

Für die Messung von Enzymkinetiken ist die Wellenlänge interessant, bei der der Absorptionswert des entstehenden Produktes maximal ist. Um diese Wellenlänge für jedes der eingesetzten Substrate (4-Methycatechol (4-MC), Dopamin (DA), Catechol (CAT) und p-Tyrosol (p-Tyr)) zu bestimmen, wurden über 1 h alle 2 min Spektren im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 350 - 700$ nm aufgenommen. Die Messungen fanden in 100 mM Maleat-Tris-Puffer pH 5,5 statt. Es wurden 10 mM 4-MC, 10 mM DA, 10 mM CAT bzw. 5 mM p-Tyr, 1,5 mM SDS als Aktivator und 0,8 µM L-VvPPOcs-2wt für 4-MC, DA und CAT und 3,2 µM L-VvPPOcs-2wt für p-Tyr eingesetzt. Die Spektren wurden gegen das Pufferspektrum korrigiert. Die Messtemperatur betrug 25 °C.

2.2.11.2 Bestimmung der pH-Optima

Die katalytische Aktivität eines Enzyms ist im Allgemeinen abhängig vom pH-Wert des umgebenden Milieus. Die Bestimmung der enzymatischen Parameter (Kap. 2.2.11.3) soll am pH-Optimum des L-VvPPOcs-2wt und der beiden Mutanten -F259L und -F259G stattfinden. Um dieses zu ermitteln wurde der Umsatz von 10 mM 4-MC nach Aktivierung durch 1,5 mM SDS oder Trypsin (Kap. 2.2.7) bei pH-Werten zwischen 2 und 9 ermittelt. Die pH-Werte wurden im Bereich von 2 bis 3,5 mit einem 100 mM Citratpuffer und im Bereich von 4 bis 9 mit einem 100 mM Maleat-Tris-Puffer eingestellt. Die Konzentration der L-VvPPOcs-2 betrug in allen Ansätzen 0,8 μ M. Die Messungen fanden mit temperierten Reaktionslösungen bei 25 °C statt. Die Zunahme der Konzentration des entstehenden Produktes wurde bei $\lambda = 405$ nm absorptionsspektroskopisch über die Zeit verfolgt. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten $dOD(\lambda_{\max})/dt$, wurden gegen die pH-Werte aufgetragen.

2.2.11.3 Bestimmung von K_M , v_{\max} und k_{cat}

Zur Messung von Michaelis-Menten-Kinetiken wurde die $dOD(\lambda_{\max})/dt$ für verschiedene Substratkonzentrationen der verwendeten Substrate (4-MC, CAT, DA, p-Tyr) bestimmt. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Alle Lösungen wurden temperiert (Ausnahme: L-VvPPOcs-2).

Bedingungen

Kinetische Messungen wurden für die in Tab. 9 aufgezeigten Bedingungen durchgeführt.

Als pH-Werte wurden die zuvor bestimmten pH-Optima gewählt (Kap. 2.2.11.2) und die Zunahme der Konzentration der Reaktionsprodukte wurde bei den ermittelten λ_{\max} detektiert (Kap. 2.2.11.1). Die Konzentration der L-VvPPOcs-2 betrug bei den Substraten 4-MC, CAT und DA 0,8 μ M. Da p-Tyr weniger effektiv umgesetzt wurde, betrug die Konzentration der L-VvPPOcs-2 in diesen Ansätzen 3,2 μ M.

Für jedes Substrat wurden zehn verschiedene Substratkonzentrationen gewählt. Diese variierten für die Substrate 4-MC, CAT und p-Tyr zwischen 0 und 50 mM. Da p-Tyr schlecht wasserlöslich ist, betrug die maximale Substratkonzentration 9,3 mM. Die Messdauer lag zwischen 5 und 10 min. Beim Umsatz des Substrates p-Tyr und bei der Verwendung der L-VvPPOcs-2-F259G betrug sie aufgrund einer langsameren Umsatzgeschwindigkeit bis zu 5 h. Die Messungen wurden mit der Zugabe der L-VvPPOcs-2 in die Küvette gestartet und die Reaktionslösung durch zügiges Invertieren der Küvette gemischt. Die Zeit zwischen dem Reaktionsstart und dem Beginn der Messung betrug konstant 15 s.

Substrat	Enzym	λ_{\max} [nm]	100 mM Maleat-Tris	Aktivator	Substratkonzentrationen [mM]
4-MC	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	405	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
4-MC	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	405	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
4-MC	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	405	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
4-MC	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	405	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
4-MC	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	405	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 50
4-MC	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	405	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 50
CAT	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
CAT	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
CAT	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 50
CAT	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 50
CAT	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 50
CAT	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 50
DA	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	475	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 50
DA	L-VvPPOcs-2wt (0,8 μ M)	475	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
DA	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	475	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 50
DA	L-VvPPOcs-2-F259L (0,8 μ M)	475	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
DA	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	475	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 50
DA	L-VvPPOcs-2-F259G (0,8 μ M)	475	pH 4,5	Trypsin	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30; 50
p-Tyr	L-VvPPOcs-2wt (3,2 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,05; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3
p-Tyr	L-VvPPOcs-2wt (3,2 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,05; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3
p-Tyr	L-VvPPOcs-2-F259L (3,2 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,05; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3
p-Tyr	L-VvPPOcs-2-F259L (3,2 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,05; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3
p-Tyr	L-VvPPOcs-2-F259G (3,2 μ M)	400	pH 5,5	1,5 mM SDS	0; 0,1; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3
p-Tyr	L-VvPPOcs-2-F259G (3,2 μ M)	400	pH 4,5	Trypsin	0; 0,1; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 9,3

Tabelle 9: Übersicht über die Messbedingungen der Enzymkinetiken.

Auswertung

Gemessen wird die Änderung der OD(λ_{\max}) über die Zeit t . Diese ist aber nicht wie bei der Enzymkinetik von Michaelis-Menten angenommen über den gesamten Messzeitraum linear. Begründet ist dies z.B. in einer Lag-Phase, die bei bestimmten Substraten oder Konzentrationen auftreten kann, dem Ende der *steady state*-Bedingungen nach Substratverbrauch oder autokatalytische Weiterreaktionen der gebildeten Chinone. An den aufgezeichneten Messgraphen ($dOD(\lambda_{\max})/dt$) musste folglich der lineare Bereich mit der steilsten Steigung (Anfangsgeschwindigkeit) bestimmt werden. In der Regel entsprachen diese den Zeitintervallen zwischen 10 und 30 s nach Beginn der Messung und wurde mit den Programmen UV Solutions (Hitachi; Tokyo, Japan) und Cary WinUV (Agilent Technologies; Santa Clara, USA) bestimmt. Zu jeder Substratkonzentration ergibt sich so die $dOD(\lambda_{\max})/dt$ (Umsatzgeschwindigkeit). Die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3) wurde in der Software Origin® 7.5 (OriginLab; Northampton, USA) mittels nicht-linearer Regression an die an die Datenpunkte angepasst (Michaelis & Menten, 1913):

$$v([S]) = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Gleichung 3})$$

mit $[S]$: Substratkonzentration in mM
 $v([S])$: Umsatzgeschwindigkeit (entspricht $dOD(\lambda_{\max})/dt$ bei bestimmten $[S]$)
 v_{\max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit
 K_M : Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration, bei der die halb-maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht ist) in mM

Dadurch ergeben sich die enzymatischen Parameter K_M und v_{\max} . Die Michaelis-Menten-Konstante K_M gilt als Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat und gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der Substratbindungsstellen gesättigt ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit, die maximal bei Sättigung aller Substratbindungsstellen erreicht werden kann, wird als v_{\max} bezeichnet (Einheit: $dOD(\lambda_{\max})/min$).

Über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 2) wird die entstehende Stoffmenge berechnet, wofür der molare Extinktionskoeffizient der entstehenden Chinone notwendig ist. Diese sind aus der Literatur jedoch nur bei abweichenden Versuchsbedingungen bekannt (Tab. 10), weshalb die Stoffmengen der Reaktionsprodukte nur näherungsweise bestimmt werden konnten. Anhand des Parameters v_{\max} lässt sich dann abschätzen, um wieviel μmol sich die Produktkonzentration in einer Minute Reaktionszeit ändert. Die Wechselzahl k_{cat} errechnet sich aus

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{E_0} \quad (\text{Gleichung 4})$$

mit k_{cat} : katalytische Wechselzahl in 1/s
 v_{max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit in $\mu\text{mol/s}$
 E_0 : eingesetzte Enzymkonzentration in μmol

und erlaubt einen Vergleich der entstandenen Produktmoleküle in einem Zeitintervall von 1 Sekunde. Sie ist unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration, weswegen sie hier einen Vergleich zwischen dem Umsatz der Diphenole 4-MC, CAT und DA und dem Monophenol p-Tyr ermöglicht. Je größer die Wechselzahl und je höher die Affinität des Enzyms zum Substrat ist, desto höher ist seine katalytische Effizienz:

$$k_{eff} = \frac{k_{cat}}{K_M} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Diese stellt eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung dar und wird überwiegend verwendet, wenn eine Enzymsättigung aufgrund einer niedrigen Substratkonzentration nicht erreicht wird. Dies ist vor allem für physiologisch relevante Substratkonzentrationen interessant (Horton et al, 2008). Jeder Datenpunkt wurde mindestens 3-mal gemessen. Die Fehlerbalken in den Michaelis-Menten Diagrammen geben die Standardabweichung an. Die absoluten Fehler werden für K_M und v_{max} durch Origin® innerhalb der nicht-linearen Regression ausgegeben. Aus diesen wurden über den relativen Fehler (k_{cat}) und die Gauß'sche Fehlerfortpflanzung (k_{eff}) die weiteren Fehler berechnet.

Substrat	pH-Wert	Messwellenlänge [nm]	Puffer	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	Referenz
4-MC	5,0	405	50 mM Phosphat- Acetat-Puffer	1090	Dirks- Hofmeister et al., 2014
CAT	5,0	400	50 mM Phosphat- Acetat-Puffer	1197	Dirks- Hofmeister et al., 2014
DA	7,0	480	30 mM Natrium- Phosphat	3300	Muñoz et al., 2006
p-Tyr	6,5	400	10 mM Natrium- Phosphat	950	García-García et al., 2013; Fronk & Jaeckels, 2016

Tabelle 10: Übersicht über die zur Bestimmung der entstehenden Stoffmenge der Produkte verwendeten Extinktionskoeffizienten.

2.2.12 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse fand am Institut für Molekulare Biologie (IMB) Mainz in der *Core Facility Proteomics* statt. Nach Proteolyse mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin zeigt der L-VvPPOcs-2wt ein multiples Bandenmuster im SDS-Gel (Kap. 3.2). Um die entstanden Peptide in den einzelnen Banden den verschiedenen Domänen (N-terminale Domäne, C-terminale Domäne und Linkerbereich) zuordnen zu können, wurden die Peptide mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Probenpräparation

Die Proben wurden in Form von ausgeschnittenen Banden aus einem 12,5 %igen SDS-Gel ins IMB, Mainz gegeben. Die Proteolyse und die Anfertigung des SDS-Gels fanden analog zu Kap. 2.2.7 und Kap. 2.2.4.1 statt. Die Banden wurden mit einem gesäuberten und desinfizierten Skalpell mittels einer Pinzette in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt.

Durchführung und Theorie

Im IMB Mainz wurden die eingereichten SDS-Gelbanden zunächst mechanisch zerkleinert und mit Trypsin bzw. nach einem modifizierten Protokoll zusätzlich durch saure Hydrolyse (3 M HCl) in Peptide zerlegt.

Prinzipiell gliedert sich die Massenspektrometrie in fünf Bereiche (Einlasssystem, Ionenquelle, Massenanalysator, Detektor, Datenanalyse), von denen Teile des Einlasssystems, Ionisierung, Massenanalysator und Detektion im Vakuum stattfinden (Abb. 8).

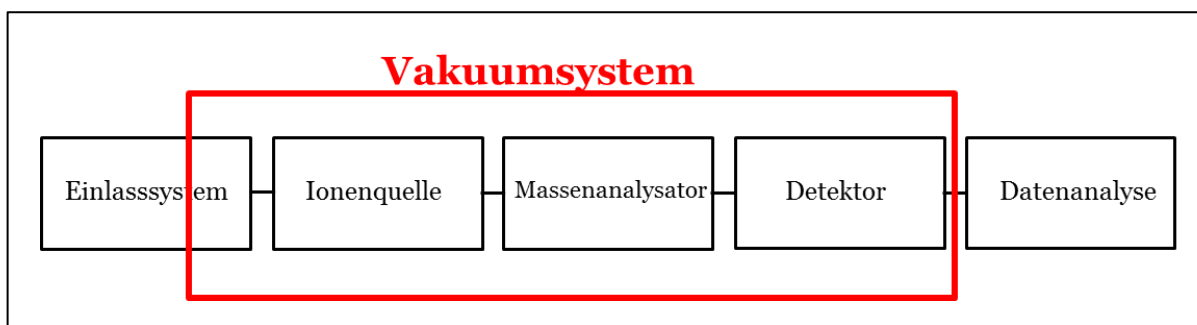


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der massenspektrometrischen Analyse. Teile des Einlasssystems, die Ionenquelle, der Massenanalysator und der Detektor befinden sich unter Vakuum.

Als Einlasssystem dient am IMB Mainz eine uHPLC (EASY nLC 1000), die die in der Bande des SDS-Gels vorhandenen Peptide der Größe nach auftrennt und in die Ionisierungsquelle einleitet. Als Ionisierungsquelle wird die Elektrospray-Ionisation (ESI, *Positive Ionization Mode*) genutzt. Die ionisierten Peptide gelangen in den Massenanalysator, der im Falle des Massenspektrometers

Q Exactive™ (Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, USA) aus einer Hybridtechnologie aus Quadrupol und Orbitrap besteht. Der Massenanalysator trennt die ionisierten Peptide entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis auf. Einige Peptide sind aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaft nur schwer ionisierbar, wodurch sie den Massenanalysator nicht oder nur geringfügig passieren können. Die Besonderheit an der Kombination zweier verschiedener Analyseverfahren (Quadrupol und Orbitrap) liegt darin, dass die Peptide, die über das Einlasssystem in das Massenspektrometer gelangen, durch Stöße mit Inertgas abermals fragmentiert und analysiert werden, wodurch die Nachweisgrenze des Massenspektrometers sinkt (Tandem-MS).

Datenauswertung

Die primäre Auswertung der Daten erfolgt noch im IMB Mainz mittels der Software *MaxQuant*. Diese errechnet aus den Rohdaten, die aus je einer SDS-Gelbande mittels Tandem-MS gewonnen werden, dreidimensionale Intensitätpeaks (Intensität-m/z-Verhältnis-Retentionszeitebene; Cox & Mann; 2008; Cox & Mann; 2009; Tyanova et al., 2015), die zur weiteren Auswertung verwendet werden. Diese beruht auf einem Datenbankabgleich. Aus den Proteinsequenzen in der Datenbank werden mittels bestimmter Kriterien (z.B. Spezifität des Trypsins, Masseneinschränkungen) Peptid- und Fragmentsequenzen selektiert, in denen das untersuchte Protein vorliegen könnte. Die Sequenzen dieser „theoretischen Peptide“ in der Datenbank werden mit den gemessenen Masse-zu-Ladungsverhältnissen abgeglichen und einander zugeordnet. Dies geschieht zunächst auf der Ebene der kleinen Peptidfragmente und im Anschluss auf Ebene der größeren Peptide (Tandem-MS). Das identifizierte Protein setzt sich schlussendlich aus der größten Anzahl von am besten korrelierenden Peptiden zusammen und bildet somit den signifikantesten Treffer in der Datenbank.

Es ist hervorzuheben, dass nur Proteine oder Peptide identifiziert werden können, die in der Datenbank hinterlegt sind. Aus diesem Grund wurde dem IMB Mainz die Aminosäuresequenzen der L-VvPPOcs-2-wt und der verwendeten Proteasen zur Verfügung gestellt. Ebenso war die Angabe, dass es sich um ein rekombinant in *E. coli* exprimiertes Protein handelt, interessant, um Verunreinigungen mit Proteinen aus *E. coli*, die aufgrund der hohen Sensitivität des Massenspektrometers detektiert wurden, zu berücksichtigen. Sowohl Sequenzen von *E. coli*-Proteinen als auch Sequenzen von Proteinen, die von Verunreinigungen der Probe ausgehen können (z.B. Keratin), können mittels der Software *MaxQuant* direkt von der weiteren Analyse ausgenommen werden.

Auf dieser Grundlage wurden vom IMB zu jeder SDS-Gelbande eine Auflistung aller detektierten Proteine (z.B. *E. coli*-Proteine, die nicht durch die Software gefiltert werden konnten) und detektieren Spaltpeptide des Zielproteins (L-VvPPOcs-2wt) und deren zugehörigen Messintensitäten und Molekularmassen zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde ein Alignment der detektierten Spaltpeptide und der Aminosäuresequenz der L-VvPPOcs-2wt angefertigt.

Mittels dieser Daten und der aus der SDS-PAGE ermittelten Molekularmasse des in der SDS-Gelbande enthaltenen Peptids, wurde dieses einer der funktionellen Domänen (N-terminale Domäne, C-terminale Domäne, Linkerbereich) des L-VvPPOcs-2wt zugeordnet.

Die Schwierigkeit lag hierbei darin, dass die Proteinauftrennung in der SDS-PAGE nicht ausreichend ist, um die in der Proteolyse entstandenen Peptide vollständig voneinander zu trennen: In SDS-Gelbanden, die Peptide kleiner Molekularmassen enthalten, wurden fast alle im L-VvPPOcs-2wt vorkommende Peptide detektiert. Die Messintensität dieser in geringen Konzentrationen vorkommenden Peptide war relativ zu den tatsächlich enthaltenen Peptiden gering. Um den Aminosäuresequenzabschnitt, der das Peptid aus der SDS-Gelbande überwiegend tatsächlich enthält, einzugrenzen, wurde die Molekularmasse des aus den Messdaten ermittelten Peptids mit der experimentell ermittelten Molekularmasse der SDS-Gelbande verglichen. Zusätzlich wurde die Sequenz des Peptids anhand der Enzymspezifität der eingesetzten Protease (theoretisch ermittelten Schnittstellen; Anhang C) eingegrenzt. Diese Approximation wurde solange wiederholt bis die Masse der theoretisch ermittelten Peptidsequenz mit der experimentell ermittelten Molekularmasse (SDS-Gelbande) übereinstimmte. Da die Protokolle am IMB Mainz im Laufe der Dissertation modifiziert wurden, weicht die detaillierte Auswertung der zur Verfügung gestellten Daten bei Analyse der Schnittstellen durch die Proteinase K geringfügig ab. Das genaue Vorgehen wurde für jedes Experiment anhand der Daten detailliert in den entsprechenden Ergebniskapiteln erörtert (Kap. 3.2).

2.2.13 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie gibt Aufschluss über die Anteile an Sekundärstrukturelementen in einem Protein.

Somit soll in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der CD-Spektren des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine L-VvPPOcs-2-F259L, L-VvPPOcs-2-F259G Hinweise auf signifikante Abweichungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung und damit Proteinfaltung geben.

Die Spektren wurden im Fern-UV-Bereich an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer (JASCO Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) im Institut [REDACTED] ([REDACTED]) gemessen. In diesem Wellenlängenbereich wird das größte Signal durch α -helicale Domänen verursacht. β -Faltblattstrukturen und ungeordnete Bereiche weisen ein geringeres Signal auf.

Die L-VvPPOcs-2 lag in einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7,6 und in einer Konzentration von 0,2 mg/ml vor. Es wurden Quarzglasküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 mm verwendet. Die Messtemperatur betrug 20 °C.

Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 – 260 nm mit einer spektralen Bandbreite von 5 nm aufgenommen. Der Abstand zwischen den Datenpunkten betrug 1 nm. Jedes Spektrum wurde 3 x aufgenommen, von der Gerätesoftware gegen das Pufferspektrum korrigiert und gemittelt.

Abschließend wurden die Spektren auf das Spektrum des PPO-2-Wildtyps normiert, um geringe Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Proteinproben auszugleichen.

2.2.14 Kristallisation der L-VvPPOcs-2wt

Bereits in meiner Masterarbeit wurde nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für den L-VvPPOcs-2wt gesucht und viele Kristallisationsreagenzien ausprobiert, die jedoch nur zur Bildung von Mikrokristallen führten (Ludwig, 2014). Hauptsächlich stammten die Hinweise auf die Kristallisationsbedingungen aus einem Screening des *Hauptman-Woodward-Medical-Research-Institute* (Buffalo, NY, USA). Dort wurden 1536 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen mittels des *Microbatch*-Verfahrens getestet. Über sechs Wochen erhielt man jede Woche Fotos der 1536 verschiedenen Ansätze, die dann auf Kristallbildung und deren Vorstufen durchsucht und klassifiziert werden konnten.

Die Kristallisationsexperimente wurden im Rahmen dieser Dissertation fortgeführt. Die Reaktionsansätze, in denen Mikrokristalle beobachtet werden konnten, wurden erneut im Gasphasendifusionsverfahren (*hanging drop*) angesetzt und in kleineren Konzentrationsschritten und variierenden pH-Werten um die ursprüngliche Bedingung variiert (Tab. 11).

Hierfür wurde 1 ml einer Reservoirolösung angesetzt, die Puffer und Präzipitanten enthielt. Diese wurde in eine Reaktionsgefäßvertiefung einer 24-Well-Kristallisationsplatte (VDX-Platten, *Hampton Research*; CA, USA) pipettiert, die oben mit Vaseline beschichtet war. Auf ein silikonbeschichtetes Deckgläschen wurde ein 5 µl Tropfen pipettiert, der im Verhältnis 1:1 aus Protein- und Reservoirolösung bestand. Dieses wurde anschließend so auf das Reaktionsgefäß gesetzt und angeedrückt, dass das System durch die Vaseline luftdicht verschlossen wurde (Abb. 9). Durch das Konzentrationsgefälle und die hygroskopische Reservoirolösung diffundierte Wasser aus dem Tropfen, das Protein konzentrierte auf und es bildeten sich im günstigen Fall Proteinkristalle. Alle Bedingungen wurden doppelt angesetzt. Die Konzentration des L-VvPPOcs-2wt im Tropfen betrug 5 mg/ml oder 8 mg/ml in 20 mM Tris pH 8. Alle Lösungen mit Ausnahme des L-VvPPOcs-2wt und der viskösen Präzipitanten (PEG, Glycerol, Ethylenglycol) wurden durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

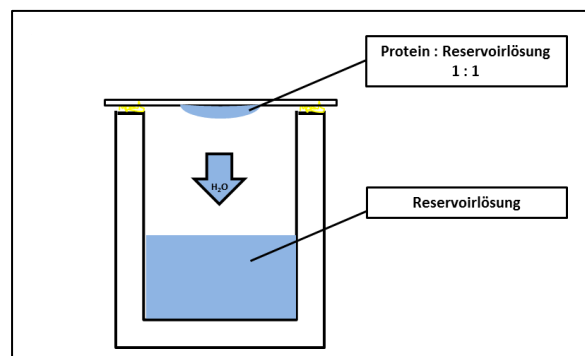


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Gasphasendifusionsverfahrens mittels des *hanging drop* Verfahrens.

Im Gasphasendiffusionsverfahren startet das System im Zustand der Untersättigung. Durch die Diffusion von Wasser (der Dampfdruck des Wassers ist im Tropfen höher als in der Reservoirolösung) trocknet der Tropfen ein, wodurch sich sowohl die Protein- als auch die Präzipitantenkonzentration solange erhöhen bis es zu einer Übersättigung kommt (Abb. 10). In der labilen Phase bilden sich Nukleationskeime, wodurch der Grad der Übersättigung gesenkt wird, da Protein von der flüssigen in die feste Phase übergeht. Die Konzentration der Präzipitanten wird sich solange erhöhen bis sich der Dampfdruck des Wassers im Tropfen und der Reservoirolösung angeglichen haben. Der Ausgleich der Dampfdrücke ist allerdings nicht als Ende des Experimentes anzusehen. Dieses endet erst, wenn das Protein im Tropfen nicht mehr übersättigt vorliegt. Dieser Punkt ist häufig erst nach der Äquilibrierung der Dampfdrücke erreicht (Chayen, 1998; Luft et al., 2003).

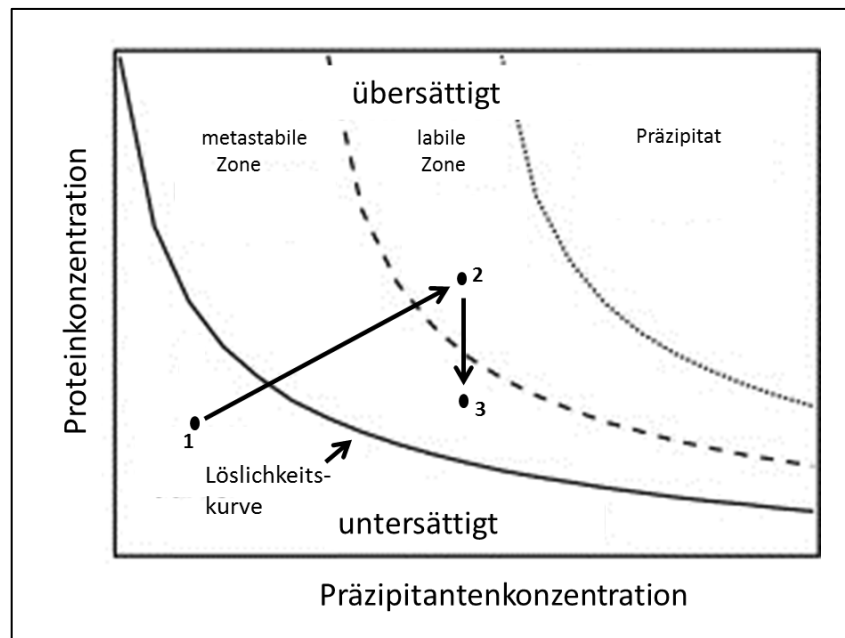


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Phasendiagramms der Proteinkristallisation. Das System startet im Zustand der Untersättigung (1). Durch Diffusion von Wasser aus dem Tropfen kommt es zur Konzentration des Proteins und der Präzipitanten bis das System übersättigt ist. Hier kann es in der labilen Zone zur Bildung von Nukleationskeimen kommen (2), wodurch die Proteinkonzentration sinkt und keine weiteren Aggregate gebildet werden. Die Konzentration der Präzipitanten bleibt konstant. Somit ist die Lösung weiterhin übersättigt, so dass gebildete Nukleationskeime in der metastabilen Zone wachsen können (3). Modifiziert aus Asherie, 2004.

Durch die Verwendung von Polyoxometallaten (POMs) gelang die Kristallisation einer latenten PPO aus den Blättern der Walnuss (Zekiri et al., 2014). Diese besteht ähnlich der L-VvPPOcs-2 aus einer Linkerregion und einer C-terminalen Domäne, die aufgrund ihrer hohen Flexibilität die Bildung von Proteinkristallen erschwert. POMs sind eine Stoffgruppe von anorganischen Übergangsmetalloxidclustern in ihrer höchsten Oxidationsstufe (Bijelic & Rempel, 2015). Die

Interaktion zwischen dem Protein und den Präzipitanten ist oftmals grundlegend für erfolgreiche Kristallisationsexperimente. POMs können z.B. elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen oder van der Waals Wechselwirkungen zu Proteinen eingehen, wodurch z.B. die flexible Linkerregion und die C-terminale Domäne der L-VvPPOcs-2wt mittels des POM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ stabilisiert werden und die Wahrscheinlichkeit der Proteinkristallbildung erhöht werden könnte. Das POM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ wurde im Institut für anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Felix Tuczek synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Da keine Kristallisationsbedingungen für die L-VvPPOcs-2wt bekannt waren, wurde auch hier in den Konzentrationen der Präzipitanten variiert (Tab. 11). Die Ansätze wurden in einem Klimaschrank bei 20 °C inkubiert, mit einem Lichtmikroskop (SZ-60 Olympus; Tokio, Japan) regelmäßig auf Kristallbildung untersucht und mit einer Digitalkamera (*Samsung Galaxy S5 und S7edge*; Seoul, Südkorea) dokumentiert.

Präzipitant 1						Präzipitant 2						Puffer			
Platte	pH	Name	Bereich	Abstufung	Name	Bereich	Abstufung	Name	Bereich	Abstufung	Name	Bereich	Abstufung	Bereich	Abstufung
1	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,8 – 1,2 M	0,1	PEG 4000	8 – 11 %	1	Tris	8 – 11 %	1	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
2	6,5	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 3350	5 – 12 %	2	Bicin	5 – 12 %	2	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
3	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,5 – 1 M	0,1	Glycerin	25 %	-	Tris	25 %	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
4	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 5000	5 – 12 %	2	Tris	5 – 12 %	2	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
5	6,5	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,5 – 1,3 M	0,1	Ethylenglycol	25 %	-	Bicin	25 %	-	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
6	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,5 – 1,3 M	0,1	PEG 400	25 %	-	Tris	25 %	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
7	6,5	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,5 – 1,3 M	0,1	PEG 400	25 %	-	Bicin	25 %	-	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
8	6,5	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,5 – 1,3 M	0,2	PEG 400	5 – 12 %	2	Bicin	5 – 12 %	2	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
8	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,8 – 1,1 M	0,05	PEG 5000	9 – 10,5 %	0,5	Tris	9 – 10,5 %	0,5	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
9	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 6000	5 – 12 %	2	Tris	5 – 12 %	2	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
10	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 8000	5 – 12 %	2	Tris	5 – 12 %	2	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
11	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 10000	5 – 12 %	2	Tris	5 – 12 %	2	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
12	7	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 20000	5 – 12 %	2	Tris	5 – 12 %	2	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
13	6,5	Na ₆ [TeW ₆ O ₂₄]·22H ₂ O	0,9 – 1,1 M	0,1	PEG 6000	5 – 12 %	2	Bicin	5 – 12 %	2	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
14	6	-	-	-	PEG 3350	5 – 8 %	0,5	Bicin	5 – 8 %	0,5	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
15	6,5	-	-	-	PEG 3350	5 – 8 %	0,5	Bicin	5 – 8 %	0,5	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
16	7	-	-	-	PEG 3350	5 – 8 %	0,5	Bicin	5 – 8 %	0,5	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-
17	7,5	-	-	-	PEG 3350	5 – 8 %	0,5	Bicin	5 – 8 %	0,5	Bicin	0,1 M	-	0,1 M	-

Tabelle 11: Übersicht über die Zusammensetzung aller Kristallisationsansätze (Teil 1). Alle Bedingungen wurden mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (5 mg/ml und 8 mg/ml) angesetzt. Die Tropfengröße betrug 5 µl. Die Ansätze wurden in einem Klimaschrank bei 20 °C inkubiert. PEG: Polyethylenglycol. Abstufung: Intervallschritte, in denen die Konzentration variiert wurde.

Präzipitant 1				Präzipitant 2				Puffer				
Platte	pH	Name	Bereich	Abstufung	Name	Bereich	Abstufung	Name	Bereich	Abstufung	Bereich	Abstufung
18	6	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	-	-	-	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
19	6,5	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	-	-	-	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
20	7	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	-	-	-	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
21	6,5	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	PEG 4000	5 – 12 %	2	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
22	6,5	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	PEG 6000	5 – 12 %	2	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
23	6,5	Lithiumsulfat	0,5 – 0,9 M	0,1	PEG 10000	5 – 12 %	2	Bis-Tris-Propan	0,1 M	-	0,1 M	-
24	7	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	-	-	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
25	7,5	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	-	-	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
26	8	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	-	-	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
27	8,5	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	-	-	-	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
28	7,5	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	PEG 4000	8 – 11 %	1	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-
29	8	Kaliumthiocyanat	0,3 – 0,5 M	0,1	PEG 4000	8 – 11 %	1	Tris	0,1 M	-	0,1 M	-

Tabelle 11: Übersicht über die Zusammensetzung aller Kristallisationsansätze (Teil 2). Alle Bedingungen wurden mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (5 mg/ml und 8 mg/ml) angesetzt. Die Tropfengröße betrug 5 µl. Die Ansätze wurden in einem Klimaschrank bei 20 °C inkubiert. PEG: Polyethylenglycol. Abstufung: Intervallschritte, in denen die Konzentration variiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Proteingewinnung

Die L-VvPPOcs-2 (L-VvPPOcs-2: L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G) wurde in *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) pLysS - Zellen überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie über ein N-terminales Strep-Tag® II -Peptid gereinigt.

3.1.1 Reinheit und Menge der L-VvPPOcs-2

Abb. 11 A-C zeigt den Verlauf der Isolierung der PPO-Konstrukte aus *E. coli*: Das *E. coli* Rohextrakt (A-C, Spur 1) und der Durchfluss durch die Strep-Tactin®-Säule (A-C, Spur 2) zeigen ein multiples Bandenmuster, was den Gehalt vieler Proteine unterschiedlicher Größe aus *E. coli* anzeigt. Die prominente Bande bei ca. 60 kDa (roter Pfeil) deutet auf eine Überexpression der L-VvPPOcs-2 hin (59 kDa). In der Analyse des Durchflusses ist ebenfalls eine Bande bei ca. 60 kDa sichtbar, die entweder anzeigt, dass die L-VvPPOcs-2 nicht vollständig an die Strep-Tactin®Superflow™ Agarose bindet oder dass ein weiteres Protein ähnlicher Größe im *E. coli* Rohextrakt vorhanden ist.

Um Proteine auszuwaschen, die unspezifisch an die Strep-Tactin®Superflow™ Agarose gebunden haben, wurde die Matrix nach dem Durchfluss des 5-fachen Säulenvolumens an *E. coli* Rohextrakt mit dem 10-fachen Säulenvolumen an Strep-Tactin®- Waschpuffer gewaschen. Spur 3 bis 4 (Abb. 11 A-C) zeigen sowohl jeweils den ersten bzw. zwanzigsten Milliliter des Waschschrittes.

Der erste Milliliter beider Waschschritte (Spur 3) zeigt ein multiples Bandenmuster, das daraufhin deutet, dass an der Strep-Tactin®Superflow™ Agarose haftende Proteine durch das Waschen entfernt werden. Im zwanzigsten Milliliter der Waschfraktionen ist außer einer schwachen Bande bei ca. 60 kDa kein Protein nachweisbar. Die gereinigte L-VvPPOcs-2 (Abb. 11, Spur 5) zeigt eine sehr prominente Bande bei ca. 60 kDa und einige niedermolekulare Banden. Zusätzlich treten zwei höher molekulare Banden auf (ca. 73 kDa und 90 kDa), die wahrscheinlich aus *E. coli* stammen und unspezifisch an die Strep-Tactin®Superflow™ Agarose binden. Die Reinheit der L-VvPPOcs-2 beträgt für den Wildtyp und die beiden Muteine > 95 %.

Abb. 11 D zeigt einen Vergleich der *E. coli* Rohextrakte und des gereinigten L-VvPPOcs-2wt und der Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und L-VvPPOcs-2-F259G. Die Bandenmuster sind vergleichbar, was darauf hinweist, dass Expressionsstärke und Reinheit der gewonnenen L-VvPPOcs-2 reproduzierbar und vergleichbar sind.

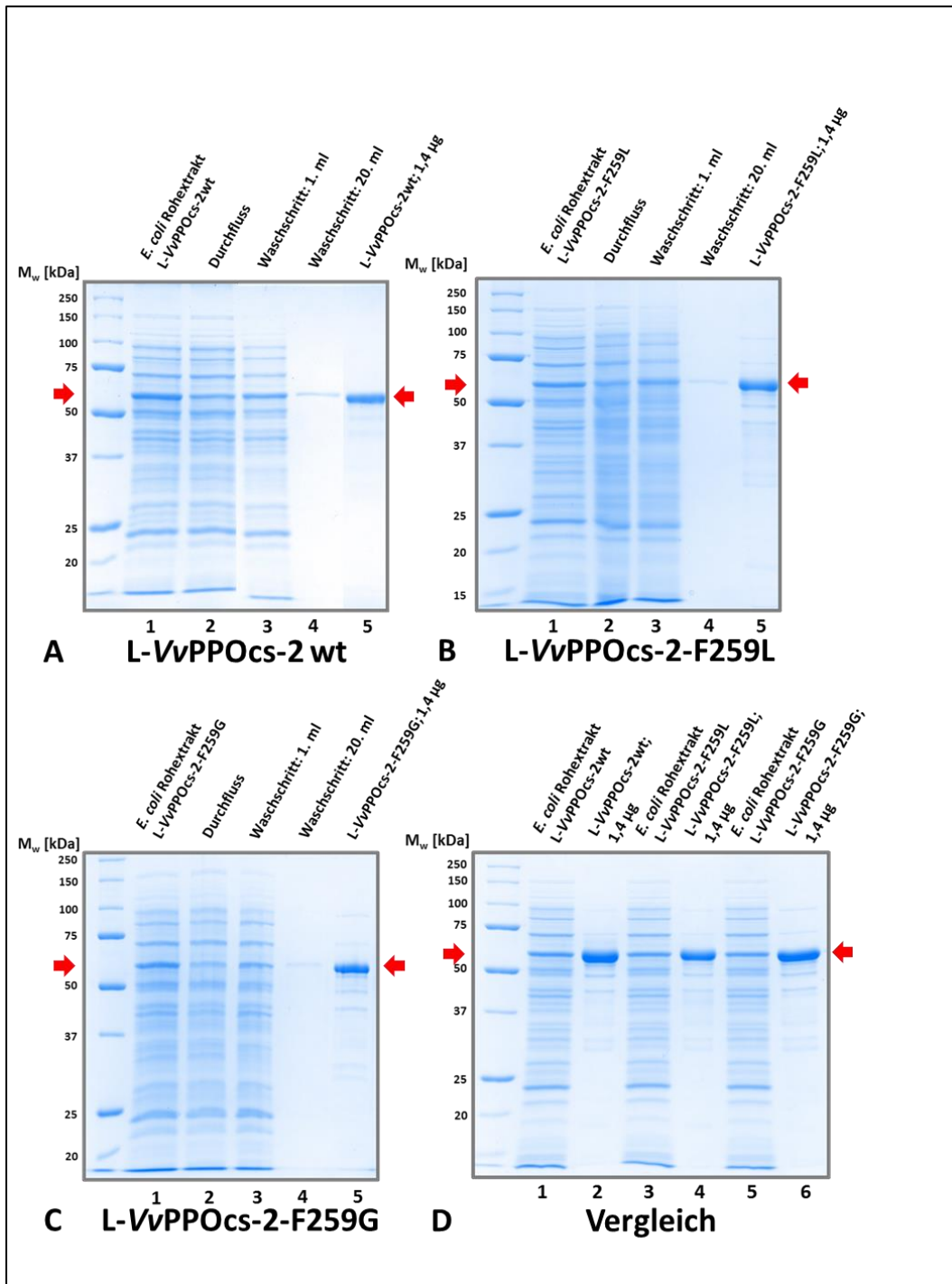


Abbildung 11: Analyse der Reinigung der in *E. coli* überexprimierten (A) L-VvPPOcs-2wt, (B) L-VvPPOcs-2-F259L und (C) L-VvPPOcs-2-F259G. 10 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). Die Bande bei ca. 60 kDa, die auf die L-VvPPOcs-2 hinweist, wurde mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. **A-C; Spur 1:** *E. coli* Rohextrakt. Die Bande bei ca. 60 kDa zeigt eine Überexpression der L-VvPPOcs-2 an. **Spur 2:** Durchfluss durch die Strep-Tactin®Superflow™ Agarose. Das Bandenmuster ähnelt Spur 1, hier ist jedoch die Bande bei ca. 60 kDa schwächer. Die L-VvPPOcs-2 hat an die Strep-Tactin® Bindestellen der Agarose gebunden. **Spur 3:** Beginn des Waschvorgangs. Proteine, die unspezifisch an die Agarose gebunden haben, werden ausgewaschen. **Spur 4:** Ende des Waschvorgangs. Es sind fast keine Banden sichtbar, was auf eine komplette Reinigung der Strep-Tactin®Superflow™ Agarose schließen lässt. **Spur 5:** Gereinigte Probe der L-VvPPOcs-2. Die Bande bei ca. 60 kDa ist stark ausgeprägt. Es treten nur vereinzelt schwache höher- und niedermolekulare Banden auf. **D:** Vergleich der *E. coli* Rohextrakte und der gereinigten L-VvPPOcs-2wt (Spur 1,2), -F259L (Spur 3,4) und -F259G (Spur 5,6). Expressionsstärke und Bandenmuster sind vergleichbar.

Die Konzentration der L-VvPPOcs-2 wurde mittels Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt (Kap. 2.2.3). Abb. 12 zeigt exemplarisch ein gemessenes Proteinspektrum des L-VvPPOcs-2wt nach der Reinigung und Konzentration. Es ergibt sich eine Proteinkonzentration von $3,6 \text{ mg/ml}$. Allerdings waren weder bei 340 nm noch bei $500 - 600 \text{ nm}$ Absorptionsmaxima erkennbar, für die ein $\text{O}_2^{2-} \rightarrow \text{Cu(II)}$ Charge Transfer Übergang an oxygenierten Typ-3-Kupferzentren ursächlich ist (Jolley et al., 1974; Himmelwright et al., 1980). Dies lässt vermuten, dass die gewonnene L-VvPPOcs-2 überwiegend in der *met*-Form vorlag (Jolley et al., 1974; Bubacco et al., 2000). Aus einem Liter Expressionskultur konnten ca. 6 mg L-VvPPOcs-2 isoliert werden.

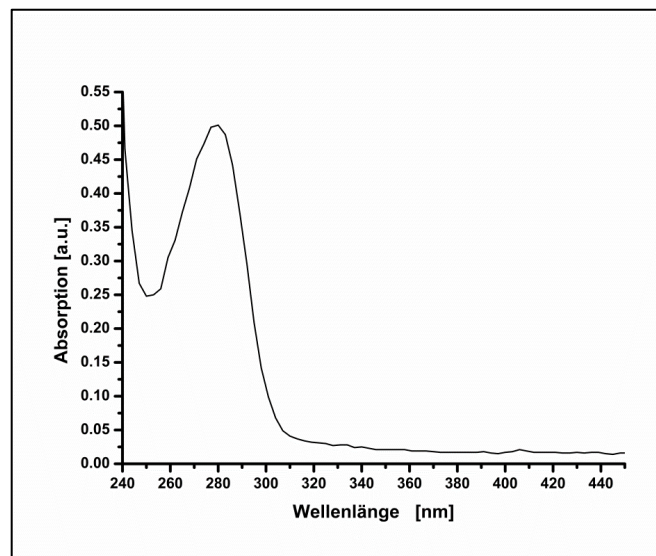


Abbildung 12: Absorptionsspektrum des konzentrierten L-VvPPOcs-2wt. Proteinspektrum des L-VvPPOcs-2wt nach der Reinigung aus *E. coli*. Das Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. Die A_{280} betrug $0,501$, die Weglänge 1 mm (Nanodrop-Spektrometer ND-100), was einer Proteinkonzentration von $3,6 \text{ mg/ml}$ entspricht. Die leichte Schulter bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ kann ein Hinweis auf geringe Rückstände von Nucleobasen sein.

3.1.2 Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Nachweis, dass es sich bei der prominenten Bande bei ca. 60 kDa um die L-VvPPOcs-2 handelt, wurde mittels Western Blot bereits während meiner Masterarbeit erbracht (Ludwig, 2014). Sowohl die L-VvPPOcs-2wt (Abb. 13 Spur 1) als auch die Muteine L-VvPPOcs-2-F259L (Abb. 13, Spur 2) und L-VvPPOcs-2-F259G (Abb. 13, Spur 3) werden auf Höhe von ca. 60 kDa mittels des Polyphenoloxidasenspezifischen Antikörpers detektiert (Abb. 13, rot umrandet). Zusätzlich wird eine der niedermolekularen Banden (ca. 45 kDa) angefärbt, was darauf schließen lässt, dass es sich hier um ein Fragment der L-VvPPOcs-2 handelt. Da das Epitop des Antigens nahe am N-Terminus der L-VvPPOcs-2 (Abb. 6) liegt, ist davon auszugehen, dass es sich um ein N-terminales Abbaufragment handelt. Die übrigen nieder- und höher molekularen Banden färben sich nicht an (Abb. 11 D, Spur: 2, 4, 6),

weswegen diese Banden wahrscheinlich durch Proteine aus *E. coli* hervorgerufen werden, die unspezifisch an die Strep-Tactin®Superflow™ Agarose binden.

Der Westen Blot bestätigt, dass es sich bei der prominenten Bande bei ca. 60 kDa um die L-VvPPOcs-2 handelt. Aus diesem Grund wird das Protein, das die 60 kDa-Bande hervorruft, im Folgenden als L-VvPPOcs-2 bezeichnet. Dies wurde im Folgenden mittels Massenspektrometrie bestätigt (Kap. 3.2).

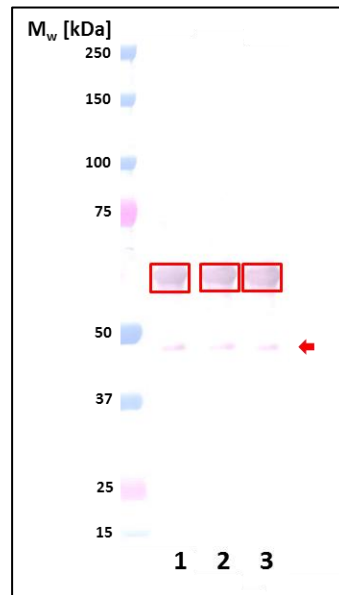


Abbildung 13: Western Blot-Analyse des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine L-VvPPOcs-2-F259L, -F259G. Primärantikörper: Anti-PPO, Sekundärantikörper: Anti-Rabbit (alkalische Phosphatase gekoppelt). Marker: Precision Protein Dual Xtra Standard, prestained (Biorad, München). **Spur 1:** L-VvPPOcs-2wt, **Spur 2:** L-VvPPOcs-2-F259L, **Spur 3:** L-VvPPOcs-2-F259G. Aufgetragen sind je ca. 0,7 µg Protein. Die prominente Bande bei ca. 60 kDa (rot umrandet) wurde als L-VvPPOcs-2 identifiziert. Die Bande bei ca. 45 kDa ist vermutlich ein N-terminales Abbaufragment der L-VvPPOcs-2 (roter Pfeil). Modifiziert aus Ludwig, 2014.

3.1.3. Aktivitätsnachweis

Der Nachweis der Diphenolase-Aktivität der L-VvPPOcs-2 wurde ca. 24 h nach der Reinigung mittels eines Aktivitätsschnelltests durchgeführt (Kap. 2.2.8.1). Als Substrat diente 10 mM 4-MC und als Aktivatoren 1,5 mM SDS bzw. ein saurer pH-Wert (pH 3 und pH 4,5). In Abb. 14 sind exemplarisch ein Aktivitätstest des L-VvPPOcs-2wt und der beiden Muteine –F259L und –F259G kurz nach Beginn der Reaktion und nach einer Reaktionsdauer von 2 h zusammengefasst. In jedem Ansatz befindet sich die gleiche Enzymmenge (2,6 µg). Die Negativkontrolle enthält keine L-VvPPOcs-2 und zeigt über den gesamten Versuchszeitraum keinen Farbumschlag (Abb. 14 B). Anhand der Farbintensitäten können die drei Konstrukte qualitativ miteinander verglichen werden. Die Reaktionslösung, in der der L-VvPPOcs-2wt enthalten ist, zeigte den schnellsten und intensivsten Farbumschlag (Abb. 14). Bei pH 4,5 und pH 6 und 1,5 mM SDS und pH 3 ohne SDS war ein Umsatz des 4-MC (Farbumschlag) durch den L-VvPPOcs-2wt unmittelbar nach Reaktionsstart zu beobachten. Zeitlich verzögert (ca. 3 min) war

der Substratumsatz auch durch die L-VvPPOcs-2-F259L nachweisbar (Abb. 14 A-B). Das Mutein L-VvPPOcs-2-F259G setzt das Substrat 4-MC am langsamsten und schwächsten um (Abb. 14 B). Eine leichte Färbung war bei pH 4,5 ohne SDS-Zusatz für die L-VvPPOcs-2wt nach ca. 10 min sichtbar. Die Muteine zeigten unter diesen Bedingungen erst nach 60 min (L-VvPPOcs-2-F259L) eine schwache bzw. nach 120 min eine sehr schwache (L-VvPPOcs-2-F259G) Aktivität. Das saure Milieu reicht aus, um eine Aktivierung der L-VvPPOcs-2 zu erreichen. Bei pH 6 ohne Zusatz von SDS zeigt sich keine Aktivität. Auffällig ist, dass beide Muteine bei pH 3 nicht aktiv sind, während der L-VvPPOcs-2wt durch pH 3 aktiviert werden kann. Sowohl Wildtyp als auch Muteine zeigen trotz Vorhandenseins zweier Aktivatoren (pH 3 und 1,5 mM SDS) keine Aktivität (Abb. 14). Stattdessen war im Reaktionsgefäß ein Präzipitat sichtbar, das im Verlauf dieser Arbeit weiter analysiert wurde (Kap. 3.5.2). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G 24 h nach der Reinigung aktiv waren. Der L-VvPPOcs-2wt zeigt beim Umsatz von 4-MC die stärkste Diphenolase-Aktivität, während das Mutein L-VvPPOcs-2-F259L 4-MC etwas schwächer und das Mutein -F259G auffällig schwächer umsetzen. Sowohl ein saurer pH (pH 3 und pH 4,5) als auch SDS aktivieren die latente L-VvPPOcs-2.

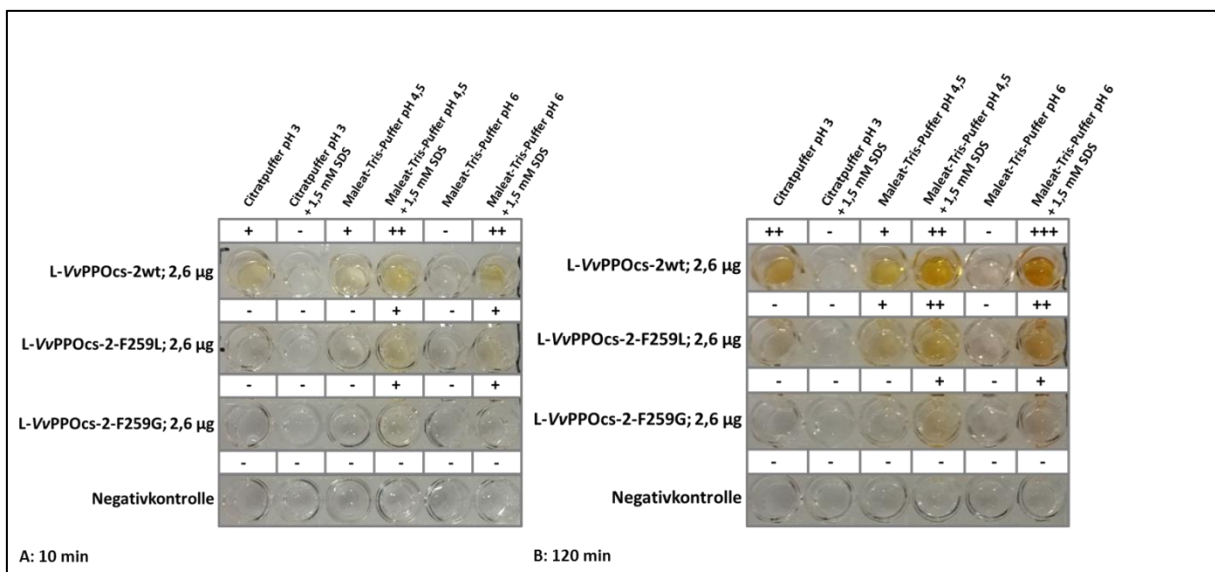


Abbildung 14: Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G. Aktivitätsschnelltest. Substrat: 10 mM 4-MC; Beobachtung bei Raumtemperatur. **A:** Aktivitätsschnelltest 10 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. Aktivierung des L-VvPPOcs-2wt durch SDS und sauren pH kurz nach Reaktionsstart. Die Muteine setzten 4-MC deutlich schwächer und langsamer um. Bei pH 3 zeigen sie keine Aktivität. **B:** Intensive Färbung nach 120 min in Ansätzen mit Aktivatoren. Nach 120 min zeigt auch die L-VvPPOcs-2-F259L bei pH 4,5 ohne SDS-Zusatz Aktivität. In den Ansätzen, in denen schon in A Aktivität nachweisbar war, hat sich die Färbung intensiviert. Die Negativkontrolle zeigt über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.1.4 Circular dichroismus-Spektroskopie

Um zu prüfen, ob Unterschiede in der Aktivität der L-VvPPOcs-2 durch Faltungsunterschiede oder -fehler begründet sind, wurden CD-Spektren der drei PPO-Konstrukte aufgenommen, die eine Analyse der vorhandenen Sekundärstrukturelemente erlauben.

Die L-VvPPOcs-2 (0,2 mg/ml) lag in 20 mM Phosphatpuffer vor. Die Ergebnisse ergeben sich nach Korrektur gegen das Pufferspektrum und Mittelung von je drei aufgezeichneten Spektren im Bereich von 190 bis 260 nm. Um die Form der Spektren vergleichbar zu machen, wurden sie auf das CD-Spektrum des L-VvPPOcs-2wt normiert (Abb. 15).

Die Spektrenform des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine ist sehr ähnlich, weshalb sich vermuten lässt, dass sich die Anteile an Sekundärstrukturelementen im L-VvPPOcs-2wt und den Muteinen -F259L und -F259G nicht oder nur geringfügig voneinander unterscheiden. Die Sekundärfaltung des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine ist im Wesentlichen als gleich anzunehmen.

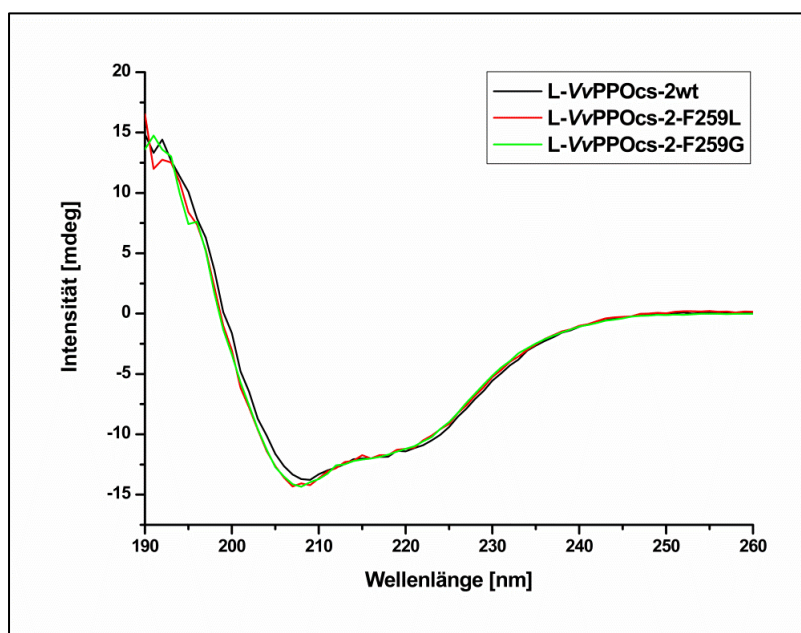


Abbildung 15: CD-Spektren des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und L-VvPPOcs-2-F259G, normiert. Aufgenommen im Wellenlängenbereich $\lambda = 190 - 260$ nm, gegen das Pufferspektrum korrigiert und aus je drei Messungen gemittelt. Die Spektren zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem L-VvPPOcs-2wt und den Muteinen -F259L und -F259G. schwarz: L-VvPPOcs-2wt, rot: L-VvPPOcs-2-F259L, grün: L-VvPPOcs-2-F259G. Modifiziert aus Ludwig, 2014.

3.2 Aktivierung durch Proteolyse

Eine Möglichkeit latente pflanzliche PPOs zu aktivieren ist die proteolytische Abspaltung der C-terminalen Domäne (Marusek et al., 2006; Boeckx et al., 2015). Da bislang keine Protease bekannt ist, die die L-VvPPOcs-2 aktiviert, wurden unterschiedliche Proteasen ausgewählt und bezüglich Hydrolyse und Aktivierung der L-VvPPOcs-2 untersucht (Kap. 2.2.7). Alle Proteasen wurden im Konzentrationsverhältnis 1 : 10 (Protease : L-VvPPOcs-2) eingesetzt (Ausnahme: Calpain-1 (Herstellervorschrift im Verhältnis 1 : 3 bzw. 1 : 5)). Die Ansätze wurden für 30 min bei 25 °C inkubiert und nach festgelegten Zeitpunkten t (t = 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h) Proben entnommen, denaturiert (Kap. 2.2.7) und mittels eines 12,5 %igem SDS-Gel analysiert. Die aus der Proteolyse der L-VvPPOcs-2 mit Trypsin, Thermolysin, Proteinase K und Chymotrypsin entstehenden Spaltfragmente (im Folgenden auch als Spaltpeptide bezeichnet) wurden zur massenspektrometrischen Analyse an das IMB, Mainz gegeben (Kap. 2.2.12). Ein Aktivitätsschnelltest gab Aufschluss über die Aktivierung der L-VvPPOcs-2 nach Proteolyse mit der jeweiligen Protease durch Umsetzung von 4-MC. Ziel der Experimente war es, eine Protease zu identifizieren, die die L-VvPPOcs-2 im Linkerbereich spaltet und aktiviert.

Erste Vorversuche zur proteolytischen Aktivierung der L-VvPPOcs-2 wurden durch die von mir eng betreuten Studenten [REDACTED] und [REDACTED] im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten (Panagos, 2016; Derenbach, 2016) durchgeführt. Die Auswahl der Proteasen und das experimentelle Design erfolgten durch mich im Rahmen der Betreuung. Abbildungen, die aus den Bachelorarbeiten übernommen wurden, sind gesondert gekennzeichnet. Im Folgenden wird am Beispiel der Proteolyse durch Trypsin die prinzipielle Vorgehensweise der Auswertung der massenspektrometrischen Daten erläutert.

3.2.1 Proteolyse durch Trypsin

Die unbehandelte L-VvPPOcs-2 zeigt eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa (Abb. 16 A-C: Spur 1; Kap. 3.1.1). Aus der Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch Trypsin entstanden nach kurzer Reaktionszeit (15 min) vier Spaltpeptide, deren Massen zu der Größe der N-terminalen Domäne (36 kDa und 34 kDa) bzw. der C-terminalen Domäne (17 kDa und 15 kDa) passen (Abb. 16 A-C: Spur 2-8). Die deutlichste Bande liegt auf Höhe von ca. 34 kDa (grüner Rahmen) und auch die 17 kDa-Bande (violetter Rahmen) ist stark angefärbt. Da die Intensität der 36 kDa-Bande (blauer Rahmen) abnimmt, ist davon auszugehen, dass die 36 kDa schweren Spaltpeptide im Laufe des Experimentes weiter abgebaut wurden. Nach 1 h ist eine schwach angefärbte Bande auf Höhe von 13 kDa erkennbar. Bereits nach 15 min ist die Bande auf Höhe von 60 kDa kaum sichtbar, weshalb davon auszugehen ist, dass die L-VvPPOcs-2 vollständig in die Spaltpeptide fragmentiert wurde. Nach einer Versuchsdauer von 6 h sind alle Banden deutlich schwächer angefärbt, was den Rückschluss auf eine fortgeschrittene

Proteolyse zulässt (Abb. 16 A-C, Spur 8). Geringe Unterschiede in der angezeigten molekularen Masse der Banden nach Spaltung des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine, sind wahrscheinlich auf Artefakte beim Lauf der SDS-PAGE zurückzuführen (Abb. 16, A-C). Der Vergleich der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine (nach $t = 30$ min) auf einem SDS-Gel zeigt, dass die Banden, die durch die Spaltpeptide hervorgerufen werden, auf einer Höhe liegen (Abb. 16, D).

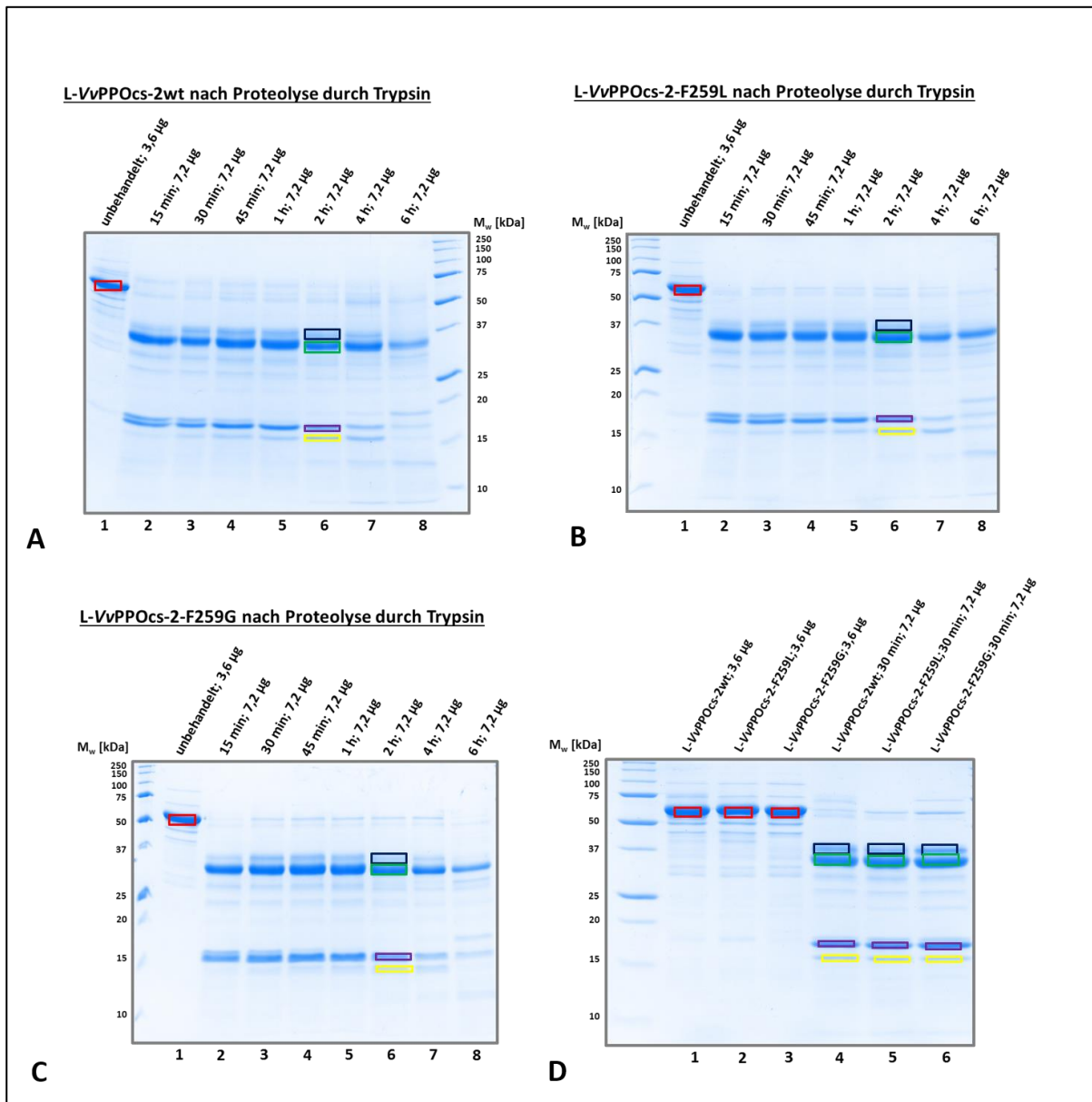


Abbildung 16: Analyse der Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch Trypsin. 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **A-C; Spur 1:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt den L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C) an. **Spur 2-8:** Proteolytisch gespaltener L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C). Es entstehen vier Spaltpeptide mit einer ungefähren Größe von ca. 36 kDa (blauer Rahmen), ca. 34 kDa (grüner Rahmen), ca. 17 kDa (violetter Rahmen), ca. 15 kDa (gelber Rahmen). Nach 6 h (Spur 8) sind alle Banden weniger intensiv angefärbt. Lediglich die 34 kDa Bande ist noch deutlich sichtbar. **D:** Vergleich der Größe der Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach 30-minütiger Proteolyse mit Trypsin. Die Spaltpeptide der Muteine entsprechen von der Größe denen des L-VvPPOcs-2wt. Geringe Unterschiede in den Größen in A-C sind folglich auf Artefakte der Gelelektrophorese zurückzuführen.

Schnittstellenanalyse durch Massenspektrometrie

Die entstandenen Spaltpeptide sollen im Folgenden den Domänen (N-terminale Domäne, Linkerbereich, C-terminale Domäne) der L-VvPPOcs-2 zugeordnet werden. Da sowohl bei der L-VvPPOcs-2wt als auch bei den beiden Muteinen -F259L und -F259G Peptide identischer Größe entstanden sind, wurden lediglich die Banden des L-VvPPOcs-2wt aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse an das IMB Mainz gegeben. Diese wurden mechanisch zerkleinert, mit Trypsin verdaut und über eine uHPLC in das Massenspektrometer eingelassen (Kap. 2.2.12). Die Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt wurde dem IMB zur Verfügung gestellt (Vorlagesequenz). Die Auswertung der Messsignale erfolgt am IMB mit der Software *MaxQuant* (Kap. 2.2.12). Zur weiteren Interpretation der Messergebnisse wird ein Alignment der detektierten Aminosäuresequenzen mit der Vorlagesequenz (Abb. 17), ein Histogramm der berechneten Messintensitäten der detektierten Peptide (Abb. 20) und ein Histogramm, welches die aufsummierten Messintensitäten der Peptide in Bezug zum Molekulargewicht ihrer Position in der Vorlagesequenz setzt (Abb. 18), ausgegeben.

Es ist herauszustellen, dass die Schnittstellen der eingesetzten Protease in der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt mit dieser Methode nicht auf eine Aminosäureposition genau bestimmt werden können. Es handelt sich nicht um einen Edman-Abbau, der die genaue Identifikation von Aminosäuren am C- und N-terminalen Ende eines Peptids zulassen würde. Dieser ist sehr kostenintensiv und fordert viel Probenmaterial.

Vielmehr lässt sich mit dem hier entwickelten Protokoll eine ungefähre Eingrenzung der Schnittstellen vornehmen. Die Spaltpeptide können so der N- oder C-terminalen Domäne oder dem Linkerbereich zugeordnet werden, was der Fragestellung dieser Arbeit genügt.

Die Probe des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt dient als Positivkontrolle. Ein Protein gilt als eindeutig identifiziert, wenn mindestens zwei Peptide dieses Proteins nachgewiesen werden konnten (persönliche Kommunikation: ██████████, IMB Mainz).

Im Laufe der Dissertation wurde das Protokoll zur Auswertung am IMB Mainz modifiziert. Zusätzlich zur Hydrolyse der SDS-Gelbande durch Trypsin wurde an einer identischen Bande eine saure Hydrolyse mit 3 M HCl durchgeführt, wodurch die Anzahl der identifizierten Spaltpeptide erhöht und damit die Genauigkeit der bestimmten Schnittstelle verbessert werden konnte. Allerdings erhöht dies die Schwierigkeit der Datenauswertung bei Analyseproben nach Proteolyse durch unspezifische Proteasen, da eine Vielzahl von Schnittstellen abgeglichen werden müssen. Wenn sich die Messintensität der vielen Analysepeptide nicht stark unterscheidet, ist eine genaue Eingrenzung schwierig. Diese Methode wurde bei Bestimmung der Schnittstellen, die durch Hydrolyse durch Proteinase K entstanden sind, angewandt. Der unbehandelte L-VvPPOcs-2wt wurde nach beiden Vorgehensweisen identifiziert.

Im Folgenden wird am Beispiel des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt die Auswertung der massenspektrometrischen Daten erläutert. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Spaltpeptide der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Trypsin analysiert.

Unbehandelter L-VvPPOcs-2wt

Die Probe des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt wurde sowohl nach Trypsin-Verdau der SDS-Gelbande als auch nach saurer Hydrolyse der Bande im Massenspektrometer analysiert.

Durch Kombination der beiden Verfahren konnten 550 Peptide, die sich über den gesamten Sequenzbereich verteilen, identifiziert werden, weshalb der L-VvPPOcs-2wt eindeutig nachgewiesen gilt (Abb. 17). Insgesamt wurden 94,8 % Sequenzidentität der detektierten Sequenz zur eingelesenen Aminosäuresequenz (Vorlagesequenz) ermittelt. Dass keine 100 %ige Kongruenz erreicht wurde, ist darin begründet, dass nicht alle Peptide aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften ionisiert und/oder in den Massenanalysator eintreten konnten. Diese Peptide sind im Alignment als *Gaps* (-) gekennzeichnet (Abb. 17). Da allerdings sowohl N- als auch C-terminal der *Gaps* Peptide in hoher Intensität detektiert wurden (Abb. 18), ist davon auszugehen, dass die nicht detektierten Peptide in der SDS-Gelbande vorhanden, aber mit der angewandten Methode nicht analysiert werden konnten.

L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 550 aligned peptides and 94.8% sequence coverage:	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	1 WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK 80 WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTN-CPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	81 YKKAIELQKALPDDDPFSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY 160 YKKAIELQKALPDDDPFSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNER----LIDDPFALPY
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	161 WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTETIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY 240 WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTETIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	241 RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPDIFFGHHANVDRMWNWKTIGGKNRKFDTDWDLDA 320 RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPDIFFGHHANVDRM-----TIGGKNRKFDTDWDLDA
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	321 TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV 400 TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLKNTK-----SSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	401 IRVEVPRPKKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFKFDVYINDEYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKKTNLNR 480 IRVEVPRPKK----KEKENEVEVLLIKGIELDRENFKFDVYINDEYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHK-----TNLR
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	481 LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD 523 LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD

Abbildung 17: Alignment der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt und den in der Massenspektrometrie detektierten Peptiden des L-VvPPOcs-2wt. Obere Zeile: Vorlagesequenz, untere Zeile: detektierte Sequenz. Nicht detektierte Peptide (Sequenzabschnitte) sind durch Gaps „-“ dargestellt. Die Sequenzidentität beträgt 94,8 %. Es wurden Peptide von C- bis N-terminal detektiert. Der L-VvPPOcs-2wt liegt vollständig vor.

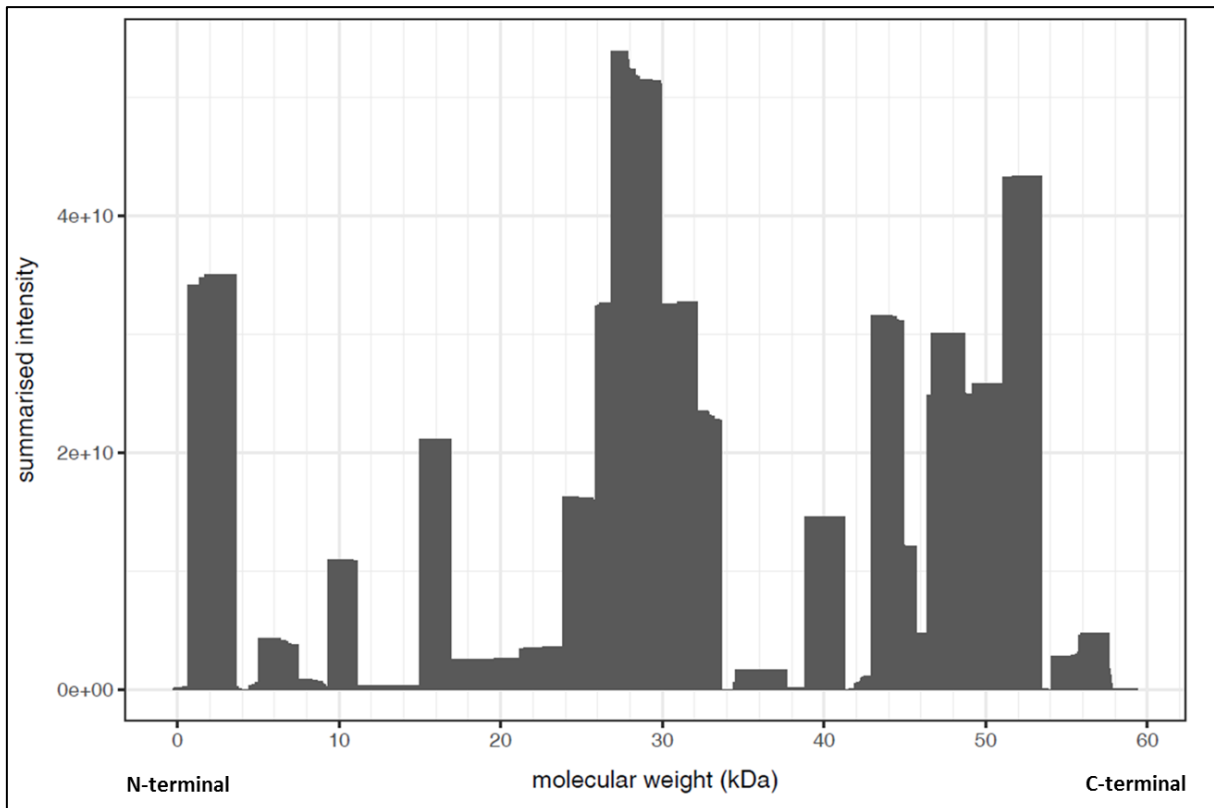


Abbildung 18: Histogramm der aufsummierten Messintensitäten über das Molekulargewicht des L-VvPPOcs-2wt. Die Lage der Intensitätsbalken auf der Abszisse zeigt die Position im Molekulargewicht des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt (Vorlagesequenz) von N- nach C-terminal. Über den gesamten Molekulargewichtsbereich sind Spaltpeptide detektiert worden. Die 60 kDa-Bande zeigt folglich den L-VvPPOcs-2wt.

Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin

Trypsin spaltet den L-VvPPOcs-2wt in vier Spaltpeptide (Abb. 19 A, Spur 2) der Größe von ca. 36 kDa (blauer Rahmen), ca. 34 kDa (grüner Rahmen), ca. 17 kDa (violetter Rahmen) und ca. 15 kDa (gelber Rahmen), die am IMB Mainz massenspektrometrisch untersucht wurden. Das SDS-Gel ist der Bachelorarbeit [REDACTED] (Panagos, 2016) entnommen und zeigt die SDS-Gelbanden, die am IMB analysiert wurden (Abb. 19).

Jede SDS-Gelbande wurde im Folgenden einzeln untersucht. Dafür wurden die zur Verfügung gestellten Diagramme (Abb. 20), die Masse der Bande auf dem SDS-Gel (Abb. 19), das Webtool *ProtParam* zur Berechnung von Peptidmassen, und ein Schema, das alle theoretischen Schnittstellen des Trypsins in der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt visualisiert (Anhang C4), verwendet.

Die Histogramme, die den Zusammenhang zwischen Messintensität, Position in der Vorlagesequenz des L-VvPPOcs-2wt und Molekulargewicht aufzeigen, unterstützen die Interpretation. Sie veranschaulichen nochmals die Größe und Lage der Spaltpeptide. Die Ergebnisse können jedoch auch ohne diese Darstellung gewonnen werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind diese Histogramme deswegen in Anhang D zu finden.

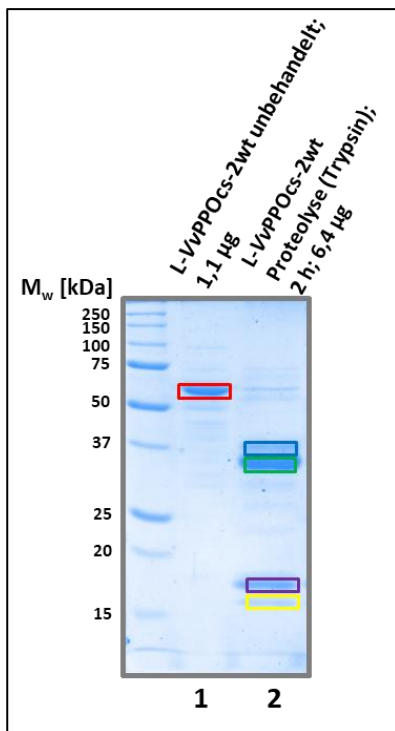


Abbildung 19: Spaltpeptide des L-VvPPOcs2-wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Trypsin. Modifiziert nach Panagos, 2016.

Zunächst wurde der Bereich der höchsten Messsignale innerhalb der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt bestimmt. Dies geschah mittels des Histogramms, das die Messintensität für jedes einzelne Spaltfragment darstellt (Abb. 20-23). Unter Berücksichtigung der aus dem SDS-Gel bekannten Masse des zu analysierenden Spaltpeptids (z.B. 36 kDa, Abb. 19, blauer Rahmen) und der theoretisch möglichen Schnittstellen des Trypsins in der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt (Anhang C4), wurde der zuvor eingegrenzte Peptidsequenzbereich (höchste Messintensitäten) angepasst. Somit kann der Sequenzabschnitt, aus dem das Spaltpeptid stammt, eingegrenzt werden. Der rote Rahmen (Abb. 20-23) zeigt den Bereich innerhalb der Sequenz der L-VvPPOcs-2, der nach den eben beschriebenen Kriterien eingegrenzt wurde. Da sich nicht alle technisch entstandenen Spaltfragmente (methodische Proteolyse der SDS-Gelbande mit Trypsin) massenspektrometrisch nachweisen lassen (Kap. 2.2.12), ist die Sequenz in den Histogrammen nicht vollständig abgedeckt, so dass der rote Rahmen einer ersten Orientierung dient. Die genaueren Angaben

finden sich im beschreibenden Text. Es ist jedoch festzuhalten, dass lediglich eine Approximation an die tatsächliche Schnittstelle möglich ist. Durch die hohe Sensitivität der Methode werden auch Peptide nachgewiesen, die sich nur in der Lauffront des Peptidgemisches befanden und somit auf dem SDS-Gel „Spuren“ hinterlassen haben. Diese müssen nicht dem Spaltpeptid zugehörig sein. Auch kann die Masse auf dem SDS-Gel nur ungefähr bestimmt werden, was die Auflösung des Verfahrens begrenzt. Die gewonnen Aussagen sind jedoch ausreichend, um die Spaltpeptide der N- bzw. C-terminalen Domäne zuordnen zu können. Es lässt sich folglich sagen, ob eine Protease den L-VvPPOcs-2wt im Linkerbereich schneidet, welche Spaltpeptide das katalytische Zentrum enthalten und somit potentielle enzymatische Aktivität aufweisen können.

Abb. 20 stellt die Verteilung der Messintensitäten der 36 kDa-Bande (Abb. 19, Spur 2, blauer Rahmen) dar. Es zeigt sich deutlich, dass die höchsten Messsignale im Sequenzbereich, der die N-terminale Domäne umfasst, gemessen wurden (Abb. 20, roter Rahmen). Auffällig ist, dass keine Peptide detektiert wurden, die aus den Aminosäuren (AS) 1-8 aufgebaut sind und in Proben des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt nachgewiesen werden konnten (Abb. 18). Es ist folglich davon auszugehen, dass die N-terminalen Aminosäuren durch Trypsin abgespaltet wurden. Dadurch wurde auch der Strep-Tag® entfernt, der N-terminal am L-VvPPOcs-2wt exprimiert wurde, was es für weitere Experimente nicht möglich machte, N-terminale Spaltpeptide über Affinitätschromatographie zu isolieren. Die

Messintensitäten der Peptide, die AS 345-523 enthalten, sind im Vergleich zu den Messintensitäten der entsprechenden Peptide der unbehandelten Probe sehr gering. Die Aminosäuren 31-344 haben eine errechnete molekulare Masse von 35,6 kDa, was ungefähr der Masse der SDS-Gelbande entspricht (Abb. 19, Spur 2, blauer Rahmen). Das größte Spaltpeptid, das aus der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Trypsin entsteht, umfasst folglich näherungsweise die AS 31-344 und beinhaltet einen großen Teil der N-terminalen Domäne. Es könnte somit enzymatisch aktiv sein.

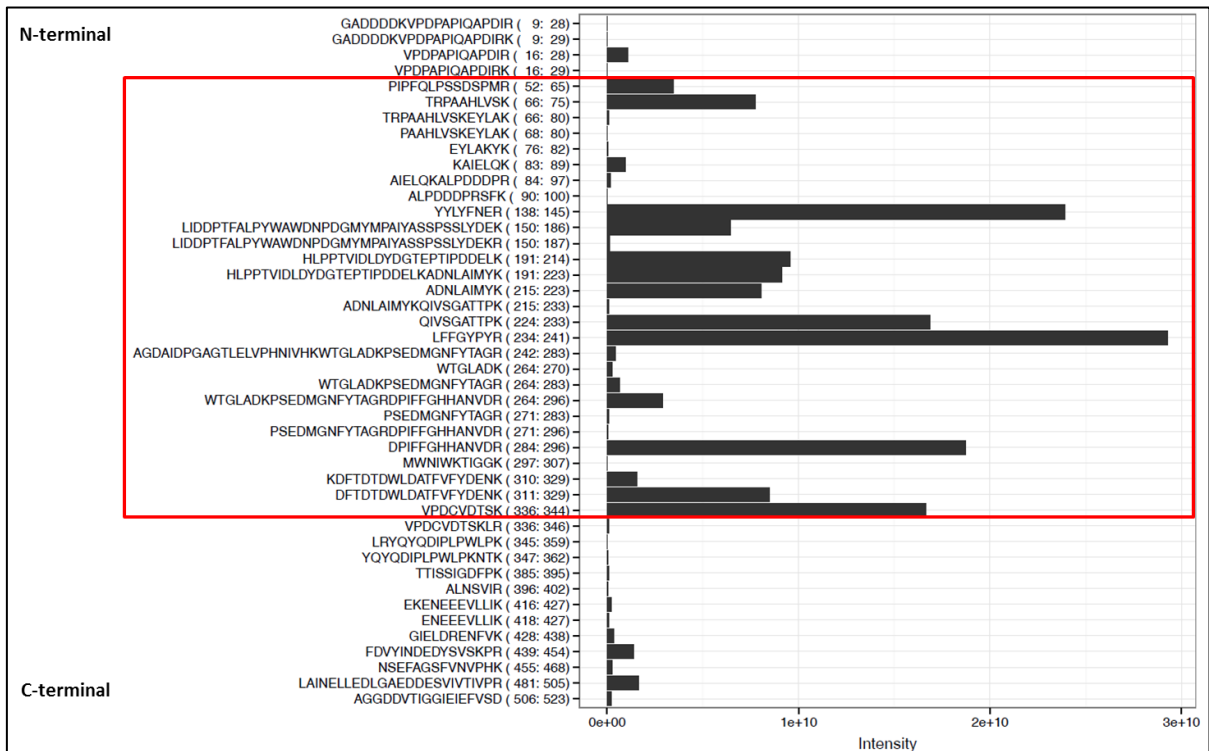


Abbildung 20: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (36 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung (roter Kasten) liegen im Bereich der N-terminalen Domäne. Die Schnittstellen des Trypsins liegen näherungsweise hinter AS 30 und AS 344. Die Masse des Spaltpeptides (AS 31-344) beträgt 35,6 kDa. Die analysierte Bande könnte damit katalytisch aktiv sein.

Derselben Methodik folgend werden die weiteren Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt analysiert. Das Molekulargewicht des Peptids, das die Bande bei ca. 34 kDa (Abb. 19, Spur 2 grüner Rahmen) hervorruft, unterscheidet sich nur um ca. 2 kDa von der zuvor analysierten Bande (Abb. 19, Spur 2, blauer Rahmen). Die Darstellung der Messintensitäten und das Alignment zeigen, dass auch hier die meisten Peptide im Bereich der N-terminalen Domäne detektiert wurden (Abb. 21, roter Rahmen). Die Schnittstellen liegen näherungsweise hinter AS 51 und AS 344. Die mit *ProtParam* errechnete molekulare Masse des Peptids liegt bei 33,4 kDa und stimmt damit fast mit der geschätzten Masse der SDS-Gelbande von 34 kDa überein. Auch dieses Spaltpeptid könnte enzymatisch aktiv sein.

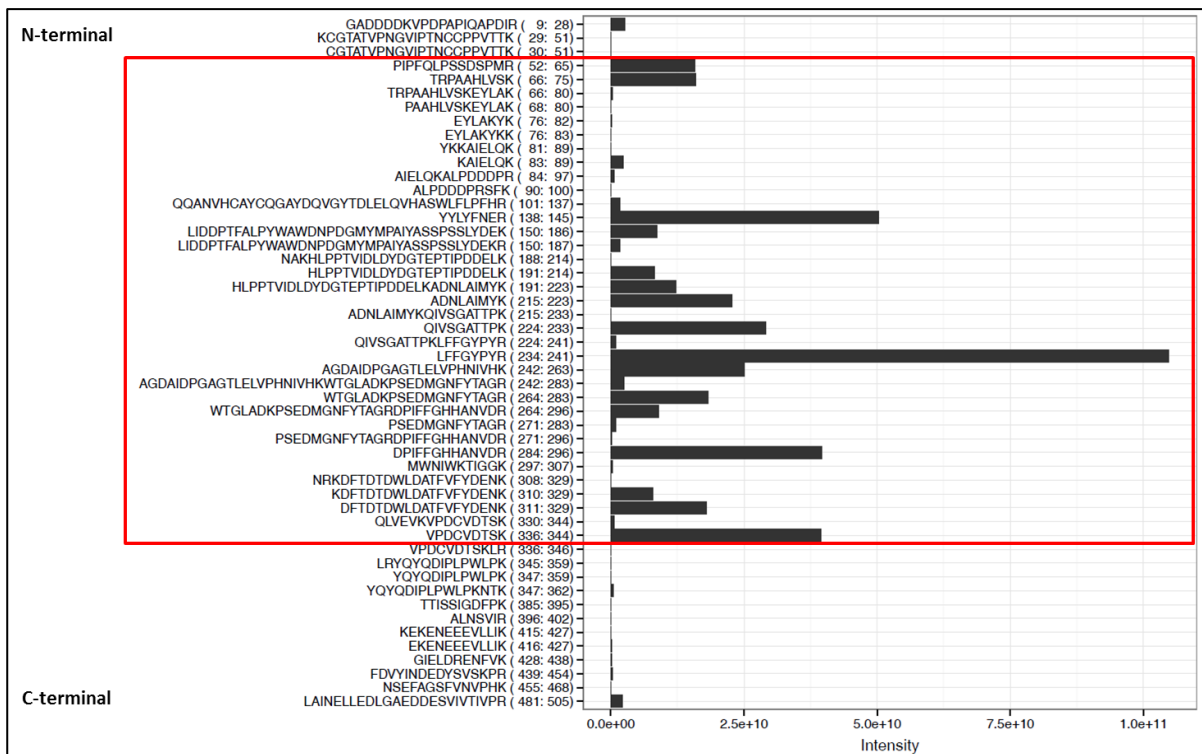


Abbildung 21: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (34 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne. Die Schnittstellen des Trypsins liegen näherungsweise hinter AS 51 und AS 344. Die Masse des Spaltpeptides (AS 52-344) beträgt 33,4 kDa. Die analysierte Bande könnte damit ebenfalls katalytisch aktiv sein.

Das Spaltpeptid, das überwiegend die Bande auf Höhe von ca. 17 kDa hervorruft (Abb. 19, Spur 2, violetter Rahmen), besteht aus Peptiden aus dem Bereich der C-terminalen Domäne und Teilen (36 AS) des Linkerbereiches. Das Peptid umfasst die AS 365-523 und hat damit eine berechnete Größe von 17,5 kDa (Abb. 22).

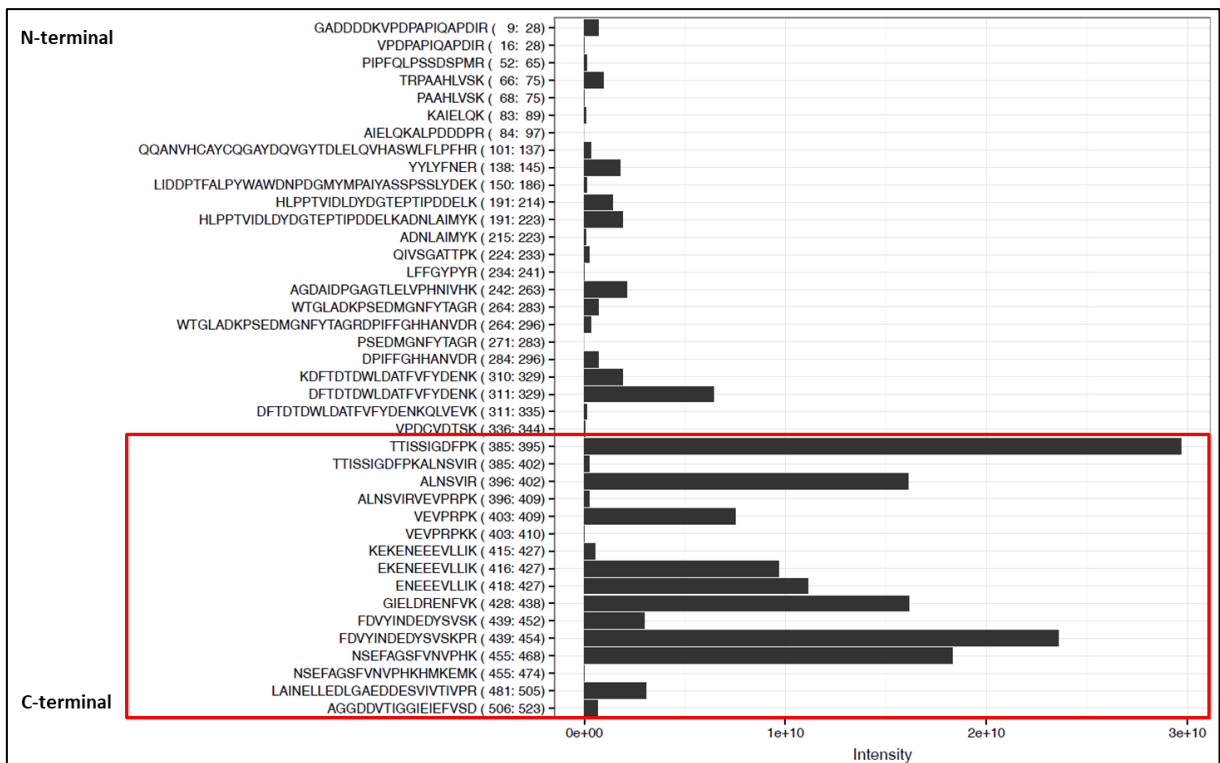


Abbildung 22: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptids (17 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der C-terminalen Domäne. Die Schnittstelle des Trypsins liegen näherungsweise hinter AS 364. Die Masse des Spaltpeptids (AS 365-523) beträgt 33,4 kDa.

Das kleinste analysierte Spaltpeptid hat eine Größe von ca. 15 kDa (Abb. 19, Spur 2, violetter Rahmen). Es umfasst die Aminosäuren AS 385-523 des L-VvPPOcs-2wt und hat damit eine errechnete Größe von 15,6 kDa. Es besteht aus der C-terminalen Domäne und 15 AS des 51 AS umfassenden Linkerbereiches (Abb. 23).



Abbildung 23: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptids (15 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der C-terminalen Domäne. Die Schnittstelle des Trypsins liegt näherungsweise hinter AS 384. Die Masse des Spaltpeptids (AS 385-523) beträgt 15,6 kDa.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die proteolytische Schnittstelle der Serinprotease Trypsin kurz vor dem Linkerbereich des L-VvPPOcs-2wt liegt. Sowohl das ca. 36 als auch das ca. 34 kDa große Peptid könnten katalytisch aktiv sein, da sie das katalytische Zentrum und die überwiegenden Bereiche der N-terminalen Domäne enthalten.

Aktivitätsschnelltest

Anhand eines Aktivitätsschnelltestes (Kap. 3.1.3) wurde der Umsatz von 10 mM 4-MC durch die proteolytierte L-VvPPOcs-2 überprüft.

Als Puffer dienten 50 mM Maleat-Tris Puffer pH 6. In diesem pH Bereich ist die L-VvPPOcs-2 ohne Aktivator nicht aktiv (Kap. 3.1.3) und ein Substratumsatz folglich auf die Protease als Aktivator zurückzuführen. Ein Farbumschlag des transparenten Reaktionsansatzes zeigt einen Umsatz von 4-MC an (Kap. 3.1.3).

Bereits 15 min nach Reaktionsstart zeigt sich eine deutliche gelbe Färbung der Reaktionslösung des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine (Abb. 24 A), die nach 120 min Reaktionszeit gelb-bräunlich erscheint (Abb. 24 B). Sowohl der L-VvPPOcs-2wt als auch die Muteine -F259L und -F259G werden durch Trypsin aktiviert und zeigen in der Folge Diphenolase-Aktivität. Die Intensität der Färbung der Reaktionslösung scheint im Ansatz der Mutante L-VvPPOcs-2-F259L ähnlich zur Intensität des Ansatzes des

L-VvPPOcs-2wt. Der Substratumsatz der Mutante L-VvPPOcs-2-F259G scheint hingegen etwas gering, jedoch aber deutlich stärker als nach Aktivierung durch SDS (Abb. 14).

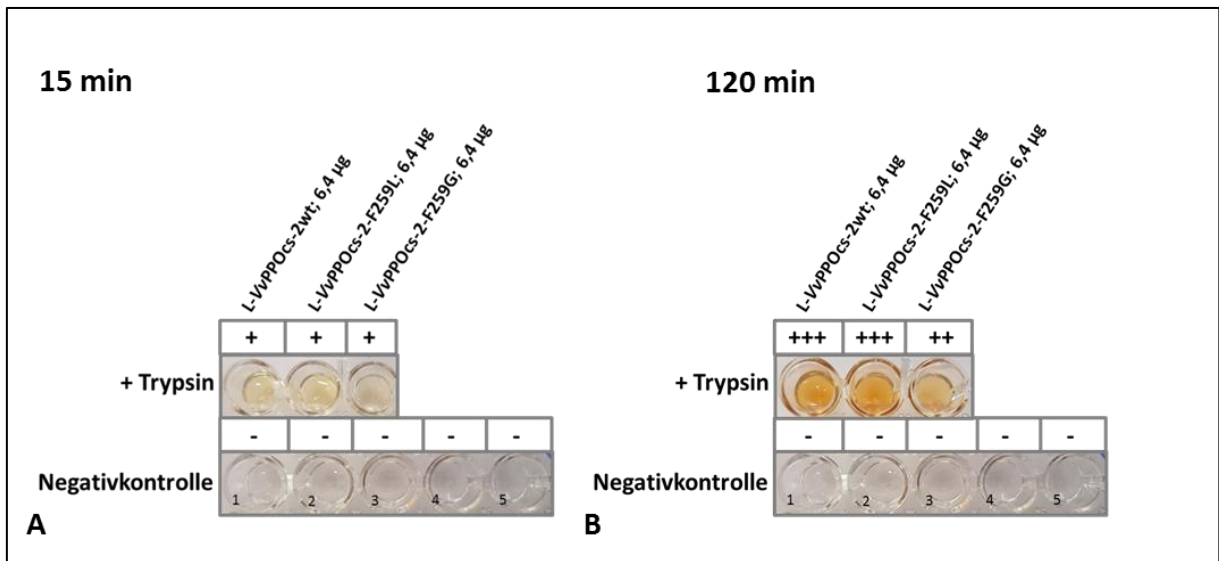


Abbildung 24: Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Trypsin. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **A:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. Sowohl beim L-VvPPOcs-2wt als auch in den Ansätzen der Muteine zeigt sich eine leichte Färbung. **B:** Nach 120 min zeigen die Ansätze des L-VvPPOcs-2wt und -F259L eine intensive Färbung. Im Ansatz des Muteins -F259G ist eine deutliche Färbung nachweisbar. Die Negativkontrollen zeigen über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg Trypsin. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.2 Proteolyse durch Proteinase K

Proteinase K hydrolysiert Proteine nach allen aliphatischen und aromatischen Aminosäuren und wird daher auch als Breitbandprotease bezeichnet. Die unbehandelte L-VvPPOcs-2 ist als Kontrollprobe aufgetragen und ruft eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa hervor (Abb. 25 A-C, Spur 1). Bereits 15 min nach Start der Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch Proteinase K ist die Proteolyse vollständig (60 kDa-Bande nicht sichtbar, Abb. 25 A-C, Spur 2-8) und es haben sich acht Spaltpeptide der Größe von ca. 35 kDa (blauer Rahmen), ca. 30 kDa (grüner Rahmen), ca. 29 kDa (violetter Rahmen), ca. 23 kDa (gelber Rahmen), ca. 18 kDa (grauer Rahmen), ca. 15 kDa (orangefarbener Rahmen), ca. 14 kDa (hellblauer Rahmen) und ca. 12 kDa (weißer Rahmen) gebildet (Abb. 25 A-C). Die Intensität der Banden bleibt bis zu 4 h nach Beginn der Proteolyse konstant, was auf eine gleichbleibende Konzentration der Spaltpeptide schließen lässt (Abb. 25 A-C, Spur 2-7). Nach 6-stündiger Proteolyse sind die Banden sowohl in den Proben des L-VvPPOcs-2wt als auch der Muteine schwächer angefärbt, was eine Konzentrationsabnahme der Spaltpeptide andeutet. Diese werden wahrscheinlich weiter hydrolysiert. Peptide, die kleiner als 10 kDa sind, werden durch die 12,5 %ige SDS-PAGE nicht aufgetrennt.

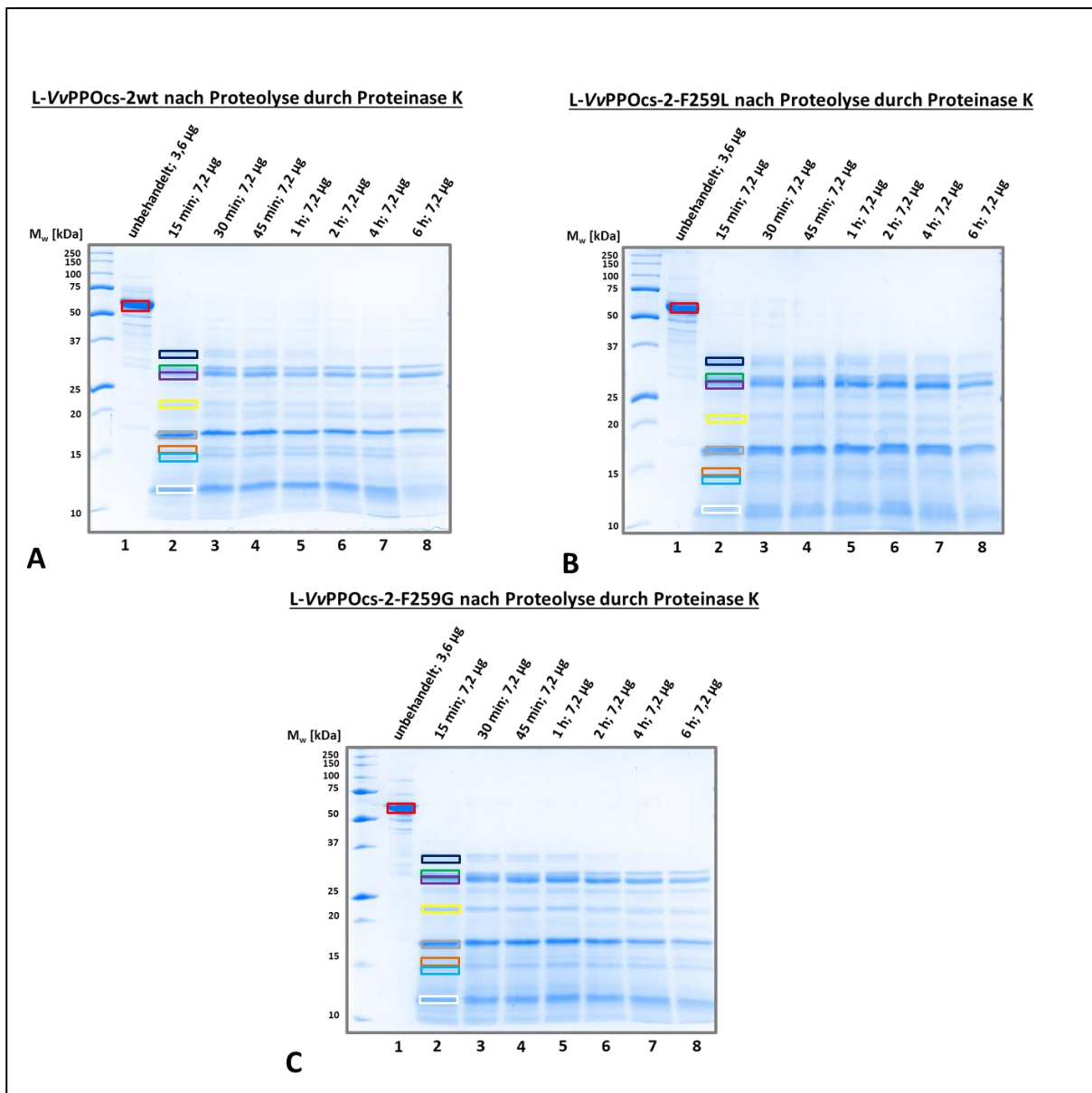


Abbildung 25: Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Proteinase K. 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **A-C; Spur 1:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt den L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C) an. **Spur 2-8:** Proteolytisch gespaltener L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C). Es entstehen acht Spaltpeptide mit einer ungefähren Größe von ca. 35 kDa (blauer Rahmen), ca. 30 kDa (grüner Rahmen), ca. 29 kDa (violetter Rahmen), ca. 23 kDa (gelber Rahmen), ca. 18 kDa (grauer Rahmen), ca. 15 kDa (orange-farbener Rahmen), ca. 14 kDa (hellblauer Rahmen) und ca. 12 kDa (weißer Rahmen). Bereits nach 15-minütiger Proteolyse ist die 60 kDa Bande nicht mehr nachweisbar. Nach 4-stündiger Proteolyse wird die Intensität der Banden schwächer. Die einzelnen Spaltpeptide werden wahrscheinlich weiter hydrolysiert.

Schnittstellenanalyse durch Massenspektrometrie

Die Analyse der Schnittstellen fand für alle Proteasen analog zu Kap. 3.2.1 statt. Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Analyse der SDS-Gelbanden aus Abb. 26 verkürzt und zusammenfassend dargestellt. Alle verwendeten Histogramme sind im Anhang G dargestellt. Die massenspektrometrische Analyse der Spaltpeptide nach Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Proteinase K wurde nach einem modifizierten Protokoll (saure Hydrolyse, Kap. 2.2.12) durchgeführt.

Um einen Überblick über die Messintensitäten zu bekommen, wird zusätzlich ein Histogramm zur

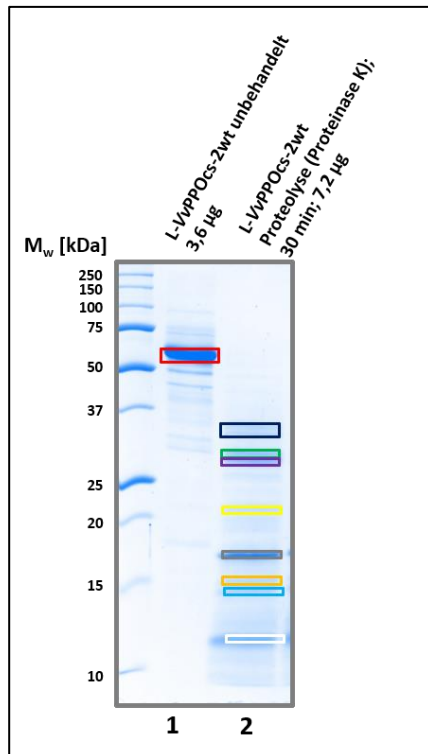


Abbildung 26: 30-minütige Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Proteinase K.

Verfügung gestellt, welches die aufsummierten Intensitäten in Bezug zum Molekulargewicht setzt. Durch dieses Verfahren und die hohe Anzahl an Peptiden verschiedener Schnittstellen (es existieren nicht nur Schnittstellen hinter R und K wie bei der Proteolyse durch Trypsin) ist die Methode zwar prinzipiell besser aufgelöst, aber die Auswertung wurde in diesem Fall nicht erleichtert, da viele der Peptide nur in sehr geringer und ähnlicher Intensität detektiert wurden (Anhang G).

Zur Charakterisierung der entstandenen Spaltpeptide (Abb. 26) wurden sie entsprechend ihrer Lage in der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt schematisch eingezeichnet (Abb. 27). Jedoch sind die genauen Positionen der Schnittstellen nicht immer ermittelbar. Folglich ergeben sich für einige Schnittstellen mehrere Möglichkeiten, die jedoch an der topologischen Lage (N- oder C-terminalen Domäne) und der potenziellen enzymatischen Aktivität des Spaltpeptides nichts ändern. Eine Übersicht über alle möglichen Schnittstellen zeigt Tab. 12.

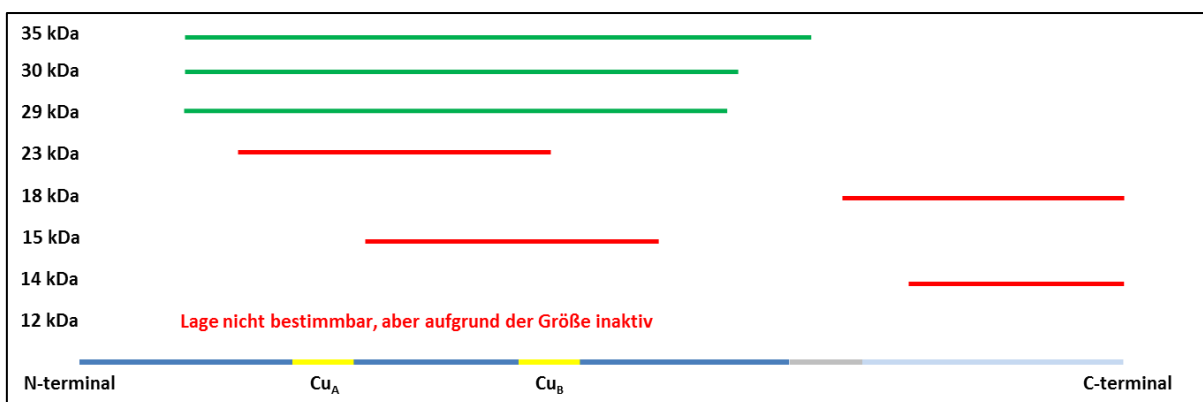


Abbildung 27: Position der durch die Proteolyse mit Proteinase K entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt. Die Sequenz des L-VvPPOcs-2wt ist dreiteilig gegliedert: Die N-terminale Domäne (dunkelblau) mit Cu_A und Cu_B-Motiv (gelb) ist über den Linker (grau) mit der C-terminalen Domäne verbunden (hellblau). Die 35 kDa, 30 kDa und 29 kDa Spaltpeptide liegen im

Bereich der N-terminalen Domäne, umfassen beide Kupfermotive und können enzymatisch aktiv sein (grün). Die übrigen Spaltpeptide können aufgrund ihrer Lage und/oder Größe nicht beide Kupfermotive umfassen und sind somit inaktiv (rot).

Die 35 kDa bzw. 30 und 29 kDa großen Spaltpeptide umfassen große Teile der N-terminalen Domäne und könnten enzymatisch aktiv sein. Alle übrigen Spaltpeptide liegen um Bereich der C-terminalen Domäne oder enthalten das aktive Zentrum nicht vollständig. Die Analyse des kleinsten Spaltpeptids (ca. 12 kDa, Abb. 26, Spur 2, weißer Rahmen) ergibt Maxima in der Verteilung der aufsummierten Intensitäten über den gesamten Sequenzbereich (Anhang G). Wahrscheinlich sind in dieser Bande Abbaupeptide anderer Banden enthalten. Ein Peptid zwischen dem Cu_A- und Cu_B Motiv (AS 106-AS 290, minimale Anforderung an mögliche Aktivität) hat eine Größe von 21 kDa. Ein 12 kDa großes Spaltpeptid kann somit nicht aktiv sein, da mindestens ein Kupferzentrum nicht enthalten ist.

Masse des Spaltpeptid	Möglichkeit	Sequenzabschnitt	Masse des Sequenzabschnittes	Enzymatische Aktivität möglich?
35 kDa	1	AS 49-352	34,9 kDa	ja
	2	AS 50-353	35,0 kDa	ja
	3-7	AS 50-354/355/356/357/358	ca. 35,1 kDa	ja
30 kDa	1	AS 49-312	30,1 kDa	ja
	2	AS 49-306	29,3 kDa	ja
	3	AS 49-317	30,7 kDa	ja
29 kDa		siehe 30 kDa		ja
23 kDa	4	AS 77/78/79/81-283	ca. 23,0 kDa	nein
18 kDa	7	AS	ca. 18 kDa	nein
		353/354/355/356/357/358		
15 kDa	16	AS 139/140/141/142-275/276/278/279	ca. 15 kDa	nein
14 kDa	1	AS 401-523	14,0 kDa	nein
	2	AS 403-523	14,2 kDa	nein
12 kDa		Nicht bestimmbar		nein

Table 12: Übersicht aller aus der Proteolyse mit Proteinase K entstandenen Spaltpeptide. Aufgrund der begrenzten Auflösung der Methode ist die genaue Schnittstelle nicht bestimmbar. Die Spaltpeptide lassen sich aber einem konkreten Sequenzabschnitt zuordnen.

Aktivitätsschnelltest

Nach Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch Proteinase K ist im Aktivitätsschnelltest nach ca. 20 min ein Umsatz von 4-MC durch den L-VvPPOcs-2wt nachweisbar. Die Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und -F259G zeigen keine Aktivität (Abb. 28 A). Nach 120 min ist die gelbbraunliche Färbung der Reaktionslösung des L-VvPPOcs-2wt deutlich sichtbar, während die Muteine -F259L und -F259G weiterhin keinen Substratumsatz zeigen (Abb. 28 B). Proteinase K hydrolysiert folglich sowohl den L-VvPPOcs-2wt als auch die Muteine -F259L und -F259G. Jedoch wird nur der L-VvPPOcs-2wt aktiviert und zeigt

Diphenolase-Aktivität. Das Ergebnis wurde in fünf unabhängigen Versuchsansätzen geprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

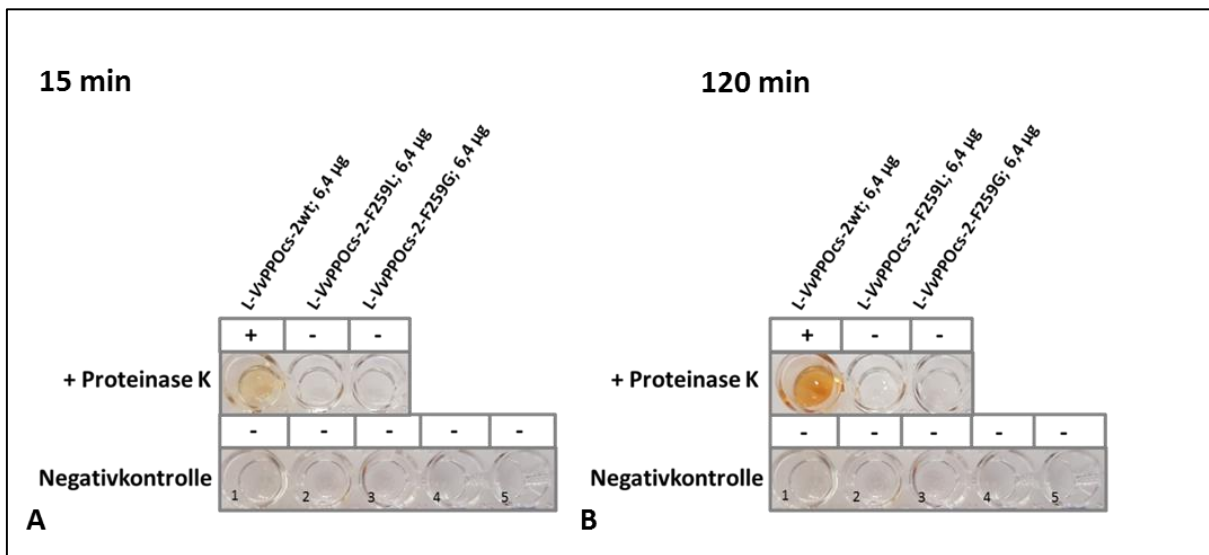


Abbildung 28: Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Proteinase K. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **A:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. Im Ansatz des L-VvPPOcs-2wt zeigt sich eine leichte Färbung. In den Ansätzen der Muteine ist kein Farbumschlag nachweisbar. **B:** Nach 120 min zeigt der Ansatz des L-VvPPOcs-2wt eine intensive Färbung. Im Ansatz der Muteine -F259L und -F259G ist keine Färbung sichtbar. Die Negativkontrollen zeigen keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg Proteinase K. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.3 Proteolyse durch Chymotrypsin

Die Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch die Serinprotease Chymotrypsin führt zu fünf Spaltpeptiden der Größe von ca. 38 kDa (Abb. 29, blauer Rahmen), ca. 35 kDa (grüner Rahmen), ca. 30 kDa (violetter Rahmen), ca. 24 kDa (gelber Rahmen) und ca. 18 kDa (grauer Rahmen). Die Bande, die durch die unverdaute L-VvPPOcs-2 hervorgerufen wird (ca. 60 kDa, roter Rahmen), ist bis zu 2 h erkennbar (Abb. 29 A-C). Die Proteolyse der L-VvPPOcs-2 ist folglich erst nach 2 h vollständig abgeschlossen. Die Spaltpeptide mit höchster Konzentration haben eine Masse von ca. 38 kDa und 18 kDa, was den Molekulargewichten der N-terminalen bzw. C-terminalen Domäne entspricht. Die Bande auf Höhe von ca. 38 kDa wird während der Versuchsdauer weiter abgebaut (Abb. 29 A-C). Die 35 kDa-Bande erscheint teilweise als Doppelbande (Abb. 29 B-C), wobei dies bei der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt nur bedingt erkennbar ist (Abb. 29 A), was wahrscheinlich auf die begrenzte Auflösung der SDS-PAGE zurückzuführen ist. Die intensive Bande auf Höhe von 18 kDa erscheint wahrscheinlich aufgrund der fortschritten Hydrolyse nach einer Versuchsdauer von 4 h als Doppelbande (Abb. 29 A-C, Spur 7-8). Ein

Vergleich ausgewählter Proteolyseproben des L-VvPPOcs-2wt und der beiden Muteine -F259L und -F259G zeigt, dass die entstehenden Spaltpeptide die gleiche Masse haben und in vergleichbarer Konzentration vorliegen (Abb. 29 D, Spur 4-6).

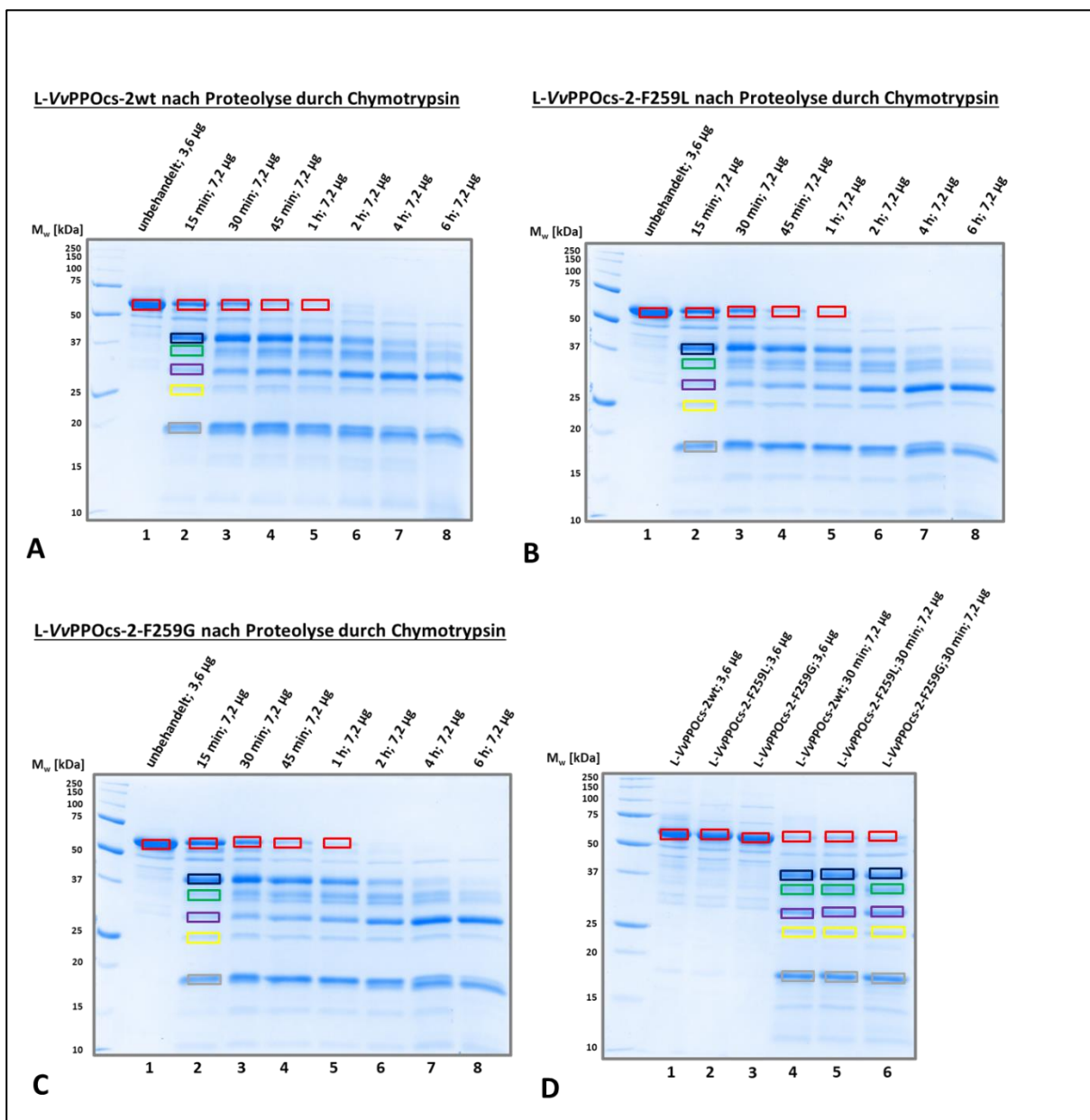
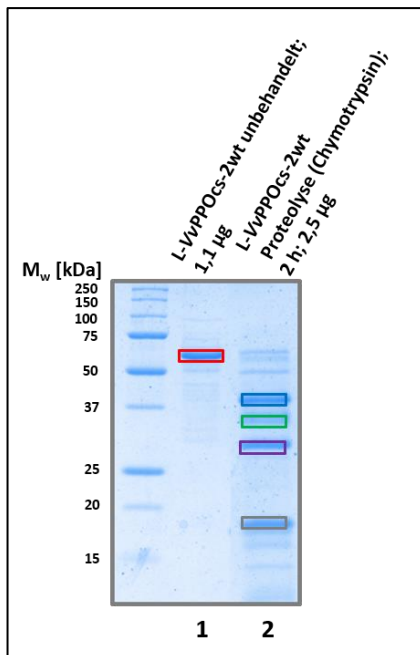


Abbildung 29: Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Chymotrypsin. 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **A-C; Spur 1:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt den L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C) an. **Spur 2-8:** Proteolytisch gespaltener L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C). Es entstehen fünf Spaltpeptide mit einer ungefähren Größe von ca. 38 kDa (blauer Rahmen), ca. 35 kDa (grüner Rahmen), ca. 30 kDa (violetter Rahmen), ca. 25 kDa (gelber Rahmen) und ca. 18 kDa (grauer Rahmen). Erst nach 2-stündiger Proteolyse ist die 60 kDa Bande nicht mehr nachweisbar. Zwischen 4 und 6 h (**Spur 7,8**) lässt die Farbintensität der Banden nach. Lediglich die Banden auf Höhe von ca. 30 und ca. 18 kDa sind noch deutlich sichtbar. **D:** Vergleich der Größe der Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach 30-minütiger Proteolyse mit Chymotrypsin.

Schnittstellenanalyse durch Massenspektrometrie

Die Banden wurden analog zur Schnittstellenanalyse nach Proteolyse durch Trypsin aus einem SDS-Gel



der Bachelorarbeit von [REDACTED] extrahiert, an das IMB Mainz gegeben und analysiert (Abb. 30, Kap. 2.2.12). In diesem Gel ist die Bande auf Höhe von ca. 24 kDa (Abb. 29, gelber Rahmen) nicht sichtbar, was an der geringeren Gesamtmenge an Protein liegt, die aufgetragen wurde (2,5 µg statt 7,2 µg). Da die Bande auf Höhe von 24 kDa aber in allen Proben im Verhältnis zu den anderen Spaltpeptiden nur sehr schwach gefärbt ist, wurde auf eine nachträgliche massenspektrometrische Analyse verzichtet.

Abbildung 30: Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Chymotrypsin.
Modifiziert nach Panagos, 2016.

Aufgrund der niedrigen Spezifität des Chymotrypsins (Hydrolyse hinter Y, W, F, M, L) ergeben sich mehrere mögliche Peptidsequenzen für eine SDS-Gelbande (Abb. 31; Tab. 13).

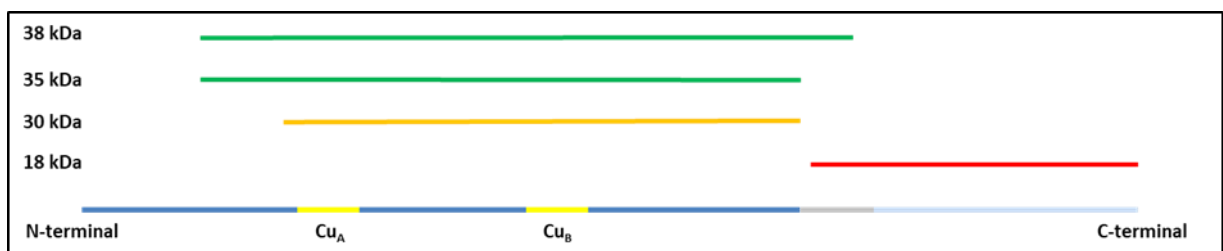


Abbildung 31: Position der durch die Proteolyse mit Chymotrypsin entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt. Die Sequenz des L-VvPPOcs-2wt ist dreiteilig gegliedert: Die N-terminale Domäne (dunkelblau) mit Cu_A und Cu_B -Motiv (gelb) ist über den Linker (grau) mit der C-terminalen Domäne verbunden (hellblau). Die 38 kDa und 35 kDa Spaltpeptide liegen im Bereich der N-terminalen Domäne, umfassen beide Kupfermotive und können enzymatisch aktiv sein (grün). Das 30 kDa Spaltpeptid beginnt N-terminal sieben AS vor dem Cu_A -Motiv, was eine enzymatische Aktivität in Frage stellt (orange). Das 18 kDa Spaltpeptid umfasst einen Sequenzabschnitt der C-terminalen Domäne und ist inaktiv (rot).

Der Sequenzabschnitt AS 52-344 (Molekulargewicht: 33,5 kDa) zeigte die höchsten Messintensitäten (Anhang E). Da das Molekulargewicht der SDS-Gelbanden größer ist und folglich einen breiteren

Sequenzabschnitt umfassen muss, ergeben sich mit Hilfe der theoretischen Schnittstellen (Anhang E) mehrere mögliche Sequenzabschnitte für das 38 kDa und 35 kDa große Spaltpeptid (Tab. 13), die alle im Bereich der N-terminalen Domäne liegen und enzymatisch aktiv sein könnten (Abb. 31). Die N-terminale Schnittstelle des 30 kDa Spaltpeptids liegt nur sieben AS entfernt vom kupferkoordinierenden Histidin H_{A1}, womit ein großer Teil der N-terminalen Domäne fehlt. Ob das 30 kDa große Spaltpeptid enzymatisch aktiv sein kann, ist damit fraglich (Abb. 31). Das 18 kDa große Spaltpeptid umfasst den größten Teil des Linkerbereiches und die C-terminale Domäne, womit eine enzymatische Aktivität ausgeschlossen werden kann (Abb. 31, Tab. 13).

Masse des Spaltpeptid	Möglichkeit	Sequenzabschnitt	Masse des Sequenzabschnittes	Enzymatische Aktivität möglich?
38 kDa	1	AS 56-382	37,2 kDa	ja
	2	AS 56-393	38,4 kDa	ja
	3	AS 58-393	38,1 kDa	ja
	4	AS 56-397	38,8 kDa	ja
	5	AS 58-397	38,5 kDa	ja
35 kDa	1	AS 56-357	34,7 kDa	ja
	2	AS 58-357	34,4 kDa	ja
	3	AS 56-356	34,6 kDa	ja
	4	AS 58-356	34,3 kDa	ja
	5	AS 56-354	34,3 kDa	ja
	6	AS 58-354	34,1 kDa	ja
30 kDa	1	AS 92-357	30,5 kDa	unklar
	2	AS 100-357	29,6 kDa	unklar
18 kDa	1	AS 358-523	18,4 kDa	nein
	2	AS 358-520	18,0 kDa	nein

Tabelle 13: Übersicht aller aus der Proteolyse mit Chymotrypsin entstandenen Spaltpeptide. Aufgrund der begrenzten Auflösung der Methode ist die genaue Schnittstelle nicht bestimmbar. Die Spaltpeptide lassen sich aber einem konkreten Sequenzabschnitt zuordnen.

Aktivitätsschnelltest

Im Aktivitätsschnelltest nach Proteolyse mit Chymotrypsin zeigte sowohl der L-VvPPOcs-2wt als auch die Muteine -F259L und -F259G nach 15 min keinen Substratumsatz (Abb. 32 A). Nach 120 min ist in allen drei Ansätzen eine Reaktion durch eine leichte gleich intensive rötliche Verfärbung angezeigt (Abb. 32 B). Da die Negativkontrollen weiterhin klar und transparent sind, ist der Farbumschlag auf einen Umsatz von 4-MC zurückzuführen. Insgesamt ist der L-VvPPOcs-2 durch die Proteolyse mittels Chymotrypsin zwar aktiviert, der Umsatz von 4-MC jedoch deutlich geringer als nach Aktivierung durch SDS (Abb.14) oder Trypsin (Abb. 24).

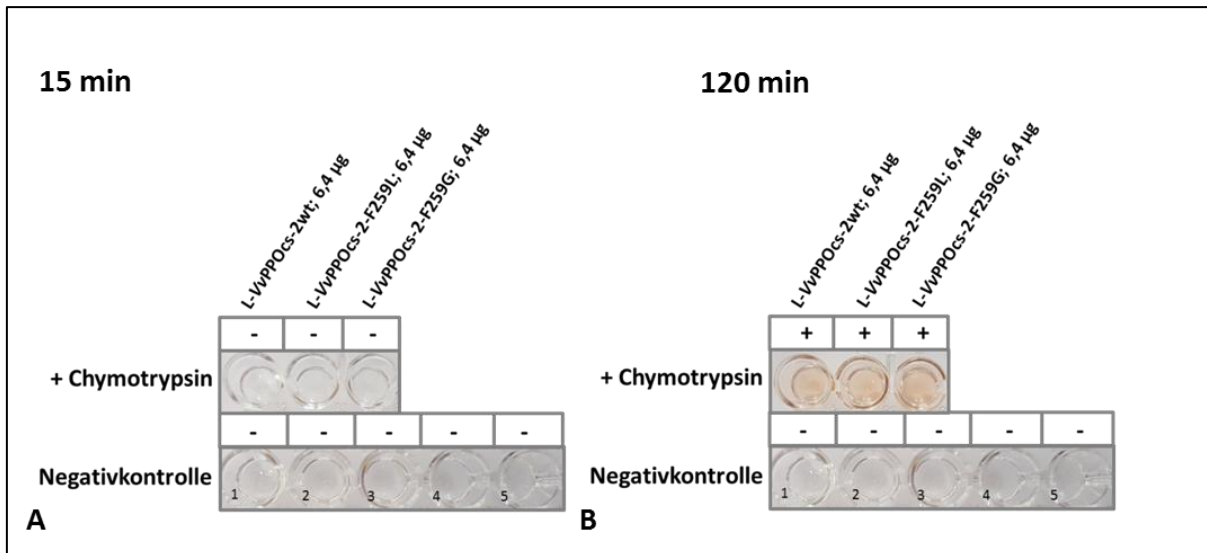


Abbildung 32: Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Chymotrypsin. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **A:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. In keinem Ansatz ist eine Reaktion nachweisbar. **B:** Nach 120 min zeigen sowohl der Ansatz des L-VvPPOcs-2wt als auch die Ansätze der Muteine -F259L und -F259G eine leichte rötliche Färbung. Die Negativkontrollen zeigen über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg Proteinase K. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.4 Proteolyse durch Thermolysin

Abb. 33 zeigt den zeitlichen Verlauf der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt (Abb. 33 A), der L-VvPPOcs-2-F259L (Abb. 33 B) und der L-VvPPOcs-2-F259G (Abb. 33 C) durch Thermolysin. Die unbehandelte L-VvPPOcs-2 (Abb. 33 A-C, Spur 1, roter Rahmen) ist über die gesamte Versuchszeit schwach sichtbar, was eine unvollständige Proteolyse anzeigt (Abb. 33 A-C, Spur 3-8). Die L-VvPPOcs-2 wird durch Thermolysin in fünf Peptide gespalten, die Massen von ca. 36 kDa (blauer Rahmen), 34 kDa (grüner Rahmen), 31 kDa (violetter Rahmen), 18 kDa (gelber Rahmen) und 17 kDa (grauer Rahmen) aufweisen (Abb. 33 A-C) und nach 15-minütiger Inkubation mit Thermolysin bei 25 °C auftreten. Über einen Inkubationszeitraum von 6 h wird das Peptid der Größe von ca. 18 kDa abgebaut und ist nicht mehr nachweisbar (Abb. 33 A-C, Spur 7-8). Auch die Bande bei ca. 37 kDa wird nach 1 h Inkubationszeit schwächer und wahrscheinlich weiter hydrolysiert.

Ein Vergleich der Proteolyseproben nach 30-minütiger Inkubationszeit des L-VvPPOcs-2wt und der beiden Muteine zeigt, dass die entstehenden Spaltpeptide die gleiche Masse haben und in ähnlicher Konzentration vorliegen (Abb. 33 D).

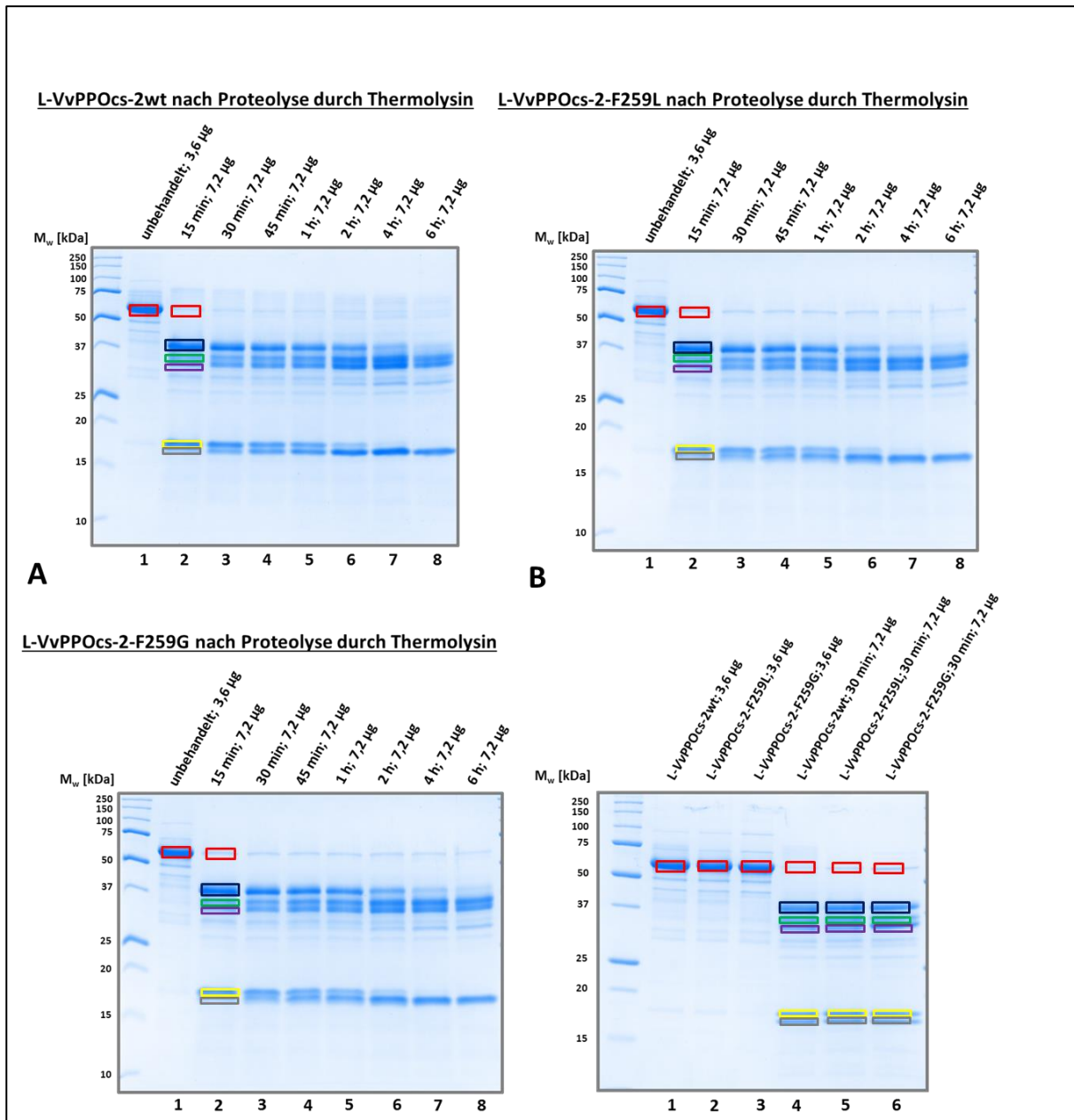
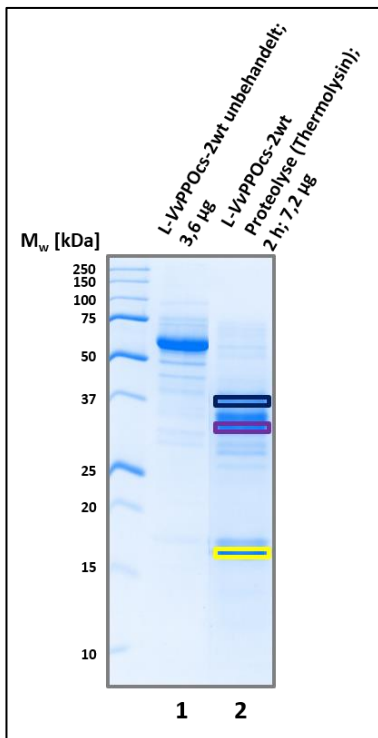


Abbildung 33: Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Thermolysin. 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **A-C; Spur 1:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt den L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C) an. **Spur 2-8:** Proteolytisch gespaltener L-VvPPOcs-2wt (A) und die Muteine -F259L (B) und -F259G (C). Es entstehen fünf Spaltpeptide mit einer ungefähren Größe von ca. 36 kDa (blauer Rahmen), ca. 34 kDa (grüner Rahmen), ca. 31 kDa (violetter Rahmen), ca. 18 kDa (gelber Rahmen) und ca. 17 kDa (grauer Rahmen). Die Bande bei 60 kDa ist über die gesamte Versuchszeit sichtbar. **D:** Vergleich der Größe der Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach 30-minütiger Proteolyse mit Thermolysin. Die Spaltpeptide der Muteine entsprechen von der Größe denen des L-VvPPOcs-2wt.

Schnittstellenanalyse mittels Massenspektrometrie



Vier Spaltpeptide (36 kDa (Abb. 34, blauer Rahmen), 34 kDa (grüner Rahmen), 31 kDa (violetter Rahmen), 17 kDa (gelber Rahmen)) wurden mittels Massenspektrometrie Sequenzabschnitten zugeordnet (Abb. 35).

Abbildung 34: Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Thermolysin.

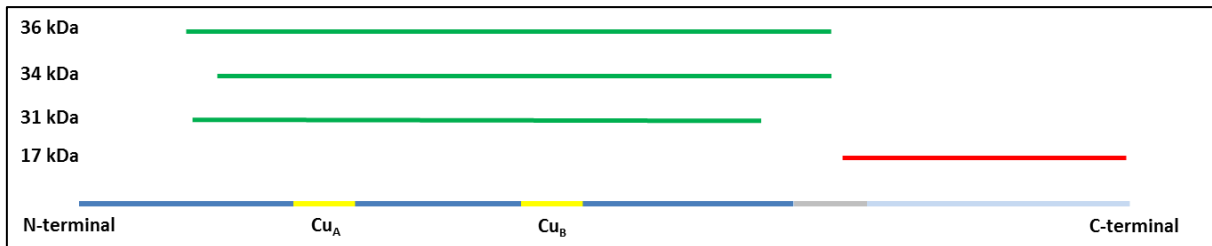


Abbildung 35: Position der durch die Proteolyse mit Thermolysin entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt. Die Sequenz des L-VvPPOcs-2wt ist dreiteilig gegliedert: Die N-terminale Domäne (dunkelblau) mit Cu_A und Cu_B-Motiv (gelb) ist über den Linker (grau) mit der C-terminalen Domäne verbunden (hellblau). Die 36 kDa, 34 kDa und 31 kDa Spaltpeptide liegen im Bereich der N-terminalen Domäne, umfassen beide Kupfermotive und können enzymatisch aktiv sein (grün), wohingegen das 18 kDa Spaltpeptid im C-terminalen Sequenzbereich liegt und inaktiv ist (rot).

Die Messergebnisse des 36 kDa, 34 kDa und 31 kDa großen Spaltpeptids zeigen zwischen AS 52-296 (Molekulargewicht: 27,8 kDa) die größte Intensität (Anhang F). Unter Berücksichtigung der theoretischen Schnittstellen des Thermolysins (Anhang F) und einem Vergleich der Messintensitäten zwischen den verschiedenen Spaltpeptiden, ist es gelungen, die Spaltpeptide dem N-terminalen Sequenzbereich zuzuordnen, so dass eine enzymatische Aktivität möglich wäre (Abb. 35, Tab. 14). Das

17 kDa- Spaltpeptid umfasst die C-terminale Domäne und den C-terminalen Teil des Linkerbereiches, weswegen eine Enzymaktivität ausgeschlossen ist (Abb. 35, Tab. 14).

Masse des Spaltpeptid	Möglichkeit	Sequenzabschnitt	Masse des Sequenzabschnittes	Enzymatische Aktivität möglich?
36 kDa	1	AS 49-363	36,1 kDa	ja
	2	AS 41-363	36,9 kDa	ja
	3	AS 40-363	37,0 kDa	ja
	4	AS 49-365	36,3 kDa	ja
	5	AS 41-365	37,1 kDa	ja
	6	AS 40-365	37,2 kDa	ja
34 kDa	1	AS 58-363	35,1 kDa	ja
	2	AS 65-363	34,4 kDa	ja
	3	AS 70-363	33,8 kDa	ja
	4	AS 71-365	33,7 kDa	ja
	5	AS 73-365	33,5 kDa	ja
31 kDa	1	AS 65-296	26,5 kDa	ja
	2	AS 65-324	29,8 kDa	ja
	3	AS 58-324	30,5 kDa	ja
	4	AS 56-324	30,7 kDa	ja
	5	AS 54-324	31,0 kDa	ja
	6	AS 49-324	31,5 kDa	ja
17 kDa	1	AS 377-523	16,4 kDa	nein
	2	AS 366-523	17,5 kDa	nein
	3	AS 378/380/381/383-523	15,8-16,4 kDa	nein

Tabelle 14: Übersicht aller aus der Proteolyse mit Thermolysin entstandenen Spaltpeptide. Aufgrund der begrenzten Auflösung der Methode ist die genaue Schnittstelle nicht bestimmbar. Die Spaltpeptide lassen sich aber einem konkreten Sequenzabschnitt zuordnen.

Aktivitätsschnelltest

Die Reaktionsansätze zeigen nach 15 min keinen Farbumschlag (Abb. 36 A). Eine erste Reaktion ist nach ca. 45 min erkennbar (Daten nicht gezeigt) und nach 120 min Reaktionszeit zeigt sich in allen drei Ansätzen eine leichte rötliche Verfärbung der Reaktionslösung (Abb. 36 B). Die Verfärbung des Ansatzes des Muteins L-VvPPOcs-2-F259G zeigt eine weniger intensive Färbung als die Ansätze des L-VvPPOcs-2wt und L-VvPPOcs-2-F259L. Insgesamt ist der L-VvPPOcs-2 durch die Proteolyse mittels Chymotrypsin zwar aktiviert, die Geschwindigkeit der Aktivierung scheint jedoch langsamer und der Umsatz von 4-MC jedoch deutlich geringer als nach Aktivierung durch SDS (Abb. 14) oder Trypsin (Abb. 24).

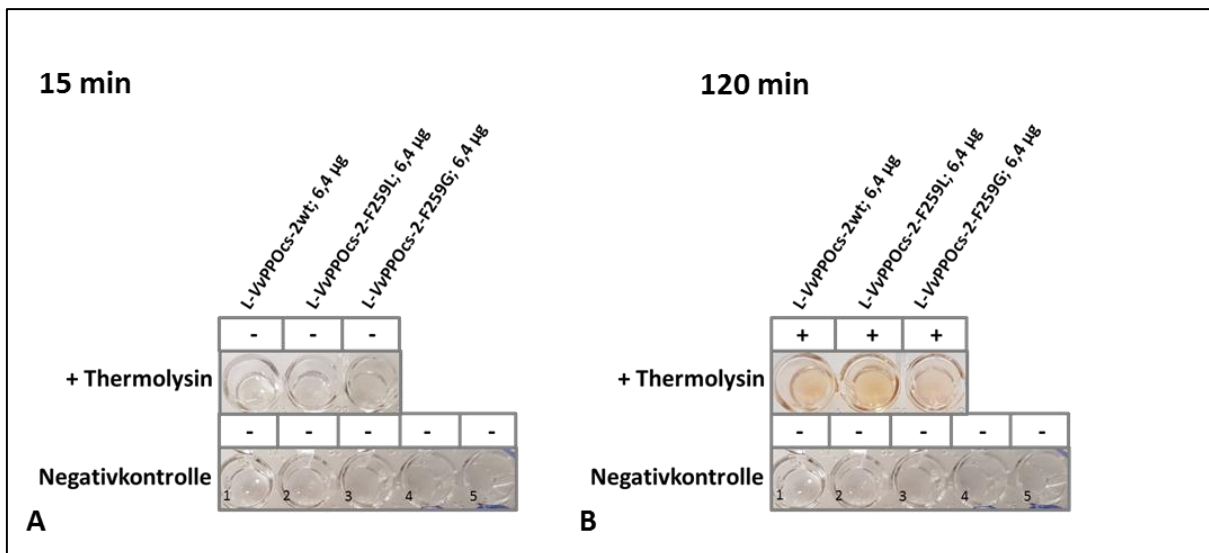


Abbildung 36: Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Thermolysin. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **A:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. In keinem Ansatz ist eine Reaktion nachweisbar. **B:** Nach 120 min zeigen sowohl der Ansatz des L-VvPPOcs-2wt als auch die Ansätze der Muteine -F259L und -F259G eine leichte rötliche Färbung. Die Intensität im Ansatz des Muteins -F259G ist etwas geringer. Die Negativkontrollen zeigen über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg Proteinase K. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.5 Proteolyse durch Endoproteinase V8

Die Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt und der L-VvPPOcs-2-F259L mittels der V8 Protease wurde nach meiner Anleitung durch die Bachelorstudenten [REDACTED] und [REDACTED] überprüft (Derenbach 2016; Panagos 2016). Sowohl Panagos als auch Derenbach konnten keine Spaltpeptide nachweisen. Im SDS-Gel ist für den L-VvPPOcs-2wt (Abb. 37 A, Spur 8-9) und die Mutante -F259L (Spur 2-7) auch nach 24 h Versuchsdauer eine prominente Bande bei ca. 60 kDa sichtbar (Spur 7) und lediglich einige niedermolekulare Banden schwach angefärbt. Im Aktivitätsschnelltest zeigt weder der L-VvPPOcs-2wt noch die Muteine -F259L -F259G nach der Proteolyse mit V8 Protease einen Umsatz von 4-MC (kein Farbumschlag der Reaktionslösung nachweisbar) (Abb. 37 B-C). Panagos und Derenbach verwendeten V8 Proteasen von zwei verschiedenen Herstellern, um die Ergebnisse zu verifizieren (Derenbach 2016; Panagos 2016).

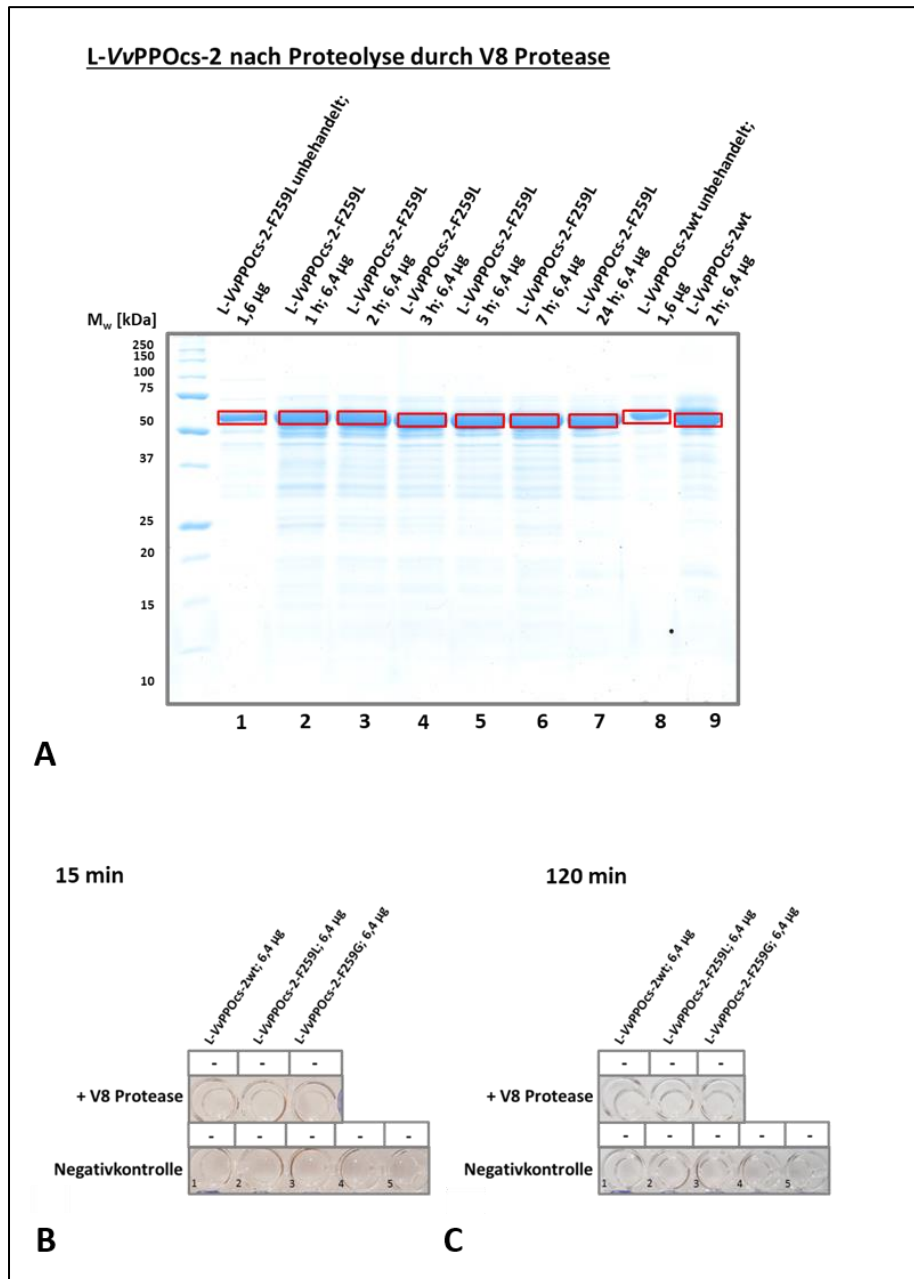


Abbildung 37: Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt und des Muteins L-VvPPOcs-2-F259L durch die V8 Protease und Aktivitätsschnelltest. **A:** 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **Spur 1 und 8:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt das Mutein L-VvPPOcs-2-F259L (Spur 1) und den L-VvPPOcs-2wt (Spur 8) an. **Spur 2-6:** Proteolyseansatz der L-VvPPOcs-2-F259L zwischen 1 h und 24 h. Weiterhin ist die 60 kDa Bande sichtbar und einige schwach angefärbte niedermolekulare Banden. **Spur 9:** Kontrolle des Proteolyseansatzes des L-VvPPOcs-2wt nach 2 h Versuchsdauer. Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa und die schwach gefärbten niedermolekularen Banden zeigen an, dass kaum Proteolyse stattgefunden hat. Modifiziert nach Derenbach, 2016. **B-C:** Prüfung der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch die V8 Protease. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **B:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. In keinem Ansatz ist eine Reaktion nachweisbar. **C:** Auch nach 120 min ist kein Farbumschlag erkennbar. Die Negativkontrollen zeigen über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg V8 Protease. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.6 Proteolyse durch Calpain-1

Zur Proteolyse der L-VvPPOcs-2 mittels der Metalloprotease Calpain-1 wurden bereits im Rahmen meiner Masterarbeit Vorversuche durchgeführt (Ludwig, 2014), die durch [REDACTED] während ihrer Bachelorarbeit weiterentwickelt wurden (Panagos, 2016). Auch 24 h nach Versuchsbeginn ist die Proteolyse unvollständig, was durch die Bande auf Höhe von ca. 60 kDa angezeigt wird (Abb. 38 A, Spur 4, roter Rahmen). Es entstehen dennoch bereits nach 1-stündiger Proteolyse fünf Spaltfragmente einer Größe von ca. 50 kDa (grüner Rahmen), 38 kDa (violetter Rahmen), 36 kDa (gelber Rahmen), 18 kDa (grauer Rahmen) und 15 kDa (oranger Rahmen). Die Bande auf Höhe von 50 kDa ist am intensivsten angefärbt, alle weiteren Banden zeigen nur eine schwache Färbung (Abb. 38). Dies lässt darauf schließen, dass von der L-VvPPOcs-2 nur ein kleines Peptid abgespalten wurde, das in weitere kleine Peptide hydrolysiert worden sein könnte, die in der SDS-PAGE nicht aufgetrennt wurden. Im Aktivitätsschnelltest ist nach 120 min ist eine leichte Rotfärbung dokumentierbar (Abb. 38 C). Nach 24 h ist diese allerdings nicht intensiver geworden (Daten nicht gezeigt). Calpain-1 scheint die L-VvPPOcs-2 langsam im geringen Maße zu aktivieren (Abb. 38 B-C).

Panagos modifizierte die experimentellen Bedingungen bezüglich der Konzentration der Protease und des zur Proteolyse nötigen Cofaktor Ca^{2+} , jedoch änderte sich das entstehende Bandenmuster nicht (Ludwig, 2014; Panagos, 2016). Aus diesem Grund wurde Calpain-1 nur zur Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt eingesetzt. Weitere Experimente wurden nicht forciert.

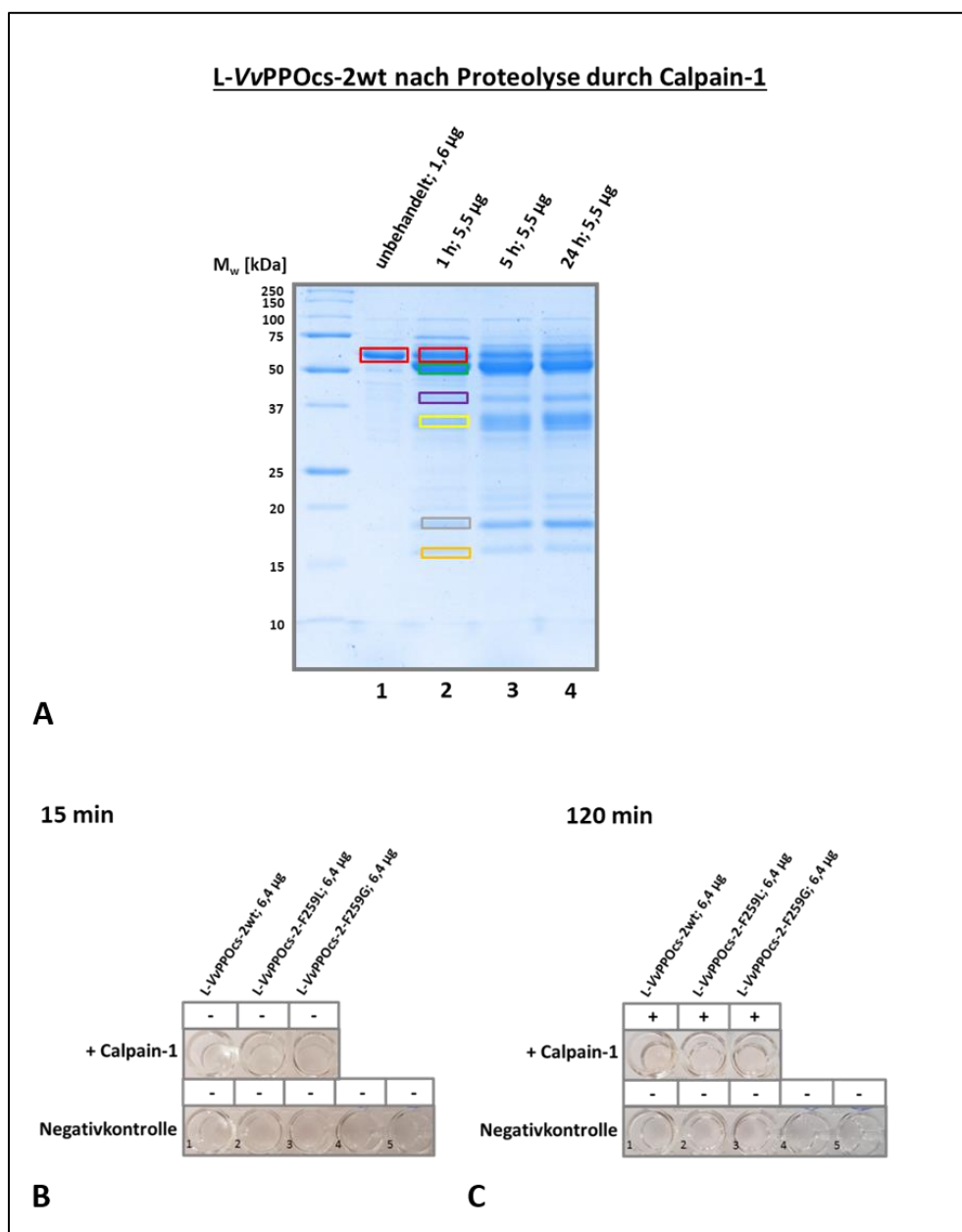


Abbildung 38: Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Calpain-1 und Aktivitätsschnelltest. A: 12,5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **Spur 1:** Die deutliche Bande bei ca. 60 kDa zeigt den L-VvPPOcs-2wt an. **Spur 2-4:** Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt zwischen 1 h und 24 h. Die 60 kDa Bande ist auch nach 24 h noch deutlich erkennbar (Spur 4). Die prominenteste Bande liegt bei ca. 50 kDa (Spur 2, grüner Rahmen). Weitere schwächer angefärbte Banden liegen bei ca. 38 kDa (violetter Rahmen), 36 kDa (gelber Rahmen), 18 kDa (grauer Rahmen) und 15 kDa (orangener Rahmen). Modifiziert nach Panagos, 2016 **B-C:** Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Calpain-1. Substrat: 10 mM 4-MC; Puffer: 50 mM Maleat-Tris-Puffer pH 6. Beobachtung bei Raumtemperatur. **B:** Aktivitätsschnelltest 15 min nach Zugabe der L-VvPPOcs-2. In keinem Ansatz ist eine Reaktion nachweisbar. **C:** Nach 120 min ist in allen drei Ansätzen ein schwacher Farbumschlag erkennbar. Die Negativkontrollen zeigen über die Versuchsdauer keine Farbveränderung. 1: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2wt; 2: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259L; 3: Puffer + 6,4 µg L-VvPPOcs-2-F259G; 4: Puffer + 10 mM 4-MC; Puffer + 0,6 µg Proteinase K. -: keine Färbung; +: leichte Färbung; ++: deutliche Färbung; +++: intensive Färbung.

3.2.7 Zusammenfassung der proteolytischen Aktivierung der L-VvPPOcs-2

Um die C-terminale Domäne von der katalytischen Einheit der L-VvPPOcs-2 zu trennen und das Enzym damit zu aktivieren, wurde eine Proteolyse mittels sechs Proteasen durchgeführt. Ziel war es, eine Protease zu finden, die die L-VvPPOcs-2 im Linkerbereich in möglichst wenige Spaltpeptide schneidet und aktiviert. Trypsin ist diesen Kriterien folgend am besten geeignet: Es spaltet die L-VvPPOcs-2 kurz vor dem Linkerbereich in vier Spaltpeptide und induziert eine deutliche Diphenolase-Aktivität (Tab. 15, Kap. 3.2.1).

Proteinase K hydrolysiert die L-VvPPOcs-2 aufgrund der niedrigen Spezifität in acht Spaltpeptide und aktiviert lediglich den L-VvPPOcs-2wt, der nach Proteolyse 4-MC effektiv umsetzt. Die Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und -F259G werden ebenfalls in acht Peptide gespalten. Jedoch bleibt eine effektive Aktivierung aus.

Chymotrypsin und Thermolysin spalten die L-VvPPOcs-2 in je fünf Peptide. Es lässt sich aber in beiden Fällen nur ein geringer Umsatz von 4-MC nachweisen.

Calpain-1 spaltet nur einen geringen Teil der L-VvPPOcs-2. Ein Substratumsatz ist nur sehr schwach nachweisbar. Die V8-Protease führt zu keiner Proteolyse und damit auch keiner Aktivierung der L-VvPPOcs-2.

Trypsin wurde somit als Aktivator identifiziert, der die L-VvPPOcs-2 kurz vor dem Linkerbereich schneidet und zu zwei Peptiden führt, die die N-terminale Domäne enthalten (AS 30-344 bzw. AS 51-344) und damit enzymatisch aktiv sein können. Zusätzlich entstehen zwei Peptide, die der C-terminalen Domäne zuzuordnen sind. Die Aktivierung und gelelektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte wurde im Laufe der Arbeit in über ca. 50 SDS-PAGEs verifiziert, ist reproduzierbar und praktikabel. Aus diesem Grund wurde Trypsin für die folgenden Experimente ausgewählt.

Protease	Größe der Spaltpeptide [kDa]	Diphenolase-Aktivität	Geeignet zur Aktivierung der L-VvPPOcs-2
Calpain-1	50, 38, 36, 18, 15	sehr schwach	nein
Chymotrypsin	38, 35, 30, 24, 17	schwach	nein
Proteinase K	35, 30, 29, 23, 18, 15, 14, 12	nur L-VvPPOcs-2wt	nur L-VvPPOcs-2wt
Thermolysin	36, 34, 31, 18, 17	schwach	nein
Trypsin	36, 34, 17, 15	ja	ja
V8	-	nein	nein

Table 15: Zusammenfassung der verwendeten Proteasen. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Größe der Spaltpeptide, den Nachweis von Diphenolase-Aktivität und das Fazit, ob die Protease sich als Aktivator der L-VvPPOcs-2 eignet.

3.3 Trennung der Spaltpeptide über Größenaustauschchromatographie

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Proteolyse durch Trypsin die C-terminale von der katalytischen Domäne abtrennt. Im Folgenden sollte der Massenunterschied zwischen den Domänen genutzt werden, um diese mittels Größenaustauschchromatographie voneinander zu trennen. Dazu wurde eine Superdex 75 10/300 GL Säule (*GE Healthcare Bio-Science AB*; Uppsala, Schweden), die mit einer FPLC-Anlage *Biologic DuoFlow* (*Bio-Rad Laboratories Inc.*; CA, USA) verbunden war, genutzt. Die Trypsin-proteolysierte Probe wurde über eine 300 µl Schleife in das System injiziert (Kap. 2.2.9). Das Laufprofil zeigt die OD_{280} aufgetragen gegen die Zeit (Abb. 39 A). Sichtbar sind sechs Maxima, die verschieden große Proteine anzeigen. Allerdings ist die Intensität der Maxima 1 bis 2 und 4 bis 6 mit einer OD_{280} von maximal 0,07 und damit auch die Konzentration der Peptide sehr gering. Das dritte Maximum zeigt eine OD_{280} von ca. 0,3.

Die Fraktionen wurden gesammelt und auf 12,5 %ige SDS-Gele aufgetragen (Abb. 39 B-E). Da das Volumen der gesammelten Fraktionen gering ist, wurden die Proben nicht konzentriert, sondern je in gleicher Menge mit SDS-Probenpuffer versetzt (Kap. 2.2.4.1) und auf die SDS-PAGE aufgetragen. In den Fraktionen 17 und 32-50 konnten nur sehr geringe Mengen oder gar kein Protein detektiert werden (Abb. 39 B-E), was mit den Aufzeichnungen der Größenaustauschchromatographie korreliert (Abb. 39 A). In den Fraktionen 18 -28 ist eine Bande auf Höhe von ca. 34 kDa sichtbar (katalytische Domäne; Kap. 3.2). In den Fraktionen 22-26 zeigen sich zusätzlich noch Banden auf Höhe von ca. 60 kDa (intakter L-VvPPOcs-2wt) und 19 kDa (C-terminale Domäne). In den Fraktionen 27-29 sind zusätzlich zu der Bande auf Höhe von ca. 34 kDa weitere Peptide der Größe von ca. 20 kDa (Abb. 39 C, weißer Pfeil) detektiert. Der Proteinnachweis in den Fraktionen 30-31 zeigt Peptide der Größe von ca. 25 kDa (Abb. 39 C, gelber Pfeil) und in Fraktion 31 Peptide einer Größe von ca. 10 kDa (Abb. 39 C, blauer Pfeil). Aufgrund der starken Verdünnung der Probe sind in vielen Spuren nur schwache Banden sichtbar. Die höchste Proteinkonzentration ist in Fraktion 22 enthalten, was sowohl durch das höchste Maximum des Laufprofils der Größenchromatographie (Abb. 39 A) als auch durch die intensivste Bandenfärbung im SDS-Gel belegt wird (Abb. 39 B, Spur 7).

Um die Diphenolase-Aktivität des Trypsin-aktivierten L-VvPPOcs-2wt nach der größenchromatographischen Reinigung zu prüfen, wurde eine native PAGE durchgeführt, die einer Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC und 10 mM MBTH unterzogen wurde. Hierfür wurde die Fraktion mit der höchsten Konzentration der 34 kDa Bande (Fraktion 22, katalytische Domäne, Kap. 3.2.1) ausgewählt. Als Vergleich dient eine Probe des Trypsin-aktivierten L-VvPPOcs-2wt, der zuvor nicht größenchromatographisch getrennt wurde und eine Probe des unbehandelten und nicht aktivierten L-VvPPOcs-2wt (Abb. 39 F-G). Die Pilz-Tyrosinase dient als Kontrolle für eine erfolgreiche Aktivitätsfärbung (Kap. 2.2.8.2). Bei pH 4,5 unter Zusatz von 1,5 mM SDS als Aktivator (Abb. 39 F) zeigen alle aufgetragenen Proben Diphenolase-Aktivität. Auffällig ist, dass der Trypsin-aktivierte

größenchromatographisch aufgetrennte L-VvPPOcs-2wt nur eine klare und stark angefärbte Bande zeigt (Abb. 39 F, Spur 4). Unter dieser liegt noch eine schwächere Bande, die aber deutlich geringer angefärbt ist, als die Bande, die bei Umsatz von 4-MC durch den L-VvPPOcs-2wt, der Trypsin-aktiviert, aber nicht weiter gereinigt wurde, entsteht (Abb. 39 F, Spur 3). Dieser Unterschied ist so deutlich, dass er nicht auf die unterschiedlich aufgetragenen Proteinmengen zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Aussage durch ein zweites natives Gel, das einer Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC und 10 mM MBTH unterzogen wurde. Die Reaktion lief bei pH 6 und ohne Zusatz eines Aktivators ab. Folglich zeigt der nicht aktivierte L-VvPPOcs-2wt keinen Umsatz von 4-MC (Abb. 39 G, Spur 2). Der Trypsin-aktivierte und nicht weiter gereinigte L-VvPPOcs-2wt zeigt eine deutliche Färbung über einen breiten Bereich der Laufspur (Abb. 39 G, Spur 3). Wird der Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt größenchromatographisch gereinigt, zeigt sich nur noch eine intensiv angefärbte Bande. Die Laufspur ist nur leicht gefärbt (Abb. 39 G, Spur 4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt seine Diphenolase-Aktivität nicht verliert (Abb. 39 F-G). Jedoch gelingt es mit der verwendeten Säule und der kleinstmöglich einstellbaren Fraktionsgröße nicht, die katalytische Einheit von der C-terminalen Domäne zu trennen. Die durchgeführte SDS-PAGE zeigt, dass die Fraktionen sowohl Peptide der Größe von ca. 34 kDa als auch einer Größe von ca. 17 kDa enthalten (Abb. 39 B-C). Folglich lassen sich katalytische Einheit und C-terminale Domäne durch die hier angewandte Größenausschlusschromatographie nicht trennen. Dies führt zu der Vermutung, dass die C-terminale Domäne im nativen Zustand proteolytisch nicht vollständig abgetrennt wird, sondern durch nichtkovalente Wechselwirkungen an der katalytischen Domäne verbleibt.

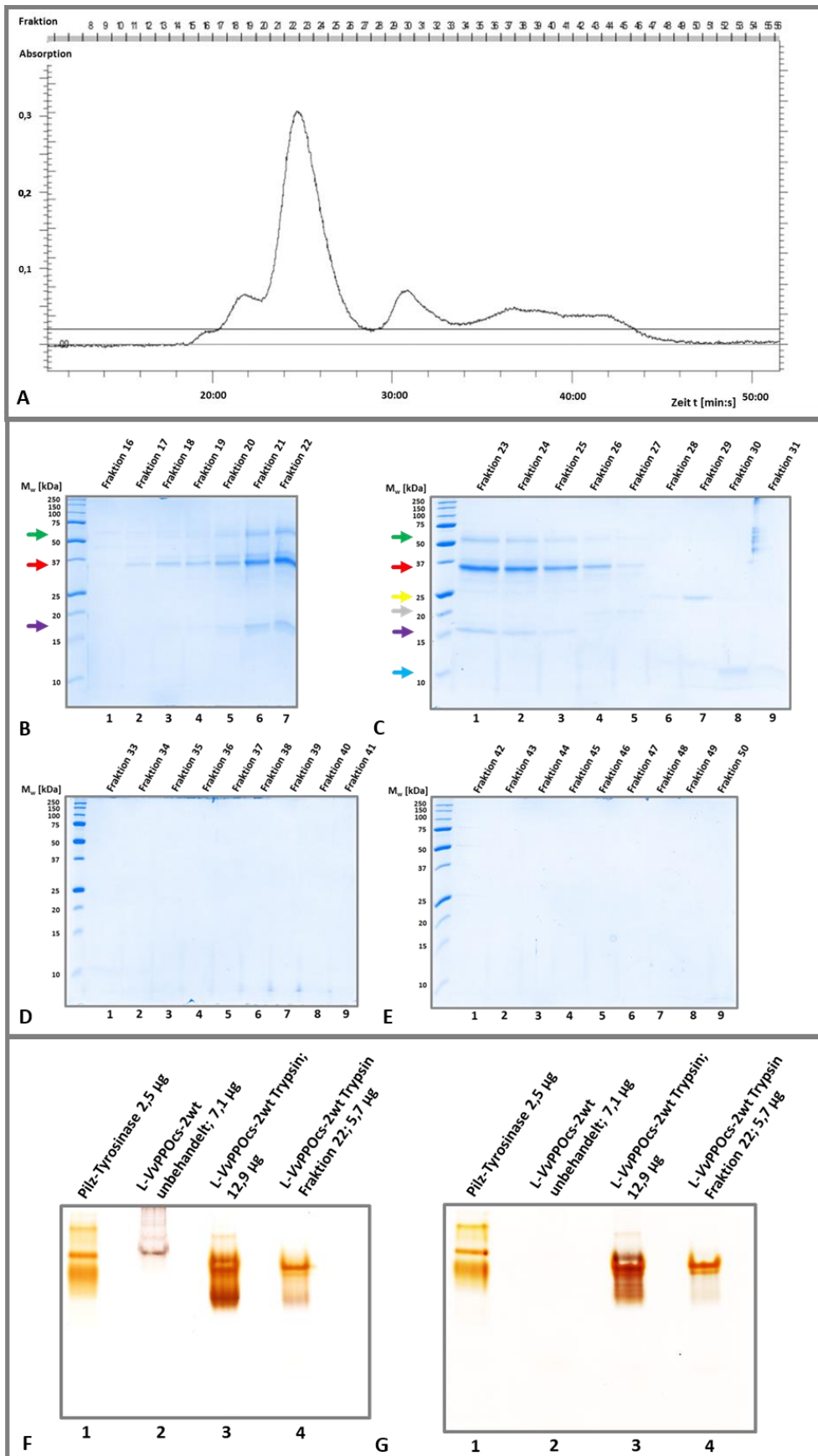


Abbildung 39: Analyse der größenchromatographischen Auftrennung des Trypsin-proteolysierten L-VvPPOcs-2wt. **A:** Laufprofil der Größenchromatographischen Auftrennung. Verwendet wurde eine Superdex 75 10/300 GL Säule (GE Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Schweden) und die FPLC-Anlage

*Biologic DuoFlow (Bio-Rad Laboratories Inc.; CA, USA). Aufgetragen ist die OD₂₈₀ über die Zeit. Das Profil zeigt sechs Absorptionsmaxima, die Peptide verschiedener Größe anzeigen. **B-D**: Proteinnachweis in den durch Größenausschlusschromatographie entstandenen Fraktionen mittels 12, 5 %ige SDS-PAGE. Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). SDS-Marker: Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). In den Fraktionen 17-30 wurde Protein nachgewiesen. Die deutlichste Bande liegt auf Höhe von ca. 34 kDa (roter Pfeil). Fraktion 22 zeigt die intensivste Bandenfärbung (B: Spur 7). Die enthaltenen Peptide entsprechen der katalytischen Domäne (Kap. 3.2.1). In Fraktion 31-49 wurde kein Protein detektiert, was auf die geringe Proteinkonzentration in den Fraktionen zurückzuführen ist. **F-G**: Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC + 10 mM MBTH. **F**: Aktivator: 1,5 mM SDS. pH 4,5. Die Pilz-Tyrosinase dient als Positivkontrolle (Spur 1). Der L-VvPPOcs-2wt wird durch das in der Reaktionslösung vorhandene SDS aktiviert und zeigt nach 5-minütiger Inkubation Diphenolase-Aktivität (Spur 2). Der Trypsin-aktivierte und nicht weiter gereinigte L-VvPPOcs-2wt zeigt einen deutlichen und direkten Umsatz von 4-MC (Spur 3). Der größenchromatographisch gereinigte Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt zeigt eine deutlich schwächere Diphenolase-Aktivität, die nicht ausschließlich auf die geringere Proteinmenge zurückzuführen ist (Spur 4). **G**: pH 6. Kein Aktivator. Die Pilz-Tyrosinase setzt 4-MC um (Spur 1). Aufgrund der fehlenden Aktivierung setzt der L-VvPPOcs-2wt 4-MC nicht um (Spur 2). Nach Trypsin-Aktivierung und ohne weitere Reinigung setzt der L-VvPPOcs-2wt 4-MC effektiv um (Spur 3). Nach größenchromatographischer Reinigung hingegen zeigt sich nur eine intensiv angefärbte Bande (Spur 4).*

3.4 Abtrennung der C-terminalen Domäne mittels Harnstoff

Nach der Proteolyse durch Trypsin scheint die C-terminale Domäne noch an der N-terminalen Domäne zu haften, da diese nicht durch Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.3) voneinander trennbar waren. Somit war es erstmal nicht möglich, das katalytische Spaltpeptid (N-terminale Domäne) zu isolieren und die Aktivität der gereinigten Domäne zu ermitteln. Harnstoff als chaotropes Reagenz vermindert die Wasserstoffbrückenbindungen und ermöglicht die Solvatisierung von unpolaren Gruppen im Innern eines Proteins. Auf diese Weise könnte sich die C-terminale Domäne vom Restprotein lösen. In einer nativen PAGE wird folglich eine zusätzliche nicht aktive Bande (C-terminale Domäne) erwartet. Um die globale Struktur der L-VvPPOcs-2 möglichst wenig zu beeinflussen, wurden zunächst geringe Harnstoffkonzentrationen (< 6 M) gewählt. Da ein Ablösen der C-terminalen Domäne bei sehr hohen Harnstoffkonzentrationen (> 6 M) sicher erwartet wird, wurden diese zur Kontrolle eingesetzt und das Erscheinen einer zweiten Bande auf der nativen PAGE zu provozieren. Die Proben wurden auf eine native PAGE (pH 8,8) aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung sowohl einer Coomassie-Färbung (Kang et al., 2002) als auch einer Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC + 10 mM MBTH unterzogen. Als Vergleich dienten Proben des unverdauten L-VvPPOcs-2wt, die gleichermaßen mit Harnstoff behandelt wurden (Kap. 2.2.10).

Ab einer Konzentration von 8 M Harnstoff, ist eine schwache zusätzliche Bande in der nativen PAGE sichtbar (Abb. 40 B, Spur 7, roter Pfeil), die bei steigender Harnstoffkonzentration deutlicher wird (Abb. 40 C, Spur 5-8, roter Pfeil). Zusätzlich tritt eine weitere Bande auf (Abb. 40 C, Spur 5-8, grüner Pfeil). Im Falle der nicht proteolysierten L-VvPPOcs-2wt zeigt sich keine zusätzliche Bande. In der Aktivitätsfärbung sind die neu aufgetretenen Banden nicht sichtbar. Allerdings wird mit zunehmender Harnstoffkonzentration die Aktivität des L-VvPPOcs-2wt geringer (Abb. 40 D, Spur 6-9), was auf eine

Denaturierung des L-VvPPOcs-2wt hindeutet. Die nicht proteolysierte L-VvPPOcs-2wt hingegen zeigt auch bei hohen Harnstoffkonzentrationen keinen Aktivitätsverlust (Abb. 40 D, Spur 2-5). Die Pilz-Tyrosinase fungiert als Positivkontrolle.

Die zusätzlich auftretenden Banden in der nativen PAGE beim Einsatz von Harnstoffkonzentrationen ≥ 8 M könnten die C-terminale Domäne (bzw. Teile von dieser) darstellen, da sie sowohl nicht aktiv sind als auch nicht bei der nicht proteolysierten L-VvPPOcs-2wt auftreten. Folglich lässt sich die C-terminale Domäne bei Harnstoffkonzentrationen ≥ 8 M von der katalytischen Domäne abtrennen, was aber durch Denaturierung der N-terminalen Domäne zu einem Aktivitätsverlust führt. Damit stellt die Behandlung des proteolysierten L-VvPPOcs-2wt mit Harnstoff keine Option zur Isolierung der intakten katalytischen Domäne dar.

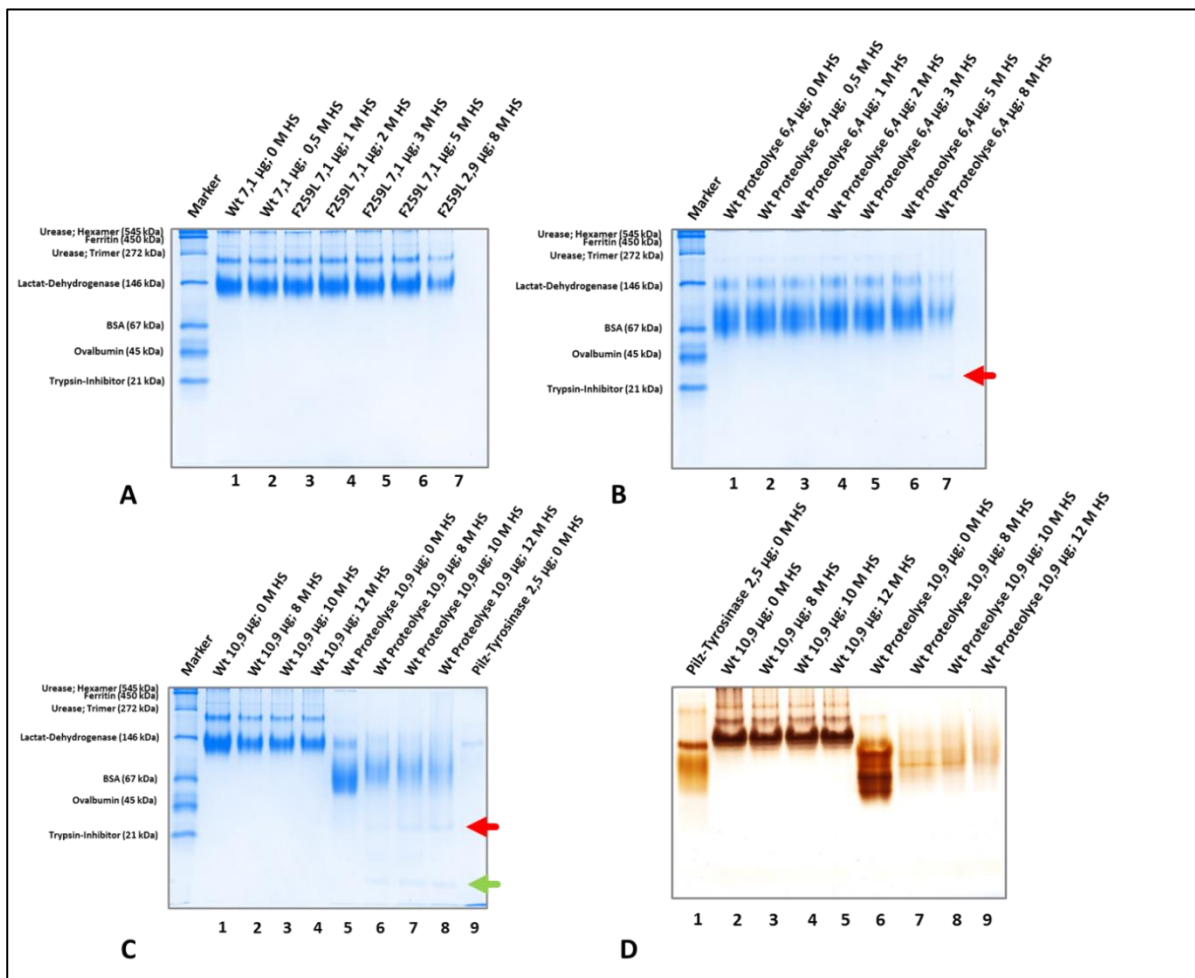


Abbildung 40: Abtrennung der C-terminalen Domäne von der katalytischen Domäne des L-VvPPOcs-2wt nach der Proteolyse mit Trypsin mittels variierender Harnstoffkonzentrationen. 10 % native PAGE. Färbung A-C: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002). D: Aktivitätsfärbung mit 10 mM 4-MC + 10 mM MBTH. Aktivator: 1,5 mM SDS. Marker: Serva Native Marker Liquid Mix. Wt: L-VvPPOcs-2wt- HS: Harnstoff. **A:** Der latente nicht proteolysierte L-VvPPOcs-2wt zeigt nach Behandlung mit 0,5 bis 8 M Harnstoff kein verändertes Bandenmuster. **B:** Der mit Trypsin behandelte L-VvPPOcs-2wt zeigt bei Harnstoffkonzentrationen von 8 M eine zusätzliche Bande und eine geringe Bandenintensität der Hauptbande (Spur 7, roter Pfeil). **C:** Der unbehandelte L-VvPPOcs-2wt zeigt auch bei Harnstoffkonzentrationen bis 12 M keine Veränderungen in der nativen PAGE (Spur 1-4). Der proteolysierte L-VvPPOcs-2wt zeigt zwei weitere Banden (Spur 5-8, roter und grüner Pfeil). **D:** In der Aktivitätsfärbung zeigt der SDS-aktivierte unbehandelte L-VvPPOcs-2wt unabhängig der eingesetzten

Harnstoffaktivität eine konstant intensive Aktivitätsfärbung, während der proteolytierte L-VvPPOcs-2wt mit zunehmender Harnstoffkonzentration an Aktivität verliert. Die in C neu auftretenden Banden (roter, grüner Pfeil) zeigen keine Aktivität. Die Pilz-Tyrosinase dient als Kontrolle für eine technisch erfolgreiche Aktivitätsfärbung.

3.5 Enzymatische Charakterisierung

Bislang sind keine vergleichenden Studien zur enzymatischen Aktivität nach SDS- bzw. proteolytischer Aktivierung von im *Gate-Residue* mutierten pflanzlichen Polyphenoloxidasen bekannt. Für diese Arbeit wurden die enzymatischen Parameter K_M und k_{cat} für den L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G nach SDS- und Trypsin-Aktivierung nach Umsatz von vier ausgewählten Substraten ermittelt (CAT, 4-MC, DA und p-Tyr; Abb. 41). Der Substratumsatz durch den L-VvPPOcs-2wt wurde zunächst qualitativ anhand aktivitätsgefärbter nativer PAGE bei pH 4,5 unter dem Zusatz von 1,5 mM SDS als Aktivator geprüft (Kap. 2.2.8.2). Da der Umsatz aller Substrate deutlich nachweisbar war (Abb. 41), wurden diese in den weiteren kinetischen Messungen eingesetzt.

Die SDS-Konzentration, die für die Aktivierung der L-VvPPOcs-2 optimal ist, wurde aus Solem, 2017 übernommen. Einige Messungen wurden durch [REDACTED] im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt. Diese Daten fließen in die Berechnungen mit ein (Gewehr, 2016).

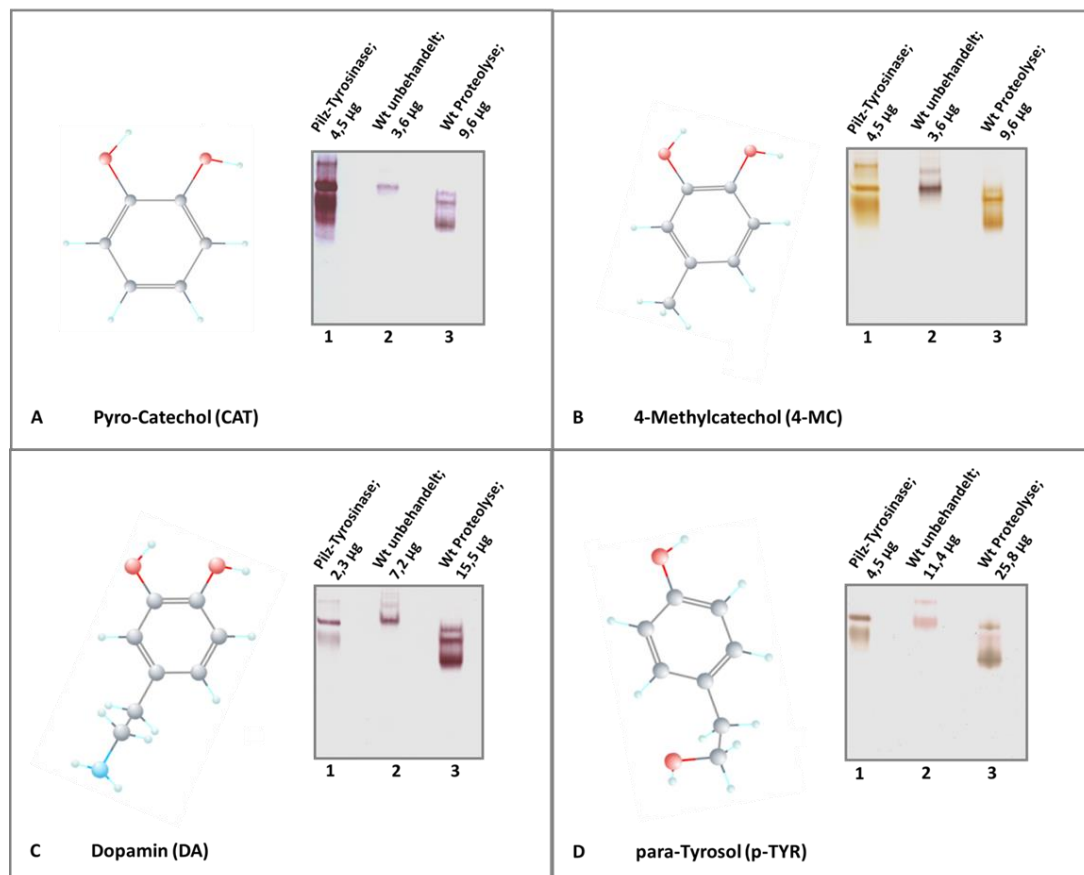


Abbildung 41: Chemische Struktur und qualitativer Umsatz der Substrate 4-Methylcatechol (4-MC; Diphenol), Pyro-Catechol (CAT; Diphenol), Dopamin (DA; Diphenol) und para-Tyrosol (p-TYR; Monophenol). 3D-Konformere und 10 % native PAGE. Aktivitätsfärbung: 10 mM Substrat (Ausnahme:

p-TYR: 9,3 mM) + 10 mM MBTH in Maleat-Tris-Puffer pH 4,5 + 1,5 mM SDS (Aktivator). Die Pilz-Tyrosinase dient als Nachweis einer technisch erfolgreichen Aktivitätsfärbung. 3D-Konformere: Grau: Kohlenstoff, rot: Sauerstoff, hellblau: Wasserstoff, blau: Stickstoff. **A:** Pyro-Catechol (CAT) wird auch als *o*-Dihydroxybenzen bezeichnet und weist zwei Hydroxygruppen an einem Benzolring auf. Es stellt das strukturell kleinste Diphenol dar. Sowohl der SDS-aktivierte als auch der Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt zeigen in der nativen PAGE Aktivität. **B:** 4-Methylcatechol besitzt an der Struktur des CAT am C₄-Atom zusätzlich eine Methylgruppe. Sowohl der SDS- als auch der Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt setzen 4-MC um. **C:** Dopamin ist ein biogenes Amin aus der Klasse der Katecholamine. Es trägt eine Aminoethylgruppe, die ionisch geladen sein kann. Die Aktivitätsfärbung zeigt deutlich, dass der Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2wt DA effektiver umsetzt als der SDS-aktivierte L-VvPPOcs-2wt. **D:** Das Monophenol *p*-Tyrosol ist ein phenolischer Alkohol und nur in geringen Mengen wasserlöslich. Der L-VvPPOcs-2wt setzt *p*-TYR sowohl nach Trypsin- als auch nach SDS-Aktivierung um. Modifiziert nach PubChem: Open Chemical Database (Kim et al., 2015); Aktivitätsgele modifiziert aus Derenbach, 2016.

3.5.1 pH-Abhängigkeit der Aktivität

Bereits in früheren Arbeiten wurde das pH-Optimum für den L-VvPPOcs-2wt nach SDS-Aktivierung ermittelt (Ludwig, 2014; übernommen in Solem 2017), aber die Versuche wurden mit nur einer Reinigungscharge des L-VvPPOcs-2wt und nur in Doppelbestimmung und an einem Tecan Infinite® M1000 PRO Plattenleser durchgeführt. Problematisch bei Messungen am Plattenleser sind die schwierig einzuschätzende Schichtdicke der Probe, die zur Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes notwendig ist (Kap. 2.2.11), und die Tatsache, dass ausfallendes Melanin beim Substratumsatz in den Lichtweg des Spektrometers gelangt und zu Streueffekten führen kann (Ludwig, 2014).

Aus diesem Grund wurden die pH- Optima des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS- und Trypsin-Aktivierung und ohne die Anwesenheit eines Aktivators (Säure-Aktivierung; (Kanade et al., 2006; Dirks-Hofmeister et al., 2012; Leufken et al., 2015) in einer Küvette und an Zweistrahlphotometern in dreifacher Bestimmung gemessen (Kap. 2.2.11). Die pH-Werte zwischen 2 und 9 wurden mit 100 mM Citrat- bzw. Maleat-Tris-Puffer bei 25 °C eingestellt. Als Substrat dienten 10 mM 4-MC. Zur Erstellung der pH-Kurven wurde die katalytische Aktivität (dOD_{405nm}/dt) bestimmt und gegen den pH-Wert aufgetragen (Kap. 2.2.11.2).

Alle ermittelten pH-Kurven zeigen den für Enzyme charakteristischen Verlauf einer Optimumkurve (Abb. 42). Für alle drei Konstrukte gilt für den pH-Wert der maximalen Aktivität:

$pH_{max}(\text{Säure}) < pH_{max}(\text{Trypsin}) < pH_{max}(\text{SDS})$. Die pH Kurven des L-VvPPOcs-2wt zeigen ein pH-Optimum nach SDS-Aktivierung bei pH 5,5; nach Trypsin-Aktivierung bei pH 4,5; und ohne Aktivator (Säure-Aktivierung) bei pH 3,5 (Abb. 42 A-C).

pH-Kurven des L-VvPPOcs-2wt

Nach SDS-Aktivierung ist der Umsatz von 4-MC zwischen pH 4,5 und pH 6 am höchsten. Unter pH 4,5 und über pH 6 ist hingegen nur eine geringe Aktivität detektierbar (Abb. 42 A). Zwischen pH 2 und pH 3,5 ist kein Substratumsatz messbar, da es zur Präzipitation in der Reaktionslösung kommt (Kap. 3.5.2).

Nach Trypsin-Aktivierung zeigt der L-VvPPOcs-2wt in einem breiteren pH Bereich (pH 3,5 – 7) höhere Aktivität. Es kommt zu keiner Präzipitation im sauren Bereich. Das pH-Optimum liegt bei pH 4,5 und damit eine pH-Einheit weiter im sauren Bereich als nach der Aktivierung durch SDS.

Bei einem pH-Wert von 6,5 ist ein zusätzlicher kleiner Peak feststellbar, dessen Ursache unklar ist (Abb. 42 A).

Das pH-Optimum nach Säureaktivierung liegt für den L-VvPPOcs-2wt bei pH 3,5 und Substratumsatz ist nur im sauren pH-Bereich detektierbar. Die katalytische Aktivität beträgt nur ca. 25 % der Aktivität nach Trypsin-Aktivierung (Abb. 42 A).

Der Substratumsatz ist an den ermittelten pH-Optima nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung gering, so dass der additive Einfluss der pH-Aktivierung auf Aktivitätsmessungen nach Trypsin- bzw. SDS-Aktivierung bei diesen pH-Werten gering einzuschätzen ist.

Auffällig ist, dass die katalytische Aktivität bei pH 3,5 ohne Aktivator höher ist als nach Trypsin-Aktivierung. Eventuell kommt es durch den sauren pH-Wert zur Beeinflussung der katalytischen Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt, so dass ein Aktivitätsverlust die Folge ist (Abb. 42 A).

pH-Kurven des Muteins L-VvPPOcs-2-F259L

Der Verlauf der pH-Optimumkurven des Muteins L-VvPPOcs-2-F259L ist ähnlich zu denen des L-VvPPOcs-2wt. Auch hier liegen die pH-Optima nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung bei pH 5,5 bzw. pH 4,5. Nach der Aktivierung durch sauren pH ist das Optimum um 0,5 pH-Einheiten auf pH 4 verschoben (Abb. 42 B).

Im pH-Bereich < 3 ist nach SDS-Aktivierung ebenfalls ein Präzipitat in der Reaktionslösung und ein Aktivitätsverlust feststellbar.

Die katalytische Aktivität der L-VvPPOcs-2-F259L nach Trypsin-Aktivierung bei pH 4,5 ist fast gleich hoch wie die Aktivität des L-VvPPOcs-2wt bei identischen Versuchsbedingungen. Nach SDS-Aktivierung beträgt die Aktivität des Muteins -F259L bei pH 5,5 nur 50 % der Aktivität des L-VvPPOcs-2wt (Abb. 42 D).

pH-Kurven des Muteins L-VvPPOcs-2-F259G

Das Mutein L-VvPPOcs-2-F259G zeigt die geringste Aktivität nach allen Aktivierungsmechanismen, aber einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die pH-Kurven des L-VvPPOcs-2wt und des Muteins -F259L

(Abb. 42 C-F). Die Kurve nach Säure-Aktivierung zeigt jedoch einen flacheren Verlauf als die für den L-VvPPOcs-2wt und -F259L ermittelten Werte (Abb. 42 F).

Die deutlichste stärkste Aktivität zeigt das Mutein nach Trypsin-Aktivierung (Abb. 42 C). Allerdings setzen der L-VvPPOcs-2wt und das Mutein -F259L das Substrat bei pH 4,5 ca. 1,6 x stärker um (Abb. 42 E). Der Substratumsatz des Muteins -F259G nach SDS-Aktivierung ist hingegen gering (Abb. 42 C): Der L-VvPPOcs-2wt zeigt eine 13-fach und das Mutein -F259L eine 6-fach höhere Aktivität als -F259G (Abb. 42 D).

Die pH-Optima liegen identisch zu denen der Mutante -F259L bei pH 5,5 nach SDS-Aktivierung, pH 4,5 nach Trypsin-Aktivierung und pH 4 nach Säure-Aktivierung (Abb. 42 C). Die Aktivität nach Säure-Aktivierung ist absolut bei pH 4 höher als der höchste Wert nach SDS-Aktivierung. Die Aktivierung durch SDS scheint folglich am wenigsten erfolgreich.

Auffällig ist, dass die L-VvPPOcs-2-F259G nach allen drei Aktivierungsmechanismen bis pH 3,5 keine Aktivität zeigt (Abb. 42 C). Ein Präzipitat konnte aber analog zum L-VvPPOcs-2wt und L-VvPPOcs-2-F259L nur nach SDS-Aktivierung im sauren pH Bereich nachgewiesen werden.

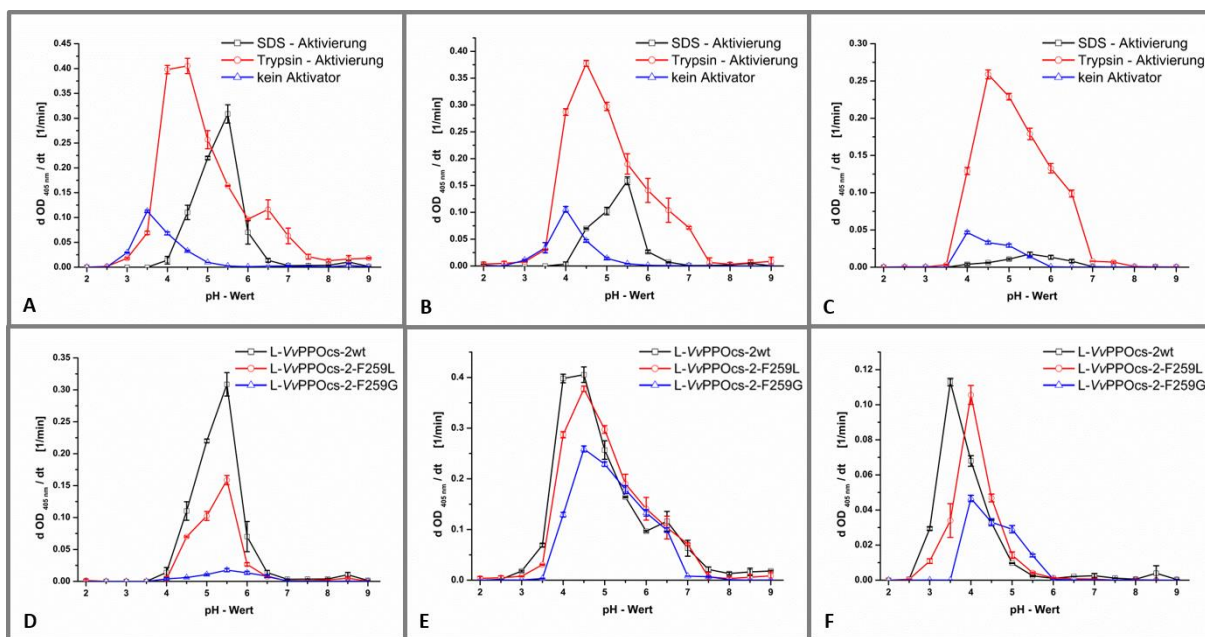


Abbildung 42: pH-Optimumkurven des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-, Trypsin- und Säure-Aktivierung. Die katalytische Aktivität (dOD_{405nm}/dt) wurde durch den Umsatz von 10 mM 4-MC bei 25 °C ermittelt. $[L-VvPPOcs-2] = 0,8 \mu M$. Die pH-Werte wurden mit Citrat-Puffer (pH 2 - pH 3,5) bzw. Maleat-Tris-Puffer (pH 4 - pH 9) eingestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus mindestens drei Messwerten an. Die Messpunkte symbolisieren die gemittelten Messwerte. **A-C:** Vergleich der pH-Kurven nach SDS-, Trypsin- und Säureaktivierung für den L-VvPPOcs-2wt (**A**) und die Muteine -F259L (**B**) und -F259G (**C**). Die pH-Optima liegen bei pH 5,5 nach SDS-Aktivierung, pH 4,5 nach Trypsin-Aktivierung und pH 3,5 (L-VvPPOcs-2wt) bzw. pH 4 (-F259L und -F259G) nach Säure-Aktivierung. **D-F:** Vergleich der Optimumkurven des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für SDS-, Trypsin, und Säure-Aktivierung. Die Kurvenverläufe ähneln sich. Nach SDS-Aktivierung zeigt der L-VvPPOcs-2wt 13-fach höhere Aktivität als das Muteins -F259G (**D**). Nach Trypsin-Aktivierung ist die Aktivität des L-VvPPOcs-2wt ähnlich der des Muteins -F259L. Die Aktivitäten sind 1,6-fach höher als die des Muteins -F259G (**E**). Nach Säure-Aktivierung zeigen L-VvPPOcs-2wt und L-VvPPOcs-2-F259L eine ca. 2,5-fach höhere Aktivität als das Mutein -F259G (**F**).

Zusammenfassend sind alle pH-Optima in Tab. 16 festgehalten. Die im Folgenden ermittelten Enzymkinetiken sind ausnahmslos an den pH-Optima gemessen worden. Nach SDS-Aktivierung kommt es im sauren pH-Bereich zu einer Präzipitation in der Reaktionslösung. Diese wird im Folgenden weiter analysiert.

		Aktivierungsmechanismus		
		SDS	Trypsin	Säure
L-VvPPOcs-2	wt	pH 5,5	pH 4,5	pH 3,5
	-F259L	pH 5,5	pH 4,5	pH 4,0
	-F259G	pH 5,5	pH 4,5	pH 4,0

Tabelle 16: pH-Optima der L-VvPPOcs-2 nach SDS-, Trypsin- und Säure-Aktivierung.

3.5.2 Präzipitation der L-VvPPOcs-2 bei saurem pH und SDS

Sowohl im Aktivitätsschnelltest (Kap. 3.1.3) als auch bei Messung der pH-Optimumkurven (Kap. 3.5.1) kam es in einem sauren Milieu unter Zusatz von SDS zur Bildung eines Präzipitats. Da dieses unmittelbar nach Zugabe der L-VvPPOcs-2 auftrat, wird angenommen, dass es sich bei dem Präzipitat um die L-VvPPOcs-2 handelt.

Um die Hypothese zu verifizieren, wurde das Präzipitat abzentrifugiert und Pellet und Überstand auf eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetragen, um in beiden Fraktionen Protein zu detektieren (Kap. 2.2.4.1). Als Vergleichsprotein wurde Albumin gewählt und analog behandelt. Proben von unbehandeltem L-VvPPOcs-2wt und Albumin dienen als Referenz (Abb. 43 Spur 1, roter Rahmen; Spur 4 (grüner Rahmen)). Albumin ($M_w = 66$ kDa) ruft eine prominente Bande bei ca. 66 kDa hervor. Die darunterliegende Bande ist wahrscheinlich auf Verunreinigung der bei Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) gekauften Probe zurückzuführen.

Im Überstand beider Proben wurde kein Protein detektiert (Abb. 43 Spur 2; Spur 5). Im Pellet ist aber sowohl bei der Probe des L-VvPPOcs-2wt (Spur 3) als auch des Albumins (Spur 6) Protein nachweisbar. Die Probe des Pellets des L-VvPPOcs-2wt zeigt ein multiples Bandenmuster, das anzeigt, dass es zur Fragmentierung des L-VvPPOcs-2wt kam. Die Bande auf Höhe von ca. 60 kDa (Abb. 43, Spur 3, roter Rahmen) ist nur noch schwach angefärbt.

In der Probe des Pellets des Albumins sind ebenfalls mehrere Banden sichtbar, jedoch weist die 66 kDa-Bande fast gleiche Intensität wie in der Probe des unbehandelten Albumins auf (Abb. 43, Spur 4; Spur 6). Der Fragmentierungseffekt ist deutlich geringer.

Worauf die starke Fragmentierung des L-VvPPOcs-2wt unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist, kann mit diesem Experiment nicht geklärt werden.

Im sauren Milieu kommt es nach SDS-Aktivierung folglich zur Präzipitation der L-VvPPOcs-2. Die Fragmentierung führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust, was den ausbleibenden Substratumsatz trotz der Anwesenheit zweier Aktivatoren (saurer pH, SDS) erklärt.

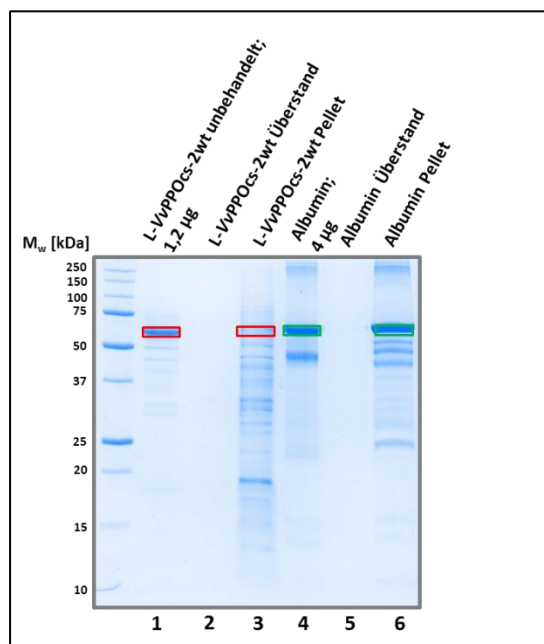


Abbildung 43: Analyse des Präzipitates der L-VvPPOcs-2wt und Albumin bei pH 3 und SDS-Zusatz. 10 %ige SDS-PAGE, Färbung: Coomassie nach Kang (Kang et al., 2002), Marker: SDS-Marker Precision Plus Standard Unstained (BioRad, München). **Spur 1:** Der unbehandelte L-VvPPOcs-2wt zeigt die charakteristische Bande bei ca. 60 kDa (roter Rahmen). **Spur 2:** Im Überstand konnte kein Protein detektiert werden, während im Pellet Protein in einem multiplen Bandenmuster nachweisbar ist (**Spur 3**). **Spur 4:** Unbehandeltes Albumin ruft eine Bande auf Höhe von ca. 66 kDa hervor (grüner Rahmen). Im Überstand ist kein Protein nachweisbar (**Spur 5**). Das Pellet enthält Protein (**Spur 6**). Der Fragmentierungseffekt ist deutlich geringer als in der Probe des L-VvPPOcs-2wt.

3.5.3 Bestimmung der Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte

Für einige Mono- und Diphenole sind die Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte bekannt. Diese können jedoch in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen stark variieren. Aus diesem Grund wurden die Absorptionsmaxima (λ_{\max}) der Chinone, die aus dem Umsatz phenolischer Substrate durch die L-VvPPOcs-2 entstehen, unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen ermittelt. Bei den Wellenlängen λ_{\max} werden im Folgenden die Enzymkinetiken gemessen (Tab. 17). Die Spektren sind Anhang H zu entnehmen.

Substrat	λ_{\max} des korrespondierenden Chinons
4-MC	405 nm
CAT	400 nm
DA	475 nm
p-TYR	400 nm

Tabelle 17: Übersicht über die λ_{\max} der aus den eingesetzten Substraten entstehenden Chinone.

3.5.4 Enzymkinetiken

In der Vergangenheit wurden Enzymkinetiken an vielen Tyrosinasen und Polyphenoloxidasen gemessen. Jedoch ist bislang keine Studie bekannt, die die enzymatischen Parameter nach SDS- und proteolytischer Aktivierung für eine rekombinante pflanzliche PPO und zweier im *Gate-Residue* veränderten Muteine vergleicht. Die folgenden Ergebnisse geben u.a. Hinweise über die Rolle des *Gate-Residue* nach SDS- bzw. proteolytischer Aktivierung.

Eine Erläuterung der ermittelten Parameter ist Kap.2.2.11.3 zu entnehmen. Die Messungen fanden an den ermittelten pH-Optima und Wellenlängen der maximalen Absorption der korrespondierenden Produkte statt (Kap. 3.5.1, 3.5.3). Die eingesetzte Konzentration der L-VvPPOcs-2 betrug 0,8 μM für Diphenole und 3,2 μM für Monophenole. Die Aktivierung fand mit 1,5 mM SDS (Solem, 2017) bzw. Trypsin (Kap. 2.2.7) statt. Die *Delay-Zeit* (Zeit zwischen Start der Reaktion und Beginn der Messung) betrug 15 s.

4-Methylcatechol

Zur Messung des Umsatzes des Diphenols 4-MC wurde die Änderung der OD bei $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$ bei zehn verschiedenen Substratkonzentrationen zwischen 0,5 und 50 mM aufgezeichnet (Kap. 2.2.11.3). Auffällig ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten für $[S] \geq 20 \text{ mM}$ abfallen (für L-VvPPOcs-2wt und -F259L; Abb. 44 A, C). Ähnliches wurde für die PPO aus *Taraxacum officinale* beobachtet und vermutet, dass eine Substratinhibition ursächlich für die abfallenden Reaktionsgeschwindigkeiten sei (Dirks-Hofmeister et al., 2012). Versuche, die Substratinhibition durch die Einführung des Parameters K_i in die Michaelis-Menten-Gleichung mathematisch zu integrieren (Gleichung 6), führten zu Regressionskurven, deren Funktionsvorschrift die Messwerte nicht folgten (Daten nicht gezeigt).

$$v([S]) = \frac{v_{\text{max}}[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Aus diesem Grund wurden nur Messwerte für Substratkonzentrationen bis zu 20 mM für die eine Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung berücksichtigt (Kap. 2.2.11.3; Abb. 44 B, D, F, G, H). Zu beachten ist hierbei, dass der Umsatz von 4-MC keine Sättigung zeigt, was im Michaelis-Menten-Modell zu einer Unterschätzung der Parameter K_M und v_{max} führt.

Da das Bestimmtheitsmaß für alle Regressionen $R^2 > 0,98$ (Ausnahme: L-VvPPOcs-2wt nach Trypsin-Aktivierung mit p-TYR: $R^2 = 0,96773$) war, wird die Regression als gelungen betrachtet und die enzymatischen Parameter K_M , v_{max} und k_{cat} in Tab. 18 dargestellt.

Ein Vergleich der enzymatischen Parameter erfolgt nun im Folgenden auf Ebene der SDS-Aktivierung bzw. proteolytische Aktivierung zwischen dem L-VvPPOcs-2wt und den Muteinen -F259L und -F259G.

SDS-Aktivierung

Die Substrataffinität des Muteins -F259G ist nach SDS-Aktivierung stärker als die des Wildtyps und -F259L (-F259G: $K_M = 5,2 \pm 0,5$ mM; WT: $K_M = 8,6 \pm 0,9$ mM; -F259L: $K_M = 10,8 \pm 1,5$ mM; Tab. 18). Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen liegen die K_M -Werte aber eng beieinander.

Die Wechselzahl zeigt deutlich, dass der L-VvPPOcs-2wt das Substrat 4-MC am effektivsten umsetzt ($k_{cat} = 11,5 \pm 0,6$ s⁻¹). Das Mutein -F259L weist mit einer Wechselzahl von $k_{cat} = 5,5 \pm 0,4$ s⁻¹ einen nur halb so hohen und das Mutein -F259G einen ca. 29-fach ($k_{cat} = 0,38 \pm 0,02$ s⁻¹) niedrigen Substratumsatz auf. Dies bestätigt auch die visuellen Eindrücke des Aktivitätsschnelltestes (Kap. 3.1.3).

Trypsin-Aktivierung

Nach proteolytischer Aktivierung weist das Mutein L-VvPPOcs-2-F259L die höchste Substrataffinität auf, und zeigt damit eine 6-fach erhöhte Affinität im Vergleich zur SDS-Aktivierung ($K_M = 1,8 \pm 0,1$ mM; Tab. 18). Der L-VvPPOcs-2wt setzt das Substrat 4-MC auch nach Trypsin-Aktivierung am effektivsten um (WT: $k_{cat} = 11,1 \pm 0,2$ s⁻¹; -F259L: $k_{cat} = 8,0 \pm 0,2$ s⁻¹; -F259G: $k_{cat} = 4,0 \pm 0,2$ s⁻¹). Auffällig ist, dass bei den Ergebnissen für das Mutein -F259G sowohl nach Trypsin-Aktivierung als auch nach SDS-Aktivierung kein Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeiten für hohe Substratkonzentrationen festgestellt werden konnte.

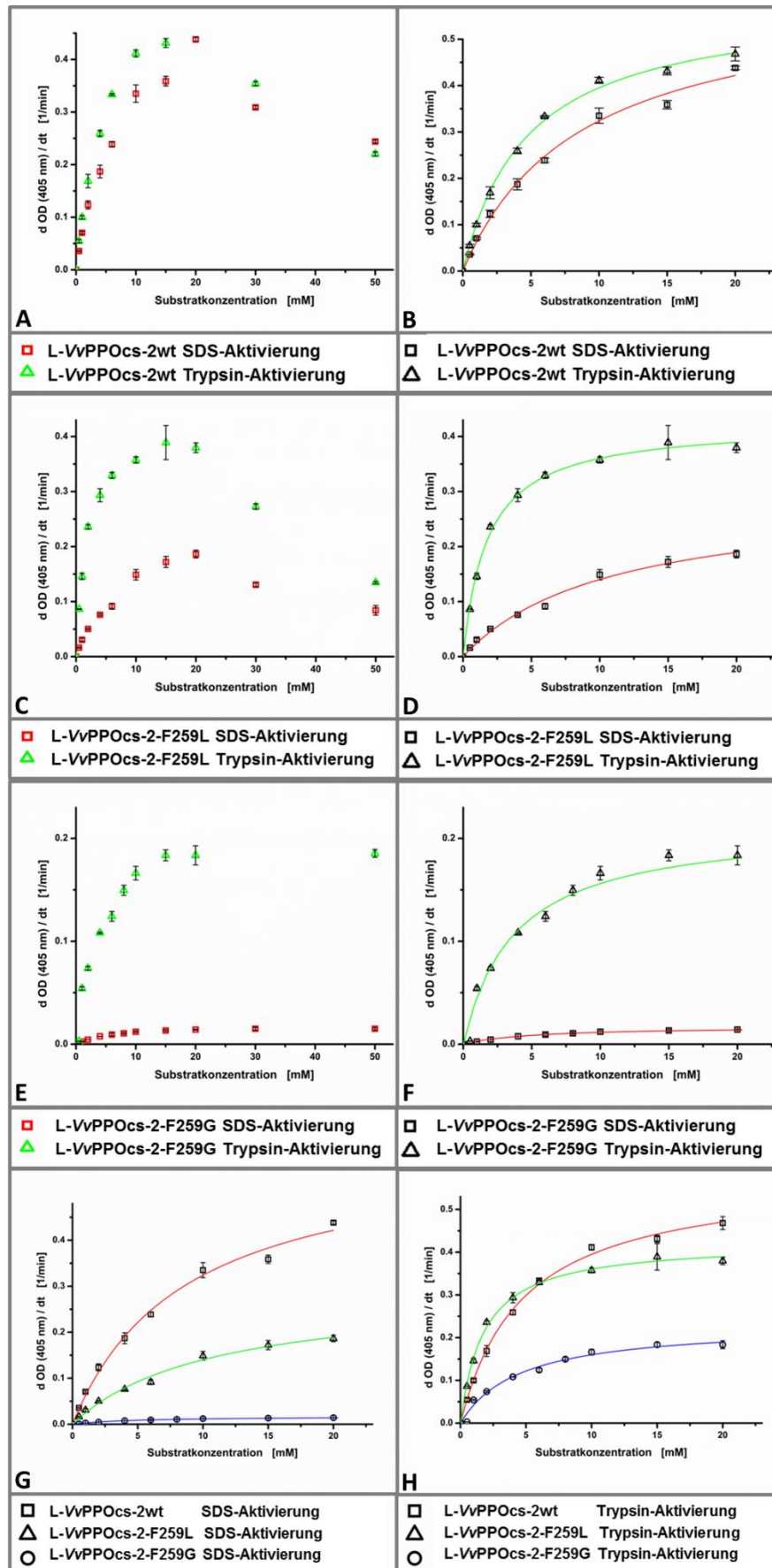


Abbildung 44: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von 4-MC nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Die

Enzymkonzentration betrug $0,8 \mu\text{M}$. Messtemperatur $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Aktivierung der L-VvPPOcs-2 mit $1,5 \text{ mM}$ SDS oder Trypsin (Kap. 2.2.7). $\text{pH} = 4,5$ (Trypsin) oder $\text{pH} = 5,5$ (SDS). Messwellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$. **A-F**: SDS-Aktivierung: rot, Trypsin-Aktivierung: grün. **A-B**: Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt; L-VvPPOcs-2-F259L: **C-D**; L-VvPPOcs-2-F259G: **E-F** in Abhängigkeit der 4-MC-Konzentration. Der Rückgang der Umsatzgeschwindigkeiten ab $[4\text{-MC}] \geq 20 \text{ mM}$ folgt nicht dem mathematischen Modell der Substratinhibition (**A, C, E**), weswegen nur die Reaktionsgeschwindigkeiten für $[4\text{-MC}] \leq 20 \text{ mM}$ per nichtlineare Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst wurden (**B, D, F**). Nach Trypsin-Aktivierung liegt die maximal ermittelte Umsatzgeschwindigkeit der L-VvPPOcs-2 höher als nach SDS-Aktivierung (**B, D, F**). **G-H**: Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-Aktivierung (**G**) bzw. Trypsin-Aktivierung (**H**). Alle Werte wurden mindestens dreimal gemessen. Die dargestellten Messpunkte geben den Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. L-VvPPOcs-2wt: SDS – $R^2 = 0,99587$; Trypsin – $R^2 = 0,9974$; -F259L: SDS – $R^2 = 0,99425$; Trypsin – $R^2 = 0,9965$; -F259G: SDS – $R^2 = 0,99091$; Trypsin – $R^2 = 0,9893$.

Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
	Aktivator		Aktivator		Aktivator	
	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
K_M [mM]	$8,6 \pm 0,9$	$4,7 \pm 0,3$	$10,8 \pm 1,5$	$1,8 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,5$
v_{\max} [dOD /min]	$0,60 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,001$	$0,21 \pm 0,01$
v_{\max} [μM /min]	$550,5 \pm 27,5$	$532,1 \pm 9,2$	$266,1 \pm 18,3$	$385,3 \pm 9,2$	$18,3 \pm 0,9$	$192,7 \pm 9,2$
k_{cat} [1/s]	$11,5 \pm 0,6$	$11,1 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,02$	$4,0 \pm 0,2$
k_{cat} / K_M [$\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$]	$1,3 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,3$	$0,08 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,2$

Tabelle 18: Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols 4-MC. Die Umrechnung der Umsatzgeschwindigkeiten in die Stoffmenge pro Zeit gelang über das Lambert-Beer'sche Gesetz und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 1090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dirks-Hofmeister et al., 2014). Die Fehler geben den absoluten Fehler an und wurden durch Origin® innerhalb der nichtlinearen Regression (K_M , v_{\max}) ausgegeben bzw. berechnet.

Umsatz von Pyro-Catechol

Der Extinktionskoeffizient zur Berechnung der Umsatzraten des Diphenols Pyro-Catechol (CAT, $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$) beträgt $\epsilon = 1197 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kap. 2.2.11.3). Die eingesetzten Substratkonzentrationen lagen zwischen $0,1 - 50 \text{ mM}$. Die Messwerte zeigen nur geringe Abweichung vom Verlauf der Regressionskurve (Abb. 45).

SDS-Aktivierung

Nach Aktivierung durch SDS zeigt der L-VvPPOcs-2wt die höchste Katalyserate ($k_{\text{cat}} = 3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 19). Anteilig davon setzt das Mutein -F259G nur 10 % ($k_{\text{cat}} = 0,35 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$) und das Mutein -F259L 40 %

($k_{\text{cat}} = 1,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$) der Substratmoleküle pro Sekunde um. Mit kleiner werdendem *Gate-Residue* sinkt folglich die Wechselzahl.

Die Substrataffinität bleibt hingegen trotz Substitution des *Gate-Residue* weitgehend konstant (L-VvPPOcs-2wt: $K_M = 14,4 \pm 1,9 \text{ mM}$; L-VvPPOcs-2-F259L: $K_M = 9,4 \pm 1,0 \text{ mM}$; L-VvPPOcs-2-F259G: $K_M = 13,8 \pm 1,3 \text{ mM}$) (Tab. 19). Eine Korrelation zwischen der Affinität des CAT zum aktiven Zentrum und der Größe des *Gate-Residue* ist nicht nachweisbar. Dementsprechend nimmt die aus K_M und k_{cat} abgeleitete katalytische Effizienz für CAT mit kleiner werdendem *Gate-Residue* nach SDS-Aktivierung ab.

Trypsin-Aktivierung

Die Wechselzahl für den Umsatz von CAT ist nach der Aktivierung der L-VvPPOcs-2 durch Trypsin bei der Mutante -F259L am höchsten ($k_{\text{cat}} = 7,3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 19). Das Mutein -F259G weist eine kleinere Wechselzahl ($k_{\text{cat}} = 5,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$) auf und auch der Wildtyp setzt 40 % weniger Substratmoleküle um ($k_{\text{cat}} = 4,4 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$). Die Substrataffinitäten des Wildtyps und der Muteine -F259L und -F259G liegen nach der Trypsin-Aktivierung in einer ähnlichen Größenordnung (L-VvPPOcs-2wt: $K_M = 12,2 \pm 0,9 \text{ mM}$; L-VvPPOcs-2-F259L: $K_M = 11,9 \pm 1,0 \text{ mM}$; L-VvPPOcs-2-F259G: $K_M = 9,2 \pm 0,6 \text{ mM}$), d.h. die Mutation des *Gate-Residue* hat beim Umsatz des Substrates CAT und nach Freilegung des aktiven Zentrums durch Trypsin-Aktivierung nur einen geringen Effekt auf die Affinität der L-VvPPOcs-2 zum Catechol. Die katalytische Effizienz der Muteine (-F259L: $0,61 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; -F259G: $0,54 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) zeigt einen geringfügig höheren Wert als die katalytische Effizienz des Wildtyps ($0,36 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; Tab. 19). Dies lässt den Schluss zu, dass das *Gate-Residue* nach der Aktivierung durch Trypsin wenig Einfluss auf die Substrataffinität dafür aber auf die Katalyserate hat.

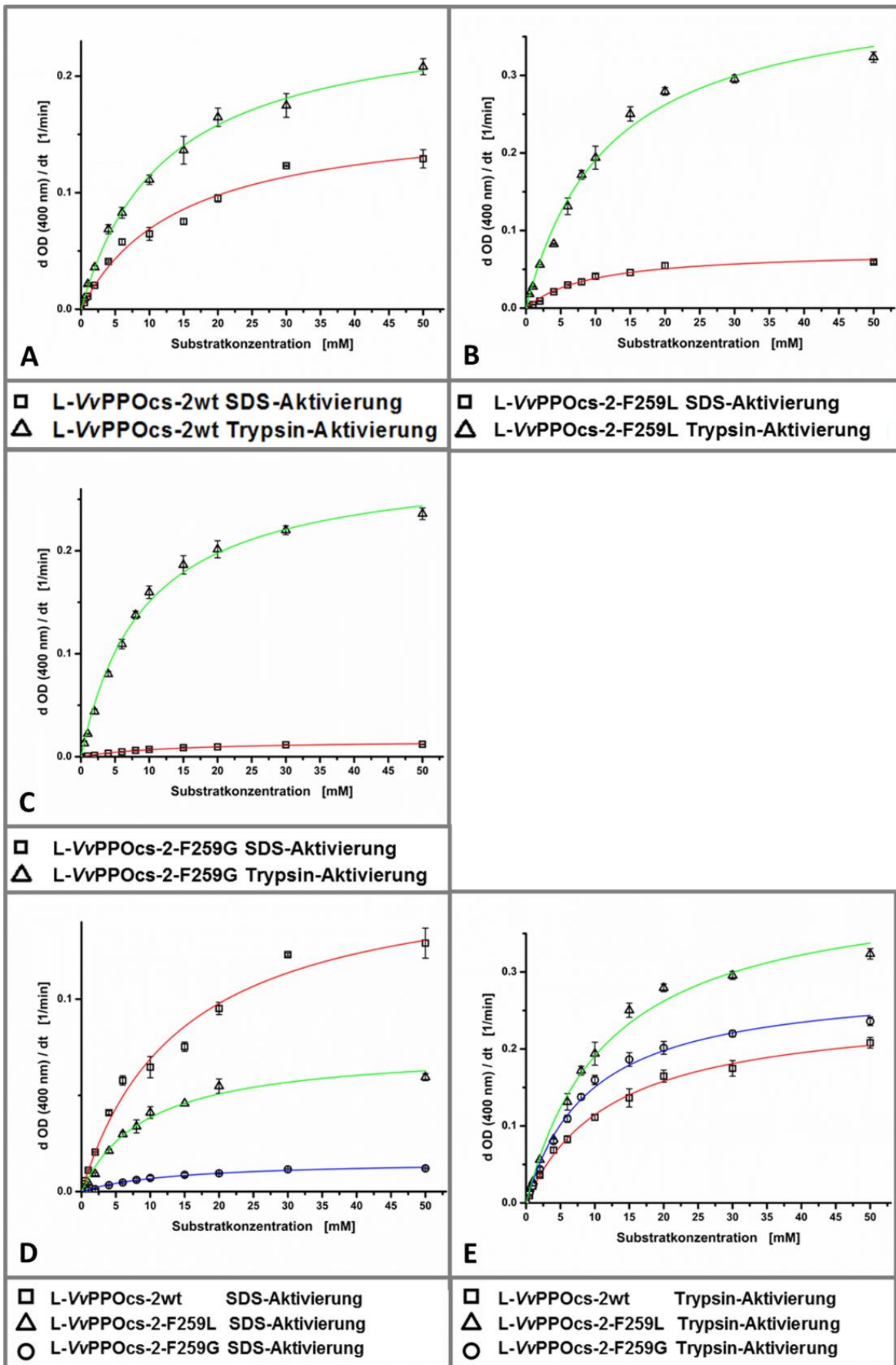


Abbildung 45: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von CAT nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Die Enzymkonzentration betrug 0,8 μ M. Messtemperatur $T = 25$ °C. Aktivierung der L-VvPPOcs-2 mit 1,5 mM

SDS oder Trypsin (Kap. 2.2.7). pH = 4,5 (Trypsin) oder pH = 5,5 (SDS). Messwellenlänge $\lambda = 400$ nm. **A-C:** SDS-Aktivierung: rot, Trypsin-Aktivierung: grün. **A:** Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt; L-VvPPOcs-2-F259L: **B;** L-VvPPOcs-2-F259G: **C** in Abhängigkeit der CAT-Konzentration. Nach Trypsin-Aktivierung liegt die maximal ermittelte Umsatzgeschwindigkeit der L-VvPPOcs-2 höher als nach SDS-Aktivierung (**A, B, C**). **D-E:** Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-Aktivierung (**D**) bzw. Trypsin-Aktivierung (**E**). Alle Werte wurden mindestens dreimal gemessen. Die dargestellten Messpunkte geben den Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. L-VvPPOcs-2wt: SDS – $R^2 = 0,9901$; Trypsin – $R^2 = 0,99621$; -F259L: SDS – $R^2 = 0,99072$; Trypsin – $R^2 = 0,99509$; -F259G: SDS – $R^2 = 0,99349$; Trypsin – $R^2 = 0,99712$.

Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
	Aktivator		Aktivator		Aktivator	
	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
K_M [mM]	14,4 ± 1,9	12,2 ± 0,9	9,4 ± 1,0	11,9 ± 1,0	13,8 ± 1,3	9,2 ± 0,6
v_{max} [dOD / min]	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,07 ± 0,003	0,42 ± 0,01	0,02 ± 0,001	0,29 ± 0,007
v_{max} [μM / min]	142,0 ± 8,4	208,9 ± 8,4	58,5 ± 2,5	350,9 ± 8,4	16,7 ± 0,8	242,3 ± 5,8
k_{cat} [1/s]	3,0 ± 0,2	4,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	7,3 ± 0,2	0,35 ± 0,02	5,0 ± 0,1
k_{cat} / K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,025 ± 0,002	0,54 ± 0,03

Tabelle 19: Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols CAT. Die Umrechnung der Umsatzgeschwindigkeiten in die Stoffmenge pro Zeit gelang über das Lambert-Beer'sche Gesetz und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 1197 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dirks-Hofmeister et al., 2014). Die Fehler geben den absoluten Fehler an und wurden durch Origin® innerhalb der nichtlinearen Regression (K_M , v_{max}) ausgegeben bzw. berechnet.

Umsatz von Dopamin

Die chemische Struktur des Dopamins ($\lambda_{max} = 475$ nm, $\epsilon = 3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Kap. 2.2.11.3) weist eine protonierbare Aminogruppe auf (Abb. 41). Somit hängt die Ladung des Substratmoleküls vom pH-Wert der Reaktionslösung ab. In der Literatur findet dies jedoch bislang kaum Beachtung. Alle Substrate werden bei gleichen pH-Werten gemessen (Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al. 2014, Fronk & Jaeckels, 2016). Dies ist argumentativ nachvollziehbar, wenn nur ein Aktivierungsmechanismus betrachtet wird.

Bei der Messung und Analyse der spektroskopischen Daten für diese Arbeit fiel auf, dass die Katalyserate des L-VvPPOcs-2wt nach Aktivierung durch Trypsin 75 % niedriger war als nach der Aktivierung durch SDS (Tab. 20). Dies war zuvor weder für den Umsatz von 4-MC noch CAT zu beobachten. Da sich die für 4-MC ermittelten pH-Optima für SDS und Trypsin-Aktivierung in einer

pH-Einheit unterscheiden, wurde angenommen, dass die niedrige Katalyserate des L-VvPPOcs-2wt nach Trypsin-Aktivierung auf den saureren pH-Wert von 4,5 zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden weitere Messungen nach Trypsin-Aktivierung bei pH 5,5 vorgenommen. Die Katalyserate für den Umsatz von DA bei pH 5,5 nach Trypsin-Aktivierung ist 3,6-fach höher als in saurerem Milieu bei pH 4,5. Allerdings sinkt die Substrataffinität um ca. 50 % (Tab. 20), so dass die katalytische Effizienz bei pH 5,5 geringer ist als bei pH 4,5 (Tab. 20, Abb. 46). Für die Muteine konnte bei pH 5,5 keine höhere Katalyserate festgestellt werden. Die Substrataffinität lag in einem ähnlichen Bereich wie bei Messungen in einem pH-Bereich von 4,5 (Daten nicht gezeigt). Es ist folglich festzuhalten, dass der pH-Wert des Reaktionsmediums Einfluss auf die Ladung der Substratmoleküle hat. Dies beeinflusst die Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt, aus denen sich die enzymatischen Parameter berechnen. Die Muteine hingegen zeigen bei den Messungen bei pH 5,5 kaum eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu den Messungen bei pH 4,5. Dies erschwert den Vergleich zwischen den enzymatischen Parametern nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung, lässt aber dennoch einen Vergleich zwischen Wildtyp und Muteinen innerhalb eines Aktivierungsmechanismus zu.

SDS-Aktivierung

Die Affinität der L-VvPPOcs-2 nimmt mit kleiner werdendem *Gate-Residue* deutlich ab. Der K_M -Wert des Muteins -F259G liegt 5,7-fach höher als der K_M -Wert des Wildtyps. Das Mutein -F259L weist mit $K_M = 4,8 \pm 0,5$ mM eine ähnliche Substrataffinität wie der Wildtyp ($K_M = 3,8 \pm 0,2$ mM) auf. Zusätzlich ist die Katalyserate der Muteine ca. 10-fach kleiner als die des Wildtyps (Tab. 20). Das Mutein -F259L zeigt gegenüber -F259G eine doppelt so hohe Katalyserate (Tab. 20). Die katalytische Effizienz der Mutante -F259L ist gegenüber dem Wildtyp 20-fach reduziert. Die Mutante -F259G zeigt eine 80-fach reduzierte katalytische Aktivität (Tab. 20). Aufgrund der kleinen Messsignale war der Substratumsatz der Mutante -F259G schwierig bestimmbar (Abb. 46).

Trypsin-Aktivierung

Der Vergleich zwischen Wildtyp und Muteinen berücksichtigt die in einem Milieu von pH 4,5 ermittelten enzymatischen Parameter. Der Wildtyp und das Mutein -F259L weisen eine ca. doppelt so hohe Substrataffinität wie das Mutein -F259G auf (Tab. 20). Die katalytische Effizienz zeigt, dass der Wildtyp unter den Reaktionsbedingungen ca. 4-mal so effizient arbeitet wie die Muteine (Tab. 20).

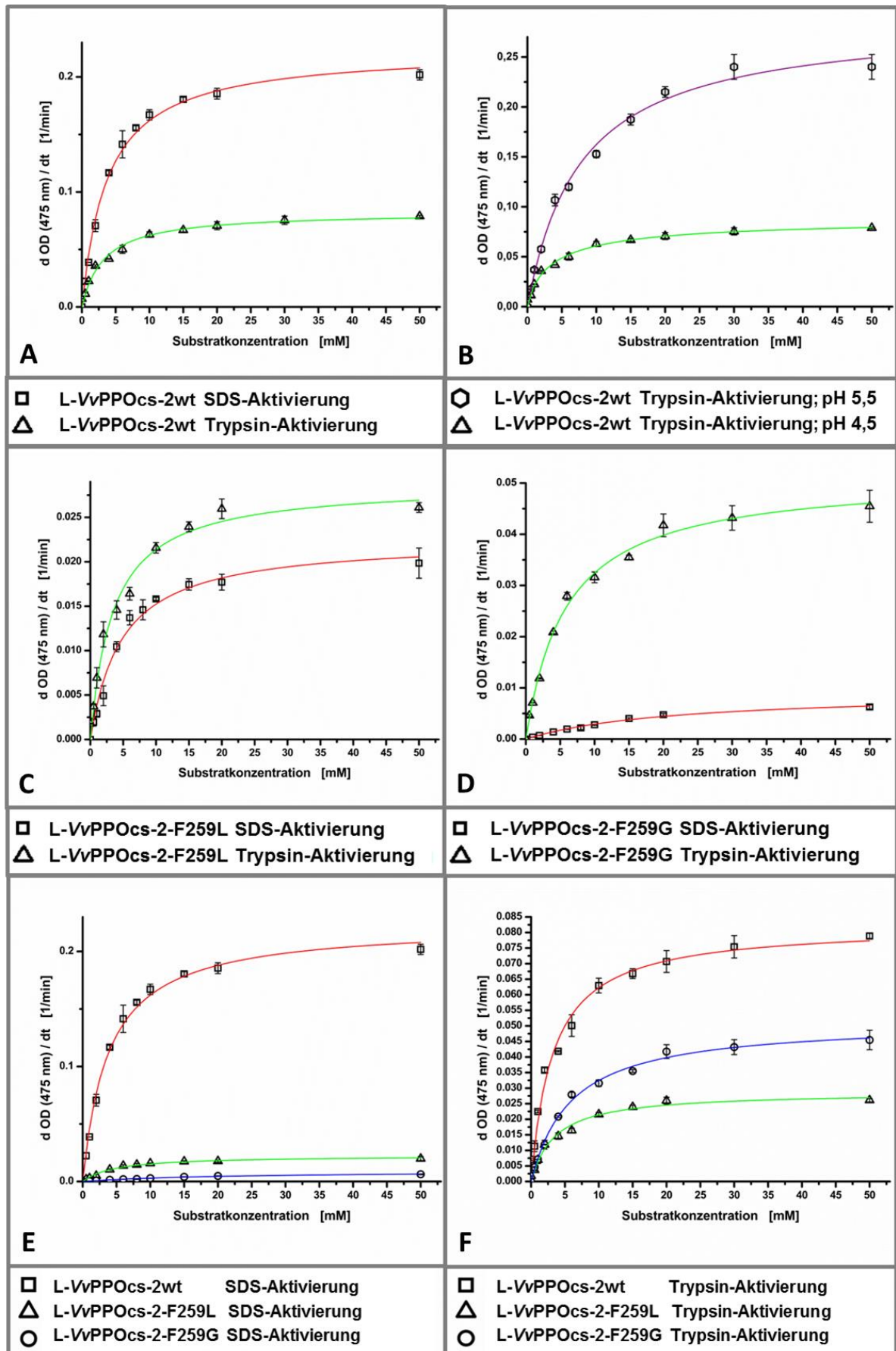


Abbildung 46: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von DA nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Die

Enzymkonzentration betrug $0,8 \mu\text{M}$. Messtemperatur $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Aktivierung der L-VvPPOcs-2 mit $1,5 \text{ mM}$ SDS oder Trypsin (Kap. 2.2.7). $\text{pH} = 4,5$ (Trypsin) oder $\text{pH} = 5,5$ (SDS). Messwellenlänge $\lambda = 475 \text{ nm}$. **A, C-D**: SDS-Aktivierung: rot, Trypsin-Aktivierung: grün. **A**: Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt; L-VvPPOcs-2-F259L: **C**; L-VvPPOcs-2-F259G: **D** in Abhängigkeit der DA-Konzentration. Nach Trypsin-Aktivierung liegt die maximal ermittelte Umsatzgeschwindigkeit der L-VvPPOcs-2 höher als nach SDS-Aktivierung (**C, D**). Eine Ausnahme bildet der Umsatz von DA durch den L-VvPPOcs-2wt: Nach SDS-Aktivierung wurden höhere Umsatzgeschwindigkeiten gemessen (**A**). **B**: Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten bei Katalyse von DA nach Trypsin-Aktivierung bei $\text{pH} 4,5$ (grün) und $\text{pH} 5,5$ (violett). Bei $\text{pH} 5,5$ wurden höhere Reaktionsgeschwindigkeiten gemessen. **E-F**: Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-Aktivierung (**E**) bzw. Trypsin-Aktivierung (**F**). Alle Werte wurden mindestens dreimal gemessen. Die dargestellten Messpunkte geben den Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. L-VvPPOcs-2wt: SDS – $R^2 = 0,99723$; Trypsin – $R^2 = 0,99604$; SDS ($\text{pH} 5,5$) – $R^2 = 0,99691$; -F259L: SDS – $R^2 = 0,99165$; Trypsin – $R^2 = 0,98325$; -F259G: SDS – $R^2 = 0,9932$; Trypsin – $R^2 = 0,99659$.

Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
	Aktivator		Aktivator		Aktivator	
	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
K_M [mM]	$3,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$ pH 5,5: $7,3 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,4$	$21,7 \pm 2,0$	$5,9 \pm 0,4$
v_{\max} [dOD /min]	$0,22 \pm 0,004$	$0,08 \pm 0,002$ pH 5,5: $0,28 \pm 0,006$	$0,02 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,001$
v_{\max} [μM /min]	$66,7 \pm 1,2$	$24,2 \pm 0,6$ pH 5,5: $84,8 \pm 2,3$	$6,1 \pm 0,3$	$9,1 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,1$	$15,2 \pm 0,3$
k_{cat} [1/s]	$1,39 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,01$ pH 5,5: $1,77 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	$0,063 \pm 0,002$	$0,32 \pm 0,01$
k_{cat} / K_M [$\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$]	$0,37 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$ pH 5,5: $0,24 \pm 0,07$	$0,027 \pm 0,003$	$0,054 \pm 0,008$	$0,0029 \pm 0,0005$	$0,054 \pm 0,004$

Tabelle 20: Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols DA. Die Umrechnung der Umsatzgeschwindigkeiten in die Stoffmenge pro Zeit gelang über das Lambert-Beer'sche Gesetz und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Muñoz et al., 2006). Unter bestimmten Bedingungen setzt die L-VvPPOcs-2 das Substrat DA nur in geringen Mengen um. Aus diesen Gründen sind die ermittelten Werte teilweise mit mehreren Nachkommastellen angegeben. Die Fehler geben den absoluten Fehler an und wurden durch Origin® innerhalb der nichtlinearen Regression (K_M , v_{\max}) ausgegeben bzw. berechnet.

Umsatz von p-Tyrosol

Zur Feststellung der Monophenolase-Aktivität wurde der Umsatz des Monophenols p-Tyrosol (p-TYR, $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$, $\epsilon = 950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) überprüft. Aufgrund der geringen Löslichkeit des p-TYR in wässrigen Lösungen, wurden nur Substratkonzentrationen bis $9,3 \text{ mM}$ eingesetzt.

PPOs setzen nur kleine Mengen Monophenole um. Das geringe Messsignal erschwerte die Datenauswertung, da das ungünstige Signal-Rausch-Verhältnis insbesondere bei Einsatz kleiner Substratkonzentrationen die Auswertung des Kurvenanstiegs erschwerte. Dies erklärt die im Vergleich zur Umsetzung von Diphenolen großen Fehlerbalken einiger Messpunkte (Abb. 47). Aufgrund der geringen Messsignale sind die Werte für v_{\max} , die Wechselzahl und die katalytische Effizienz nicht auf

die erste bzw. zweite Nachkommastelle gerundet angegeben (Tab. 21). Um eine Aussage über die Verhältnisse der enzymatische Parameter zueinander tätigen zu können, ist die Angabe weiterer Nachkommastellen nötig.

Zusätzlich weist p-TYR zwei protonierbare Hydroxylgruppen auf. Wie bereits für den Umsatz von Dopamin diskutiert, könnte der pH-Wert des Reaktionsgemisches und damit der Protonierungsgrad der Substratmoleküle Einfluss auf die Umsatzrate des L-VvPPOcs-2 haben. Experimente nach Trypsin-Aktivierung bei pH 5,5 (vgl. Umsatz von DA) zeigten aber sowohl der Wildtyp als auch die Muteine geringere Umsatzgeschwindigkeiten als in einem pH-Milieu von pH 4,5 (Daten nicht gezeigt). Somit wurden die Versuchsbedingungen beibehalten und an den für den Umsatz von 4-MC ermittelten pH-Optima gemessen (Kap. 3.5.1). Dennoch zeigt der L-VvPPOcs-2wt nach SDS-Aktivierung eine 1,6-fach erhöhte Katalyserate als nach der Aktivierung durch Trypsin (Tab. 21).

SDS-Aktivierung

Der L-VvPPOcs-2wt zeigt eine 3-fach so hohe Katalyserate wie das Mutein -F259L (Tab. 21, Abb. 47). Auch über einen Messzeitraum von mehreren Stunden konnte für das Mutein -F259G kein Umsatz von p-TYR nachgewiesen werden. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, dass das Mutein -F259G nach SDS-Aktivierung keine Monophenolase-Aktivität besitzt (Ludwig, 2014).

Der für den Umsatz von p-TYR durch den L-VvPPOcs-2wt ermittelte K_M -Wert ist schwierig einzuordnen. Die Michaelis-Menten-Kurve zeigt kein Plateau (Sättigung) (Abb. 47). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des p-TYR ist der Einsatz von höheren Substratkonzentrationen nicht möglich. Die Substrataffinität des Wildtyps und des Muteins -F259L werden deswegen als ähnlich bewertet (L-VvPPOcs-2wt: $K_M = 2,0 \pm 0,2$ mM; L-VvPPOcs-2-F259L: $K_M = 3,2 \pm 0,8$ mM).

Der Wildtyp weist eine 5-fach höhere katalytische Effizienz auf als das Mutein -F259L (Tab. 21). Mit kleiner werdendem *Gate-Residue* tritt folglich ein geringerer Umsatz von p-TYR auf. Die Mutation zu einem Glycin führt schließlich zum Verlust der Monophenolase-Aktivität (Ludwig, 2014).

Trypsin-Aktivierung

Nach Trypsin-Aktivierung gelang der Nachweis einer Monophenolase-Aktivität für das Mutein -F259G. Die Katalyserate des Muteins liegt ca. 20 % niedriger als die des Wildtyps, während die Wechselzahl des Muteins -F259L ca. 50 % unter der des Wildtyps liegt (Tab. 21).

Die K_M -Werte zeigen ähnliche Substrataffinitäten von Wildtyp und Muteinen an (Tab. 21). Der Wildtyp setzt p-TYR 1,6-fach effektiver um als das Mutein -F259G (Tab. 21). Das Mutein -F259L arbeitet nur ein Drittel so effektiv wie der Wildtyp. Folglich ist kein Bezug zwischen Größe bzw. Sperrigkeit des *Gate-Residue* und katalytischer Effizienz feststellbar.

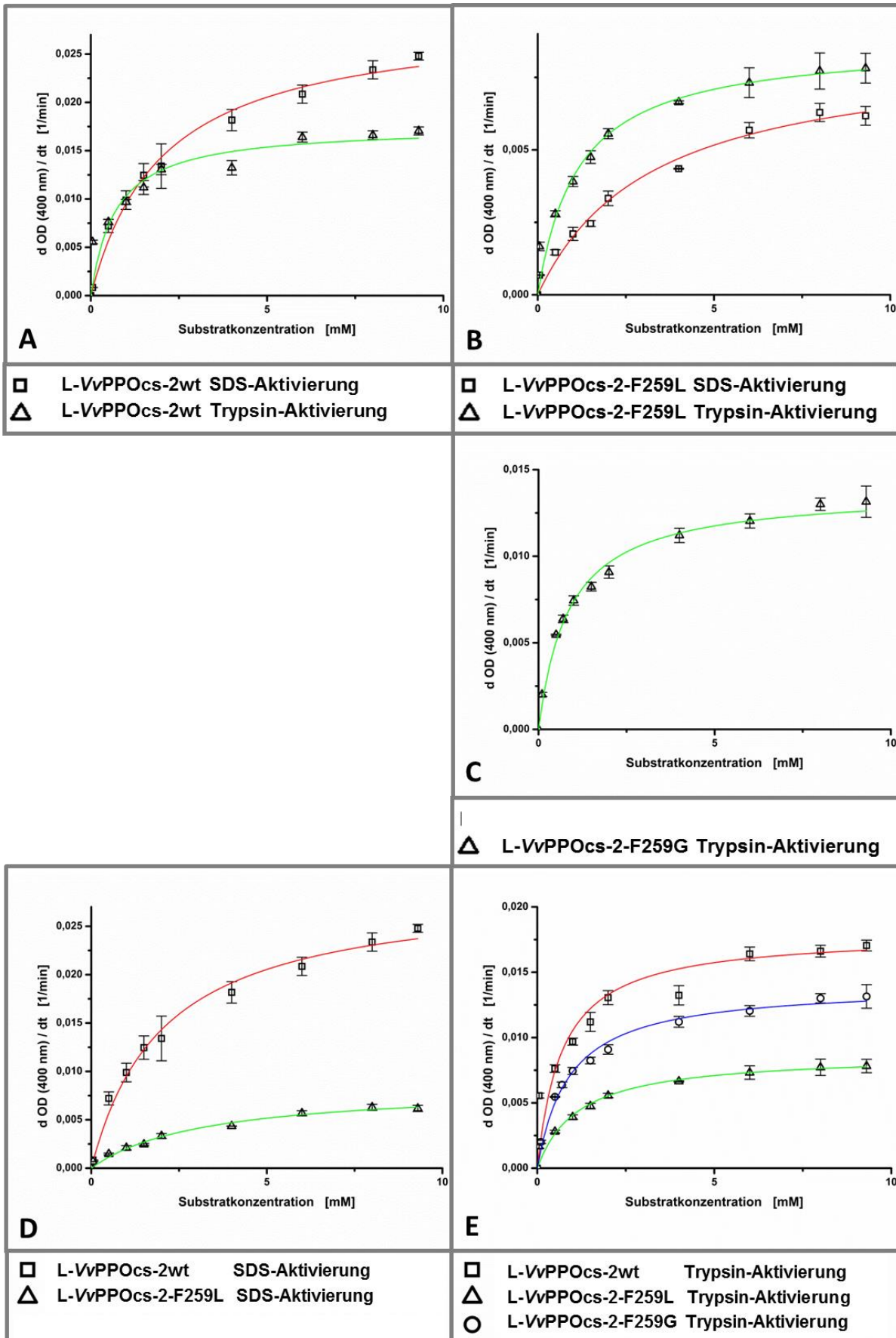


Abbildung 47: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von p-TYR nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Die Enzymkonzentration betrug 3,2 μ M. Messtemperatur $T = 25$ °C. Aktivierung der L-VvPPOcs-2 mit 1,5 mM

SDS oder Trypsin (Kap. 2.2.7). $pH = 4,5$ (Trypsin) oder $pH = 5,5$ (SDS). Messwellenlänge $\lambda = 400\text{nm}$. **A-C:** SDS-Aktivierung: rot, Trypsin-Aktivierung: grün. **A:** Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt; L-VvPPOcs-2-F259L; **B:** L-VvPPOcs-2-F259G; **C** in Abhängigkeit der p-TYR-Konzentration. Nach Trypsin-Aktivierung liegt die maximal ermittelte Umsatzgeschwindigkeit des L-VvPPOcs-2wt niedriger als nach SDS-Aktivierung (**A**), während die Umsatzgeschwindigkeit des Muteins L-VvPPOcs-2-F259L nach Trypsin-Aktivierung höher ist (**B**). Das Mutein -F259G setzt p-TYR nur nach Trypsin-Aktivierung um (**C**). **D-E:** Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-Aktivierung (**D**) bzw. Trypsin-Aktivierung (**E**). Die dargestellten Messpunkte geben den Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. L-VvPPOcs-2wt: SDS – $R^2 = 0,99385$; Trypsin – $R^2 = 0,96773$; -F259L: SDS – $R^2 = 0,9803$; Trypsin – $R^2 = 0,9870$; -F259G: Trypsin – $R^2 = 0,99624$.

Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
	Aktivator		Aktivator		Aktivator	
	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
K_M [mM]	$2,0 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,2$	-	$0,90 \pm 0,07$
v_{max} [dOD /min]	$0,0289 \pm 0,00011$	$0,0176 \pm 0,0011$	$0,0085 \pm 0,0001$	$0,0087 \pm 0,0004$	-	$0,01378 \pm 0,0003$
v_{max} [μM /min]	$30,38 \pm 1,12$	$18,55 \pm 1,14$	$8,96 \pm 0,84$	$9,17 \pm 0,42$	-	$14,51 \pm 0,32$
k_{cat} [1/s]	$0,16 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,047 \pm 0,004$	$0,048 \pm 0,002$	-	$0,076 \pm 0,002$
k_{cat} / K_M [$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$]	$0,0791 \pm 0,0093$	$0,1380 \pm 0,0418$	$0,0146 \pm 0,0039$	$0,0435 \pm 0,0081$	-	$0,0839 \pm 0,0069$

Tabelle 21: Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Monophenols p-TYR. Die Umrechnung der Umsatzgeschwindigkeiten in die Stoffmenge pro Zeit gelang über das Lambert-Beer'sche Gesetz und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Fronk & Jaeckels, 2016; García-García et al., 2013). Aufgrund des geringen Substratumsatzes und den daraus resultierenden geringen (Fehler-) Werten sind bis zu vier Nachkommastellen angegeben. Die Fehler geben den absoluten Fehler an und wurden durch Origin® innerhalb der nichtlinearen Regression (K_M, v_{max}) ausgegeben bzw. berechnet.

3.5.5 Vergleich und Zusammenfassung der Enzymkinetiken

Die L-VvPPOcs-2 setzt alle verwendeten Substrate nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung um. Eine Ausnahme bildet das SDS-aktivierte Mutein -F259G, für das kein Umsatz von p-TYR nachgewiesen werden konnte.

Trypsin-Aktivierung steigert bei allen eingesetzten Substraten die Katalyserate gegenüber SDS-aktivierter L-VvPPOcs-2 (Ausnahme: L-VvPPOcs-2wt und p-TYR). Nach der Aktivierung durch Trypsin zeigt auch das Mutein -F259G durch den Umsatz von p-TYR Monophenolase-Aktivität.

Der L-VvPPOcs-2wt und das Mutein -F259L zeigen für hohe Konzentrationen an 4-MC ([4-MC] $\geq 20 \text{ mM}$) einen Rückgang der Umsatzgeschwindigkeiten, der als Substratinhibition

interpretiert werden kann. Allerdings folgten die gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten keinem bekannten mathematischen Modell, so dass eine genauere Einordnung des Inhibitionseffektes schwierig ist.

Es wird deutlich, dass die L-VvPPOcs-2 die höchsten Affinitäten zu dem Monophenol p-Tyr zeigt (Abb. 48 A). Dem folgt die Katalyse der Substrate Dopamin (Ausnahme: -F259G nach SDS-Aktivierung) und 4-MC. Die geringste Affinität der L-VvPPOcs-2 wurde zum Substrat CAT nachgewiesen (Abb. 48 A). Nach proteolytischer Aktivierung durch Trypsin (gekennzeichnete Flächen, Abb. 48 A) wurden niedrigere K_M -Werte ermittelt als nach SDS-Aktivierung (gestreifte Flächen, Abb. 48 A). Die einzige Ausnahme bildet hierbei der Umsatz des Substrates CAT durch das Mutein -F259L (Abb. 48 A).

Die Wechselzahl k_{cat} zeigt deutlich, dass die L-VvPPOcs-2 4-MC am schnellsten umsetzt (Abb. 48 B). Der Umsatz von CAT erfolgt durch den L-VvPPOcs-2wt ca. halb so schnell wie der Umsatz von 4-MC. Der k_{cat} -Wert der Trypsin-aktivierten Muteine liegt für den Umsatz von CAT in einem ähnlichen Bereich wie für die Katalyse von 4-MC. Die SDS-aktivierten Muteine zeigen jedoch eine reduzierte Wechselzahl (Abb. 48 B). Deutlich weniger Substratmoleküle werden beim Umsatz von DA und p-TYR umgesetzt (Abb. 48 B). Hier zeigt der SDS-aktivierte WT die deutlich höchste Katalyserate ($k_{cat} = 1,39 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, Tab. 22).

Für die Muteine liegt die Wechselzahl k_{cat} nach Aktivierung durch Trypsin für alle verwendeten Substrate höher als nach SDS-Aktivierung. Dies wird am Mutein -F259G besonders deutlich: Für 4-MC ergibt sich eine 10-fach größere Wechselzahl nach Trypsin-Aktivierung gegenüber der SDS-Aktivierung. Das Substrat CAT wird 16-fach, DA 3-fach besser umgesetzt. Eine Katalyse des Monophenols p-Tyr konnte nur nach proteolytischer Aktivierung durch Trypsin nachgewiesen werden (Abb. 48 B, Tab. 22). Für den L-VvPPOcs-2wt ist ein solches Muster nicht erkennbar. In diesem Fall scheint der Aktivierungsmechanismus in Abhängigkeit des eingesetzten Substrates zu einer geringeren bzw. keiner Steigerung der Umsatzrate zu führen (Abb. 48 B). Für den Umsatz von p-TYR sinkt die Katalyse sogar leicht.

Der L-VvPPOcs-2wt setzt nach Aktivierung durch SDS alle verwendeten Substrate mit der höchsten Katalyserate um. Dem folgt das Mutein -F259L (Abb. 48 B, Tab. 22).

Für die Katalyse von 4-MC zeigt die L-VvPPOcs-2 deutlich die höchste Effizienz (Abb. 48 C). Mit Ausnahme des Umsatzes von DA durch den Wildtyp, ist die katalytische Effizienz in allen Experimenten für die Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2 am größten. Dies wirft die Frage auf, ob die Aktivierung *in vivo* durch Proteasen einen Vorteil in der schnellen Bereitstellung aktiver PPO gegenüber anderen vermuten Aktivatoren (z.B. Fettsäuren) bietet (Kap. 4.3).

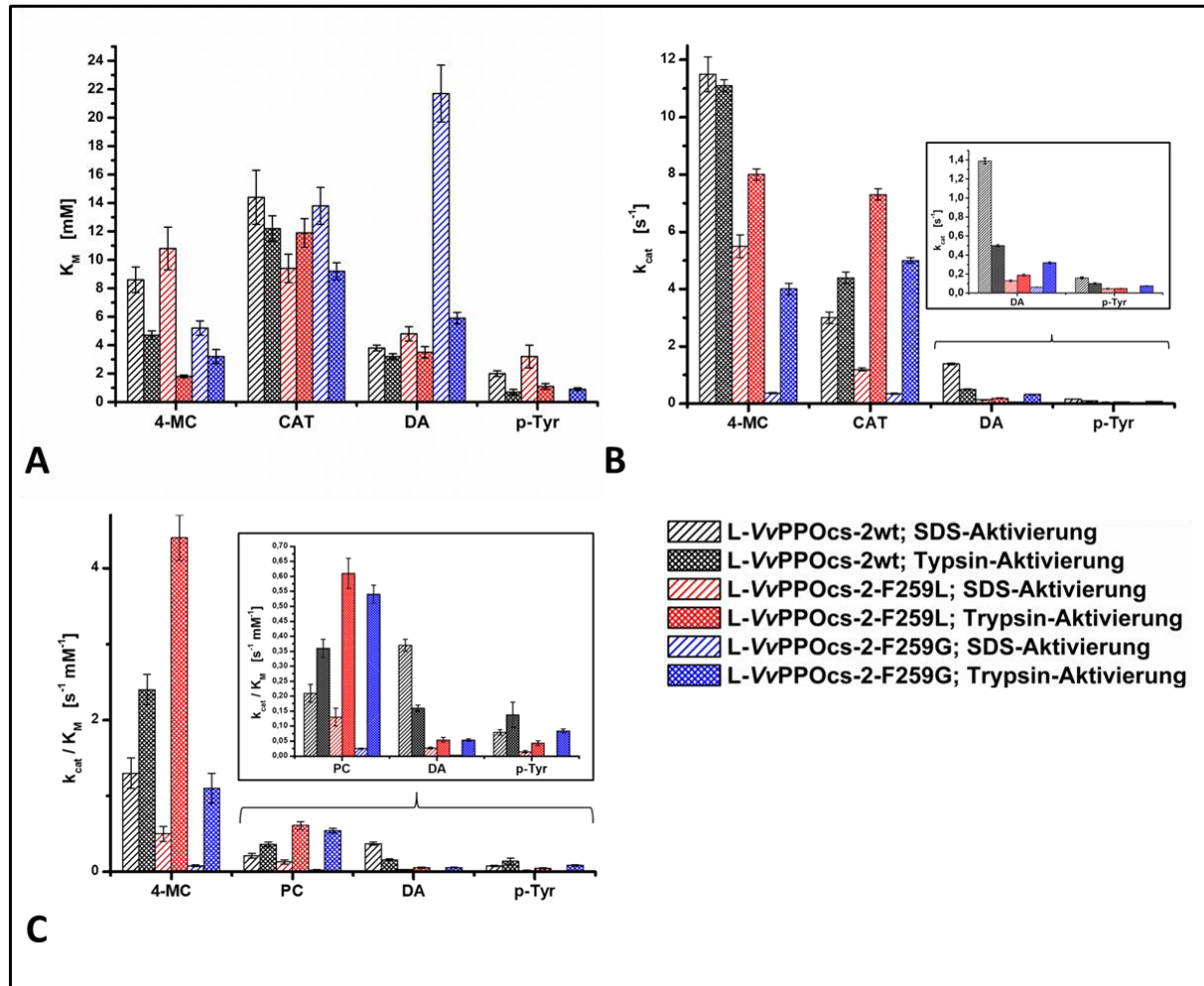


Abbildung 48: Histogramme und Zusammenfassung aller ermittelten enzymatischer Parameter für den L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Gestreifte Flächen: SDS-Aktivierung, gekreuzte Flächen: Trypsin-Aktivierung, schwarz: L-VvPPOcs-2wt, rot: L-VvPPOcs-2-F259L, blau: L-VvPPOcs-2-F259G. **A:** Vergleich der K_M -Werte. Die kleinsten K_M -Werte zeigt die L-VvPPOcs-2 für den Umsatz des Monophenols p-TYR. Nach Trypsin-Aktivierung zeigt die L-VvPPOcs-2 niedrigere K_M -Werte als nach der Aktivierung durch SDS (Ausnahme: Umsatz von CAT durch -F259L). **B:** Histogramm der Wechselzahl k_{cat} . Die größten k_{cat} -Werte zeigt die L-VvPPOcs-2 für den Umsatz von 4-MC. Bei den Muteinen sind die k_{cat} -Werte nach Trypsin-Aktivierung deutlich höher als nach SDS-Aktivierung. Für die Katalyse der Substrate durch den L-VvPPOcs-2wt wurden größere Wechselzahlen ermittelt als für die Muteine (Ausnahme: Katalyse von CAT durch Trypsin-aktivierte L-VvPPOcs-2-F259L). Das SDS-aktivierte Mutein -F259G zeigt keine Monophenolase-Aktivität. Insert: Vergrößerung des gekennzeichneten Bereiches zur besseren Darstellung. **C:** Histogramm der berechneten katalytischen Effizienz. Die katalytische Effizienz ist für den Umsatz von 4-MC am größten. Die proteolytische Aktivierung steigert die katalytische Effizienz (Ausnahme: Katalyse von DA durch den L-VvPPOcs-2wt). Insert: Vergrößerung des gekennzeichneten Bereiches zur besseren Darstellung. Die Fehlerbalken geben den absoluten Fehler an.



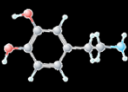
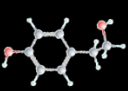
	Substrat	Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
			Aktivator		Aktivator		Aktivator	
			SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
	4-MC	K_M [mM]	8,6 ± 0,9	4,7 ± 0,3	10,8 ± 1,5	1,8 ± 0,1	5,2 ± 0,5	3,7 ± 0,5
		k_{cat} [1/s]	11,5 ± 0,6	11,1 ± 0,2	5,5 ± 0,4	8,0 ± 0,2	0,38 ± 0,02	4,0 ± 0,2
		k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	1,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	4,4 ± 0,3	0,08 ± 0,01	1,1 ± 0,2
	CAT	K_M [mM]	14,4 ± 1,9	12,2 ± 0,9	9,4 ± 1,0	11,9 ± 1,0	13,8 ± 1,3	9,2 ± 0,6
		k_{cat} [1/s]	3,0 ± 0,2	4,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	7,3 ± 0,2	0,35 ± 0,02	5,0 ± 0,1
		k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,025 ± 0,002	0,54 ± 0,03
	DA	K_M [mM]	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,2	4,8 ± 0,5	3,5 ± 0,4	21,7 ± 2,0	5,9 ± 0,4
		k_{cat} [1/s]	1,39 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,063 ± 0,002	0,32 ± 0,01
		k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,37 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,027 ± 0,003	0,054 ± 0,008	0,0029 ± 0,0005	0,054 ± 0,004
	p-Tyr	K_M [mM]	2,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	3,2 ± 0,8	1,1 ± 0,2	-	0,9 ± 0,07
		k_{cat} [1/s]	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,047 ± 0,004	0,048 ± 0,002	-	0,076 ± 0,002
		k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,0791 ± 0,0093	0,1380 ± 0,0418	0,0146 ± 0,0039	0,0435 ± 0,0081	-	0,0839 ± 0,0069

Tabelle 22: Zusammenfassung aller ermittelter enzymatischer Parameter für den L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung. Aufgrund stark unterschiedlicher Katalyseraten und daraus resultierenden verschieden starken Messsignalen sind die angegebenen Werte nicht auf die gleiche Anzahl an Nachkommastellen gerundet. Dies dient der besseren Les- und Vergleichbarkeit. Eine um v_{max} erweiterte Tabelle findet sich in Anhang I. Die Fehler geben den absoluten Fehler an und wurden durch Origin® innerhalb der nichtlinearen Regression (K_M) ausgegeben bzw. berechnet.

3.6 Kristallisation des L-VvPPOcs-2wt

Mit der Hilfe von Proteinkristallstrukturen gelingt es u.a. molekulare Mechanismen der enzymatischen Aktivität besser zu verstehen. Aus diesem Grund war die Kristallisation der L-VvPPOcs-2 von großem Interesse und von hohem experimentellem Aufwand begleitet. In einer Vielzahl an Kristallisationsansätzen im Gasphasendifusionsverfahren wurde die Konzentration verschiedener Präzipitanten variiert und die Ansätze über Monate beobachtet (Kap. 2.2.14). Zusätzlich wurde das POM Na₆[TeW₆O₂₄] · 22 H₂O eingesetzt, um durch Stabilisierung des flexiblen L-VvPPOcs-2wt durch Wechselwirkungen die Wahrscheinlichkeit der Kristallbildung zu erhöhen (Kap. 2.2.14).

Trotz der Vielzahl an verschiedenen Bedingungen konnten keine vermessbaren Kristalle des L-VvPPOcs-2wt gewonnen werden. Insbesondere bei Verwendung des POM Na₆[TeW₆O₂₄] · 22 H₂O kam es zur Bildung von unregelmäßigen Mikrokristallen (Abb. 49 A-B), die aber keine ausreichende Größe (> 200 μm) erreichten, um sie am Institut für Molekulare Physiologie (AG Biophysik) röntgenkristallographisch zu untersuchen. Weiterhin kam es zur Bildung sogenannter „Häutchen“ (Abb. 49 C), die ein Indikator für die Denaturierung des L-VvPPOcs-2wt sind (Luft et al., 2009). Zudem trat nach wenigen Tagen ein braunes Präzipitat auf (Abb. 49 D). Die Versuche die Löslichkeit des L-VvPPOcs-2wt zu erhöhen oder die eingesetzte Konzentration des L-VvPPOcs-2 zu variieren, führten ebenfalls zu keiner Kristallbildung. In einigen Ansätzen war auch Monate nach dem Ansetzen des Experimentes keine Veränderung innerhalb des Tropfens erkennbar. Diese *clear drops* deuten darauf

hin, dass sich das System weiterhin im Zustand der Untersättigung befindet (Kap. 2.2.14). Auch nach Erhöhung und Variation der Konzentration der Präzipitanten bildeten sich keine ausreichend großen Einkristalle aus. Aufgrund der hohen Flexibilität und der geringen Löslichkeit des L-VvPPOcs-2wt ist die Bildung von großen Einkristallen erschwert. Mit den zur Verfügung stehenden experimentellen und zeitlichen Mitteln konnte kein Kristall gewonnen werden, der zur Strukturaufklärung der L-VvPPOcs-2wt verwendet werden konnte (Kap. 4.6).

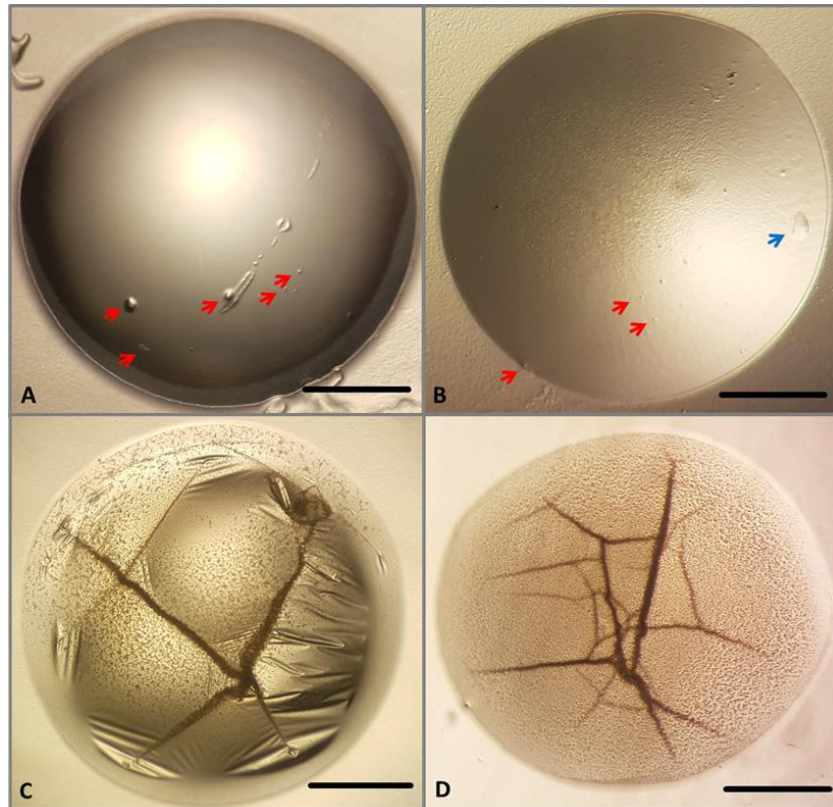


Abbildung 49: Ergebnisse der Kristallisationsansätze des L-VvPPOcs-2wt im Gasphasendiffusionsverfahren unter verschiedenen Bedingungen. Maßstab: 500 μm . Proteinkonzentration = 8 mg/ml. Temperatur: 20 °C. Proteinpuffer: 20 mM Tris pH 8. **A:** Aufnahme nach 21 Tagen. 0,5 mM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM Tris pH 7, 25 % PEG 400. Es kam zur Ausbildung kleiner Strukturen (rote Pfeile). Diese vergrößerten sich auch bei längerer Beobachtungszeit nicht. **B:** Aufnahme nach 15 Tagen. 1,1 mM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM Bicine pH 6,5, 12 % PEG 3350. Sehr kleine kristalline Strukturen (rote Pfeile) bildeten sich bereits nach 24 Stunden. Die muschelförmige und flache Struktur (blauer Pfeil) war nach 14 Tagen erkennbar, zeigte aber bei längerer Beobachtung kein Wachstum **C:** Aufnahme nach 60 Tagen. 0,8 mM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM Tris pH 7, 11 % PEG 4000. Die ersten 50 Tage war ein klarer Tropfen zu beobachten. Nach 60 Tagen zeigte sich wahrscheinlich präzipitierter L-VvPPOcs-2wt als Häutchen. **D:** Aufnahme nach 5 Tagen. 0,9 mM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM Tris pH 7, 9 % PEG 8000.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt der Dissertation stand die Identifikation eines bislang unbekanntem proteolytischen Aktivators der L-VvPPOcs-2. Daraus resultierend war es erstmals möglich, den Substratumsatz des L-VvPPOcs-2wt und zweier Muteine -F259L und -F259G nach proteolytischer und Detergenz-abhängiger (SDS) Aktivierung zu vergleichen und neue Erkenntnisse zur Funktion des *Gate-Residue* zu erlangen.

4.1 Expression der L-VvPPOcs-2

Die heterologe Expression pflanzlicher Polyphenoloxidasen ist von großer Bedeutung, um die Struktur-Funktionsbeziehung der Enzyme zu untersuchen. Biochemisch gewonnene PPO, die direkt aus Pflanzengewebe isoliert wird, ist ein Gemisch aus mehreren Isoformen, die sich bezüglich ihrer katalytischen Aktivität, den pH- und Temperaturoptima und auch in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden können (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Katayama-Ikegami et al., 2017).

Als die experimentellen Arbeiten für diese Dissertation begannen, waren effektive Expressionssysteme für PPOs selten (Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2013; Kaintz et al. 2014).

Die Expression pflanzlicher PPOs in prokaryotischen Systemen ist nicht trivial und führte in der Vergangenheit oft zu wenig oder inaktivem und unlöslichem Enzym (Haruta et al., 1998; Sullivan et al., 2004; Liu et al., 2010; Wu et al., 2010). Obwohl in einigen Fällen eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und eine Rückfaltung der PPO gelang, war die nachgewiesene Substratkatalyse deutlich geringer als nach direkter biochemischer Gewinnung der PPO aus dem entsprechenden Pflanzengewebe (Liu et al., 2010). Begründet wurde dies unter anderem mit der Existenz von Disulfidbrücken, die in pflanzlichen PPOs konserviert nachweisbar sind. Das reduzierende Medium, das in den prokaryotischen Expressionszellen vorherrscht, behindere die Ausbildung dieser und damit die katalytische Funktion der PPO (Liu et al., 2010). Aber auch ein ungeeigneter Vektor, eine unphysiologisch hohe Konzentration des Zielproteins in der Wirtszelle oder ein unzureichendes Medium können ursächlich für eine ungenügende Expression von löslichem und nativem Protein sein (Prouty & Goldberg, 1972; Baneyx & Mujacic, 2004).

Dirks-Hofmeister et al. (2012) gelang es durch Wahl eines Autoinduktionsmediums, niedrige Kultivierungstemperatur und dem Zusatz einer hohen Konzentration an CuCl_2 , eine große Menge aktiver PPO aus *Taraxacum officinale* zu gewinnen und kinetische vergleichende Studien zwischen verschiedenen Isoformen und Muteinen durchzuführen (Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2013). Mit der Kenntnis, dass eine hohe Kupferkonzentration die Expression von löslicher und aktiver PPO positiv beeinflusst, etablierten sich in den letzten zwei Jahren mehrere Protokolle zur Gewinnung verschiedener PPOs (Kampatsikas et al., 2017; Katayama-Ikegami et al. (2017); Kampatsikas et al., 2019).

Kampatsikas et al. (2017; 2019) gelang die rekombinante Expression zweier latenter Isoformen aus *Solanum lycopersium* und dreier PPOs aus Blattgewebe von *Malus domestica* in *E. coli* bei einer Expressionstemperatur von 20 °C und 500 µM CuSO₄ unter Verwendung eines GST-Tag.

Kürzlich zeigte Katayama-Ikegami et al. (2017) die Expression und Reinigung einer Isoform der PPO aus *Vitis vinifera* L.- x *Vitis labruscana* Bailey unter Verwendung von 200 µM CuCl₂ bei 26 °C. Insbesondere diese PPO kann künftig aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft für interessante Vergleiche bezüglich der Aktivierung und Substratkatalyse zu der hier verwendeten L-VvPPOcs-2 dienen.

Das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem basiert auf dem System für Gewinnung der PPO aus *Taraxacum officinale* (Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2013; Solem, 2017). Entsprechend den Vorgaben von Dirks-Hofmeister wurde dem Autoinduktionsmedium mit 200 µM eine hohe Konzentration an CuCl₂ zugesetzt und die *E. coli* Kultur bei 26 °C inkubiert. Der kritische Punkt bestand in der Wahl einer geeigneten Amplitudenstärke des Sonifikators, der zum Zellaufschluss genutzt wurde (Kap. 2.2.1.3). Eine zu geringe Amplitude führte zu einer sehr geringen Konzentration an gereinigter L-VvPPOcs-2, während mit einer zu hohen Amplitudenstärke hohe Konzentrationen an L-VvPPOcs-2 gewonnen wurden, diese aber in Aktivitätsschnelltests nur eine geringe Aktivität zeigten. Durch Testexpressionen wurde eine Einstellung von 60 % Amplitudenstärke festgesetzt, um sowohl große Mengen als auch aktive L-VvPPOcs-2 aus dem Expressionssystem isolieren zu können. Die gewonnene L-VvPPOcs-2 wurde mit einer Reinheit von ca. 95 % isoliert. Die CD-Spektren des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G zeigen eine Superposition, weswegen die Faltung auf Ebene der Sekundärstruktur als vergleichbar anzusehen ist (Kap. 3.1.4). Es gelang, ca. 6 mg L-VvPPOcs-2 aus einem Liter Expressionskultur zu isolieren. Weitere in *E. coli* exprimierte pflanzliche PPOs konnten in ähnlicher Größenordnung gewonnen werden (Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2013; Kaintz et al., 2014). Lediglich die PPOs aus *Malus domestica* und die PPO-1 aus *Solanum lycopersium* konnte in erheblich größerem Maßstab isoliert werden (bis zu 225 mg (bzw. 80 mg) pro Liter Expressionskultur, Kampatsikas et al., 2017; Kampatsikas et al., 2019). Hierfür wurden ein GST-Tag, eine niedrigere Expressionstemperatur (20 °C bzw. 25 °C) und 500 µM CuSO₄ gewählt. Mit dem genutzten Expressionssystem der L-VvPPOcs-2 steht ein praktikables Protokoll zur Verfügung, das die reproduzierbare Gewinnung der L-VvPPOcs-2 gewährleistet und künftig die Möglichkeit bietet, weitere funktionell interessante Muteine zu erzeugen und zu gewinnen.

4.2 Stabilität der L-VvPPOcs-2

Es ist bereits bekannt, dass die Aktivität von PPOs während der *in vitro* Lagerung nicht konstant bleibt, wobei sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der Catecholoxidaseaktivität beschrieben wird (Goldbeck & Cammarata, 1981; Kampatsikas et al. 2019). Um die Vergleichbarkeit von Experimenten zu wahren, ist es wichtig, Lagerungsbedingungen der L-VvPPOcs-2 konstant zu halten, und Aktivitätsschwankungen zu beobachten.

Die aus *E. coli* gewonnene L-VvPPOcs-2 zeigt erst ab 12 h nachweisbare Aktivität, so dass der Aktivitätsschnelltest nach der Reinigung der L-VvPPOcs-2 aus *E. coli* nach 24 h durchgeführt wurde (Kap. 3.1.3). Weshalb die L-VvPPOcs-2 zunächst keinen nachweisbaren Substratumsatz zeigt, ist nicht bekannt. Möglich ist jedoch, dass die das Protein stabilisierenden Disulfidbrücken durch das reduzierende Medium im *E. coli* Bakterium an ihrer Ausbildung gehindert werden und sich somit erst Stunden nach der Reinigung formieren können, was letztendlich zu einem funktionstüchtigen Protein führt. Bei Lagerung der L-VvPPOcs-2 in Strep-Tactin® Waschpuffer 2 und 4 °C wurde über einen Zeitraum von ca. 16 Wochen keine Änderung in der Enzymaktivität festgestellt. Danach kommt es jedoch aus unbekanntem Grund zu einem Aktivitätsanstieg. Dieses Phänomen wurde auch für die PPO aus dem Spinat beschrieben (Goldbeck & Cammarata, 1981). Nach ca. 10 Monaten Lagerung bei 4°C kommt es zu einem Aktivitätsverlust, der mit einem durch Gelelektrophorese nachweisbaren Abbau der L-VvPPOcs-2 einhergeht. Auch für die PPO aus der Aprikose wird bei Lagerung bei 4 °C der Abbau der latenten PPO zu einer 38 kDa großen aktiven PPO beschrieben (Derardja et al., 2017). Kampatsikas et al. (2019) berichteten kürzlich von einem bei der PPO-1 aus *Malus domestica* vorkommenden Selbstverdau, durch den die PPO durch Hydrolyse im Linkerbereich in einen *Pre-Active-Stage* überführt wird (Nachweis über SDS-PAGE).

Sánchez-Ferrer et al. (1988) beschreiben eine Haltbarkeit ohne Aktivitätsverlust über 2 Monate bei Lagerung bei -20 °C. Eine ähnliche Lagerung der L-VvPPOcs-2 führte jedoch bereits nach 24 h und einem Tauprozess bei 4°C zu Aktivitätsverlust.

Aufgrund der zeitlichen Veränderungen in der Aktivität und den unterschiedlichen Berichten aus der Literatur zu möglichen Ursachen, wurde die L-VvPPOcs-2 stets neu exprimiert und nicht länger als 12 Wochen für Experimente verwendet.

4.3 Proteolytische Aktivierung der L-VvPPOcs-2

Eine der Kernfragen dieser Dissertation, die proteolytische Aktivierung pflanzlicher PPOs, wurde bislang nur wenig untersucht. Es gibt zwar Berichte über aktivierende Proteasen, aber genaue Analysen der Schnittstellen sind selten (Mayer, 1966; Goldbeck & Cammarata, 1981; King & Flurkey, 1987; Sánchez-Ferrer et al., 1989; Laveda et al., 2001; Gandía-Herrero et al., 2005; Marusek et al., 2006; Flurkey & Inlow, 2008; Kampatsikas et al., 2017).

Die L-VvPPOcs-2 wurde durch die Proteasen Trypsin, Proteinase K, Chymotrypsin und Thermolysin gespalten. Calpain-1 spaltete nur einen geringen Anteil der L-VvPPOcs-2 (Kap. 3.2.5). Die Endoproteinase V8 proteolytierte die L-VvPPOcs-2 nicht (Kap. 3.2.6). Die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin spalten die L-VvPPOcs-2 unter anderem im (bzw. nahe dem) Linkerbereich und im vorderen N-terminalen Bereich (Abb. 50 A, Kap. 3.2) und es entstanden Spaltpeptide einer Größe zwischen 30 und 38 kDa, die Substrate umsetzen könnten. Das 36 kDa und/oder 34 kDa Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt, die durch die Proteolyse mit Trypsin entstehen, zeigen die höchste Aktivität (Kap. 3.2.1).

Vergleicht man die Aminosäurepositionen, hinter denen die verwendeten Proteasen die L-VvPPOcs-2 in die relevanten katalytisch aktiven Peptide schneiden, fällt auf, dass die Spaltpeptide, die durch die Proteolyse mit Trypsin entstehen, einen überwiegenden Anteil der N-terminalen Domäne enthalten (Abb. 50 A-C). Sowohl das 36 kDa als auch das 34 kDa große Spaltpeptid enden C-terminal fünf AS vor dem Linkerbereich. Dem 36 kDa großen Spaltpeptid fehlen N-terminal nur 30 AS. Da die ersten N-terminalen 20 Aminosäuren aus der rekombinanten Expression der L-VvPPOcs-2 resultieren (z.B. Strep-Tactin®II-Peptid), fehlen der physiologischen L-VvPPOcs-2 nur die ersten zehn N-terminalen Aminosäuren. Dem 34 kDa Spaltpeptid hingegen fehlen N-terminal die ersten 31 physiologischen AS. Welches Spaltpeptid aktiv ist bzw. welchen Anteil das 36 oder 34 kDa große Spaltpeptid an der beobachteten Aktivität hat, kann nicht geklärt werden, da eine Trennung des Gemisches der Spaltpeptide nicht möglich war (Kap. 3.3). Die SDS-PAGE der Trypsin-Proteolyse zeigt aber, dass das 34 kDa große Spaltpeptid in der Probe in höherer Konzentration vorlag als das 36 kDa große Spaltpeptid (Abb. 19). Ein größerer Anteil des 34 kDa - Spaltpeptids an der induzierten Aktivität wird folglich als wahrscheinlich angenommen.

Die Spaltpeptide der anderen verwendeten Proteasen, die eine deutlich geringere Catecholoxidase-Aktivität aufweisen, umfassen C-terminal mindestens drei Aminosäuren des Linkerbereiches (Abb. 50 A). Da bei den Trypsin-induzierten Spaltpeptiden der Linkerbereich vollständig fehlt, könnte eine Abtrennung des gesamten Linkerbereiches für eine Aktivität nötig sein. Da die stark verwandte Kristallstruktur der aktiven Form der VvPPOg (PDB: 2P3X; Virador et al., 2010) allerdings Anteile des Linkerbereiches enthält und diese PPO als aktive Catecholoxidase beschrieben ist, ist davon

auszugehen, dass die vorderen N-terminalen Aminosäuren des Linkerbereiches eine Aktivität der L-VvPPOcs-2 wenig beeinflussen.

N-terminal enthält keines dieser Spaltpeptide so viele Aminosäuren wie das 36 kDa große Trypsin-induzierte Spaltpeptid (Abb. 50 A). Obwohl bislang keine funktionelle Aminosäure im vorderen N-terminalen Bereich einer PPO beschrieben wurde, wäre nach den gewonnen Erkenntnissen ein Einfluss von Aminosäuren innerhalb dieses vorderen Sequenzbereiches auf die Aktivität denkbar.

Im Vergleich zu dem 34 kDa großen Trypsin-induzierten Spaltpeptid liegen die N-terminalen Schnittstellen der anderen Proteasen in einem ähnlichen Sequenzbereich (\pm max. 5 AS weiter N- bzw. C-terminal; Abb. 50 A). Es ist unwahrscheinlich, dass einzelne AS in einem so kurzen Sequenzabschnitt allein entscheidend für die Aktivierung der L-VvPPOcs-2 sind. Allein anhand der Lage der Schnittstellen in der Sequenz der L-VvPPOcs-2 ist eine Aussage über Aktivierung der PPO schwierig.

Der L-VvPPOcs-2wt konnte durch Proteinase K aktiviert werden. Hierbei zeigt das 35 kDa und/oder 30 kDa große Spaltpeptid starke Aktivität (Kap. 3.2.2). Diesen fehlen N-terminal 49 AS (Abb. 50 A) – ähnlich dem 34 kDa großen Trypsin-induziertem Spaltpeptid. C-terminal enden sie 37 AS (30 kDa Spaltpeptid) vor bzw. drei AS (35 kDa Spaltpeptid) nach Beginn des Linkerbereiches. Interessant ist, dass Proteinase K zwar zu einer Aktivierung des L-VvPPOcs-2wt führt, für die Muteine -F259L und -F259G aber keine Aktivierung nachweisbar war. Folglich stellt sich die Frage, ob allein die Proteolyse und damit die Bildung von Spaltpeptiden ausreichend für eine Aktivierung der L-VvPPOcs-2 ist. Möglich ist, dass durch eine zusätzlich von Proteinase K induzierte Konformationsänderung der Zugang für das Substrat beim L-VvPPOcs-2wt freigelegt wurde, während er aufgrund von geringfügig anderer Konformation der Muteine versperrt blieb. Unterschiede in Anteilen der Sekundärstruktur zwischen Wildtyp und Muteinen konnte nicht nachgewiesen werden (Kap. 3.1.4; 4.1) und auch die Muteine zeigen bei geeigneter Aktivierung (Trypsin, SDS) Substratumsatz (Kap. 3.5), so dass große Faltungsabweichungen oder -fehler ausgeschlossen werden können. Jedoch weisen beide Muteine eine Verschiebung der pH-Optima auf (Kap. 3.5.1), was auf eine instabilere Konformation hinweisen könnte (Kap. 4.4). Folglich wäre es möglich, dass entweder die Proteolyse der Muteine nicht ausreichend für eine Aktivierung ist oder die entstehenden Spaltpeptide weniger stabil gegenüber dem pH- oder ionischen Milieu als die des L-VvPPOcs-2wt sind.

Die von Kampatsikas et al. (2019) aufgestellte Hypothese zur Autoproteolyse von PPOs, die bei Vorhandensein einer spezifischen Peptidsequenz im Linkerbereich auftritt und zu einem *Pre-Active-Stage* führt, könnte auch für die hier eingesetzten externen Proteasen zutreffend sein. Kampatsikas berichtet, dass die PPO nur eine geringe Aktivierung benötige, um die zwar abgespaltene aber noch am Zugang des aktiven Zentrums haftende C-terminale Domäne zu entfernen. Im Falle der L-VvPPOcs-2 käme es zwar nicht zu einer Autoproteolyse, aber ein Anheften der eigentlich abgetrennten C-terminalen Spaltpeptide am Zugang zum aktiven Zentrum, könnte eine enzymatische Aktivität

verhindern. Dies wäre über weitere Experimente zu prüfen. Zudem sind die Proteasen als „nicht aktivierend“ einzuordnen, wenn man wie von Kampatsikas et al. (2019) vorgeschlagen, einen weiteren externen Aktivator (wie z.B. SDS oder hohe Salzkonzentration) benötigt, um Enzymaktivität zu induzieren.

Es ist festzuhalten, dass Trypsin aufgrund der Lage der Schnittstellen in der Sequenz der L-VvPPOcs-2, der geringen Anzahl an Spaltpeptiden und der induzierten Aktivität als geeigneter Aktivator der L-VvPPOcs-2 identifiziert werden konnte. Der Vergleich der Lage der Schnittstellen innerhalb der PPO-Sequenz ergibt, dass sich eine vollständige Abtrennung des Linkerbereiches und der C-terminalen Domäne positiv auf die Catecholoxidase-Aktivität auswirkt und am N-terminalen Ende der PPO liegende Aminosäuren (AS 1-50) möglicherweise eine Rolle bei der Induzierung des Substratumsatzes spielen könnten.

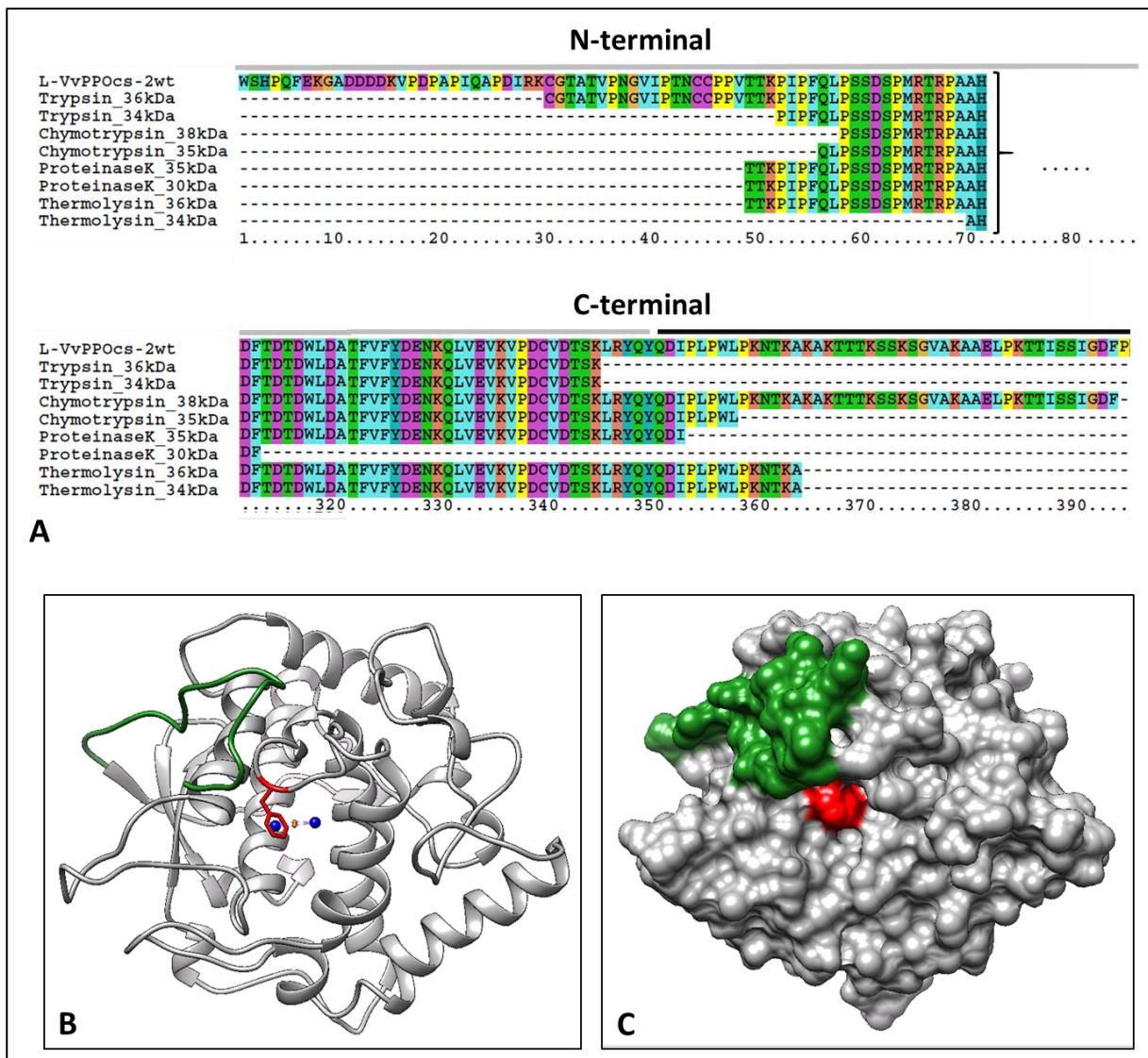


Abbildung 50: Alignment der durch Proteolyse entstandenen Spaltpeptide der katalytischen Domäne des L-VvPPOcs-2wt und Modell des aktiven 36 kDa Spaltpeptids des L-VvPPOcs-2wt nach der Proteolyse durch Trypsin. A: Gleiche Farben zeigen AS mit gleichen chemischen Eigenschaften an. Grauer Balken: N-terminale Domäne (AS 1 – 349), schwarzer Balken: Linkerbereich (AS 350 – 401). Das Alignment zeigt einen Vergleich der Länge der Spaltpeptide, die durch Proteolyse entstehen und

potentiell katalytisch aktiv sein können (Kap. 3.2.1). Dem 36 kDa Spaltpeptid fehlen N-terminal nur zehn Aminosäuren und C-terminal nur fünf Aminosäuren der N-terminalen Domäne. Folglich ist diese fast vollständig erhalten. Alle anderen entstandenen Spaltpeptide weisen größere fehlende Abschnitte auf. **B:** Darstellung des aktiven Spaltpeptides (36 kDa) des L-VvPPOcs-2 nach Proteolyse durch Trypsin. Grün: Sequenzabschnitt, der beim 34 kDa großen Spaltpeptid fehlt. Rot: Gate-Residue. Darstellung auf Basis eines Homologiemodells nach Di Silvestre, 2018. Der Linkerbereich und die C-terminale Domäne fehlen. N-terminal fehlen die ersten zehn Aminosäuren. **C:** Darstellung der Oberfläche berechnet mittels Chimera 1.13.1. Das Gate-Residue F259 schirmt das aktive Zentrum ab. Die grünen Bereiche fehlen beim 34 kDa Spaltpeptid.

In der Literatur finden sich Hinweise auf aktivierende, wenig- und nicht-aktivierende Proteasen für pflanzliche PPOs. Viele dieser Studien stammen bereits aus den 1960ern oder 1980ern, so dass die meisten Untersuchungen nicht an rekombinanten PPOs und ohne massenspektrometrische Experimente zur Feststellung der Schnittstellen durchgeführt wurden. Zudem fehlen Überlegungen dazu, wieso viele Proteasen die PPO zwar spalten, aber nicht aktivieren. Dennoch wird für viele untersuchte pflanzliche PPOs Trypsin als effektiver Aktivator angegeben (Harel et al., 1966; Goldbeck & Cammarata, 1981; Sánchez-Ferrer et al., 1989, Laveda et al., 2001; Kampatsikas et al., 2017). Goldbeck & Cammarata untersuchten die Aktivierung einer latenten PPO von Thylakoidmembranen der Chloroplasten aus dem Spinat mittels einer Kombination aus Trypsin und Carboxypeptidase (Goldbeck & Cammarata, 1981), was zu einer erfolgreichen Aktivierung führte. Die aus Zuckerrüben isolierte PPO lässt sich durch Pankreatin (ein Enzymgemisch, das Trypsin enthält) aktivieren, nicht aber durch Lecithinase D und Lipase (Mayer, 1966). Studien an der rekombinanten latenten PPO aus *Malus domestica* zeigen eine Aktivierung durch Trypsin. Proteinase K und Nargase werden als ungeeignet eingestuft (Kampatsikas et al., 2017). Allerdings ist den gezeigten SDS-Gelen zu entnehmen, dass Trypsin die PPO aus *Malus domestica* in deutlich mehr Peptide spaltet als die L-VvPPOcs-2 (es erfolgt also keine spezifische Spaltung im Linkerbereich), was vielleicht auf oberflächenexponierte Arginine und Lysine in der Struktur der PPO zurückzuführen ist.

Trypsin als möglicher *in vivo*-Aktivator in Pflanzen

Von den untersuchten Proteasen führt nur Trypsin zu einer selektiven Spaltung der L-VvPPOcs-2 kurz vor dem Linkerbereich und zu einer effektiven Aktivierung. Pflanzen enthalten physiologisch kein Trypsin, es kann jedoch durch Verdauungssekrete aus Fraßfeinden oder Schleim von Pilzen nach Verletzung des Pflanzengewebes mit PPOs in Kontakt kommen und diese aktivieren (Jamal et al., 2013; Meriño-Cabrera et al., 2018). Da eine derartige Schädigung des Gewebes eine Immunreaktion der Pflanze erfordert, ist eine Trypsin-Aktivierung der PPO *in vivo* auf diesem Weg denkbar und sinnvoll. Untersuchungen zur biochemischen Wirkung von Insekten auf Pflanzen haben gezeigt, dass Trypsin-ähnliche Aktivatoren aus *Leucoptera coffeella* bei Kontakt mit Blättern von *Coffea arabica* zu einem Anstieg der PPO-Aktivität führen. *Leucoptera coffeella* weist zudem eine 33-fach höhere Konzentration

an Trypsin-ähnlichen Aktivatoren im Vergleich zu Chymotrypsin-ähnlichen Faktoren auf (Meriño-Cabrera et al., 2018), weswegen eine Aktivierung der PPO mittels Trypsin oder Trypsin-ähnlichen Enzymen als Schutzmechanismus vorstellbar wäre.

Zusätzlich könnten Trypsin-ähnliche Enzyme in der Pflanze selbst unter bestimmten Voraussetzungen als Aktivatoren dienen. Die Existenz einer solchen Protease ist sehr wahrscheinlich, da aktive PPOs (also ohne C-terminale Domäne) einer Größe unter 40 kDa vielfach aus Pflanzengewebe isoliert wurden (Klabunde et al., 1998; Virador et al., 2010; Zaini et al., 2013; Fronk et al., 2015; Gong et al., 2015; Bravo & Osorio, 2016; Escalante-Minakata et al., 2017; Panadare & Rathod, 2018). In der Traube wurden 712 Proteine identifiziert, von denen 62 keiner bekannten Proteingruppe und Zellkompartementen zugeordnet werden konnte (Riebel, 2016; Riebel et al., 2017). Mit der Zeit werden durch weitere Forschungsarbeiten und verbesserten experimentellen Techniken weitere Proteine zugeordnet werden können. Trypsin-ähnliche Proteasen könnten beispielweise in Vakuolen, in denen sich auch die Substrate der PPO befinden, lokalisiert sein und bei Zerstörung der Zellkompartimentierung mit der PPO in Kontakt kommen und diese aktivieren. Möglich wäre auch, dass solche Enzyme zunächst in einer inaktiven Vorstufe vorliegen, die erst durch andere Aktivatoren (z.B. pH-Schwankung, weitere Enzyme) zum funktionstüchtigen Enzym reifen, vergleichbar zum humanen Trypsinogen-Trypsin-System (Haverback et al., 1960; Liener, 1960; Walsh, 1970). Diese Aktivierungskaskade würde eine Lokalisation der inaktiven Trypsin-ähnlichen-Vorstufe in jedem Zellkompartiment ermöglichen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die proteolytische Aktivierung eines Proenzym und anschließende Proteolyse einer PPO Zeit kostet, so dass parallel zu dieser Aktivierung noch weitere Aktivatoren denkbar wären. *In vitro* vergingen bis zur vollständigen Aktivierung von PPOs zwischen 5 min und 30 min (Kap, 3.2.1; Goldbeck & Cammarata, 1981; Sánchez-Ferrer et al., 1989; Laveda et al., 2001).

Trypsin löst in der Pflanze neben der PPO-Aktivierung noch viele weitere Reaktionen aus. Aus diesem Grund besitzen Pflanzen ein ganzes Abwehrsystem aus Serin-Protease-Inhibitoren, die nach Gewebsverletzung verstärkt exprimiert werden (Green & Ryan, 1972; Jongtsma et al. 1994, Lawrence & Koundal, 2002). Es ist bekannt, dass Trypsin und Trypsin-ähnliche Enzyme aus Verdauungsssekreten von Insekten bei Langzeitexposition an Inhibitoren neue Isoformen ausbilden, gegen die die vorhandenen Inhibitoren keine Wirkung zeigen. In einem generationsübergreifenden evolutionären Prozess kommt es so zur Bildung angepasster Inhibitoren (Koiwa et al., 1997; Koiwa et al., 1998; Jamal et al., 2013). Vorstellbar ist, dass die PPO als abschließender Teil des Proteasen-Abwehrsystems durch die Katalyse der Melaninbildung zum Gewebeschutz beiträgt, falls die Inhibitoren die Proteolyse nicht verhindern oder reduzieren bzw. diese nicht schnell genug exprimiert werden können.

4.4 Pflanzliche PPOs zeigen über einen breiten pH-Bereich Aktivität

Die L-VvPPOcs-2 besitzt wie jedes Enzym ein pH-Optimum, da eine Variation der Protonenkonzentration im umgebenden Medium Konformationsänderungen innerhalb des Enzyms hervorrufen (Janovitz-Klapp et al. 1989; Valero & García-Carmona, 1992, 1998; Yoruk & Marshall, 2003). Die pH-Optima des L-VvPPOcs-2 wurden unter Einfluss von SDS, Trypsin und auch ohne Zusatz eines Aktivators gemessen (Abb. 42). Sie differieren nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung um eine pH-Einheit (SDS: pH 5,5; Trypsin: pH 4,5), unterscheiden sich aber nicht zwischen dem Wildtyp und den Muteinen. Es ist vielfach beschrieben, dass sich die pH-Optima für SDS-Aktivierung latenter PPOs zu höheren Werten verschieben, was einer Verschiebung der pK_S -Werte der PPO zugeschrieben wird, die durch Wechselwirkung mit den negativ geladenen SDS-Molekülen entstehen (Jimenez & García-Carmona, 1996; Espin & Wichers, 1999; Yoruk & Marshall, 2003; Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015). Ist dem Reaktionsgemisch kein Aktivator zugesetzt (die Aktivierung erfolgt also durch einen sauren pH-Wert), ist das pH-Optimum des Wildtyps gegenüber dem der Muteine leicht verschoben (L-VvPPOcs-2wt: pH 3,5; L-VvPPOcs-2-F259L/F259G: pH 4,0; Abb.51). Zudem fällt auf, dass abhängig vom Aktivator bei niedrigen pH-Werten < 2,5 keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Besonders die Muteine sind gegenüber niedrigen pH-Werten empfindlich (L-VvPPOcs-2-F259G zeigt unter pH 3,5 keine Aktivität, Abb. 42). Möglich ist, dass diese durch die Substitution der Aminosäure F259 weniger stabil sind. Hiervon muss die Raumstruktur des Proteins nicht betroffen sein, jedoch könnte die Mutation ursächlich für die Instabilität im niedrigen pH-Bereich sein.

Im sauren pH-Bereich unter Beimischung von SDS kommt es zur Präzipitation der L-VvPPOcs-2 (Kap. 3.5.2), die wahrscheinlich auf die denaturierende Wirkung von SDS-Molekülen zurückzuführen ist. Die rekombinante PPO aus *Taraxacum officinale* zeigt ebenfalls im sauren Bereich unter Einfluss von SDS keine Aktivität. Zu vermuten ist, dass auch diese präzipitiert (persönliche Kommunikation: [REDACTED]; Leufken et al., 2015).

Insgesamt fällt auf, dass die L-VvPPOcs-2 über einen breiten pH-Bereich aktiv ist, was auch für andere PPOs beschrieben ist (Leufken et al., 2015; Derardja et al., 2017). Dies ist für die L-VvPPOcs-2 insbesondere nach Trypsin-Aktivierung der Fall. Zwar ist der pH-Wert in den einzelnen Zellorganellen der Pflanzenzelle streng kontrolliert, wird sich jedoch bei Zerstörung der Zellkompartimentierung neu einstellen, so dass ein breiter Wirkungsbereich sinnvoll erscheint, um an der Immunantwort der Zelle beteiligt zu sein (Kap. 4.3). Leufken et al. erzeugten durch einen Domänen austausch von Linkerbereich und/oder C-terminalen Domäne Hybride zwischen der Isoform 1 und 2 der PPO aus *Taraxacum officinale* und wiesen so nach, dass das pH-Optimum der PPO von der C-terminalen Domäne beeinflusst wird (Leufken et al., 2015). Maßgeblich für die Lage der pH-Optima sei aber dennoch der Aufbau der N-terminalen Domäne, da diese das aktive Zentrum trage (Leufken et al., 2015).

In der Literatur sind die pH-Optima vieler pflanzlicher PPOs dokumentiert. Diese variieren zwischen pH 3,5 und pH 8 (Abb. 51), je nach Pflanzengewebe, Extraktionsgewebe, Puffersystem, Temperatur, verwendetem Substrat, Proteinzustand (aktiv oder latent) und Aktivator (Whitaker, 1994; Yoruk & Marshall, 2003; Kampatsikas et al., 2017), was einen Vergleich schwierig macht. Selbst für PPOs aus dem gleichen Organismus werden unterschiedliche pH-Optima beschrieben (Yoruk & Marshall, 2003), so auch für die PPO aus der Traube (Cash et al., 1976; Wissemann & Lee, 1981; Lee et al., 1983; Nakamura et al., 1983; Interesse et al., 1984; Valero et al., 1988; Lamikanra et al., 1992; Yoruk & Marshall, 2003; Ludwig, 2014; Fronk et al. 2015; Solem, 2017). Neben unterschiedlichen Experimentalbedingungen, könnte auch das Vorkommen verschiedener Isoformen ursächlich für die Abweichung der angegebenen pH-Optima sein. Für verschiedene Isoformen der rekombinanten PPO aus *Taraxacum officinale* wurden Abweichungen in den Optima von bis zu zwei pH-Einheiten gemessen (PPO-1: pH 5/PPO-2: pH 7; Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015).

Der Einfluss des verwendeten Substrates auf den Verlauf der pH-Kurve ist auf protonierbare Gruppen, an Phenolen zurückzuführen (z.B. Dopamin, p-Tyrosol; Abb. 41), deren Ladungszustände sich je nach pH-Wert des umgebenden Milieus ändern und somit die Bindungsfähigkeit an das aktive Zentrum verändern, weswegen ein Aktivitätsvergleich zwischen Substraten mit und ohne protonierbaren Gruppen erschwert wird (Wesche-Ebling & Montgomery, 1990; Whitaker 1994; Paul & Gowda, 2000; Yoruk & Marshall, 2003) und unbedingt in die Dateninterpretation einbezogen werden muss.

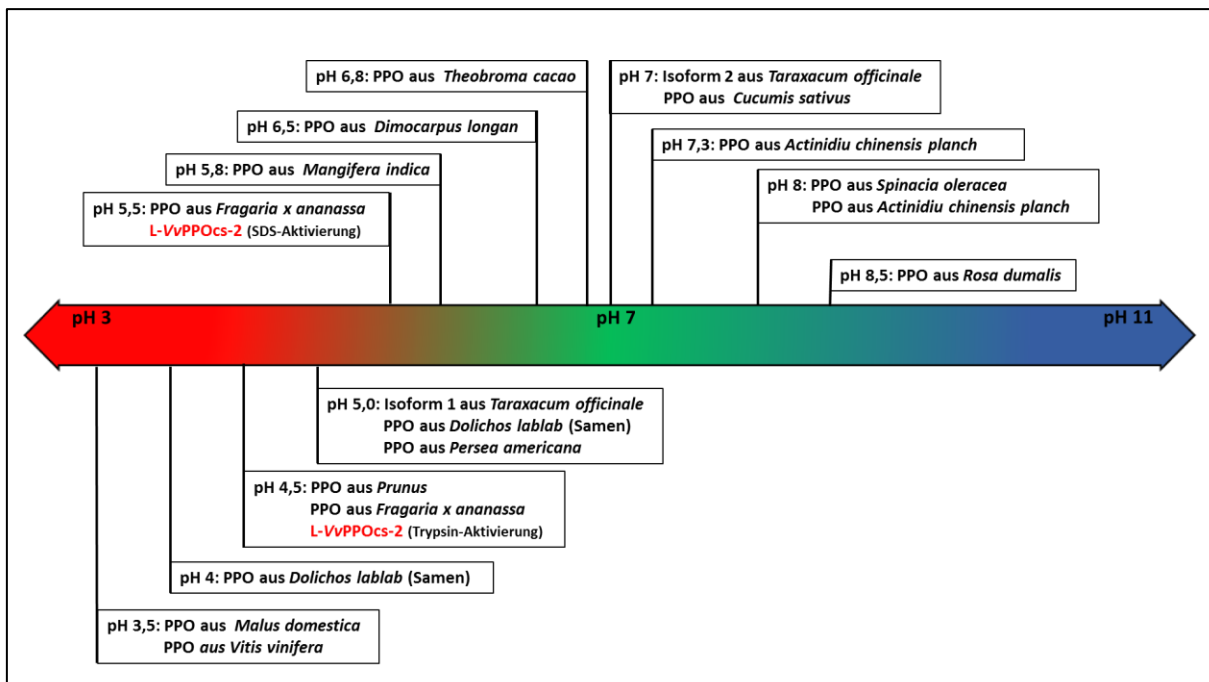


Abbildung 51: pH-Optima ausgewählter pflanzlicher PPOs. Die pH-Optima pflanzlicher PPOs variieren über einen breiten pH-Bereich. Selbst für PPOs aus demselben Organismus wurden unterschiedliche pH-Optima beschrieben. Die L-VvPPOcs-2 zeigt nach SDS- und Trypsin-Aktivierung unterschiedliche pH-Optima. **pH 3,5:** PPO aus *Malus domestica* (Apfel), Substrat: 4-MC (Marques et al., 1995); PPO aus *Vitis vinifera* (Traube), Substrat: 4-MC (Valero et al., 1988); **pH 4,0:** PPO aus *Dolichos lablab* (Samen der Ackerbohne), Substrat: 4-MC (Paul & Gowda, 2000); **pH 4,5:** PPOs aus *Prunus* (Kirsche), Substrat: 4-MC (Fraignier et al., 1995); PPO aus *Fragaria x ananassa* (Erdbeere), Substrat: 4-MC (Wesche-Ebling & Montgomery, 1990); **pH 5,0:** PPO aus *Taraxacum officinale* Isoform 1 (Löwenzahn), Substrat: 4-MC (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015); PPO aus *Dolichos lablab* (Samen der Ackerbohne), Substrat: L-Dopa (Paul & Gowda, 2000); PPO aus *Persea americana* (Haas Avocado), Substrat: 4-Hydroxyanisole (Espin et al., 1997); **pH 5,5:** PPO aus *Fragaria x ananassa* (Erdbeere), Substrat: Catechol (Wesche-Ebling & Montgomery, 1990); **pH 5,8:** PPO aus *Mangifera indica* Kensington Pride (Mango), Substrat: 4-MC (Robinson et al., 1993); **pH 6,5:** PPO aus *Dimocarpus longan* Lor. (Loganfrucht), Substrat: 4-MC (Jiang, 1999); **pH 6,8:** PPO aus *Theobroma cacao* (Kakaobohne), Substrat: Catechol (Lee et al., 1991); **pH 7,0:** PPO aus *Taraxacum officinale* Isoform 2 (Löwenzahn), Substrat: 4-MC (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015); PPO aus *Cucumis sativus* (Gurke), Substrat: Catechol (Miller et al., 1990); **pH 7,3:** PPO aus *Actinidiu chinensis planch* (Kiwi), Substrat: Catechol (Park & Luh, 1985); **pH 8,0:** PPO aus *Actinidiu chinensis planch* (Kiwi), Substrat: (+) Catechin (Park & Luh, 1985); PPO aus *Spinacia oleracea* (Spinat), Substrat: Dopamin (Sheptovitsky & Brudvig, 1996); **pH 8,5:** PPO aus *Rosa dumalis* (Hundsrose), Substrat: Catechol (Sakirogluet et al., 1996). Visualisiert nach Yoruk & Marshall, 2003.

4.5 Die Katalyse pflanzlicher PPOs ist multifaktoriell beeinflusst

Die L-VvPPOcs-2 setzt alle vier verwendeten Substrate um (Ausnahme: SDS-aktivierte L-VvPPOcs-2-F259G und p-Tyr), wobei der Umsatz des Substrates 4-MC in Hinblick auf die Wechselzahl und die katalytische Effizienz am effektivsten katalysiert wird (Kap. 3.5.4). Dem folgen Catechol, Dopamin und p-Tyrosol, wobei beachtet werden muss, dass die pH-Optima der L-VvPPOcs-2 für das Substrat 4-MC ermittelt wurden und somit ein direkter Vergleich mit dem Umsatz protonierbarer Substrate (DA, p-TYR) im leicht sauren pH-Milieu schwierig ist.

Generell sind die ermittelten Wechselzahlen im Vergleich zu anderen Enzymen als niedrig zu bewerten. Es ist nicht bekannt, wieviel Kupfer in das aktive Zentrum der L-VvPPOcs-2 eingebaut wurde. Sollte einzelnen Molekülen ein oder beide Kupferionen fehlen, sind diese enzymatisch inaktiv und reduzieren somit die zur Berechnung der Katalyserate eingesetzte Konzentration an aktiver PPO. Für die enzymatischen Messungen in dieser Arbeit ist es vor allem wichtig, dass der L-VvPPOcs-2wt eine ähnliche Kupfersättigung aufweist wie die Muteine -F259L und -F259G. Dieser Nachweis gelang in früheren Experimenten (Ludwig, 2014). Dieser Aspekt sollte bei Messungen mit rekombinant gewonnenen PPOs berücksichtigt werden (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015; Kampatsikas et al., 2017; Prexler et al., 2018; Kampatsikas et al., 2019).

Es sind große Unterschiede zwischen den Wechselzahlen verschiedener PPO-Isoformen aus dem gleichen Organismus bekannt (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Kampatsikas et al., 2019), so dass sich für eine andere Isoform der L-VvPPOcs größere Wechselzahlen messen lassen könnten.

4-MC wird oft als Modellsubstrat für kinetische Messungen verwendet, da es von vielen PPOs effektiv umgesetzt wird (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al., 2015; Katayama-Ikegami et al., 2017; Prexler et al., 2018). Die in dieser Arbeit beobachtete Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeiten der L-VvPPOcs-2wt und -F259L für $[4\text{-MC}] > 20 \text{ mM}$ wurde bereits für die PPO aus *Taraxacum officinale* als Substratinhibition beschrieben (Dirks-Hofmeister et al., 2014). Die Tatsache, dass das weniger aktive Mutein -F259G keine Inhibierung zeigt, lässt die Vermutung zu, dass es sich bei dem auftretenden Inhibierungsmechanismus um eine Form von Produktinhibition handelt: Entsteht weniger Produkt, wie bei der Katalyse des 4-MC durch das Mutein -F259G der Fall ist, setzt die Inhibition nicht ein. Es muss beachtet werden, dass durch die Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung an die Reaktionsgeschwindigkeiten für $[4\text{-MC}] \leq 20 \text{ mM}$, K_M und v_{\max} unterschätzt werden können.

Die katalytische Tasche wird als hydrophobe Höhle beschrieben, die mit dem Catecholring der Substrate interagiert (Dirks-Hofmeister et al., 2014), wobei das Substrat eine Sandwich-Struktur mit dem konservierten Phenylalanin (*Gate-Residue*) und dem Imidazolring des H_{B2} bildet (Dirks-Hofmeister et al., 2014). In mehreren kinetischen Studien fällt auf, dass Substrate mit weniger sperrigen Seitenketten (z.B. 4-MC) besser umgesetzt werden als solche, die lange Reste tragen, z.B. Kaffeesäure oder DA (Dirks-Hofmeister et al., 2014; Katayama-Ikegami et al., 2017). Das noch kleinere Catechol

hingegen wird schlechter umgesetzt als 4-MC und die L-VvPPOcs-2 zeigt auch eine geringere Substrataffinität zu CAT. Es ist möglich, dass das Catechol, das keine Seitenkette aufweist, aufgrund seiner Größe nicht oder nur geringfügig durch Wechselwirkungen stabilisiert werden kann. An Position H_{B2+1} wurde von Prexler et al. eine Aminosäure identifiziert, die die Substratspezifität pflanzlicher PPOs beeinflussen soll (Prexler et al., 2018; Abb. 52). In einigen Isoformen der PPO aus *Taraxacum officinale* wird diese von einem Arginin gebildet. Durch Vergleich mit den Umsatzraten anderer Isoformen und in Studien an PPOs aus anderen Organismen ergab sich, dass PPOs, die an Position H_{B2+1} eine Aminosäure mit langen positiv geladenen Seitenketten (Arginin, Lysin) tragen, eine erhöhte Substratspezifität für negativ geladene Substrate und kleine Substrate wie 4-MC aufweisen können (Klabunde et al., 1997; Goldfeder et al., 2014; Bijelic et al., 2017; Prexler et al., 2018). Diese Vermutung beruht allerdings nur auf Docking-Experimenten auf Grundlage von Homologiemodellen und kinetischen Untersuchungen. Eine experimentelle Bestätigung in Form einer aufgeklärten Struktur aus kokristallisierter PPO und einem Substrat fehlt bislang. Die L-VvPPOcs-2 weist auf Position H_{B2+1} ein Lysin auf (Abb. 52 A), müsste folglich auch eine erhöhte Substratspezifität für negativ geladene Substrate aufweisen, was im Rahmen dieser Dissertation nicht nachgewiesen werden konnte. Es wurde jedoch gezeigt, dass DA (ein sperriges und positiv geladenes Substrat) 8-fach schlechter umgesetzt wird als 4-MC (L-VvPPOcs-2wt nach SDS-Aktivierung). Allerdings zeigt der L-VvPPOcs-2wt eine höhere Substrataffinität zu DA als zu 4-MC, was den Rückschluss zulässt, dass DA besser im aktiven Zentrum bindet als 4-MC, aber nicht effektiv katalysiert werden kann. Zusätzlich soll nach Prexler et al. die Aminosäure auf Position H_{B1+1} Substrate durch hydrophobe Interaktion stabilisieren (Molitor et al., 2015; Prexler et al., 2018). Nachvollziehbar ist, dass einzelne Aminosäuren durch ihre Größe und Ladung Einfluss auf den Zugang und die elektrostatischen Eigenschaften der katalytischen Tasche haben.

Natürliche Substrate pflanzlicher PPOs sind bislang weitgehend unbekannt, wobei Flavonoide und Catechine als potentielle Substanzen diskutiert werden (Lee & Jaworski, 1988; Murata et al., 1995; Pourcel et al., 2007; Sullivan, 2015; Pretzler & Rompel, 2017; Prexler et al., 2018; Kampatsikas et al., 2019). PPOs aus der Aprikose, dem Kaffee und dem Apfel zeigen *in vitro* die höchste Katalyserate bei Umsatz von Chlorogensäure, die physiologisch in vielen Pflanzen (z.B. Kaffee oder Kartoffeln) in hohen Konzentrationen vorkommt (Mazzafera & Robinson, 2000; Derardja et al., 2017; Marrufo-Hernández et al., 2017). Von den in dieser Arbeit verwendeten Substraten ist Dopamin als natürliche Substanz in Pflanzen vertreten und somit ein mögliches *in vivo* Substrat für die L-VvPPOcs-2. Die niedrige Umsatzrate lässt aber vermuten, dass DA nicht das „Zielsubstrat“ der Isoform 2 ist, um einen physiologischen Nutzen zu erzielen. Eventuell stellt sich aber bei Zerstörung der Zellkompartimentierung und dem daraus resultierenden Enzym-Substrat-Kontakt ein für die DA-Katalyse optimalerer pH-Wert ein oder eine andere Isoform zeigt eine höhere Katalyserate. Wäre die

Katalyserate tatsächlich gering, ist auch denkbar, dass bei dauerhafter Schädigung des Pflanzengewebes (z.B. durch Schädlingsbefall) die PPO überexprimiert wird und so durch entsprechend viele Enzymmoleküle eine nennenswerte Menge an Dopamin umgesetzt. Dieses Schema findet sich in der Natur zum Beispiel in der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase wieder, die das häufigste Protein der Erde darstellt und in photosynthetisch aktiven Zellen mit kleiner Katalyserate der Fixierung des CO₂ dient (Ellis, 1979; Andrews & Lorimer, 1987; Hartman & Harpel, 1994).

Der Aktivierungsmechanismus beeinflusst die Monophenolase-Aktivität

Pflanzliche PPOs galten lange als Catecholoxidasen, d.h. sie sollten sich durch ein Fehlen der Monophenolase-Reaktion auszeichnen (Goldbeck & Cammarata, 1981; King & Flurkey, 1987; Robinson & Dry, 1987; Klabunde et al., 1998; Kanade et al., 2006; Dirks-Hofmeister et al., 2012). Für die PPO aus *Vitis vinifera*, die zunächst ebenfalls als Catecholoxidase beschrieben wurde (Virador et al., 2010), gelang inzwischen mehrfach der Nachweis der Monophenolase-Reaktion (Ludwig, 2014; Fronk et al., 2015; Solem, 2017). Aufgrund des geringen Umsatzes von Monophenolen (Kap. 3.5.4) und der bekannten lag-Phasen (Cabanés et al., 1987; Ros et al., 1994; Sojo et al., 1998; Laveda et al., 2001; Katayama-Ikegami et al., 2017), könnten pflanzliche PPOs bei ungenügender Beobachtungszeit des Experimentes fälschlicherweise als Catecholoxidasen eingestuft worden sein. Dafür spricht, dass in der Literatur seit einigen Jahren vermehrt pflanzliche PPOs als Tyrosinasen beschrieben werden (Zekiri et al., 2014; Ludwig, 2014; Fronk et al., 2015; Kampatsikas et al., 2017; Kampatsikas et al., 2019). Weshalb Catecholoxidasen trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft in der Monophenolase-Aktivität restringiert sind, wurde vielfältig diskutiert, dennoch sind die Gründe bislang nicht geklärt (Goldfeder et al., 2013; Goldfeder et al., 2014; Kanteev et al., 2015; Solem et al., 2016; Kampatsikas et al., 2017; Solem, 2017; Kampatsikas et al., 2019). Die Ursachen werden jedoch meistens strukturellen Besonderheiten zugeschrieben, wie zum Beispiel dem *Gate-Residue*, einer bei pflanzlichen PPO vorkommenden kovalente Thioetherbindung zwischen dem H_{A2} und einem nah lokalisierten Cystein (Kap. 1.2.1), oder dem sogenannten *Place-Holder-Residue*, eine in der C-terminalen Domäne lokalisierte Aminosäure, die im inaktiven latenten Zustand die Position des Substrates im aktiven Zentrum besetzt (Cuff et al., 1998; Gerdemann et al., 2002; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007; Pretzler & Rempel, 2017; Solem, 2017).

Goldfeder et al. diskutierten, dass bei Koexistenz der Thioetherbindung und einem sperrigen Phenylalanin als *Gate-Residue* eine Monophenolase-Aktivität der PPO nicht gegeben sein könne, da die Substratdrehung, die für die Hydroxylierung des monophenolischen Substrates am Cu_A-Zentrum nötig sei (Decker et al., 2006), aus der axialen (parallel zu H_{A3}) in die äquatoriale (parallel zu H_{A2}) Position sterisch behindert werde (Goldfeder et al., 2013; 2014; Ludwig, 2014; Solem 2017).

Die L-VvPPOcs-2 weist beide strukturellen Charakteristika auf und zeigt dennoch Monophenolase-Aktivität. Fronk et al. zeigten mittels MD-Simulationen, dass das *Gate-Residue* F259 der VvPPOg nicht fixiert ist, sondern durch Rotation das Cu_A-Zentrum freilegen kann (Fronk et al., 2015). Anhand der Kristallstrukturen aus *Streptomyces* wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Monophenol durch π - π -Wechselwirkung mit dem Imidazolring des H_{B2} „vororientiert“ wird, so dass die Hydroxylbindung auf das Cu_A weist (Decker et al., 2006; Fronk et al., 2015). Anschließend kommt es zu einer Verschiebung des Monophenols in Richtung des Cu_A-Zentrums, zur Koordinierung und die Hydroxylierung erfolgt (Decker et al., 2006; Decker et al., 2010).

Der Nachweis der Monophenolase-Aktivität bestimmter Isoformen und Muteine der L-VvPPOcs ist in dieser und anderen Arbeiten eindeutig gelungen (Kap. 3.5.4; Ludwig, 2014; Solem, 2017), womit das Vorkommen der beschriebenen Thioetherbindung bei gleichzeitigem sperrigen *Gate-Residue* als hinreichendes Kriterium für eine Differenzierung zwischen Tyrosinasen und Catecholoxidasen unzureichend ist.

Solem et al. postulierten in Anlehnung an eine Theorie von Goldfeder et al., dass als strukturelle Voraussetzung für die Monophenolase-Aktivität von PPOs das Vorhandensein eines konservierten Wassermoleküls sei, dass über ein konserviertes Glutamat und Asparagin im Cu_B-Motiv über zwei Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert sei (Abb. 52; Goldfeder et al., 2014; Solem et al., 2016). Dieses Wassermolekül diene als „interne Base“ und ermögliche somit den Deprotonierungsschritt der monophenolischen Substrate, der für die Weiterreaktion unerlässlich sei (Decker et al., 2006; Rolff et al., 2011; Goldfeder et al., 2014; Solem et al., 2016; Solem, 2017; Decker et al., 2017).

Kampatsikas beobachteten aber, dass auch andere Aminosäuren auf dieser Position bei vorhandener Monophenolase-Aktivität auftreten (Abb. 52; Kampatsikas et al., 2017; Kampatsikas et al., 2019; Kampatsikas et al., 2019) und erweiterten diese Theorie für verschiedene Isoformen aus *Malus domestica* und *Solanum lycopersicum*, indem vier Aminosäuren die Aktivität von PPOs kontrollieren sollen: Das *Gate-Residue* stabilisiert durch hydrophobe π - π -Wechselwirkung die Lage von Substraten, der sogenannte *Water-Keeper* stabilisiert das zur Deprotonierung von Monophenolen notwendige Wassermolekül (interne Base) und durch Wahl und Kombination zweier so bezeichneten *Activity-Controller* (H_{B1+1} und H_{B2+1}) wird die Umgebung der katalytischen Tasche so beeinflusst, dass das Wassermolekül entweder ausreichend stabilisiert wird oder nicht, was zu einer Verstärkung oder einem Verlust der Monophenolase-Aktivität führen kann (Abb. 52). Für eine Bestätigung dessen, müssten eine Vielzahl an Mutagenese-Studien durchgeführt werden, die nicht Gegenstand dieser Dissertation sind.

Vielmehr wird aufgezeigt, dass auch der Aktivierungsmechanismus Einfluss auf Mono- und Diphenolaseaktivität nehmen kann und Beobachtungen und physiologische Bedeutung somit nicht nur auf strukturelle Charakteristika zurückzuführen und zu reduzieren sind.

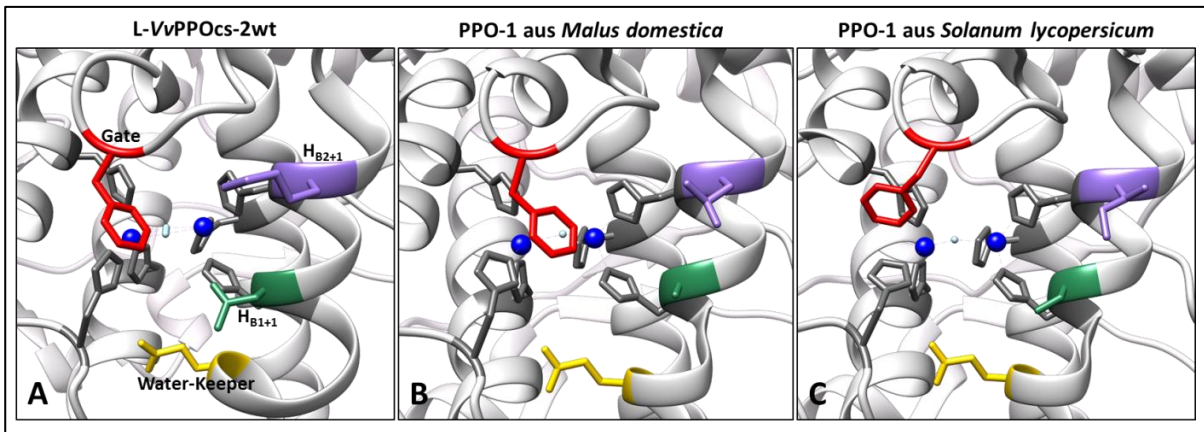


Abbildung 52: Funktionelle Aminosäuren in der katalytischen Tasche pflanzlicher PPOs. **A:** L-VvPPOcs-2wt: Homologiemodell nach Di Silvestre, 2018. **B:** PPO-1 aus *Malus domestica* (PDB: 6ELS; Kampatsikas et al., 2019). **C:** PPO-1 aus *Solanum lycopersicum* (PDB: 6HQL; Kampatsikas et al., 2019). Das Gate-Residue (rot) und der Water-Keeper (gelb) sind hochkonserviert. Die Activity-Controller (H_{B1+1} (grün) und H_{B2+1} (violett)) sollen Einfluss auf Abschwächung bzw. Verstärkung der Monophenolase-Aktivität haben. Das Gate-Residue in der Kristallstruktur der PPO aus *Solanum lycopersicum* weist eine ungewöhnliche Lage auf, was auf eine hohe Flexibilität hindeutet.

4.5.1 Aktivierungsmechanismen beeinflussen die Katalyserate und Substrataffinität

Für die Bearbeitung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit, die Aktivierung von latenten pflanzlichen PPOs, stehen *in vitro* grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien zur Verfügung: die proteolytische Abspaltung der C-terminalen Domäne oder eine durch Detergenzien (hier: SDS) oder angesäuertes Milieu induzierte Konformationsänderung des Enzyms. Beide Fälle bewirken einen offeneren Zugang zur katalytischen Tasche für phenolische Substrate (Kap. 1.2.2; Moore & Flurkey, 1990; Robinson & Dry, 1992; van Geldern et al., 1997; Marusek et al., 2006; Gandía-Herrero et al., 2005; Leufken et al., 2015).

Eine Aktivierung der L-VvPPOcs-2 mittels SDS bei sauren pH-Werten führte zur Präzipitation und Denaturierung der L-VvPPOcs-2 (Kap. 3.5.2). Es ist vorstellbar, dass die durch den sauren pH-Wert destabilisierte L-VvPPOcs-2 besonders empfindlich auf die leicht denaturierende Wirkung des SDS reagiert, was dann zur Präzipitation führt. Allerdings kann die Frage nach der starken Fragmentierung der denaturierten L-VvPPOcs-2 (Abb. 43) im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Auch in der Literatur findet man Angaben darüber, dass zum Beispiel für die latente PPO aus *Malus domestica* (Kampatsikas et al., 2017) Aktivität in Anwesenheit von SDS erst ab einem pH-Wert von 5 induziert werden kann. Ebenso ist die PPO aus *Taraxacum officinale* unter Verwendung von SDS bei pH 3 inaktiv (Dirks-Hofmeister et al., 2014). Ob es unter diesen Experimentalbedingungen auch zu einer Präzipitation der PPO kommt, ist nicht bekannt. Da es sich bei SDS um eine artifizielle Substanz handelt, spielen diese Wechselwirkungen *in vivo* wahrscheinlich keine Rolle.

Eine maßgebende Beobachtung ist, dass in den meisten Fällen nach Trypsin-Aktivierung eine höhere Aktivität (k_{cat}) der L-VvPPOcs-2 nachgewiesen werden konnte als nach SDS-Aktivierung. Diese Aussage trifft insbesondere für die Muteine zu (L-VvPPOcs-2-F259L: 1,5-fache Aktivitätssteigerung bei Umsatz von 4-MC, L-VvPPOcs-2-F259G: 10-fache Aktivitätssteigerung). Unter der Prämisse, dass die C-terminale Domäne vollständig von der katalytischen Einheit getrennt wird und somit das aktive Zentrum frei zugänglich ist (Abb. 50 B-C), ist eine Steigerung der Aktivität nachvollziehbar. Wird die L-VvPPOcs-2 durch SDS aktiviert, kommt es zu einer Änderung der Enzymkonformation, über die bislang keine konkreten Erkenntnisse vorliegen. Folglich ist unbekannt wie „frei“ die Öffnung für Substrate zum aktiven Zentrum wirklich ist und ob alle PPOmoleküle eine gleichartige Konformationsänderung erfahren. Demzufolge ist unklar, wie hoch die Aktivierungsrate der L-VvPPOcs-2 tatsächlich ist. Trypsin hingegen hydrolysiert nahezu 100 % der Enzymmoleküle, wie mittels SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde (Kap. 3.2.1). Aufgrund des Alleinstellungsmerkmals des Trypsins der einzige effektive Aktivator von fünf betrachteten Proteasen zu sein, ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich eine Konformationsänderung der L-VvPPOcs-2 stattfindet, die eine Aktivierung unterstützt. Die Rate eines solchen zusätzlichen Effekts ist (wie im Falle der SDS-Aktivierung) unbekannt. Allerdings liegt Trypsin im Vergleich zur L-VvPPOcs-2 stöchiometrisch betrachtet in so geringer Konzentration vor, dass eine Konformationsänderung aller PPO-Moleküle unwahrscheinlich ist.

Zu beachten ist, dass die C-terminale Domäne experimentell nicht vollständig von der katalytischen Domäne getrennt werden konnte (Kap. 3.4). Wahrscheinlich haftet sie aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen unter Experimentalbedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert) der L-VvPPOcs-2 noch an (Kampatsikas et al., 2019). Dabei liegt sie in einer zu ihrer ursprünglichen Position veränderten Lage, was durch den Fakt, dass die L-VvPPOcs-2 aktiviert werden konnte und die Domänen unter denaturierenden Bedingungen und Hitzeeinwirkung (SDS-Gel, Kap. 3.2.1) getrennt werden konnten, gestützt wird.

Fronk et al., die mit der biochemisch aus Pflanzengewebe isolierten Mischung von PPO-Isoformen aus *Vitis vinifera* (Riesling und Dornfelder) arbeiten, beschrieben, dass das isolierte 38 kDa Fragment (die aktive Form) eine deutlich höhere Aktivität zeigt als die isolierte latente Form (59 kDa) nach SDS-Aktivierung (Fronk et al., 2015). Dies bekräftigt die Beobachtung, dass Trypsin-Aktivierung (Erzeugung eines Analogons zu dem physiologischen 38 kDa Fragmentes) gegenüber der SDS-Aktivierung (59 kDa Protein bleibt intakt) überwiegend zu einer Steigerung der Katalyse der PPO aus *Vitis vinifera* führt (Abb. 53).

Hingegen ist für die PPO aus *Malus domestica* beschrieben, dass Trypsin-Aktivierung zu einer schlechteren Katalyse als SDS-Aktivierung führe (Kampatsikas et al., 2017). Dies könnte in der unterschiedlichen Primärstruktur der PPOs aus *Vitis vinifera* und *Malus domestica* begründet sein, so

dass die PPO aus *Malus domestica* aufgrund zu vieler oberflächenexponierter Arginine und Lysine in viele Spaltpeptide zerlegt wird und keine klare Trennung in N- und C-terminalen Domäne auftritt.

Kommt es zu einer Offenlegung des aktiven Zentrums, steigt zusätzlich die Affinität der L-VvPPOcs-2 zu fast allen eingesetzten Substraten an (Abb. 53). Mit Abtrennung der C-terminalen Domäne wird die Platzhalter-Aminosäure vollständig aus dem aktiven Zentrum entfernt, so dass bereits angesprochene Wechselwirkungen mit weiteren funktionellen Aminosäuren zu einer Substratbindung führen (Kap. 4.5)

Die katalytische Effizienz erhöhte sich sowohl für den L-VvPPOcs-2wt als auch für die Muteine bei Umsatz aller eingesetzten Substrate, so dass die Vermutung, dass die L-VvPPO-2 *in vivo* proteolytisch aktiviert wird, um eine schnelle und effiziente Funktion zu gewährleisten, durch die durchgeführten Experimente unterstützt wird.

		L-VvPPOcs-2wt	L-VvPPOcs-2-F259L	L-VvPPOcs-2-F259G
4-MC	K_M [mM]	↓	↓ ↓	↓
	k_{cat} [1/s]	→	↑	↑ ↑
	k_{cat}/K_M [$s^{-1} mM^{-1}$]	↑	↑ ↑	↑ ↑
CAT	K_M [mM]	↓	↑	↓
	k_{cat} [1/s]	↑	↑ ↑	↑ ↑
	k_{cat}/K_M [$s^{-1} mM^{-1}$]	↑	↑ ↑	↑ ↑
DA	K_M [mM]	→	↓	↓ ↓
	k_{cat} [1/s]	↓	→	↑
	k_{cat}/K_M [$s^{-1} mM^{-1}$]	↓	↑	↑ ↑
p-Tyr	K_M [mM]	↓	↓	-
	k_{cat} [1/s]	↓	→	↑ ↑
	k_{cat}/K_M [$s^{-1} mM^{-1}$]	↑	↑ ↑	-

Abbildung 53: Übersicht über Anstieg oder Abfall der kinetischen Parameter der L-VvPPOcs-2 nach Trypsin- gegenüber SDS-Aktivierung. ↑: Anstieg des Wertes nach Trypsin-Aktivierung gegenüber SDS-Aktivierung; ↑↑: Anstieg des Wertes um mindestens des 3-fache; →: kein signifikanter Anstieg oder Abfall des Wertes; ↓: Abfall des Wertes; ↓↓: Abfall des Wertes auf mindestens ein Drittel. Ein Abfall des K_M -Wertes spricht für eine erhöhte Substrataffinität der L-VvPPOcs-2 nach Trypsin-Aktivierung im Vergleich zur SDS-Aktivierung. Die L-VvPPOcs-2 zeigt in fast allen Fällen nach Trypsin-Aktivierung eine erhöhte Substrataffinität (Ausnahme: Umsatz von DA durch L-VvPPOcs-2wt, Umsatz von CAT durch -F259L). Die Katalyserate wird in vielen Experimenten durch eine proteolytische Trypsin-Aktivierung gesteigert oder ändert sich nicht signifikant (Ausnahme: Umsatz von DA durch L-VvPPOcs-2wt, Umsatz von p-Tyr durch L-VvPPOcs-2wt). Die katalytische Effizienz wurde in allen Fällen durch Trypsin-Aktivierung gesteigert (Ausnahme: Umsatz von DA durch L-VvPPOcs-2wt). Da das Mutein -F259G nach SDS-Aktivierung keine Monophenolase-Aktivität zeigt, konnten keine Angaben gemacht werden (-).

4.5.2 Das *Gate-Residue* übernimmt eine aktivierungsabhängige Funktion

Die meisten pflanzlichen PPOs tragen an der Position des *Gate-Residue*, das in einer flexiblen Schleife oberhalb des Cu_A lokalisiert ist, ein Phenylalanin. Zu dieser Gruppen gehören unter anderem PPOs aus *Vitis vinifera* (*Grenache*), *Ipomoea batatas*, *Juglans regia*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Vicia faba* sowie auch der L-VvPPOcs-2wt. Sequenzvergleiche zeigen aber, dass auch PPOs aus anderen Organismen existieren, die an der analogen Position des *Gate-Residue* andere Aminosäure aufweisen, zum Beispiel Leucine, Valine, Tyrosine oder Glycine (Claus & Decker, 2000; Marusek et al., 2006; Sendowsky et al., 2011).

Ausgehend von der These, dass das konservierte sperrige F259 den Zugang zum aktiven Zentrum für Substrate erschwere (Decker und Rimke, 1998; Eicken et al., 1999; Decker und Tuczec, 2000; Gerdemann et al., 2002; Pretzler & Rompel, 2017), wurde das *Gate-Residue* mittels PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese durch weniger raumfordernde, aber dennoch physiologisch vorkommende Aminosäuren substituiert, durch die der Zugang zum aktiven Zentrum offener und das Reaktionsvolumen der katalytischen Tasche vergrößert wird. Das Mutein L-VvPPOcs-2-F259L wurde von mir im Rahmen meiner Masterarbeit (Ludwig, 2014) und das Mutein L-VvPPOcs-2-F259G von [REDACTED] für seine Dissertation (Solem, 2017) erstellt, um die katalytische Aktivität des L-VvPPOcs-2wt gegen ein ungeladenes, aber dennoch raumforderndes *Gate-Residue* (L-VvPPOcs-2-F259L) bzw. einen offenen Zugang zum aktiven Zentrum (L-VvPPOcs-2-F259G) vergleichen zu können (Abb. 4).

Im Folgenden wird der Einfluss des *Gate-Residue* nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung getrennt diskutiert.

Das *Gate-Residue* fungiert nach SDS-Aktivierung als Abstandhalter

Erste Experimente zum Einfluss des *Gate-Residue* auf die Katalyse der L-VvPPOcs-2 wurden bereits im Rahmen meiner Masterarbeit durchgeführt (Ludwig, 2014; Solem, 2017). Jedoch wurden nach Optimierung der Expressionsbedingungen und Standardisierung des Messprotokolls zur Aufnahme von Kinetiken eine Vielzahl neuer Messungen durchgeführt, um verlässliche und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (Kap. 3.5).

Bei Umsatz der Diphenole 4-MC, CAT und DA konnten die höchsten Umsatzraten (v_{\max} und k_{cat}) und die höchste katalytische Effizienz jeweils für den L-VvPPOcs-2wt ermittelt werden (Tab. 22).

Auch erreicht der L-VvPPOcs-2wt bei Umsatz des Monophenols p-Tyr die höchsten Werte.

Dies war überraschend, weil der zur Ausgangsthese gegenteilige Effekt eingetreten ist: Mit kleiner werdendem *Gate-Residue* ist eine Abnahme der Katalyserate und katalytischen Effizienz zu beobachten.

Ähnliches wurde für die rekombinante PPO aus *Malus domestica* beobachtet (Kampatsikas et al., 2017). Das ebenfalls durch ein Phenylalanin gebildete *Gate-Residue* wurde gegen ein kleines hydrophobes Alanin substituiert, was zur Folge hatte, dass weder Mono- noch Diphenolase-Aktivität nachweisbar waren. Das Mutein L-VvPPOcs-2-F259G zeigte ebenfalls ein völliges Fehlen der Monophenolase-Aktivität und eine drastisch reduzierte Diphenolase-Aktivität.

Da durch den SDS-abhängigen Aktivierungsmechanismus die C-Terminale Domäne nicht entfernt wird, sondern die Struktur der PPO lediglich durch kleine nicht näher bekannte Konformationsänderungen „aufgeweicht“ wird, so dass ein genügender Platz entsteht, durch den Substrate an das aktive Zentrum gelangen können, wird vorgeschlagen, dass das *Gate-Residue* als „Abstandhalter“ zwischen der N- und C-terminalen Domäne dient (Abb. 54). Je sperriger das *Gate-Residue* ist, desto größer und weiter ist der offengehaltene Raum zwischen N- und C-terminaler Domäne, da die Bewegungsfreiheit der hochflexiblen C-terminalen Domäne in Richtung aktives Zentrum eingeschränkt wird. Durch das raumfordernde Phenylalanin entsteht zunächst der Eindruck, dass der Zugang zum aktiven Kupferzentrum verschlossen sei (Abb. 54 A). Wie bereits bekannt ist, ist das F259 flexibel und kann durch Fluktuation seiner Position den Weg zum aktiven Zentrum öffnen (Fronk et al., 2015; Kampatsikas et al., 2019). Zusätzlich nimmt es so viel Raum ein, dass Aminosäurereste der anliegenden C-terminalen Domäne (z.B. die Platzhalter-Aminosäure V446) daran gehindert werden dem aktiven Zentrum zu nah anzuliegen und somit den Zugang für Substrate zu versperren. Mit kleiner werdendem *Gate-Residue* geht diese Eigenschaft verloren. Im Falle des Muteins -F259G kann die C-terminale Domäne dem aktiven Zentrum ungehindert anliegen (Abb. 54 C).

Zusätzlich könnte dieser Effekt durch elektrostatische Wechselwirkung an der Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen moduliert werden. Je nach Polarität der an der Oberfläche liegenden Aminosäuren könnte ein Wegfall des Abstandhalters Phenylalanin in der PPO aus *Malus domestica* ein „aufeinander haften“ von N- und C-terminaler Domäne bewirken, so dass Substrate nicht mehr ans aktive Zentrum gelangen können und die PPO inaktiv ist. Sind die elektrostatischen Kräfte gleicher Polarität, führt dies zu einer Abstoßung der Domänen und somit zu einem (begrenzten) Zugang für Substrate an das katalytische Zentrum. Um diese Theorie experimentell zu bestätigen, sind Kristallstrukturen der L-VvPPOcs-2 notwendig, die bislang nicht aufgeklärt werden konnten. Der Vorschlag steht jedoch im Einklang mit den gewonnenen kinetischen Experimenten.

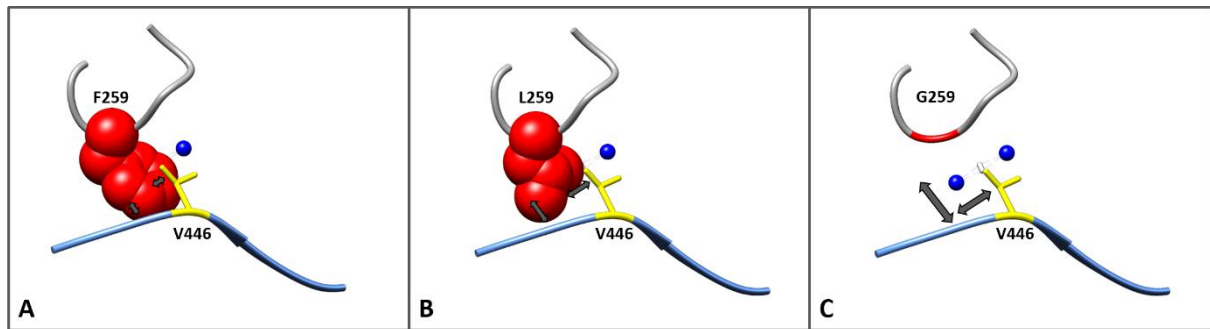


Abbildung 54: Darstellung des Gate-Residue in der Funktion des Abstandhalters. Grau: N-terminale Domäne, rot: Gate-Residue, blau: Kupferionen, hellblau: C-terminale Domäne, gelb: Platzhalter-Aminosäure. **A:** Durch den Phenylrest hat das Gate-Residue F259 raumfordernde Eigenschaften, die die Bewegungsfreiheit der hochflexiblen C-terminalen Domäne einschränken und somit verhindern, dass die Aminosäurereste der C-terminalen Domäne dem aktiven Zentrum zu nah anliegen. Durch seine bereits nachgewiesene Flexibilität können Substrate an das aktive Zentrum gelangen (Fronk et al., 2015). **B:** Leucin weist ebenfalls einen sperrigen Aminosäurerest auf, der für eine Distanz zwischen N- und C-terminaler Domäne verantwortlich sein könnte. **C:** Wird das Gate-Residue von einem Glycin dargestellt, kann die hochflexible C-terminale Domäne in alle Bewegungsrichtungen fluktuieren und damit der katalytischen Domäne direkt anliegen. Zusätzlich könnte der Effekt durch elektrostatische Wechselwirkungen verstärkt werden. Als Vorlagestruktur für die N-terminale Domäne diente die PPO aus *Vitis vinifera* Grenache (VvPPOg, PDB: 2P3X) und für die C-terminale Domäne die latente Auresidin-Synthase aus *Coreopsis grandiflora* (PDB: 4Z14). Modifiziert nach Di Silvestre, 2018.

Einfluss des Gate-Residue nach Trypsin-Aktivierung

Nachdem die C-terminale Domäne durch Trypsin proteolytisch entfernt wurde, liegt das Gate-Residue oberflächenexponiert direkt vor dem Eingang zu der katalytischen Tasche. Es könnte somit seiner namensgebenden Funktion gerecht werden und als „Tor“ den direkten Zugang zum aktiven Zentrum beeinflussen (Abb. 50 B-C).

Tendenziell fallen auch nach Trypsin-Aktivierung die Katalyseraten mit kleiner werdendem Gate-Residue ab. Beim Umsatz von CAT zeigen die Muteine aber deutlich erhöhte k_{cat} -Werte gegenüber dem Wildtyp. Wahrscheinlich ist die stabilisierende π - π -Wechselwirkung, für die das Phenylalanin ursächlich ist (Kap. 4.5) bei fehlender C-terminaler Domäne für das kleine Catecholmolekül nicht notwendig um eine effiziente Bindung und Umsetzung zu gewährleisten. Berücksichtigt man die Beobachtung, dass die Substrataffinitäten mit kleiner werdendem Gate-Residue zunehmen, zeigt insbesondere das Mutein -F259L bei Umsatz von 4-MC und CAT die höchste katalytische Effizienz (Abb. 48). Die mit weniger sperrigen Gate-Residue fallenden Katalyseraten zeigen, dass eine bessere Substratbindung an das aktive Zentrum unabhängig von einer verbesserten Katalyserate ist.

Es ist interessant, dass das Mutein -F259G nur nach Trypsin-Aktivierung Monophenolase-Aktivität zeigt (Kap. 3.5.4). Für das Mutein -F259G konnte nach SDS-Aktivierung mit keinem verwendeten Monophenol (p-Tyr, p-Cumarsäure, Tyramin) auch unter Beachtung eventuell auftretender lag-Phasen (Beobachtung bis zu 10 h) und unter Einsatz von des MBTH-Assays zur Verstärkung von Messsignalen eine Monophenolase-Aktivität nachgewiesen werden (auch Ludwig, 2014). Eine schwache Diphenolase-Aktivität trat nach SDS-Aktivierung auf, so dass postuliert wird, dass das Mutein -F259G

nach SDS-Aktivierung eine Catecholoxidase ist. Führt man eine proteolytische Trypsin-Aktivierung durch, kam es ohne das Auftreten einer lag-Phase zu einem deutlichen Umsatz von p-Tyr (Kap. 3.5.4) und p-Cumarsäure (Daten nicht gezeigt). Das Trypsin-aktivierte Mutein -F259G ist folglich eine Tyrosinase.

Goldfeder et al. führten Mutagenese-Studien des *Gate-Residue* anhand der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* durch, die natürlicherweise an der topologisch analogen Position 218 ein Valin aufweist. Dieses wurde gegen ein Glycin und Phenylalanin mutiert. Die Tyrosinase ist nicht latent, es fehlt folglich die C-terminale Domäne, weswegen sie als Vergleichsstruktur zur Trypsin-aktivierten L-VvPPOcs-2 dient. Für V218G wurde eine signifikante Erhöhung der Katalyserate von L-DOPA und Tyrosin aufgezeigt, die mittels der gelösten Kristallstruktur des Muteins V218G anhand eines verbesserten Zugangs zum Cu_A und einem erhöhten Reaktionsvolumen in der katalytischen Tasche begründet wurde (Goldfeder et al., 2013).

Das Mutein V218F weist im Vergleich zum Wildtyp ein 9-fach erhöhtes Monophenolase/Diphenolase-Verhältnis auf, was bei Fehlen eines Thioethers auf ein flexibles H_{A2} zurückzuführen sei, dass in zwei alternativen Lagen existieren kann. Durch das Auftreten einer sogenannten *flipped out* Konformation könne durch Wechselwirkung des H_{A2} mit dem mutiertem F218 das Cu_A durch Verlagerung des Phenylrestes zugänglich werden, was besonders eine Bindung von Monophenolen favorisieren könne (Goldfeder et al., 2013). Da die L-VvPPOcs-2 allerdings die beschriebene Thioetherbindung aufweist (Kap. 1.2.1), ist eine solche *flipped out* Konformation ausgeschlossen.

Weitere rekombinante, im *Gate-Residue* mutierte PPOs mit fehlender C-terminaler Domäne, für die der Einfluss des *Gate-Residue* auf das kinetische Verhalten untersucht wurde, sind meines Wissens bislang nicht bekannt.

Es ist festzuhalten, dass ein weniger sperriges *Gate-Residue* bei abgespaltener C-terminaler Domäne im Falle der L-VvPPOcs-2 zu einer erhöhten Substrataffinität führt, während die Katalyseraten für 4-MC, DA und p-Tyr bei Anwesenheit des sperrigen F259 weiterhin höher sind als für die Muteine.

Abhängig vom Aktivierungsmechanismus wirkt sich die Anwesenheit eines sperrigen oder nicht sperrigen *Gate-Residue* unterschiedlich aus. Während das *Gate-Residue* nach SDS-Aktivierung wahrscheinlich mit vielen Aminosäuren der vorhandenen C-terminalen Domäne in komplexe Wechselwirkungen treten kann, ist es nach Trypsin-Aktivierung (Entfernung der C-terminalen Domäne) eine oberflächenexponierte Aminosäure. Es kann damit durch Größe und Ladung gezielt die Bindung von Substraten an das zugängliche aktive Zentrum beeinflussen. Die Erzeugung weiterer *Gate-Residue*-Muteine, die sich in Größe und Polarität unterscheiden, könnten mithilfe der hier gewonnen Erkenntnisse und des etablierten Assays Aufschluss über den Mechanismus der Substratspezifität der L-VvPPOcs-2 geben.

4.6 Verwendung eines Polyoxometallates führt zur Bildung von Mikrokrystallen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kristallisation der L-VvPPOcs-2wt unter vielen verschiedenen Bedingungen untersucht (Kap. 2.2.14). Die Gewinnung kleiner Strukturen (< 50 µm) gelang. Diese waren aber zu unregelmäßig und klein für eine röntgenkristallographische Analyse in der AG für Molekulare Biophysik (Abb. 49). Es ist anzunehmen, dass die hohe Flexibilität der C-terminalen Domäne und des Linkerbereiches die Entstehung größerer kristalliner Strukturen beeinträchtigen. Zusätzlich könnte das N-terminale Strep-Tag® II-Peptid aufgrund seiner Flexibilität den Kristallisationsprozess stören.

Die Trennung der N- und C-terminalen Domäne und eine anschließende getrennte Kristallisation und computergestützte Modellierung (wie bereits nach früheren Kristallisationsexperimenten überlegt (Ludwig, 2014)), war aufgrund der unvollständigen Ablösung der C-terminalen Domäne von der katalytischen Einheit nicht möglich (Kap. 3.4).

Die Schwierigkeit der Kristallisation latenter PPOs zeigt sich auch darin, dass bislang nur wenige Strukturen pflanzlicher PPOs gelöst wurden. Die PPOs aus *Ipomoea batatas* (Klabunde et al., 1998), *Vitis vinifera* (Virador et al., 2010), *Juglans regia* (Bijelic et al., 2015) umfassen nur die N-terminale Domäne. Die ersten aufgeklärten latenten Strukturen stammen aus einer Aurone Synthetase aus *Coreopsis grandiflora* (PDB: 4Z12, Molitor et al., 2016) und einer Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (PDB: 5M6B, Pretzler et al., 2017). Zusätzlich ist die Struktur einiger zur C-terminalen Domäne der PPOs analoger funktioneller Untereinheiten aus verschiedenen Hämocyaninen bekannt (z.B. PDB: 1JS8, Cuff et al., 1998). Aktuell sind die Kristallstrukturen der latenten PPO-1 aus *Solanum lycopersicum* (PDB: 6HQI, 6HQJ; Kampatsikas et al., 2019) und der PPO-1 aus *Malus domestica* (6ELS; Kampatsikas et al., 2019) veröffentlicht worden.

Sowohl die Struktur der Aurone Synthetase als auch die Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* sind mittels Kristallisations-Additiven aus der Gruppe der Polyoxometallate gewonnen worden (Molitor et al., 2016; Bijelic et al., 2015). Aus diesem Grund wurde in Kooperation [REDACTED]

[REDACTED] das Anderson-Evans Polyoxometallat $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ (TEW) synthetisiert und in einer Vielzahl von Kristallisationsexperimenten eingesetzt (Kap. 3.6). Insbesondere wurden TEWs für die Kristallisation flexibler Proteine empfohlen, da sie durch eine hohe negative Ladung über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen einzelne Domänen des Zielproteins fixieren können. Zudem sind sie pH-stabil, erhalten die Proteinintegrität und zeigen im Vergleich zu anderen POMs (z.B. aus der Gruppe der Keggin- oder Wells-Dawson) eine hohe Löslichkeit, was sie im Kristallisationsexperiment flexibel einsetzbar macht (Bijelic & Rempel, 2017).

Unter der Verwendung des $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ kam es zwar zu einer reproduzierbaren Bildung kleiner Strukturen, aber auch in diesen Experimenten setzte sich das Kristallwachstum nicht fort. Gründe hierfür könnten, neben den bereits diskutierten, eine nicht vollständig phasenreine Probe des

$\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ gewesen sein. Außerdem könnte die flexible Linkerregion des L-VvPPOcs-2wt durch das $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ nicht ausreichend fixiert sein.

Die Tatsache, dass Mikrokrystalle nicht weiter wachsen, spricht für eine hohe Unregelmäßigkeit im Kristall, für die verschiedene Konformationen des Proteinmoleküls ursächlich sein könnten. Es ist denkbar, dass die Synthese eines in Bezug auf Ladung, Form und Größe speziell auf den L-VvPPOcs-2wt ausgerichteten POMs ein regelmäßiges Kristallwachstum begünstigen könnte.

Da Kristallisationsexperimente aber sehr zeit- und ressourcenaufwendig sind, war im Rahmen dieser Arbeit die Durchführung einer solchen Synthese und das Ansetzen weiterer Experimente leider nicht möglich.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein proteolytischer Aktivator für die rekombinante, latente PPO-2 aus *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon) identifiziert werden. Mittels Massenspektrometrie gelang die Zuordnung der aus der Proteolyse entstandenen Spaltfragmente der L-VvPPOcs-2 zu ihren funktionellen Domänen. Trypsin führte zu einer Spaltung der L-VvPPOcs-2 wenige Aminosäuren vor dem Linkerbereich und induzierte eine Substratkatalyse und wurde somit als geeigneter Aktivator eingestuft.

Im Folgenden standen zwei Aktivierungsformen für die L-VvPPOcs-2 zur Verfügung (SDS-abhängige und Trypsin-abhängige Aktivierung). Es konnten zum ersten Mal Enzymkinetiken vorgelegt werden, die Substrataffinität und Katalyse nach SDS- und proteolytische Aktivierung einer pflanzlichen PPO und ihrer im *Gate-Residue* substituierten Muteine miteinander vergleichen. Es wurden Rückschlüsse auf die Funktion bzw. den Einfluss des *Gate-Residue* in unterschiedlichen Zustandsformen der L-VvPPOcs-2 (als latentes 59 kDa- und als aktives 38 kDa-Fragment) gezogen und vorgeschlagen, dass das *Gate-Residue* nach SDS-Aktivierung als Abstandhalter zwischen N- und C-terminaler Domäne dient, so dass die raumfordernde Eigenschaft des F259 entgegen früherer Annahmen entscheidend für die Substratkatalyse SDS-aktivierter latenter PPOs sein könnte. Besteht das *Gate-Residue* aus einer weniger sperrigen Aminosäure, liegen N- und C-terminale Domäne nah aneinander und der Zugang für Substrate zum aktiven Zentrum ist erschwert. Fehlt nach Proteolyse die C-terminale Domäne, stellt das *Gate-Residue* eine an der Oberfläche lokalisierte Aminosäure dar, und nimmt so durch Größe und Polarität direkten Einfluss auf die Substratspezifität und Katalyse der L-VvPPOcs-2.

Zusätzlich konnten durch Einsatz des Polyoxometallates $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$ die Kristallisationsbedingungen des L-VvPPOcs-2wt eingegrenzt und Mikrokrystalle gewonnen werden.

Fortführend an dieses Projekt ist vorzuschlagen, dass mit dem sehr gut reproduzierbaren Expressionssystem weitere Muteine erzeugt werden, die sich in funktionellen Aminosäuren (*Gate-*

Residue, Platzhalter-Aminosäure, *Activity Controller*) unterscheiden, um mittels Enzymkinetiken den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Katalyse besser zu verstehen.

Zudem werden Proteomdatenbanken ständig erweitert, so dass im Proteom der Traube nach einer Trypsin-ähnlichen Protease gesucht werden könnte, die *in vivo* in Pflanzenzellen vorkommt und damit als physiologischer Aktivator identifiziert werden könnte. Die Lokalisation dieser Protease innerhalb der Zelle könnte Rückschlüsse auf Funktion und physiologische Substrate der L-VvPPOcs-2 zulassen. Diese potentiell physiologischen Substrate stünden dann für weitere kinetische Messungen zur Verfügung.

Für die erfolgreiche Gewinnung eines Einkristalles der L-VvPPOcs-2 könnte die Synthese eines Polyoxometallates angestrebt werden, das spezifisch auf die Oberflächenstruktur der L-VvPPOcs-2 abgestimmt ist, um die hochflexible C-terminale Domäne zu fixieren. Die Aufklärung der Kristallstruktur wäre wegweisend, um intramolekulare Wechselwirkungen genauer zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- Aguilera F**, McDougall C, Degnan BM (2013): Origin, evolution and classification of type-2 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evolutionary Biology*; 13:96
- Andrews TJ**, Lorimer GH (1985): Catalytic Properties of a Hybrid between Cyanobacterial Large Subunits and Higher Plant Small Subunits of Ribulose Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*; 260:4632-4636
- Asherie N** (2004): Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*; 34(3):266–272
- Bagby S**, Driscoll PC, Harvey TS, Hill HA (1994): High resolution solution structure of reduced parsley plastocyanin. *Biochemistry*; 33:6611-6622
- Bajorath J**, Saenger W, Pada Pal G (1988): Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*; 954:176-182
- Baneyx F** & Mujacic M (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*; 22:1399-1408
- Bell AA** & Wheeler MH (1986): Biosynthesis and functions of fungal melanins. *The Annual Review of Phytopathology*; 24:411-451
- Bijelic A**, Pretzler M, Molitor C, Zekiri F, Rompel A (2015): The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angewandte Chemie*; 127:14889-14893
- Bijelic A**, Rompel A (2017): The use of polyoxometalates in protein crystallography – An attempt to widen a well-known bottleneck. *Coordination Chemistry Reviews*; 299:22-38
- Boeckx T**, Winters AL, Webb KJ, Kingston-Smith AH (2015): Polyphenol oxidases in leaves: Is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany*; 66:3571-3579
- Bonaventura J** & Bonaventura C (1980): Hemocyanins Relationships in their Structure, Function and Assembly. *Integrative and Comparative Biology*; 20:7-17
- Boss P**, Gardner R, Janssen BJ, Ross GS (1995): An Apple Polyphenol Oxidase cDNA is Up-Regulated in Wound Tissues. *Plant Molecular Biology*; 27:429-433
- Bravo K** & Osorio E (2016): Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L-fruit). *Food Chemistry*; 197:185-190
- Bubacco L**, Vijgenboom E, Gobin C, Tepper AWJW, Salgado J, Canters GW (2000): Kinetic and paramagnetic NMR investigations of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis A*; 8:27-35
- Büchler K** (2008): Strukturelle, enzymkinetische und thermodynamische Untersuchungen am KLH, dem Hämocyanin der Schlüssellockschnecke *Megathura crenulata*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Cabanes J**, García-Canovas F, Lozano JA, García-Carmona F (1987): A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochimica et Biophysica Acta*; 187-195
- Cash JN**, Sistrunk WA, Stutte CA (1976): Characteristics of Concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. *Journal of Food Science*; 41:1398-1402
- Chang YL** & Whitaker JR (1995): Enzymatic Browning and its Prevention. *American Chemical Society*; 1. Auflage

- Chayen N** (1998): Comparative Studies of Protein Crystallization by Vapour-Diffusion and Microbatch Techniques. *Acta Crystallographica*; D54:8-15
- Claus H** & Decker H (2006): Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*; 29:3-14
- Cohn J**, Sessa G, Martin GB (2001): Innate immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*; 13:55-62
- Cox J** & Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*; 12:1367-1372
- Cox J** & Mann M (2009): Computational principles of determining and improving mass precision and accuracy for proteome measurements in an Orbitrap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*; 8:1477-1485
- Cuff M**, Miller K, van Holde K, Hendrickson W (1998): Crystal Structure of a Functional Unit from Octopus Hemocyanin. *Journal of Molecular Biology*; 278:855-870
- Das JR**, Bhat SG, Gowda LR (1997): Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from Kew Cultivar of Indian Pineapple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 45:2031-2035
- Decker H** & Rimke T (1998): Two different functions of one active site: Binding oxygen and phenoloxidase activity of hemocyanin of tarantula hemocyanin. *Journal of Biological Chemistry*; 273:25889-25892
- Decker H** & Terwilliger N (2000): Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *Journal of Experimental Biology*; 203(12):1777-1782
- Decker H** & Tuczek F (2000): Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*; 25:392-397
- Decker H**, Schweikardt T, Tuczek F (2006): The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angewandte Chemie*; 46:4546-4550
- Decker H**, Schweikardt T, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tuczek F (2007): Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*; 398:183-191
- Decker H**, Solem E, Tuczek F (2017): Are glutamate and asparagine necessary for tyrosinase activity of type-3 copper proteins. *Inorganica Chimica Acta*; 481:32-37
- Derardja AE**, Pretzler M, Kampatsikas I, Barkat M, Rompel A (2017): Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 65:8203-8212
- Derenbach L** (2016): Proteolytische Aktivierung eines Muteins der rekombinanten, latenten Polyphenoloxidase (L-VvPPOcs-2-F259L) aus Weinblättern (*Vitis vinifera*). Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik.
- Dirks-Hofmeister ME**, Inlow JK, Moerschbacher BM (2012): Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction. *Plant Molecular Biology*; 80:203-217
- Dirks-Hofmeister ME**, Kolkenbrock S, Moerschbacher BM (2013): Parameters that enhance the bacterial expression of active plant polyphenol oxidase. *PLoS ONE*; 8:e77291
- Dirks-Hofmeister ME**, Singh R, Leufken CM, Inlow JK, Moerschbacher BM (2014): Structural Diversity in the Dandelion (*Taraxacum officinale*) Polyphenol Oxidase Family Results in Different Responses to Model Substrates. *PLOS One*; 9:99759

- Di Silvestre L** (2018): Bioinformatische Untersuchungen zur Struktur der Polyphenoloxidase (L-VvPPOcs-2) aus Weinblättern (*Vitis vinifera*). Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik.
- Drapeau GR**, Boily Y, Houmard J (1972): Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*; 247:6720-6726
- Ebeling W**, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974): Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*; 47(1): 91-97
- Eicken C**, Krebs B, Sacchettini JC (1999): Catechol oxidase - structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology*; 9:677-683
- Ellis RJ** (1979): The Most Abundant Protein in the World. *Trends in Biochemical Sciences*; 4:241-244
- Escalante-Minakata P**, Ibarra-Junquera V, de Jesús Ornelas-Paz J, García-Ibáñez V, Virgen-Ortíz JJ, González-Potes A, Pérez-Martínez JD, Orozco-Santos M (2018): Comparative study of the banana pulp browning process of "Giant Dwarf" and FHIA-23 during fruit ripening based on image analysis and the polyphenol oxidase and peroxidase biochemical properties. *3 Biotech*; 8:30
- Espín JC**, Trujano MF, Tudela J, García-Cánovas F (1997): Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Haas Avacado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 45:1091-1096
- Espín JC & Wichers HJ** (1999): Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47:3518-3525
- Fang Z**, Zhang M, Sun Y, Sun J (2007): Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chemistry*; 103:268-273
- Fraignier M**, Marques L, Fleuriet A, Macheix J (1995): Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 43:2375-2380
- Festa RA & Thiele DJ** (2011): Copper: An essential metal in biology. *Current Biology*; 21:R877-R883
- Fronk P**, Hartmann H, Bauer M, Solem E, Jaenicke E, Tenzer S, Decker H (2015): Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chemistry*; 183:49-57
- Fronk P & Jaeckels N** (2016): Influence of the buffer systems on PPO activity of Riesling grapes [*Vitis vinifera* cv. Riesling]. *European Food Research and Technology*; 10.1007/s00217-016-2800-3
- García-García MI**, Hernández-García S, Sánchez-Ferrer Á, García-Carmona F (2013): Kinetic study of hydroxytyrosol oxidation and its related compounds by Red Globe grape polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 61:6050-6055
- Gandía-Herrero F**, Escribano J, García-Carmona F (2005): Betaxanthins as Substrates for Tyrosinase. An Approach to the Role of Tyrosinase in the Biosynthetic Pathway of Betalains. *Plant Physiology*; 138(1):421-432
- Gandía-Herrero F**, Jiménez-Altiénzar M, Cabanes J, García-Carmona F, Escribano J (2005): Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biological Chemistry*; 386(6):601-607
- Gandía-Herrero F**, Jiménez-Altiénzar M, Cabanes J, García-Carmona F, Escribano J (2005): Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53(17):6825-6830

- García-Borrón JC** & Solano F (2002): Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*; 15:162-173
- Gasparetti C**, Faccio G, Arvas M, Buchert J, Saloheimo M, Kruus K (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 86:213-226
- Gerdemann C**, Eicken C, Krebs B (2002): The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3-Cooper Proteins. *Accounts of Chemical Research*; 35:183-191
- Gerdemann C**, Eicken C, Galla H-J, Krebs B (2002): Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluskan hemocyanin structure. *Journal of Inorganic Chemistry*; 89:155-158
- Gewehr L** (2016): Quantifizierung der katalytischen Aktivität von proteolytisch aktivierter Polyphenoloxidase (L-VvPPOcs-2wt) und eines Muteins (L-VvPPOcs-2-F259L) aus Weinblättern (*Vitis vinifera*). Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik
- Godden J**, Turley S, Teller S, Adman D, Liu E, Payne W, LeGall J (1991): The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science*; 253:438-442
- Goldbeck JH** & Cammarata KV (1981): Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiology*; 67:977-984
- Goldfeder M**, Kanteev M, Adir N, Fishman A (2013): Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1834:629-633
- Goldfeder M**, Kanteev M, Isaschar-Ovdat S, Adir N, Fishman A (2014): Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 cooper proteins. *Nature Communications*; 5:4505
- Gong Z**, Li D, Liu C, Cheng A, Wang W (2015): Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT- Food Science and Technology*; 60:1095-1099
- Green TR** & Ryan CA (1972): Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*; 175:776-777
- Hakulinen N**, Gasparetti C, Kaljunen K, Kruus K, Rouvinen J (2013): The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*; 18:917-929
- Halaouli S**, Asther M, Sigoillot J C, Hamdi M, Lomascolo A (2006): Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*; 100:219-232
- Harel E**, Mayer AM, Lehman E (1966): Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phytochemistry*; 5:1297-1301
- Harris JR**, Markl J (2000): Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of a potent marine immunoactivator. A review. *European Urology*; 37:24-33
- Hartman FC** & Harpel MR (1994): Structure, Function, Regulation, and Assembly of D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Annual Review of Biochemistry*; 63:197-234
- Haruta M**, Murata M, Hiraide A, Kadokura H, Yamasaki M, Sakuta M, Shimizu S, Homma S (1998): Cloning Genomic DNA Encoding Apple Polyphenol Oxidase and Comparison of the Gene Product in *Escherichia coli* and in Apple. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*; 62:358-362
- Haverback BJ**, Dyce B, Bundy H, Edmondson HA (1960): Trypsin, trypsinogen and trypsin inhibitor in pancreatic juice. *The American Journal of Medicine*; 29(3):424-433

- Hearing V** & Jiménez M (1987): Mammalian Tyrosinase – The Critical Regulatory Control Point In Melanocyte Pigmentation. *International Journal of Biochemistry*; 19:1141-1147
- Himmelwright RS**, Eickmann NC, LuBien CD, Solomon EI, Lerch K (1980): Chemical spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *Journal of the American Chemical Society*; 102:7339-7344
- Holland PL** & Tolman WB (1999): Three-Coordinate Cu(II) Complexes: Structural Models of Trigonal-Planar Type 1 Copper Protein Active Sites. *Journal of the American Chemical Society*; 121:7270-7271
- Horton HR**, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD (2008): Biochemie (4. aktualisierte Auflage). *Pearson Studium*; S.212
- Houmar J** & Drapeau G R (1972): Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 69:3506-3509
- Inouye K**, Kuzuya K, Tonomura B (1998): Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1388:209-214
- Interesse FS**, Alloggio V, Lamparelli F, D'avella G (1984): Characterization of the oxidative enzymatic system of the phenolic compounds from Muscat grapes. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*; 17:5-10
- Ismaya W**, Rozeboom H, Weijn A, Mes J, Fusetti F, Wichers H, Dijkstra B (2011): Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *American Chemical Society*; 50:5477-5486
- Ito N**, Philipps SEV, Yaday KDS, Knowles PF (1994): Crystal Structure of a Free Radical Enzyme, Galactose Oxidase. *Journal of Molecular Biology*; 238:704-814
- Jaenicke E**, Decker H (2003): The physico-chemical properties of the hexameric phenoloxidase may explain their role in the innate immunity of crustaceans. *Protein Science*; 1:93
- Jaenicke E** & Decker H (2004). Functional Changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *ChemBioChem*; 5:163-169
- Jamal F**, Pandey PK, Singh D, Khan MY (2013): Serin protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry I Reviews*; 12:1-34
- Janovitz-Klapp AH**, Richard F, Nicolas J (1989): Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*; 28:2903-2907
- Jiang Y** (1999): Purification and some properties of polyphenol oxidase of logan fruit. *Food Chemistry*; 66:75-79
- Jimenez M** & García-Carmona (1996): The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*; 42:1503-1509
- Jolley RL**, Evans LH, Makino N, Mason HS (1974): Oxytyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*; 249:335-345
- Jongsma MA**, Bakker PL, Visser B, Stiekema WJ (1994): Trypsin inhibitor in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta*; 195:29-35
- Kaintz C**, Molitor C, Thill J, Kampatsikas I, Michael C, Halbwirth H, Rompel A (2014): Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Letters*; 588:3417-3426

- Kaljunen H**, Gasparetti C, Kruus K, Rouvinen J, Hakulinen N (2011): Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Acta Crystallographica*; 67:672-674
- Kampatsikas I**, Bijelic A, Pretzler M, Rompel A (2017): Three recombinantly expressed apple tyrosinases suggest the amino acids responsible for mono- versus diphenolase activity in plant polyphenol oxidases. *Scientific Reports*; 7(1):8860
- Kampatsikas I**, Bijelic A, Rompel A (2019): Biochemical and structural characterization of tomato polyphenol oxidases provide novel insights into their substrate specificity. *Scientific Reports*; 9(1):4022
- Kampatsikas I**, Bijelic A, Pretzler M, Rompel A (2019): A peptide inducing self-cleavage reaction initiates the activation of tyrosinase. *Angewandte Chemie International Edition*; 10.1002/anie.201901332
- Kanade S**, Paul B, Rao A, Gowda L (2006): The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochemical Journal*; 395(3):551-562
- Kang D**, Gho Y, Suh M, Kang C (2002): Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*; 11:1511-1512
- Kanteev M**, Goldfeder M, Fishman A (2015): Structure-function correlations in Tyrosinases. *The Protein Society*; 24:1360-1369
- Katayama-Ikegami A**, Suehiro Y, Katayama T, Jindo K, Itamura H, Esumi T (2017): Recombinant expression, purification, and characterization of polyphenol oxidase 2 (VvPPO2) from "Shine Muscat" (*Vitis labruscana* Bailey × *Vitis vinifera* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 2330-2338
- Klabunde T**, Eicken C, Sacchettini JC, Krebs B (1998): Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*; 12:1084-1090
- Koiwa H**, Bressan RA, Hasegawa PM (1997): Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*; 2:379-384
- Koiwa K**, Shade RE, Zhu-Salzman K, Subramanian L, Murdock LL, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM (1998): Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *The Plant Journal*; 14:371-379
- Kim S**, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH (2015): PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*; 44(D1): D1202-13
- King R** & Flurkey W (1987): Effects of Limited Proteolysis on Broad Bean Polyphenoloxidase. *Journal of Sciences, Food and Agriculture*; 41:231-240
- King RA**, Hearing VJ, Creel DJ, Oetting WS (2001): Albinism. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8. Auflage, New York, USA, McGraw-Hill, 5587–5627
- Klabunde T**, Eicken C, Sacchettini J, Krebs B (1998): Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature structural biology*; 5:1084-1090
- Koussevitzky S**, Neeman E, Peleg S, Harel E (2008): Polyphenol oxidase can cross thylakoids by both the Tat and the Sec-dependent pathways: A putative role for two stromal processing sites. *Physiologia Plantarum*; 133:266-277
- Kushimoto T**, Valencia JC, Costin GE, Toyofuku K, Watabe H, Yasumoto K, Rouzaud F, Vieira WD, Hearing VJ (2003): The melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Research*; 16:237-244
- Kuznetsov VD**, Filippova SN, Rybakova AM (1984): Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. *Microbiologia*; 53:251-256

- Laemmli U** (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685
- Lamikanra O**, Kirby SD, Musingo MN (1992): Muscadine grape polyphenoloxidase: Partial purification by high pressure liquid chromatography and some properties. *Journal of Food Science*; 57:686-689
- Land E**, Ramsden C, Riley P (2003): Tyrosinase Autoactivation and the Chemistry of ortho-Quinone Amines. *Accounts of Chemical Research*; 36:300-308
- Laveda F**, Núñez-Delicado E, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A (2001): Proteolytic Activation of Latent Paraguaya Peach PPO. Characterization of Monophenolase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49:1003-1008
- Lawrence PK** & Koundal KR (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*; 5:93-109
- Lee CY**, Smith NL, Pennesi AP (1983): Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *Journal of the Science of Food and Agricultural*; 34:987-991
- Lee CY** & Jaworski AW (1988): Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture*; 39:337-340
- Lee PM**, Lee K, Karim MIA (1991): Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 55:251-260
- Leufken C**, Moerschbacher B, Dirks-Hofmeister M (2015): Dandelion PPO-1/PPO-2 domain-swaps: The C-terminal domain modulates the pH optimum and the linker effects SDS-mediated activation and stability. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*; 1854:178-186
- Liener IE** (1960): Chromatographic Studies on Trypsin, Trypsinogen and the Activation Process. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 88:216-221
- Liu J**, Ding J, Liu C, Xiao X, Ni D (2010): Prokaryotic expression and purification of *Camellia sinensis* polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 90:302-309
- Lu Y**, Yeung N, Sieracki N, Marshall NM (2009): Design of functional metalloproteins. *Nature*; 460:855-862
- Ludwig K** (2014): Einfluss der ortsgerichteten Mutagenese auf die Enzymatik sowie Kristallisationsversuche der Polyphenoloxidase aus der Weinrebe (*Vitis vinifera*). Masterarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (angefertigt: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik).
- Luft J**, Collins RJ, Fehrman NA (2003): A deliberate approach to screening for initial crystallization conditions of biological macromolecules. *Journal of Structural Biology*; 142:170-179
- Luft JR**, Wolfley JR, Snell EH (2011): What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments. *Crystal Growth & Design*; 11(3):651-663
- Lyons TW**, Reinhard CT, Planavsky NJ (2014): The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*; 506(7488):307-315
- Magnus K**, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol W (1994): Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins*; 19:302-309
- Markl J** (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *The Biological Bulletin*; 171:90-115

- Markl J & Decker H** (1992): Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins. *Advances in Comparative and Environmental Physiology. Blood and Tissue Oxygen Carriers*; 13:325-376
- Markl J** (2013): Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*; 9:1840-1852
- Marques L, Fleuriet A, Macheix J** (1995): Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*; 33:192-200
- Marrufo-Hernández NA, Palma-Orozco G, Beltrán HI, Nájera H** (2017): Purification, partial biochemical characterization and inactivation of polyphenol oxidase from Mexican Golden Delicious apple (*Malus domestica*). *Journal of Food Biochemistry*; 41:e12356
- Martinez MV & Whitaker JR** (1995): The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*; 6:195-200
- Marusek C, Trobaugh N, Flurkey W, Inlow J** (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, Sugiyama M** (2006): Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*; 281:8981-8990
- Matoba Y, Bando N, Oda K, Noda M, Higashikawa F, Kumagai T, Sugiyama M** (2011): A Molecular Mechanism for Copper Transportation to Tyrosinase That Is Assisted by a Metallochaperone, Caddie Protein. *The Journal of Biological Chemistry*; 286:30219-30231
- Mauracher SG, Molitor C, Al-Oweini R, Kortz U, Rompel A** (2014): Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of latent isoform PPO4 mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase. *Acta Crystallographica*; F70:263-266
- Mayer AM & Harel E** (1979): Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*; 18:193-215
- Mayer A** (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*; 7:2318-2331
- Mazzafera P, Robinson SP** (2000): Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*; 55:285-296
- McGrath AP, Mithieux SM, Collyer SM, Bakhuis JG, van der Berg M, Sein A, Heinz A, Schmelzer C, Weiss AS, Guss JM** (2011): Structure and Activity of *Aspergillus nidulans* Copper Amine Oxidase. *Biochemistry*; 50:5718-5730
- Meriño-Cabrera Y, Zanuncio JC, da Silva RS, Solis-Vargas M, Cordeiro G, Rainha FR, Campos WG, Picanço MC, de Almeida Oliveira MG** (2018): Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (*Lepidoptera: Lyonetiidae*) and leaves of *Coffea Arabica* (*Rubiaceae*) after herbivory. *Annals of Applied Biology*; 172:236-243
- Metz M, Solomon E** (2001): Dioxygen Binding to Deoxyhemocyanin: Electronic Structure and Mechanism of the Spin-Forbidden Two-Electron Reduction of O₂. *Journal of the American Chemical Society*; 123:4938-4950
- Michaelis L, Menten L** (1913): The Kinetics of Invertase Action. *Biochemische Zeitschrift*; 49:334-336
- Miller AR, Kelley TJ, Mujer CV** (1990): Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenol oxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. *Phytochemistry*; 29:705-709
- Mishra BB, Gautam S, Sharma A** (2013): Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chemistry*; 139:105-114
- Molitor C, Mauracher SG, Rompel A** (2015): Crystallization and preliminary crystallographic analysis of latent, active and recombinantly expressed aurone synthase, a polyphenol oxidase, from *Coreopsis grandiflora*. *Acta Crystallographica*; F71:746-751

- Monder C**, Williams J, Waisman H (1957): Studies of the Non-Enzymatic Conversion of Dopa to Melanin. I: Studies on Autooxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 72
- Mori S** & Barth H G (1999): Size Exclusion Chromatography. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*
- Muñoz JL**, García-Molina F, Varón R, Rodríguez-Lopez JN, García-Cánovas F, Tudela J (2006): Calculating molar absorptivities for quinones: application to the measurement of tyrosinase activity. *Analytical Biochemistry*; 351:128-138
- Murata M**, Tsurutani M, Tomita M, Homma S, Kaneko K (1995): Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 43:1115-1121
- Naish S**, Cooksey CJ, Riley PA (1988): Initial mushroom tyrosinase catalysed oxidation product of 4-hydroxyanisole is 4-methoxy-ortho-benzoquinone. *Pigment Cell Research*; 1:379-381.
- Naish-Byfield S** & Riley P (1992): Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. *Biochemical Journal*; 288:63-67
- Nakamura K**, Amano Y, Kagami M (1983): Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*; 34:122-127
- Nar H**, Messerschmidt A, Huber R, de Kamp M, Canters GW (1992): Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa apo-azurin at 1,85 angstrom resolution. *FEBS letters*; 306:119-124
- Neuhoff V**, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*; 9: 255-262
- Nicolas JJ**, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot M, Aubert SY (1994): Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 34:109–157
- Olivares C**, García-Borrón JC, Solano F (2002): Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry*; 41:679-686
- Ortiz-Ruiz C**, Berna J, del Mar Garcia-Molina M, Tudela J, Tomas V, García-Cánovas F (2015): Identification of p-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 23:3738-3746
- Panadare D** & Rathod VK (2018): Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*; 14:431-437
- Panagos L** (2016): Proteolytische Aktivierung der latenten Polyphenoloxidase (L-VvPPOcs-2wt) aus Weinblättern (*Vitis vinifera*). Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik.
- Park EY** & Luh BS (1985): Polyphenol oxidase of Kiwi fruit. *Journal of Food Science*; 50:678-684
- Paul B** & Gowda LR (2000): Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seed of field bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48:3839-3846
- Pifferi P** & Baldassari L (1973): A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorns Hydrazon. *Analytical Biochemistry*; 52(2):325-335

Planavsky NJ, Reinhard CT, Wang X, Thomson D, McGoldrick P, Raunbird RH, Johnson T, Fischer WW, Lyons TW (2014): Low Mid-Proterozoic atmospheric oxygen levels and the delayed rise of animals. *Science*; 346(6209):635-638

Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I (2007): Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*; 12:29-36

Pretzler M, Bijelic A, Rompel A (2017): Heterogous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (*AbPPO4*). *Scientific Reports*; 7(1):1810

Pretzler M & Rompel A (2017): What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of art perspective. *Inorganica Chimica Acta*; 481:25-31

Prexler SM, Sighn R, Moerschbacher BM (2018): A specific amino acid residue in the catalytic site of dandelion polyphenol oxidases acts as "selector" for substrate specificity. *Plant Molecular Biology*; 96(1-2):151-164

Prigge St, Mains RE, Eipper BA, Amzel BM (2000): New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 57:1236-1259

Prouty WF & Goldberg AL (1972): Fate of abnormal Proteins in *E. coli*. Accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nature New Biology*; 240:147-150

Queiroz C, Lopes MLM, Fialho E, Valente-Mesquita VL (2008): Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*; 361-375

Reinhard CT, Planavsky NJ, Olson SL, Lyons TW, Erwin DH (2016): Earth's oxygen cycle and the evolution of animal life. *PNAS*; 113(32):8933-8938

Riebel M (2016): Quantitative Proteomanalytik von Riesling- und Dornfelder-Trauben sowie der Einfluss von traubeneigener Tyrosinase auf gesundheits-fördernde Inhaltsstoffe des Weins. Dissertation; Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Riebel M, Fronk P, Distler U, Tenzer S, Decker H (2017): Proteomic profiling of German Dornfelder grape berries using data-independent acquisition. *Plant Physiology and Biochemistry*; 118:64-70

Robinson SP, Loveys BR, Chacko EK (1993): Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*; 20:99-107

Rolff M, Schottenheim J, Decker H, Tuczek F (2011): Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*; 40:4077-4098

Ros JR, Rodríguez-Lopez JN, Varón R, García-Cánovas F (1994): Kinetic study of the oxidation of 4-tert-butylphenol by Tyrosinase. *Journal of Biochemistry*; 222:449-452

Ruan L, Huang Y, Zhang G, Yu D, Ping S (2002): Expression of the mel gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Letters in Applied Microbiology*; 34:244-248

Ruan R, Yu Z, Fang B, He W, Wang Y, Shen P (2004): Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*; 27:286-289

Sakiroglu H, Kufrevioglu OI, Kocacaliskan I, Oktay M, Onganer Y (1996): Purification and characterization of dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 44:2982-2986

Sánchez-Ferrer A, Bru R, Garcia-Carmona F (1988): Novel Procedure for Extraction of a Latent Grape Polyphenoloxidase Using Temperatur-Induced Phase Separation in Triton X-114. *Plant Physiology*; 91:1481-1487

- Sánchez-Ferrer A**, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F (1995): Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1247:1-11
- Sheptovitsky YG** & Brudvig GW (1996): Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry*; 35:16255-16263
- Siddiq M** & Dolan KD (2017): Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*; 218:216-220
- Sojo MM**, Núñez-Delicado E, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A (1998): Monophenolase Activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46:4931-4936
- Solem E** (2017): Heterologe Expression und physikochemische Charakterisierung der Polyphenoloxidasen aus dem Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulare Physiologie, AG Molekulare Biophysik.
- Solomon EI**, Sundaram UM, Machonkin TE (1996): Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*; 96:2563-2605
- Sommer A**, Neéman E, Steffens JC, Mayer AM, Harel E (1994): Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiology*; 105:1301-1311
- Sturm RA**, Teasdale RD, Box NF (2001): Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*; 277:49-62
- Sugumaran M** (2002): Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*; 15:2-9
- Sullivan ML**, Hatfield RD, Thoma SL, Samac DA (2004): Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiology*; 136:3234-3244
- Sullivan ML** (2015): Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in plant science*; 5:783
- Thaler J**, Fidantsef A, Duffey SS, Bostock RM (1999): Trade-Offs in Plant defense against pathogens and herbivores: A field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*; 25:1597-1609
- Thipyapong P**, Hunt MD, Steffens JC (1995): Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*; 40:673-676
- Thipyapong P** & Steffens JC (1997): Tomato Polyphenol Oxidase (Differential Response of the Polyphenol Oxidase F Promoter to Injuries and Wound Signals). *Plant Physiology*; 115:409-418
- Tyanova S**, Temu T, Carlson A, Sinitcyn P, Mann M, Cox J (2015): Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics*; 15:1453-1456
- Van Gelder C**, Flurkey W, Wichers H (1997): Sequence and Structural Features Of Plant And Fungal Tyrosinases. *Phytochemistry*; 45:1309-1323
- van Holde KE** & Miller KI (1995): Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry*; 47:1-81
- van Holde KE**, Miller KI, Decker H (2001): Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry*; 276:15563-15566
- Valero E**, Varon R, García-Carmona (1988): Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *Journal of Food Science*; 53:1482-1485

Valero E & García-Carmona F (1992): pH-induced kinetic co-operativity of a thylakoid-bound polyphenol oxidase. *Biochemical Journal*; 286:623-626

Vaughn KC, Lax AR, Duke SO (1988): Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum*; 72:659-665

Virador V, Reyes Grajeda J, Blanco-Labra A, Mendiola-Olaya E, Smith G, Moreno A, Whitaker J (2010): Cloning, Sequencing, Purification and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58: 1189-1201

Volbeda A & Hol W (1989): Crystal Structure of Hexameric Haemocyanin from *Panulirus interruptus* Refined at 3.2 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*; 209:249-279

Walsh KA (1970): Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods in Enzymology*; 19:41-63

Weijn A, Bastiaan-Net S, Wichers HJ, Mes JJ (2013). Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genetics and Biology*; 55:42-53

Wesche-Ebeling P & Montgomery MW (1990): Strawberry polyphenoloxidase: Extraction and partial characterization. *Journal of Food Science*; 55:1315-1319

Whitaker JR (1994): Principles of Enzymology for the Food Science. Second Edition: 271-556; Marcel Dekker, New York

Whitaker JR & Lee CY (1995): Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. Enzymatic Browning and Its Prevention. *ACS Symposium Series (American Chemical Society)*; Washington DC, USA

Winder A & Harris H (1991): New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*; 198: 317-326

Wisemann KW & Lee CY (1981): Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara grapes. *Journal of Food Science*; 46:506-508

Wong TC, Luh BS, Whitaker JR (1971): Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiology*; 48:19-23

Wu YL, Pan LP, Yu SL, Li HH (2010): Cloning, microbial expression and structure-activity relationship of polyphenol oxidase from *Camellia sinensis*. *Journal of Biotechnology*; 145:66-72

Yoruk R & Marshall MR (2003): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*; 27:361-422

Zaini NAM, Osman A, Hamid AA, Ebrahimpour A, Saari N (2013): Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]. *Food Chemistry*; 136:407-414

Zekiri F, Bijelic A, Molitor C, Rompel A (2014): Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of polyphenol oxidase from *Juglans regia* (jrPPO1). *Acta Crystallographica Section F*; 70:832-834

Abkürzungsverzeichnis

4-MC	4-Methylcatechol
°C	Grad Celsius
Å	Ångström: 0,1 nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
B-CIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
CAT	Pyro-Catechol
CD-Spektroskopie	Circulardichroismus-Spektroskopie
CO	Catecholoxidase
Cu _A / Cu _B	Cu _A -Zentrum / Cu _B -Zentrum
Da	Dalton $1,66 \times 10^{-27}$ kg
DA	Dopamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EPR	(= ESR) Elektronenspinresonanz
h	Stunde
H _{A1} , H _{A2} , H _{A3} , H _{B1} , H _{B2} , H _{B3}	Kupferkoordinierende Histidine
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure
Hc	Hämocyanin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
K	Kelvin
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilo-Dalton
k _{cat}	Wechselzahl
L-VvPPOcs-2	Latente Isoform 2 der PPO aus <i>Vitis vinifera</i> Carbernet Sauvignon (Wildtyp (wt) und Muteine -F259L, -F259G)

LB-Medium	<i>Lysogeny-Broth-Medium</i>
Linker	Linkerbereich (verbindet N- und C-terminale Domäne)
λ	Wellenlänge
(μ /m)M	(mikro/milli)Molar
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
<i>Microbatch</i>	Microbatch under Oil (Kristallisationsverfahren)
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p-Cumarsäure	para-Cumarsäure (4-Hydroxy-Zimtsäure)
PEG	Polyethylenglykol
p-Tyr	para-Tyrosol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PPO	Polyphenoloxidase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep-Tag	Streptavidin-Tag
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TBS Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris/HCl :Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
μ l	Mikroliter
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
VIS	<i>Visible</i> (sichtbarer Spektralbereich des Lichtes)
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volt
VvPPOg	Aktive PPO aus <i>Vitis vinifera</i> Grenache (PDB: 2P3X)
(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überlagerung der konservierten aktiven Zentren von sechs kristallographisch strukturaufgeklärten Typ 3-Kupferproteinen.	2
Abbildung 2:	Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen und Catecholoxidasen.	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Aufbaus einer latenten pflanzlichen Polyphenoloxidase einschließlich funktionell wichtiger Aminosäuren.	6
Abbildung 4:	Homologiemodell der L-VvPPOcs-2.	10
Abbildung 5:	Übersicht über die experimentellen Schritte der Proteingewinnung.	20
Abbildung 6:	Sequenzausschnitt des L-VvPPOcs-2wt. Fettgedruckt sind Aminosäuren, gegen die sich der Anti-PPO-Antikörper richtet.	24
Abbildung 7:	Farbreaktion des MBTH-Assays.	29
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der massenspektrometrischen Analyse.	35
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Gasphasendiffusionsverfahrens mittels des <i>hanging drop</i> Verfahrens	38
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des Phasendiagramms der Proteinkristallisation	39
Abbildung 11:	Analyse der Reinigung der in <i>E. coli</i> überexprimierten L-VvPPOcs-2wt, L-VvPPOcs-2-F259L und L-VvPPOcs-2-F259G..	44
Abbildung 12:	Absorptionsspektrum des konzentrierten L-VvPPOcs-2wt.	45
Abbildung 13:	Western Blot-Analyse der L-VvPPOcs-2wt und der Muteine.	46
Abbildung 14:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G.	47
Abbildung 15:	CD-Spektren des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine L-VvPPOcs-2-F259L und L-VvPPOcs-2-F259G, normiert.	48
Abbildung 16:	Analyse der Proteolyse der L-VvPPOcs-2 durch Trypsin.	50
Abbildung 17:	Alignment der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt und den in der Massenspektrometrie detektierten Peptiden des L-VvPPOcs-2wt.	52
Abbildung 18:	Histogramm der aufsummierten Messintensitäten über das Molekulargewicht des L-VvPPOcs-2wt.	53
Abbildung 19:	Spaltpeptide des L-VvPPOcs2-wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Trypsin.	54
Abbildung 20:	Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (36 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin.	55

Abbildung 21:	Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (34 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin.	56
Abbildung 22:	Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (17 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin.	57
Abbildung 23:	Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (15 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Trypsin.	58
Abbildung 24:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Trypsin.	59
Abbildung 25:	Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Proteinase K.	60
Abbildung 26:	30-minütige Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Proteinase K.	61
Abbildung 27:	Position der durch die Proteolyse mit Proteinase K entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt.	61
Abbildung 28:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Proteinase K	63
Abbildung 29:	Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Chymotrypsin.	64
Abbildung 30:	Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Chymotrypsin.	65
Abbildung 31:	Position der durch die Proteolyse mit Chymotrypsin entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt.	65
Abbildung 32:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Chymotrypsin.	67
Abbildung 33:	Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2 durch Thermolysin.	68
Abbildung 34:	Spaltpeptide des L-VvPPOcs-2wt nach 2-stündiger Proteolyse mit Thermolysin.	69
Abbildung 35:	Position der durch die Proteolyse mit Thermolysin entstandenen Spaltpeptide in der Aminosäuresequenz des L-VvPPOcs-2wt.	69
Abbildung 36:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2wt, der L-VvPPOcs-2-F259L und der L-VvPPOcs-2-F259G nach proteolytischer Aktivierung durch Thermolysin.	71
Abbildung 37:	Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt und des Muteins L-VvPPOcs-2-F259L durch die V8 Protease und Aktivitätsschnelltest.	72
Abbildung 38:	Analyse der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Calpain-1 und Aktivitätsschnelltest.	74
Abbildung 39:	Analyse der größenchromatographischen Auftrennung des Trypsin-proteolysierten L-VvPPOcs-2wt.	78
Abbildung 40:	Abtrennung der C-terminale Domäne von der katalytischen Domäne des L-VvPPOcs-2wt nach der Proteolyse mit Trypsin mittels variierender Harnstoffkonzentrationen.	80

Abbildung 41:	Chemische Struktur und qualitativer Umsatz der Substrate 4-Methylcatechol (4-MC; Diphenol), Pyro-Catechol (CAT; Diphenol), Dopamin (DA; Diphenol) und para-Tyrosol (p-TYR; Monophenol).	81
Abbildung 42:	pH-Optimumkurven des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G nach SDS-, Trypsin- und Säure-Aktivierung.	84
Abbildung 43:	Analyse des Präzipitates der L-VvPPOcs-2wt und Albumin bei pH 3 und SDS-Zusatz.	86
Abbildung 44:	Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von 4-MC nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	89
Abbildung 45:	Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von CAT nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	92
Abbildung 46:	Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von DA nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	95
Abbildung 47:	Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G bei Umsatz von p-TYR nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	98
Abbildung 48:	Histogramme und Zusammenfassung aller ermittelter enzymatischer Parameter für den L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	101
Abbildung 49:	Ergebnisse der Kristallisationsansätze des L-VvPPOcs-2wt im Gasphasendiffusionsverfahren unter verschiedenen Bedingungen.	103
Abbildung 50:	Alignment der durch Proteolyse entstandenen Spaltpeptide der katalytischen Domäne des L-VvPPOcs-2wt und Modell des aktiven 36 kDa Spaltpeptids des L-VvPPOcs-2wt nach der Proteolyse durch Trypsin.	110
Abbildung 51:	pH-Optima ausgewählter pflanzlicher PPOs.	115
Abbildung 52:	Funktionelle Aminosäuren in der katalytischen Tasche pflanzlicher PPOs.	120
Abbildung 53:	Übersicht über Anstieg oder Abfall der kinetischen Parameter der L-VvPPOcs-2 nach Trypsin- gegenüber SDS-Aktivierung.	122
Abbildung 54:	Darstellung des <i>Gate-Residue</i> in der Funktion des Abstandhalters.	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verwendeten Organismen.	13
Tabelle 2:	Übersicht über die verwendeten Enzyme und Proteasen.	13
Tabelle 3:	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	14
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Substrate.	14
Tabelle 5:	Übersicht über verwendete Software und Analyseprogramme.	18
Tabelle 6:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.	23
Tabelle 7:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die native Gelelektrophorese.	23
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Proteasen.	26
Tabelle 9:	Übersicht über die Messbedingungen der Enzymkinetiken.	32
Tabelle 10:	Übersicht über die zur Bestimmung der entstehenden Stoffmenge der Produkte verwendeten Extinktionskoeffizienten.	34
Tabelle 11:	Übersicht über die Zusammensetzung aller Kristallisationsansätze (Teil 1+2).	41/42
Tabelle 12:	Übersicht aller aus der Proteolyse mit Proteinase K entstandenen Spaltpeptide.	62
Tabelle 13:	Übersicht aller aus der Proteolyse mit Chymotrypsin entstandenen Spaltpeptide.	66
Tabelle 14:	Übersicht aller aus der Proteolyse mit Thermolysin entstandenen Spaltpeptide.	70
Tabelle 15:	Zusammenfassung der verwendeten Proteasen.	75
Tabelle 16:	pH-Optima der L-VvPPOcs-2 nach SDS-, Trypsin- und Säure-Aktivierung.	85
Tabelle 17:	Übersicht über die λ_{\max} der aus den eingesetzten Substraten entstehenden Chinone.	86
Tabelle 18:	Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols 4-MC.	90
Tabelle 19:	Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols CAT.	93
Tabelle 20:	Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Diphenols DA.	96
Tabelle 21:	Enzymatische Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken des L-VvPPOcs-2wt und der Muteine -F259L und -F259G für den Umsatz des Monophenols p-TYR.	99
Tabelle 22:	Zusammenfassung aller ermittelter enzymatischer Parameter für den L-VvPPOcs-2wt und die Muteine -F259L und -F259G nach SDS- bzw. Trypsin-Aktivierung.	102

Anhang

Anhangsverzeichnis

Anhang A:	Vektorkarte der L-VvPPOcs-2	II
Anhang B:	Geräte	III
Anhang C:	Theoretisch ermittelte Schnittstellen der verwendeten Proteasen in der Aminosäuresequenz der L-VvPPOcs-2wt	IV
Anhang D:	Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Trypsin	VIII
Anhang E:	Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Chymotrypsin	XII
Anhang F:	Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Thermolysin	XVIII
Anhang G:	Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Proteinase K	XXII
Anhang H:	Bestimmung der Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte	XL
Anhang I:	Zusammenfassung aller ermittelten enzymatischen Parameter	XLIII
Anhang J:	Buchstabencode der Aminosäuren	XLIII

Anhang A: Vektorkarte der L-VvPPOcs-2

Es wurde der dargestellte Vektor L-VvPPOcs-2_pET-51b(+) verwendet. Die Abbildung wurden von [REDACTED] (Institut für Molekulare Physiologie, JGU Mainz) erstellt.

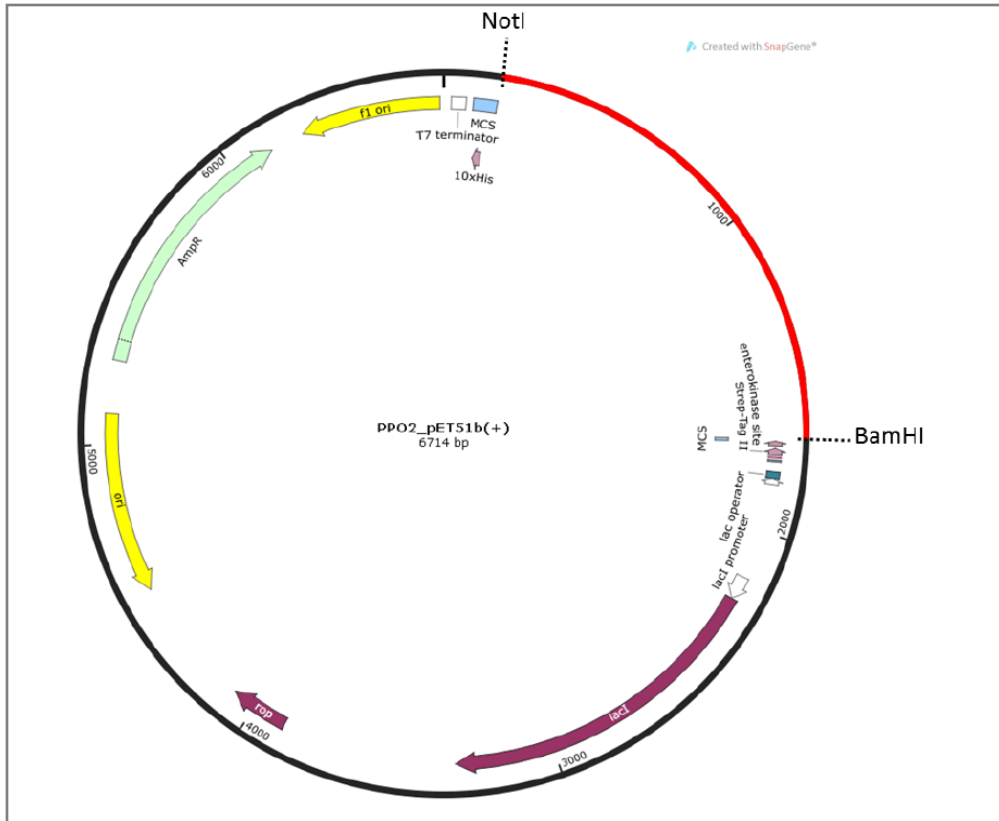


Abbildung A1: Schematische Darstellung des L-VvPPOcs-2_pET-51b(+)-Vektors. Der Vektor verfügt über einen N-terminalen Strep-Tag® II, eine Enterokinaseschnittstelle und umfasst 6714 Basenpaare. f1 ori: Replikationsursprung für die Synthese von einzelsträngiger DNA. NotI und BamHI bezeichnen die Restriktionsschnittstellen. Der Vektor wurde von [REDACTED] (Institut für Molekulare Physiologie, JGU Mainz) mit SnapGene® generiert.

Anhang B: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysewaage	A200S	Sartorius GmbH (Göttingen, Deutschland)
Autoklav	3850 EL	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Binokular	SZ-CTV	Olympus, Hamburg
Blotsystem	iBlot®	Life Technologies™ (Darmstadt, Deutschland)
Brutschrank	Heratherm™ Advanced Protocol	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
CD-Spektrometer	Jasco J-815	JASCO Labor-und Datentechnik GmbH (Gross-Umstadt, Deutschland)
Druckkochtopf	Opal – 9,5 l	B/R/K Vertriebs-GmbH (Wuppertal, Deutschland)
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra-Eismaschinen (Isernhagen, Deutschland)
Gasbrenner	Labogaz 206	Caming Gaz (Hattersheim, Deutschland)
Geldokumentation	Epson Perfection V750 Pro	SEIKO Epson CORPORATION (Tokyo, Japan)
Geldokumentation	ChemiDoc™ MP System 170- 8280	Bio-Rad (München, Deutschland)
Geltrockner	GT 2	von Keutz-Labortechnik (Reiskirchen, Deutschland)
Heizblock	Blockthermostat TK13	HLC BioTech (Brovenden, Niederlande)
Heizplatte	Tarrinton House KIF12005	N&NF Traiding GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Inkubator/Schüttler	Certomat IS	B. Braun BioTech International (Melsungen, Deutschland)
Leuchtplatte	Gr. 1 E2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Massenspektrometer	Q Exactive™	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Nanodrop® -Spektrometer	ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick Elektrische Messgeräte GmbH + Co. KG (Berlin, Deutschland)
Plattformschüttler	Duomox 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Reinstwasseranlage	Milli-Q Biocel PF	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Rotor für Beckman-Zentrifuge	JLA 10.500	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

Gerät	Modell	Hersteller
Rotor für Beckman-Zentrifuge	JLA 25.50	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Spannungsquelle (Gelelektrophorese)	Power Pac-3000	Bio-Rad (München, Deutschland)
Spektrometer	U3000	Hitachi, Ltd. (Tokyo, Japan)
Spektrometer	Cary 100	UV-Vis Agilent Technologies (Santa Clara, United States)
Steuerelement zur Ultraschallsonde	Bandelin sonopuls, HD 2200	BANDELIN electronic GmbH + Co. KG (Berlin, Deutschland)
Tischzentrifuge	Universal 32R	Andreas Hettich GmbH + Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
Ultraschallsonde	Bandelin sonopuls, LS7	BANDELIN electronic GmbH + Co. KG (Berlin, Deutschland)
Vakuumpumpe	Laboport N820.3FTP	KNF NEUBERGER, INC. (Trenton, USA)
Waage	MJ 3000	YMC Co. Ltd. (Kyoto, Japan)
Zentrifuge	Avant J-25	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

Anhang C: Theoretisch ermittelte Schnittstellen der verwendeten Proteasen in der Aminosäuresequenz der L-VvPPOcs-2wt

Folgende Abbildungen zeigen die theoretisch möglichen Schnittstellen der eingesetzten Protease in einem Alignment der Sequenz des L-VvPPOcs-2wt, L-VvPPOcs-2-F259L und L-VvPPOcs-2-F259G (orange). Liegt eine Massenspektrometrie Analyse der Schnittstellen vor, sind diese in violett gekennzeichnet. Die Schnittstellen der Protease Calpain-1 wurden mittels PROSPER ermittelt. Die Sequenz wurde ab AS-Position 1 (Strep-Tag®) mit 1 beziffert, da die Ergebnisse der Massenspektrometrie am IMB Mainz auf ebenso einer Nummerierung beruhen. Aus diesem Grund ist das *Gate-Residue* nach dieser Zählweise an Position 279 und nicht an der eigentlichen (physiologischen) Position 259. Bei der hier angewandten Zählweise hat die erste physiologische AS der L-VvPPOcs-2 die Position 20.

C1: Schnittstellen der Serinprotease Thermolysin

Thermolysin hydrolysiert die Peptidbindung hinter (großen) hydrophoben Aminosäuren: Leucin (L), Phenylalanin (F), Isoleucin (I), Methionin (M), Valin (V) und Alanin (A).

```

1         *         *         *         *         *         *
L-VvPPOcs-2wt: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259L: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259G: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80

L-VvPPOcs-2wt: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259L: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259G: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160

L-VvPPOcs-2wt: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259L: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259G: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240

L-VvPPOcs-2wt: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259L: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259G: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320

L-VvPPOcs-2wt: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259L: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259G: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
                                     Linkerbereich

L-VvPPOcs-2wt: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
L-VvPPOcs-2-F259L: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
L-VvPPOcs-2-F259G: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
                                     C-terminale Domäne

L-VvPPOcs-2wt: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259L: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259G: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
    
```

C2: Schnittstellen der Serinprotease Chymotrypsin

Chymotrypsin hydrolysiert die Peptidbindung aromatischen Aminosäuren: Tyrosin (Y), Phenylalanin (F), und Tryptophan (W), sowie hinter Methionin (M) und Leucin (L).

```

1         *         *         *         *         *         *
L-VvPPOcs-2wt: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259L: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259G: WSHPQFEKGA DDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMTRPAAHIVSKEYLAK : 80

L-VvPPOcs-2wt: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259L: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259G: YKKAIEI LCKALPDDDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELVHASWLF LFPFHRYLYYFNERILAKLIDDDPTFALPY : 160

L-VvPPOcs-2wt: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259L: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259G: WAWNDNPDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTEPTIPDDELKADNLAIMKQIVSGATTPKLFFGYPY : 240

L-VvPPOcs-2wt: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259L: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259G: RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMNGYTAGRDPIDFHHANVDRMNIWKTIGGKNRKDFD TDDWLDA : 320

L-VvPPOcs-2wt: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259L: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259G: TFMFYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV : 400
                                     Linkerbereich

L-VvPPOcs-2wt: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
L-VvPPOcs-2-F259L: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
L-VvPPOcs-2-F259G: IRVEVPRPKKRSRKKKEKENE EEVLLKGI ELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGS FVNVPHKHKEMKTKTNLR : 480
                                     C-terminale Domäne

L-VvPPOcs-2wt: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259L: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259G: LAINEI LEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD : 523
    
```


C3: Schnittstellen der V8-Protease

Die V8-Protease hydrolysiert die Peptidbindung hinter Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E).

	1	*	*	*	*	*	*	*	*																											
L-VvPPOcs-2wt:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2-F259L:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2-F259G:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2wt:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2-F259L:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2-F259G:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2wt:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2-F259L:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2-F259G:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2wt:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2-F259L:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2-F259G:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2wt:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2-F259L:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2-F259G:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2wt:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2-F259L:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2-F259G:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2wt:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523
L-VvPPOcs-2-F259L:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523
L-VvPPOcs-2-F259G:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523

Linkerbereich

C-terminale Domäne

C4: Schnittstellen der Serinprotease Trypsin

Trypsin hydrolysiert die Peptidbindung hinter Lysin (K) und Arginin (R).

	1	*	*	*	*	*	*	*	*																											
L-VvPPOcs-2wt:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2-F259L:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2-F259G:	WSHPQFEK	GADDD	VDP	PAPIQAPD	IRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSD	SPMRTR	PPAAHLVSK	EYLAK	:	80																										
L-VvPPOcs-2wt:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2-F259L:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2-F259G:	YKKAIEL	QKALPDD	PRSFKQ	QANVHCAYCQ	GAYDQVGYTD	LELQVHASWLF	LPFHRYLYFNER	ILAKLID	PTFALPY	: 160																										
L-VvPPOcs-2wt:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2-F259L:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2-F259G:	WAWDNP	DGMYP	AIYASSP	S	SLYDEKRN	AKHL	LPPTVIDLDYD	GTEPTIPD	DELKAD	NLAIMYKQIVSGATTPKLF	FGYYPY : 240																									
L-VvPPOcs-2wt:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2-F259L:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2-F259G:	RAGDAID	PGAGTLE	LVP	HNIVHKWTGLAD	KPSEDM	GNLYTAGR	PIFFGHANV	DRM	WNIWKTIGGK	NRKDF	TD	D	W	L	D	A	:	320																		
L-VvPPOcs-2wt:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2-F259L:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2-F259G:	TFVFDEN	KQLVEV	KVPCVD	TSKLR	YQYQD	IPL	WLPK	NTKAKAK	TTKSSK	SGVAKAEL	PKTTISSIGD	FPKALNSV	:	400																						
L-VvPPOcs-2wt:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2-F259L:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2-F259G:	IRVEV	PRPK	SRSK	KE	NEE	E	VLLIK	GIELD	RENFV	KFDVYIN	EDY	SVSK	PRNSE	FAGS	FVNV	PHK	H	M	K	E	M	K	T	N	L	R	:	480								
L-VvPPOcs-2wt:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523
L-VvPPOcs-2-F259L:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523
L-VvPPOcs-2-F259G:	LAINELLE	D	L	G	A	E	D	D	E	S	V	I	V	I	V	P	R	A	G	G	D	D	V	T	I	G	G	I	E	I	F	V	S	D	:	523

Linkerbereich

C-terminale Domäne

C5: Schnittstellen der Subtilisin-ähnlichen Proteinase K

Thermolysin hydrolysiert die Peptidbindung hinter aliphatischen und aromatischen Aminosäuren: Glycin (G), Alanin (A), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Prolin (P), Valin (V), Histidin (H), Phenylalanin (F), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y).

1

```

L-VvPPOcs-2wt: WSHFQFEKGA*DDDDKVPDPA*IQAPDIRKCGTAVPNGVIPTNCCPPV*TTKPIPFQLPSSDSPMRT*RPAHLV*SKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259L: WSHFQFEKGA*DDDDKVPDPA*IQAPDIRKCGTAVPNGVIPTNCCPPV*TTKPIPFQLPSSDSPMRT*RPAHLV*SKEYLAK : 80
L-VvPPOcs-2-F259G: WSHFQFEKGA*DDDDKVPDPA*IQAPDIRKCGTAVPNGVIPTNCCPPV*TTKPIPFQLPSSDSPMRT*RPAHLV*SKEYLAK : 80

L-VvPPOcs-2wt: YKKAI*EIQKALPDD*DRSFKQANVHCAYCQGAN*DQVGYTDLELQVHASWLF*LPFHRYLYFNERILAKL*IDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259L: YKKAI*EIQKALPDD*DRSFKQANVHCAYCQGAN*DQVGYTDLELQVHASWLF*LPFHRYLYFNERILAKL*IDDPTFALPY : 160
L-VvPPOcs-2-F259G: YKKAI*EIQKALPDD*DRSFKQANVHCAYCQGAN*DQVGYTDLELQVHASWLF*LPFHRYLYFNERILAKL*IDDPTFALPY : 160

L-VvPPOcs-2wt: WAWDNEDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL*PP*TV*IDL*DYDGTET*IPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT*PKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259L: WAWDNEDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL*PP*TV*IDL*DYDGTET*IPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT*PKLFFGYPY : 240
L-VvPPOcs-2-F259G: WAWDNEDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHL*PP*TV*IDL*DYDGTET*IPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT*PKLFFGYPY : 240

L-VvPPOcs-2wt: RAGDAIDDPGAGTLELVPHNIVHKW*TGLADK*PESEDMENFYTAGRDP*IFFGHHANVDRM*WNI*WKTIGGK*NRKDFD*TD*DW*LDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259L: RAGDAIDDPGAGTLELVPHNIVHKW*TGLADK*PESEDMENLYTAGRDP*IFFGHHANVDRM*WNI*WKTIGGK*NRKDFD*TD*DW*LDA : 320
L-VvPPOcs-2-F259G: RAGDAIDDPGAGTLELVPHNIVHKW*TGLADK*PESEDMENGYTAGRDP*IFFGHHANVDRM*WNI*WKTIGGK*NRKDFD*TD*DW*LDA : 320

L-VvPPOcs-2wt: TFMFYDENKQLVEVKV*PCVDT*SKLRYQYQDIPL*PLPKNTKAKAK*TTT*SSKSGVAKAELPK*TTISSIGD*FFKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259L: TFMFYDENKQLVEVKV*PCVDT*SKLRYQYQDIPL*PLPKNTKAKAK*TTT*SSKSGVAKAELPK*TTISSIGD*FFKALNSV : 400
L-VvPPOcs-2-F259G: TFMFYDENKQLVEVKV*PCVDT*SKLRYQYQDIPL*PLPKNTKAKAK*TTT*SSKSGVAKAELPK*TTISSIGD*FFKALNSV : 400

```

Linkerbereich

```

L-VvPPOcs-2wt: IRVEV*PRPKSR*SKKEKE*NEEEV*LLIKGIELDREN*FVKFDVYI*NDEDY*SVSKPRN*SEFAGS*FVNVPHK*HKEMK*TKTNL*R : 480
L-VvPPOcs-2-F259L: IRVEV*PRPKSR*SKKEKE*NEEEV*LLIKGIELDREN*FVKFDVYI*NDEDY*SVSKPRN*SEFAGS*FVNVPHK*HKEMK*TKTNL*R : 480
L-VvPPOcs-2-F259G: IRVEV*PRPKSR*SKKEKE*NEEEV*LLIKGIELDREN*FVKFDVYI*NDEDY*SVSKPRN*SEFAGS*FVNVPHK*HKEMK*TKTNL*R : 480

```

C-terminale Domäne

```

L-VvPPOcs-2wt: LRLAINELLEDLGAEDDES*VITIVPRAGDDVTI*GGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259L: LRLAINELLEDLGAEDDES*VITIVPRAGDDVTI*GGIEIEFVSD : 523
L-VvPPOcs-2-F259G: LRLAINELLEDLGAEDDES*VITIVPRAGDDVTI*GGIEIEFVSD : 523

```

C6: Schnittstellen der Protease Calpain-1

Calpain-1 hydrolysiert laut PROSPER die Peptidbindung hinter AS 370 und AS 478.

Aspartic Cysteine Metallo Serine

cathepsin K calpain-1

calpain-1 (C02.001)

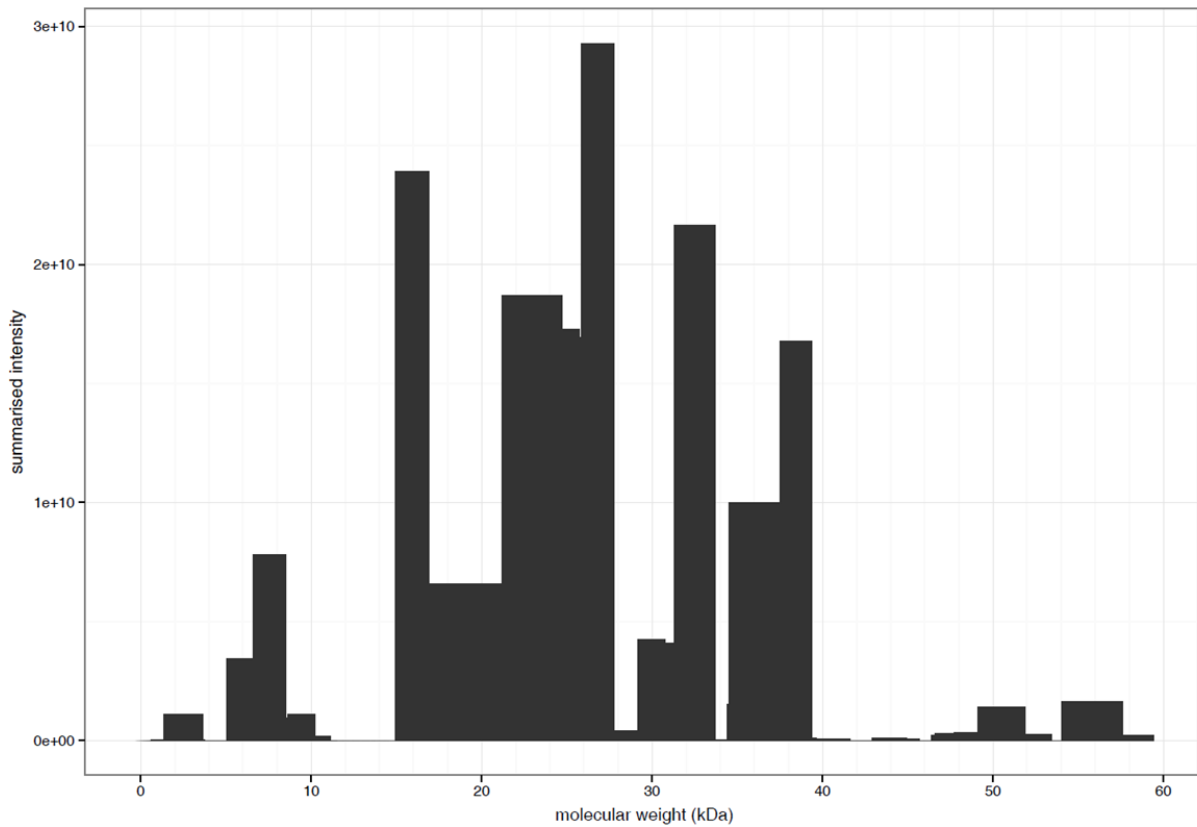
Position	Segment	Nfragment	Cfragment	Score
370	TTTK [*] SSKS	43.99 kDa	17.99 kDa	1.02
478	TKTN [*] LRLA	56.66 kDa	5.32 kDa	0.98

```

WSHPQFEKGADDDKVPDPAIQAPDIRKCGTAVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKKEYLAK
YKKAIEIQKALPDDDRSFKQANVHCAYCQGAN*DQVGYTDLELQVHASWLF*LPFHRYLYFNERILAKLIDDPTFALPY
WAWDNEDGMMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPP*TV*IDL*DYDGTET*IPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT*PKLFFGYPY
RAGDAIDDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADK*PESEDMENFYTAGRDP*IFFGHHANVDRM*WNI*WKTIGGK*NRKDFD*TD*DW*LDA
TFMFYDENKQLVEVKV*PCVDT*SKLRYQYQDIPL*PLPKNTKAKAK*TTT*SSKSGVAKAELPK*TTISSIGD*FFKALNS
VIRVEVPRPKSR*SKKEKE*NEEEV*LLIKGIELDREN*FVKFDVYI*NDEDY*SVSKPRN*SEFAGS*FVNVPHK*HKEMK*TKTNL
LRLAINELLEDLGAEDDES*VITIVPRAGDDVTI*GGIEIEFVSD

```

Natively unstructured region

Anhang D: Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Trypsin**D1: Massenspektrometrische Daten der 36 kDa SDS-Gelbande**

L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 44 aligned peptides and 75.3% sequence coverage:

```

L-VvPPOcs-2_pET51b      1                               80
identified              WSHPQFEK GADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK
                        -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIRK-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK

L-VvPPOcs-2_pET51b      81                               160
identified              YKKAIELQKALPDDDPFSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNERILAKLIDDPTFALPY
                        YKKAIELQKALPDDDPFSFK-----YYLYFNER----LIDDPTFALPY

L-VvPPOcs-2_pET51b      161                              240
identified              WAWDNPDMGYMPIAYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGTTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY
                        WAWDNPDMGYMPIAYASSPSSLYDEK---HL PPTVIDLDYDGTTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY

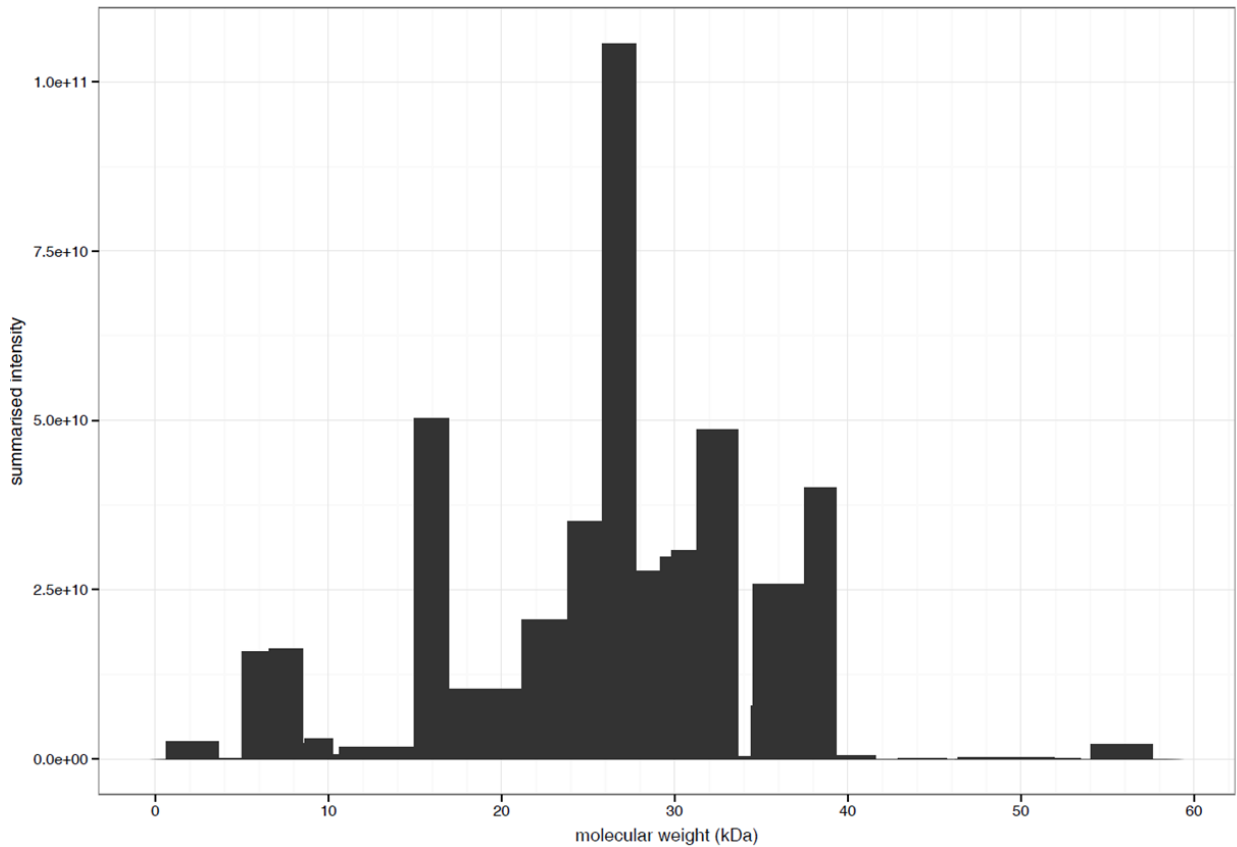
L-VvPPOcs-2_pET51b      241                              320
identified              RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIWKTIGGKNRKDFD TDW L D A
                        RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIWKTIGGK--KDFD TDW L D A

L-VvPPOcs-2_pET51b      321                              400
identified              TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV
                        TFVFDENK-----VPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV

L-VvPPOcs-2_pET51b      401                              480
identified              IRVEVPRPKKSRSKKEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K T K T N L R
                        IR-----EKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K-----

L-VvPPOcs-2_pET51b      481                              523
identified              LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
                        LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
  
```


D2: Massenspektrometrische Daten der 34 kDa SDS-Gelbande

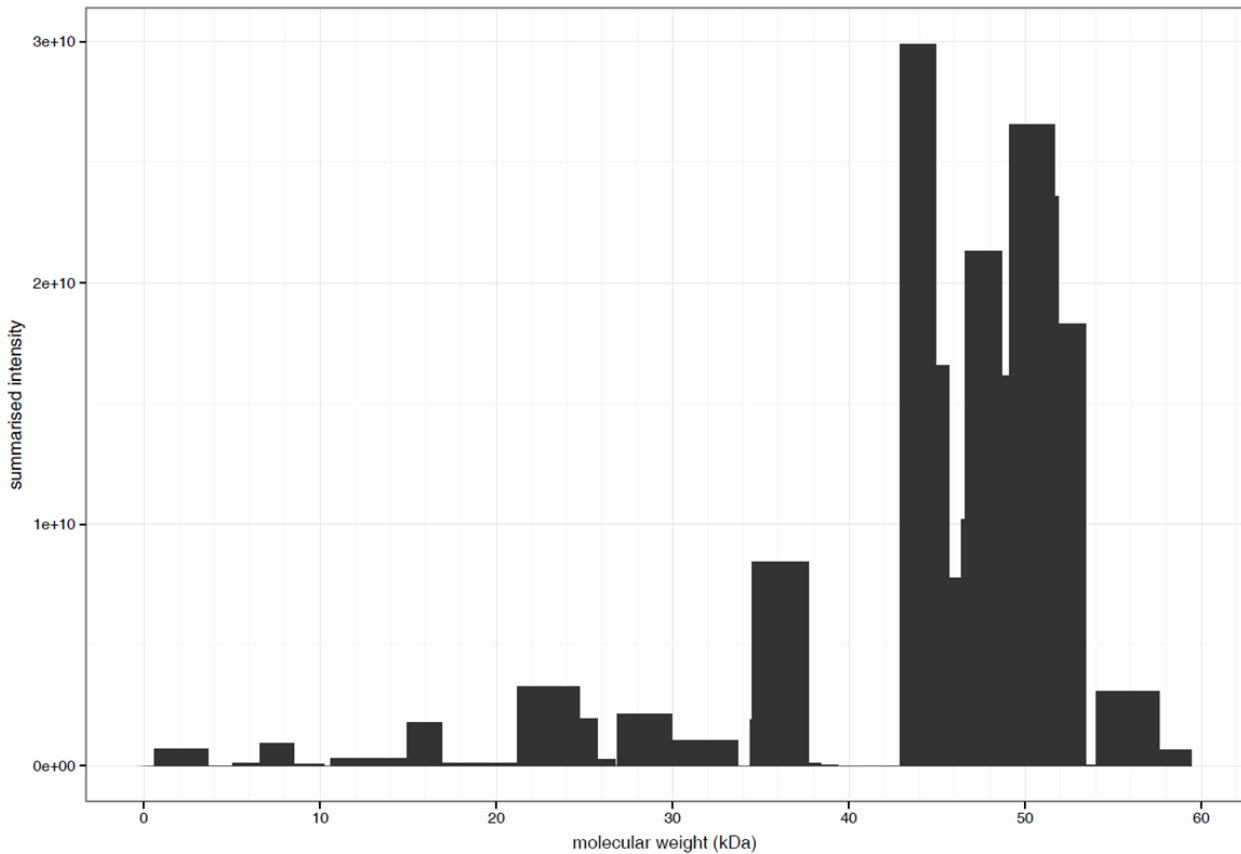


```

|-VVPPocs-2_pETS1b with 523 amino acids and 50 aligned peptides and 85.5% sequence coverage:
L-VvPPocs-2_pETS1b      1      WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK      80
  identified             -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK
L-VvPPocs-2_pETS1b      81      YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY      160
  identified             YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNER----LIDDPFALPY
L-VvPPocs-2_pETS1b      161     WAWNDPGMYMPIAYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYQIVSGATTPKLFFGYPY      240
  identified             WAWNDPGMYMPIAYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYQIVSGATTPKLFFGYPY
L-VvPPocs-2_pETS1b      241     RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPDIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKFDTDWDLDA      320
  identified             RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPDIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKFDTDWDLDA
L-VvPPocs-2_pETS1b      321     TFVFDYENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKATTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV      400
  identified             TFVFDYENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV
L-VvPPocs-2_pETS1b      401     IRVEVPRPKKSRSKKEKENEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR      480
  identified             IR-----KEKENEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHK-----
L-VvPPocs-2_pETS1b      481     LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD      523
  identified             LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPR-----

```

D3: Massenspektrometrische Daten der 17 kDa SDS-Gelbande



L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 40 aligned peptides and 78.6% sequence coverage:

```

1
L-VvPPOcs-2_pET51b      80
identified      WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVLSKEYLAK
                -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVLSK-----

81
L-VvPPOcs-2_pET51b      160
identified      YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQGAYDQVG YTDLELQVHASWLF LPPHRYLYLFNERILAKLIDDPTFALPY
                --KAIELQKALPDDPR---QQANVHCAYCQGAYDQVG YTDLELQVHASWLF LPPHRYLYLFNER----LIDDPTFALPY

161
L-VvPPOcs-2_pET51b      240
identified      WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPK LFFGYPY
                WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEK----HL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPK LFFGYPY

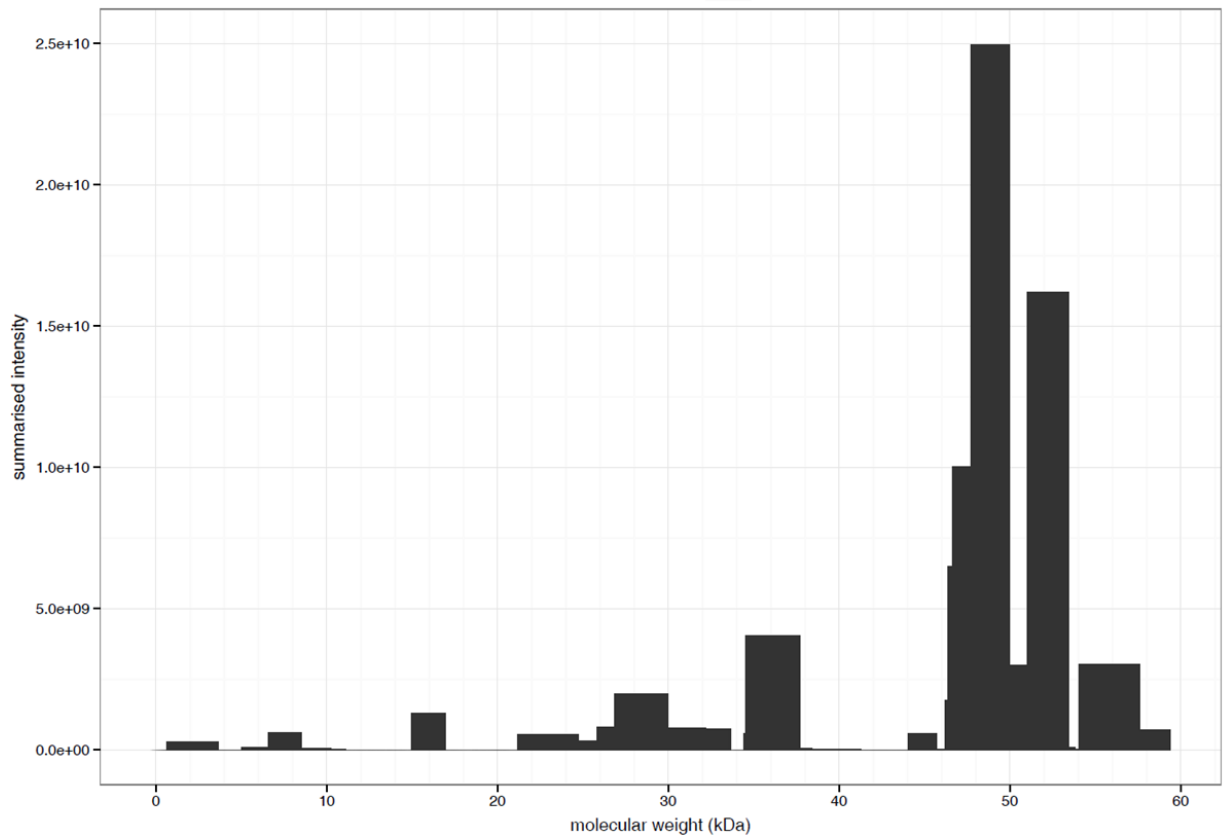
241
L-VvPPOcs-2_pET51b      320
identified      RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWKTI GGKNRKDF TD TDWLDA
                RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDR-----KDF TD TDWLDA

321
L-VvPPOcs-2_pET51b      400
identified      TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWL PKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV
                TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSK-----TTISSIGDFPKALNSV

401
L-VvPPOcs-2_pET51b      480
identified      IRVEVPRPKKSRSKKEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K T K T N L R
                IRVEVPRPKK----KEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K-----

481
L-VvPPOcs-2_pET51b      523
identified      LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
                LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
    
```

D4: Massenspektrometrische Daten der 15 kDa SDS-Gelbande



L-VVPP0cs-2_pET51b with 523 amino acids and 35 aligned peptides and 62.7% sequence coverage:

```

L-VVPP0cs-2_pET51b      1      80
identified      WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPA AHLVSKEYLAK
                  -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PIPFQLPSSDSPMRTRPA AHLVSK-----

L-VVPP0cs-2_pET51b      81      160
identified      YKKAIELQKALPDDDP RSFKQQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYLFNERILAKLIDDP T FALPY
                  --KAIELQKALPDDDP-----YLYLFNER-----

L-VVPP0cs-2_pET51b      161      240
identified      WAWDNP DGMYP AIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPK LFFGYPY
                  -----HL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYK-----LFFGYPY

L-VVPP0cs-2_pET51b      241      320
identified      RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKW TGLADKPS E DMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWK TIGGKNR KDF TD DWLDA
                  RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKW TGLADKPS E DMGNFYTAGRDP IFFGHANVDR-----KDF TD DWLDA

L-VVPP0cs-2_pET51b      321      400
identified      TFVFDENKQLVEVKVPCVD TSKLRYQYQDIPLPWL PKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGD FPKALNSV
                  TFVFDENKQLVEVKVPCVD TSK--YQYQDIPLPWLPK-----ALNSV

L-VVPP0cs-2_pET51b      401      480
identified      IRVEVPRPKSRSKKEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K T K T N L R
                  IRVEVPRPK-----KEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K-----

L-VVPP0cs-2_pET51b      481      523
identified      LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
                  LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD

```

Anhang E: Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Chymotrypsin

E1: Massenspektrometrische Daten der 38 kDa SDS-Gelbande

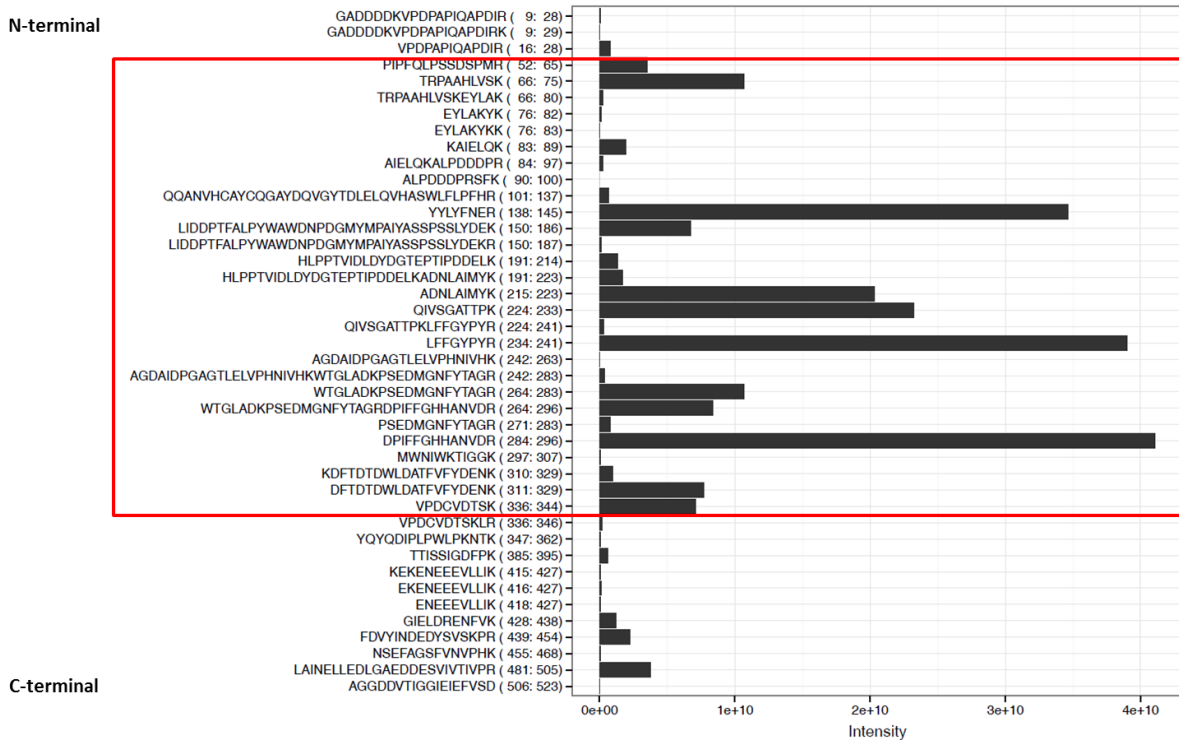
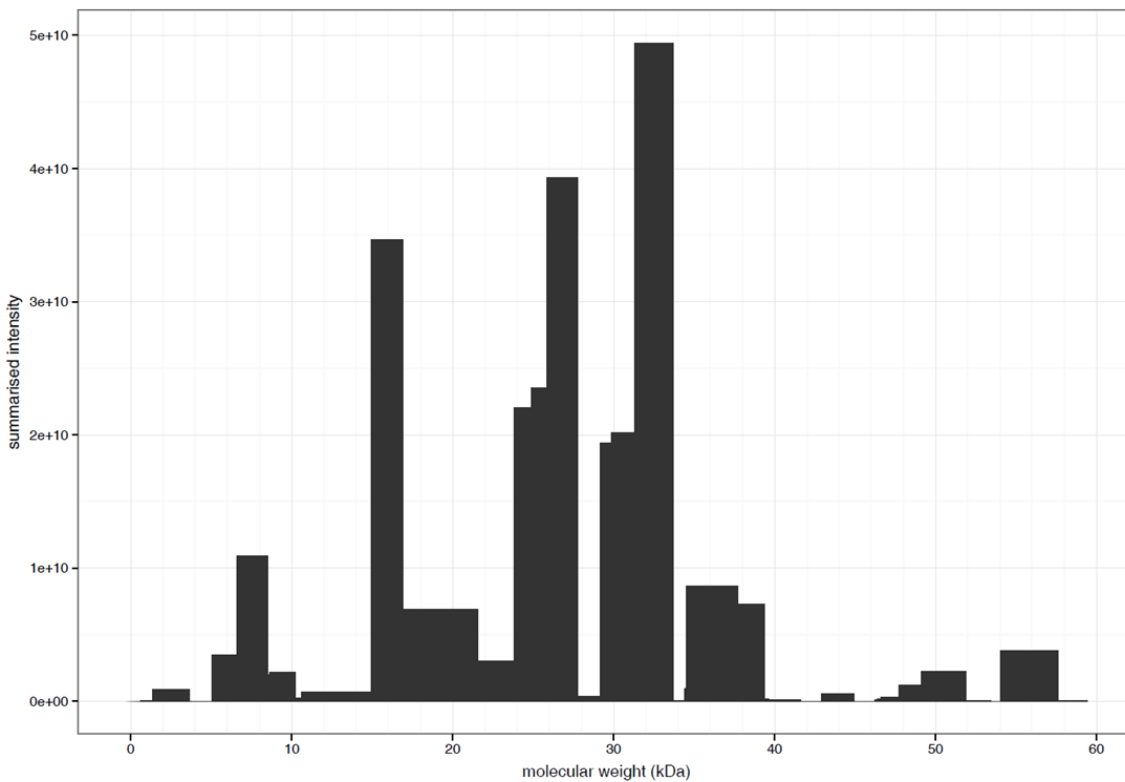


Abbildung E1: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (38 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Chymotrypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne.



L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 42 aligned peptides and 81.3% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pET51b identified	1 WSHPQFEKGADDDDKVDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK -----GADDDDKVDPAPIQAPDIRK-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	81 YKKAIELQKALPDDDPKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYYLYFNERILAKLIDDPFALPY YKKAIELQKALPDDDPKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYYLYFNER----LIDDPFALPY	160
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	161 WAWNDPDGMYPAYIASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY WAWNDPDGMYPAYIASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY	240
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	241 RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKRNKDFDFTDWLDA RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGK--KDFDFTDWLDA	320
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	321 TFVFDYENKQLVEVKVPCDVTSLKRYQYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV TFVFDYENK-----VPDCVDTSLKRYQYQDIPLPWLKNTK-----TTISSIGDFPK-----	400
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	401 IRVEVPRPKKSRKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR -----KEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHK-----	480
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	481 LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD	523

E2: Massenspektrometrische Daten der 35 kDa SDS-Gelbande

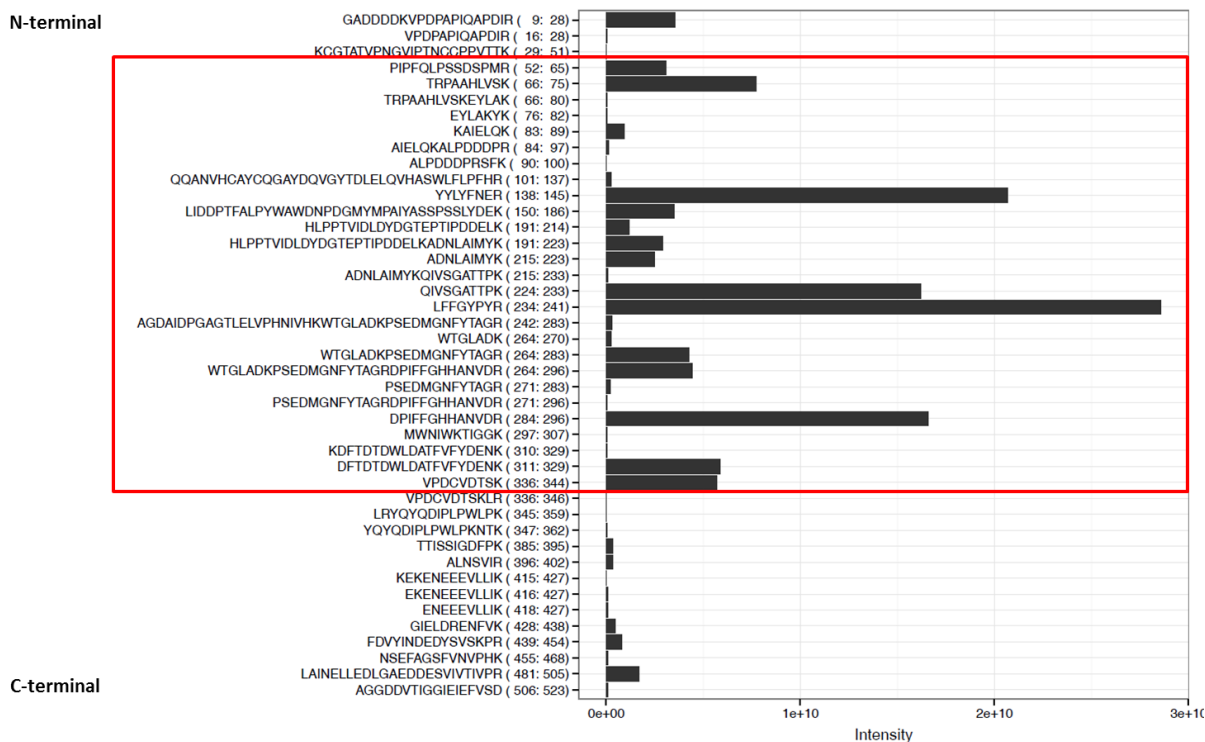
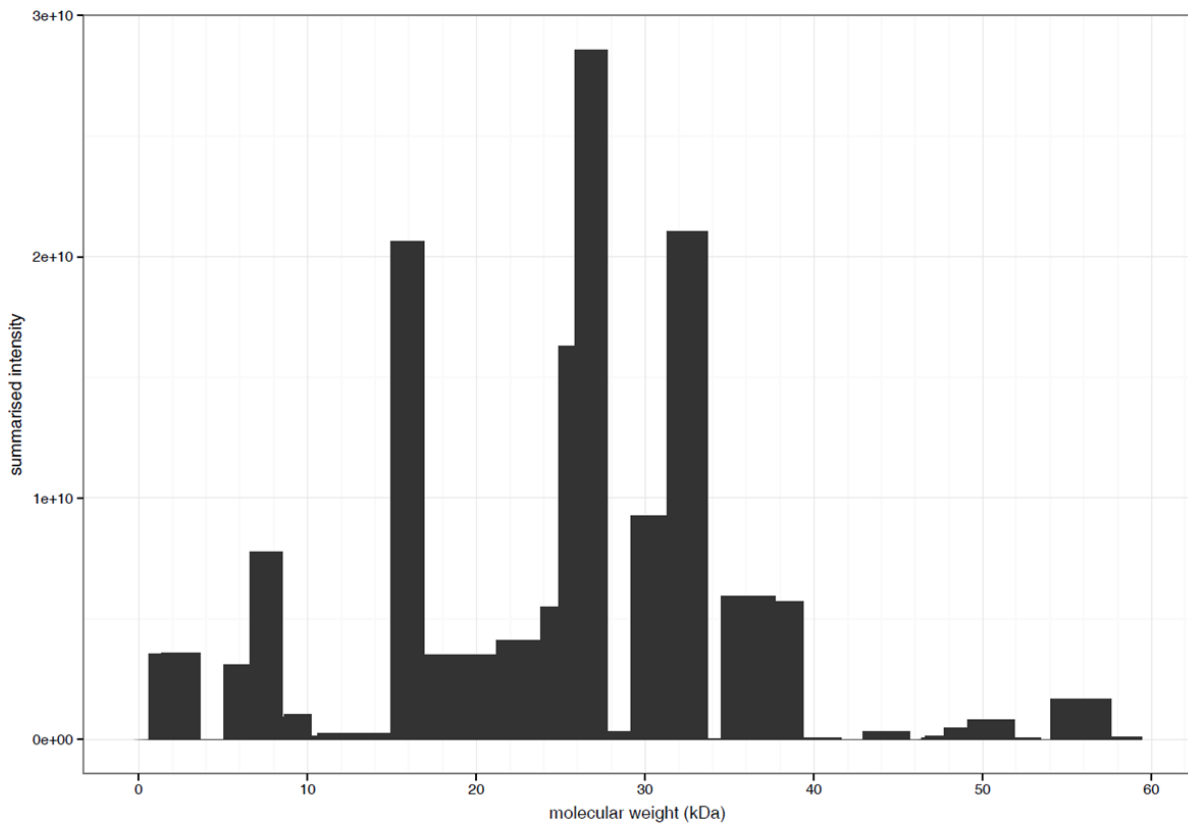


Abbildung E2: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (35 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Chymotrypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne.



L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 43 aligned peptides and 86.6% sequence coverage:

```

L-VvPPOcs-2_pETS1b      1      WSHPQFEKGADDDDKVDPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKEYLAK      80
identified              -----GADDDDKVDPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKEYLAK

L-VvPPOcs-2_pETS1b      81      YKKAIELQKALPDDDPFSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY      160
identified              YKKAIELQKALPDDDPFSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYLYFNER----LIDDPFALPY

L-VvPPOcs-2_pETS1b      161     WAWNDPDGMYMPAIYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY      240
identified              WAWNDPDGMYMPAIYASSPSSLYDEK----HLPPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY

L-VvPPOcs-2_pETS1b      241     RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKRDFTDWDWLD      320
identified              RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGK--KDFDWDWLD

L-VvPPOcs-2_pETS1b      321     TFVFDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV      400
identified              TFVFDENK-----VPDCVDTSKLRVYQDIPLPWLPKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV

L-VvPPOcs-2_pETS1b      401     IRVEVPRPKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEYSVSKPRNSEFAGSFVNVPKHKMKEMKTKTNLR      480
identified              IR-----KEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEYSVSKPRNSEFAGSFVNVPK-----

L-VvPPOcs-2_pETS1b      481     LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD      523
identified              LAINELLEDLGAEDDESIVITIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
    
```

E3: Massenspektrometrische Daten der 30 kDa SDS-Gelbande

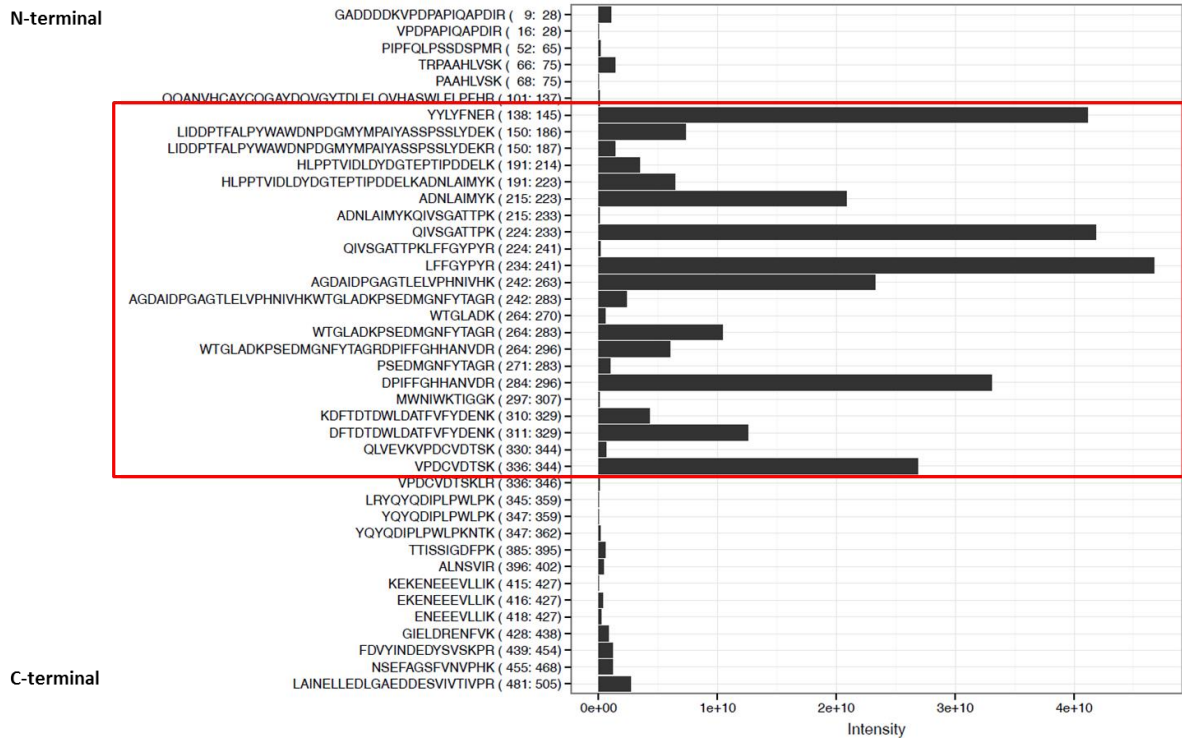
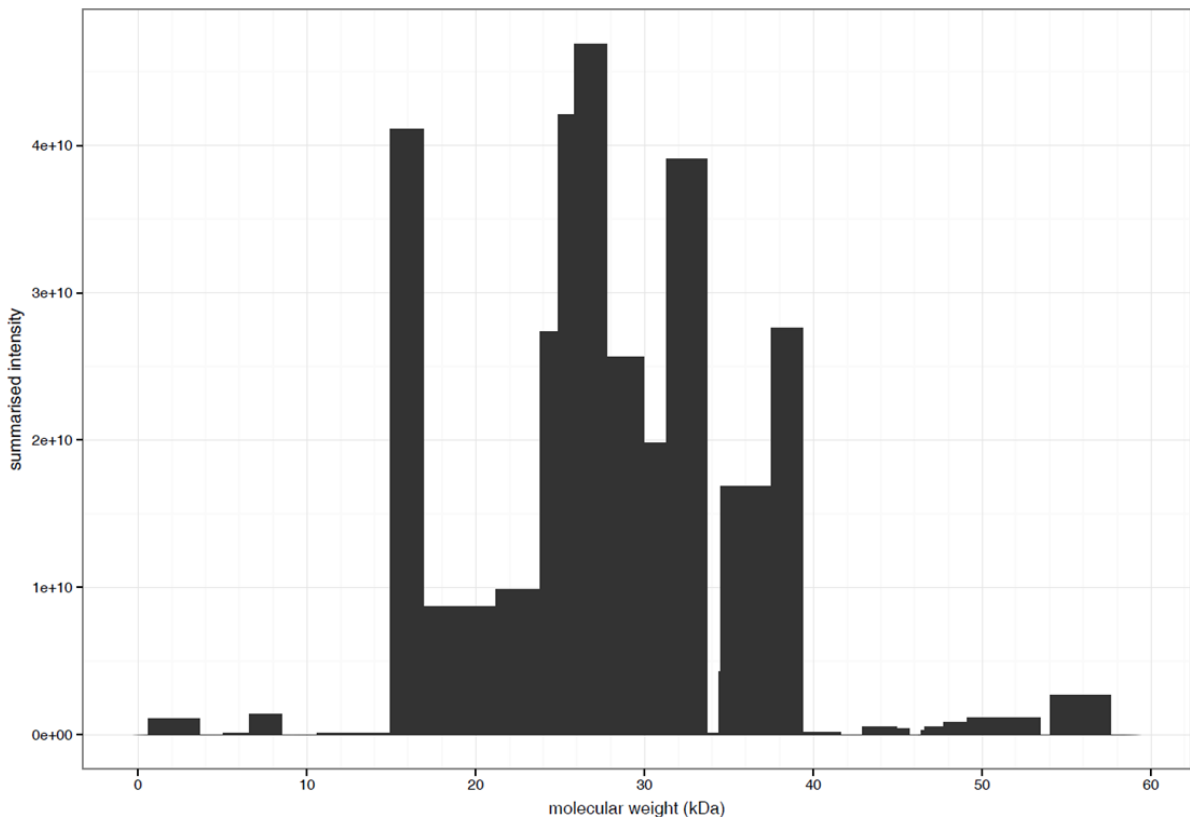


Abbildung E3: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (30kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Chymotrypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung umfassen einen Teil der N-terminalen Domäne.



L-VvPPOcs-2_pet51b with 523 amino acids and 41 aligned peptides and 75.3% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pet51b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKKEYLAK	80
		-----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSK-----	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	81	YKKAIELQKALPDDDFRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLF LPFHRYYLYFNERILAKLIDDPTFALPY	160
		-----QQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLF LPFHRYYLYFNER----LIDDPTFALPY	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	161	WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRNKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT PKLFFGYPPY	240
		WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRNKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT PKLFFGYPPY	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWKTI GGKNRKDFTD TDWLDA	320
		RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWKTI GGKNRKDFTD TDWLDA	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	321	TFVFDENKQLVEVKVPCVDTSKLR YQQDIPLPWL PKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
		TFVFDENKQLVEVKVPCVDTSKLR YQQDIPLPWL PKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	401	IRVEVPRPKSRSKKEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K H M K E M K T K T N L R	480
		IR-----KEKENE E E V L L I K G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D Y S V S K P R N S E F A G S F V N V P H K-----	
L-VvPPOcs-2_pet51b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523
		LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPR-----	

E4: Massenspektrometrische Daten der 18 kDa SDS-Gelbande

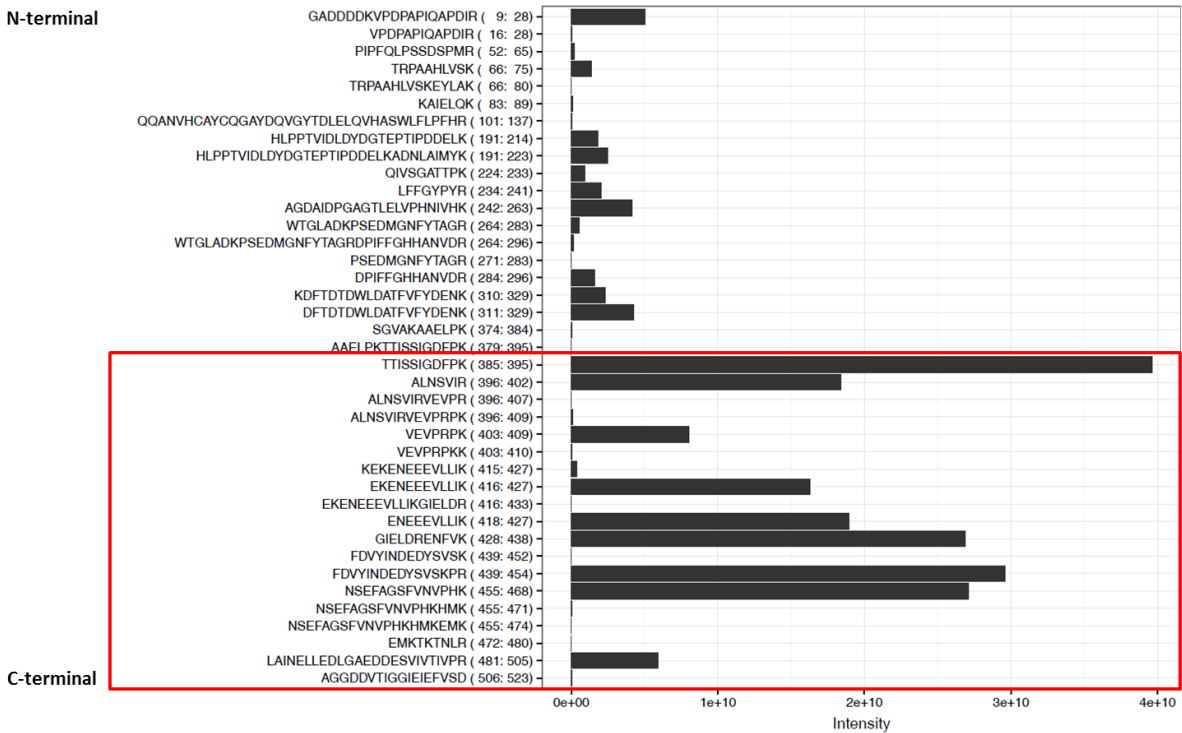
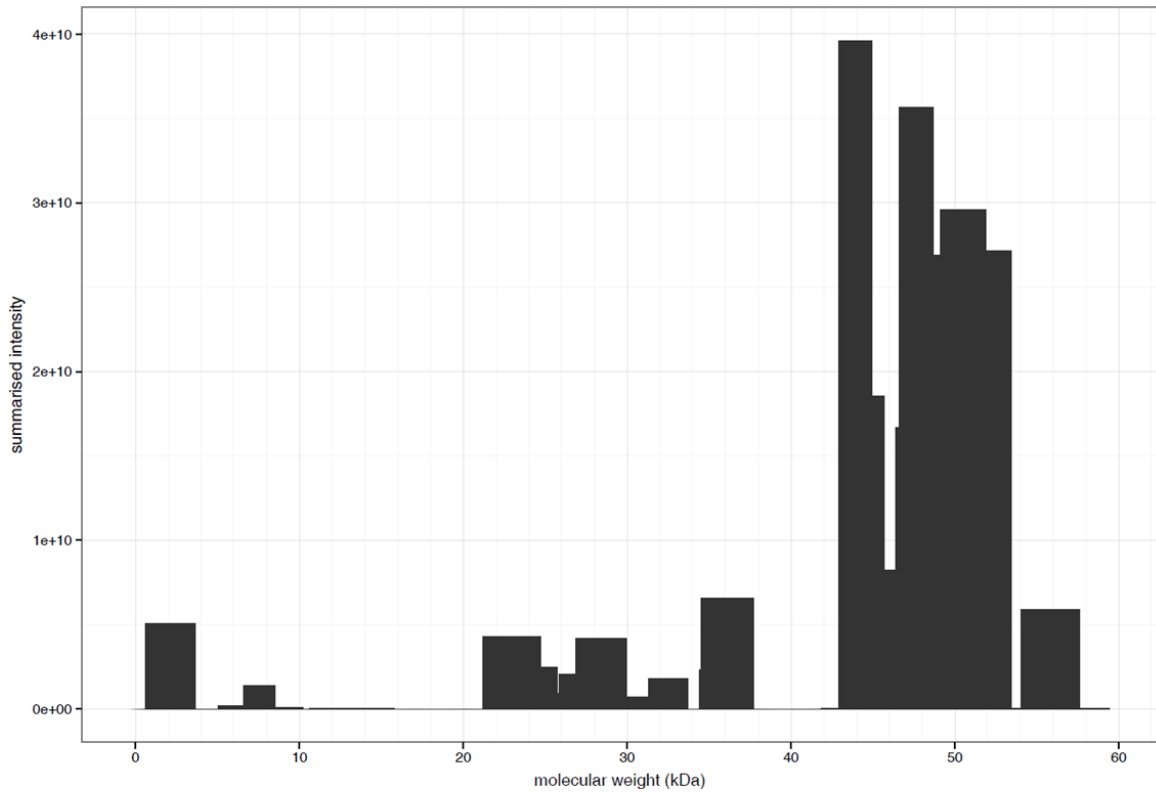


Abbildung E4: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (18 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Chymotrypsin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der C-terminalen Domäne.



L-VVPP0cs-2_pET51b with 523 amino acids and 39 aligned peptides and 69.8% sequence coverage:

```

1
L-VVPP0cs-2_pET51b      WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPA AHLVSKEYLAK      80
identified              -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PIPFQLPSSDSPMRTRPA AHLVSKEYLAK

81
L-VVPP0cs-2_pET51b      YKKAIELQKALPDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYYLYFNERILAKLIDDP TFALPY      160
identified              --KAIELQK-----QQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHR-----

161
L-VVPP0cs-2_pET51b      WAWDNPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT PKLFFGYPY      240
identified              -----HL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATT PKLFFGYPY

241
L-VVPP0cs-2_pET51b      RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPS EDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWKTI GGKNRKDFTD TDWLDA      320
identified              RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPS EDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDR-----KDFTD TDWLDA

321
L-VVPP0cs-2_pET51b      TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWL PKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGD FPKALNSV      400
identified              TFVFDENK-----SGVAKAAELPKTTISSIGD FPKALNSV

401
L-VVPP0cs-2_pET51b      IRVEVPRPKKSR SKKEKENE EEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKTKTNLR      480
identified              IRVEVPRPKK---KEKENE EEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEY SVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKTKTNLR

481
L-VVPP0cs-2_pET51b      LAINELLEDLGAEDDESIVIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD      523
identified              LAINELLEDLGAEDDESIVIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD

```

Anhang F: Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Thermolysin.

Für die Analyse der Schnittstellen des Thermolysins liegen keine Histogramme der aufsummierten Messintensitäten über die molekulare Masse des L-VvPPOcs-2wt. Dies ist darin begründet, dass die Analyse chronologisch als Erste stattfand. Das Auswerteprotokoll wurde im Laufe der Zeit modifiziert.

F1: Massenspektrometrische Daten der 38 kDa SDS-Gelbande

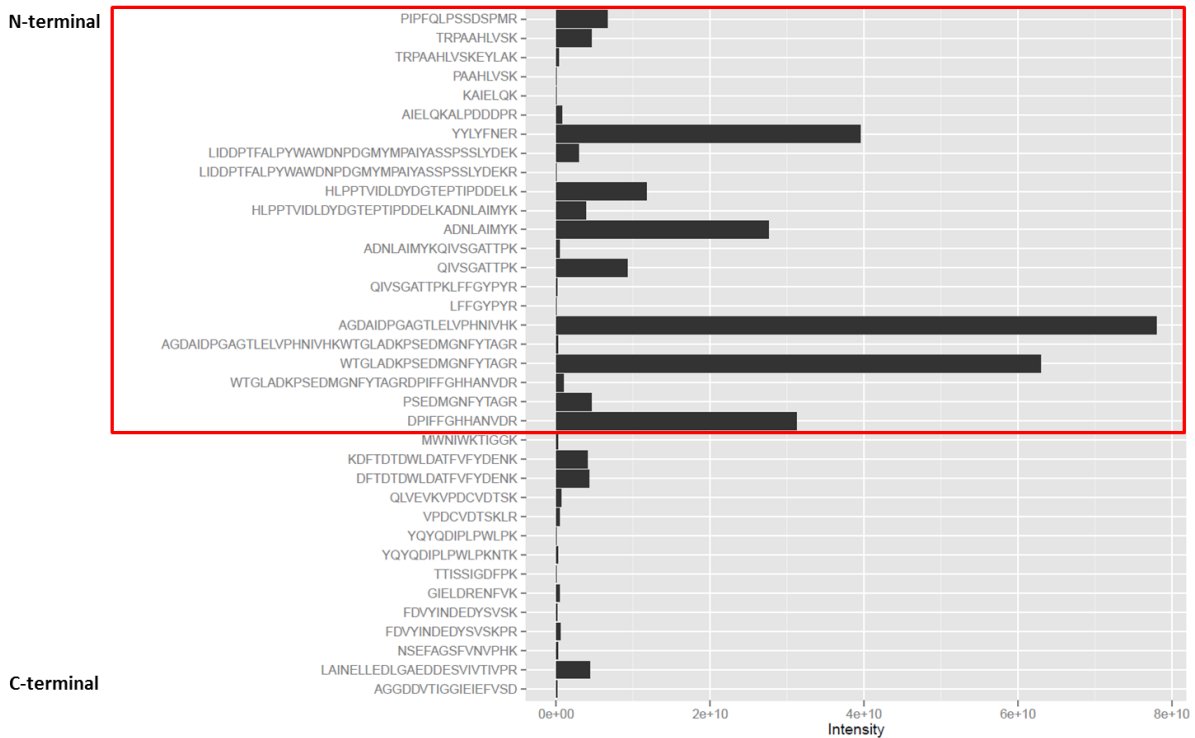


Abbildung F1: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (36 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Thermolysin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne.

```

L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 36 aligned peptides and 67.9% sequence coverage:
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 1 WSHPFQFEKGADDDDKVPDPAPAIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKKEYLAK 80
-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKKEYLAK
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 81 YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY 160
--KAIELQKALPDDPR-----YYLYFNER----LIDDPFALPY
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 161 WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNHLPTVIDLDYDGTTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPR 240
WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNHLPTVIDLDYDGTTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPR
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 241 RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNIWKTIGGKRNKDFTDWDLDA 320
RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNIWKTIGGKRNKDFTDWDLDA
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 321 TFVYDENKQLVEVKVPCVDTSKLRQYQDIPLPWLKNTKAKAKATTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV 400
TFVYDENKQLVEVKVPCVDTSKLRQYQDIPLPWLKNTK-----TTISSIGDFPK-----
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 401 IRVEVPRPKKSRSKKEKENEVEVLLKGIELDRENFVKFDVYINDEYVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR 480
-----GIELDRENFVKFDVYINDEYVSKPRNSEFAGSFVNVPHK-----
L-VvPPOcs-2_pET51b identified 481 LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD 523
LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
    
```

F2: Massenspektrometrische Daten der 34 kDa SDS-Gelbande

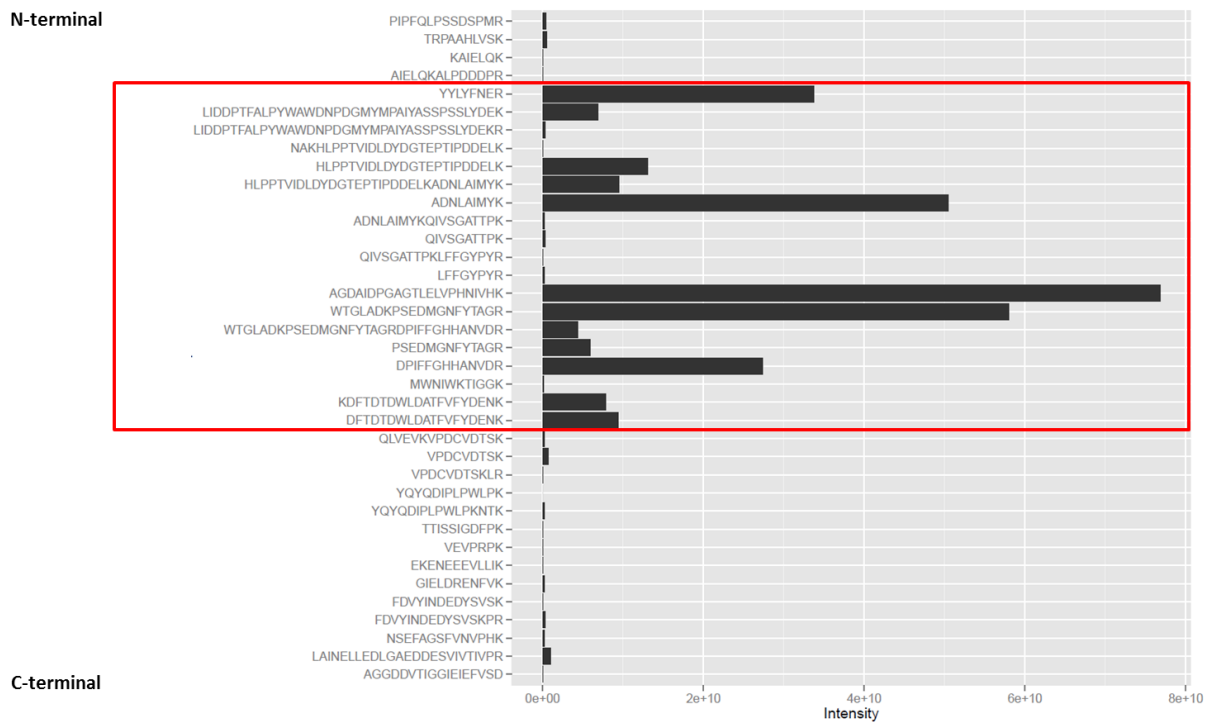


Abbildung F2: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (34 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Thermolysin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne.

L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 37 aligned peptides and 71.1% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pET51b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVDPAPAIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKKEYLAK	80
		-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSK-----	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	81	YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQGYDQVGYTDLELQVHASWLFPHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY	160
		--KAIELQKALPDDPR-----YYLYFNER----LIDDPFALPY	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	161	WAWNDPDGMYPAYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPR	240
		WAWNDPDGMYPAYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPR	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRPIFFGHANVDRMWNWKTIGGK--KDFDTDWLDA	320
		RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRPIFFGHANVDRMWNWKTIGGK--KDFDTDWLDA	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	321	TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
		TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRQYQDIPLPWLPKNTK-----TTISSIGDFPK----	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	401	IRVEVPRPKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEYVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR	480
		--VEVPRPK-----EKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEYVSKPRNSEFAGSFVNVPHK-----	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523
		LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	

F3: Massenspektrometrische Daten der 31 kDa SDS-Gelbande

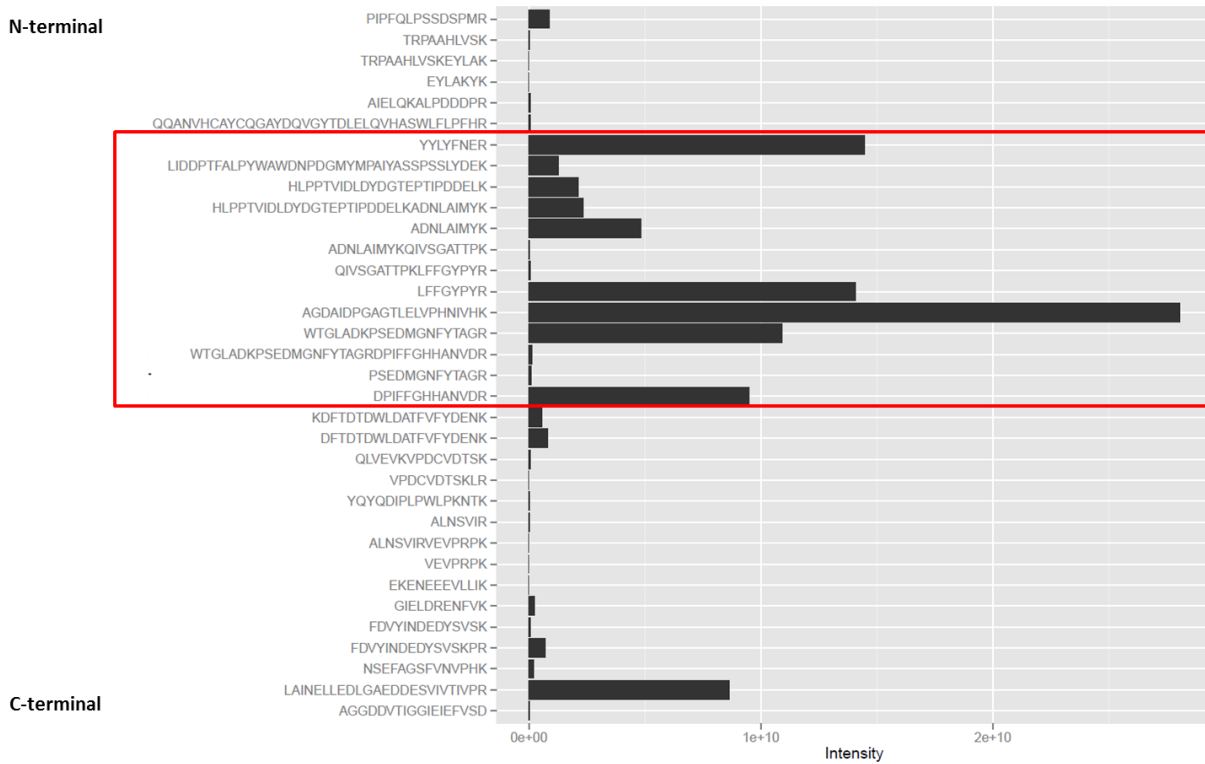


Abbildung F3: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (31 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Thermolysin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der N-terminalen Domäne.

L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 30 aligned peptides and 55.8% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKEYLAK	80
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	81	YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLQLQVHASWLFLLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY	160
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	161	WAWDNPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLLFFGYPY	240
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRPIFFGHANVDRMWNIVKTIIGGKNRKDFDTDWLDA	320
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	321	TFVYDENKQLVEKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	401	IRVEVPRPKKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR	480
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523

F4: Massenspektrometrische Daten der 17 kDa SDS-Gelbande

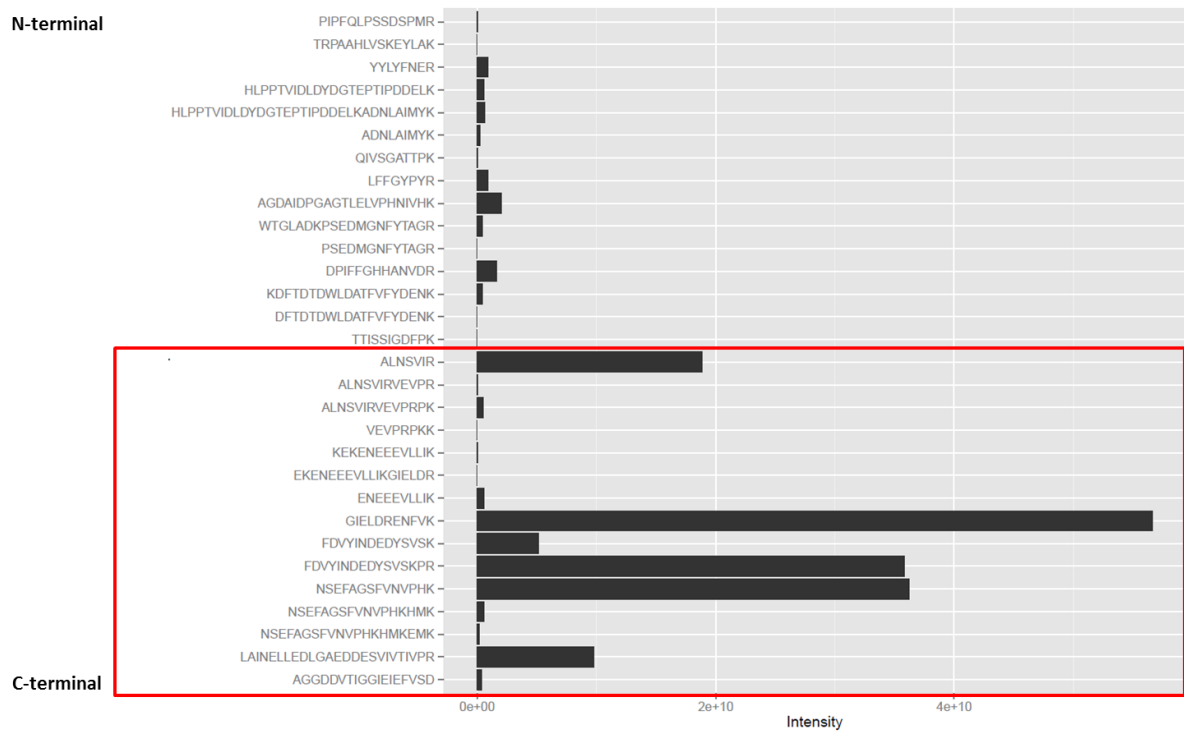


Abbildung F4: Histogramm der Messintensitäten der massenspektroskopischen Analyse der detektierten Peptidsequenzen des Spaltpeptides (17 kDa) des L-VvPPOcs-2wt nach Proteolyse durch Thermolysin. Die Maxima der Messintensitätsverteilung liegen im Bereich der C-terminalen Domäne.

L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 34 aligned peptides and 75.7% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pET51b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	81	YKKAIELQKALPDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLFLLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY YK-AIELQKALPDDPR---QQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLFLLPFHRYLYFNER---LIDDPFALPY	160
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	161	WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLLFFGYPY WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEK---HLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLLFFGYPY	240
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKRNKDFDTDWLDA RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDR-----KDFDTDWLDA	320
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	321	TFVYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV TFVYDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTK-----ALNSV	400
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	401	IRVEVPRPKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFKVFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKMKEMKTKTNLR IRVEVPRPK-----EKENEVEVLLIKGIELDRENFKVFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHK-----	480
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523

Anhang G: Massenspektrometrische Daten der Proteolyse des L-VvPPOcs-2wt durch Proteinase K.

Für die Analyse der Schnittstellen der Proteinase K wurde zusätzlich zum Verdau durch Trypsin eine saure Hydrolyse durchgeführt. Demzufolge entstanden viele Spaltpeptide, die oftmals nur in 1 oder 2 Aminosäuren different sind. Aus diesem Grund sind die Histogramme der Messintensitäten sehr umfangreich.

G1: Massenspektrometrische Daten der 35 kDa SDS-Gelbande

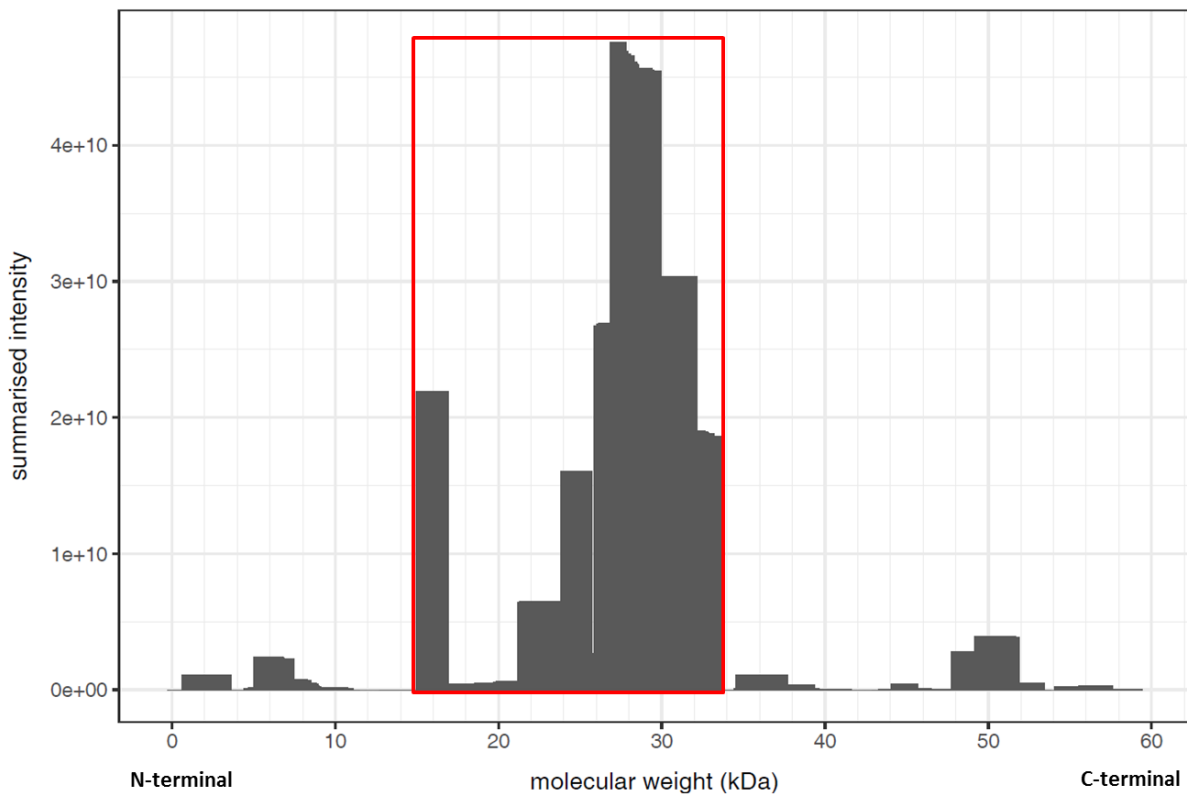
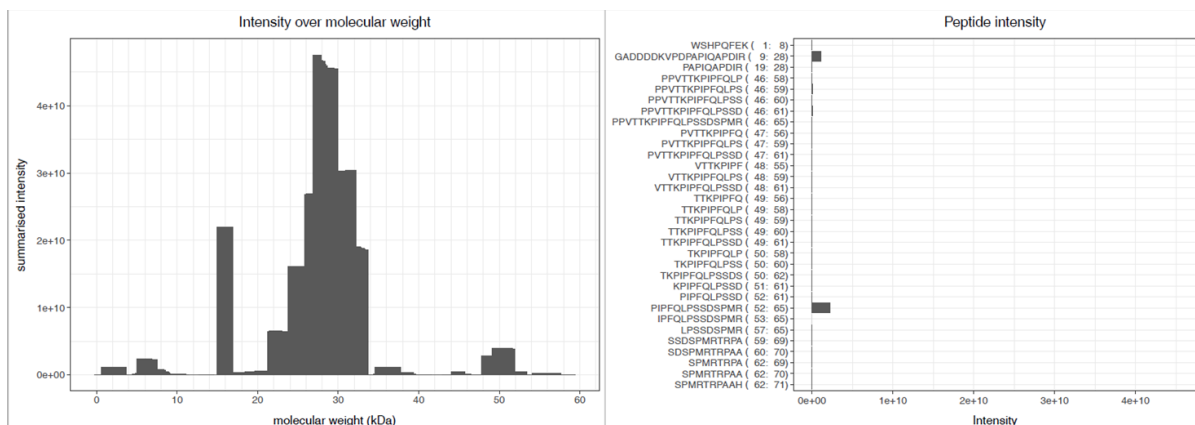


Abbildung G1: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen des 35 kDa Spaltpeptids. Die Lage der Intensitätsbalken auf der Abszisse zeigt die Position im Molekulargewicht des unbehandelten L-VvPPOcs-2wt (Vorlagesequenz) von N- nach C-terminal. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 12 und 32 kDa, also im Bereich der N-terminalen Domäne.



L-VVPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 374 aligned peptides and 82.6% sequence coverage:

```

L-VVPPOcs-2_pET51b      1      80
identified      WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK
                  WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK

L-VVPPOcs-2_pET51b      81      160
identified      YKKAIELQKALPDDDPFSFKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY
                  YKKAIELQKALPDDDPFSFK-----TDLELQVHA-----YYLYFNER----LIDDPFALPY

L-VVPPOcs-2_pET51b      161      240
identified      WAWNDPDGMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY
                  WAWNDPDGMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY

L-VVPPOcs-2_pET51b      241      320
identified      RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKDFDWDWLD
                  RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRM-----TIGGKNRKDFDWDWLD

L-VVPPOcs-2_pET51b      321      400
identified      TFFVYDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQYDIPLPWPKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV
                  TFFVYDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQYDIPLPWPKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV

L-VVPPOcs-2_pET51b      401      480
identified      IRVEVPRPKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFKVDFVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKMKTKTNLR
                  IRVEVPRPK-----EKENEVEVLLIKGIELDRENFKVDFVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKMK-----

L-VVPPOcs-2_pET51b      481      523
identified      LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD
                  LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD

```

G2: Massenspektrometrische Daten der 30 kDa SDS-Gelbande

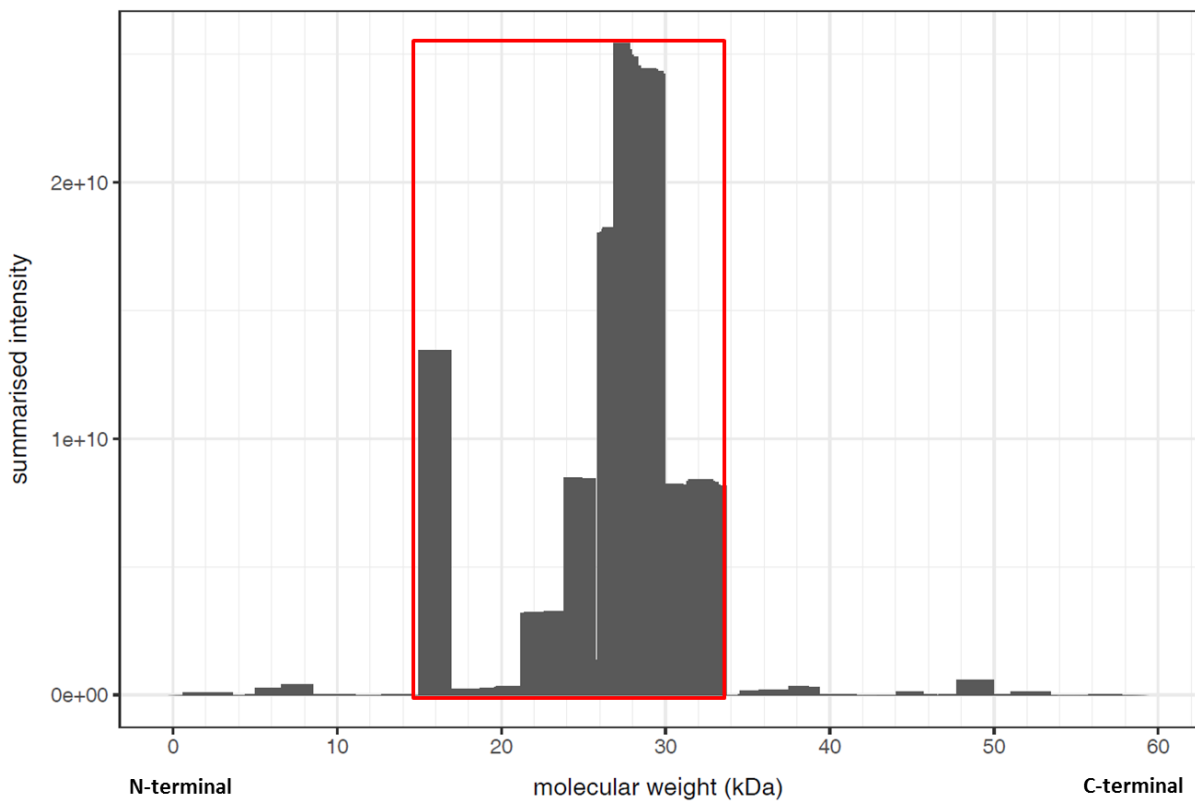
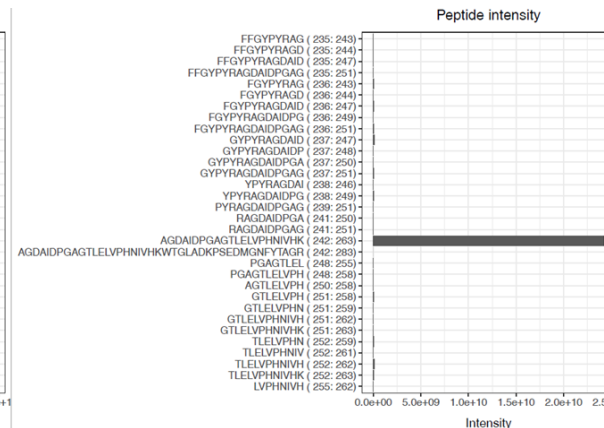
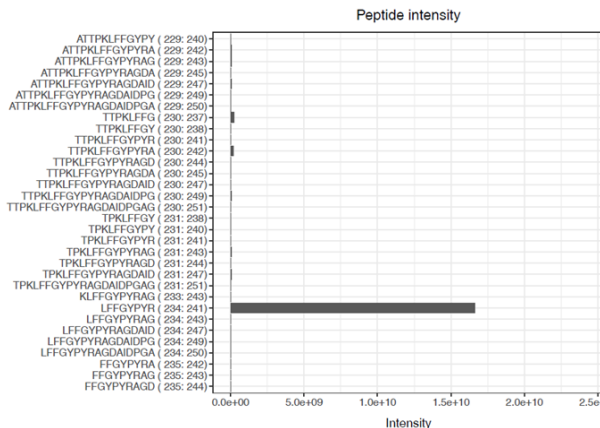
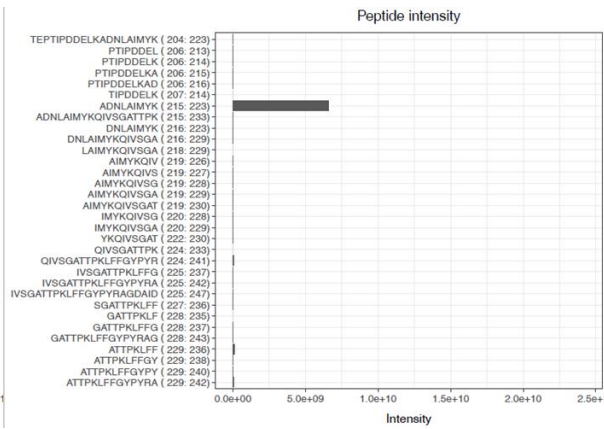
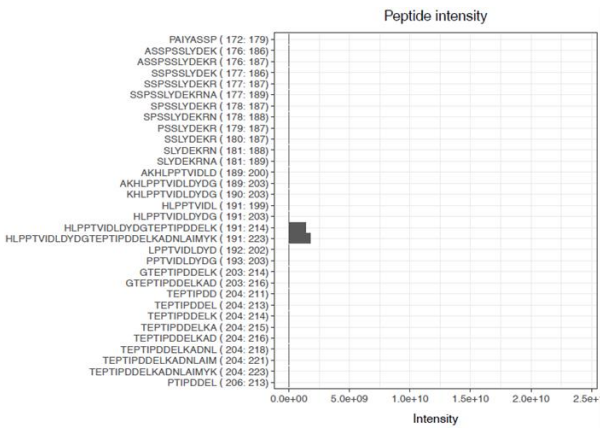
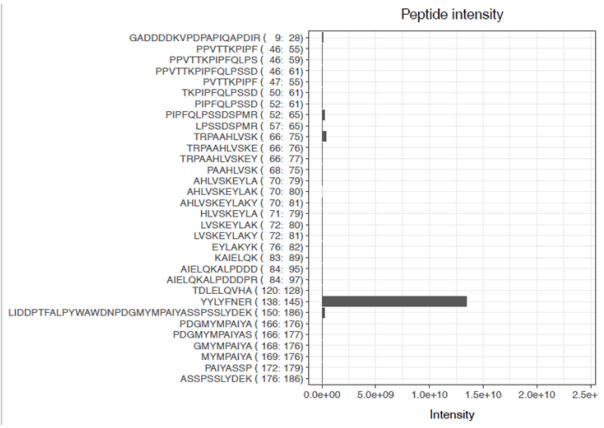
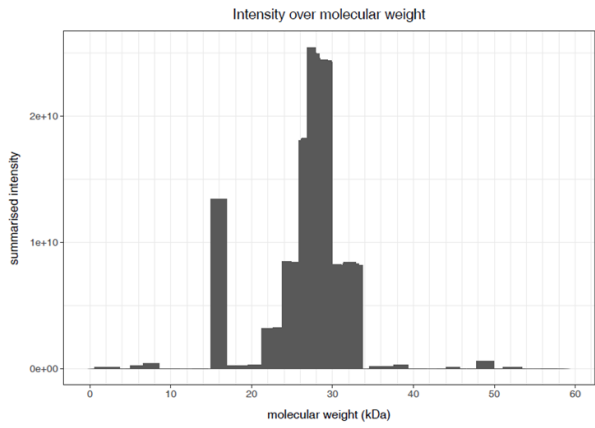
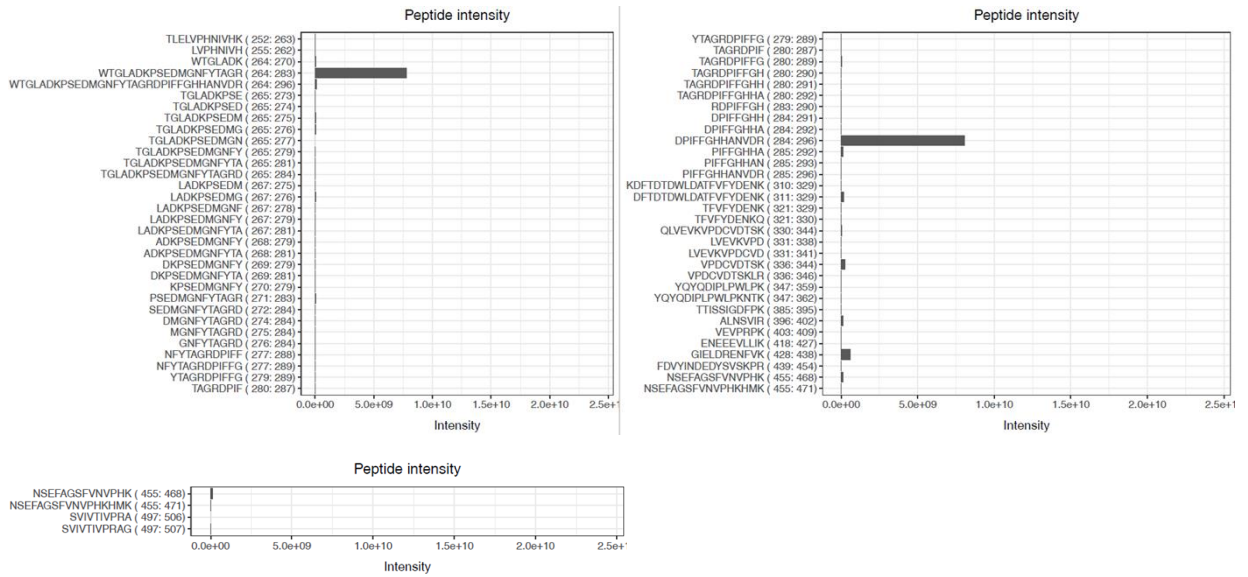


Abbildung G2: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 30 kDa Spaltpeptid. Die Verteilung der aufsummierten Intensitäten ähnelt den Ergebnissen der Analyse des 35 kDa Spaltpeptids. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 12 und 32 kDa (roter Rahmen), also im Bereich der N-terminalen Domäne.





L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 214 aligned peptides and 72.5% sequence coverage:

```

1
L-VvPPOcs-2_pETS1b      WSHPFQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK      80
identified              -----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----PPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK

81
L-VvPPOcs-2_pETS1b      YKKAIELQKALPDDDPKRSFKKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLLELQVHASWLFPPFHRYLYFNERILAKLIDDPPTFALPY      160
identified              YKKAIELQKALPDDDPK-----TDLELQVHA-----YYLYFNER----LIDDPPTFALPY

161
L-VvPPOcs-2_pETS1b      WAWDNPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNKHLPPPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPPY      240
identified              WAWDNPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNKHLPPPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPPY

241
L-VvPPOcs-2_pETS1b      RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKDFDTDWLDA      320
identified              RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDR-----KDFDTDWLDA

321
L-VvPPOcs-2_pETS1b      TFVFDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV      400
identified              TFVFDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQDIPLPWLKNTK-----TTISSIGDFPKALNSV

401
L-VvPPOcs-2_pETS1b      IRVEVPRPKRSRKKKEKEEEEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKTKTNLR      480
identified              IRVEVPRK-----EEEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHK-----

481
L-VvPPOcs-2_pETS1b      LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD      523
identified              -----SIVTIVPRAG-----
    
```

G3: Massenspektrometrische Daten der 29 kDa SDS-Gelbande

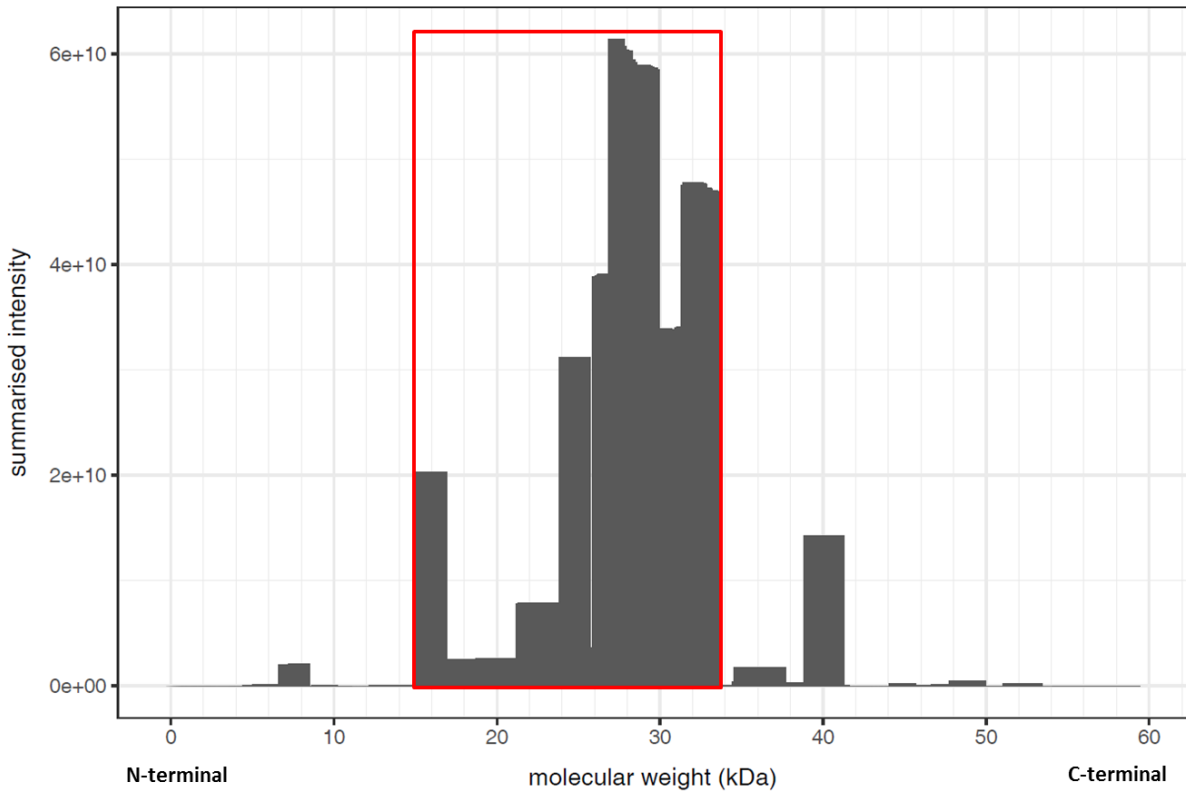
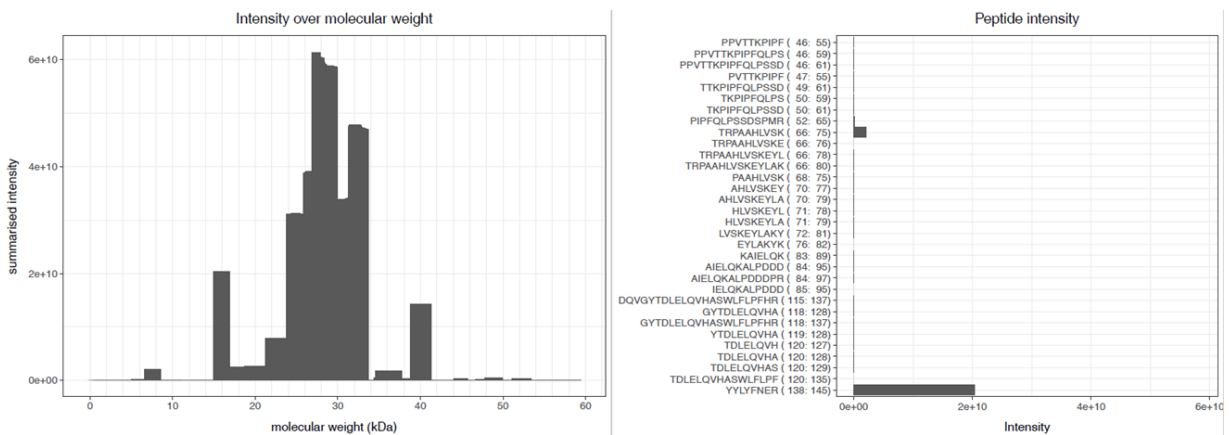
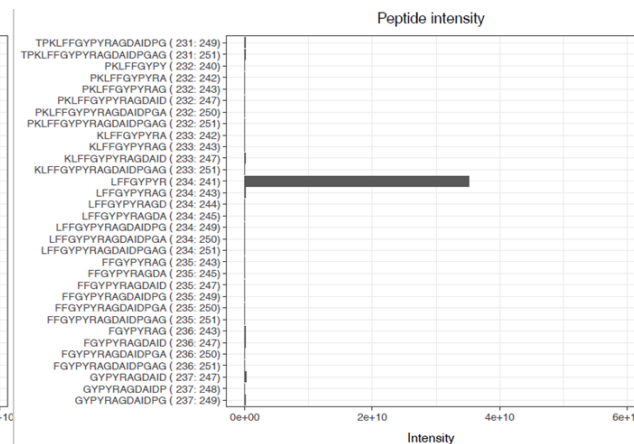
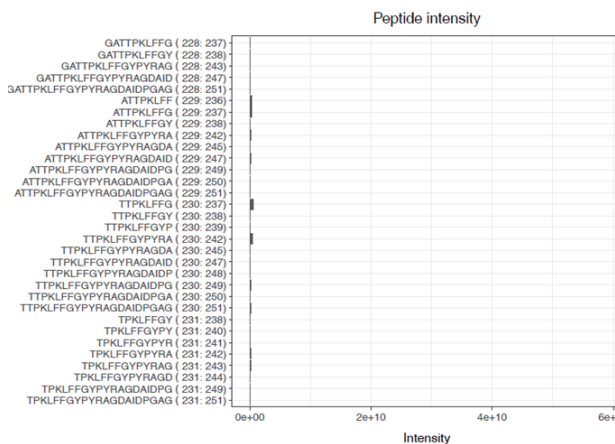
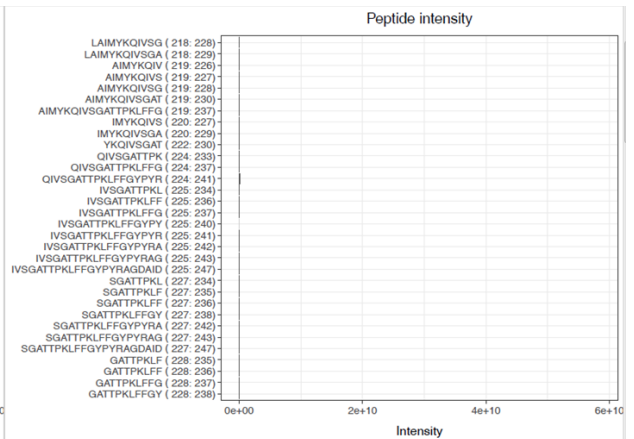
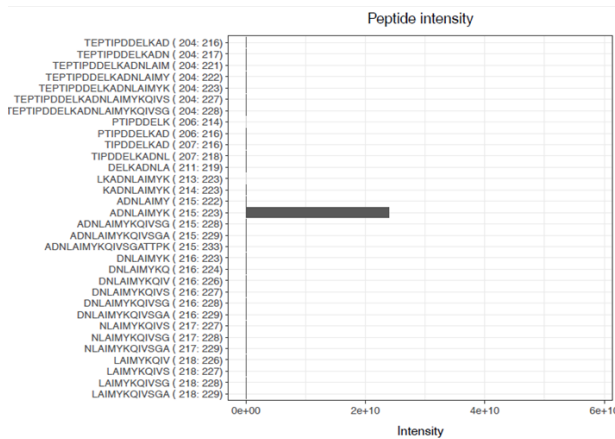
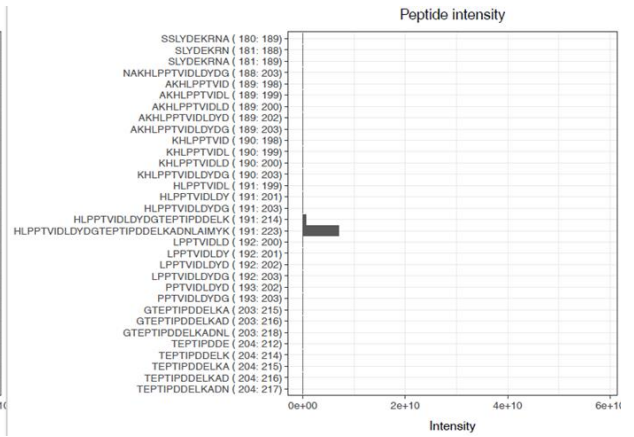
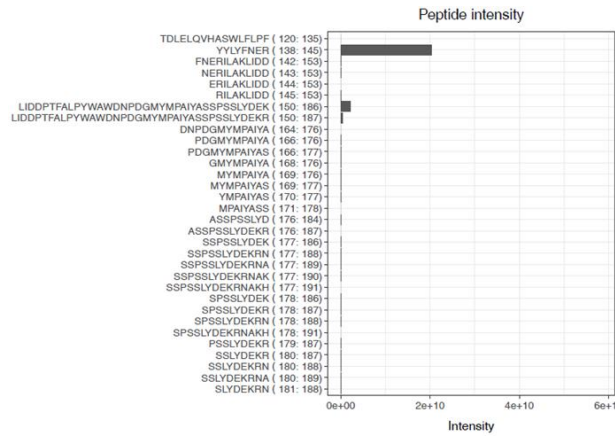
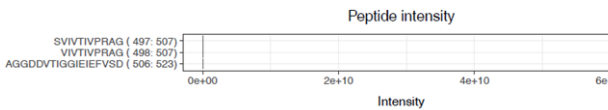
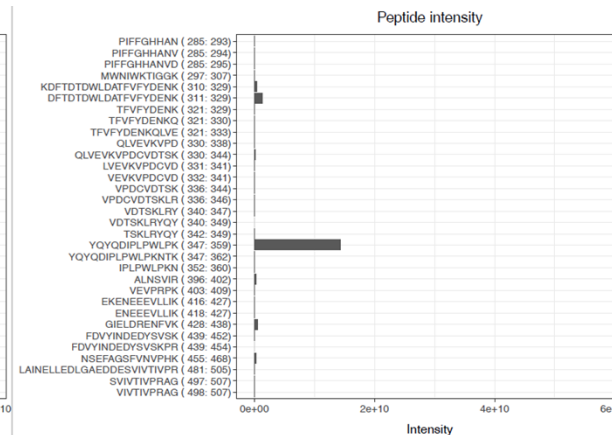
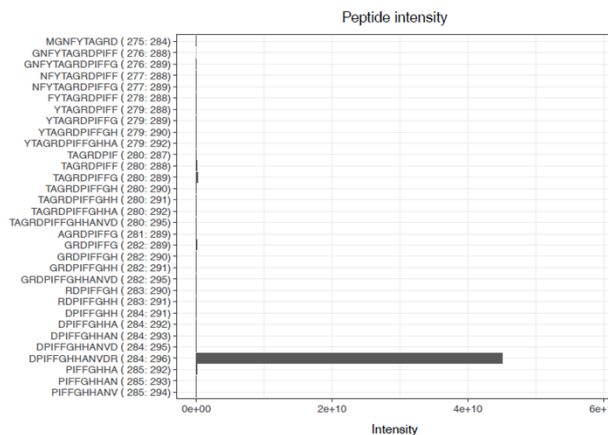
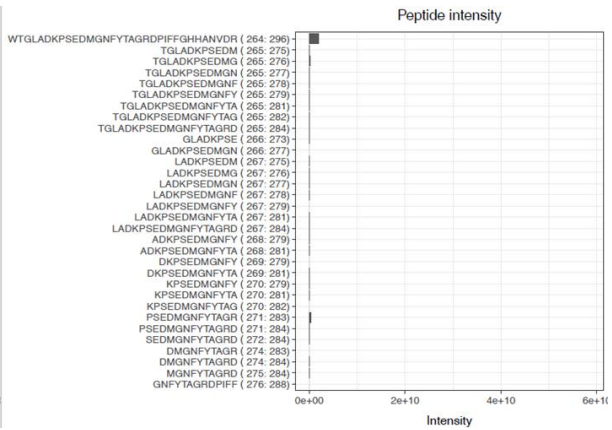
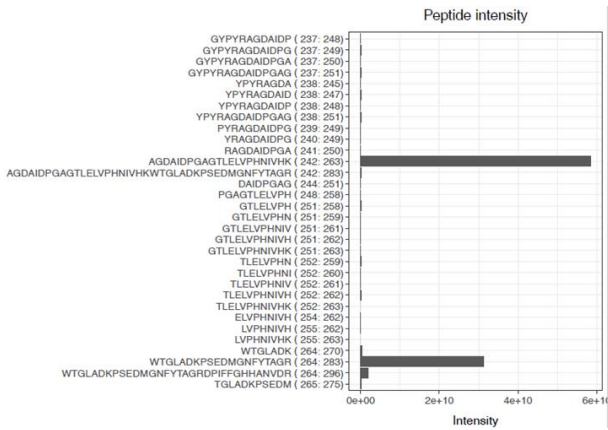


Abbildung G3: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 29 kDa Spaltpeptid. Die Verteilung der aufsummierten Intensitäten ähnelt den Ergebnissen der Analyse des 35 kDa und 30 kDa Spaltpeptids. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 12 und 32 kDa (roter Rahmen), also im Bereich der N-terminalen Domäne. Alle drei Spaltpeptide könnten enzymatisch aktiv sein.







L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 333 aligned peptides and 78.0% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	1	WSHPQFEKGADDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	81	YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLFPPHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY	160
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	161	WAWNPDGMYPPIAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYQIVSGATTPKLLFFGY	240
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRPIFFGHHANVDRMWNWIKTIGGKNRKDFD TDWLD A	320
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	321	TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	401	IRVEVPRPKSRSKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEYDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR	480
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD	523

G4: Massenspektrometrische Daten der 23 kDa SDS-Gelbande

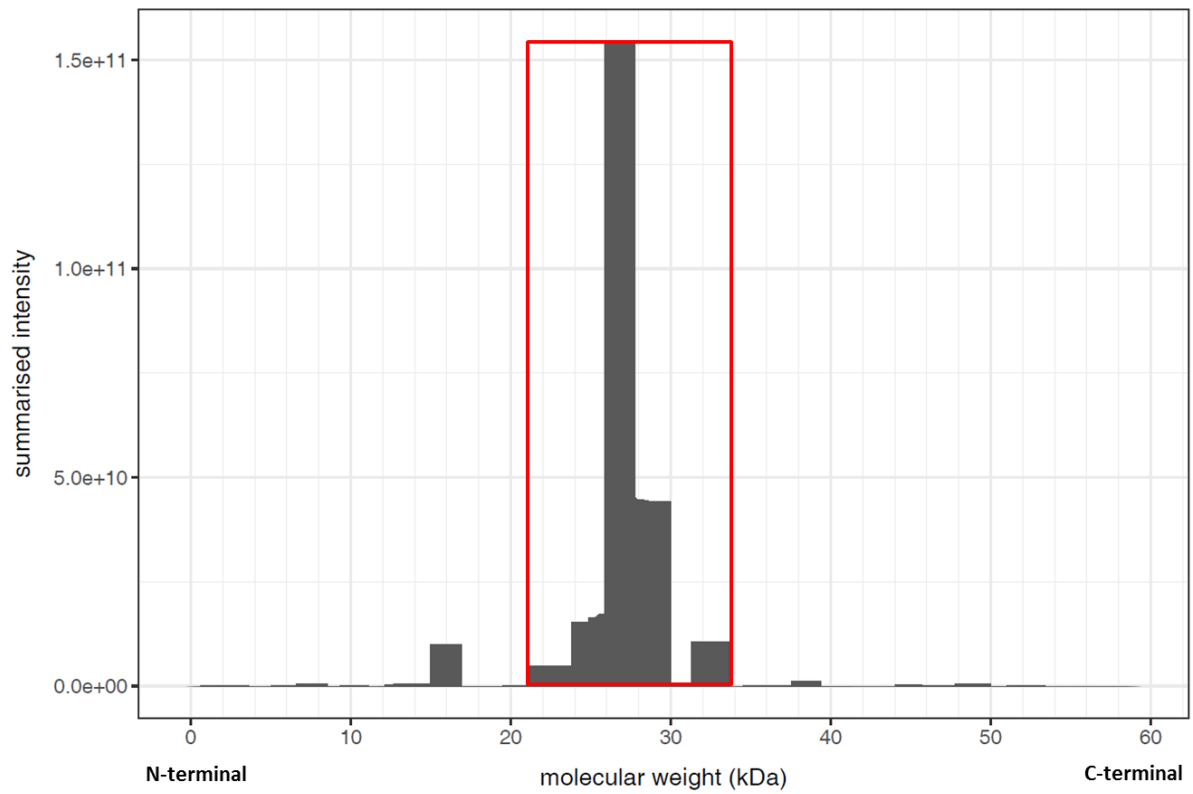
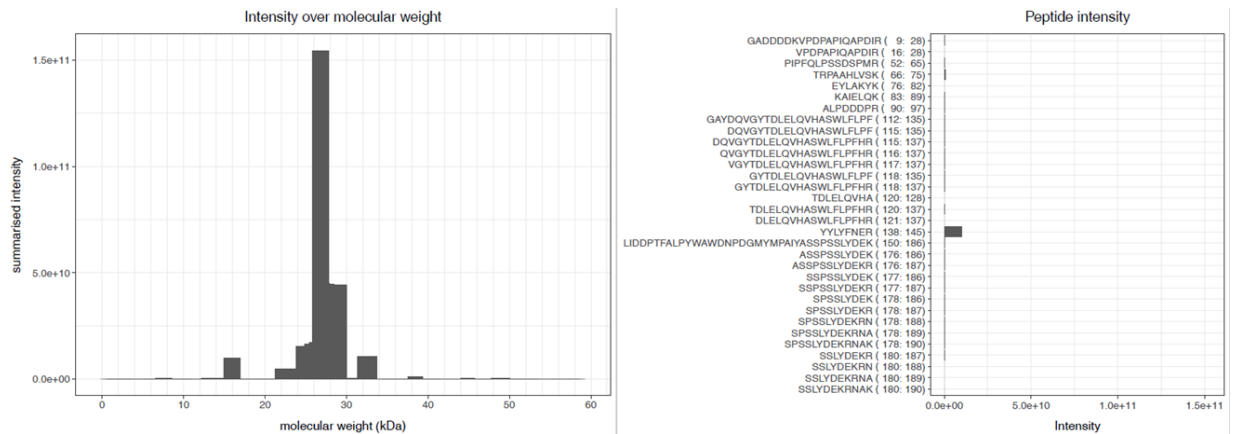
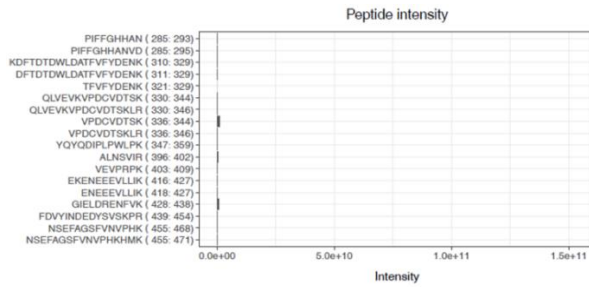
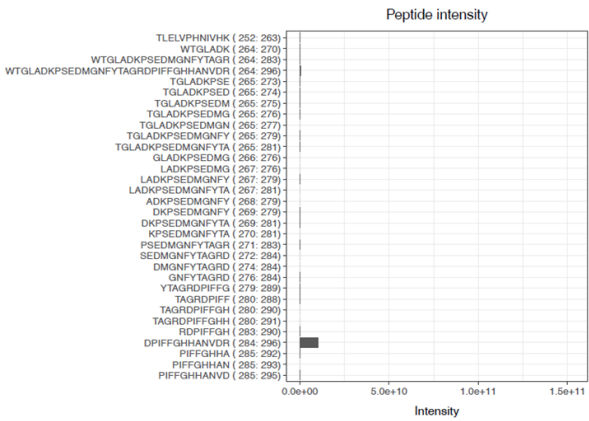
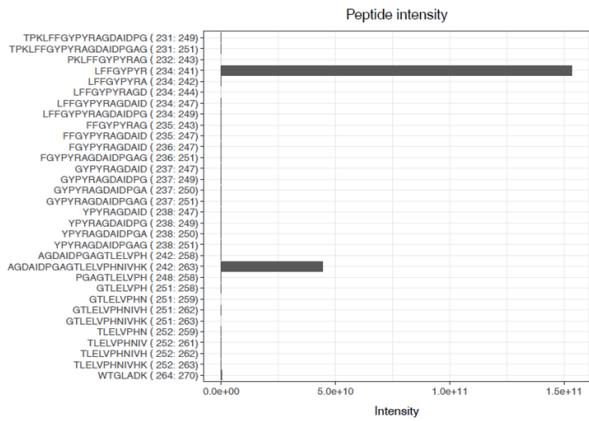
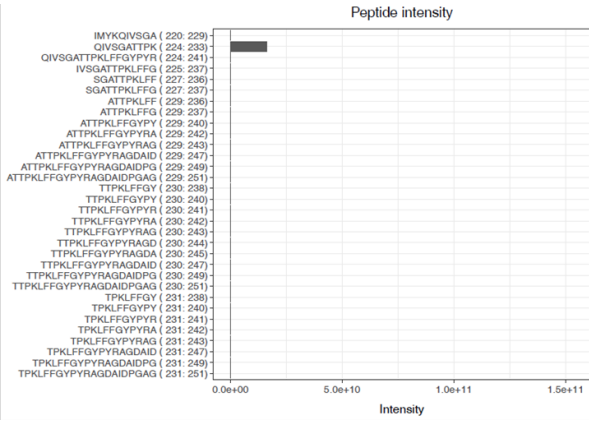
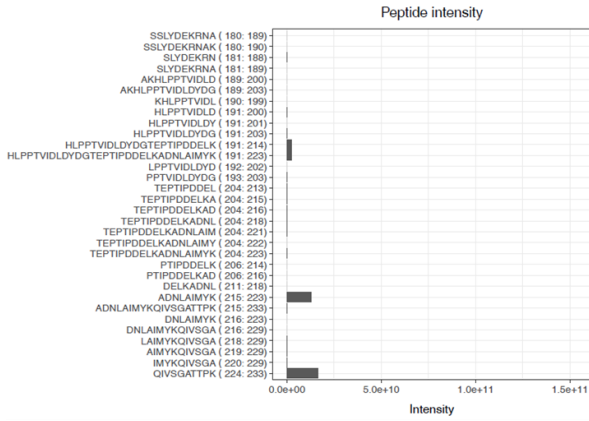


Abbildung G4: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 23 kDa Spaltpeptid. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 20 und 32 kDa (roter Rahmen), also im Bereich der N-terminalen Domäne. N- und C-terminal wurden Peptide nur in sehr geringen Intensitäten detektiert.





L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 168 aligned peptides and 70.2% sequence coverage:

```

1
L-VvPPOcs-2_pET51b identified WSHPQFEKGDADDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLSVKEYLAK 80
-----GADDKVPDPAPIQAPDIR-----PIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLSVKEYLAK

81
L-VvPPOcs-2_pET51b identified YKKAIELQKALPDDPRSFKQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY 160
YKKAIELQKALPDDPR-----GAYDQVGYTDLELQVHASWFLPFHRYLYFNER----LIDDPFALPY

161
L-VvPPOcs-2_pET51b identified WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFYGY 240
WAWNDPDMYMPAIYASSPSSLYDEKRNAKHLPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFYGY

241
L-VvPPOcs-2_pET51b identified RAGDAIDPGAGTLELVPHNVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKDFDTDWLDA 320
RAGDAIDPGAGTLELVPHNVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPPIFFGHANVDR-----KDFDTDWLDA

321
L-VvPPOcs-2_pET51b identified TFVFDENKQLVEVKVPCDVTSKLRYQYQIPLPWLKNTKAKATTTKSSKSGVAKAELPKTTISSIGDFPKALNSV 400
TFVFDENKQLVEVKVPCDVTSKLRYQYQIPLPWLK-----ALNSV

401
L-VvPPOcs-2_pET51b identified IRVEVPRPKRSRKKKEKEEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKTKTNLR 480
IRVEVPRPK-----EKENEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHK-----

481
L-VvPPOcs-2_pET51b identified LAINELLELGAEDDESIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD 523
-----LAINELLELGAEDDESIVTIVPRAGDDVTIGGIEIEFVSD-----
    
```


G5: Massenspektrometrische Daten der 18 kDa SDS-Gelbande

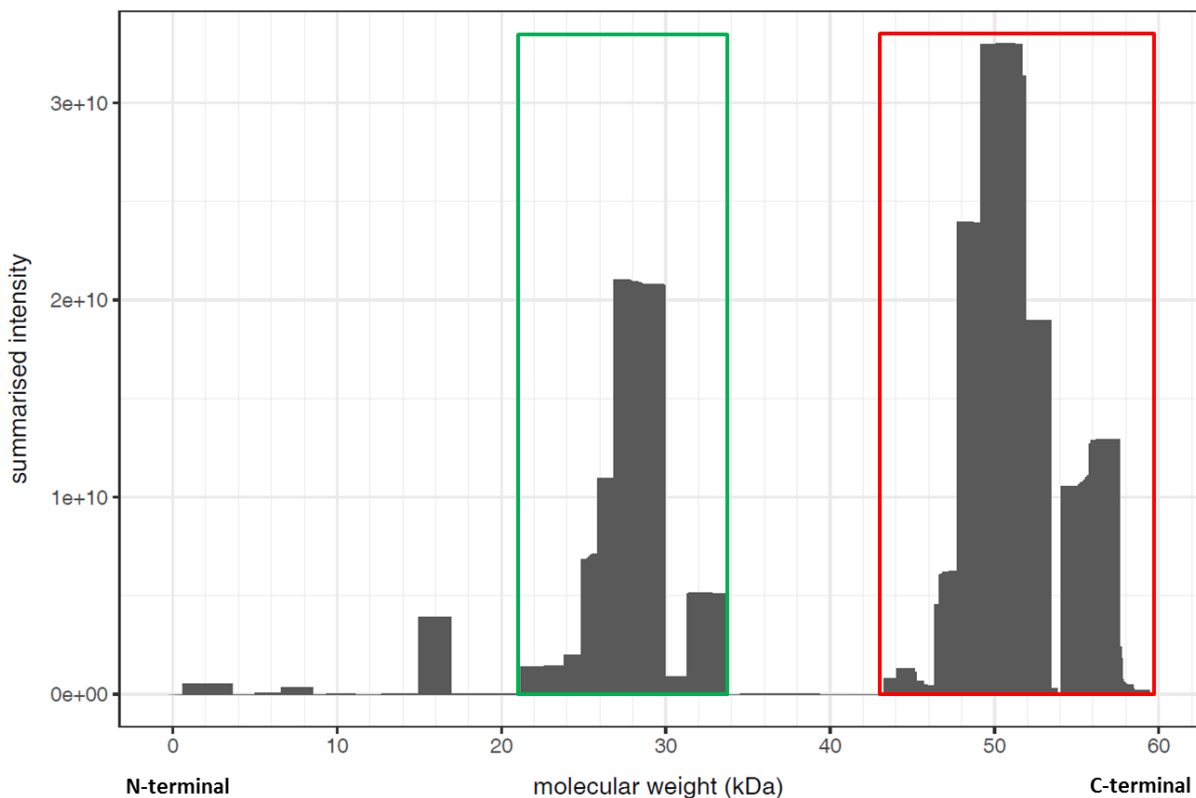
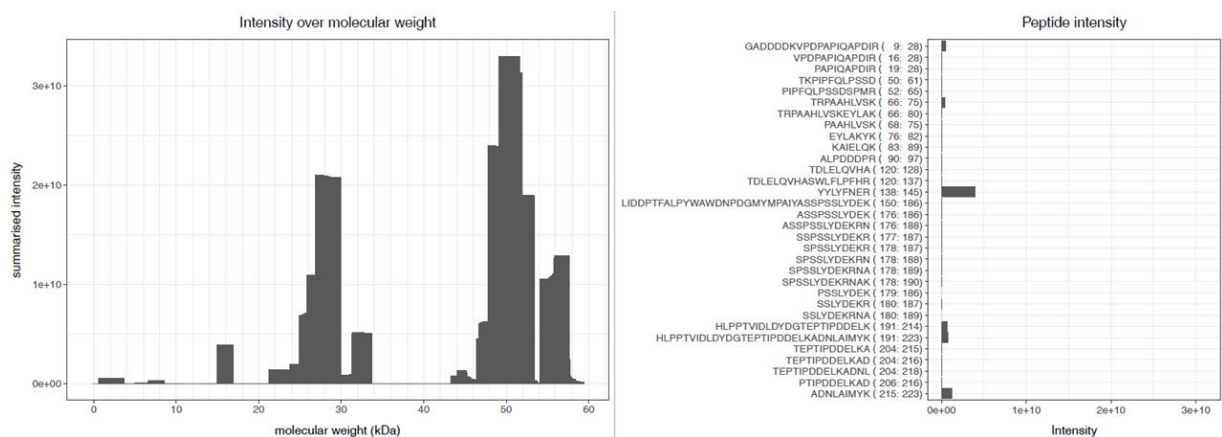
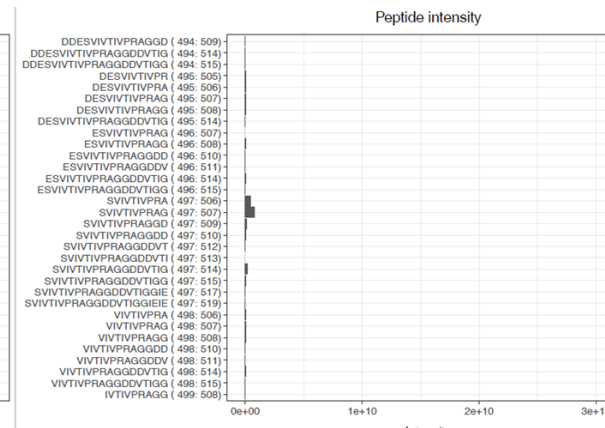
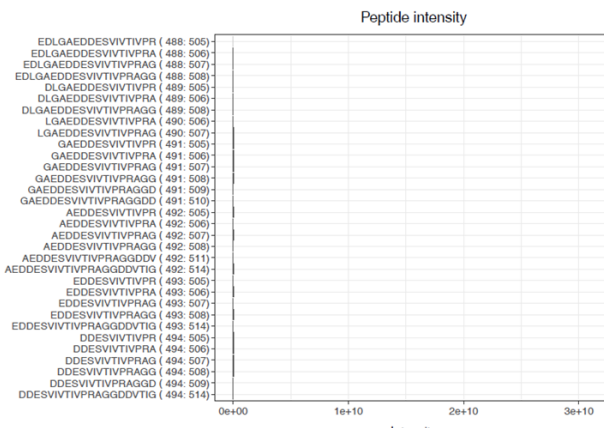
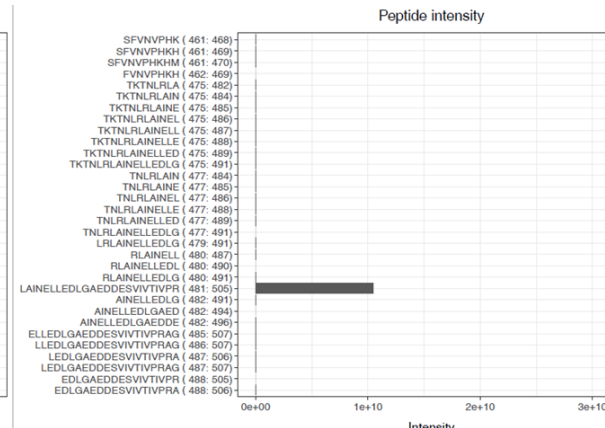
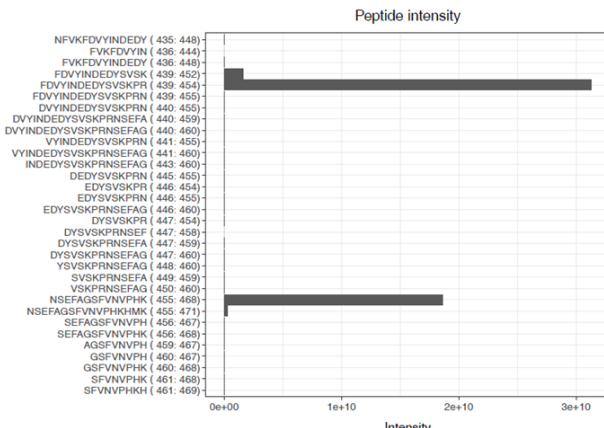
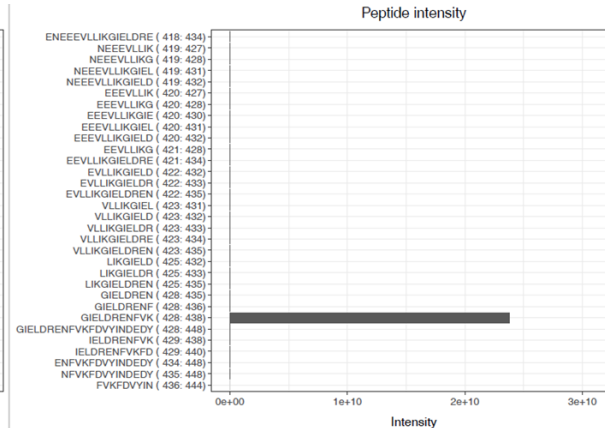
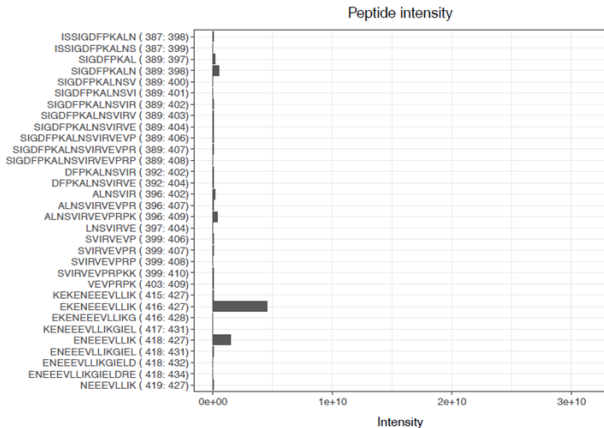
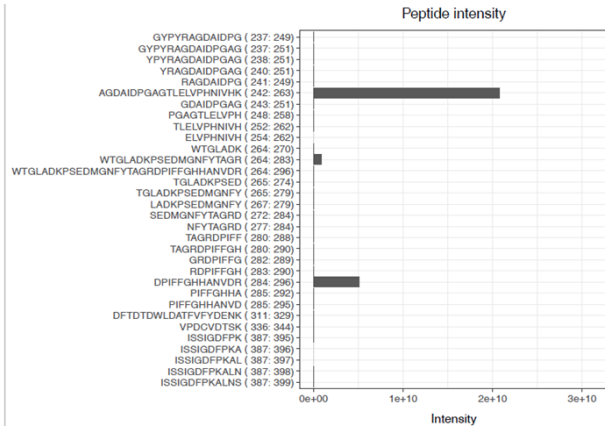
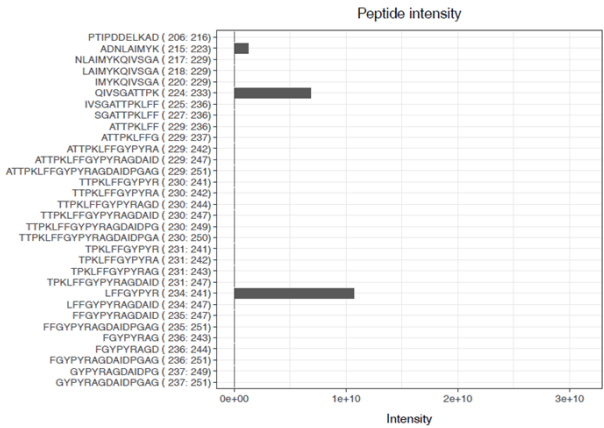
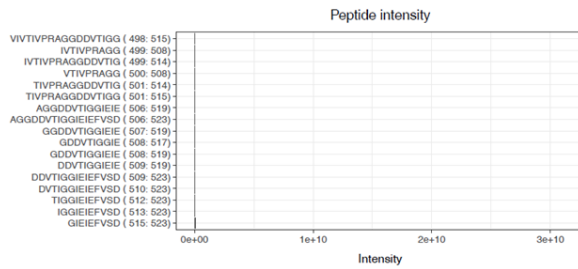


Abbildung G5: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 18 kDa Spaltpeptid. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 20 und 32 kDa (grüner Rahmen), also im Bereich der N-terminalen Domäne, und zwischen 42 und 60 kDa (roter Rahmen) im Bereich der C-terminalen Domäne. Da die Anteile der C-terminalen Domäne überwiegen, enthält das Spaltpeptid wahrscheinlich Teile des Linkerbereiches und die C-terminale Domäne.







L-VvPPOcs-2_pET51b with 523 amino acids and 287 aligned peptides and 76.3% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pET51b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
		-----GADDDDKVPDPAPIQAPDIR-----TKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	81	YKKAIELQKALPDDPRSFKQQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYLYFNERILAKLIDDPTFALPY	160
		YKKAIELQKALPDDPR-----TDLELQVHASWFLFPFHRYLYFNER----LIDDPTFALPY	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	161	WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRN AKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPK LFFGYPY	240
		WAWNDPDGMYP AIYASSPSSLYDEKRN AKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPK LFFGYPY	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDRMWN IWK TIGGKNRKDF TD TDW L D A	320
		RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSEDMGNFYTAGRDP IFFGHANVDR-----DF TD TDW L D A	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	321	TFVFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
		TFVFDENK-----VPDCVDTSK-----ISSIGDFPKALNSV	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	401	IRVEVPRPKSRSKKEKENE EEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKMKTKTNLR	480
		IRVEVPRPKK----KEKENE EEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKMK----TKTNLR	
L-VvPPOcs-2_pET51b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523
		LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	

G6: Massenspektrometrische Daten der 15 kDa SDS-Gelbande

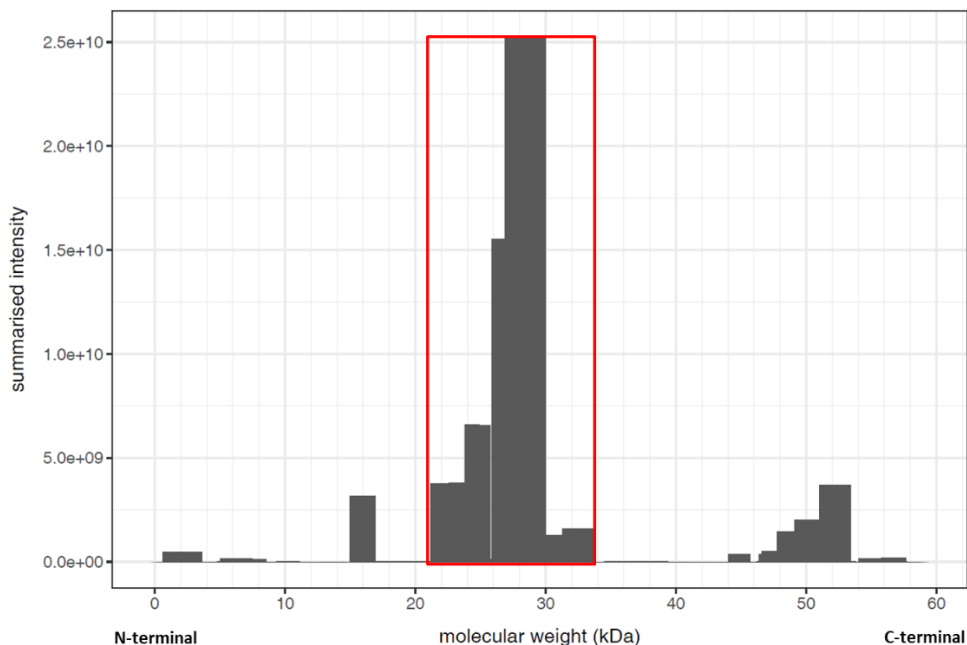
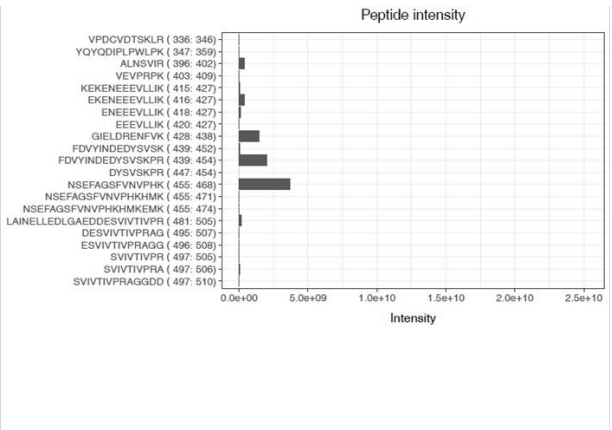
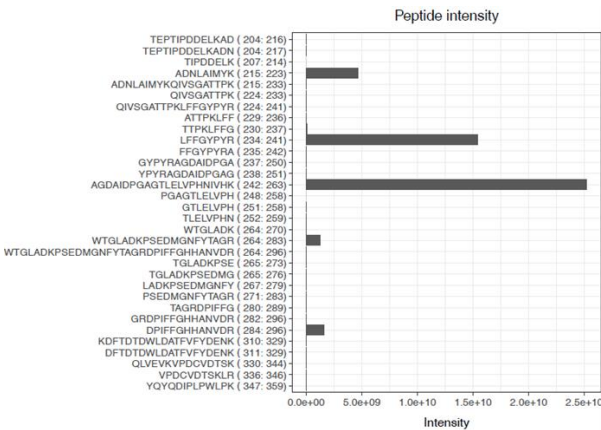
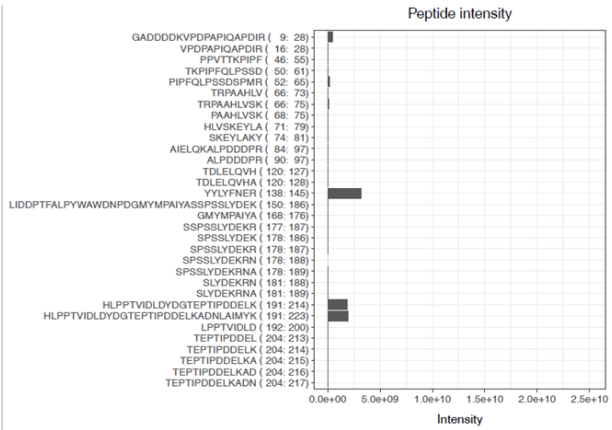
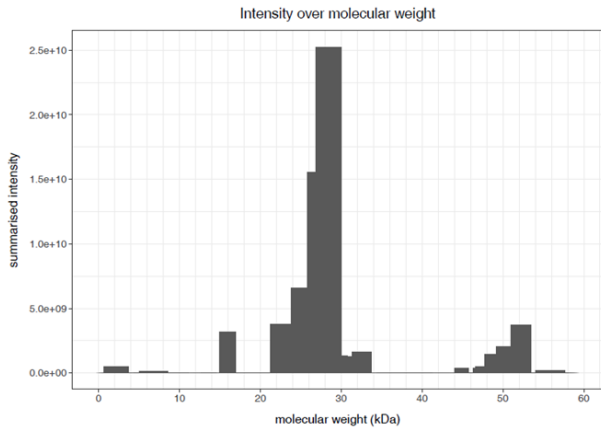


Abbildung G6: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 15 kDa Spaltpeptid. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 20 und 32 kDa (roter Rahmen), also im Bereich der N-terminalen Domäne. Dieser Bereich der N-terminalen Domäne ist zu klein, um sowohl das Cu_A - als auch das Cu_B -Zentrum vollständig zu umfassen. Dieser Abschnitt der N-terminalen Domäne ist folglich enzymatisch nicht aktiv.



L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 81 aligned peptides and 74.0% sequence coverage:

```

1
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified WSHPQFEKGADDDDKVDPAPAIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKLEYLAK 80
-----GADDDDKVDPAPAIQAPDIR-----PPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAHLVSKLEYLAK

81
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified YKKAIELQKALPDDDFR.SFKQQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWLF.PFHRYYLYFNERILAKLIDDPFTALPY 160
Y--AIELQKALPDDDFR-----TDLELQVHA-----YYLYFNER----LIDDPFTALPY

161
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified WAWNDPGMYMPAIYASSPSSLYDEKRNHLPPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY 240
WAWNDPGMYMPAIYASSPSSLYDEKRNA-HLPPTVIDLDYDGTPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY

241
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP.IFFGHANVDRMWNIVKTIIGGKRN.KDFTD.TDWLDA 320
RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDP.IFFGHANVDR-----KDFTD.TDWLDA

321
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified TFVYFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLKNTKAKAKTTTTSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV 400
TFVYFDENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLK-----ALNSV

401
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified IRVEVPRPKSR.SKKEKENEEVLLIKGIELDRENFKVFDVYINDEDYVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR 480
IRVEVPRPK-----KEKENEEVLLIKGIELDRENFKVFDVYINDEDYVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMK-----

481
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD 523
LAINELLEDLGAEDDESIVITVPRAGGDD-----
    
```


G7: Massenspektrometrische Daten der 14 kDa SDS-Gelbande

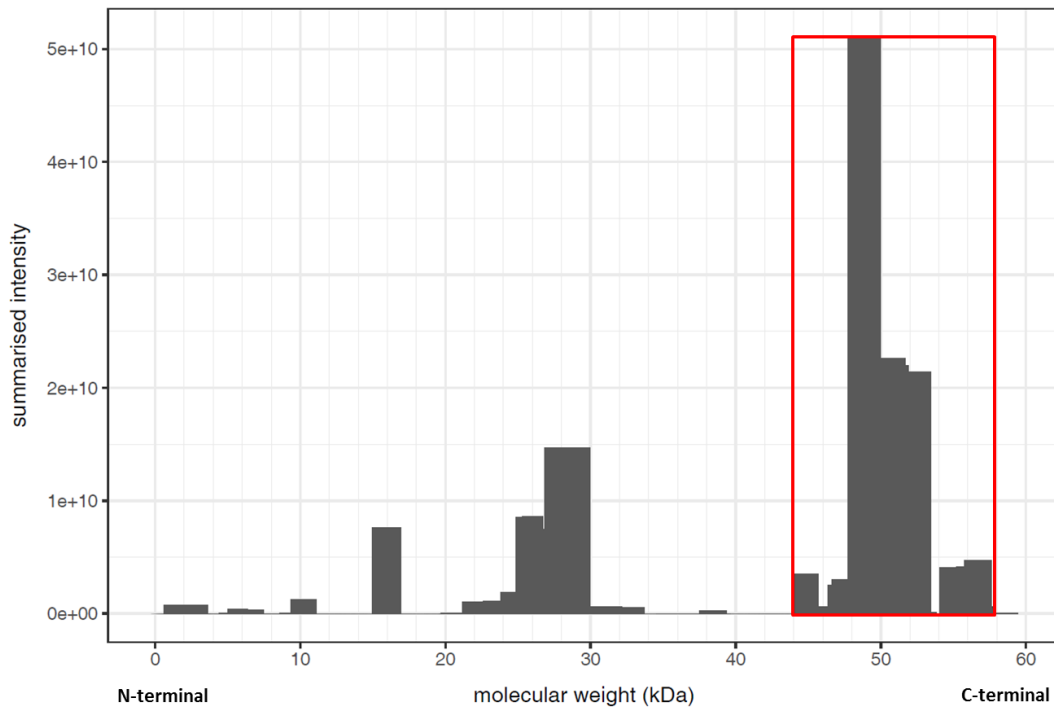
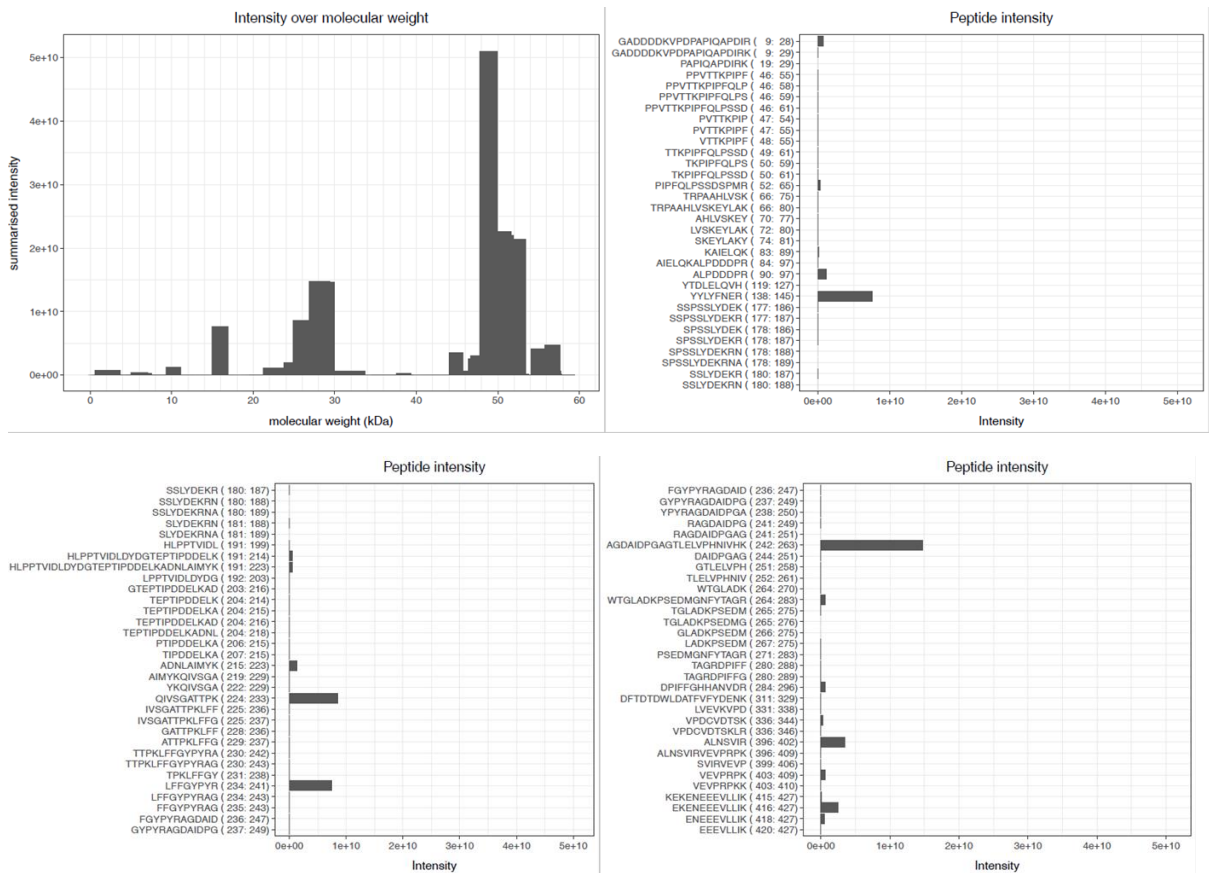
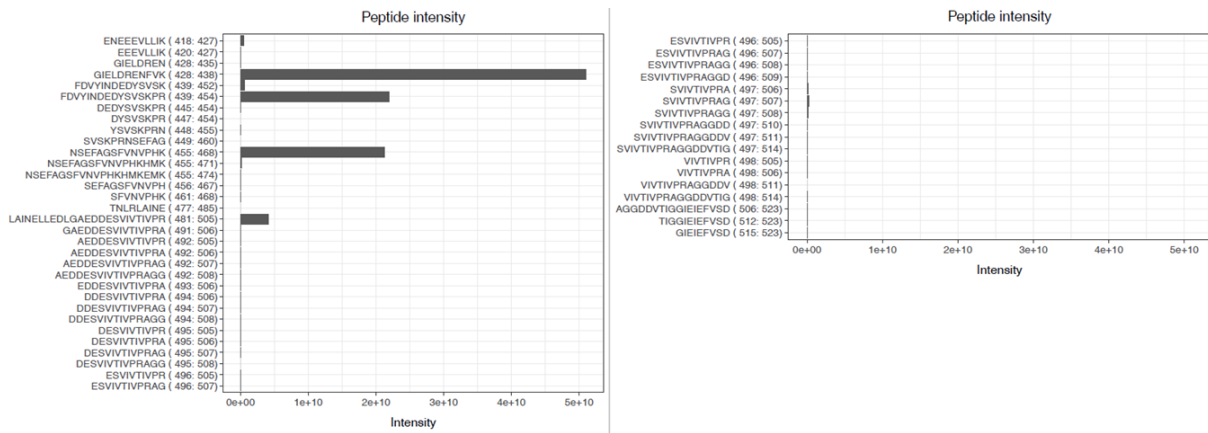


Abbildung G7: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 14 kDa Spaltpeptid. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen zwischen 44 und 58 kDa (roter Rahmen), also im Bereich der C-terminalen Domäne. Das Spaltpeptid ist somit nicht enzymatisch aktiv.





L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 137 aligned peptides and 69.8% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	1	WSHPQFEKGADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
		-----GADDDDKVPDPAPIQAPDIRK-----PPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	81	YKKAIELQKALPDDDPFSFKQANVHCAYCQGAYDQVGYTDLELQVHASWLFPPHRYLYFNERILAKLIDDPFALPY	160
		Y-KAIELQKALPDDDP-----YTDLELQVH-----YYLYFNER-----	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	161	WAWDNPDGMYPPIYASSPSSLYDEKRNKHLPTVIDLDYDTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY	240
		-----SSPSSLYDEKRNA-HLPTVIDLDYDTEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLPFFGYPY	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKFDTDTWLDA	320
		RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDR-----DFTDTWLDA	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	321	TFVFYDENKQLVEVKVPCVDTSKLRVYQYQIPLPWLKNTKAKAKTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
		TFVFYDENK-LVEVKVPCVDTSKLR-----ALNSV	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	401	IRVEVPRPKKSRSKKEKENEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMKTKTNLR	480
		IRVEVPRPKK----KEKENEEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKHKEMK--TNLR	
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523
		LAINELLEDLGAEDDESIVTIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	

G8: Massenspektrometrische Daten der 12 kDa SDS-Gelbande

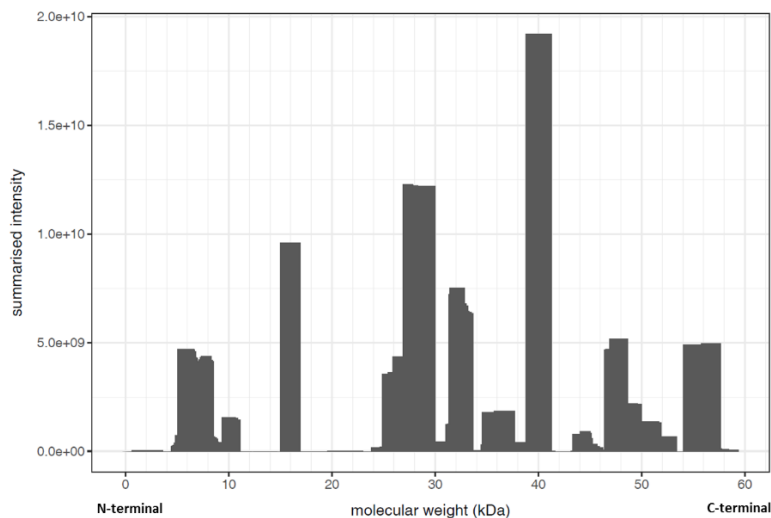
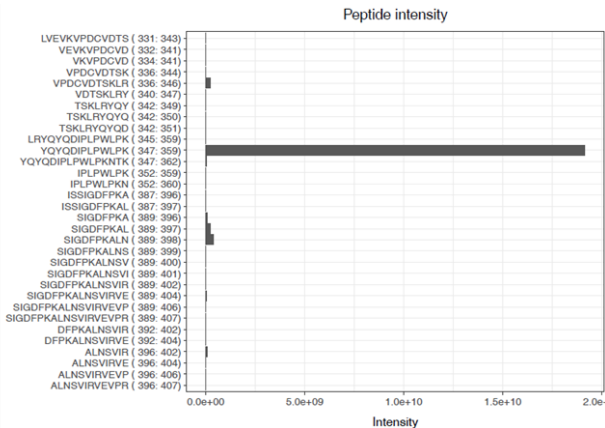
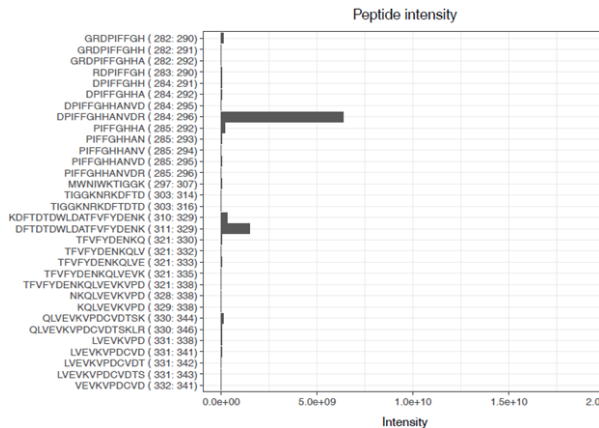
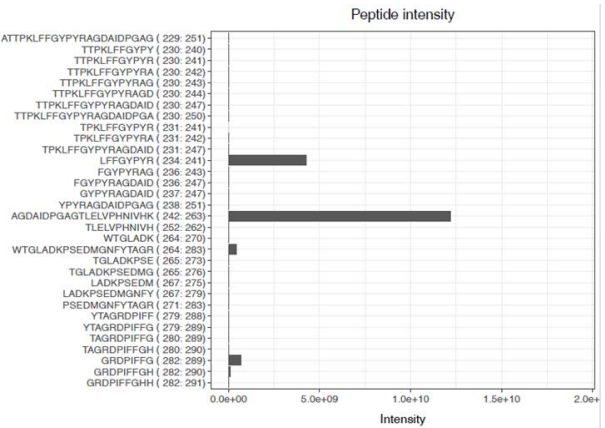
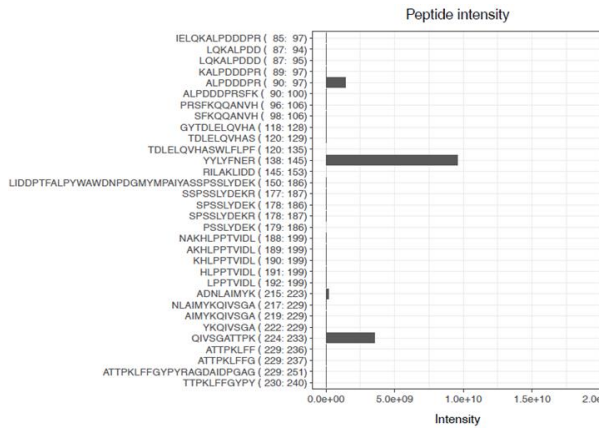
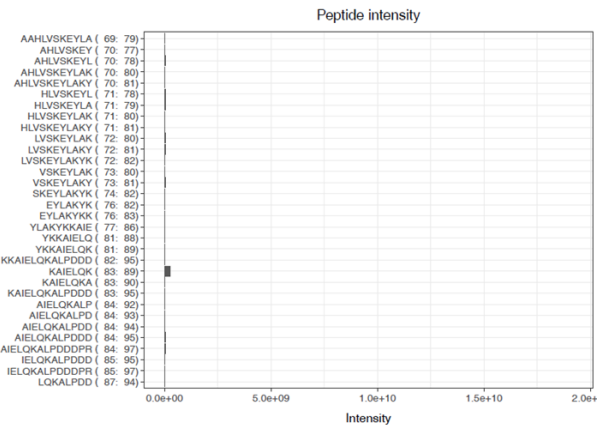
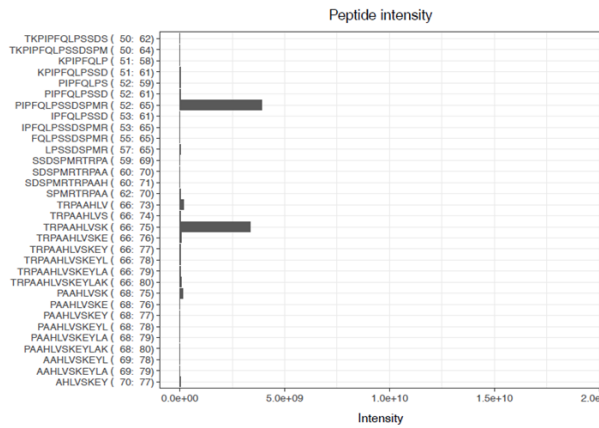
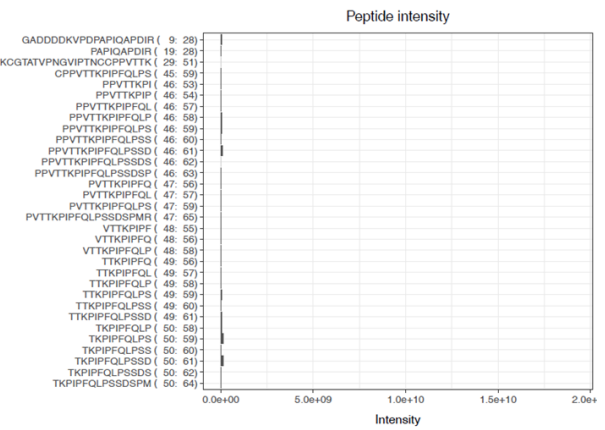
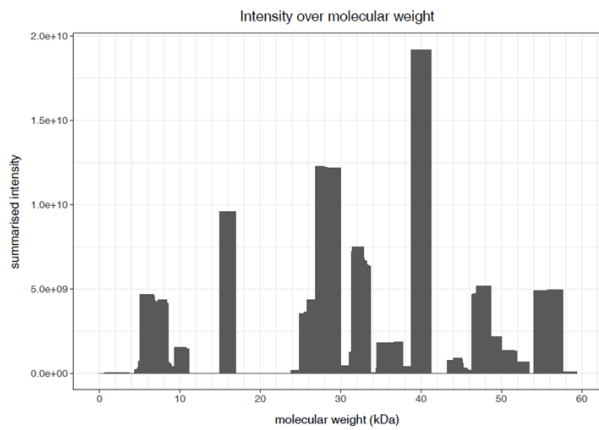
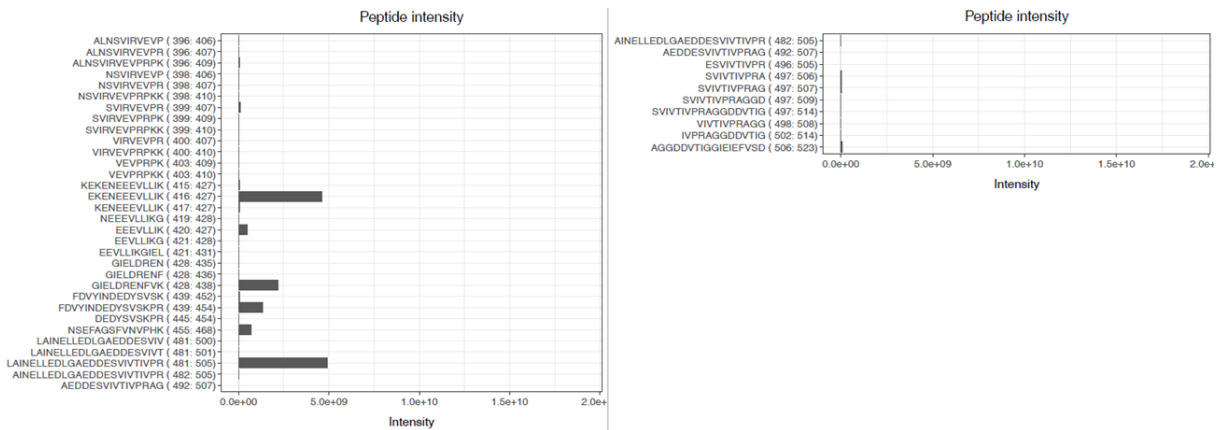


Abbildung G8: Histogramm der Messintensitäten der detektierten Peptidsequenzen für das 12 kDa Spaltpeptid. Die Maxima der aufsummierten Intensitäten liegen über den gesamten Molekulargewichtsbereich verteilt. Möglich ist, dass in dieser SDS-Gelbande unterschiedliche Abbaupeptide des L-VvPPOcs-2wt und der Spaltpeptide vorhanden sind. Aufgrund ihrer Größe und/oder der Lage in der Sequenz (C-terminale Domäne) sind diese nicht enzymatisch aktiv.





L-VvPPOcs-2_pETS1b with 523 amino acids and 250 aligned peptides and 85.5% sequence coverage:

L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	1	WSHPQFEK GADDDDKVPDPAPIQAPDIRKCGTATVPNGVIPTNCCPPVTTKPIPFQLPSSDSPMRTRPAAHLVSKEYLAK	80
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	81	YKKAIELQKALPDDDPKSFKQQANVHCAYCQAYDQVGYTDLELQVHASWFLFPFHRYYLYFNERILAKLIDDPFALPY	160
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	161	WAWDNPDGMYPPIAYASSPSSLYDEKRNAKHL PPTVIDLDYDGEPTIPDDELKADNLAIMYKQIVSGATTPKLFFGYPY	240
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	241	RAGDAIDPGAGTLELVPHNIVHKWTGLADKPSSEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRMWNWIKTIGGKNRKDFTD TDWLDA	320
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	321	TFVFDYENKQLVEVKVPDCVDTSKLRYQYQDIPLPWLPKNTKAKAKTTTTKSSKSGVAKAAELPKTTISSIGDFPKALNSV	400
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	401	IRVEVPRPKKSRKKEKENEVEVLLIKGIELDRENFVKFDVYINDEEDYSVSKPRNSEFAGSFVNVPHKMKEMKTKTNLR	480
L-VvPPOcs-2_pETS1b identified	481	LAINELLEDLGAEDDESIVIVPRAGGDDVTIGGIEIEFVSD	523

Anhang H: Bestimmung der Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte

Der L-VvPPOcs-2wt wurde mittels 1,5 mM SDS aktiviert. Eine Aktivierung mit Trypsin führt zu keiner Veränderung der λ_{max} (Panagos, 2016).

Die photometrischen Messungen wurden in einem Wellenlängenbereich $\lambda = 350 - 700$ nm durchgeführt und über 60 min alle 2 min ein Spektrum aufgenommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur ausgewählte Spektren gezeigt, die gegen das Substrat-Puffer-Spektrum korrigiert sind (Abb. 56). In den folgenden Experimenten wurde der L-VvPPOcs-2wt mittels 1,5 mM SDS aktiviert. Eine Aktivierung mit Trypsin führt zu keiner Veränderung der λ_{max} (Panagos, 2016).

4-Methylcatechol (4-MC)

Das Absorptionsmaximum des aus 4-MC entstehenden Chinons liegt bei $\lambda_{max} = 405$ nm (Abb. 56 A). Dies bestätigt Referenzwerte (Dirks-Hofmeister et al., 2014). Der Umsatz des 4-MC durch den L-VvPPOcs-2wt beginnt schnell und die 50 % des Absorptionsmaximums (0,65) sind nach 1 min erreicht. Die folgenden Absorptionswerte sinken, was wahrscheinlich auf eine schnelle autokatalytische Weiterreaktion der entstandenen Chinone zurückzuführen ist.

Pyro-Catechol (CAT)

Das Absorptionsmaximum des zu CAT korrespondierenden Chinons absorbiert zu Beginn der Reaktion bei $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ (Abb. H1). Nach ca. 5 min kommt es zu einer Rechtsverschiebung des Spektrums, so dass λ_{\max} nach 21 min Reaktionszeit bei $\lambda_{\max'} = 415 \text{ nm}$ liegt. Da der Umsatz von CAT in einer schnellen Reaktion verläuft und zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit für die Ermittlung der enzymatischen Parameter die erste Minute der Reaktion von Interesse ist, wird $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ für alle weiteren Experimente verwendet, was Literaturwerte bestätigt (Dirks-Hofmeister et al., 2014).

Ein Nebenpeak bei ca. $\lambda = 370 \text{ nm}$ ist vermutlich auf ein Artefakt am Spektrometer zurückzuführen und hat keinen Einfluss auf die Absorption bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ (Daten nicht gezeigt).

Eine autokatalytische Weiterreaktion des gebildeten Chinons (Rückgang der Absorptionswerte) ist bis $t = 21 \text{ min}$ nicht zu beobachten, was auf die Bildung eines stabilen Produktes hinweist (vgl. 4-MC).

Dopamin (DA)

Der Umsatz von DA durch den L-VvPPOcs-2wt führt zur Bildung eines Chinons, das bei $\lambda_{\max} = 475 \text{ nm}$ absorbiert (Abb. H1 C). Diese Wellenlänge wurde zur Messung der Enzymkinetiken appliziert (Kap. 3.5.4). Innerhalb 1 h Reaktionszeit wird kein Rückgang der Absorptionswerte dokumentiert, so dass auf die Bildung eines stabilen Reaktionsproduktes geschlossen werden kann (vgl. 4-MC).

In der Literatur ist λ_{\max} des entstehenden Chinons meist bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ beschrieben (Muñoz et al., 2006), was wahrscheinlich auf andere Versuchsbedingungen rückführbar ist.

p-Tyrosol (p-Tyr)

Das Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ (Abb. H1 D). In der Literatur wurde nur ein Referenzwert gefunden, der $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ angibt (Ortiz-Ruiz et al., 2015) und bei pH 7 ermittelt wurde. Möglicherweise wird bei dem in diesen Experimenten verwendeten pH-Wert von 5,5 ein anderes Reaktionsprodukt stabilisiert, welches bei anderer Wellenlänge absorbiert. Für die Messung der Enzymkinetik wurde der ermittelte Wert von $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ verwendet.

Der maximale Absorptionswert beträgt trotz einer Enzymkonzentration von $c(\text{L-VvPPOcs-2wt}) = 3,2 \mu\text{M}$ (vgl. Umsetzung von Diphenolen: $c(\text{L-VvPPOcs-2wt}) = 0,8 \mu\text{M}$) nach ca. 1 h Reaktionszeit nur 0,25, was auf einen langsameren Umsatz von p-Tyr durch den L-VvPPOcs-2wt hinweist.

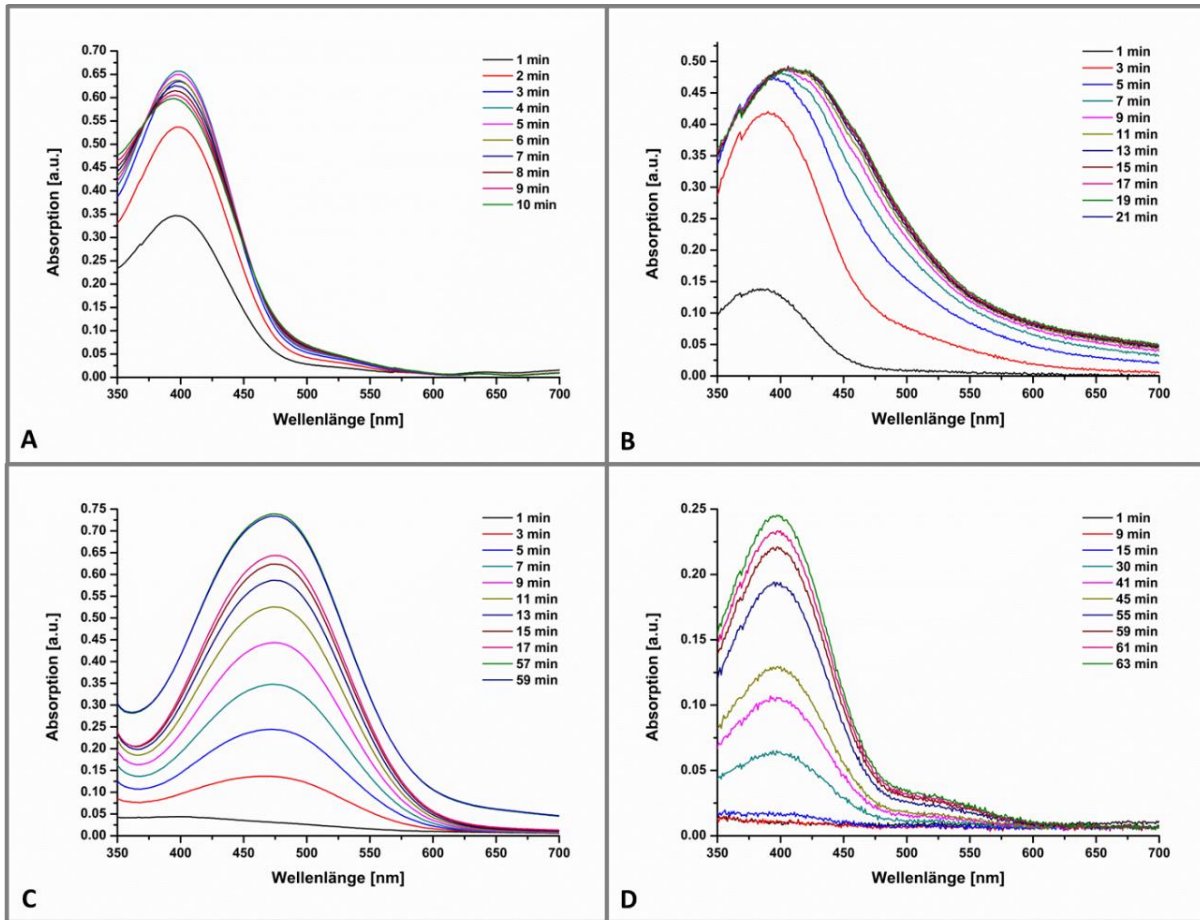
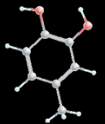
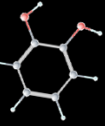
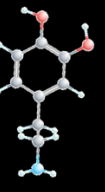
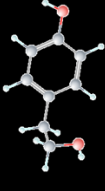


Abbildung H1: Bestimmung der Absorptionsmaxima λ_{max} der zur 4-MC, DA, CAT und p-Tyr korrespondieren Chinone nach Umsatz durch den L-VvPPOcs-2wt. Die Enzymkonzentration betrug $0,8 \mu\text{M}$ (Ausnahme: Umsatz von p-Tyr D: $c(\text{L-VvPPOcs-2wt}) = 3,2 \mu\text{M}$). Aktivierung des L-VvPPOcs-2wt mit $1,5 \text{ mM}$ SDS. $\text{pH} = 5,5$, Die Messtemperatur betrug $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Anhang I: Zusammenfassung aller ermittelten enzymatischen Parameter

Substrat	Enzymatischer Parameter	L-VvPPOcs-2wt		L-VvPPOcs-2-F259L		L-VvPPOcs-2-F259G	
		Aktivator		Aktivator		Aktivator	
		SDS	Trypsin	SDS	Trypsin	SDS	Trypsin
 4-MC	K_M [mM]	8,6 ± 0,9	4,7 ± 0,3	10,8 ± 1,5	1,8 ± 0,1	5,2 ± 0,5	3,7 ± 0,5
	v_{max} [dOD /min]	0,60 ± 0,03	0,58 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,017 ± 0,001	0,21 ± 0,01
	v_{max} [μM /min]	550,5 ± 27,5	532,1 ± 9,2	266,1 ± 18,3	385,3 ± 9,2	18,3 ± 0,9	192,7 ± 9,2
	k_{cat} [1/s]	11,5 ± 0,6	11,1 ± 0,2	5,5 ± 0,4	8,0 ± 0,2	0,38 ± 0,02	4,0 ± 0,2
	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	1,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	4,4 ± 0,3	0,08 ± 0,01	1,1 ± 0,2
 CAT	K_M [mM]	14,4 ± 1,9	12,2 ± 0,9	9,4 ± 1,0	11,9 ± 1,0	13,8 ± 1,3	9,2 ± 0,6
	v_{max} [dOD /min]	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,075 ± 0,003	0,42 ± 0,01	0,016 ± 0,001	0,29 ± 0,01
	v_{max} [μM /min]	142,0 ± 8,4	208,9 ± 8,4	58,5 ± 2,5	350,9 ± 8,4	16,7 ± 0,8	242,3 ± 5,8
	k_{cat} [1/s]	3,0 ± 0,2	4,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	7,3 ± 0,2	0,35 ± 0,02	5,0 ± 0,1
	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,025 ± 0,002	0,54 ± 0,03
 DA	K_M [mM]	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,2	4,8 ± 0,5	3,5 ± 0,4	21,7 ± 2,0	5,9 ± 0,4
	v_{max} [dOD /min]	0,224 ± 0,004	0,082 ± 0,002	0,022 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,0092 ± 0,0004	0,051 ± 0,001
	v_{max} [μM /min]	66,7 ± 1,2	24,2 ± 0,6	6,1 ± 0,3	9,1 ± 0,3	3,0 ± 0,1	15,2 ± 0,3
	k_{cat} [1/s]	1,39 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,063 ± 0,002	0,32 ± 0,01
	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,37 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,027 ± 0,003	0,054 ± 0,008	0,0029 ± 0,0005	0,054 ± 0,004
 p-Tyr	K_M [mM]	2,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	3,2 ± 0,8	1,1 ± 0,2	-	0,9 ± 0,07
	v_{max} [dOD /min]	0,0289 ± 0,0001	0,0176 ± 0,0011	0,0085 ± 0,0001	0,0087 ± 0,0004	-	0,0138 ± 0,0003
	v_{max} [μM /min]	30,38 ± 1,12	18,55 ± 1,14	8,96 ± 0,84	9,17 ± 0,42	-	14,51 ± 0,32
	k_{cat} [1/s]	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,047 ± 0,004	0,048 ± 0,002	-	0,076 ± 0,002
	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	0,0791 ± 0,0093	0,1380 ± 0,0418	0,0146 ± 0,0039	0,0435 ± 0,0081	-	0,0839 ± 0,0069

Anhang J: Der Buchstabencode der Aminosäuren

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

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Mainz, den

Katharina Ludwig