

**Klonierung, heterologe Expression, Kristallisation und
Struktur der Perakin-Reduktase aus
*Rauvolfia serpentina***

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Cindy Rosenthal
geb. am 20.03.1977 in Bad Saarow

Mainz, 2006

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
1	Einleitung	3
1.1	Alkaloide - Pflanzliche Sekundärstoffe als Signale, Toxine und Pharmazeutika	3
1.2	Enzyme der Ajmalinbiosynthese in <i>R. serpentina</i>	5
1.3	Bisheriger Kenntnisstand zur PR	10
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Geräte	12
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Enzyme und Isolierungskits	14
2.4	Biologisches Material	15
2.4.1	Pflanzliche Zellsuspensionskulturen	15
2.4.2	Bakterien	16
2.4.2.1	Bakterienstämme	16
2.4.2.2	Anzucht von Bakterien	16
2.4.2.3	Herstellung kompetenter Bakterien	17
2.4.2.4	Transformation kompetenter Bakterien	18
2.5	Plasmide	19
2.6	Oligonukleotide	19
2.7	Molekularbiologische Methoden	20
2.7.1	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.7.3	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	22
2.7.4	DNA-Sequenzierung	22
2.7.5	Präparation von reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .	22
2.7.6	Mini-Präparation	22
2.7.7	Enzymatische Modifikationen von DNA-Fragmenten	23

2.7.8	RNA-Präparation aus Zellsuspensionskulturen	23
2.7.9	cDNA-Synthese	24
2.7.10	Formaldehyd-Gelelektrophorese	25
2.8	Proteinchemische Methoden	26
2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.8.2	Bestimmung des N-terminalen His-tags	27
2.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.8.4	Proteinpräparation	28
2.8.4.1	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>E. coli</i> .	28
2.8.4.2	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus Zellsuspensionskulturen	28
2.8.4.3	Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	29
2.8.4.4	Größenausschlußchromatographie	29
2.8.4.5	Dialyse und Konzentrierung von Proteinlösungen	30
2.8.4.6	Enzymatische Abspaltung des His-tags mit DAPase	30
2.8.4.7	Reduktive Methylierung	31
2.8.5	Enzymaktivitätstests per HPLC	31
2.8.6	Enzymaktivitätstests über NADPH ₂ -Abnahme	32
2.9	Syntheseverfahren	33
2.9.1	Synthese von 21-Hydroxyraumaclin	33
2.9.2	Synthese von Raucaffrinolin	33
2.10	Dünnschichtchromatographie	33
2.11	Massenspektrometrie	34
2.12	Kristallographische Arbeiten	35
2.12.1	Kristallisation der PR	35
2.12.2	Datensammlung	35
2.12.3	Herstellung von Schwermetallatomderivaten	36
2.12.4	Strukturaufklärung	36
2.13	Datenbankenrecherche	37
3	Ergebnisse	38
3.1	RNA-Isolierung aus <i>R. serpentina</i> und cDNA-Synthese	38
3.2	PCR mit degenerierten Primern	38
3.3	Ermittlung des Vollängenklones mit RACE-PCR	40

3.4	Expressionsversuche	43
3.5	Enzymaktivitätstest mit Perakin	45
3.6	Identifizierung des Endproduktes über DC und MS	46
3.7	Stabilität der PR	47
3.8	Mutationsexperimente	48
3.9	Sequenzalignment	49
3.10	Proteincharakterisierung	51
3.10.1	Kinetik	51
3.10.2	Bestimmung der Proteingröße über Größenausschlußchromatographie	52
3.10.3	Temperaturoptimum	53
3.10.4	pH-Optimum	54
3.10.5	Substratspezifität	55
3.10.6	Cosubstratspezifität	58
3.10.7	Metallionenabhängigkeit	58
3.11	Kristallisation	59
3.11.1	Versuche zur Kristallisation der PR	59
3.11.2	Einfluß der reduktiven Methylierung auf die Enzymaktivität	62
3.11.3	N- und C-Terminus des kristallisierten Proteinfragmentes	63
3.12	Diffractionsexperimente	64
3.13	Strukturaufklärung der PR	66
3.14	NADPH ₂ -Bindungsstelle	68
4	Diskussion	70
4.1	Klonierung, Expression und Reinigung der PR	70
4.2	Biochemische Charakterisierung der PR	72
4.3	Einfluss der reduktiven Methylierung auf die Kristallbildung	73
4.4	Einordnung der PR in die Superfamilie der AKRs	75
4.5	Struktur der AKRs	79
4.6	Strukturelle Besonderheiten der PR	82
4.7	Ausblick	84
	Literaturverzeichnis	86
	Abbildungsverzeichnis	95

Tabellenverzeichnis	97
Abkürzungsverzeichnis	98
Aminosäurecode	100
Anhang	101

Zusammenfassung

Die Perakin-Reduktase (PR) ist ein hochspezifisches Enzym aus dem Alkaloidstoffwechsel in *Rauvolfia serpentina*, dessen enzymatischer und molekularer Reaktionsmechanismus noch immer unbekannt ist. Um die dreidimensionale Struktur der PR aufzuklären, wurde in der vorliegenden Arbeit das für die PR codierende Gen erstmals identifiziert, exprimiert und das Genprodukt zur Kristallisation gebracht. Grundlage dafür waren frühere Untersuchungen, in denen die PR aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* gereinigt, isoliert und Peptidfragmente sequenziert wurden.

Aus der Suspensionskultur von *R. serpentina* Br wurde die zelluläre Gesamt-RNA isoliert und komplementäre DNA synthetisiert. Mittels PCR mit degenerierten Oligonukleotiden konnte das PR-Gen gefunden und die codierende Region sequenziert werden. Das PR-Gen codiert für ein 337 Aminosäure langes, in Lösung monomer vorliegendes Protein mit einem Molekulargewicht von 37,2 kDa. Ferner wurde das reine Enzym charakterisiert und kristallisiert. Dazu wurde der Volllängenklon rekombinant in *E. coli* M15-Zellen exprimiert. Das für die Reinigung entwickelte Präparationsprotokoll umfasste mehrere Schritte. Nach Aufschluß des Bakterienpellets wurde das im Bakterienrohextrakt befindliche Enzym über Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Matrix gebunden. Die Elution von der Säule mit 250 mM Imidazol lieferte 10 mg homogenes Protein pro Liter Bakterienkultur. Nach Expression in *E. coli* wurde im Enzymassay die NADPH₂-abhängige Reduktion von Perakin in Raucaffrinolin bestätigt und das Endprodukt massenspektrometrisch identifiziert. Im Substrattest zeigte sich, dass die PR neben Perakin auch Zimtaldehyd reduziert. Entgegen Ergebnissen früherer Arbeiten konnte eine 21-Hydroxyraumaclin-Aktivität nicht gefunden werden.

Die Umwandlung von Vomilenin kann im Verlauf der Ajmalin-Biosynthese auf hauptsächlich drei verschiedenen Wegen erfolgen. Die Regulation an diesem Verzweigungspunkt erfolgt größtenteils über die Bildung von Raucaffricin. Daneben ist die Isomerisierung des Vomilenins zu Perakin ein weiteres Nebenprodukt der Regulation der Ajmalinproduktion.

Aus Sequenzalignments in Datenbanken mit anderen Proteinen wurde geschlossen, dass die PR zu der Superfamilie der Aldo/Keto-Reduktasen (AKR) gehört. Mit 72% Sequenzidentität zu putativen AKRs und 31% Sequenzidentität zu bereits kristallisierten AKRs ist die PR innerhalb dieser Familie die einzige pflanzliche AKR, die funktionell aktiv exprimiert, kristallisiert sowie strukturell charakterisiert wurde.

Kristallisationsversuche mit der homogenen PR wurden mit unterschiedlichen Screeningkits nach der Methode der Dampfdiffusion im hängenden und sitzenden Tropfen bei 25°C und 4°C durchgeführt. Dazu wurde das Protein gegen 10 mM TRIS-HCl, 1 mM DTT und 1 mM EDTA (pH 7,5) dialysiert und eine Proteinkonzentration von 3-20 mg/ml eingestellt. Trotz intensiv durchgeführter Kristallisationsversuche wurden zunächst keine Proteinkristalle beobachtet. Nach reduktiver Methylierung der freien Aminogruppen, bei der die Oberflächenspannung des Proteins beeinflusst wurde, konnte eine Kristallbildung initiiert werden. Obwohl nach dieser chemischen Modifikation nur noch ca. 15% Enzymaktivität vorhanden war, zeigte sich, dass die Methylierung für die Bildung von Kristallen mit Hilfe der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen eine notwendige Voraussetzung darstellte. Die ersten orthorhombischen Kristalle bildeten sich nach 4 Tagen bei 20°C in Gegenwart von 27% PEG 4000 und 70–100 mM Natriumcitrat (pH 5,6) sowie einer Proteinkonzentration von 9-12 mg/ml.

Die Struktur der PR konnte mit einer Auflösung von 2,0 Å durch molekularen Ersatz und MAD-Experimenten vollständig gelöst werden. Das Strukturmodell besitzt eine für AKRs charakteristische $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel Faltung, konservierte Aminosäuren, die an der Bindung von NADPH₂ beteiligt sind sowie eine katalytische Tetrade, die den Wasserstofftransfer von NADPH₂ zum Kohlenstoff des Substrates vermittelt. Der C-Terminus der PR zeigt eine für AKRs außergewöhnliche Struktur, die eine dimere Konformation des Enzyms im Kristall unterstützen könnte. Die große Kontaktfläche zwischen den Molekülen ist ein weiteres Indiz dafür. Jedoch steht dieses Resultat scheinbar im Widerspruch mit dem der Größenausschlusschromatographie, wonach die PR in Lösung als Monomer vorliegt. Weitere Untersuchungen sollten darüber Aufschluss bringen.

1 Einleitung

1.1 Alkaloide - Pflanzliche Sekundärstoffe als Signale, Toxine und Pharmazeutika

Pflanzen produzieren eine unüberschaubare Vielzahl organischer Verbindungen, die in ihrer Biosynthese vom Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren abgeleitet sind. Diese so genannten Sekundärstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion in der Pflanze und ihrer Verbreitung auf bestimmte taxonomische Gruppen im Pflanzenreich von denen der Primärstoffe. Während Substanzen des Primärstoffwechsels wie Phytosterole, Lipide, Aminosäuren, Cytochrome und organische Säuren in allen Pflanzen verbreitet sind und essentielle Funktionen im Metabolismus erfüllen, spielen die Sekundärstoffe keine direkte Rolle in Wachstum und Entwicklung der Pflanze. Sie besitzen vielmehr ökologische Funktionen, die sich im Laufe der Evolution durch spezifische Anpassungsreaktionen (i.d.R. natürliche Mutationen) an die Umwelt z. B. Schutz gegen Herbivoren und Pathogenen (HARTMANN 1991), Anlockung von bestäubenden Insekten und samenverbreitenden Tieren (RAGUSO 2003) und zum Schutz vor UV-Strahlung entwickelten.

Neben den beiden großen Naturstoffgruppen der Terpene und Phenole sind Alkaloide stickstoffhaltige heterozyklische Verbindungen, die in ungefähr 20% aller Pflanzen vorkommen und von denen bisher 12000 Vertreter isoliert und strukturell aufgeklärt wurden (DE LUCA UND LAFLAMME 2001). Auffallend umfangreich ist die Vielfalt ihrer biologischen Aktivitäten. So besitzen sie große pharmakologische Bedeutung und werden für die Therapie schwerer Krankheiten eingesetzt. Zu den bekanntesten Vertretern zählen hier Taxol und Morphin (Abbildung 1). Taxol wurde erstmals Anfang der 1960er Jahre aus *Taxus brevifolia* isoliert und im Tierversuch als antikanzerogene Substanz identifiziert (WANI et al. 1971). Seit 1992 wird es als effektives Chemotherapeutikum (z. B. Paclitaxel[®]) gegen verschiedene Tumorarten eingesetzt (KÖHLER UND GOLDSPIEL 1994). Die kommerzielle Nachfrage sowie die entsprechenden Kosten von Taxol erlebten in den 80er Jahren ungeahnte Höhen, da die chemische Total-Synthese nicht möglich war und die Extraktion aus *T. brevifolia* nur kleine Mengen lieferte. Mit der Isolierung von Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III aus *Taxus baccata* wurde es möglich Taxol halbsyn-

thetisch in größeren Mengen herzustellen (DENIS et al. 1988). Ebenso konnten Hochleistungszellkulturen angelegt werden, die in großem Maßstab ausreichend Taxol produzieren (HU et al. 2003). Ein weiteres recht prominentes Alkaloid ist Morphin, dessen schmerzlindernde Wirkung auf den tierischen Organismus bereits seit vielen Jahrhunderten bekannt ist. Die Aufklärung der einzelnen Syntheseschritte und der beteiligten Enzyme der komplexen Morphinbiosynthese wurden jedoch erst ab den 1970er Jahren möglich, nachdem pflanzliche Zellkulturen als experimentelle Systeme eingeführt wurden (KUTCHAN 1995).

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzym PR ist Teil des Biosyntheseweges des monoterpenoiden Indolalkaloids Ajmalin aus *R. serpentina* (L.) Benth. Dessen antiarrhythmische Wirkung ergänzt mit der des antihypertensiven Reserpin (RINALDI et al. 1955; Abbildung 1), einen weiteren Hauptinhaltsstoff, macht diese Pflanze zu einem seit Jahrzehnten interessanten Forschungsobjekt. Andere pharmazeutisch genutzte und kommerziell gewonnene Indolalkaloide aus pflanzlichen Zellkulturen sind Camptothecin

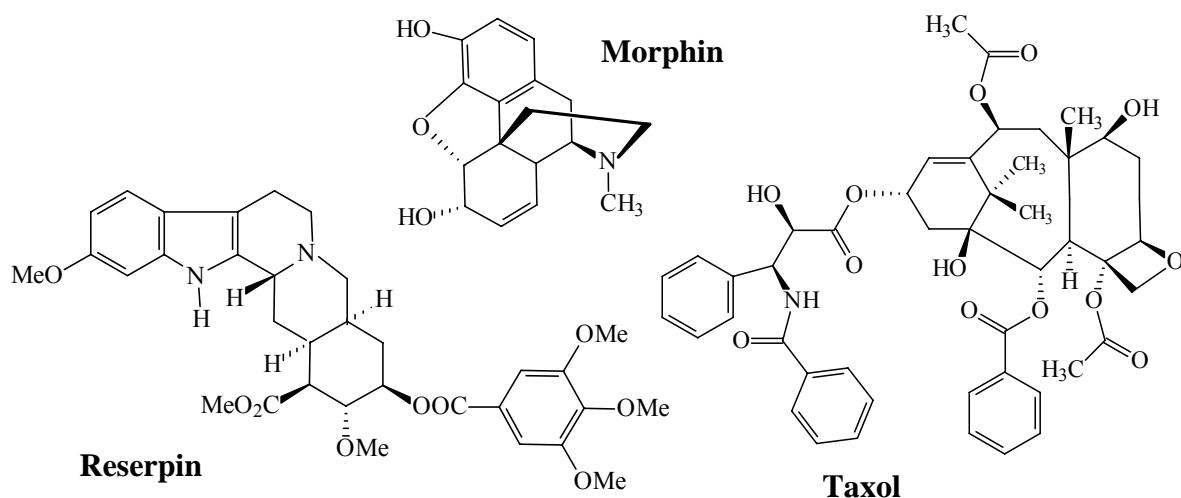


Abbildung 1. Pharmazeutisch wirksame pflanzliche Alkaloide. Reserpin, ein Monoterpen aus *R. serpentina*; Morphin, ein Isoquinolin aus *Papaver somniferum* und Taxol, ein Diterpen aus *Taxus brevifolia*.

aus *Camptotheca acuminata* sowie die Chemotherapeutika Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus roseus*. Da, wie im Fall des Taxols, die teilweise überaus komplizierten Strukturen chemisch nicht oder wirtschaftlich nur unrentabel synthetisiert werden können, erfolgt die Isolation in den meisten Fällen aus Pflanzen. So gibt es Strategien, Bio-

synthesewege gewünschter Alkaloide in der Pflanze gezielt so zu beeinflussen, dass z. B. durch Überexpression eines Schlüsselenzyms das Gleichgewicht innerhalb der Pflanze zu Gunsten des gewünschten Alkaloids verschoben wird. Die Blockade der Gene für die entsprechenden Enzyme der Nebenwege ist eine weitere Möglichkeit die gesamte Stoffwechselenergie in den Hauptweg hin zum gewünschten Endprodukt zu leiten. FRICK et al. (2005) stellten fest, dass trotz gesteigerter Produktion der Zwischenprodukte der Anteil von Morphin im Alkaloidgemisch transgenen *Papaver somniferum* nicht erhöht werden konnte. Offenbar reicht die Kenntnis der Synthese in ihren Einzelschritten nicht aus, um sie nachhaltig zu beeinflussen. Vielmehr ist die Kenntnis der Regulationsmechanismen aller Komponenten, Teilreaktionen und beteiligten Gene der Wirkstoffsynthese erforderlich. Schließlich ist es möglich partielle oder komplette Biosynthesewege aus der Originalpflanze in einen anderen Organismus einzuschleusen, wie es im Falle der Entwicklung von "Golden Rice" erfolgreich gelang (XE et al. 2000; PAINE et al. 2005).

1.2 Enzyme der Ajmalinbiosynthese in *R. serpentina*

Rauwolfia serpentina (L.) Benth aus der Familie der Apocynaceae, auch bekannt als indische Schlangenzahn, ist eine in Indien und Pakistan verbreitete Heilpflanze, die eine große Bedeutung in der ayurvedischen Medizin besitzt und dort Anwendung u. a. gegen Fieber und rheumatische Erkrankungen findet (Abbildung 2). Die pharmazeutisch wichtigsten Verbindungen befinden sich in den 20 bis 40 cm langen Wurzeln, deren Alkaloidgehalt laut DAB 1% Reserpin und 0,1% Ajmalin beträgt. Mit der Etablierung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* Mitte der 1970er Jahre war die Voraussetzung für die Aufklärung der Ajmalin-Biosynthese gegeben (STÖCKIGT UND ZENK 1977). Die Vorteile einer Zellkultur sind deren kostengünstige Anzucht von frischem, keimfreiem Zellmaterial innerhalb weniger Wochen im kg-Maßstab sowie die Minimierung der Gefahr der Enzyminaktivierung durch Phenole und Gerbstoffe, wenn die Enzymisolierung aus frischem Pflanzenmaterial erfolgt (STÖCKIGT 1988). Zudem besitzen Zellkulturen häufig eine höhere Stoffwechselaktivität als die Pflanzen von denen sie abstammen. Seitdem wurden fast alle Enzyme der Ajmalin-Biosynthese von der Arbeitsgruppe Stöckigt

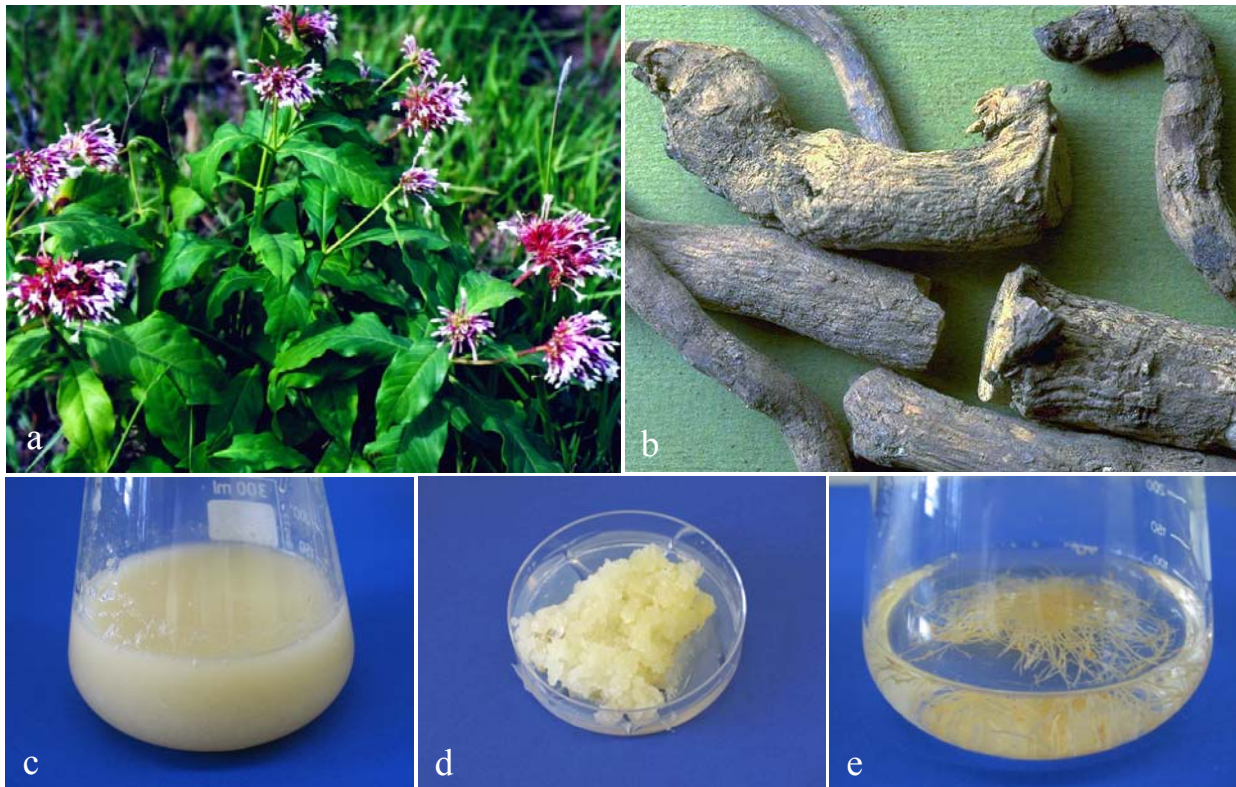


Abbildung 2. *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth als Pflanze (a), Wurzel (b), Zellsuspensionskultur (c), Kalluskultur (d) und Wurzelkultur *hairy roots* (e).

identifiziert, isoliert und charakterisiert. Seit Mitte der 1990er Jahre wurden acht Enzyme heterolog in *E. coli* exprimiert, von denen sechs kristallisiert und strukturell analysiert wurden (STÖCKIGT et al. 2006, Abbildung 3.).

Die ersten Schritte der Synthese aller monoterpenoiden Indolalkaloide ist die Decarboxylierung der Aminosäure L-Tryptophan zu Tryptamin (DE LUCA et al. 1989) sowie die von der Strictosidin-Synthase vermittelte Kondensationsreaktion von Tryptamin und Secologanin zu Strictosidin (STÖCKIGT UND ZENK 1977). KUTCHAN et al. konnten 1988 erstmals die Strictosidin-Synthase aktiv in *E. coli* exprimieren und MA et al. (2005) strukturell aufklären. Das Glucosid Strictosidin, das als Ausgangspunkt zur Synthese von etwa 2000 verschiedenen Indolalkaloiden dient, wird im folgenden Schritt durch die Strictosidin- β -Glucosidase zu einem instabilen Aglykon deglucosiliert. GERASIMENKO et al. (2002) konnten das Enzym heterolog in *E. coli* exprimieren und charakterisierten. Die strukturelle Analyse der Strictosidin- β -Glucosidase erfolgte von BARLEBEN et al. (2005). Das Strictosidin-Aglykon wird über einige unbekannte Intermediate in Dehydrogeissoschizin umgewandelt, welches durch die NADPH₂-abhängige Geissoschizin-Dehydro-

genese zum Geissoschizin umgesetzt wird (PFITZNER UND STÖCKIGT 1982). Die folgende Reaktion von Geissoschizin zum Polyneuridinaldehyd durch das Sarpagan-Brückenenzym ist nur zum Teil aufgeklärt (SCHMIDT UND STÖCKIGT 1995). Polyneuridinaldehyd, das erste Sarpagan-Alkaloid in der Ajmalinbiosynthese wird durch die Polyneuridinaldehyd Esterase zum instabilen 16-Epi-Vellosimin umgewandelt (PFITZNER UND STÖCKIGT 1983a,b). Die Klonierung und heterologe Expression in *E. coli* erfolgte von DOGRU et al. (2000). Die Vinorin-Synthase katalysiert die Acetyl-CoA-abhängige Transformation von 16-Epi-Vellosimin zu Vinorin. Die resultierende hydroxylierte Ajmalan-Gerüststruktur würde auf Grund der sehr hohen Reaktivität spontan wieder zum Sarpagan-Typ unter Spaltung der neu geschaffenen C-C-Bindung rückreagieren, was jedoch die Vinorin-Synthase durch Acetylierung der Hydroxygruppe verhindert (PFITZNER et al. 1986). BAYER (2004) hat das Enzym isoliert, aktiv exprimiert und kristallisiert und MA et al. (2005) konnten die Struktur aufklären. Die NADPH₂-abhängige Hydroxylierung des Vinorins zu Vomilenin wird von dem Enzym Vinorin-Hydroxylase katalysiert (FALKENHAGEN UND STÖCKIGT 1995 a,b). Die Umwandlung von Vomilenin kann im weiteren Verlauf der Biosynthese auf vier verschiedenen Wegen erfolgen.

1. Über einen noch unbekanntem, nicht enzymgebundenen, Mechanismus erfolgt die Umlagerung von Vomilenin zu Perakin (TAYLOR et al. 1962). Die anschließende NADPH₂-abhängige Reduktion durch die Perakin-Reduktase zu Raucaffrinolin ist Gegenstand dieser Arbeit.
2. Die Vomilenin-Glucosyl-Transferase glycosyliert Vomilenin zu Raucaffricin (RUYTER UND STÖCKIGT 1991). Raucaffricin ist das am häufigsten vorkommende Alkaloid in *R. serpentina* Suspensionskulturen. SCHÜBEL et al. (1988) beschrieben nach Optimierung der Kulturbedingungen eine Alkaloidproduktion von 1,6 g/l Raucaffricin. Die Rückreaktion wird katalysiert durch die heterolog exprimierte und kristallisierte Raucaffricin-Glucosidase, ein Enzym mit 80% Homologie zur Strictosidin-Glucosidase (RUPPERT et al. 2006).
3. Die Vomilenin-Oxidoreduktase katalysiert die NADPH₂-abhängige Reduktion zu 21-Oxovomilenin (nicht dargestellt). Die vollständige Funktion dieses Enzymes konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden (STÖCKIGT 1986).

4. Auf dem Hauptweg wird Vomilenin durch die Vomilenin-Reduktase zu 1,2-Dihydrovomilenin reduziert, welches unmittelbar in einer ebenfalls NADPH_2 -abhängigen Reaktion durch die 1,2-Dihydrovomilenin-Reduktase in 17-O-Acetylnorajmalin umgewandelt wird. Es konnte noch nicht geklärt werden, wie viele Enzyme an den beiden Reaktionen beteiligt sind. Die 17-O-Acetylnorajmalin-Esterase deacetyliert 17-O-Acetylnorajmalin zu Norajmalin (POLZ 1987) und wurde von RUPPERT et al. (2005) gereinigt, kloniert und aktiv exprimiert. Der vermutlich letzte Reaktionsschritt dieses Biosyntheseweges wird katalysiert durch die Acetylnorajmalin-Methyltransferase, dem einzigen membrangebundenen Enzym im Biosyntheseweg, wenn man von den Cytochrom P450 abhängigen Enzymen Vinorin-Hydroxylase und dem Sarpagan-Brückenzym absieht. Im letzten Biosyntheseschritt wird der sekundäre Stickstoff des Indolringes von Norajmalin zum Ajmalin in einer S-Adenosylabhängigen Reaktion methyliert.

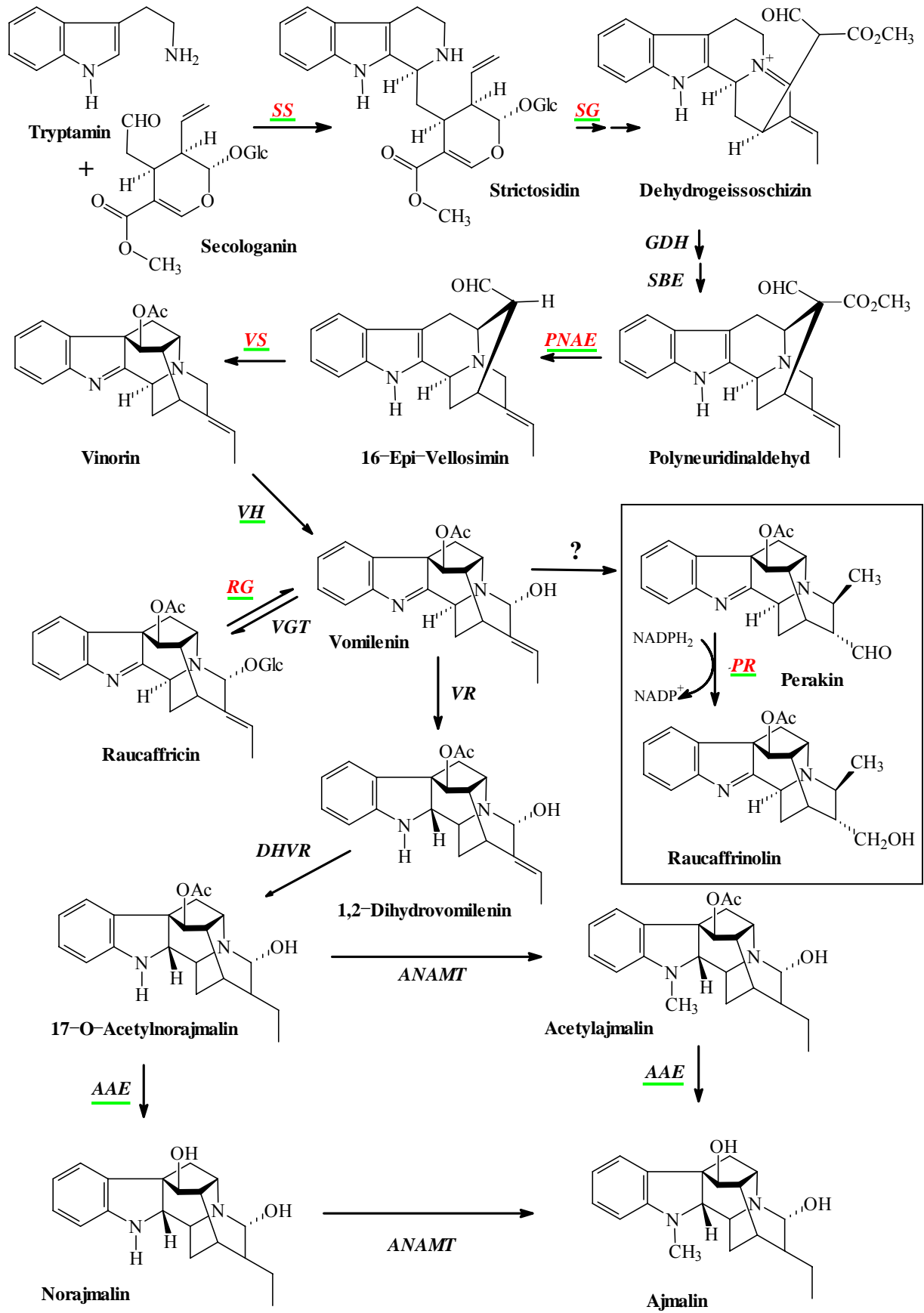


Abbildung 3. Biosyntheseweg von Ajmalin in *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen ausgehend von Tryptamin und Secologanin. Der umrahmte Bereich markiert die enzymatische Reduktion von Perakin zu Raucaffrinolin durch die Perakin-Reduktase, die in dieser Arbeit untersucht wurde. SS = Strictosidin Synthase, SG = Strictosidin Glucosidase, GDH = Geissoschizin Dehydrogenase, SBE = Sarpagan-Brückenenzym, PNAE = Polyneuridinaldehyd Esterase, VS = Vinorin Synthase, VH = Vinorin Hydroxylase, RG = Raucaffricin Glucosidase, VGT = Vomelinin Glucosyl Transferase, PR = Perakin-Reduktase, VR = Vomilenin Reduktase, DHVR = 1,2-Dihydrovomilenin Reduktase, AAE = Acetyljmalin Esterase, ANAMT = Acetylnorajmalin Methyltransferase. Grün unterstrichen: heterolog, aktiv exprimierte Enzyme, Rot: kristallisierte Enzyme.

1.3 Bisheriger Kenntnisstand zur PR

In früheren Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Stöckigt wurde versucht die PR aus *R. serpentina* zu reinigen und zu charakterisieren. OBITZ (1995) widmete sich in seiner Promotionsarbeit dieser Thematik und entwickelte nach säulenchromatographischen Reinigungsschritten einen Enzymaktivitätstest sowie ein Trennprofil für die Detektion des Substrates und Endproduktes per HPLC. Das gereinigte Enzym wies ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa auf. Im Aktivitätstest zeigte sich, dass Perakin wie auch 21-Hydroxyraumaclin als Substrat dieses Enzyms angesehen werden konnten.

Die Existenz der 21-Hydroxyraumaclin-Reduktase wurde erstmals von LIBOT et al. (1980) postuliert und von STÖCKIGT (1986) nachgewiesen. OBITZ (1995) konnte bei Untersuchungen zur Substratspezifität zeigen, dass dieses Enzym identisch mit der PR ist, die Perakin zu Raucaffrinolin reduziert. Im Gegensatz zu 21-Hydroxyraumaclin, das früher nur bei der Fütterung von Zellkulturen mit Ajmalin nachgewiesen werden konnte, sind Perakin und Raucaffrinolin in *R. serpentina* natürlich vorkommende Indolalkaloide. Perakin musste damit als endogenes Substrat dieser Reduktase angesehen werden, die deswegen in PR umbenannt wurde.

Warzecha (1996, unveröffentlichte Daten) versuchte mit einem anderen Reinigungsprofil die PR aus pflanzlichen Suspensionskulturen von *R. serpentina* aufzureinigen. Er konnte nach Reinigungsschritten über mehrere Säulen in einigen Fraktionen enzymatischen Umsatz von 21-Hydroxyraumaclin nachweisen. Diese Fraktionen wurden vereinigt und die darin enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Eine ca. 38 kDa große Proteinbande wurde isoliert und tryptisch verdaut. Die anschließende N-terminale Sequenzierung der Bruchstücke ergab zwei 12–14 Aminosäure lange Oligopeptide aus denen dege-

nerierte Primer entwickelt wurden. PCR-Versuche zur Isolierung des Volllängenklones im Genpool der Pflanze scheiterten, da zum einen die PCR mit degenerierten Primern meist nicht das gewünschte PCR-Produkt liefert und zum anderen das pflanzliche Ausgangsmaterial keine Genexpression des entsprechenden Enzyms auf transkriptioneller Ebene aufweist. Die vorliegende Promotionsarbeit setzt an diesem Punkt an. Aus den bekannten Oligopeptiden wurden neue degenerierte Primer entwickelt, die in Kombination mit den noch existierenden alten Primern für die PCR eingesetzt wurden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Hauptaufgabe der Untersuchungen war die Klonierung, heterologe Expression, Reinigung und Kristallisation des auf molekularer und biochemischer Ebene vorher unbekanntes Enzyms PR aus *R. serpentina*. Mit der aktiven Expression des Enzyms in *E. coli* sollte es möglich sein, die Funktion des Enzyms aufzuklären. Nach Auffinden des Volllängenklones für die PR mit den von Warzecha isolierten Oligopeptiden sollte u. a. mit Aktivitätstests geklärt werden, ob es sich überhaupt um das gesuchte Enzym handelt. Nach Überexpression in *E. coli* sollte die Proteinlösung aus der anschließenden Aufreinigung biochemisch aufgearbeitet und zum Züchten von Kristallen genutzt werden. Eine erfolgreiche Kristallisation und kristallographische Analyse sollte zum besseren Verständnis der PR hinsichtlich Struktur und Katalyse beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Amersham Biosciences, Freiburg

Äkta-Explorer-Chromatographiesystem, Horizontalelektrophoresekammer SE 600, Säulen: a) HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 für Größenausschlußchromatographie, b) Tricorn Säule für Affinitätschromatographie, c) HiTrap Desalting Säule Sephadex G-25 Superfine

Bandelin, Berlin

Sonotrode Sonoplus HD 2070, Ultraschallwasserbad SONOREX RK 510 S

Beckmann, München

Kühlzentrifugen J2-21, Rotoren JA 10, 20,

BioRad, München

Stromversorgungsgeräte

Eppendorf, Hamburg

Biophotometer, Thermomixer 5437, Mastercycler personal

Finnigan, Bremen

Massenspektrometer MAT 44 S

Fisher Scientific, Schwerte

Wasserbad Fisherbrand FBC 620

Fröbel Labortechnik, Lindau

Laminarbox

GFL, Burgwedel

Schüttelinkubator

Heidolph REAX 2000, Kehlheim

Vortex-Gerät

Heraeus/Sepatech, Osterode

Tischzentrifuge Biofuge 15

Hermle, Gosheim

Kühlzentrifuge Z320K

Hund, Wetzlar

Stereomikroskop

IKA, Stauffen

Ultraturrax TP 18/10

ISMATEC, Schweiz
Peristaltikpumpe IPC

Leitz, Wetzlar
Stereomikroskop Laborlux S

Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfingen
Brutschränke Ecocell

Merck-Hitachi, Darmstadt
HPLC: Integrator D-2500, Autosampler AS-2500, UV/VIS-Detektor L-450, Pumpe L-6500, HPLC-Säule, LiChrospher 60 RP Select B, HPLC-Vorsäule, Select B

Peqlab, Erlangen
Elektroporator Equibio Easyject, Optima

Perkin Elmer, Überlingen
Lambda 2 Spektrometer

Pharmacia LKB, Freiburg
Schreiber REC 102, UV/VIS-Detektor 2158 UVICORD SD

Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage

Serva, Heidelberg
Horizontalelektrophoresekammer Mini Blue, Vertikalelektrophoresekammer BlueMarine 100 und 200

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Standardchemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von den Firmen Serva (Heidelberg), AppliChem (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) bezogen. Verwendete Alkaloide stammen aus der Alkaloidsammlung von Prof. J. Stöckigt (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Pharmazie). Weitere Chemikalien werden in der Beschreibung der Methoden aufgeführt.

AppliChem, Darmstadt
Ampicillin, Kanamycin, Lysozym, IPTG, LowEEO Agarose, NADH, NADPH₂

Bayer, Leverkusen
Baysilone-Paste, Silikonfett

Fresenius, Bad Homburg
Ampuwa

Hampton Research, USA
Linbroplatten, Silikondeckgläser, Crystal Screen I und II

Intermedica, Klein-Winternheim
Halbmikroküvetten

Jena Bioscience, Jena
JBScreen Classic Mixed

Merck, Darmstadt
DC-Platten

Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen, Zimtaldehyd

Saarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße

Sartorius, Göttingen
Nitrocellulosefilter 0,45 µm

Schleicher & Schüll, Dassel
Rundfilter Protran 0,45µm

Serva, Heidelberg
Servapor Dialyseschläuche mit 9, 16 mm Ø, Coomassie Brillant Blue G-250/R-250

Sigma, Heidelberg
Basic und Extension Kit für Kristallisation

VWR, Darmstadt
Vivaspin 500, 10.000 MWCO

2.3 Enzyme und Isolierungskits

Amersham Biosciences, Freiburg
LMW-Marker

BD Clontech, Heidelberg
Advantage DNA-Polymerase

Eurogentec, Seraing/Belgien
Smart Ladder

Invitrogen, Karlsruhe
Gene Racer Kit

Macherey&Nagel, Düren
Nucleo Spin/ Extract Kit

New England Biolabs, Schwalbach
Phusion DNA-Polymerase Kit, Restriktionsendonukleasen, Taq DNA-Polymerase, M-MuLV, Reverse Transkriptase

Promega, Mannheim
dNTP's, T4 DNA Ligase, pGEM®T-Easy Kit

Qiagen, Hilden
RNeasy Plant Mini Kit

Stratagene, Heidelberg
Pfu-Turbo DNA-Polymerase

2.4 Biologisches Material

2.4.1 Pflanzliche Zellsuspensionskulturen

Folgende Zelllinien von *R. serpentina* (L.) Benth wurden als Suspensionskultur aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Mainz verwendet: *R. serpentina* T₃₀, *R. serpentina* 02, *R. serpentina* Braunschweig, *R. serpentina*. Die Kultivierung erfolgte in keimfreien, mit Schaumgummistopfen verschlossenen 1 Liter Erlenmeyerkolben in 400 ml LS-Kulturmedium (LINSMAIER UND SKOOG 1965) unter Zusatz von 1×10^{-6} mol/l 1-Naphthylelessigsäure und 2,4- Dichlorphenoxyessigsäure bei pH 5.7 auf Rotationsschüttlern bei 100 rpm. Die Kulturen wurden 24 h pro Tag bei ca. 6000 Lux und durchschnittlich 24°C gehalten. Nach 7 tägiger Wachstumsphase wurde den Kolben unter sterilen Bedingungen 200 ml der Zellmasse entnommen und die gleiche Menge frisches Medium zugesetzt.

Die Ernte der Suspensionskultur erfolgte am fünften Tag der Wachstumsphase. Dafür wurden die Zellen mittels Vakuumfiltration geerntet und die abfiltrierten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Erfolgte die weitere Verarbeitung nicht unmittelbar im Anschluss, wurde das Pflanzenmaterial in Kunststoffbeuteln verschweißt und bei -24°C aufbewahrt. Zellen, die für eine RNA-Isolierung bestimmt waren, wurden bei -70°C gelagert.

2.4.2 Bakterien

2.4.2.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden bei den molekularbiologischen Arbeiten und der Proteinexpression verwendet:

E. coli Top10 für Standardklonierungen und Plasmidvermehrung

(Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

E. coli M15[pREP4] Expressionsstamm mit Repressorplasmid und Kanamycinresistenz

(Qiagen, Hilden)

Phänotyp wie *E. coli* K12: NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

2.4.2.2 Anzucht von Bakterien

Platten- und Glycerinkulturen

Zur Herstellung von Plattenkulturen wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Die Lösung wurde auf ca. 55°C abgekühlt, je nach Selektionsanforderung entweder mit 100 mg/ml Ampicillin und/oder 25mg/ml Kanamycin versetzt und ca. 5 mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Agarplatten offen für einige Stunden zum Trocknen in der Sterilbank gelassen und steril verpackt bei 4°C gelagert. Zum Ausplattieren von Bakterien aus Flüssigkulturen wurden 10-500 µl der Bakterienkultur auf eine Platte pipettiert und ausgestrichen. Die Platten wurden zum Austrocknen etwa 15 min bei RT gelagert und dann umgedreht für 10-16 h bei 37°C inkubiert. Für eine längerfristige Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurde 1 ml einer stationären Flüssigkultur in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,5 ml Glycerin vermischt. Danach wurde die Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium (Luria Bretani-Medium):

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,0

H₂O ad 1 l

→ autoklavieren (20 min, 121°C)

Flüssigkulturen

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde LB-Medium in 1 l in Schüttelkolben autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das LB-Medium je nach Selektionsanforderung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (50 mg/ml Ampicillin und/oder 25 mg/ml Kanamycin, sterilfiltriert) und mit Bakterien einer Vorkultur, die der Plattenkultur entnommen wurde, angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden bei RT bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert.

Expression der Perakin-Reduktase in E. coli

Für die Überexpression der PR wurde in den Expressionsvektor pQE-2 die cDNA der PR ligiert, in M15-Zellen transformiert und auf Amp/Kan-Platten ausgestrichen. Wachsen auf den Platten Kolonien, wurden diese gepickt und in Anzuchtröhrchen mit Amp/Kan-LB-Medium angeimpft und für 12-16 h bei 37°C geschüttelt. Es wurden Schüttelkolben mit je 500ml Amp/Kan-LB-Medium vorbereitet, mit je 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei RT kultiviert. Erreichten die Bakterienkulturen eine OD₆₀₀ von ca. 0,8 wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM) die Proteinexpression induziert. Nach 24 h Induktionszeit bei RT wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6000 x g, 8 min, 4°C) und das Pellet in Falcon-Röhrchen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.4.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien***Hitzeschockkompetente Bakterien***

Zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation wurden 50 ml LB-Medium mit 500 ml einer entsprechenden Vorkultur angeimpft.

Die Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 20 ml eisgekühltem TFB I resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 2 ml TFB II resuspendiert und die Bakteriensuspension zu 200 µl aliquotiert. Dabei wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um Schwerkkräfte während des Aufziehens der Bakterienlösung zu vermeiden. Die Aliquots wurden 20 min auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

TFB I:

30 mM Kaliumacetat
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15 % (v/v) Glycerin
auf pH 5,8 mit HOAc

TFB II:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
auf pH 6,8 mit KOH

Elektrokompetente Bakterien

Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden 200 ml Bakterienkultur in vier 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4°C), zweimal mit je 20 ml eiskaltem autoklavierten Wasser gewaschen. Die Pellets wurden anschließend in 2 ml 10% sterilem Glycerin resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Eppendorfgefäßen zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

2.4.2.4 Transformation kompetenter Bakterien***Hitzeschocktransformation***

Die hitzeschockkompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 40 µl der Bakterienkultur mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der Ansatz für 2 min im Wasserbad bei 41°C erhitzt, danach sofort auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes auf LB-Agar-Platten

ausplattiert, welche das zur Selektion erforderliche Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden für 14-20 h bei 37°C inkubiert.

Elektrotransformation

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl der Zellen mit 0,01-0,1 mg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und auf den Boden einer trockenen vorgekühlten Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde in einem Elektroporator bei einer Spannung von 2500 V durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 500 ml LB-Medium aufgenommen, bei 37°C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes auf LB-Agar-Platten ausplattiert, welche das zur Selektion erforderliche Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden für 14-20 h bei 37°C inkubiert.

2.5 Plasmide

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden folgende Vektoren verwendet:

Plasmidvektor	Antibiotikaresistenz	Verwendungszweck	Hersteller
pQE-2, pQE-70	Amp	High-level Expressionsvektor für (His) ₆ -tag Proteine	Qiagen, Hilden
Plasmidvektor	Antibiotikaresistenz	Verwendungszweck	Hersteller
pGEM-T Easy Vector System I	Amp	High-copy-Plasmide für schnelle Vermehrung, Standardklonierung	Promega, Mannheim

2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden zur Amplifizierung der cDNA der Perakin-Reduktase verwendet. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und VBC-GENOMICS Bioscience Research (Österreich) hergestellt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA, cDNA oder Plasmiden und zur Mutagenese von Plasmid-DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Eine PCR wurde üblicherweise mit Taq-Polymerase durchgeführt. Für die PCR von Plasmiden wurde die lesegenaue Phusion-Polymerase von NEB verwendet. Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, um die amplifizierte DNA von überschüssigen Desoxynukleotiden, Primern und Polymerase abzutrennen.

20 µl PCR-Ansatz:

- je 2 µl forward und reverse Primer (10 pmol/ml)
- 1 µl DNA-Template
- 1 µl dNTPs (25 mM von jedem Nukleotid)
- 1 µl MgSO₄ (50 mM)
- 2 µl Taq-Puffer (10x)
- 1 µl Taq-Polymerase
- 10 µl Ampuwa

Der Reaktionsansatz wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Der Thermocycler wurde wahlweise mit folgenden PCR-Programmen verwendet.

PCR-Programm mit Taq-Polymerase:

1. 3 min, 95°C
2. 25-30 Zyklen:
 - a) 1 min, 95°C
 - b) 1 min, 40-65°C
 - c) 2-3 min, 72°C
3. 10 min, 72°C
4. Reaktionsansatz bei 4°C halten

PCR-Programm mit Phusion-Polymerase:

1. 3 min, 95°C
2. 20-25 Zyklen:
 - a) 30 sek, 95°C
 - b) 20 sek, 56-65°C
 - c) 2 min, 72°C
3. 10 min, 72°C
4. Reaktionsansatz bei 4°C halten

PCR-Programme für RACE-PCR:**5'-RACE**

2 min, 95°C

5 Zyklen: a) 30 sek, 95°C
b) 1 min, 67°C20 Zyklen: a) 30 sek, 95°C
b) 1 min, 65°C
c) 2 min, 72°C

10 min, 72°C

3'-RACE

2 min, 95°C

5 Zyklen: a) 30 sek, 95°C
b) 2 min, 70°C5 Zyklen: a) 30 sek, 95°C
b) 2,5 min, 68°C
c) 2 min, 72°C20 Zyklen: a) 20 sek, 95°C
b) 1 min, 66°C
c) 2 min, 72°C

10 min, 72°C

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Größentrennung und qualitativen Beurteilung der synthetisierten DNA. Als Gelmatrix wurde ein 1% (w/v) Agarose-Gel verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf etwa 70°C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in die Apparatur gegossen. Nach Beschichtung des Gels mit TBE-Puffer wurden die zu untersuchenden DNA-Proben mit einem entsprechenden Volumen Probenauftragspuffer versetzt und in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer konstanten Spannung von 60 V durchgeführt, bis die Proben vollständig in das Gel eingewandert waren. Danach wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) konnte nun die Lage der Banden im Gel durch ihre Fluoreszenz, aufgrund der in die DNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle, festgestellt werden. Es erfolgte eine photographische Dokumentation der Gele.

50xTAE:

121g Tris

28,88 ml Eisessig

50 ml 0,5 M EDTA

pH 8,0

Probenauftragspuffer (3x):

30 % (v/v) Glycerin

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.7.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kit von Macherey & Nagel aus Agarose-Gelen isoliert. Dazu wurde die DNA-Bande unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert. Die Qualität der isolierten DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.7.4 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden mit der Kettenabbruchmethode (SANGER et al. 1977) von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt.

2.7.5 Präparation von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli*

Transformierte *E. coli*-Bakterien wurden im 6 ml Maßstab bei 37°C angezogen. Zur Isolation von Plasmid-DNA (bis zu 50 µg) wurde das Plasmid-Isolationskit von Macherey & Nagel unter Befolgung der entsprechenden Protokolle verwendet. Jedoch wurde abweichend vom Reinigungsprotokoll im letzten Schritt die DNA mit H₂O statt des im Kit empfohlenen TE-Puffers von der Säule eluiert, da die im TE-Puffer enthaltenen Salze bei nachfolgenden Plasmidsequenzierung stören.

2.7.6 Mini-Präparation

Diese Methode dient zur preisgünstigen Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA (ca. 10 µg) aus *E. coli* ohne Verwendung kommerziell erhältlicher Kits und wird nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (BIRNBOIM UND DOLY 1979). Die Minipräparation bietet sich an, um eine größere Anzahl transformierter Bakterienkulturen auf erfolgreichen Einbau des Inserts in einen Vektor zu prüfen. Die erhaltene DNA wurde in RNase-Lösung aufgenommen und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut.

2.7.7 Enzymatische Modifikationen von DNA-Fragmenten

Die enzymatischen Modifikationen von DNA durch Restriktionsverdau und Ligation erfolgten nach den Angaben der entsprechenden Herstellern (NEB, Qiagen).

Ligation

Mit Hilfe des pGEM-T-Easy Kits wurden PCR-Produkte unter Verwendung einer T4 DNA-Ligase mit dem pGEM-T-Vektor ligiert. Ebenso erfolgte die Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsplasmide wie pQE-2 oder pQE-70.

Bestandteil	Ligation in	
	pGEM-T-Vektor	pQE-2 / pQE-70
Vektor	1 µl (50 ng)	3-5µl (20 ng)
10 x Puffer	1 µl	1 µl
DNA	3 µl (10-20 ng)	2-6 µl (60-100 ng)
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl

→ wenn nötig auffüllen auf 10 µl Endvolumen mit Ampuwa

Die Ligation erfolgte entweder für 16 h bei 4°C oder für 2 h bei 25°C. Nach der Ligation wurde der komplette Ligationsansatz in kompetente Top10-Zellen transformiert.

Restriktion

Das Herausschneiden von DNA aus Vektoren sowie die Linearisierung der Plasmid-DNA erfolgten mit Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers. 1 µg DNA wurde mit 1-3 U von jedem Enzym und 10 x Puffer bei 37°C 2 h im Wasserbad inkubiert. In der Regel wurde mit 20 µl Ansätzen gearbeitet.

2.7.8 RNA-Präparation aus Zellsuspensionskulturen

Ribonukleasen (RNasen) sind extrem stabile und aktive Enzyme, die in bereits sehr geringen Mengen RNA vollständig zerstören. Daher muss beim Umgang mit RNA sehr vorsichtig gearbeitet werden, um die Proben nicht unabsichtlich mit RNasen zu kontaminieren. Alle im Folgenden zur Isolierung der RNA verwendeten Geräte wurden bei 260°C für mehrere Stunden erhitzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 35% H₂O₂

aufgefüllt. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden mit DEPC behandelt und sterilfiltriert.

Die Suspensionskultur wurde unmittelbar nach dem Ernten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde mit Mörser und Pistill unter permanenter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder verarbeitet. Die Isolierung der Gesamt-RNA (rRNA, tRNA und mRNA) aus 100 mg Zellmaterial erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben.

2.7.9 cDNA-Synthese

Viele der eukaryontischen mRNAs enden mit einem Poly-A Schwanz von 20-250 Adenosinnukleotiden, der im Zellkern nach der Transkription an die RNA angehängt wird. Hingegen werden rRNAs und tRNAs, die über 95 % der zellulären RNA ausmachen, nicht polyadenyliert. Diese Tatsache wird bei der RT-PCR ausgenutzt. Als Primer wurden die degenerierten reversen Primer 32rev und 32rev1 (siehe 3.2) sowie ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der eine Erststrang-cDNA-Synthese der 3'-Enden der Transkripte erlaubt. Oligo(dT)-Primer sind Oligonukleotide mit einer Nukleotidabfolge von 12-18 dTs, die spezifisch an den Poly(A)- Schwanz von eukaryontischer mRNA binden.

Nach Denaturieren der RNA für 5 min bei 65°C wurde der Ansatz 10 min auf Eis abgekühlt und die RT-Reaktion mit Zugabe der M-MuLV gestartet. Die Reaktion inkubierte 1h bei 37°C und wurde abschließend für 5 min bei 95°C inaktiviert.

RT-Ansatz:

5 μl Gesamt-RNA

1 μl Oligo dT-Primer (10 pmol/ μl) bzw. 1 μl reverse Primer (100pmol/ μl)

2 μl 10x1st Strand Puffer

2 μl dNTP's (20 mM)

9 μl Wasser

1 μl M-MuLV-RT

2.7.10 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Reinheit der RNA-Proben wurde mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese in einer Vertikalgelapparatur überprüft. Während des Gießens des Gels wurde darauf geachtet, dass keine Kontamination mit RNasen stattfand. 1,2 g Agarose wurde in 110 ml 1x MOPS-Puffer erhitzt bis sich die Agarose auflöste. Nachdem die Agaroselösung im Wasserbad auf etwa 65°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid sowie 37% Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 2,2 M zugegeben und das Gel so schnell wie möglich gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer versehen. Die RNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, 5 min bei 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde anfangs unter eine Spannung von 60 V gesetzt, bis die Proben aus den Auftragstaschen vollständig in das Gel eingelaufen waren. Danach wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Nach Beendigung des Laufes konnte die Lage der Banden im Gel durch ihre Fluoreszenz aufgrund der in die RNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm) festgestellt werden.

10x Formaldehyd-Gelpuffer

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 7.0 mit NaOH

1x Formaldehyd-Gellaufpuffer

100 ml 10x Formaldehyd-Gelpuffer
20 ml 37% (12.3 M) Formaldehyd
880 ml DEPC-Wasser

5x RNA Ladepuffer

16 μ l gesättigte Bromphenolblaulösung
80 μ l 500 mM EDTA, pH 8.0
720 μ l 37% (12.3 M) Formaldehyd
2 ml 100% Glycerin
3084 μ l Formamid
4 ml 10 x Formaldehyd-Gelpuffer
DEPC-Wasser auf 10 ml

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (LAEMMLI 1970). Die dafür notwendigen Lösungen und Gele wurden nach Standardmethoden hergestellt (SAMBROOK et al. 1989). Vor dem Auftragen des Proteinextraktes auf ein Gel wurden die Proben mit Protein-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard diente ein definiertes Gemisch kleinerer Proteine mit einem Molekulargewicht von 15 bis 90 kDa (Amersham, Freiburg). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10-20 mA im kleinen SDS-Gel bzw. 20-40 mA im großen SDS-Gel. Zur Identifizierung der Proteinbanden wurden die Gele 10-30 min mit Färbelösung behandelt und mit Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Trenngel (11%)	großes Gel	kleines Gel
Acrylamid-Trenngellösung	30 ml	6 ml
SDS (20%)	150 µl	30 µl
TEMED	20 µl	4 µl
APS (10%)	150 µl	30 µl
Sammelgel (5%)	großes Gel	kleines Gel
Acrylamid-Sammelgellösung	15 ml	5 ml
SDS (20%)	70 µl	24 µl
TEMED	10 µl	3,5 µl
APS (10%)	200 µl	67 µl

Protein-Ladepuffer (3x):

9,6 ml Tris-HCl (pH 6,8)
 12 ml 20 % (w/v) SDS
 12 ml Glycerin
 6,4 ml Mercaptoethanol
 0,024 g Bromphenolblau

Laufpuffer:

12 g Tris
 30 g Glycin
 3 g SDS
 auf 2 l mit H₂O

Färbelösung:

40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant B G250

Entfärbelösung:	Trenngellösung:	Sammelgellösung:
30 % (v/v) Methanol	11 ml Acrylamid-Stammlösung	2,5 ml Acrylamid-Stammlösung
10 % (v/v) Essigsäure	7,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,7 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	11,2 ml Wasser	8,5 ml Wasser

→ Trenn- und Sammelgellösung wurden filtriert und 15 min entgast

2.8.2 Bestimmung des N-terminalen His-tags

Die Bestimmung des N-terminalen His-tags des kristallisierten Proteinfragmentes erfolgte über eine einfache Methode. 100 µl einer Lösung aus gelösten Proteinkristallen (1 mg/ml) in Puffer A2 (siehe 2.8.4.3) wurde mit Puffer A2-äquilibriertem Ni²⁺-NTA im Eppendorfgefäß unter Schütteln 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 x g, 3 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Ni²⁺-NTA-Material mit 100 µl Elutionspuffer versetzt und unter Schütteln 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand erneut abgenommen. Mit gleichen Volumina der jeweiligen Überstände wurde die Proteinkonzentration bestimmt sowie Proben für ein SDS-Gel aufbereitet.

2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Gesamtproteingehalt wurde mit der Methode von Bradford photometrisch ermittelt (BRADFORD 1976). Dazu wurden 950 µl Bradford-Reagenz mit 1-20 µl Proteinlösung versetzt und das Gemisch auf 1000 µl mit Ampuwa aufgefüllt. Die Probe wurde 5 min bei RT inkubiert und ihre Extinktion bei 595 nm gegen eine Blindprobe gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Photometer mit einer internen Eichreihe mit BSA in den Konzentrationen von 0,02 bis 0,2 mg/ml (Absorptionsbereich 0 bis 0,8) kalibriert.

Bradford-Reagenz:

10 % (v/v) Phosphorsäure
 5 % (v/v) Ethanol
 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250

2.8.4 Proteinpräparation

2.8.4.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *E. coli*

Nach der Überexpression wurden die Bakterienpellets in Lysepuffer 1 (2 ml/g Pellet) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (6 x 10 Impulse bei 70% der Nennleistung des Ultraschallgerätes) auf Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden nach Zentrifugation bei 14000 x g (30 min, JA-10 Rotor, 4°C) angetrennt. Der Überstand stellte den gewünschten Rohextrakt dar. Sollte der Rohextrakt nicht mit weiter aufgereinigt, sondern nur auf Enzymaktivität überprüft werden, wurde, wie unter Punkt 2.8.4.5 beschrieben, weiterverarbeitet.

Lysepuffer 1:

10 mM Imidazol
300 mM NaCl
50 mM NaH₂PO₄
1 mg Lysozym/ml
pH 8 mit NaOH

2.8.4.2 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus Zellsuspensionskulturen

Die Herstellung eines Proteinrohextraktes aus Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* erfolgte mit tiefgefrorenem Pflanzenmaterial. Die Zellbrocken wurden mit einer stickstoffgekühlten Mühle pulverisiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt, gewogen und das gleiche Volumen an Lysepuffer 2 zugesetzt. Nach 30 min schütteln bei 4°C wurde die Suspension 30 min zentrifugiert (JA-20 Rotor, 9000 rpm, 4°C), das Pellet verworfen und der Überstand mit 75% Ammoniumsulfat versetzt. Nachdem sich die Salzkristalle vollständig gelöst hatten, wurde die Lösung bei 4°C für 1 h inkubiert. Der Überstand wurde nach wiederholtem Zentrifugieren (JA-20 Rotor, 9000 rpm, 4°C) verworfen, das Pellet mit 1 ml Puffer A1 resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 9000 rpm, 4°C) wurde 1 ml des Rohextraktes auf eine Entsalzungssäule (G 25) geladen, die Proteinfraction aufgefangen und zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Lysepuffer 2:	Puffer A1:
0,1 M Tris pH 8,0	50 mM KPi pH 7,0
20 mM β -Mercaptoethanol	0,15 M NaCl

2.8.4.3 Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie

Alle für die Proteinisolierung verwendeten Puffer wurden vor Verwendung frisch angesetzt und 15–30 min entgast. Die Isolierung der mit einem His-tag versehenen PR aus *E. coli* bis zu einer hochreinen Proteinlösung erfolgte durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA Material (SULKOWSKI 1985). Vor dem Auftragen des Rohextraktes wurde das in 25% Ethanol gelagerte Säulenmaterial mit 30 ml Puffer A2 gespült (Flußrate: 2 ml/min). Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurde durch Waschen mit Puffer B unspezifisch gebundene Proteine entfernt, bevor die Proteinelution mit 100% Elutionspuffer gestartet wurde. Die PR-enthaltenden Fraktionen befanden sich im dritten bis sechsten Milliliter des Eluats. Die Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von Na-EDTA (10 mM Endkonzentration) gegen 4 l 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 dialysiert.

Stammlösung:	Puffer A2:	Puffer B:	Elutionspuffer:
300 mM NaCl	100 ml Stammlösung	250 ml Stammlösung	100 ml Stammlösung
50 mM NaH_2PO_4	10 mM Imidazol	40 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	mit NaOH auf pH 8	mit NaOH auf pH 8	

2.8.4.4 Größenausschlußchromatographie

Die Bestimmung der Molmasse der PR erfolgte durch Größenausschlußchromatographie mit einer Sephacryl-Säule. Dafür musste die Retentionszeit des Enzyms auf der Chromatographiesäule mit der einer Eichsubstanz verglichen werden. Die Säule wurde vor dem Beladen mit 60 ml entgastem, destilliertem Wasser (Flußrate 0,15 ml/min, max. 0,15 MPa) und anschließend mit 240 ml Laufpuffer equilibriert (Flußrate 0,15 ml/min, max. 0,15 MPa). Zur Eichung der Säule wurden folgende Proteine unterschiedlicher Größe verwendet: α -Chymotrypsin (25.000 g/mol), Ovalbumin aus Hühnerei (45.000 g/mol) und Rinderserumalbumin (67.000 g/mol). Das Proteingemisch (jeweils 3 mg/ml, 600 μ l) wurde kurz zentrifugiert und 1,2 ml auf die Säule gegeben. Anhand der Retentionszeiten der Proteine wurde eine Eichgerade erstellt. Mit Hilfe dieser konnte nun durch Vergleich

mit der Retentionszeit der PR dessen relative Molmasse bestimmt werden. Für die Größenbestimmung der PR wurde zusätzlich ein interner Standard (α -Chymotrypsin 3 mg/ml, 600 μ l) der reinen Enzymlösung (3 mg/ml, 600 μ l) zugesetzt, bevor diese auf die Säule geladen wurde.

Laufpuffer:

0,05 M Natriumphosphat pH 7,2

0,15 M NaCl

→ sterilfiltriert und entgast

2.8.4.5 Dialyse und Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe eines Dialyseschlauches bei 4°C unter ständigem Rühren umgepuffert. Dabei wurde der Puffer durch die Poren der Membran gepresst und somit ein Konzentrationsgleichgewicht innerhalb und außerhalb der Membran erreicht, während die Proteinmoleküle von der Membran zurückgehalten wurden.

Für das Konzentrieren der Proteinlösung wurden bei Volumina unter 5 ml Vivaspin 500-Konzentratoren (10.000 MWCO) und über 5 ml Centricon-Konzentratoren (12.000-14.000 MWCO) für die Zentrifugation verwendet.

2.8.4.6 Enzymatische Abspaltung des His-tags mit DAPase

Für die Abspaltung der N-terminalen Oligohistidindomäne mit DAPase wurde die gereinigte Proteinlösung gegen 1xTAGzyme-Puffer dialysiert und zu einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die DAPase wurde kurz vor Zugabe zu der Proteinlösung mit 1-10 μ l Cysteamin aktiviert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von DAPase inkubierte die Proteinlösung 10 h bei 20 °C. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine mit Puffer A2 (siehe 2.8.4.3) äquilibrierte Ni²⁺-NTA Säule aufgetragen, um unvollständig verdautes Protein, welches die Oligohistidindomäne noch trägt, sowie andere kontaminierende Protein, die an die Säule binden, abzutrennen. Das Protein ohne His-tag befand sich in dem Durchfluss, welcher weiterverarbeitet wurde. Anschließend wurde die Proteinlösung in einem Dialysepuffer für die darauffolgende Kristallisation (10 mM Tris-HCl pH 7; 1 mM Na-EDTA) umgepuffert.

2.8.4.7 Reduktive Methylierung

Die von RYPNIEWSKI et al. (1993) entwickelte Methode der reduktiven Methylierung der freien Aminogruppen von Proteinen wurde verwendet, um eine Kristallbildung durch Veränderung der Oberflächenspannung des Proteins zu initiieren. Die Methylierung erfolgte nach Reinigung und Dialyse des Enzyms im Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0). Die Lösungen wurden vor Gebrauch frisch hergestellt. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten im Dunkeln. Im ersten Schritt wurde 1 ml der Proteinlösung (5-10 mg/ml) mit 20 µl DMAB versetzt, vorsichtig vermischt, darauf sofort 40 µl 1 M Formaldehyd zugegeben und wiederholt vorsichtig vermengt. Der Inkubationsansatz wurde 2 h inkubiert. Diese Prozedur wurde noch einmal wiederholt. Nach Zugabe von 10 µl DMAB wurde der Ansatz über Nacht (maximal 18 h) inkubiert, anschließend mit 100 µl Ammoniumsulfat versetzt und 2 h inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinlösung in einem Dialysepuffer für die darauffolgende Kristallisation (10 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM DTT) umgepuffert.

2.8.5 Enzymaktivitätstests per HPLC

Es wurde ein HPLC-Aktivitätstest unter Berücksichtigung der Ergebnisse von OBITZ (1995) verwendet, der auch zur Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums sowie der Substratspezifität des Enzyms diente. Es wurde ebenso versucht den Perakin-Aktivitätstest mit dem von GERASIMENKO et al. (2001) entwickelten HPLC-Profil (2) für die Bestimmung kinetischer Daten über die HPLC anzuwenden.

Die HPLC-Laufpuffer wurden vor ihrer Verwendung unter Vakuum filtriert und 20 min im Ultraschallbad entgast. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge. Die Auswertung erfolgte im Falle des Perakins über die Peakflächen von Substrat und Endprodukt, sonst über die Peakflächen. Es wurden Puffer, das Cosubstrat, die Enzymlösung und das Substrat zusammen für 10-120 min bei 37 °C bzw. 45°C und 500 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 200 µl MeOH abgestoppt, die Ansätze für 10 min bei 14000 x g zentrifugiert und 200 µl der partikelfreien Lösung in die HPLC injiziert. Die genauen Bedingungen für Inkubation und Assay sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Neben Perakin wurde das Enzym auch

auf Aktivität folgender Substanzen mit HPLC-Profil (1) getestet: Zimtaldehyd (254 nm), 21-Hydroxyraumaclin (284 nm), Gardneral (225 nm) und Anisaldehyd (254 nm). Die in Klammern stehenden Wellenlängen wurden während des HPLC-Laufes zur Detektion des Substrates verwendet.

Bestandteil	Volumina
Substrat (1 mg/ml in MeOH)	5 µl
1M KPi (pH 7,5)	10 µl
100 µg/ml Proteinlösung	170 µl
20 mM NADPH ₂	15 µl

HPLC-Profil (1):

		Zeit		
		[min]	%A	%B
Trennsäule:	LiChrospher 60, RP-Select B (250 ´ 4 mm)	0	20	80
Vorsäule:	RP-Select B (4 ´ 4 mm)	5	35	65
Inj.-Volumen:	60 µl	8	50	50
Fließmittel A:	Acetonitril	8,1	75	25
Fließmittel B:	50 mM KPi-Puffer (pH 2,3)	10	75	25
Flußrate:	1 ml/min	10,1	20	80
Wellenlänge:	284 nm	15	20	80

HPLC-Profil (2):

		Zeit		
		[min]	%A	%B
Trennsäule:	LiChrospher 60, RP-Select B (250 ´ 4 mm)	0	15	85
Vorsäule:	RP-Select B (4 ´ 4 mm)	5	20	80
Inj.-Volumen:	60 µl	5,1	40	60
Fließmittel A:	Acetonitril	45	40	60
Fließmittel B:	39 mM NaH ₂ PO ₄ + 2,5 mM Hexansulfonsäure (pH 2,5)	45,1	80	20
Flußrate:	1 ml/min	65	80	20
Wellenlänge:	255 nm			

2.8.6 Enzymaktivitätstests über NADPH₂-Abnahme

Enzymaktivitätstests mit Progesteron, Benzaldehyd und Glucose wurden mit dem Lambda 2 Spektrometer durchgeführt. Die PR benötigt für ihre enzymatische Aktivität das Co-

substrat NADPH₂, das während der Reaktion zu NADP⁺ oxidiert wird. Die NADPH₂-Abnahme wurde mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 340 nm verfolgt und quantifiziert. Ein typischer Ansatz zur Bestimmung der NADPH₂-Abnahme setzte sich, wie unter 2.8.5 beschrieben, zusammen, jedoch bezog sich das Volumen in der Quarzküvette auf 0,5 ml. Die katalytische Reaktion erfolgte bei 25°C und startete nachdem NADPH₂ zum Reaktionsansatz pipettiert wurde. Nach 10 min wurde die Messung beendet.

2.9 Syntheseverfahren

2.9.1 Synthese von 21-Hydroxyraumaclin

Die Herstellung von 21-Hydroxyraumaclin erfolgte durch eine enzymunabhängige, flavinkatalysierte Photoreaktion nach der Vorschrift von OBITZ (1995). Die Photooxidation wurde erstmals am Beispiel der Transformation von Dihydrochanoajmalin zu Raumaclin von ENDREß UND STÖCKIGT (1993) untersucht. Es wurden 30 µmol Ajmalin mit 250 µl Methanol in einer Petrischale gelöst und mit 3,8 mg Riboflavin und 4,4 ml 0,1 M Citrat-Phosphatpuffer pH 6 versetzt. Die Petrischalen wurden auf Eis gesetzt und mit einer 1000 Watt Halogenlampe belichtet. Nach 20 min, 40 min, 60 min und 90 min wurde 10 µl der Lösung abgenommen und der Reaktionsverlauf per HPLC kontrolliert. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit 1M KOH auf pH 9 eingestellt und das Alkaloid mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit N₂ eingengt und über DC in Fließmittel B gereinigt. 21-Hydroxyraumaclin zeigte sich als Bande bei einem R_f = 0,19.

2.9.2 Synthese von Raucaffrinolin

Die Synthese von Raucaffrinolin erfolgte durch Reduktion der Aldehydgruppe des Perakins zu einem primären Alkohol mit einem Überschuß an Natriumborhydrid. Für die Reaktion lag Perakin in 0,1 M KPi-Puffer pH 6 vor. Nach einer Reaktionszeit von 10 min wurden die Alkaloide mit Ethylacetat ausgeschüttelt und über DC gereinigt.

2.10 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde verwendet, um Perakin und Raucaffrinolin aus einem Ansatz vor und nach dem Enzymaktivitätsassay aufzutrennen und diese später mas-

senspektrometrisch zu identifizieren. Die zu untersuchenden Lösungen wurden bandenförmig auf DC aufgetragen und über eine Strecke von 15 cm in Fließmittel A aufgetrennt. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung des synthetisierten 21-Hydroxyraumaclins wurde die DC mit CAS-Reagenz besprüht. Unter UV-Licht wurden Flecken der Substanzen detektiert sowie markiert und mit einem Spatel von der DC-Platte ausgekratzt. Die Alkaloide wurden von der Kieselgelmatrix mit einer Lösung aus Dichlormethan und Methanol (7:3) eluiert. Das Eluat wurde zur Reduktion des Volumens mit Stickstoff eingengt und in 30 µl Dichlormethan : Methanol (7:3) aufgenommen. Über eine Kapillare wurde das gesamte Volumen in einen Aluminiumtiegel gebracht und für die MS-Messung mit einem Fön vollständig getrocknet.

Fließmittel A:	Fließmittel B:	CAS-Reagenz:
88 ml Chloroform	80 ml Chloroform	5% Ammoniumcer(IV)sulfat
12 ml Methanol	20 ml MeOH	85% Phosphorsäure
1 ml Ammoniak	0,2 ml Ammoniak	→ unter Erwärmen lösen

2.11 Massenspektrometrie

Nach dünnschichtchromatographischer Aufreinigung wurden MS-Spektren von Perakin, dem mutmaßlichen Endprodukt Raucaffrinolin, Raumaclin und synthetisiertem 21-Hydroxyraumaclin durchgeführt. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte durch Elektronenstoss-Ionisation bei 70 eV. Die im Tiegel getrocknete Lösung wurde über Direkteinlaß zwischen 100 und 320°C, bei einer Ionenquelle von 200°C verdampft.

Massenspektrometrische Untersuchungen zur Detektion von Metallionen in der PR wurden am Institut für anorganische und analytische Chemie (Johannes Gutenberg Universität Mainz) von W. Brüchert durchgeführt. Die Trennung des Enzyms von anderweitig gebundenen Metallionen erfolgte über die Größenausschlußchromatographie. Die Detektion des Enzyms (über das Element Schwefel) und der Metalle wurde mit Hilfe der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) durchgeführt.

2.12 Kristallographische Arbeiten

2.12.1 Kristallisation der PR

Für die PR mußten die Kristallisationsbedingungen individuell ausgearbeitet werden. Zum Austesten einer größeren Anzahl von Bedingungen wurde der unvollständigen faktoriellen Suche nach JANCARIK UND KIM (1991) gefolgt. Demnach werden anfängliche Kristallisationsbedingungen durch Screenings optimiert. Sind durch langsame Änderung der äußeren Bedingungen bestimmte Fällungsmittel- und Proteinkonzentrationen erreicht, erzwingen diese intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Idealfall die Anordnung zum Proteinkristall bewirken. Geeignete Fällungsmittel sind anorganische Salze, organische Lösungsmittel oder Polyethylenglykole unterschiedlicher Molekularmasse. Neben der Art des Fällungsmittels, seiner Konzentration und der Proteinkonzentration haben auch andere Faktoren wie die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke einen entscheidenden Einfluß auf die Kristallisation von Proteinen.

Für die Kristallisation wurden die aufgereinigten Proteinproben konzentriert und kurz zentrifugiert, um eventuell vorhandene Verunreinigungen abzutrennen. Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen (MC-PHERSON 1990). Bei der hanging drop-Methode wurde ein Tropfen aus 2 µl Proteinlösung und 2 µl Fällungspuffer aus dem Reservoir auf die Unterseite eines silikonisierten Deckgläschens pipettiert. Dieses wurde auf den mit niedrigviskosem Silikonöl bedeckten Rand einer mit 700 bzw. 1000 µl Fällungspuffer gefüllten Reservoirkammer der Linbro-Platte befestigt. Die Kristallisationsansätze wurden wahlweise bei 20°C im Trockenschrank und bei 4°C im Kühlraum gelagert. Die Ergebnisse wurden regelmäßig unter dem Stereomikroskop beobachtet und dokumentiert.

2.12.2 Datensammlung

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden nach der Rotationsmethode von ARNDT UND WONACOTT (1977) aufgenommen. Dazu wurde der Kristall in einem Kryo-Puffer aus 80 mM Na-Citrat (pH 5,6), 27 % (w/v) PEG 4.000 und 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen und mit Hilfe einer Nylonschleife in gekühltem Stickstoff schockgefroren. Die Nylonschleife wurde mit einer magnetischen Halterung auf einem Goniometerkopf befestigt und der

Kristall im Primärstrahlengang zentriert. Die Aufnahme der Diffraktionsdaten der Kristalle erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. U. Müller auf einem Imaging Flächendetektor (MarResearch, Norderstedt), in Verbindung mit der beamline BL14.1 am BESSY in Berlin. Als Meßbedingungen wurden gewählt: Primärstrahlwellenlänge 0.91841 Å, Kristall-Detektor-Abstand 240 mm, Belichtungszeit 5 s, Meßtemperatur 100 K.

2.12.3 Herstellung von Schwermetallatomderivaten

Für die Herstellung der Schwermetallatomderivate wurde die Haut des Kristallisationstropfens mit Hilfe einer Akkupunktturnadel entfernt und die zu derivatisierenden Kristalle mit Hilfe einer Nylonschleife in die Schwermetalllösung überführt. Bei diesem Vorgang, auch „Soaken“ genannt, dringen Schwermetallionen in den Kristall ein. Die Inkubation in dieser Lösung erfolgte über einen variablen Zeitraum zwischen 20 und 60 min. Für eine reproduzierbare Herstellung der Schwermetallatomderivate und Stabilität der Kristalle war es wichtig, die Schwermetalllösungen nicht in Wasser, sondern in der Stabilisierungslösung herzustellen. Die Kristalle wurden direkt nach der Derivatisierung ohne Cryopuffer in flüssigen Stickstoff eingefroren und röntgenkristallographisch untersucht.

Schwermetalllösung:

27% PEG 4000

80 mM Na-Citrat pH 5,6

10 mM K₂PtCl₄

2.12.4 Strukturaufklärung

Die Aufklärung der nativen Struktur erfolgte von Dr. U. Müller (BESSY, Berlin) mit Hilfe des Programmes Phaser (Molekularer Ersatz, READ 2001). Die kristallographische Verfeinerung und Berechnung der Elektronendichte von Datensätzen wurden mit den Programmen Refmac5 (Molekulare Verfeinerung, MURSHUDOV et al. 1997), CNS und Coot (Molekülgrafik, EMSLEY UND COWTAN 2004) durchgeführt. Die Komplettierung und Verfeinerung des nativen Strukturmodells sowie die Modellierung der NADPH₂-Bindung im Enzym erfolgte von Dr. S. Panjikar (EMBL Hamburg c/o DESY) unter Verwendung der Programme SigmaA (Bestimmung der Elektronendichte, READ 1986), dmmulti (Methode der Solvensglättung zur Phasenberechnung, COWTAN 1994) und

ARP/wARP (automatischer Modellbau, PERRAKIS et al. 1999). Die bildliche Darstellung wurde mit den Programmen PyMOL (DELANO 2003), RASMOL (SAYLE UND MILNER-WHITE 1995) und MOLSCRIPT (KRAULIS 1991) durchgeführt.

2.13 Datenbankenrecherche

Zu DNA- und Protein-Sequenzanalysen, für PCR-Primer-Design, Sequenzvergleiche sowie Strukturvorhersagen wurden u. a. folgende Programme verwendet:

ExPASy:	www.expasy.org
ClustalW:	www.ebi.ac.uk/clustalw/
NCBI:	www.ncbi.nlm.nih.gov/
FASTA:	www.ebi.ac.uk/fasta33/
PDB	www.rcsb.org/pdb/
MEROPS:	www.merops.sanger.ac.uk/
AKR Superfamily:	www.med.upenn.edu/akr/
Brenda:	www.brenda.uni-koeln.de/
Scop:	www.scop.berkeley.edu/data/scop.b.html
SWISS-MODEL	www.swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html

3 Ergebnisse

3.1 RNA-Isolierung aus *R. serpentina* und cDNA-Synthese

Die Isolierung des Gens für die PR begann mit der Überprüfung der Zelllinien *R. serpentina* T₃₀, *R. serpentina* 02, *R. serpentina* Br sowie *R. serpentina* auf Enzymaktivität mit dem Substrat Perakin. Nach Gewinnung des Rohextraktes wurde die Proteinfraction nach Größenausschlußchromatographie aufgefangen und im Aktivitätstest überprüft. Es wurde bei allen Zelllinien Enzymaktivität detektiert, jedoch wies *R. serpentina* Br die quantitativ höchste Aktivität auf. Diese Suspensionskultur wurde als Grundlage für die Isolierung von RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit verwendet (Abbildung 4).

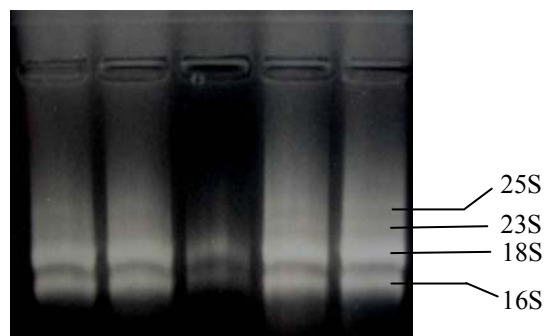


Abbildung 4. Gesamt-RNA isoliert aus *R. serpentina* Br im Formaldehyd-Agarosegel. Kennzeichnet sind die pflanzlichen ribosomalen Untereinheiten.

Die cDNA-Synthese erfolgte durch Umschreiben der Gesamt-RNA mit dem Enzym reverse Transkriptase. In verschiedenen Ansätzen wurden als Primer der Oligo dT-Primer sowie der inosinhaltige 32rev-Primer eingesetzt.

3.2 PCR mit degenerierten Primern

Zu Beginn der Arbeit lagen zwei 12–14 Aminosäure lange Fragmente vor (Tabelle 1) sowie aus ihnen abgeleitete degenerierte Primer mit Inosin. Aus diesen Oligopeptiden wurden nochmals degenerierte Primer entwickelt (Tabelle 2), die nach Umschreiben der aus *R. serpentina* Br isolierten RNA in cDNA für die darauffolgende PCR benötigt wurden. Da degenerierte Primer, aufgrund ihrer geringen Schmelztemperatur und in Folge dessen der niedrigen Annealingtemperatur, sehr unspezifisch an die DNA-Matrize binden, kommt es meist zu Fehlpaarungen und damit zu unspezifischen PCR-Produkten.

Nach Variation verschiedener chemischer und physikalischer PCR-Parameter ergab eine PCR unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen nach gelelektrophoretischer Auftrennung auch eine DNA-Bande bei ca. 500 bp (Abbildung 5).

Tabelle 1. Proteinfragmente der mutmaßlichen PR nach LysC-Verdau und N-terminaler Sequenzierung (Warzecha, 1996).

Proteinfragment	Aminosäure-/DNA-Sequenz
32	Q I Y F R I E A L A Q K
39	F G I S E L D F S G L V A K

Tabelle 2. Degenerierte Primer abgeleitet von Proteinfragmenten der PR (Tabelle 1). R = A/G, Y = C/T, S = C/G, D = A/G/T, H = A/C/T, W = A/T, I = Inosin.

Primer	Degenerierte Nukleotidsequenz
39for	5' –TTY GGI ATH WSI GAR YTI GAY TTY WSI GG- 3'
39for1	5' –TT(CT) GG(AGCT) AT(ACT) (AT)(GC)(AGCT) GA(AG) (CT)T(AGCT) GA(CT) TT-3'
32rev	5'-TTY TGI GCI ARI GCY TCD ATI CWR AAR TA-3'
32rev1	5' –TG(AGCT) A(AG) (AGCT) GC(CT) TC(AGT) AT(AGCT) C(GT)(AG) AA(AG) TA- 3'

Tabelle 3. Bedingungen und Programm der PCR mit degenerierten Primer.

Bestandteil	Volumen [µl]	Schritt	Zyklen	Zeit [min]	Temperatur [°C]
cDNA (32rev)	1	Denaturierung	1	5	95
Puffer	2	Denaturierung	4/30	1	95
Primer[10pmol]:	je 1	Annealing	4/30	1	41/46
39for und		Elongation	4/30	2	72
32rev1		Endelongation	1	10	72
MgCl ₂	1				
dNTPs	1				
Taq-Polymerase	0,5				
Ampuwa	12,5				

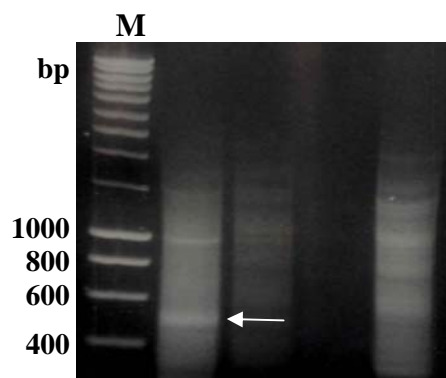


Abbildung 5. DNA-Banden im Agarosegel nach PCR mit degenerierten Primern. Die mit dem Pfeil markierte Bande wurde ausgeschnitten, in den pGEM-T-Vektor ligiert, subkloniert und sequenziert. M = Marker

Um für die Sequenzierung ausreichend viel DNA vorliegen zu haben, wurde das PCR-Produkt aus dem Gel geschnitten, in den pGEM-T-Vektor ligiert und in *E. coli* kloniert. Das vervielfältigte Plasmid wurde aus den Bakterien isoliert und das einklonierte PCR-Fragment sequenziert. In der aus der DNA-Sequenz übersetzten Aminosäuresequenz wurden die vollständigen Aminosäure-Fragmente, aus denen die degenerierten Primer entwickelt wurden, wieder gefunden.

3.3 Ermittlung des Vollängenklones mit RACE-PR

Um den Vollängenklon zu erhalten, wurde die Methode der RACE-PCR (Rapid amplifying cDNA ends) angewandt. Mit Hilfe des GeneRacer Kits (Invitrogen) wurde cDNA hergestellt, an deren 5'- und 3'-Ende Adapter ligiert sind. Die genspezifischen Primer (GSP) sind in Tabelle 4 aufgeführt. Durch eine PCR mit dem GSP 3' und dem zum 5'-Adapter komplementären Adapterprimer erhielt man das 5'-Ende des Gens mit dem Startcodon (Tabelle 5). Entsprechendes galt für den 3'-Adapter und GSP 5'-Primer mit denen das 3'-Ende des Gens mit dem Stoppcodon ermittelt wurde.

Tabelle 4. 5'- und 3'-Primer für die RACE-PCR.

Primer	Nukleotidsequenz
5'-RACE-PR	5'-CT CCA GAC TAT GTC CGC TCC TGC TGT GAG G- 3'
3'-RACE-PR	5'-CAT CAC ATC CCA GAT TTG TTG GGG AGA ACC- 3'

Tabelle 5. RACE-PCR zur Erlangung des Vollängenklones. GSP= genspezifischer Primer.

Bestandteil	Ansatz 3'-Ende [µl]		Ansatz 5'-Ende [µl]	
cDNA		2		2
10xPuffer		2		2
Primer[10pmol]	forward	Gen Racer 3' 1	Gen Racer 5' 1	
	reverse	GSP-5' 1	GSP-3' 1	
dNT's [40 mM]		1		1
Taq-Polymerase		0,5		0,5
Ampuwa		12,5		12,5

Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert und dieser in Top10-Zellen transformiert (Abbildung 6). Nach Plasmidpräparation wurden die Teilfragmente sequenziert.

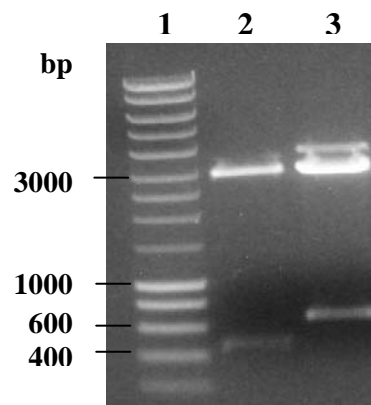


Abbildung 6. Restriktionsanalysen der in pGEM-T-Vektoren subklonierten PCR-Produkte der 3'- und 5'-RACE-PCR. Für die Restriktion wurde EcoR I verwendet. Marker (1), PCR-Produkt der 5'-RACE-PCR (2), PCR-Produkt der 3'-RACE-PCR (3)

Im nächsten Schritt wurden Primer entwickelt, die das Start- und Stoppcodon enthielten und von den Restriktionsschnittstellen SphI und SacII für Ligation in den pQE-2-Vektor flankiert wurden (Tabelle 6). Das PCR-Produkt wurde in pQE-2 ligiert, in Top10-Zellen transformiert und sequenziert. Der ermittelte Vollängenklon hatte eine Länge von 1017 bp (Abbildung 7, Abbildung 8). Der pQE-2-Vektor verfügt am N-Terminus über eine zusätzliche Sequenz (6xHis-tag), welche die darauffolgende Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie ermöglichte.

5'-ATG CCA AGA GTT AAG CTG GGA ACC CAA GGG CTC GAG GTT TCA AAA TTA GGA TTTT GGC TGT ATG GGG CTT TCC GGA GAC	78
M P R V K L G T Q G L E V S K L G F G C M G L S G D	26
TAC AAT GAT GCT CTT CCT GAG GAG CAA GGA ATT GCA GTT ATC AAG GAG GCC TTC AAT TGT GGA ATA ACA TTC TTT GAT	156
Y N D A L P E E Q G I A V I K E A F N C G I T F F D	52
ACA TCA GAT ATT TAT GGC GAG AAC GGT TCT AAT GAA TTG CTC GGG AAG GCA CTG AAA CAA TTG CCT CGA GAA AAG	234
T S D I Y G E N G S N E E L L G K A L K Q L P R E K	78
ATC CAG GTG GGA ACG AAG TTT GGT ATA CAT GAG ATT GGT TTT GGT TTT TCT GGG GTC AAA GCT AAA GGT ACT CCA GAC	312
I Q V G T K F G I H E I G F G F S G V K A K G T P D	104
TAT GTC CGC TCC TGC TGT GAG GCT AGC CTG AAG CGC CTT GAT GTG GAC TAT ATC GAT CTC TTC TAC ATA CAT CGC ATA	390
Y V R S C E A S L K R L D V D Y I D L F Y I H R I	130
GAT ACA ACA GTG CCT ATT GAG ATA ACT ATG GGT GAA CTT AAG AAG TTA GTT GAA GAA GGA AAA ATA AAG TAC GTT GGG	468
D T V P I E I T M G E L K K L V E E G K I K Y V G	156
CTA TCT GAA GCT AGT CCG GAC ACA ATA AGG AGG GCA CAT GCC GTT CAT CCT GTA ACT GCT TTA CAA ATT GAG TAT TCT	546
L S E A S P D T I R R A H A V H P V T A L Q I E Y S	182
CTG TGG ACA CGG GAC ATT GAA GAC GAG ATA GTG CCT CTG TGC AGA CAA CTC GGA ATT GGC ATA GTT CCA TAC AGC CCT	624
L W T R D I E D E I V P L C R Q L G I G I V P Y S P	208
ATT GGC CGG GGT CTT TTT GCC GGG AAG GCC ATT AAG GAA AGC CTT CCA GAA AAC AGT GTC TTG ACA CAT CCC AGA	702
I G R G L F A G K A I K E S L P E N S V L T S H P R	234
TTT GTT GGG GAG AAC CTT GAA AAG AAC AAG CAA ATA TAT CGT ATA GAA GCA TTG TCA CAA AAG CAT GGA TGT ACT	780
F V G E N L E K N K Q I Y Y R I E A L S Q K H G C T	260
CCT GTT CAA CTT GCT CTT TGG GTT TGG GGC GAA GAT GTT GTA CCT ATT CCT GGT ACC ACA AAG ATA AAA	858
P V Q L A L A W V L H Q G E D V V P I P G T T K I K	286
AAT CTT CAC AAT AAT GTT GGT GCT CTG AAA GTA AAG CTC ACG AAA GAA GAT TTG AAA GAG ATT TCT GAT GCA GTT CCT	936
N L H N N V G A L K V K L T K E D L K E I S D A V P	312
CTT GAT GAG GTG GCC GGG GAG AGC ATC CAT GAA GTT ATT GCT GTG ACC AAC TGG AAG TTT GCC AAT ACA CCA CCA TTG	1014
L D E V A G E S I H E V I A V T N W K F A N T P P L	338
AAG-3'	1017
K	339

Abbildung 7. Vollständige DNA- und Proteinsequenz der PR. Gelb: Teilfragment nach PCR mit degenerierten Primern; Rot: degenerierte Primer; Unterstrichen: nach Reinigung und Verdau erhaltene Oligopeptide; Grün: 3'- und 5'-GSP-Primer zur Amplifizierung des Volllängenklones durch RACE-PCR; Fett: Lysine an den Positionen 100, 244 und 296 wurden zu Alanin mutiert.

Tabelle 6. Forward- und reverse Primer mit Sph I- und Sac II-Schnittstelle für die Klonierung in den pQE-2-Vektor (kursiv).

Primer	Nukleotidsequenz
PRfor_pQE2	5' - <i>GCA TGC</i> GCA AAT GGC CGC GGT GCA GAT GC- 3'
PRrev_pQE2	5' - <i>CCG CGG</i> TTA CTT CAA TGG TGG TGT ATT- 3'

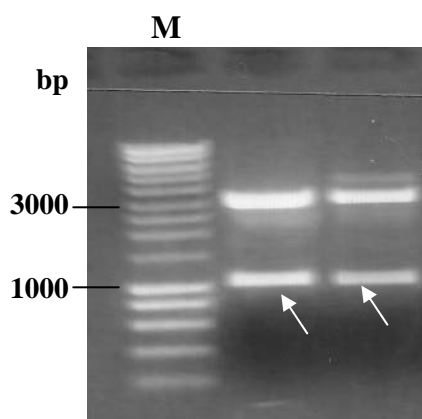


Abbildung 8. Restriktionsanalyse der in pQE-2-Vektoren klonierten PCR-Produkte. Für die Restriktion wurden Sph I und Sac II verwendet. Pfeile: Volllängenklon des gesuchten PR-Gens. Marker (M)

3.4 Expressionsversuche

Die mit einem (His)₆-tag fusionierte PR wurde nach Expression in M15-Zellen durch eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt (Abbildung 9). Für den Zellaufschluß wurde ein Lysepuffer mit 10 mM Imidazol verwendet. Nach dem Beladen der Säule wurden mit 40 mM Imidazol unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix entfernt. Die Elution der PR von der Nickel-Säule erfolgte mit 100% 250 mM Imidazol bei pH 8,0. Die ersten 6 ml des Eluats enthielten fast das komplette Protein. Eine quantitativ optimale Expressionsrate erfolgte nach Induktion von 0,5 mM IPTG und Wachstum von 24 h bei 25°C.

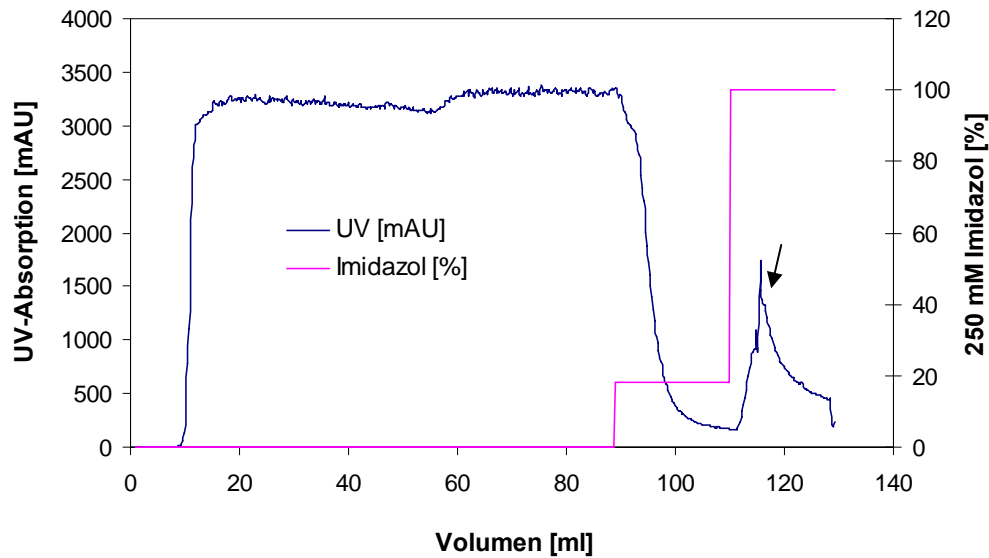
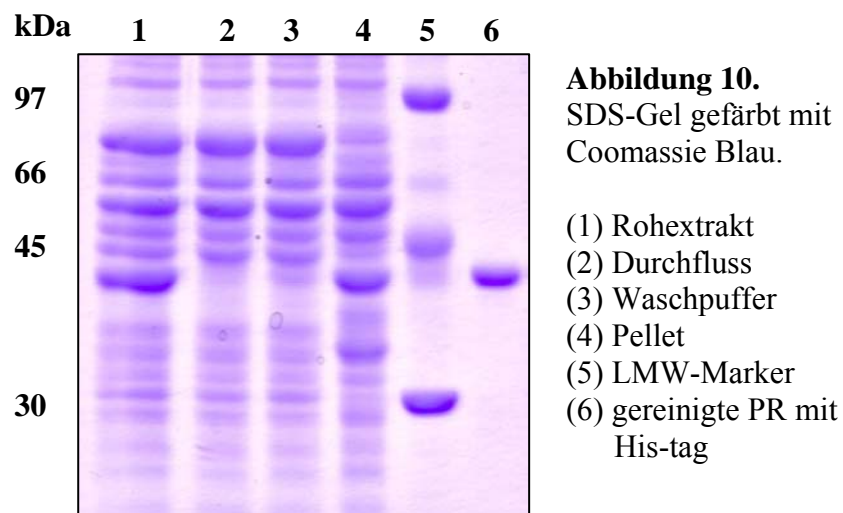


Abbildung 9. Elutionsprofil der PR an der Ni^{2+} -NTA-Matrix. Nach Beladen der Säule mit dem Rohextrakt wurde die Säule mit 40mM Imidazol gewaschen und anschließend das His-markierte Protein (Pfeil) mit 250 mM Imidazol eluiert.

Es wurden 10 μl verschiedener Fraktionen (Rohextrakt, Durchfluss während des Beladens der Säule, Durchfluss während des Waschens mit 40 mM Imidazol, Bakterienpellet sowie Eluat) auf ein 11 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Aus dem in Abbildung 10 dargestellten Gel ist ersichtlich, dass das ca. 40



kDa große Protein nach dem Waschen mit 40 mM Imidazol ohne Verunreinigung von der Ni-NTA-Matrix eluiert wurde. Deshalb wurde kein zusätzlicher Reinigungsschritt (z.B. mit MonoQ) nachgeschaltet. Die im Pellet befindliche PR ließ auf Bildung von Einschlusskörpern während der Überexpression in *E. coli* schließen. Da aus 1 l Bakterien ca.

10 mg Enzym gereinigt werden konnte, war es für die Folgearbeiten nicht nötig, die im Pellet befindlichen Einschlußkörper in aktives lösliches Enzym rückzugewinnen.

3.5 Enzymaktivitätstest mit Perakin

Im Aktivitätstest wurden verschiedene, während der Enzymreinigung erlangte Fraktionen (Rohextrakt, Durchfluss, Waschpuffer, Eluat) mit und ohne NADPH₂ auf Perakinumsatz überprüft. Im Rohextrakt sowie in der Waschpufferfraktion wurde in Gegenwart von NADPH₂ im HPLC-Profil geringe Aktivität gefunden. Dagegen wurde in der gereinigten Proteinfraction Perakin zu 100% enzymatisch umgesetzt, während in einem Parallelansatz ohne NADPH₂ dies nicht erfolgte (Abbildung 11).

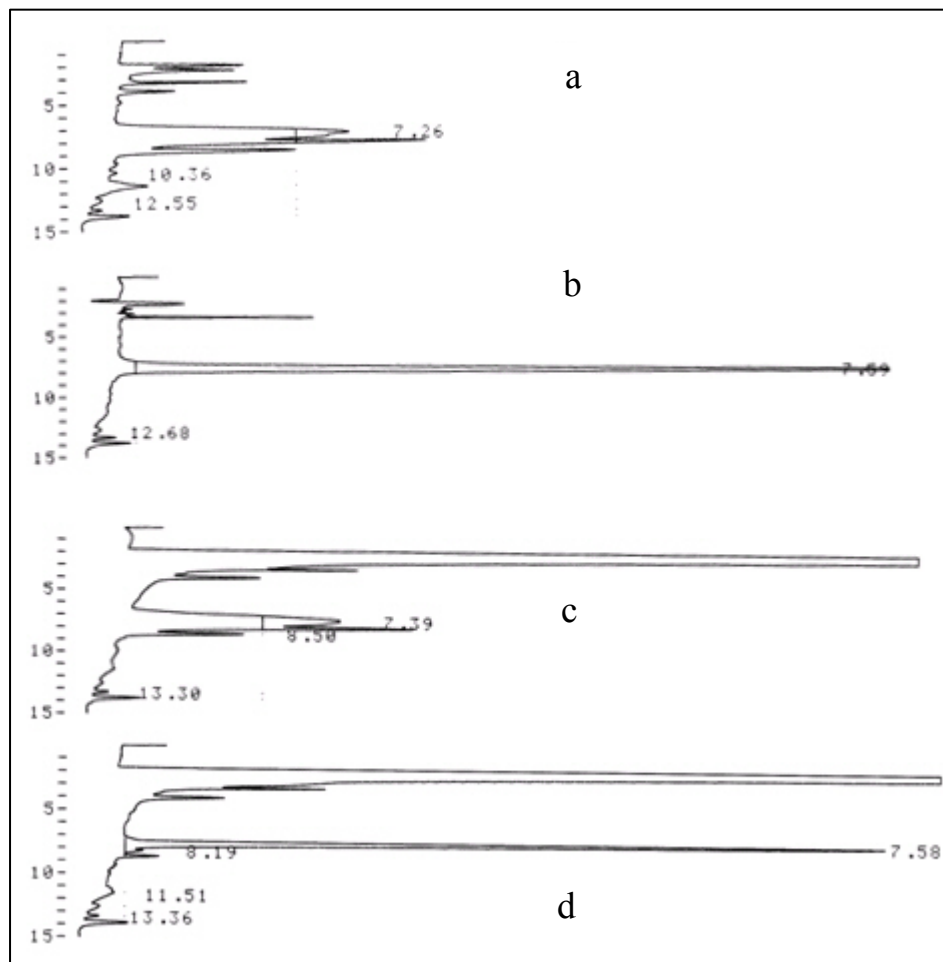
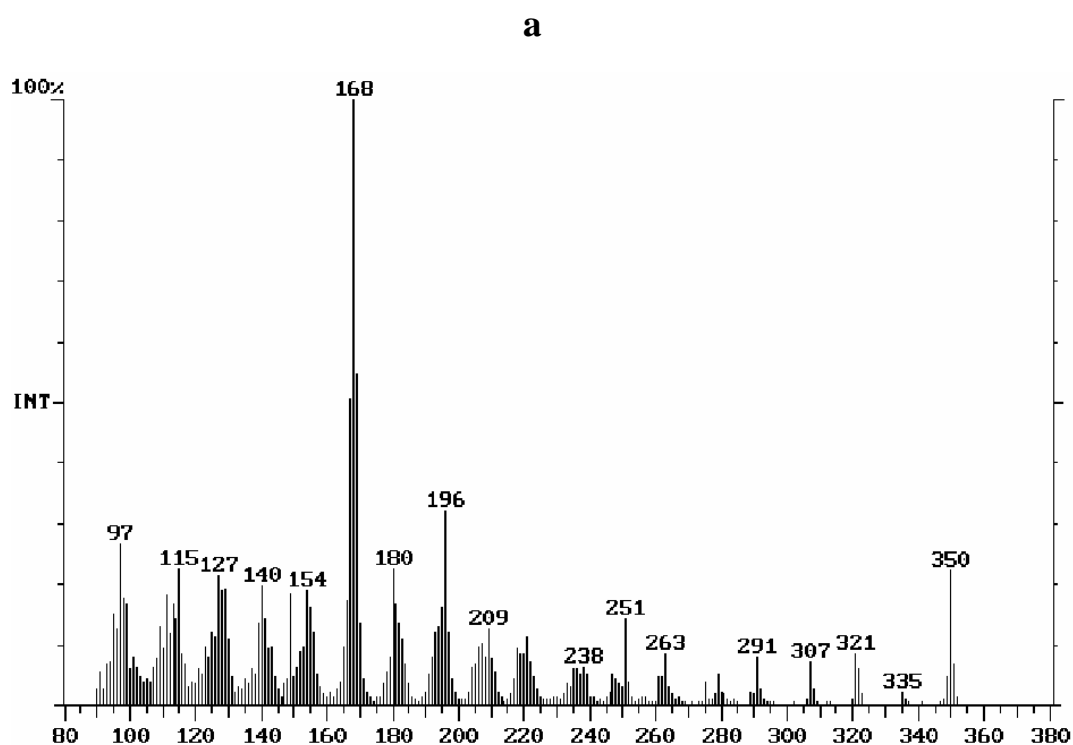


Abbildung 11. HPLC-Profile der Referenzen Perakin (a) und Raucaffrinolin (b) sowie der gereinigten Enzymlösung ohne (c) und mit NADPH₂ (d). Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Die Ansätze enthielten 170 µl Enzymlösung (0,1 mg/ml), 10 µl 1M KPi (pH 7,5), 15 µl 20 mM NADPH₂ und 5 µl Perakin (1mg/ml).

3.6 Identifizierung des Endproduktes über DC und MS

Das gereinigte Enzym wurde mit 5 µg Perakin und NADPH₂ versetzt und 30 Min bei 37°C inkubiert. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung wurden die, im Ansatz genau in Höhe der mitlaufenden Referenzen Perakin und Raucaffrinolin, auftretenden Substanzen ausgekratzt. Zum Zeitpunkt t = 0 befand sich nur ein Fleck im Ansatz auf Höhe der Perakinreferenz. Nach 10 min Reaktionszeit erschien ein zweiter, jedoch schwächerer, Fleck in Höhe des Raucaffrins. Nach 30 Min war der Perakinfleck verschwunden und das mutmaßliche Raucaffrinolin die einzig verbliebene Substanz im Reaktionsansatz. Nach Eluation von der Kieselgelmatrix wurden die Proben mit Stickstoff getrocknet, in Lösungsmittel aufgenommen und in Tiegel für die Massenspektrometrie eingebracht. Die massenspektrometrische Analyse der Substanzen ist in Abbildung 12 a,b dargestellt. Dem typischen Zerfallsmuster und den Ergebnissen aus HPLC und DC nach zu urteilen, konnte das Enzymprodukt damit eindeutig als Raucaffrinolin identifiziert werden.



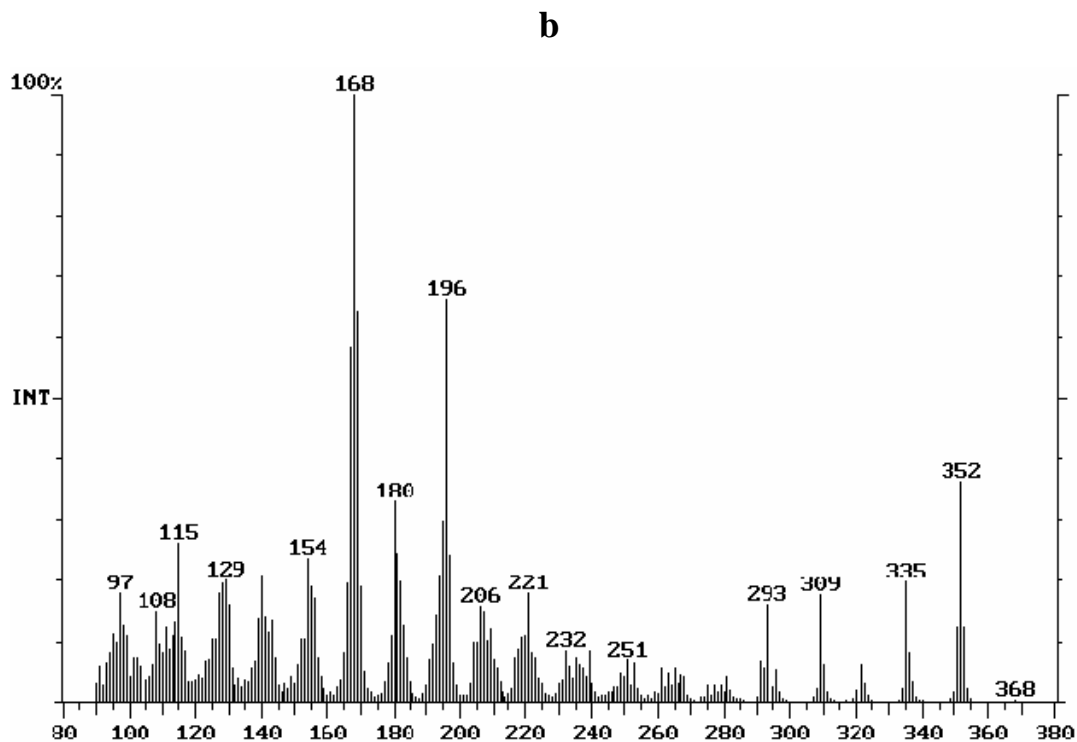


Abbildung 12. EI-Massenspektren von dem aus pflanzlichen Suspensionskulturen isolierten Perakin (a) und von dem rekombinanten Protein enzymatisch gebildeten Raucaffrinolin (b). Basispeak: 168 typisch für Indolalkaloide. Massenpeak: 350 für Perakin bzw. 352 für Raucaffrinolin.

3.7 Stabilität der PR

Es zeigte sich, dass die PR nach Expression und Reinigung aus *E. coli* nicht stabil ist. Die Degeneration in zwei Hauptfragmente (~ 28 kDa und ~ 10 kDa) begann bereits nach der Elution vom Ni^{2+} -NTA-Material. Nach einer Woche Lagerung des gereinigten Enzyms bei Raumtemperatur war die 40 kDa Bande auf SDS-Gel nicht mehr sichtbar (Abbildung 13).

Es wurden Bedingungen gefunden, unter denen die PR auch nach Wochen bei Raumtemperatur stabil bleibt. Nach Zugabe eines speziellen Protease-Inhibitor-Cocktails zum Bakterienrohextrakt und anschließender Ni-NTA-Reinigung wurde dem gereinigten Enzym Na-EDTA zugesetzt. Zum einen sollten die Proteaseinhibitoren im Rohextrakt vorhandene Proteasen eliminieren. Zum anderen bietet EDTA ebenfalls die Möglichkeit Proteasen in ihrer Aktivität zu hemmen, da es zweiwertige Kationen, wie Nickelionen, bindet und damit den Proteasen einen wichtigen Cofaktor nimmt. Die somit gewonnene Stabilität des Enzyms war für die anschließende Kristallisation eine elementare Voraussetzung.

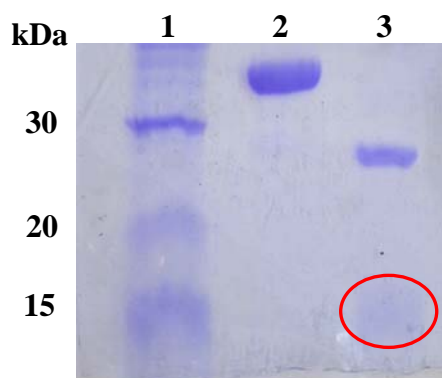


Abbildung 13. SDS-Gel gefärbt mit Coomassie Blau. Rot umkreist: kleines Proteinfragment nur als Schatten sichtbar.
 (1) LMW-Marker
 (2) PR direkt nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie
 (3) degradierte PR nach einer Woche Lagerung bei 25°C

3.8 Mutationsexperimente

Im Zuge der Stabilitätsversuche der PR wurden an drei Stellen der DNA-Sequenz Punktmutationen eingefügt. Die Verminderung der Oberflächenentropie von Proteinen durch Lysin→Alanin- und Lysin→Arginin-Mutationen führte bei CZEPAS et al. (2004) zu einer Verbesserung der Kristallqualität. Drei Lysine der Positionen 100, 244 und 296 der PR-Sequenz wurden zu Alanin mutiert. Dafür wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Primer entwickelt. Für die PCR wurde hierbei die lesegenaue Phusion-Polymerase von NEB verwendet. Es wurden folgende Mutanten erzeugt: Lys100Ala, Lys244Ala, Lys296Ala, Lys100,244,296Ala. Für die Mutagenese der dreifach-Mutante

Tabelle 7. Primer für Mutationsexperimente Lysin→Alanin an den Positionen 100, 244 und 296. Fett: verändertes Basentriplett

Primer	Nukleotidsequenz
Lys100Ala_for	5' –GGG GTC AAA GCT GCG GGT ACT CCA- 3'
Lys100Ala_rev	5' –TGG AGT ACC CGC AGC TTT GAC CCC- 3'
Lys244Ala_for	5' –CTT GAA AAG AAC GCG CAA ATA TAT TAT- 3'
Lys244Ala_rev	5' –ATA ATA TAT TTG TTG CGC GTT ATT TTC AAG- 3'
Lys296Ala_for	5' –GTT GGT GCT CTG GCG GTA AAG CTC- 3'
Lys296Ala_rev	5' –GAG CTT TAC CGC CAG AGC ACC AAC- 3'

(Lys100,244,296Ala) wurde als Template die zweifach-Mutante (Lys100,244Ala) verwendet. Die Expressionsraten sowie Enzymaktivitäten der Mutanten wurden im Vergleich zum nativen Enzym von den Mutationen nicht beeinflusst.

3.9 Sequenzalignment

Mit Hilfe der Proteindatenbank UniProt wurde die Aminosäuresequenz der PR mit anderen Proteinen verglichen (Abbildung 14). Es stellte sich heraus, dass die Sequenz des Enzyms starke Homologie zu putativen Reduktasen der Superfamilie der Aldo/Keto-Reduktasen (AKR) besitzt. In der umseitigen Abbildung wurde die Aminosäuresequenz der PR mit denen von 5 Proteinen verglichen, die die höchsten Identitäten mit der PR besitzen. Die Abkürzungen der Proteine stehen für eine Oxidoreduktase aus *Oryza sativa* (72% Sequenzidentität), ein putatives Auxin-induziertes Protein aus *O. sativa* (68% Sequenzidentität), F8A5.21 Protein und F8A5.24 Protein aus *Arabidopsis thaliana* (60% und 59% Sequenzidentität) sowie eine AKR aus *Manihot esculenta* (57% Sequenzidentität).

1	PR Oxidoreduktase Putative AKR F8A5.21 Protein F8A5.24 Protein AKR	80 MPRVKLG TO GLEV S KL GF CG ML SG Y ND AL PE EQ GI AV IK EAF NC GL TF FD TS DI YGEN S NE EL LG KAL Q LP RE KIQ IPRVKLG TO GLEV S KL GF CG ML SG Y ND AL PE EQ GI AV IK EAF NC GL TF FD TS DI YGEN S NE EL LG KAL Q LP RE KIQ MPRVKLG TR GLEV S KL GF CG ML SG Y ND AL PE EQ GI AV IK EAF NC GL TF FD TS DI YGEN S NE EL LG KAL Q LP RE QVQ VRR IK LG S Q GL EV S Q GL GC ML SA FY GT PK PE TE AI LI HH A I HS GV IF LD TS DI Y GP E - T NE LL S KAL K DG V RE K VE VRR IK LG S Q GL EV S Q GL GC ML SA FY GT PK PE TE AI LI HH A I HS GV IF LD TS DI Y GP E - T NE LL S KAL K DG V RE K VE VKR IK LG S Q GL EV S Q GL GC MS SA FY GP PK PE SD M IAL I HH A INT GV IF FD TS DI Y GP H - T NE LL LG KAL K DG I R KK VE
81	PR Oxidoreduktase Putative AKR F8A5.21 Protein F8A5.24 Protein AKR	160 VG TK FG I HE IG FS GV K AK GT PD Y VR SC CE AS LKR LD VD Y ID LF YI HR ID TT VP IE IT MG EL KK LV EE GK IK Y VG L SE AS V AT K FG IA GF D AN GL V KT PD Y VR AC CE AS L ER LA VD Y ID LY Q HR ID QS VP IE ET MG EL KK LV EE G KV K F VG L SE AS V AT K FG IR R - G AD GV RA VG R PE Y VR AC CE AS L GR LV DI LY Q HR VD TT PI ED IT IG EL KK LV EE G KV RY I GL SE AS P L AT K FG IS - Y A EG N RE IK GD P AY Y RA AC EA S L KR LD V TC IDL Y Q HR ID TR VP IE IT MG EL KK LV EE GK IK Y IG L SE AS L AT K Y G IR - Y AE G K VE F K GD P AY Y RA AC EA S L MR VD V AC IDL Y Q HR ID TR VP IE IT IG EL KK LV EE GK IK Y IG L SE AS L AT K F AIN - L K D G K R E IR GD P AY Y RA AC EA S L KR LD V DC IDL Y Q HR VD TS VP IE IT VG EL KK LV EE GK IK Y IG L SE AS
161	PR Oxidoreduktase Putative AKR F8A5.21 Protein F8A5.24 Protein AKR	240 D T IR RA H AV HP VT AL Q IE Y SL W TR DI ED IE IV PL CR QL G IG IV P Y SP IG R GL F AG KAL KE S LP EN SV L TS HP RF V GEN LE K D T IR RA H AV YP IT AV Q EW S W L TR DI EE IE I IP CR EL G IG IV P Y SP IG R FF AG RA V Q S IP S EW L TR HP RY NG EN LE K D T IR RA H AV HP IT AV Q EW S W L W ARD IE PE IV PL CR EL G IG IV P Y SP IG R FF AG RV TE Q L SA ES N L Q GH RF S A EN LE K S T IR RA H TV HP IT AV Q L EW S L W TR D VEE IV PT CR EL G IG IV S Y SP IG R FF ag PK L V EN LD N DN DF R KAL PR F Q Q EN LD H S T IR RA H AV HP IT AL Q IE W S L W SR D VEE II PT CR EL G IG IV AYS Y SP IG R FF ag PK L V EN LD N DT L --- PR F Q Q EN LD H S T IR RA H AV HP IT AV Q L EW S L W SR D VEE IV PT CR EL G IG IV AYS Y SP IG R FF ag PK L V ET LS EG DF R K YL PR F Q Q EN LE H
241	PR Oxidoreduktase Putative AKR F8A5.21 Protein F8A5.24 Protein AKR	320 N K Q I Y R IE AL S Q H G CT P V Q L AL AW L H Q GED V VP IP GT TK IK N L H NN V GA L V K L L K ED L K E I S D AV PL D EV AG ES I H N K V F Y TR IE EL AT K Y GC SP AQ L AL SW L H Q DD V VP IP GT TK IK N L DD NI GA V K L S K ED L K E I S A AV P AG EV AG S R LI N K Q L Y L K TE EL AK H Q CP AQ L AL AW L H Q DD V VP IP GT TK IK N L D AN IDS L K V N L TD DD L K E I S S Q V RE ED V AG R Q Y N K IL Y E K V S AM SE KK G CT PA Q L AL AW V H H Q DD V CP IP GT TK IE N L N Q IR AL SV K L I PE EM SE LE TT IA Q P ES V K GE --R N K IL F E K V S AM SE KK G CT PA Q L AL AW V H H Q DD V CP IP GT TK IE N L N Q IR AL SV K L I PE EM SE LE SL A Q P ES V K GE --R N K HL F ER V NE IA AR K Q CT PS Q L AL AW V H H Q DD V CP IP GT TK IE N F N Q IR AL SV K L I PE D M A EL ES IAS A SA V K G GR Y G
321	PR Oxidoreduktase Putative AKR F8A5.21 Protein F8A5.24 Protein AKR	337 E V I A V T N W K F A N T P P L K G V L E P S W R V A N T P P P K T S F A H Y T W K Y A D T P K K - Y M A T V P T F K N S D T P P L S S I S I L T T F K N S E T P P L S S D M G T --Y K D S D T P P L S

Abbildung 14. Alignment der Aminosäuresequenz der PR mit Proteinen der Datenbank UniProt. Dargestellt sind die Proteine mit der höchsten Sequenzidentität. Blau: polare, ungeladene + saure AS, grün: hydrophobe AS, rot: basische AS, gelb: ungeladene AS

3.10 Proteincharakterisierung

3.10.1 Kinetik

Versuche, die zur Bestimmung kinetischer Eigenschaften der PR führen sollten, konnten aus mehreren Gründen nicht ausgewertet bzw. durchgeführt werden.

1. Die Peaks von Perakin und Raucaffrinolin konnten aufgrund der Aldehyd-Struktur des Perakins im HPLC-Test nicht getrennt werden. Es wurden Versuchsreihen mit mehreren Substratkonzentrationen durchgeführt, jedoch konnten weder über die Peakflächen noch über die Peaklängen kinetische Parameter bestimmt werden. Mit einem von GERASIMENKO et al. (2001) entwickelten HPLC-Programm, in dessen einstündigen Laufes es möglich ist, viele Alkaloide zugleich scharf voneinander zu trennen, war es nicht möglich die Peaks von Perakin und Raucaffrinolin zu separieren.

2. Eine weitere Methode zur Bestimmung des K_m -Wertes sollte über die Kopplung des Restperakins nach der enzymatischen Reaktion mit Hydroxylaminhydrochlorid zu Oxim erfolgen. Das Oxim konnte jedoch trotz Einsatzes unterschiedlicher HPLC-Programme nicht eindeutig detektiert werden. Die Derivatisierung von Aldehyden mit Phenylhydrazin und 2,4-Dinitrophenylhydrazin sind gängige Methoden in der organischen Chemie. Anwendung konnten diese Methoden nicht finden, da der Substratpeak nach der enzymatischen Reaktion nicht größer war als vor Reaktionsbeginn. Beide Substanzen waren ungeeignet zur Bestimmung kinetischer Parameter der PR und wurden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3. Die photometrische $NADPH_2$ -Abnahme, eigentlich die gebräuchlichste Methode für kinetische Untersuchungen $NADPH_2$ -abhängiger Enzyme, war die letzte Möglichkeit zur Sammlung kinetischer Daten der PR. Da vom limitierenden Faktor, das Substrat Perakin, zu große Mengen für die Messung in verhältnismäßig großen Küvetten (mindestens 500 μ l) erforderlich waren, wurden diese Experimente nur ansatzweise durchgeführt und mußten abgebrochen werden.

3.10.2 Bestimmung der Proteingröße über Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie wurde nicht zur Reinigung der Enzymlösung sondern zu analytischen Zwecken durchgeführt, um das Dimerisierungsverhalten der PR in Lösung zu studieren. Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil von drei verschiedenen Größenmarkern an einer Sephacrylsäule. Mit Hilfe des Retentionsvolumens der methylierten PR von ca. 60 ml unter Verwendung eines Phosphatpuffers wurde ein Molekulargewicht von 38,3 kDa berechnet. Die Auswertung erfolgte durch lineare Regression des Eichlaufs (Abbildung 16). Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration und der SDS-Gelelektrophorese lieferten Hinweise auf eine monomere PR in Lösung. Es stimmt somit mit dem theoretisch kalkulierten Molekulargewicht des methylierten Enzyms mit His-tag von 39,3 kDa überein.

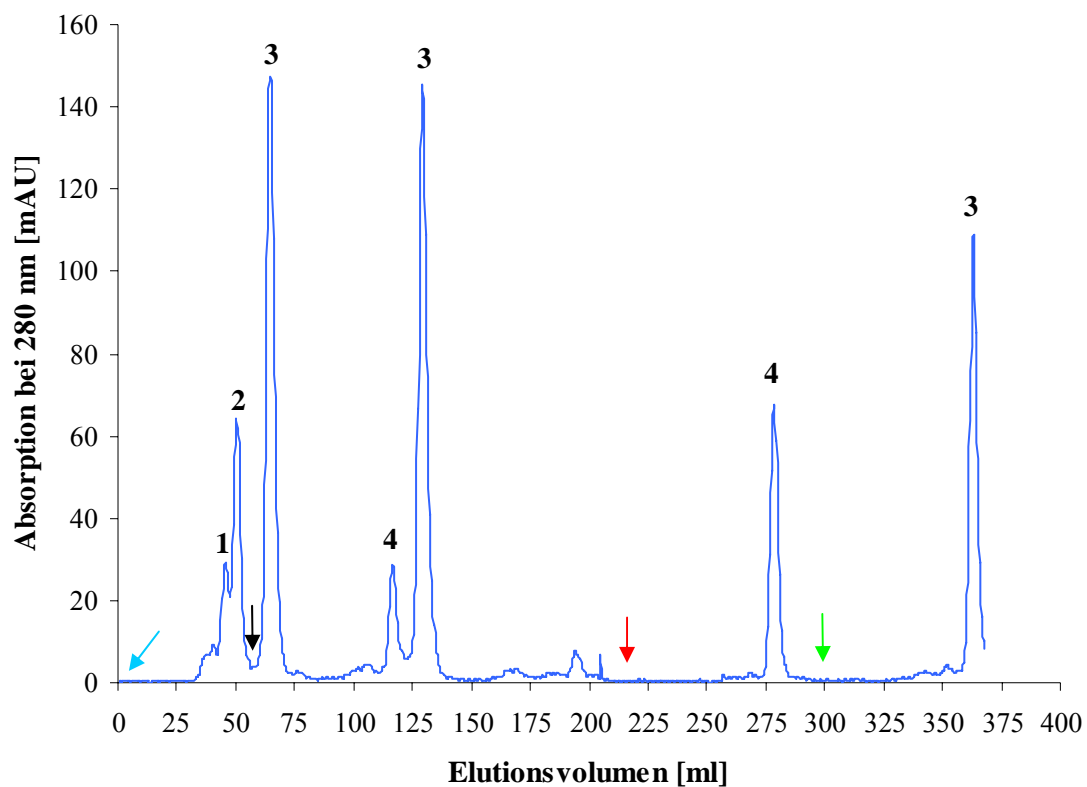


Abbildung 15. Elutionsprofil der Molekulargewichtsbestimmung für die PR an Sephacryl S-200. Die Proteinmarker (jeweils 3 mg/ml) wurden nach 48,9 ml (BSA; peak 1), 50,5 ml (Ovalbumin; peak 2) und 64,5 ml (α -Chymotrypsin; peak 3) von der Säule eluiert. Die Elution der PR (peak 4; 3 mg/ml) erfolgte zusammen mit einem internen Standard nach 57,49 ml, ohne internen Standard nach 59,72 ml. Blauer Pfeil: Injektion der Proteinmarker, schwarzer Pfeil: Injektion der Proteinprobe mit α -Chymotrypsin als internen Standard, roter Pfeil: Injektion der PR (10 mg/ml) ohne Standard, grüner Pfeil: Injektion des α -Chymotrypsins (2 mg/ml).

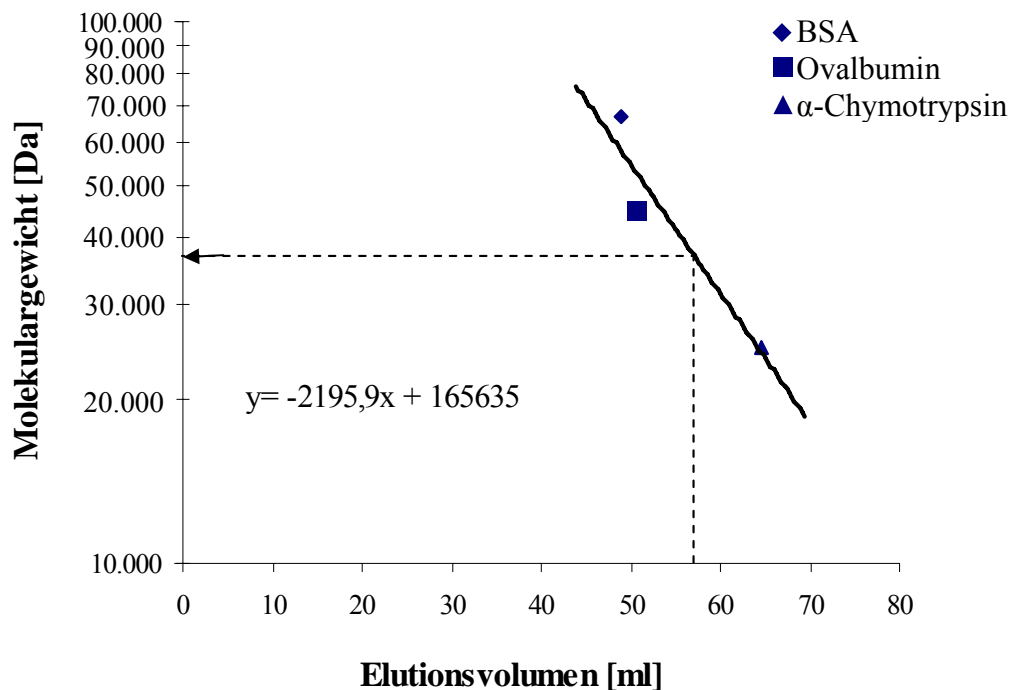


Abbildung 16. Eichgerade der Molekulargewichtsbestimmung für die PR an Sephacryl S-200. Anhand der linearen Regression der Elutionsvolumina der Proteinmarker (BSA 67.000 Da, Ovalbumin 45.000 Da, α -Chymotrypsin 25.000 Da) ergibt sich für die PR (Elutionsvolumen 58 ml) ein Molekulargewicht von 38,3 kDa (Pfeil).

3.10.3 Temperaturoptimum

Die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der PR erfolgte bei pH 7,0 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit Perakin als Substrat und NADPH₂ als Cosubstrat (2.8.5). Dabei wurden die Ansätze zunächst auf die jeweilige Temperatur erwärmt, bevor durch Zugabe von NADPH₂ die Reaktion gestartet wurde. Dadurch sollte verhindert werden, dass die PR bereits während des Erwärmens der Ansätze auf die eigentliche Reaktionstemperatur aktiv ist. Dies hätte vor allem bei den Messungen bei höheren Temperaturen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. Das Aktivitätsmaximum der PR liegt bei 50°C. Bei dieser Temperatur ist die Enzymaktivität und somit die Umsatzrate von Perakin zu Raucaffrinolin am größten. Über 55°C beginnt die Reduktase zu denaturieren, was am Verlauf der Diagrammbalken in Abbildung 17 durch den drastischen Abfall der Aktivität deutlich zu erkennen ist.

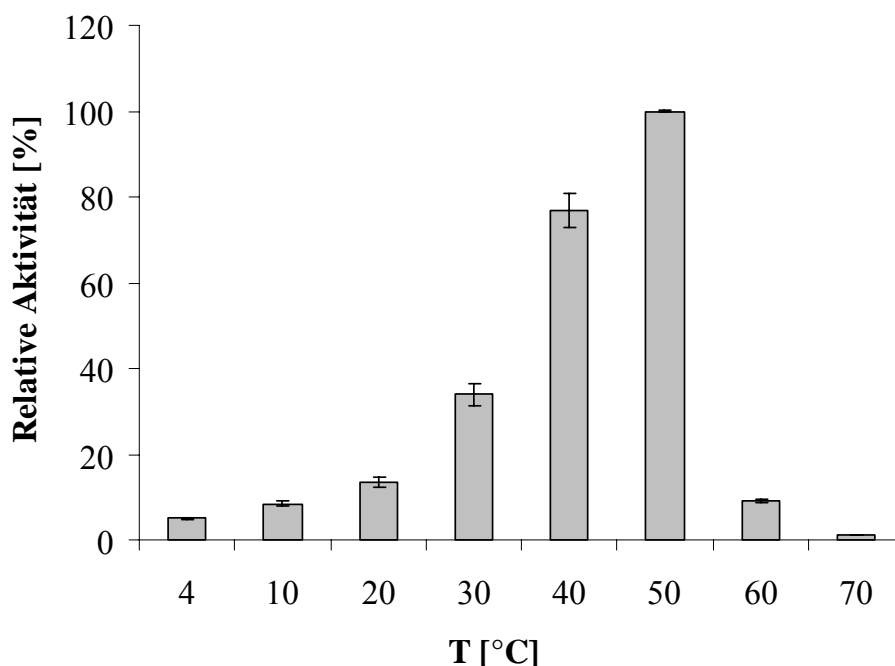


Abbildung 17. Temperaturabhängigkeit der PR. Die angegebenen Werte wurden aus drei Messungen gemittelt.

3.10.4 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums der PR wurde Kaliumphosphatpuffer-Mix mit konstanter Ionenstärke über einen pH-Bereich von 4 bis 9 verwendet. So sollten Einflüsse, die durch eine Veränderung der Ionenstärke oder durch einen Pufferwechsel bedingt sind, ausgeschlossen werden. Die Ansätze wurden für 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Methanolzugabe abgestoppt und das während der Katalyse gebildete Raucaffrinolin über HPLC quantifiziert. Die optimale Enzymaktivität lag in einem pH-Bereich von pH 6,8 bis 7,5 mit einem Maximum bei pH 7,1 (Abbildung 18). Die Werte von Temperatur- und pH-Optimum wurden über das Verhältnis der Peaklängen von Perakin und Raucaffrinolin zueinander bestimmt. Wenn der Perakinumsatz im Aktivitätstest 80% erreicht hatte, was unter den angegebenen Bedingungen nach 15 min der Fall war, wurde die Reaktion abgestoppt. Die Reaktionsbedingungen sind unter 2.8.5 näher beschrieben.

pH-Soll- und pH-Istwerte bei der Bestimmung des pH-Optimums der PR								
pH-Sollwert	4,5	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
pH-Istwert	4,7	5,5	5,9	6,4	7,1	7,9	8,3	9,2

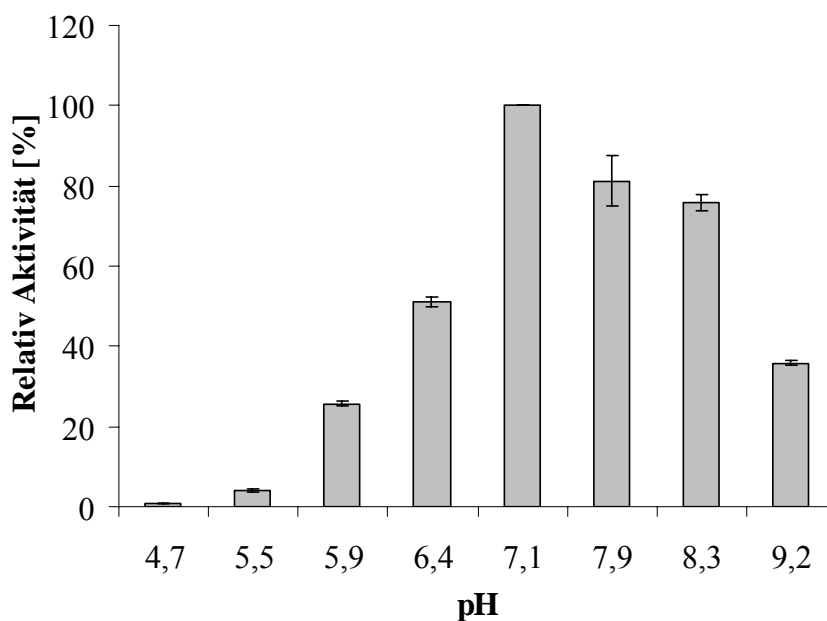
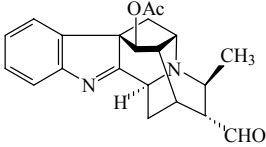
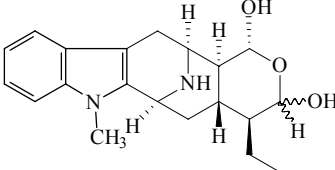
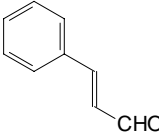
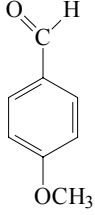
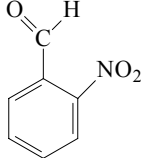
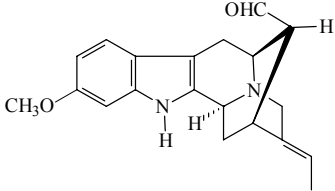
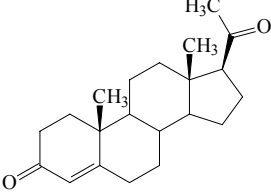
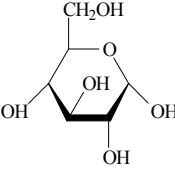


Abbildung 18. pH-Abhängigkeit der PR. Die Enzymreaktion erfolgte für 15 min bei 37°C. Die angegebenen Werte wurden aus drei Messungen gemittelt.

3.10.5 Substratspezifität

Die Aktivität der reinen Enzymlösung wurde mit denen in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen mit Hilfe der HPLC und der NADPH₂-Abnahme bestimmt. Dabei wurden zu den eigentlichen Substraten der PR noch verschiedene weitere Substrate eingesetzt. Deren Auswahl erfolgte u. a. in Anlehnung an die Substratspezifität anderer AKRs und soll die PR damit innerhalb ihrer Enzymfamilie abgrenzen. Dass die meisten AKRs durch *homology cloning* entdeckt wurden, erklärt deren hohe Identität und Substratähnlichkeit untereinander. So verwerten ein Großteil der bekannten AKRs Progesteron und Testosteron, während die PR von den getesteten Substanzen nur Perakin und Zimtaldehyd als Substrat annahm. Inkubationen mit NADPH₂ und Zimtaldehyd ohne PR ließen darauf schließen, dass Zimtaldehyd bis zu 20% auch ohne eine enzymvermittelte Reaktion reduziert wurde.

Tabelle 8. Übersicht getesteter Substrate auf PR-Aktivität.

Substrat	Strukturformel	Relative Aktivität [%]
Perakin		100
21-Hydroxyraumaclin		0
Zimtaldehyd		100
p-Anisaldehyd		0
2-Nitrobenzaldehyd		0
Gardneral		0
Progesteron		0
Glucose		0

Die Synthese von 21-Hydroxyraumaclin erfolgte nach der Vorschrift von OBITZ (1995; Abbildung 19). Die R_f -Werte von Ajmalin (0,49) und 21-Hydroxyraumaclin (0,19) korrespondierten mit den Ergebnissen von OBITZ. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, betrug die 21-Hydroxyraumaclin-Ausbeute der Lichtreaktion aus Ajmalin nach 90 min Inkubation ca. 10%. Jedoch färbte sich der 21-Hydroxyraumaclin-Fleck auf der DC nicht, wie von OBITZ beschrieben, nach besprühen mit CAS-Reagenz.

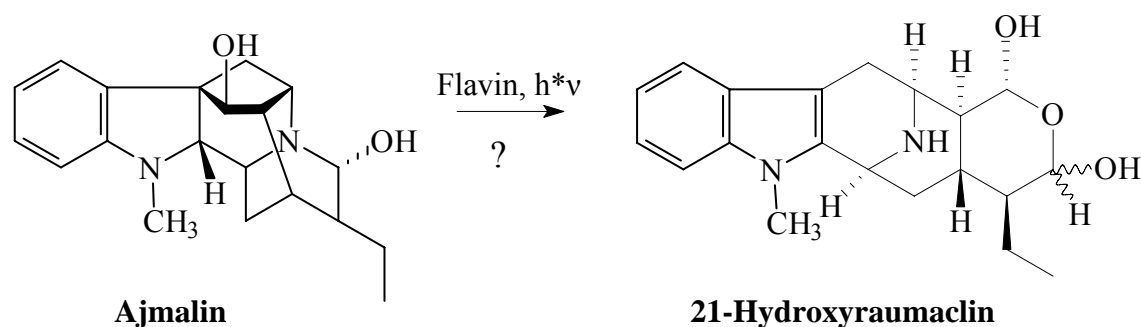


Abbildung 19. Synthese von 21-Hydroxyraumaclin aus Ajmalin durch flavinkatalysierte Photooxidation (h^*v = Lichtenergie). Nach OBITZ et al. (1995) reagiert Ajmalin durch die Photooxidation analog der Peroxidase-Reaktion zu Ajmalal (nicht dargestellt), dessen Hydrat spontan zu 21-Hydroxyraumaclin zyklisiert.

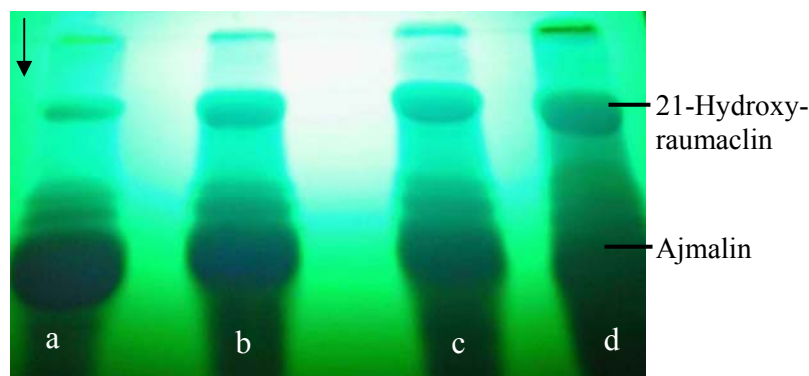


Abbildung. 20. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Syntheseansätze nach 20 min (a), 40 min (b), 60 min (c) und 90 min (d). Pfeil: Laufrichtung des Fließmittels.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von OBITZ (1995) und Warzecha konnte hier keine Enzymaktivität mit 21-Hydroxyraumaclin festgestellt werden. Die gleiche im Aktivitätstest verwendete gereinigte PR zeigte jedoch in Gegenwart von Perakin hohe Umsatzraten. In Abbildung 21 sind die HPLC-Chromatogramme der enzymatischen Reaktion mit

21-Hydroxyraumaclin dargestellt. Die Gegenwart von NADPH₂ hatte keine Auswirkung auf den 21-Hydroxyraumaclin-Peak (Abbildung 18c, Rt = 8,94).

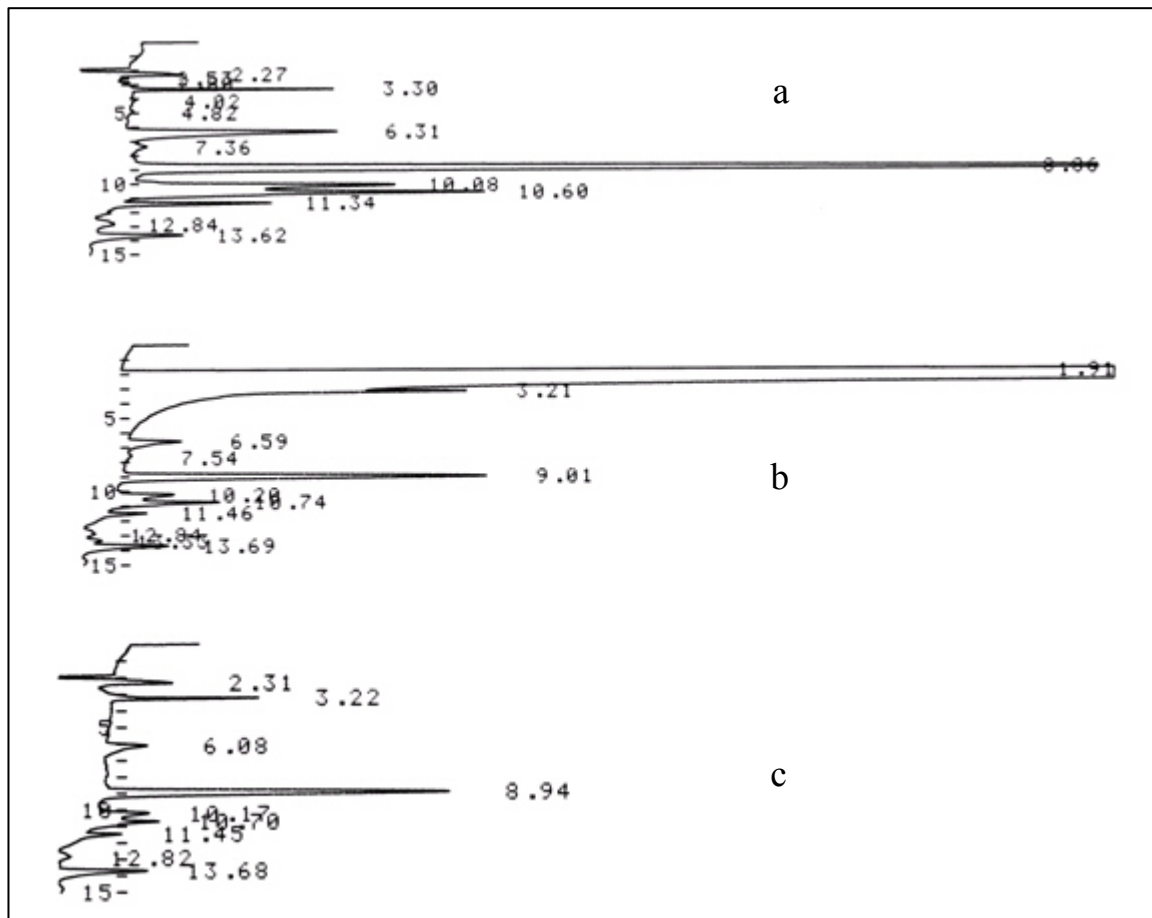


Abbildung 21. HPLC-Profile von 21-Hydroxyraumaclin als Referenz (a), im Aktivitätstest mit (b) und ohne (c) NADPH₂.

3.10.6 Cosubstratspezifität

Aktivitätstests zeigten, dass die PR als Reduktionsäquivalent nur NADPH₂ akzeptiert, nicht jedoch ATP oder NADH. Die Ansätze wurden wie in 2.8.5 beschrieben zusammengesetzt, allerdings wurde statt 15 µl 20 mM NADPH₂, in gleicher Menge und Konzentration ATP bzw. NADH hinzupipettiert. Die Auswertung erfolgte wie bei anderen Aktivitätstests über HPLC.

3.10.7 Metallionenabhängigkeit

Nach Trennung des Enzyms von möglicherweise gebundenen Metallen über die Größenausschlusschromatographie erfolgte die Detektion des Enzyms und der Metallionen mit

der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie. Es konnten keine divalenten Metallionen in der PR nachgewiesen werden. Entsprechend hatte auch die Zugabe des Chelators EDTA keinen Effekt auf die PR-Aktivität.

3.11 Kristallisation

3.11.1 Versuche zur Kristallisation der PR

Es wurden viele Bedingungen wie Temperatur, Pufferzusammensetzung, Enzymkonzentration, pH-Werte etc. ausprobiert, um Kristalle der PR in 24-well-Platten mit der *hanging drop*-Methode zu züchten. Die Abspaltung des His-tags zum nativen Enzym hatte keinen Einfluss auf die Kristallbildung. Auch Großansätze mit mehreren tausend Pufferbedingungen, verarbeitet von Kristallisations-Robotern, die Nanolitermengen in 96-well-Platten mit der *sitting-drop*-Methode pipettieren, waren nicht erfolgreich (durchgeführt am EMBL Heidelberg und EMBL Outstation Hamburg).

Es gibt die Möglichkeit, die Oberflächenspannung von Proteinen durch reduktive Methylierung so zu verändern, dass eine Kristallbildung positiv beeinflusst bzw. die Auflösung von Kristallen erhöht werden kann (RAYMENT 1997). In Abbildung 22 ist schematisch der Reaktionsverlauf der Methylierung eines Proteins dargestellt. Während der Reaktion sollten in zwei Schritten alle Lysine im Protein sowie der N-Terminus dimethyliert wer-

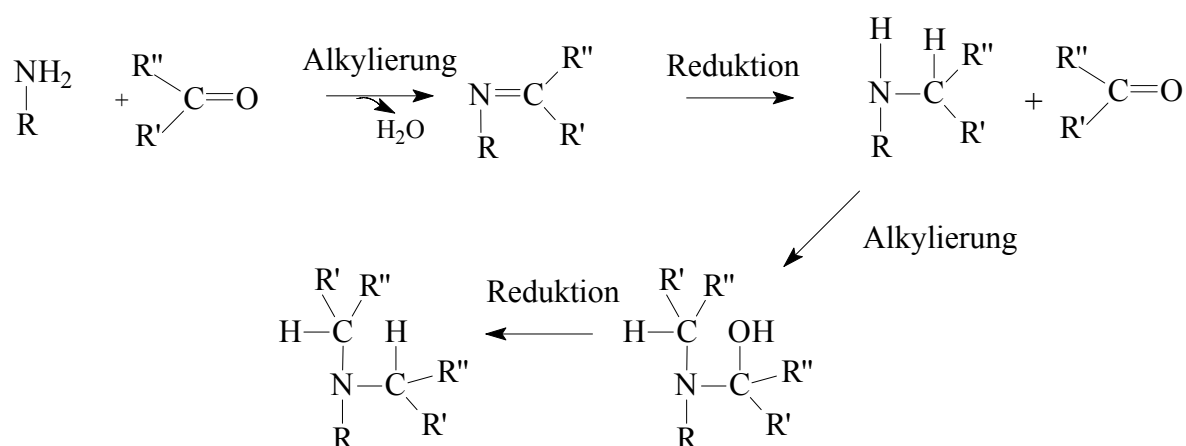


Abbildung 22. Schematischer Reaktionsverlauf während der reduktiven Methylierung eines Proteins. R = Lysin, R' = Wasserstoff, R'' = Alkylgruppe.

den. Da im Protein nach Mutation von 3 Lysinen zu Alanin 24 Lysine enthalten sind, würde sich das Molekulargewicht der PR im vollständigen dimethylierten Zustand um 672 Da erhöhen. Die Methylierung erfolgte nach Reinigung und Dialyse des Enzyms, dessen His-tag nicht abgespalten wurde, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer. Anschließend wurden mit dem methylierten Protein wie üblich Kristallisationsplatten unter Variation verschiedener Parameter angesetzt. In Abbildung 23 ist das Pipettierschema dargestellt, welches verwendet wurde, um in abgewandelter Form Kristallisationsbedingungen einer kristallisierten AKR mit 10% Sequenzhomologie zu der PR zu testen. Es wurden 4 Tropfen auf ein Deckgläschen pipettiert. Davon stellte einer den Kontrolltropfen dar (2 μ l Reservoirpuffer + 2 μ l 10 mM Tris pH 7,0; 1 mM DTT). Die restlichen Tropfen setzten sich aus jeweils einer Enzymkonzentration (9, 12, 15 mg/ml) sowie 2 μ l Reservoirpuffer zusammen. Die Platte wurde bei 20°C im Trockenschrank inkubiert und nach 7 Tagen lichtmikroskopisch überprüft.

		1M Natriumcitrat pH 5,6 / Wasser [μ l]					
30% PEG 4000	850 μ l	50 / 100	60 / 90	70 / 80	80 / 70	90 / 60	100 / 50
	900 μ l	50 / 50	60 / 40	70 / 30	80 / 20	90 / 10	100 / 0

Abbildung 23. Pipettierschema mit 30% PEG 4000 und 1M Natriumcitrat pH 5,6 auf einer Linbroplatte. Fett: in dieser Pufferzusammensetzung wurden Kristalle beobachtet.

Es wurde in Tropfen, deren Zusammensetzung in Abbildung 23 fett hervorgehoben ist, Kristallbildung beobachtet. Einen Eindruck von der orthorhombischen Form dieser Kristalle vermittelt Abbildung 24 a,b. Sie konnten in folgenden Kristallisationsversuchen in ausreichenden Mengen gezüchtet werden und waren damit reproduzierbar. Nach 2 Wochen erreichten die Kristalle ihre vollständige Größe von durchschnittlich 120 x 120 x 30 μ m. Sie wurden mit 0,5 μ l des blauen Farbstoffes Izit versetzt, der in Proteinkristalle, jedoch nicht in Salzkristalle, eindringen kann. Die Kristalle färbten sich nicht eindeutig

blau. Zur Klärung, ob es sich bei den Kristallen um Salz oder Protein handelte, wurden mehrere Kristalle aus einem Tropfen „gefischt“, in 10 µl Wasser gelöst und mit SDS-Probenpuffer aufgekocht. Banden auf dem SDS-Gel bestätigten, dass es sich um Proteinkristalle handelte.

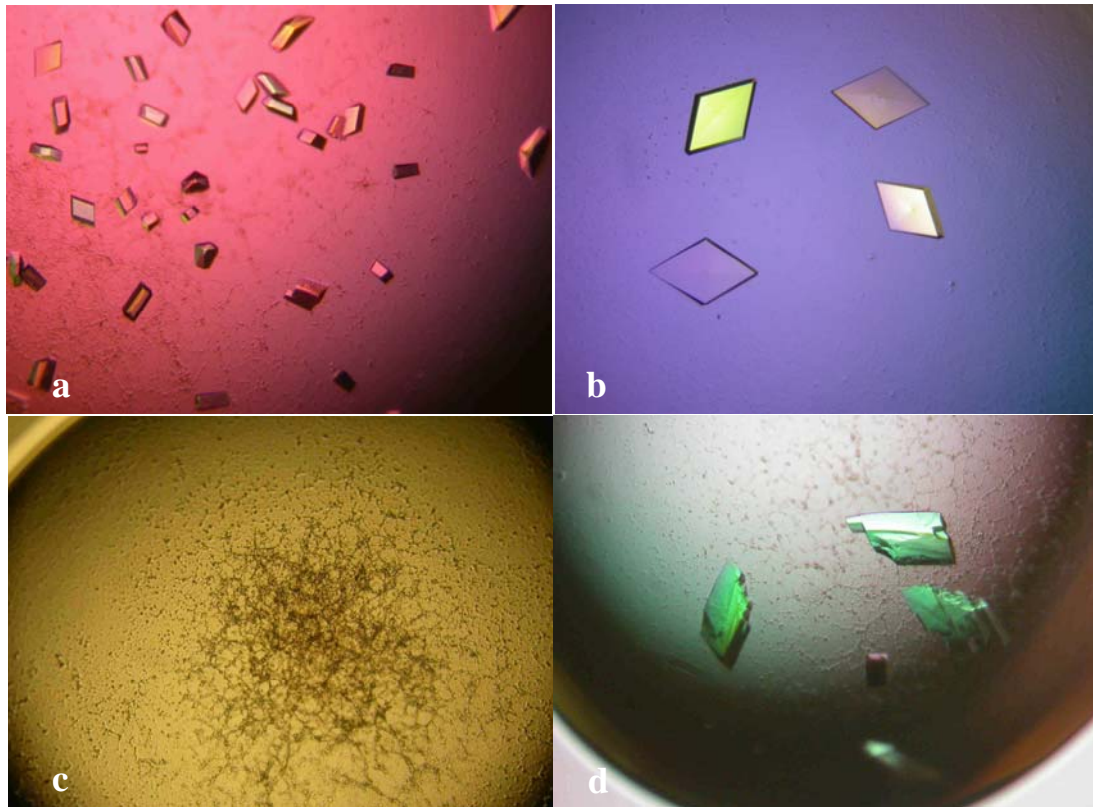


Abbildung 24. Kristalle der PR unter polarisiertem Licht (a, b); nicht methylierte Proteinlösung unter gleichen Kristallisationsbedingungen (c); verwachsene Kristalle, die entstanden, wenn die Enzymkonzentration vor der Methylierung zu hoch war (d). Größe der Kristalle: 120 x 120 x 30 µm.

Wurde nicht methyliertes Protein unter den gleichen Bedingungen verwendet, bildeten sich keine Kristalle (Abbildung 24 c). Die Methylierung war demzufolge für die Kristallbildung essentiell. In weiteren Versuchen wurde beobachtet, dass die Kristallqualität sowie das zeitliche Auftreten der Kristalle abhängig waren von der bei der Methylierung eingesetzten Enzymkonzentration. Laut Protokoll sollte das Enzym in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 - 10 mg/ml vorliegen. Wurde Enzym einer Konzentration von höchstens 5 mg/ml methyliert, konnten regelmäßige Kristalle bereits nach 4 Tagen

Wachstumszeit beobachtet werden. Mit Anstieg der Konzentration wuchsen sehr große verwachsene Kristalle, die sich erst nach 2 Wochen bildeten (Abbildung 24 d).

Es zeigte sich, dass die PR-Kristalle nach Denaturierung (95°C für 5 min) ein anderes Molekulargewicht besaß, als die Proteinlösung aus der diese Kristalle entstanden. Auf dem SDS-Gel in Abbildung 25 ist die Bande des nativen nicht-methylierten Proteins (1), die Bande des methylierten Proteins (2) sowie die Bande der Proteinkristalle (3) dargestellt. Die Ursache des geringen Größenunterschiedes zwischen 1 und 2 liegt, wie bereits erwähnt, an der Erhöhung des Molekulargewichtes um maximal 700 Da durch die Dimethylierung der freien Aminogruppen im Protein. Wie sich der deutliche Größenunterschied zwischen 2 und 3 erklären lässt, wird in Kapitel 4 diskutiert.

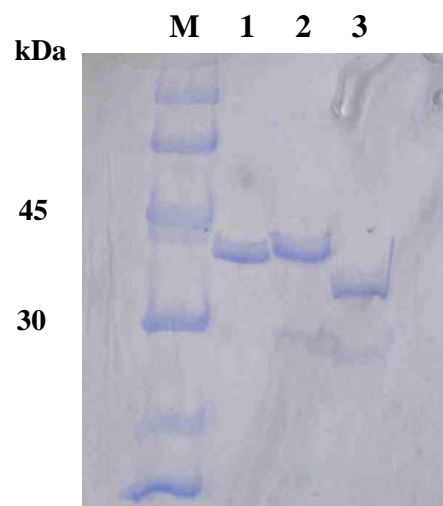


Abbildung 25. SDS-Gel gefärbt mit Coomassie Blau.

- (M) LMW-Marker
- (1) natives Protein
- (2) methyliertes Protein
- (3) Proteinkristalle

3.11.2 Einfluß der reduktiven Methylierung auf die Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der PR wurde nach der reduktiven Methylierung, eine Methode deren Durchführung insgesamt 2 Tage beansprucht, im HPLC-Aktivitätstest überprüft. Nach der Reinigung des Proteins aus *E. coli*, wurde die Enzymlösung gegen 50 mM KPi-Puffer pH 7,5 dialysiert und anschließend in zwei Teile aliquotiert. Ein Teil wurde durch reduktive Methylierung chemisch modifiziert, der andere Teil diente als Kontrolle und wurde zum einen sofort für Aktivitätstests verwendet und zum anderen im Kühlschrank aufbe-

wahrt. So konnte für den direkten Vergleich der Enzymaktivitäten Proteinlösungen gleichen Alters verwendet werden. In Abbildung 26 sind die relativen Aktivitäten von frischem Enzym, drei Tage altem Enzym sowie drei Tage altem methylierten Enzym gegenübergestellt. Während die mehrtägige Lagerung bei 4°C mit einem geringen Aktivitätsverlust einherging (ca. 15%), nahm die Aktivität des methylierten Enzyms im Vergleich zum unmodifizierten Protein um ca. 70% ab.

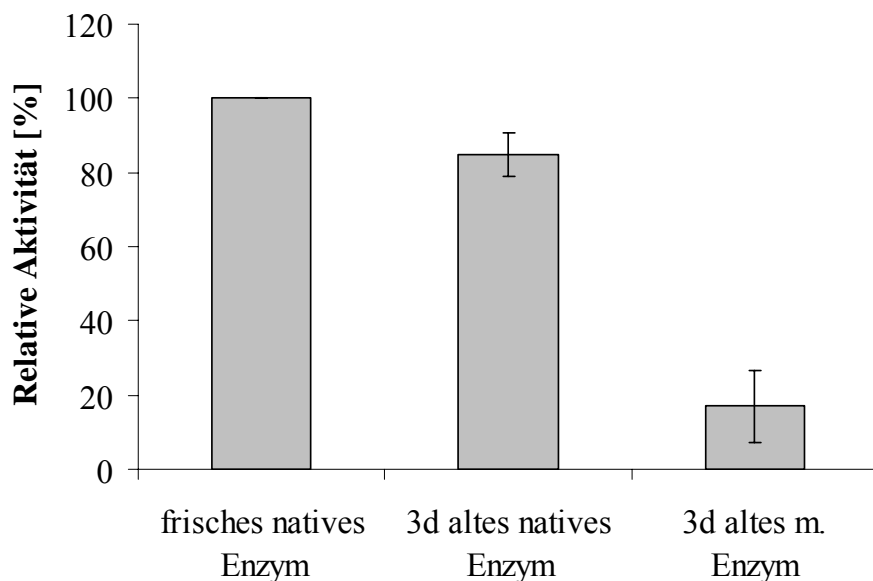


Abbildung 26. Einfluss der reduktiven Methylierung auf die Enzymaktivität. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen. m = methyliert

3.11.3 N- und C-Terminus des kristallisierten Proteinfragmentes

Es stellte sich nun die Frage, ob das kleine Fragment (schätzungsweise 3 kDa) vom C- oder N-Terminus des Proteins dissoziierte. Um dies zu klären, wurden im ersten Schritt Kristalle aufgekocht und auf SDS-Gel aufgetragen. Nach Westernblot wurde versucht auf eine PVDF-Membran die membrangebundene Proteinbande N-terminal zu sequenzieren. Der Edman-Abbau funktioniert jedoch nicht, da die Aminogruppe am N-Terminus methyliert war. Mit Hilfe eines recht einfachen Experimentes konnte bewiesen werden, dass der His-tag und damit also der N-Terminus nicht abgespalten wurde. Dazu wurden Proteinkristalle in Tris-Puffer gelöst und mit Ni^{2+} -NTA versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der wässrige Überstand abgenommen. Danach wur-

de Elutionspuffer dazugegeben, 15 min inkubiert, zentrifugiert und ebenfalls der Überstand abgenommen. In den jeweiligen Überständen wurde die Proteinkonzentration gemessen. Die Ausgangsproteinkonzentration der gelösten Kristalle wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Der Überstand nach Inkubation der Proteinlösung am Ni^{2+} -NTA-Material enthielt kein Protein, was bedeutete, dass das Kristallprotein an der Matrix gebunden hat. Nach Zugabe des Elutionspuffers löste sich das gebundene Protein. Demzufolge fand sich im Eluat eine Proteinkonzentration von annähernd 1 mg/ml. Die Spaltstelle konnte sich also nur am C-Terminus befinden. Die C-terminale Sequenzierung ist nicht wie der N-terminale Edman-Abbau eine Standardmethode zur Sequenzierung von Peptidenden. So war es nicht möglich den C-Terminus auf diese Weise zu determinieren.

Da davon ausgegangen wurde, dass das ca. 33 kDa große Fragment kristallisierte, wurde zur Klärung das Strukturmodell der PR herangezogen. Das Peptid-Grundgerüst, das aus den potentiellen Lagen der $\text{C}\alpha$ -Atome besteht, erlaubte den Verlauf der Peptidkette zu verfolgen. Mit dem Auffinden des N-terminalen His-tags und des C-Terminus stellte sich heraus, dass nicht ein Teil der Peptidkette im Kristall vorlag, sondern dieser die komplette AS-Sequenz der PR enthielt. Der Bruch konnte also nur während der Hitzedenaturierung stattgefunden haben.

3.12 Diffraktionsexperimente

Die bei den Röntgenbeugungsexperimenten eingesetzte Strahlung besitzt infolge Ihrer Frequenz hohe Energie, die neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierung und Radikalbildung im Kristall führt. Die Radikale modifizieren in einer Kettenreaktion Nachbarmoleküle und stören die periodische Anordnung der Gitterbausteine, so dass die Diffractionsqualität abnimmt. Da die Entstehung und Diffusion der Radikale temperaturabhängig ist, werden insbesondere unter Verwendung von Synchrotronstrahlung Datensammlungen von Proteinkristallen an eingefrorenen Kristallen bei Temperaturen um 100 K durchgeführt. Um Eisbildung beim Einfrieren der Kristalle zu vermeiden, müssen die Kristalle abhängig von der Zusammensetzung des Kristallisationspuffers mit einem Cryopuffer behandelt werden. Wie unter 2.12.2 beschrieben, wurde der Kristallisationspuffer mit 20% Glycerin versetzt und die Kristalle in diese Lösung überführt. Die

mit Cryopuffer getränkten Kristalle wurden anschließend in einer Nylonschleife in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in den auf 100 K temperierten Cryostrahl überführt und vermessen. Die Röntgenstrahlen wurden während der Messung an den Elektronen des Proteinkristalls gebeugt und gestreut, wobei ein in Abbildung 27 charakteristisches Diffraktionsmuster entstand.

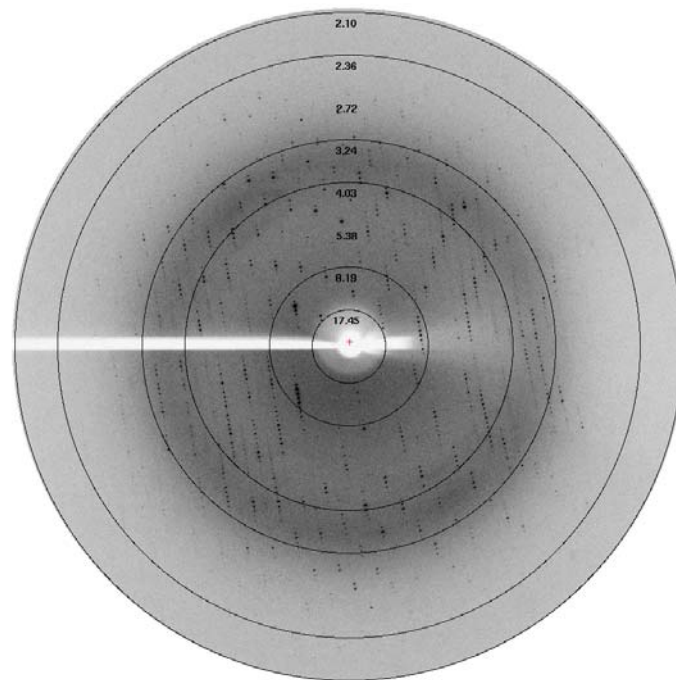


Abbildung 27. Diffraktionsmuster eines PR-Kristalls mit einer Auflösung von 2,3 Å; gemessen an BL14.1., BESSY in Berlin.

In Tabelle 9 ist die Statistik des nativen Röntgendatensatzes aufgeführt. Die Datensammlung erfolgte an der Beamline BL14.2 am BESSY in Berlin. Die Messung lieferte Daten bis zu einer Auflösung von 2,0 Å. Die PR kristallisierte unter den genannten Bedingungen in der orthorhombischen Raumgruppe $C222_1$ mit den Gitterparametern $a=58,94$ Å, $b=93,00$ Å, $c=143,35$ Å und $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Der Datensatz ist mit 99,6 % nahezu vollständig.

Tabelle 9. Datenstatistik eines PR-Kristalls.

Röntgenlichtquelle	BESSY-BL14.2
Wellenlänge [Å]	0,91841
Raumgruppe	C222 ₁
Elementarzellparameter	a=58,94 Å, b=93,00 Å, c=143,35 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Auflösungsgrenze [Å]*	12,0-2,00 (2,1-2,00)
Anzahl gemessene Reflexionen	105.755
Anzahl unabhängige Reflexionen	26.970
Rsym*	0,065 (0,51)
I/ σ (I)*	25,5 (5,1)
Redundanz*	16,6 (14,1)
Vollständigkeit* [%]	99,6 (99,3)
V _M Wert	2,9 (1 Mol / ASU)

* Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

3.13 Strukturaufklärung der PR

Die Struktur des Proteinmoleküls wird durch das Vergleichen der Elektronendichte mit der Primärstruktur des Proteins erhalten. Um eine Elektronendichte mittels Fourier-Transformation zu ermitteln, benötigt man drei Informationen: Wellenlänge, Reflexintensitäten und Phasen des gebeugten Röntgenstrahls. Dabei ergibt sich eine fundamentale Schwierigkeit der Proteinkristallographie: das Phasenproblem. So gibt es mehrere Möglichkeiten die Phasen auf anderem Wege zu ermitteln. Dies ist zum einen die Methode des *molecular replacement* (MR). In diesem Falle verfügt man bereits über ein Modell, dass eine große Ähnlichkeit mit der untersuchten Struktur aufweist. Die Berechnung der Phasen aus dem ähnlichen Modell ist in der Regel ausreichend, um die Abweichungen zu modellieren. Daneben gibt es den so genannten isomorphen Ersatz, der darauf basiert, dass zwei Kristalle gemessen werden, die sich durch Einlagerung von Schweratomen unterscheiden. Die Schweratome definieren eine anormale Phase, die als Bezugspunkt für die Phasenberechnung dient. So reichen dann die Differenzen der Strukturen aus, um die Phasen der ganzen Struktur zu errechnen. Im Falle der PR wurden beide Methoden angewandt, um aus der Elektronendichteverteilung das Strukturmodell zu erzeugen. Trotz

der guten Auflösung des Kristalls war es nicht möglich die vollständige Struktur der PR über das MR aufzuklären, da das von Swiss-Prot generierte Proteinmodell, welches als Vorlage diente, nur 31% Sequenzidentität mit der PR besaß. Im Folgenden wurden die Kristalle in MAD-Experimenten mit Schwermetallatomen derivatisiert. Der hohe Wassergehalt in Proteinkristallen lässt die Möglichkeit zu, Schwermetallionen in den Kristall diffundieren zu lassen. Bei diesen *soaking*-Experimenten wurden PR-Kristalle in eine geeignete Schwermetalllösung gebracht. Dabei lagerten sich die Schweratome so ein, dass der Proteinkristall während der Messung anormale Phasen erzeugt. Diese Phasen korrespondierten mit der bestehenden Struktur aus dem MR. Mit den unter 2.12.4 erwähnten Programmen wurde die Struktur verfeinert und bis auf 2 Bereiche (AS 25-32, AS 220-241) vollständig gelöst. In Abbildung 28 wurde die PR als Monomer und Dimer dargestellt. Die Faltung entspricht zwar dem typischen TIM-barrel der AKRs, jedoch unterscheidet sich der C-Terminus von denen aller anderen AKR-Strukturen. Dieser auffällig aus dem Modell herausragende C-Terminus lässt eine dimere Konformation der PR im Kristall erahnen. Die am jeweiligen C-Terminus liegenden β -Faltblätter formen an der Grenzfläche beider Moleküle eine barrel-Struktur. Obwohl laut Datenstatistik (Tabelle 9) in der asymmetrischen Einheit nur ein Molekül vorliegt, sagt dies nichts über den oligomeren Status der PR im Kristall aus, da die kristallographische Symmetrie mit den molekularen Interaktionen beider Moleküle übereinstimmt. Die Berechnung der ASA (Accessible Surface Area) einer Untereinheit in einem Dimer ergibt sich nach Gl. (1) aus der Summe der ASA von zwei Monomeren abzüglich der ASA der dimeren Konformation. Die ASA der Untereinheiten dimerer Proteine liegen in einem Bereich zwischen $368,1 \text{ \AA}^2$ und $4746,1 \text{ \AA}^2$ (JONES UND THORNTON 1995). Die Kontaktfläche einer PR-Untereinheit von ca. 2873 \AA^2 läßt demnach darauf schließen, dass die PR im Kristall als Dimer vorliegt.

$$A_i = ([A_{Sa} + A_{Sb}] - A_{Sab}) / 2$$

$$A_i = ([16634,5 + 16634,5] - 27523,9) / 2 \quad \text{Gl. (1)}$$

$$A_i = 2872,6 \text{ \AA}^2$$

A_i =ASA der Grenzfläche einer Untereinheit, A_{Sa} =ASA der Untereinheit a, A_{Sb} =ASA der Untereinheit b, A_{Sab} =ASA beider Untereinheiten, wenn diese als Dimer vorliegen

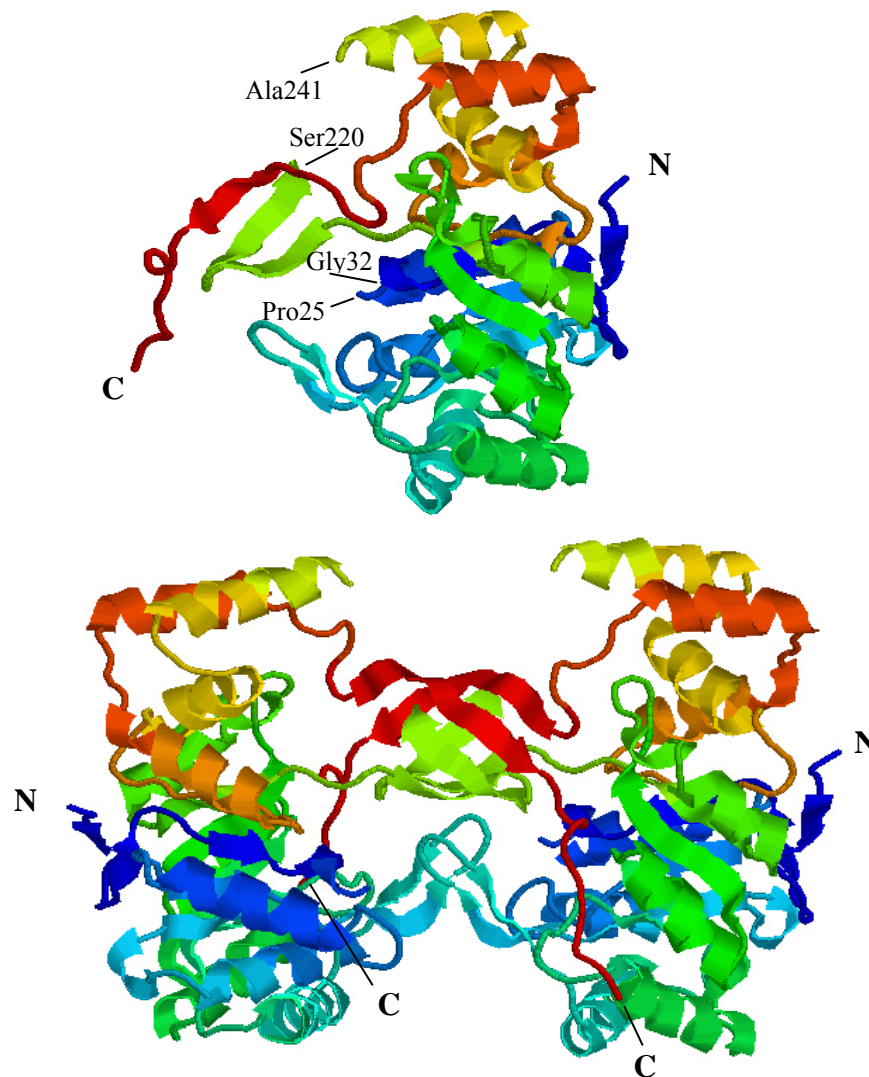


Abbildung 28. Die monomere und dimere Struktur der PR. Die mit Pfeilen markierten Bereiche zwischen den Aminosäuren Ser220 und Ala241 sowie Pro25 und Gly32 konnten nicht gelöst werden.

3.14 NADPH₂-Bindungsstelle

Strukturen von Protein-Liganden-Komplexen können entweder über die Erzeugung gemischter Kristalle (Kokristallisation) oder durch „Soaking“ determiniert werden. Wie bereits erwähnt, können kleine Moleküle in den Kristall diffundieren. Für das Soaking wurden die Kristalle für eine bestimmte Zeit in der Cosubstratlösung inkubiert und vermessen. Leider lagerte sich der Ligand nicht in der Proteinbindetasche an, so dass zukünftig weitere Versuche (höhere NADPH₂-Konzentrationen, längere Inkubationszeiten) notwendig sind, den Bindungsmodus des Cosubstrates zu bestimmen. In Kokristallisati-

onsexperimenten wurde ebenfalls versucht Protein-NADPH₂-Komplexe zu erzeugen. Hierbei wurden die Lösungen von Enzym und NADPH₂ miteinander gemischt und versucht zu kristallisieren. Jedoch wuchsen in Gegenwart von 1 mM NADPH₂ keine Kristalle. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Experimente nicht fortgeführt werden. Jedoch konnte das Cosubstrat NADPH₂ in die PR-Struktur modelliert werden (Abbildung 29). Dies war möglich, da der Bindungsmodus der AKRs für NADPH₂ aufgrund der daran beteiligten stark konservierten AS bekannt ist.

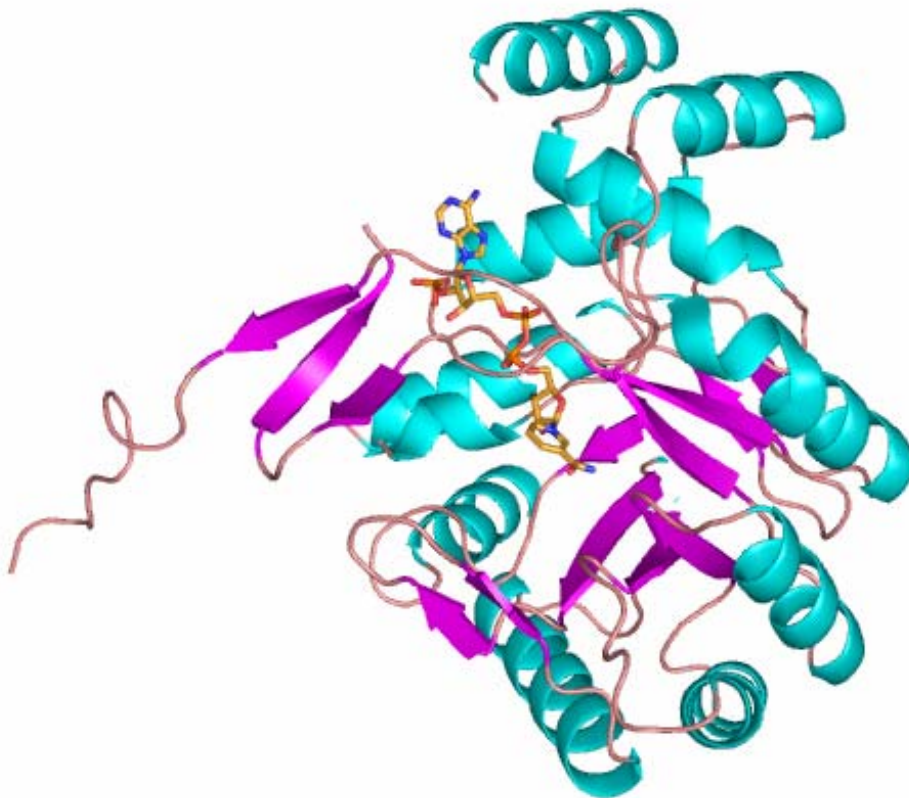


Abbildung 29. Die monomere Darstellung der Röntgenkristallstruktur der PR mit Blick auf das β -barrel, modelliert mit dem Cofaktor NADPH₂. α -Helices sind blau dargestellt, β -Faltblätter pink. NADPH₂ ist in der *stick*-Darstellung gezeigt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT erstellt.

4 Diskussion

4.1 Klonierung, Expression und Reinigung der PR

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Sequenzen zweier Oligopeptide vor, welche ursprünglich aus der säulenchromatographischen Reinigung aus *R. serpentina*-Suspensionskulturen stammten (Warzecha, unveröffentlichte Daten). Es wurde aufgrund der Ergebnisse der Aktivitätstests zwischen den Reinigungsschritten angenommen, dass es sich hierbei um Proteinfragmente der PR handelte. In dieser Arbeit sollte das vollständige, für die PR codierende Gen im Genpool aus Suspensionskulturen von *R. serpentina* gefunden werden. Im ersten Schritt wurden die vorliegenden Aminosäuresequenzen in Datenbanken mit anderen Aminosäuresequenzen verglichen. Es wurden geringe Ähnlichkeiten der Fragmente zu Reduktasen festgestellt. Damit konnte auch grob die Orientierung der Oligopeptide in der Sequenz bestimmt werden. So wurde aus dem Fragment 39 der forward Primer und aus dem Fragment 32 der reverse Primer entwickelt. Diese und noch vorhandene ältere inosinhaltige Primer wurden für die sich anschließende PCR verwendet. Die Primer wurden so entwickelt, dass die ersten und letzten Aminosäuren der Oligopeptide nicht in der DNA-Sequenz der Primer enthalten waren. So sollte später sichergestellt werden, dass die Primer an den richtigen Stellen gebunden haben. Der Rohextrakt von Suspensionskulturen der Zelllinie *R. serpentina* Br zeigte im Aktivitätstest den höchsten NADPH₂-abhängigen Umsatz von Perakin. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente in den folgenden PCR-Versuchen als Template. Es wurde ein ca. 500 bp großes PCR-Fragment in *E. coli* subkloniert und sequenziert. In der Sequenz wurden die vollständigen Oligopeptide, die als Primervorlage dienten, gefunden. Anschließend wurde durch RACE-PCR ein 1017 bp langer Vollängenklon ermittelt. Nach der erfolgreichen Subklonierung in *E. coli* Top10-Zellen konnte der Vollängenklon in den für die Produktion in *E. coli* M15-Zellen geeigneten Expressionsvektor pQE-2 kloniert werden. Der pQE-2-Vektor trägt den transkriptionsstarken T5-Promotor, dessen Expression von dem pREP4 Repressorplasmid reguliert wird. Das konstitutiv exprimierte *lac*-Repressorprotein, codiert vom *lac* I-Gen (FARABAUGH 1978), bindet an das *lac*-Operon und unterdrückt somit die Transkription. Durch Zugabe von IPTG wird das Repressorprotein inaktiviert, kann

nicht mehr an das *lac*-Operon binden und induziert somit die permanente Expression des inklonierten Gens. Dieser Vektor bietet durch die Verlinkung des Volllängenklones mit einem 6xHis-tag außerdem die Möglichkeit mit Hilfe des Enzyms DAPase den His-tag abzuspalten.

Die Kultivierung der M15-Zellen erfolgte in Schüttelkolben mit 500 ml LB-Medium. Eine 24 stündige Induktionszeit mit 0,5 mM IPTG bei 25°C führte zu hohen Expressionsraten der PR. Die Expressionsrate der PR-Mutanten zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp-Protein. Jedoch wirkten sich IPTG-Konzentrationen über 0,5 mM in der Bakterienkultur infolge der hohen Expressionsrate ungünstig auf das Wachstum der Bakterien aus. Die während der Expression gebildeten Einschlusskörper beruhten auf der hohen Produktionsrate von 10 mg Protein/l Bakterienkultur. Da die Proteinausbeute für Kristallisationsexperimente groß genug war, ist es nicht nötig gewesen, die Einschlusskörper zu renaturieren. Die nachfolgende Aufarbeitung und Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte wie in 2.8.4.3 beschrieben und erwies sich als effiziente Methode, das Protein mit hoher Reinheit zu gewinnen. Der Reinheitsgrad des Proteins wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung überprüft. Auf dem SDS-Gel zeigte sich eine Bande bei ca. 38-39 kDa. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Befund von Warzecha, der die mutmaßliche PR als 38 kDa großes Protein identifizierte. Jedoch wurden auch noch zwei weitere Banden auf dem Gel sichtbar, die in nachfolgenden Untersuchungen auf die Instabilität der PR zurückzuführen war. Die anfänglichen Stabilitätsprobleme der PR wurden vermutlich durch eine von bakteriellen Proteasen vermittelte Proteolyse verursacht. Die Banden der Abbauprodukte, eine Bande bei ca. 28 kDa und eine diffuse Bande bei ca. 10 kDa nahmen ab dem zweiten Tag trotz Lagerung bei 4°C an Intensität zu. Nach einer Woche waren auf dem SDS-Gel weder Proteinbanden noch Enzymaktivität im HPLC-Assay mehr vorhanden und das Protein, als weißer Niederschlag sichtbar, vollständig denaturiert. Die anfängliche Vermutung das Protein hätte die Tendenz zur Autodegradation, konnte mit Zugabe von EDTA nach Proteinelution von der Ni²⁺-NTA-Matrix entkräftet werden. Das Enzym blieb für Wochen auch bei Raumtemperatur stabil, was eine unerläßliche Voraussetzung für die Kristallisation der PR darstellte.

4.2 Biochemische Charakterisierung der PR

Die eindeutige Identifizierung der PR als solche wurde in Aktivitätstests und anschließender massenspektrometrischer Analyse der enzymatischen Reaktion mit Perakin erbracht. Damit konnte bestätigt werden, dass die von Warzecha aufgereinigten Oligopeptide aus *R. serpentina*-Suspensionskulturen von der PR stammten. Für die Untersuchung auf Akzeptanz unterschiedlicher Substrate durch die PR standen mehrere Substanzen zur Verfügung, von denen einige pflanzliche Alkaloide sowie aliphatische Aldehyde (u.a. Glycerinaldehyd) waren. Andere stellten typische Substrate vieler AKRs wie Steroidhormone und Zucker dar. Von den 8 untersuchten Verbindungen zeigte im Vergleich zum natürlichen Substrat nur Zimtaldehyd einen Umsatz. Eine weitere aromatische Verbindung, 2-Nitrobenzaldehyd, Substrat des YakC-Proteins (MORITA et al. 2002) und ebenso ein Substrat der Pyridoxal-Reduktase (NAKANO et al. 1999), wurde von der PR nicht umgesetzt trotz höchster Sequenzidentität (43% bzw. 35%) mit beiden Enzymen. Diese Befunde unterstreichen die hochspezifische Natur der PR. Versuche mit 21-Hydroxyraumaclin, eine aus Ajmalin synthetisierte Verbindung, wurde, entgegen den Ergebnissen von OBITZ (1995), von der PR nicht umgesetzt.

Der höchste Perakin-Umsatz der PR lag in einem Temperaturintervall zwischen 45°C – 50°C. Dies deckt sich mit den hohen Temperaturoptima einiger anderer aus *R. serpentina* isolierter Enzyme der Ajmalinbiosynthese z.B. der Strictosidin-Glucosidase (GERASIMENKO et al. 2002), der Vomilenin-Glucosyltransferase (RUYTER UND STÖCKIGT 1991) und der Arbutin-Synthase (HEFNER et al. 2002). Das pH-Optimum der PR bei pH 7 und fehlende Signalsequenzen am N-Terminus lassen darauf schließen, dass das lösliche Enzym im Cytoplasma der Pflanzenzelle vorliegt.

Über die Regulation der Ajmalinbiosynthese ist noch relativ wenig bekannt. Die Rolle der PR als Seitenweg-Enzym dürfte jedoch neben der Raucaffricin-Glucosidase und der Vomilenin-Glucosyltransferase nur eine geringe Bedeutung haben. Da Vomilenin und Raucaffricin in Zellsuspensionskulturen die Hauptalkaloide darstellen, erfolgt die Regulation der Ajmalinsynthese hauptsächlich bei diesen Enzymen.

4.3 Einfluss der reduktiven Methylierung auf die Kristallbildung

Nach Recherche in der Literatur ist die reduktive Methylierung eine nicht sehr häufig angewandte Methode, um eine Kristallbildung zu initiieren bzw. die Kristallqualität zu verbessern (RAYMENT 1997, KOBAYASHI 1999, KURINOV 2000, SCHUBOT UND WAUGH 2004). RYPNIEWSKI et al. (1993) untersuchten den Effekt verschiedener Reduktionsmittel auf Lysozym aus Hühnereiweiß und verglichen das modifizierte Protein mit der nativen Form. Es zeigte sich, dass der Einsatz von DMAB und Formaldehyd keine Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur zur Folge hatte, sondern mit der Dimethylierung der freien Aminogruppen (am Lysinrest und N-Terminus) kleine „strukturelle Störungen“ verursachte. Nach reduktiver Methylierung behielt das Lysozym seine volle Aktivität (RYPNIEWSKI et al. 1993), während das Fragment S1 von Myosin einen Teil seiner Aktivität verlor (WHITE UND RAYMENT 1993). Strukturelle Analysen ließen die Autoren darauf schließen, dass Lysin in der Untereinheit des Myosins am katalytischen Reaktionsmechanismus beteiligt ist. Im Fall der PR wirkte sich die Methylierung auf einen fast vollständigen Verlust der Aktivität aus (3.11.2). Eine Erklärung findet sich, wenn man das katalytische Zentrum der PR betrachtet. Neben drei anderen Aminosäuren ist Lysin entscheidend am Elektronentransfer von NADPH_2 auf das Substrat beteiligt. Auf diesen Punkt wird unter 4.5 und 4.6 bei der Besprechung des Strukturmodells näher eingegangen.

Die reduktive Methylierung hat demnach auf jedes Protein eine andere Wirkung. Entscheidend ist, dass die Umsetzung des Protokolls, welches RAYMENT (1997) beschreibt, dem Lysingehalt des jeweiligen Proteins angepaßt werden muss. Die Beobachtung an verwachsenen PR-Kristallen (Abbildung 24 d), die aus einer Proteinlösung stammten, die in der reduktiven Methylierung zu hoch konzentriert war, deutet darauf hin, dass der Grad der Methylierung an der Aminogruppe entscheidend ist für ein geordnetes Kristallwachstum. Die reduktive Methylierung ist demnach zwingend für die Bildung von PR-Kristallen, jedoch stellt sich die Frage, was diese chemische Modifikation im Protein bewirkt. Es ist bekannt, dass Lysinseitenketten recht beweglich sind und die Kristallbildung negativ beeinflussen. Ihre Elektronendichte ist oft, trotz guter Auflösung von 2,0 Å und weniger, in der Kristallstruktur nicht erkennbar ist (SCHUBOT UND WAUGH 2004). Muta-

genese Studien in denen Lysine gegen Alanin ausgetauscht wurden und damit eine Kristallbildung initiierten, bestätigten den störenden Einfluß dieser Aminosäure (LONGENECKER et al. 2001, DEREWENDA et al. 2004). SCHUBOT UND WAUGH (2004) stellten fest, dass die Methylgruppen die Löslichkeit des Proteins in wässriger Lösung herabsetzen, was zu einer Abnahme der Beweglichkeit der Seitenketten führt. Die Folge der durch Methylierung stabilisierten Proteinoberfläche kann in der Bildung eines Kristallgitters resultieren (RAYMENT 1997).

Bevor die Struktur der PR über Röntgenkristallanalyse gelöst wurde, ist angenommen worden, dass ein kleines Fragment der PR während der Kristallbildung „abbricht“ und das größere Fragment kristallisiert (Bahn 3 in Abbildung 25). Röntgenkristallographische Untersuchungen unterstützten diesen Befund jedoch nicht, da die komplette Aminosäuresequenz im Strukturmodell gefunden wurde. Für das SDS-Gel in Abbildung 25 wurde methylierte und unmethylierte Enzymlösung sowie Kristallprotein nach Zugabe von Probenpuffer denaturiert (5 min, 95°C). Aus den Größen der Proteinbanden muss geschlossen werden, dass (a) die methylierte PR ein größeres Molekulargewicht besitzt als die native PR (bei vollständiger Dimethylierung der 24 Lysine max. 700 Da) und (b) vom Kristallprotein während der Hitzedenaturierung ein kleines, auf dem Gel nicht sichtbares Fragment dissoziierte, so dass nur eine Bande bei schätzungsweise 34-35 kDa ersichtlich blieb. Da, wie bereits erwähnt, die komplette Peptidkette in der Kristallstruktur nachgewiesen werden konnte, ist die Fragmentierung der PR nur auf Hitzedenaturierung zurückzuführen. Im Gegensatz zu diesem Befund blieb die methylierte Proteinlösung, wie auf Bahn 2 des SDS-Gels ersichtlich, während des Denaturierens stabil. Da eine Amidbindung gegen Hitzeeinwirkung stabil ist, stellt sich die Frage, weshalb dieser Bruch nur im Falle des denaturierten Kristallproteins zustande kam und ob dieser am N- oder C-Terminus stattfand. Messungen des großen Fragmentes mit MALDI-TOF stehen noch aus und könnten darüber Aufschluss bringen. Ebenso könnte mit MALDI-TOF-Analysen geklärt werden, wieviele der 24 im Protein enthaltenen Lysine methyliert wurden und ob eine Mono- oder Dimethylierung stattfand. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, gibt auch im Fall der PR die Elektronendichteverteilung der Lysinseitenketten darauf leider keine Antwort, da die Auflösung von 2,0 Å nicht ausreichend ist, um Methylierungen an

den Aminogruppen zu erkennen (persönliche Mitteilung Dr. S. Panjikar, EMBL Hamburg).

4.4 Einordnung der PR in die Superfamilie der AKRs

Erste Sequenzalignments mit ClustalW zeigten, dass die Aminosäuresequenz der PR hohe Identität zu putativen Enzymen der Superfamilie der AKR besitzt (3.9). Derzeit gehören dieser Superfamilie 124 Mitglieder an, deren Funktion bekannt ist und die in 14 Familien (AKR1-AKR14) eingeteilt werden. Diese Daten beruhen auf einer eigens für AKRs erstellte Datenbank, die von HYNDMAN et al. (2003) unter <http://www.med.upenn.edu/akr/> eingerichtet wurde. Da die Daten der Homepage leider seit März 2003 nicht mehr aktualisiert wurden, muss angenommen werden, dass die tatsächliche Anzahl der AKR-Mitglieder höher liegt. Nach unserem derzeitigen Kenntnisstand ist die PR die erste AKR aus dem Pflanzenreich, die kristallisiert und deren Struktur aufgeklärt wurde. Die Nomenklatur der AKRs ist ähnlich der der Cytochrom P450 Superfamilie, jedoch beruht Erstere auf Aminosäuresequenzvergleiche. Enzyme, die über 40% Sequenzidentität mit Enzymen einer AKR-Familie besitzen, gehören dieser an. Innerhalb einer Familie können Unterfamilien gebildet werden, wenn das Enzym weniger als 60% Sequenzidentität zu anderen AKRs einer Unterfamilie aufweist (HYNDMAN et al. 2003). In Abbildung 37 (im Anhang) wurden die Aminosäuresequenzen jeweils eines Vertreters jeder AKR-Familie mit der Sequenz der PR verglichen. Die höchste Sequenzidentität (43%) innerhalb funktionell bekannter AKRs hat die PR mit dem YakC Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*. Demnach und anhand den Regeln der Nomenklatur würde die PR als zweites Mitglied der Familie 13A eingeordnet werden. Der Stammbaum in Abbildung 30 verdeutlicht zu einem großen Teil die Verwandtschaftsverhältnisse der durch *homology cloning* aus den verschiedensten Organismen erhaltenen Aldose- und Aldehydreduktasen. Die AKR-Familien AKR1-5 sind zusammengefasst in einem Hauptzweig, während die AKR-Familien AKR6-14 einen weiteren Zweig darstellen. Das einheitliche Verbreitungsmuster der AKRs in allen taxonomischen Gruppen lässt vermuten, dass es sich bei den AKR-Genen um eine evolutionsgeschichtlich früh entstandene

Genfamilie handelt (SEERY et al. 1998). Neben hoch entwickelten Vertebraten exprimieren gleichermaßen Pflanzen, Pilze, Hefen und Bakterien Vertreter dieser Enzymfamilie.

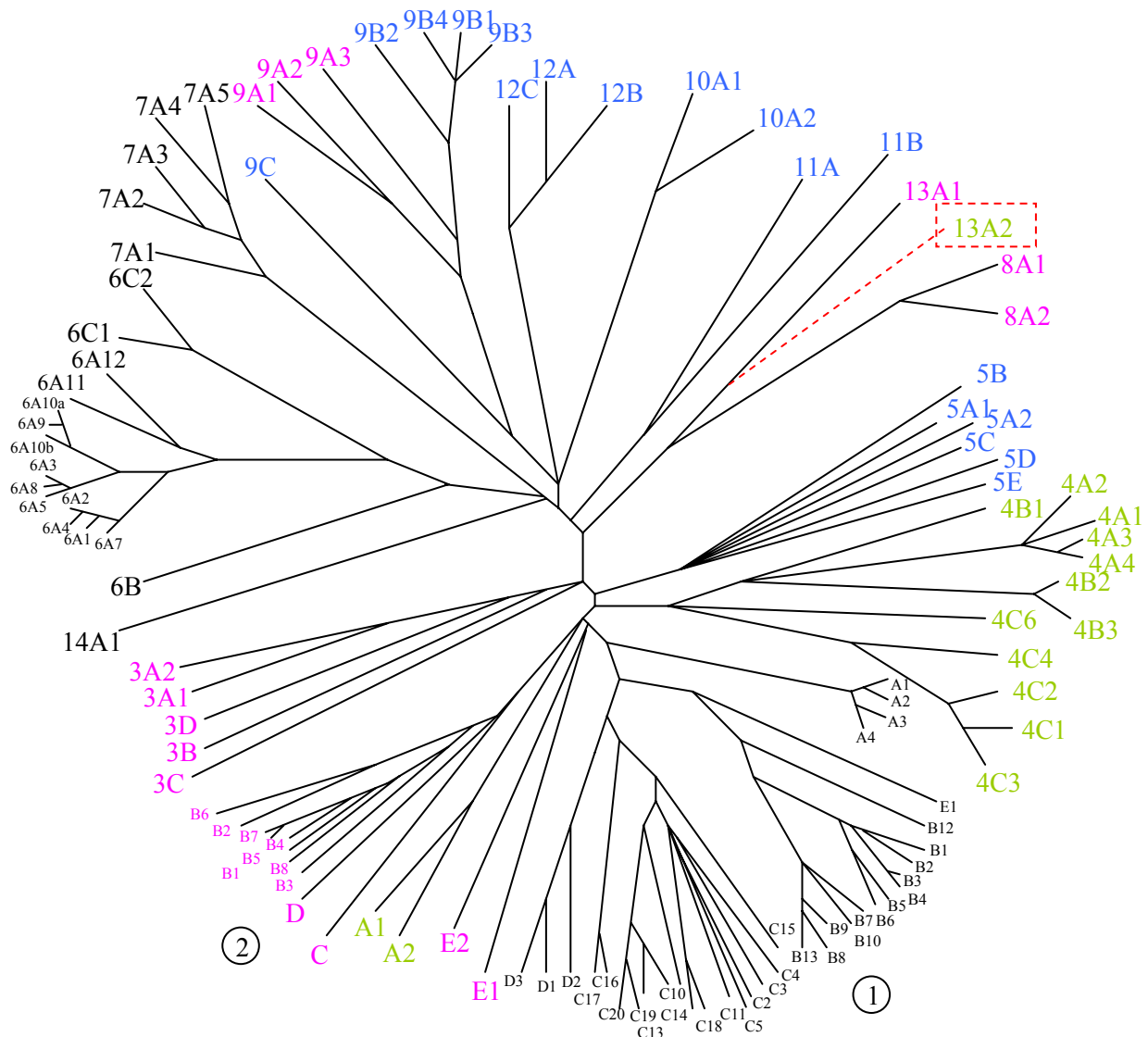


Abbildung 30. Einordnung der PR in den Stammbaum funktionell bekannter AKRs. Unterbrochene rote Linie: potentielle Lage der PR (13A2), blau: bakterielle AKRs, pink: pilzliche AKRs, schwarz: tierische AKRs, grün: pflanzliche AKRs. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an HYNDMANN et al. (2003). Aus Platzgründen wurden die Enzyme der Familien AKR1 (A1-D3) und AKR2 (B6-E1) nicht vollständig beschriftet.

Der Stammbaum in Abbildung 31 veranschaulicht die Verwandtschaftsverhältnisse der PR mit einigen pflanzlichen AKRs der Familien AKR4 und AKR2 mit Hilfe von Sequenzvergleichen. Auch in dieser Darstellung wird aufgrund der Nähe der pflanzlichen

PR zu den pilzlichen AKR8A1 und AKR13A1 deutlich, dass die Genisolierung der pflanzlichen Enzyme über *homology cloning* erfolgte und nicht, wie im Falle der PR, über säulenchromatographische Proteinreinigung auf Basis von Aktivitätstests. Das YakC-Protein (AKR13A1) aus *S. pombe*, das die höchste Sequenzidentität mit der PR besitzt, wurde von der Pyridoxal-Reduktase (AKR8A1) abgeleitet (MORITA et al. 2002). Letzteres wurde ebenso wie die PR über *reverse genetics approach* aus *S. pombe* gereinigt und isoliert.

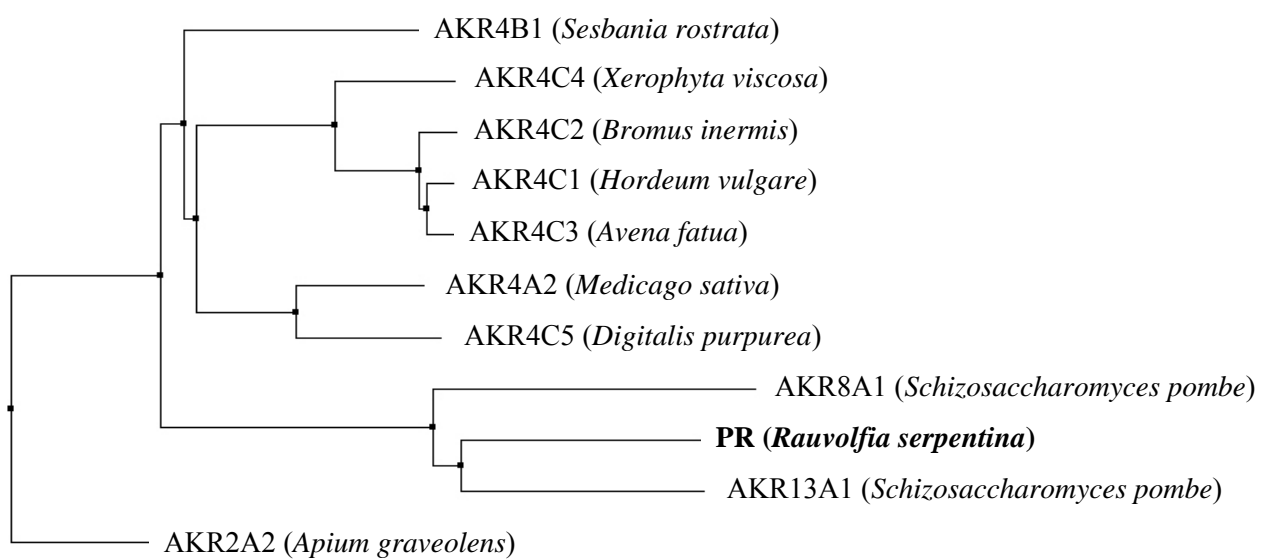


Abbildung 31. Phylogramm einiger pflanzlicher und pilzlicher, funktionell bekannter AKRs. AKR4B1 chalcone polyketide reductase *Sesbania rostrata* AJ223291, AKR4C4 aldehyde reductase *Xerophyta viscosa* AF133841, AKR4C2 aldehyde reductase *Bromus inermis* JQ2253, AKR4C1 aldehyde reductase *Hordeum vulgare* P23901, AKR4C3 aldehyde reductase *Avena fatua* S61421, AKR4A2 chalcone polyketide reductase *Medicago sativa* S48851, AKR4C5 aldose reductase *Digitalis purpurea* CAC32834, AKR8A1 pyridoxal reductase *Schizosaccharomyces pombe* T39218, Perakin-Reduktase (PR) aus *Rauwolfia serpentina* AY766462, AKR13A1 YakC aldo-keto reductase aus *S. pombe* Q09923, AKR2A2 mannose-6-phosphate reductase aus *Apium graveolens* U83687. Der Sequenzvergleich und die Erstellung des Phylogramms erfolgte mit dem Programm MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; EDGAR 2004).

Die Gene für die pflanzlichen Aldose-Reduktasen AKR4C5 und AKR4C6 wurden über eine cDNA-Bank aus *Digitalis purpurea* isoliert, basierend auf der tierischen AKR Δ 4-3-Ketosteroid 5 β -Reduktase (GAVIDIA et al. 2002). Dies erklärt auch die verwandtschaftli-

che Nähe dieser Enzyme zu den tierischen und pilzlichen Enzymen der AKR1- und AKR2-Familie. Sequenzvergleiche der PR mit denen in Abbildung 31 aufgeführten pflanzlichen Enzymen zeigten nur 20-25% Sequenzidentität miteinander und unterstützen damit erheblich die Sonderstellung der PR innerhalb existierender pflanzlicher AKRs.

Wenngleich die meisten AKRs in der Lage sind verschiedene Nitrobenzaldehyde umzusetzen, unterscheiden sich die AKRs bezüglich ihrer eigenen Substratspezifität (JEZ et al. 1997 a). Obwohl die AKR13A1 über *homology cloning* der AKR8A1 aus *S. pombe* isoliert wurde, kann AKR13A1 das natürliche Substrat Pyridoxal der AKR8A1 nicht umsetzen (MORITA et al. 2002). Tierische AKRs in der Familie AKR1 katalysieren die Oxidoreduktion von Monosacchariden, Steroiden und Prostaglandinen. Die meisten pilzlichen AKRs in den Familien AKR2 und AKR3 verwerten aromatische und aliphatische Aldehyde. Die beiden pflanzlichen AKRs der Familie AKR2 sind am Zuckerstoffwechsel von Sorbitol bzw. Mannitol beteiligt. Die PR kann nach den vorliegenden Ergebnissen nur Perakin und Zimtaldehyd reduzieren.

Unabhängig ihres taxonomischen Ursprungs weisen alle AKRs große Ähnlichkeiten in Aminosäuresequenz und genomischer Organisation auf. AKRs agieren meist als monomere Proteine, bestehen aus ca. 320 Aminosäuren und benötigen zur katalytischen Reaktion NADPH₂ als Cofaktor (JEZ et al. 1997a). Lediglich in den Familien AKR2 (Xylose Reduktase aus *Candida tenuis*), AKR6 (shaker channel β -subunit aus verschiedenen tierischen Organismen) und AKR7 (Aflatoxin Aldehyd-Reduktase aus *Rattus norvegicus*) lassen sich oligomere Formen finden (HYNDMAN et al. 2003). Der prominenteste und pharmazeutisch wichtigste Vertreter unter den AKRs ist die Aldose-Reduktase (ADR), die im menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle im Zuckerstoffwechsel spielt. Die ADR ist Teil des Polyol-Stoffwechsels und katalysiert die insulin-unabhängige Reduktion von Glucose zu Sorbitol. Somit steht das Enzym im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung von Spätschäden infolge von Hyperglykämie bei Diabetikern (BOHREN 1989, YABE-NISHIMURA 1998, DANESH et al. 2003). Klinische Studien mit ADR-Inhibitoren zeigten, dass die ADR ein potentielles Target für die Wirkstoffentwicklung zur Behandlung von Diabetes mellitus darstellt (GREENE et al. 1993, URZHUMTSEV et al. 1997, PETRASH 2004).

4.5 Struktur der AKRs

Das klinische Potential designer ADR-Inhibitoren hat die Erforschung der Struktur und Funktion der ADR und damit der AKRs entscheidend vorangetrieben. Erste röntgenkristallographische Untersuchungen an der ADR aus Schwein und Mensch zeigten, dass das Protein in Form eines $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel vorliegt (RONDEAU et al. 1992, BORHANI et al. 1992). Diese Faltung, in Abbildung 32 dargestellt, leitet sich ab von dem Enzym Triosephosphat-Isomerase (TIM) und ist in vielen Enzymfamilien weit verbreitet. NAGANO et al. (2002) schließen daraus, dass diese Enzyme trotz unterschiedlicher Reaktionsmechanismen von einem ursprünglichen TIM-barrel abgeleitet sind. Das TIM-barrel ist ein charakteristisches Merkmal aller AKRs, selbst wenn zwischen ihnen weniger als 20% Sequenzidentität besteht. Jedes der acht parallel angeordneten β -Faltblätter ist über einen Loop mit einer dazu antiparallel verlaufenden amphipatischen Helix verbunden. Mit ihrer dreidimensionalen Struktur und ihrem Reaktionsmechanismus unterscheiden sich die AKRs von den ebenfalls zu den Oxidoreduktasen gehörenden Superfamilien der multimeren kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (SDR = *short chain reductases*) und der

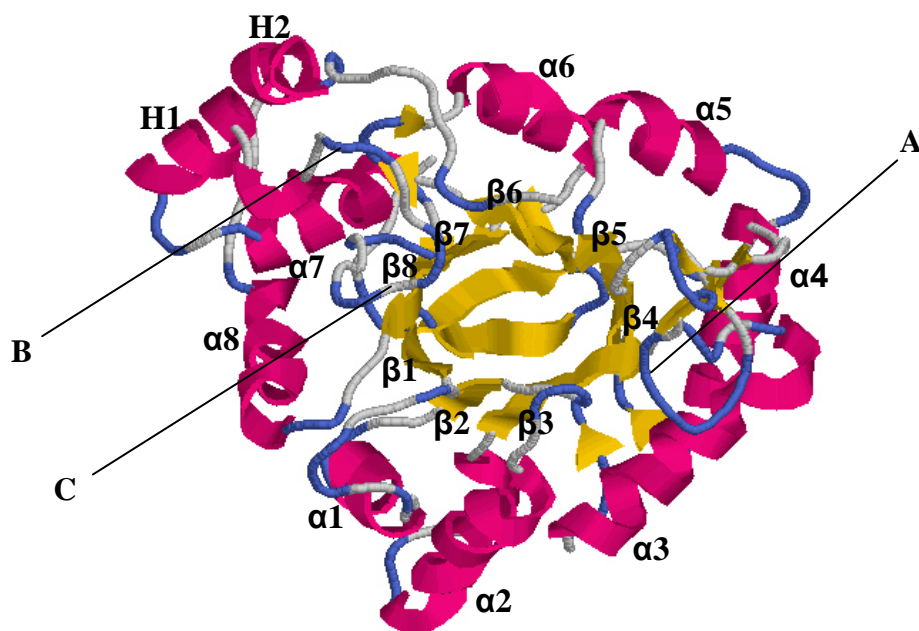


Abbildung 32. $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel Motiv am Beispiel der Röntgenkristallstruktur des Enzyms 3- α -Hydroxysteroid/Dihydrodiol Dehydrogenase (3- α -HDH, HOOG et al. 1994, PDB-Code: 1RAL). Die drei großen Loops sind mit A, B und C bezeichnet.

zinkabhängigen langkettigen Alkoholdehydrogenasen (EKLUND et al. 1985). Hauptmerkmale der SDRs sind die stark konservierte katalytische Domäne Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-Lys und die Bindung von NAD(P)H in einer Rossmann-Faltung (JÖRNVALL et al. 1995). Bei fast allen AKRs erscheinen an elf Positionen in der Primärstruktur konservierte Aminosäuren: Gly22, Gly45, Asp50, Tyr 55, Lys84, Asp112, Pro119, Gly164, Asn167, Pro186, Gln190 und Ser271, wobei sich JEZ et al. (1997a) bezüglich der Nummerierung der Aminosäurereste auf die 3- α -Hydroxysteroid/Dihydrodiol-Dehydrogenase aus *Rattus norvegicus* beziehen (Abbildung 37 im Anhang). Diese Aminosäuren spielen eine bedeutende Rolle bei der Bindung von NADPH₂ und der Bildung der katalytischen Tetrade. Letztere, bestehend aus den stark konservierten Aminosäuren Asp52, Tyr57, Lys84 und His126 (bezeichnet nach der Aminosäureabfolge der PR), vermittelt den Wasserstofftransfer vom NADPH₂ zum Kohlenstoff des Substrates. Die darauffolgende Protonierung des Substrat-Sauerstoffs erfolgt durch eine als Hauptsäure fungierende Aminosäure des Enzyms (OBMOLOVA et al. 2003). In Abbildung 33 ist die Lage des NADPH₂, umgeben von der katalytischen Tetrade, im Strukturmodell der PR dargestellt. Der Reaktionsmechanismus der AKRs während der Umsetzung der jeweiligen Substrate

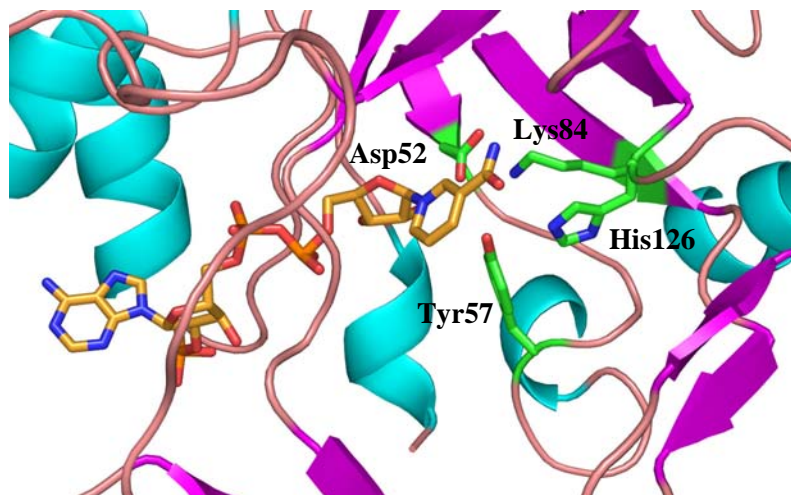


Abbildung 33. Detailansicht der gemodelten Lage des NADPH₂ an der C-terminalen Seite der PR-Struktur. NADPH₂ ist als stick-Modell dargestellt. Grün: Aminosäuren der katalytischen Tetrade, blau: Helices, pink: Faltblätter.

verläuft nach einem „*Ordered Bi-Bi*“- Mechanismus, bei dem zuerst der Cofaktor bindet und dann dieser im späteren Verlauf das Enzym als letzter Reaktionspartner wieder verlässt (YOSHIDA et al. 1992). Asp50- und His117-Mutanten zeigten keine Abnahme ihres Substratumsatzes. Daraus wurde gefolgert, dass diese Aminosäuren nicht für die Katalyse entscheidend sind. Mutagenesestudien an Tyr55 und Lys84 führten teilweise zum kompletten Verlust der katalytischen Aktivität (TARLE et al. 1993). Vergleiche verschiedener Kristallstrukturen führten zu dem Schluß, dass Tyr55 als katalytische Säure im Reaktionsmechanismus fungiert (PETRASH et al. 1995). Die Bedeutung dieser Aminosäure beweist die niedrige Enzymaktivität von ρ -Crystallin (AKR1C10). Als einziger AKR fehlt diesem Protein die Aminosäure Tyr55 (FUJII et al. 1990). Die geringe Aktivität der PR nach reduktiver Methylierung ist höchstwahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass Lys84 infolge der „maskierten“ Aminogruppe keine Bindung mit dem Kohlenstoff der Aldehydgruppe des Perakins eingehen kann.

Neben der Bindungstasche für den Cofaktor und des katalytischen Zentrums befinden sich auf der C-terminalen Seite drei große Loops A, B und C (Abbildung 32). In Vergleichsstudien der 3- α -Hydroxysteroid/Dihydrodiol Dehydrogenase mit nah verwandten AKR-Strukturen kommen JEZ et al. (1997a) zu dem Schluß, daß die Aminosäuren Met120, Phe128 und Phe129 in Loop A, Trp227 in Loop B sowie Asn306, Ala308 und Tyr310 in Loop C entscheidend sind für die Substratbindung und damit verantwortlich für die Substratspezifität. Die Autoren stellten nach multiplen Sequenzvergleichen fest, dass keine größeren Lücken, in Regionen, die im Zusammenhang mit dem TIM-barrel stehen, existieren. Jedoch zeigten sich große Lücken in der Aminosäuresequenz der Loops an der C-terminalen Seite des barrels. Daraus wurde geschlossen, dass die AKRs einerseits mit dem TIM-barrel eine konservierte dreidimensionale Faltung besitzen, während die Substratspezifität andererseits durch Modifikationen der Loops nahe der aktiven Seite beeinflusst wird (EHRENSBERGER UND WILSON 2004). Bei ADR- und ALR-Kristallkomplexen konnte mit verschiedenen Inhibitoren gezeigt werden, dass diese AKRs aufgrund der flexiblen Konformation der Loops in der Lage sind, sich einer weiten Substratvielfalt anzupassen (WILSON et al. 1993, EL-KABBANI et al. 1997).

4.6 Strukturelle Besonderheiten der PR

Wie bereits erwähnt ist die Gesamtstruktur der PR ähnlich zu den bisher bekannten Strukturen der AKRs. Die größten strukturellen Unterschiede der PR betreffen den C-terminalen Bereich und die sich dort befindlichen Loops, die, wie bei allen AKRs, für die Substratspezifität verantwortlich sind. Die Kristallstruktur der PR zeigt an der Oberfläche einen Proteinkanal, der dem Cofaktor NADPH₂ als Zugang zu seiner Bindungsstelle dienen könnte. In Abbildung 34 ist in der Oberflächenansicht des Proteins dieser Kanal sichtbar. Vermutlich dringt NADPH₂ von der einen Seite in den Proteinkanal ein, während Perakin von der anderen Seite in das katalytische Zentrum eintritt.

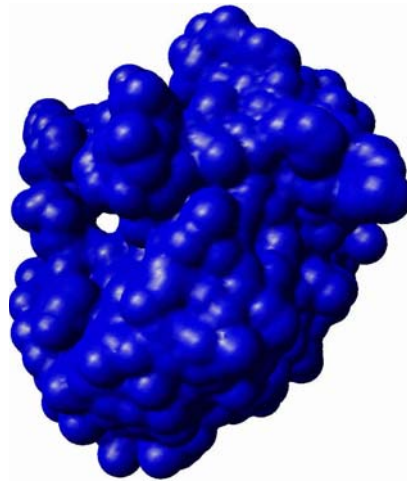


Abbildung 34. Darstellung der Oberflächenstruktur der PR mit Blick auf den Proteinkanal, von dem aus Perakin von der einen und NADPH₂ von der anderen Seite in das katalytische Zentrum vordringt.

Auffällig beim Betrachten der monomeren Struktur ist der lange C-Terminus, der, nicht so wie bei anderen AKRs, vom TIM-barrel weggerichtet ist (Abbildung 29). In Abbildung 35 ist die PR als *spacefill*-Modell dargestellt. Berechnungen der Oberflächenkontakte der Grenzfläche der Moleküle sowie die C-terminale Struktur legen den Schluß nahe, dass die PR im Kristall höchstwahrscheinlich als Dimer vorliegt. In der Familie der AKRs existieren nur in den Unterfamilien AKR7 und AKR2 dimere Enzyme.

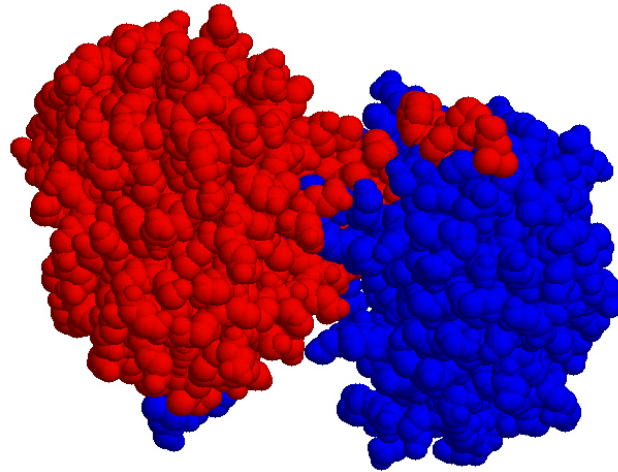


Abbildung 35. Die dimere Struktur der PR in der *spacefill*-Darstellung. Die große Kontaktfläche zwischen den Molekülen lässt darauf schließen, dass die PR im Kristall als Dimer vorliegt.

Im Vergleich der in Abbildung 36 dargestellten Dimere mit der PR berühren sich die monomeren Untereinheiten der AKR7A1 und AKR2B2 an ihren Flanken, während bei der PR die C-Termini einerseits in das gegenüberliegende Molekül eingreifen (Abbildung 35) und andererseits mit den Faltblättern an den C-Termini ein β -barrel formen. Diese Struktur unterscheidet sich damit maßgeblich von den anderen dimeren AKRs.

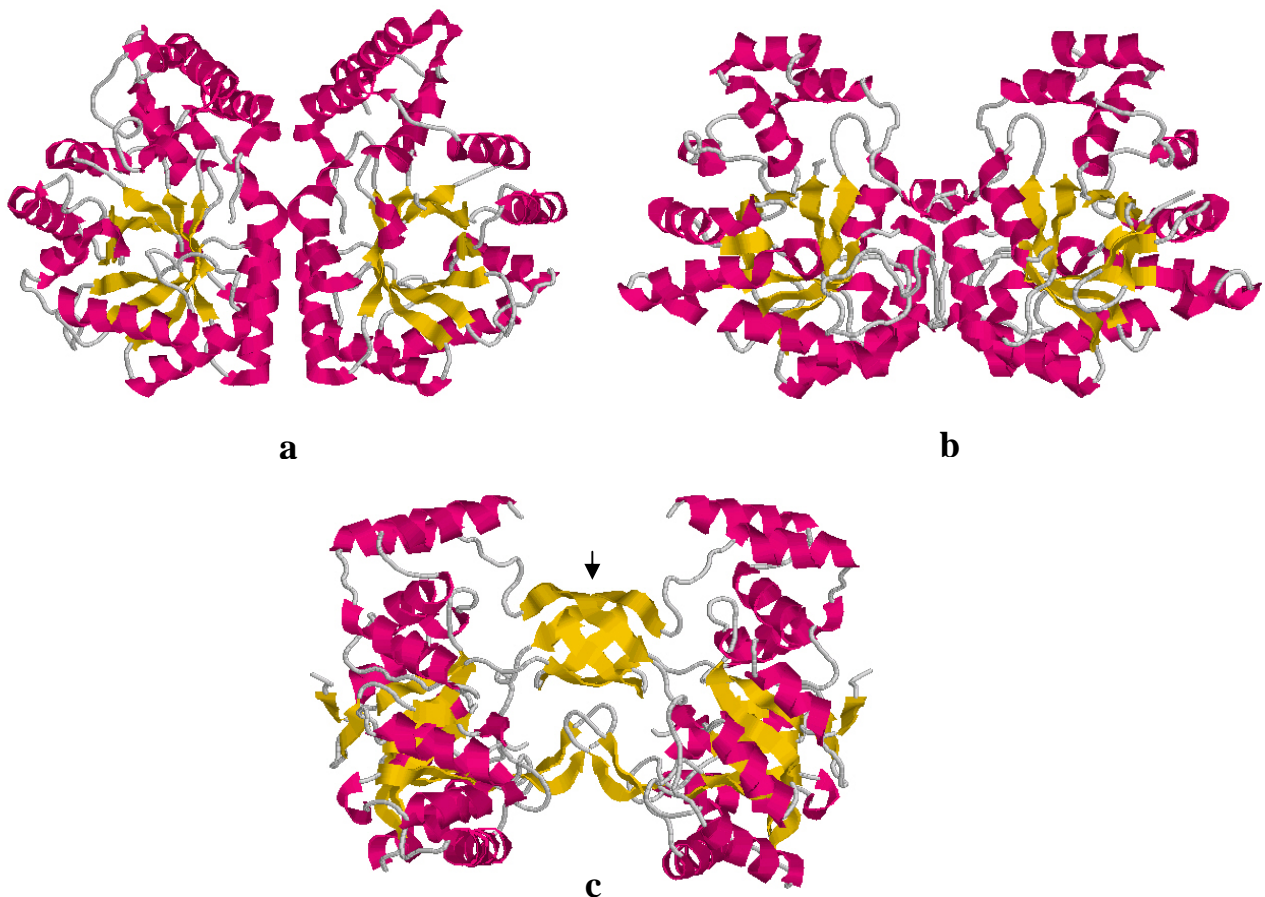


Abbildung. 36. Kristallstrukturen zweier dimerer Reduktasen der AKR-Superfamilie und der PR. (a) Die Kristallstruktur von AKR7A1 Aflatoxin Reduktase aus *Rattus norvegicus* (PDB-Code: 1GVE) (KOZMA et al. 2002). (b) Die Kristallstruktur von AKR2B5 Xylose-Reduktase aus *Candida tenuis* (PDB-Code: 1JEZ) (KAVANAGH et al. 2002). (c) Die dimere Darstellung der PR. Pfeil: Die Faltblätter am C-Terminus bilden miteinander ein β -barrel.

Das Ergebnis der Größenausschlußchromatographie deckt sich nicht mit dem kristallographischen Befund. Die PR liegt in Lösung eindeutig als Monomer vor. Es wurde bereits in anderen Fällen beschrieben, dass ein Protein im Kristall oder bei hohen Enzymkonzentrationen als Dimer vorliegt, jedoch in Lösung oder bei niedrigen Enzymkonzentration als Monomer (TRAPANI et al. 2001). Danach könnte ebenso der pH-Wert für die widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein, da die Größenausschlußchromatographie bei pH 7,2 durchgeführt wurde und die Kristallisation bei pH 5,6. SAX-(small angle scattering) Experimente könnten Aufschluss darüber geben, wie sich Perakinlösung in Abhängigkeit ihrer Konzentration und ihrem pH-Wert verhält. SAX-Daten geben Informationen zu einigen strukturellen Parametern von Proteinen wie dem Trägheitsradius, der eine wichtige Größe zur Charakterisierung der räumlichen Ausdehnung von Proteinen ist.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit war es aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich sich intensiver mit der Strukturanalyse der PR auseinanderzusetzen, da die Struktur erst vor kurzem vollständig gelöst werden konnte. Kommende Veröffentlichungen werden Gegenstand dieser Thematik sein. Mehrere interessante Aspekte ergeben sich aus dieser Arbeit für die nahe Zukunft:

Im Vordergrund folgender Arbeiten steht die detaillierte Strukturanalyse der PR. In Cokristallisations- und *Soaking*-Experimenten sollen Protein-Liganden-Komplexe mit dem Substrat Perakin und NADPH₂ erzeugt werden. Erste Versuche die PR mit NADPH₂ zu *soaken* gestalteten sich schwierig. Es sollte versucht werden Cokristalle mit NADPH₂ zu züchten und diese mit Perakin zu *soaken*, um die Bindungsverhältnisse von Substrat und Cosubstrat darzustellen.

Die sich widersprechenden Ergebnisse aus der Größenausschlußchromatographie und der Röntgenkristallstrukturanalyse der PR, ob das Enzym als Monomer und/oder als Dimer vorliegt, können mit SAX-Experimenten näher untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit das Dimerisierungsverhalten der PR zu überprüfen, ist die analytische Ultrazentrifugation. Hierbei werden sehr hohe Zentrifugalfelder erzeugt, mit denen Proteine ihrer Größe nach getrennt werden.

Enzymkinetische Untersuchungen konnten u.a. aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Substrates Perakin nicht durchgeführt werden. Da das Alkaloid käuflich nicht erhältlich ist, muss die zeitaufwendige und arbeitsintensive Isolierung von Perakin aus pflanzlichen Zellkulturen erfolgen. In Zellsuspensionskulturen ist Perakin nur in Spuren zu finden. Deshalb ist die Isolation und Reinigung des Perakins nur aus langsam wachsenden *R. serpentina*-Wurzelkulturen möglich. In Abhängigkeit des Perakingehaltes der Wurzeln könnte aus 100 g Wurzeltrockengewicht maximal 0,3 g Perakin gereinigt werden.

Weiterhin sollte eine umfassende Durchführung von Aktivitätstests mit putativen Substraten wie z. B. substituierten Zimtaldehyden und Nitrobenzaldehyden, verschiedenen Monosacchariden sowie Substraten einzelner pflanzlicher AKRs wie Pyridoxal und 2-Phthalaldehyd erfolgen. Die Untersuchung der Substratspezifität durch Mutagenesestudien an Aminosäuren, die in den großen Loops maßgeblich für die Substratbindung verantwortlich sind, stellen eine weitere Möglichkeit dar, ein umfassenderes und genaueres Bild des enzymatischen Verhaltens der PR zu liefern.

Literaturverzeichnis

- ARNDT UW, WONACOTT AJ (1977) The rotation method in crystallography. Amsterdam: North-Holland, 5-18
- BARLEBEN L, MA X, KOEPKE J, PENG G, MICHEL H, STÖCKIGT J (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons. *Biochim. Biophys. Acta* **1747**, 89-92
- BAYER A, MA X, STÖCKIGT J (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis - functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 2787-2795
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1513–1523
- BOHREN KM, BULLOCK B, WERMUTH B, GABBILDUNGAY KH (1989) The Aldo-Keto Reductase Superfamily: cDNAs and Deduced Amino Acid Sequences of Human Aldehyde and Aldose Reductases. *J. Biol. Chem.* **264**, 9547-9551
- BORHANI DW, HARTER TM, PETRASH JM (1992) The crystal structure of the aldose reductase: NADPH binary complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 24841–24847
- BRADFORD MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- COWTAN K (1994) Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, **31**, 34-38
- CZEPAS J, DEVEDJIEV Y, KROWARSCH D, DEREWENDA U, OTLEWSKI J, DEREWENDA ZS (2004) The impact of Lys→Arg surface mutations on the crystallization of the globular domain of RhoGDI. *Acta Cryst.* **D60**, 275-280
- DANESH FR, WADA J, WALLNER EI, SAHAI A, SRIVASTAVA SK, KANWAR YS (2003) Gene Regulation of Aldose-, Aldehyde- and a Renal Specific Oxido Reductase (RSOR) in the Pathobiology of Diabetes Mellitus. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1399-1406
- DeLano WL (2003) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA
- DENIS JN, GREENE AE, GUENARD D, GUÉRITTE-VOEGELEIN F, MANGATAL L, POTIER P (1988) Highly efficient practical approach to natural Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5917-5919.

- DE LUCA V, MARINEAU C, BRISSON N (1989) Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal DOPA decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2582-2586
- DE LUCA V, LAFLAMME P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 225-233
- DEREWENDA U, MATEJA A, DEVEDJIEV Y, ROUTZAHN KM, EVDOKIMOV AG, DEREWENDA ZS, WAUGH DS (2004) The Structure of *Yersinia pestis* V-Antigen, an Essential Virulence Factor and Mediator of Immunity against Plague. *Structure* **12**, 301-306
- DOGRU E, WARZECHA H, SEIBEL F, HAEBEL S, LOTSPEICH F, STÖCKIGT J (2000) The gene encoding polynneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the α/β hydrolase super family. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1397–1406
- EDGAR RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-97
- EHRENSBERGER AH UND WILSON DK (2004) Structural and Catalytic Diversity in the Two Family 11 Aldo-keto Reductases. *J. Mol. Biol.* **337**, 661–673
- EKLUND H, HORJALES E, JÖRNVALL H, BRÄNDÉN CI, JEFFERY J (1985) Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry* **24**, 8005-8012
- EL-KABBANI O, CARPER DA, MCGOWAN MH, DEVEDJIEV Y, REES-MILTON KJ, FLYNN TG (1997) Studies on the inhibitor-binding site of porcine aldehyde reductase: crystal structure of the holoenzyme–inhibitor ternary complex. *Proteins* **29**, 186–192
- EMSLEY P, COWTAN K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2126-2132
- ENDREß S, STÖCKIGT J (1993) ‘One-Pot’ Synthesis of Raumacline from Ajmaline. *Helv. Chim. Acta* **76**, 2544-2546
- FALKENHAGEN H, STÖCKIGT J (1995a) Enzymatic Biosynthesis of Vomilenine, a Key Intermediate of the Ajmaline Pathway, Catalyzed by a Novel Cytochrome P450-Dependent Enzyme from Plant Cell Cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Z. Naturforsch.* **50c**, 45–53

- FALKENHAGEN H, POLZ L, TAKAYAMA H, KITAJIMA M, SAKAI S, AIMI N, STÖCKIGT J (1995 b) Substrate Specificity of Vinorine Hydroxylase, a novel Membrane-bound Key Enzyme of Rauvolfia Indole Alkaloid Biosynthesis. *Heterocycles* **41**, 2683–2690
- FARABAUGH PJ (1978) Sequence of the Iac I gene. *Nature* **274**, 765
- FRICK S, KRAMELL R, LARKIN PJ, KUTCHAN TM (2005) Studying morphine biosynthesis using transgenic opium poppy (*Papaver somniferum* L). *Acta Horticulturae* **680**, 37-43
- FUJII Y, WATANABE K, HAYASHI H, URADE Y, KURAMITSU S, KAGAMIYAMA H, HAYASHI O (1990) Purification and characterization of rho-crystallin from Japanese common bullfrog lens. *J. Biol. Chem.* **265**, 9914-9923
- GAVIDIA I, PÉREZ-BERMÚDEZ P, SEITZ HU (2002) Cloning and expression of two novel aldo-keto reductases from *Digitalis purpurea* leaves. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2842–2850
- GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, UNGER M, STÖCKIGT J (2001) Development of an Efficient System for the Separation of Indole Alkaloids by HPLC and its Applications. *Phytochem. Analysis* **12**, 96-103
- GERASIMENKO I, SHELUDKO Y, MA X, STÖCKIGT J (2002) Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to about 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2204–2213
- GREENE DA, SIMA AA, STEVENS MJ, FELDMAN EL, KILLEN PD, HENRY DN, THOMAS T, DANANBERG J, LATTIMER SA (1993) Aldose reductase inhibitors: an approach to the treatment of diabetic nerve damage. *Diabetes Metab. Rev.* **9**, 189–217
- HARTMANN T (1991) Alkaloids. In: Rosenthal GA, Berenbaum MR (eds.) *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Vol. I: The Chemical Participants. 2. Auflage. San Diego (Academic Press)
- HEFNER T, AREND J, WARZECHA H, SIEMS K, STÖCKIGT J (2002) Arbutin Synthase, a Novel Member of the NRD1 Glycosyltransferase Family is a Unique Multifunctional Enzyme Converting Various Natural Products and Xenobiotics. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1731-1741
- HOOG SS, PAWLOWSKI JE, ALZARI PM, PENNING TM, LEWIS M (1994) Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2517-2521

- HU YM, GAN FY, LU CH, DING HS, SHEN YM (2003). Production of Taxol and related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis*. *Acta. Bot. Sin.* **45**, 373-378.
- HYNDMAN D, BAUMAN DR, HEREDIA VV, PENNING TM (2003) The aldo-keto superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* **143-144**, 621-631
- JANCARIK J, KIM SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411
- JEZ JM, BENNETT MJ, SCHLEGEL BP, LEWIS M, PENNING TM (1997a) Comparative anatomy of the aldo-keto superfamily. *Biochem. J.* **326**, 625-636
- JEZ JM, FLYNN TG, PENNING TM (1997b) A nomenclature system for the aldo-keto reductase superfamily. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 579-600
- JONES S, THORNTON JM (1995) Protein-Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 31-65
- JÖRNVALL H, PERSSON M, KROOK M, ATRIAN S, GONZALEZ-DUARTE R, JEFFREY J, GHOSH D (1995) Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDR) *Biochemistry* **34**, 6003-6013
- KABSCH W, SANDER C (1983) Dictionary of protein secondary structures: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637
- KAVANAGH KL, KLIMACEK M, NIDETZKY B, WILSON DK (2002) The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*. *Biochemistry* **41**, 8785-8795
- KOBAYASHI M, KUBOTA M, MATSUURA Y (1999) Crystallization and improvement of crystal quality for X-ray diffraction of maltooligosyl trehalose synthase by reductive methylation of lysine residues. *Acta Crystallogr. D* **55**, 931-933
- KOHLER J, GOLDSPIEL BR (1994). Evaluation of new drug Paclitaxel (Taxol). *Pharmacotherapy* **14**, 3-34
- KOZMA E, BROWN E, ELLIS EM, LAPHORN AJ (2002) The Crystal Structure of Rat Liver AKR7A1: A dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **277**, 16285-16293
- KRAULIS P (1991) MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950

- KURINOV IV, MAO C, IRVIN JD, UCKUN FM. (2000) X-ray crystallographic analysis of pokeweed antiviral protein-II after reductive methylation of lysine residues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **275**, 549-552
- KUTCHAN TM, HAMPP N, LOTTSPREICH F, BEYREUTHER K, ZENK MH (1988) The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*: DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **257**, 40-44
- KUTCHAN TM (1995) Alkaloid Biosynthesis-The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell* **7**, 1059-1070
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LIBOT F, KUNESCH N, POISSON J (1980) Structure Complète de la Raucaffrinoline et Filiation avec la Vomilenine. *Phytochemistry* **19**, 989-994
- LINSMAIER EM, SKOOG F (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **18**, 100-127
- LONGENECKER KL, GARRARD SM, SHEFFIELD PJ, DEREWENDA ZS (2001). Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 679-688
- MA X, KOEPKE J, PANJIKAR S, FRITZSCH G, STÖCKIGT J. (2005) Crystal Structure of Vinorine Synthase, the First Representative of the BAHD Superfamily. *J. Biol. Chem.* **280**, 13576-13583
- MA X, KOEPKE J, FRITZSCH G, DIEM R, KUTCHAN TM, MICHEL H, STÖCKIGT J (2004) Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of Strictosidine Synthase from *Rauvolfia* – the First Member of a Novel Enzyme Family. *Biochim. Biophys. Acta* **1702**, 121-124
- MORITA T, HURUTA T, ASHIUCHI M, YAGI T (2002) Characterization of Recombinant YakC of *Schizosaccharomyces pombe* showing YakC defines a new family of Aldo-keto Reductases. *J. Biochem.* **132**, 635-641
- MORRIS RJ, PERRAKIS A, LAMZIN VS (2003) ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods Enzymol.* **374**, 229-244
- MURSHUDOV GN, VAGIN AA, DODSON EJ (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255

- NAGANO N, ORENGO CA, THORNTON JM (2002) One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. *J. Mol. Biol.* **321**, 741–765
- NAKANO M, MORITA T, YAMAMOTO T, SANO H, ASHIUCHI M, MASUI R, KURAMITSU S, YAGI T (1999) Purification, molecular cloning, and catalytic activity of *Schizosaccharomyces pombe* pyridoxal reductase: a possible additional family in the aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **274**, 23185–23190
- OBITZ P (1995) Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Pharmazie
- OBITZ P, ENDREB S, STÖCKIGT J (1995) Enzymatic Biosynthesis of Raumacline. *Phytochemistry* **40**, 1407–1417
- OBSOLOVA G, TEPLYAKOV A, KHIL PP, HOWARD AJ, CAMERINI-OTERO DR, GILLILAND GL (2003) Crystal Structure of the *Escherichia Coli* Tas Protein, an NADP(H)-Dependent Aldo-Keto Reductase. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **53**, 323–325
- PAINÉ JA, SHIPTON CA, CHAGGAR S, HOWELLS RM, KENNEDY MJ, VERNON G, WRIGHT SY, HINCHLIFFE E, ADAMS JL, SILVERSTONE AL, DRAKE R (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* **23**, 482–487
- PERRAKIS A, MORRIS R, LAMZIN VS (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458-463
- PETRASH JM, MURTHY B, YOUNG M, MORRIS K, RIKIMARU L, GRIEST TA, HARTER T (2001) Functional genomic studies of aldo-keto reductases. *Chemico-Biological Interactions* **130-132**, 673-683
- PETRASH JM, TARLE I, WILSON DK, QUIOCHO FA (1995) Aldose reductase catalysis and crystallography: Insights from recent advances in enzyme structure and function. *Diabetes* **43**, 955-959
- PETRASH JM (2004) All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 737-749
- PFITZNER A, STÖCKIGT J (1982) Partial Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **21**, 1585–1588

- PFITZNER A, STÖCKIGT J (1983 a) Polyneuridine Aldehyde Esterase: an Unusually Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 459–460
- PFITZNER A, STÖCKIGT J (1983 b) Characterization of Polyneuridine Aldehyde Esterase, a Key Enzyme in the Biosynthesis of Sarpagine/Ajmaline Type Alkaloids. *Planta Med.* **48**, 221-227
- PFITZNER A, POLZ L, STÖCKIGT J (1986) Properties of Vinorine Synthase—the *Rauwolfia* Enzyme involved in the Formation of the Ajmaline Skeleton. *Z. Naturforsch.*
- POLZ L, SCHÜBEL H, STÖCKIGT J (1987) Characterization of 2 β -(*R*)-17-O-Acetyljmalan: Acetylerase – a Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia* Alkaloid Ajmaline. *Z. Naturforsch.* **42c**, 333–342
- RAYMENT I (1997) Reductive Alkylation of Lysine Residues to Alter Crystallization Properties of Proteins. *Methods in Enzymology* **276** (12), 171-179
- RAGUSO RA, LEVIN RA, FOOSE SE, HOLMBERG MW, MCDADE LA (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. *Phytochemistry* **63**, 265-284
- READ RJ (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr.* **A42**, 140-149
- READ RJ (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr.* **D57**, 1373-1382
- RINALDI F, HIMWICH HE (1955) A Comparison of Effects of Reserpin and some Barbiturates on the Electrical Activity of Cortical and Subcortical Structures of the Brain of Rabbits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **61**, 27-35
- RONDEAU JM, TETE F, PODJARNY A, REYMANN JM, BARTH P, BIELLMANN JF, MORAS D (1992) Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **355**, 469-472
- RUPPERT M, WOLL J, GIRITCH A, GENADY E, MA X, STÖCKIGT J (2005) Functional expression of an ajmaline pathway-specific esterase from *Rauwolfia* in a novel plant-virus expression system. *Planta* **222**, 888-898
- RUPPERT M, PANJIKAR S, BARLEBEN L AND STÖCKIGT J (2006) Heterologous expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of raucaffricine glucosidase, a plant enzyme specifically involved in *Rauwolfia* alkaloid biosynthesis. *Acta Crystallogr. F* **62**, 257-260

- RUYTER CM, STÖCKIGT J (1991) Enzymatic Formation of Raucaffricine, the Major Indole Alkaloid of *Rauwolfia serpentina* Cell-Suspension Cultures. *Helv. Chim. Acta* **74**, 1707-1712
- RYPNIEWSKI WR, HOLDEN HM, RAYMENT I (1993) Structural Consequences of Reductive Methylation of Lysine Residues in Hen Egg White Lysozyme: An X-ray Analysis at 1.8 Å Resolution. *Biochemistry* **32**, 9851-9858
- SANGER F, NICKLEIN S, COULSON AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- SAYLE R, MILNER-WHITE EJ (1995) RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sciences* **20**, 374-376
- SCHMIDT D, STÖCKIGT J (1995) Enzymatic formation of the sarpaganbridge: a key step in the biosynthesis of sarpagine- and ajmaline-type alkaloids. *Planta Med.* **61**, 254-258
- SCHUBOT FD, WAUGH DS (2004) A pivotal role for reductive methylation in the *de novo* crystallization of a ternary complex composed of *Yersinia pestis* virulence factors YopN, SycN and YscB. *Acta Crystallogr.* **D60**, 1981-1986
- SCHÜBEL H, RUYTER CM, STÖCKIGT J (1989) Improved Production of Raucaffricine by Cultivated *Rauwolfia* Cells. *Phytochemistry* **28**, 491-494
- SEERY LT, NESTOR PV, FITZGERALD GA (1998) Molecular Evolution of the Aldo-keto Reductase Gene Superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 139-146
- STÖCKIGT J, ZENK M (1977) Strictosidine: The key Intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem Commun.*, 646-648
- STÖCKIGT J (1986) Enzymatic Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids: Ajmaline, Sarpagine and Vindoline. In: *New Trends in Natural Products Chemistry 1986. Studies in Organic Chemistry, Vol. 26.* Atta-ur-Rahman, P. W. Le Quesne (Eds.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 497-511
- STÖCKIGT J, PANJIKAR S, RUPPERT M, BARLEBEN L, MA X, LORIS E, HILL M (2006) Molecular Architecture of Major Enzymes of Ajmaline Biosynthesis. *Phytochem. Reviews*, submitted
- SULKOWSKI E (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3**, 1-7
- TARLE I, BORHANI DW, WILSON DK, QUIOCHO FA, PETRASH JM (1993) Probing the Active Site of Human Aldose Reductase - Site-directed Mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77 and His-110. *J. Biol. Chem.* **268**, 25687-25693

- TAYLOR WI, FREY AJ, HOFMANN A (1962) Vomilenin und seine Umwandlung in Perakin. *Helv. Chim. Acta* **45**, 611-614
- TRAPANI S, LINSS J, GOLDENBERG S, FISCHER H, CRAIEVICH AF, OLIVA G (2001) Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **313**, 1059-1072
- URZHUMTSEV A, TETE-FAVIER F, MITSCHLER A, BARBANTON J, BARTH P, URZHUMTSEVA L, BIELLMANN JF, PODJARNY A, MORAS D (1997) A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* **5**, 601-612
- WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGON P, MCPHAIL A (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327
- WHITE HD, RAYMENT I (1993) Kinetic characterization of reductively methylated myosin subfragment 1. *Biochemistry* **32**, 9859-9865
- WILSON DK, TARLE I, PETRASH JM, QUIOCHO FA (1993) Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**, 9847-9851
- WILSON DK, BOHREN KM, GABBILDUNGAY KH, QUIOCHO FA (1992) An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **257**, 81-84
- YABE-NISHIMURA C (1998) Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacological Reviews* Vol. **50**, (1), 21-31
- YE X, AL-BABILI S, KLOTI A, ZHANG J, LUCCA P, BEYER P, POTRYKUS I (2000) Engineering the provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303-305
- YOSHIDA M, KUROKI Y, KOBAYASHI E, TAMAOKI B (1992) Kinetic mechanism of reduction of testosterone by hepatic 5 beta-reductase of chicken and inhibition of the reductase activity by a secosteroid, an azasteroid and glycyrrhetic acid. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 29-36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Pharmazeutisch wirksame pflanzliche Alkaloide.....	4
Abbildung 2. <i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth als Pflanze (a), Wurzel (b), Zellsuspensionskultur (c), Kalluskultur (d) und Wurzelkultur <i>hairy roots</i> (e).....	6
Abbildung 3. Biosyntheseweg von Ajmalin in <i>Rauwolfia serpentina</i> -Zellsuspensionskulturen ausgehend von Tryptamin und Secologanin.....	9
Abbildung 4. Gesamt-RNA isoliert aus <i>R. serpentina</i> Br im Formaldehyd-Agarosegel.....	38
Abbildung 5. DNA-Banden im Agarosegel nach PCR mit degenerierten Primern.....	40
Abbildung 6. Restriktionsanalysen der in pGEM-T-Vektoren subklonierten PCR-Produkte der 3'- und 5'- RACE-PCR.....	41
Abbildung 7. Vollständige DNA- und Proteinsequenz der PR.....	42
Abbildung 8. Restriktionsanalyse der in pQE-2-Vektoren klonierten PCR-Produkte.....	43
Abbildung 9. Elutionsprofil der PR an der Ni ²⁺ -NTA-Matrix.....	44
Abbildung 10. SDS-Gel gefärbt mit Coomassie Blau.....	44
Abbildung 11. HPLC-Profile der Referenzen Perakin (a) und Raucaffrinolin (b) sowie der gereinigten Enzymlösung ohne (c) und mit NADPH ₂ (d).....	45
Abbildung 12. EI-Massenspektren von dem aus pflanzlichen Suspensionskulturen isolierten Perakin (a) und von dem rekombinanten Protein enzymatisch gebildeten Raucaffrinolin (b).....	47
Abbildung 13. SDS-Gel gefärbt mit Coomassie Blau.....	48
Abbildung 14. Alignment der Aminosäuresequenz der PR mit Proteinen der Datenbank UniProt.....	50
Abbildung 15. Elutionsprofil der Molekulargewichtsbestimmung für die PR an Sephacryl S-200.....	52
Abbildung 16. Eichgerade der Molekulargewichtsbestimmung für die PR an Sephacryl S-200.....	53
Abbildung 17. Temperaturabhängigkeit der PR.....	54
Abbildung 18. pH-Abhängigkeit der PR.....	55
Abbildung 19. Synthese von 21-Hydroxyraumaclin aus Ajmalin durch flavinkatalysierte Photooxidation.....	57
Abbildung 20. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Syntheseansätze nach 20 min (a), 40 min (b), 60 min (c) und 90 min (d).....	57
Abbildung 21. HPLC-Profile von 21-Hydroxyraumaclin als Referenz (a), mit (b) und ohne (c) NADPH ₂	58

Abbildung 22. Schematischer Reaktionsverlauf während der reduktiven Methylierung eines Proteins.....	59
Abbildung 23. Pipettierschema von 30% PEG 4000 und 1M Natriumcitrat pH 5,6 auf einer Linbroplatte.....	60
Abbildung 24. Kristalle der PR unter polarisiertem Licht.....	61
Abbildung 25. SDS-Gel gefärbt mit Coomassie Blau.....	62
Abbildung 26. Einfluß der reduktiven Methylierung auf die Enzymaktivität.....	63
Abbildung 27. Diffraktionsmuster eines PR-Kristalles mit einer Auflösung von 2,3 Å.....	65
Abbildung 28. Die monomere und dimere Struktur der PR.....	68
Abbildung 29. Die monomere Darstellung der Röntgenkristallstruktur der PR mit Blick auf das β -barrel, modelliert mit dem Cofaktor NADPH ₂	69
Abbildung 30. Einordnung der PR in den Stammbaum funktionell bekannter AKRs.....	76
Abbildung 31. Phylogramm einiger pflanzlicher, funktionell bekannter AKRs.....	77
Abbildung 32. (β/α) ₈ TIM-barrel Motiv am Beispiel der Röntgenkristallstruktur des Enzyms 3- α -Hydroxysteroid/Dihydrodiol Dehydrogenase.....	79
Abbildung 33. Detailansicht der gemodellten Lage des NADPH ₂ an der C-terminalen Seite der PR-Struktur.....	80
Abbildung 34. Darstellung der Oberflächenstruktur der PR mit Blick auf den Proteinkanal.....	82
Abbildung 35. Die dimere Struktur der PR in der <i>spacefill</i> -Darstellung.....	83
Abbildung 36. Kristallstrukturen zweier dimerer Reduktasen der AKR-Superfamilie und der PR.....	84
Abbildung 37. Multiples Alignment der PR mit repräsentativen Vertretern bestehender Familien der AKR-Superfamilie.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Proteinfragmente der mutmaßlichen PR nach LysC-Verdau und N-terminaler Sequenzierung.....	39
Tabelle 2. Degenerierte Primer abgeleitet von Proteinfragmenten der PR.....	39
Tabelle 3. Bedingungen und Programm der PCR mit degenerierten Primer.....	39
Tabelle 4. 5'- und 3'-Primer für die RACE-PCR.....	40
Tabelle 5. RACE-PCR zur Erlangung des Vollängenklones.....	41
Tabelle 6. Forward- und reverse Primer mit Sph I- und Sac II-Schnittstelle für die Klonierung in den pQE-2-Vektor.....	43
Tabelle 7. Primer für Mutationsexperimente Lysin→Alanin an den Positionen 100, 244 und 296.....	48
Tabelle 8. Übersicht getesteter Substrate auf PR-Aktivität.....	56
Tabelle 9. Datenstatistik eines PR-Kristalls.....	66

Abkürzungsverzeichnis

A,C,G,T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
AAE	Acetyljalin Acetylerase
AKR	Aldo/Keto-Reduktase
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transkriptase
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	<i>copy</i> -DNA oder komplementäre DNA
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAPase	Dipeptidylaminopeptidase
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAB	Dimethylaminboran-Komplex
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C, G, T)
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESI-MS	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
His-tag	(Histidin) ₆ -Markierung
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton

LB	Luria-Bertani
MAD	Multiple anomale Dispersion
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MeOH	Methanol
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>moleculare weight cut off</i>
NADPH ₂	red. Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADP ⁺	ox. Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _x	optische Dichte bei x nm gemessen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PR	Perakin-Reduktase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
Rf	rel. Laufstrecke
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
rpm	<i>Rounds per minute</i>
Rt	Retentionszeit
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (1U = 16.67 nkat)
UV	Ultravoiolett
x g	x-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

Aminosäurecode

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

Anhang

4A1	-----MAAAIEIPTIVFPNSS-----	-----AQQRMPVVGMG	27
4B2	-----MESNGVPMITLSSG-----	-----IRMPALGMG	23
4C1	---MASAKATMGQGEQDHFVLKSG---	-----HAMPVGLG	30
2A1	-----MSTVTLSG-----	-----YEMPVIGLG	18
1C5	-----MDPKFORVALSDG-----	-----HFIPVLGFG	22
1D2	-----MNLSTANHHIPLNDG-----	-----NSIPIIGLG	24
1B2	-----ATHLVLYNG-----	-----AKMPILGLG	18
1A2	-----AASCVLHTG-----	-----QKMPLIGLG	19
2B2	-----MTYLAETVTLNNG-----	-----EKMPLVGLG	22
5A1	-----MAGVDKAMVTLNSG-----	-----VKMPQFGLG	23
5B	-----AGKS-PLINLNG-----	-----VKMPALGLG	21
5D	-----PNIPTISLNDG-----	-----RPFAPGLG	20
3A1	-----MPATLHDSTKILSLNTG-----	-----AQIPQIGLG	26
PR	----- MPRVKLTQGLEVSKLG -----	----- FGCMGLS	24
13A1	---MSIPTRKIGND--TVPAIG---	-----FGCMGLH	24
8A1	-----MPIVSGFKVGPIG-----	-----FGLMGLT	20
11A	-----MKKAKLGKSDLQVFPIG-----	-----LGTNAVGGH	26
12A	-----MSGMYVQLGRGA-----	-----TLVSRWLGLTV	23
9A1	MAAPPAPQPPSLLGYHRVLSPLAGIR-----	-----VSPLCLGTMHFGQW	41
14A1	--MVWLANPERYQMQYRYCGKSG-----	-----LRLPALSLG	31
10A2	-----MSSVPLPVSSDASSQPDG-----	-----APPLLLG	25
7A1	-----MSQARPATVVG-----	-----AMEMG	16
4A1	SAPDFT--CKKDT-KEAIEAVKQGYRHFDTAAAYGSEQALG-EALKEAIHLGLV-SRQD		82
4B2	TAETMV--KGTREKLAFLKAIEVGYRHFDTAAAYQSEELG-EAIAEALQLGLIKSRDE		80
4C1	---TWR--AGSDTAHSVRTAITEAGYRHVDTAAEYVVEKEVG-KGLKAAMEAGID--RKD		82
2A1	---LWR--LEKDELKEVILNAIKIGYRHFDCAAHYKSEADVG-EALAEAFKTGLVK-REE		71
1C5	TYAPEE--VPKSKAMEATKIAIDAGFRHIDSAYFYKNEKEVG-LAIRSKIADG-TVKRED		78
1D2	TYS DPR--PVPGKTFIAVKTAIDEGYRHIDGAYVYRNEHEVG-EAIREKVAEG-KVKREE		80
1B2	TWKSP----PGQVTEAVKTAIDLGYRHIDCAHVYQNEVEVG-VALQEKLKEQ-VVKREE		71
1A2	TWKSE----PGQVKAAIKYALTVGYRHIDCAAIYQNELEIG-EALTETVGP GKAVPREE		73
2B2	CWKMP----NDVCADQIYEAIKIGYRLFDGAQDYANEKEVG-QGVNRAIKEG-LVKRED		75
5A1	VWQSPA--G--EVTENAVNWALCAGYRHIDTAAIYKNEESVG-AGLRA---SG--VPRED		73
5B	VFAASA---EETASAIASATISSGYRLIDTARSYNNEAQVG-EGIRN---SG--VDRAE		70
5D	TYNLRG----DEGVAAMVAIDSYRLLDTAVNYENESEVG-RAVRA---SS--VDRDE		69
3A1	TWQSKE----NDAYKAVLTALKDGYRHIDTAAIYRNEDQVG-QAIKD---SG--VPREE		75
PR	GDYNDA--LPEEQGIAVIKEAFNCGITFFDTSDIYGENGSNE--ELLGKALKQLPREK--		78
13A1	AMYGNS--S-EEANQAVLTHAADLCTFWDSSDMYG-FGANE--ECIGRWFKQTPRRKE--		77
8A1	WKPKQT--P-DEEAFVVMNYALSQGSNYWDAGEFYVDPPTSNLDDLARFYEKYPENANK		77
11A	NLYPNL--N-EETGKELVREAIRNGVTMLDTAYIYIGIRSEE---LIGEVLE--FNRED		78
12A	NFSGRV--P-DDQAIRLMDEALDRGVNVCVDADIYGRWLYKGTTEELVGRWLRGSGRRDD		80
9A1	MRAMGD--VTKETAFALLDRFYEAGGNFIDTANFYQGESEK----WLG EWVASRGRNRE		95
14A1	LWHNFGHVNALESQRAILRKAFDLGITHFDLANNYPGPPGSAEENFGRLLREDFAAYRDE		91
10A2	TSAFGV----DERGFVYDAYWEGGGRAFDTAWLYGHAYGPGCCERTFGAWASRGRVEKE		81
7A1	RRMDVT----SSSASVRAFLQRGHTIEDTAFVYANGQSET---ILGDLGLGLGRSGCK		67
4A1	LFVTSK-----LWVTENHPLVLPALRKSCLKLQ-LEYLDLYLIHWP LSS-		126
4B2	LFITSK-----LWCADAHADLVLPALQNSLRNLK-LEYLDLYLIHHPVSL-		124
4C1	LFVTSK-----IWCTNLAPERVRPALENTLKDQ-LDYIDLHYIHWPFRL-		126
2A1	LFITTK-----IWNSDHG--HVVEACKNSLEKQ- IDYLDLYLVHYMPPTK		114
1C5	IFYTSK-----LWCTFHRPELVRP SLED SLKNLQ-LDYVDLYI IHFP TALK		123
1D2	IFYCGK-----LWSTDHDP EMVRPALERTLQTLK-LDYIDL YI IEMPMAFK		125
1B2	LFIVSK-----LWCTSHDKSLVKGACQKTLNLDK-LDYLDLYLIHWPTGFK		116
1A2	LFVTSK-----LWNTKHHPEDEVEPALRKT LADLQ-LEYLDLYLMHWPYAFE		118
2B2	LVVVSK-----LWNSFHHPDNVPRALERTLSDLQ-LDYVDIFYIHFPLAFK		120
5A1	VFITTK-----LWNTEQGYESTLAAFEESRQKLG-VDYIDL YLIHWPRGKD		118
5B	MFVTTK-----LFNCDYGYERALRAFDES LGRLG-LDYVDLYLLHWP----		111
5D	LIVASK-----IPGRQHGRAEAVDSIRGSLDRLG-LDYIDL QLIHWP----		110
3A1	IFVTTK-----LWCTQH--HEPEVALDQSLKRLG-LDYVDLYLMHWPARD		118
PR	IQVGTKFGIHEIGF---SGVKAKG-TPDYVRSCEASLKRDL-VDYIDL FYIHRIDTV		132
13A1	IFLATKFGYEKNPE----TGELSLNNEPDYIEKALDLSLKRQG-IDCIDLYVHFRFGET		132
8A1	VFLSVKGGLD-----FKTLVPDGNPDFVSKSVENVAHLRGTKKLDLFCARVDPNV		129
11A	VVIATKAAHRK--Q----GNDFVFDNSPDFLKKSVDES LKRLN-TDYIDL FYIHF PDEHT		131
12A	VVLATKVG--EPMS----DRVNDRGLSARHVIRSCASLRRLG-VDHIDL YQMHRMDRTV		133
9A1	LVLATKYTMSYRLTGPEKIKSNFQGSKSLRSLVSEASLAKLR-TDYIDL LLYVHMWDFST		154
14A1	LIISTKAGYDMWPG-----PYGSGSRKYLLASLDQSLKRMG-LEYVDIFYSHRVDENT		144
10A2	VWVLAKG-----AHTPECLPDRVEAQLAESFDRMG-RDDAAMYLHRDNPDV		127
7A1	VKIATKAAP-----MFGKTLKPADVRFQLETSLKR LQ-CPRVDL FYLHFPDHGT		115

4A1	--QPGKFSFPIE-----VEDLLPFDVKG----VWESMEECQKLGGLTKAIGVSNFSVK	172
4B2	--KPGKFVNEIP-----KDHILPMDYKS----VWAAMEECQTLGFTRAIGVSNFSCK	170
4C1	--KDG-AHMPPE-----AGEVLEFDMEG----VWKEMENLVKDGGLVKDIGVCNYTVT	171
2A1	HNAIGKTASLLG-----EDKVLIDIDVTISLQQTWEGMEKTVSLGLVRSIGLSNYELF	166
1C5	PG--VEIIPPT-----DEHGK--AIFDTVDICATWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNRR	171
1D2	PG--EEFYPK-----DENGR--VIYHKSNLCAATWEALEACKDAGLVKSLGVSNFNRR	173
1B2	HG--SEYFPL-----DAAGN--VIPSDFDLDTWEAMEGLVDEGLVKSIGVSNFNHL	164
1A2	RG--DNPFPK-----NADGT--IRYDATHYKDTWKALEALVAKGLVLRALGLSNFSSR	166
2B2	PVPFDEKYPGPFYTGKEDAEKGH--IEEEQVPLLDTWRALEKLVQDQKIKSLGISNFSGA	178
5A1	-----ILSKEGK-----KYLDSWRAFEQLYKEKKVRAIGVSNFHIH	154
5B	-----TKDWN-----ATIQSWKAAEKILGDGRARAIGVCNFLED	145
5D	-----NPSVG-----RWLDTWRGMIDAREAGLVRSIGVSNFTEP	144
3A1	PAYIKNEDILSV----PTKKDGSRAVDITNWNFIKTWELMQELPKTKGKAVGVSNFSIN	174
PR	P-----IETTMGELKKLVEEGKIKYVGLSEASPD	161
13A1	P-----IEKIMGALKKCVBEAGKIRYIGLSECSAN	161
8A1	P-----IETTMKTLKGFVDSGKISCVGLSEVSAE	158
11A	P-----KDEAVNALNEMKKAGKIRSIGVSNFSLE	160
12A	R-----WDELWQAMDQLVASGKVVRYIGSSNFAGW	162
9A1	S-----VEEVMSQLHHLVAAGKVLNIGISDAPAW	183
14A1	P-----MEETASALAHAVQSGKALYVGISSYSPE	173
10A2	P-----VGEFVSVLADLVARGLIGAYGMSNWSLD	156
7A1	P-----IETTLQACHQLHQEGKFVGLSNVSW	144
4A1	KLQNLISVAT-----IRPVVDQVEMNLAWQQK-----KLREFCKE-NGIIVTAFS	216
4B2	KLQELMAAAK-----IPPVVNQVEMSPTLHQK-----NLREYCKA-NNIMITAHS	214
4C1	KLNRLLRSKAK-----IPPAVCQMEMHPGWKND-----KIFEACKK-HGIHVTAYS	215
2A1	LTRDCLAYSK-----IKPAVSQFETHPYFQRD-----SLVKFCMK-HGVLPTAHT	210
1C5	QLEMILNKPGLK----YKPVCNQVECHPYLNQG-----KLLEFCKS-KGIVLVAYS	217
1D2	QLEVILNKPGLK----YKPVTNQVECHPYFTQT-----KLLEVSASSMSTFIVAYS	220
1B2	QIERILNKPGLK----YKPAVNQIECHPYLTQE-----KLIQYCHS-KGIVVTAYS	210
1A2	QIDDVLSVASVR-----PAVLQVECHPYLAQN-----ELIAHCQA-RGLEVTAYS	210
2B2	LIQDLLR--GAR----IKPVALQIEHHPYLTQE-----RLIKYVKN-AGIQVVAYS	222
5A1	HLEDVLAMCT-----VTPMVNQVELHPLNNQA-----DLRAFCD-AGIKVBEAWS	198
5B	QLDELIAASD-----VPAVNQIEHHPYFAQK-----PLLAKNRA-LGIVTEAWS	189
5D	MLKTLIDETG-----VTPAVNQVELHPYFQA-----ALRAFHDE-HGIRTESWS	188
3A1	NLKDLLASQGNK----LTPAANQVEIHPLLPQD-----ELINFCKS-KGIVVEAYS	220
PR	TIRRAHAVHPVT---ALQIEYSLWTRDIED-----EIVPLCRQ-LGIGIVPYS	205
13A1	TIRRAAVYPVS----AVQVEYSPFSLERPEI-----GVMKACRE-NNITIVCYA	208
8A1	TIKRAHAVPIA----AVEVEYSLFSDIETN-----GIMDICRK-LSIPIIAYS	203
11A	QKKEANKDGLVD----VLQGEYNLLNREAEKTFPPYTKHEHNISFIPYFPLVSLGKAGYT	216
12A	HLAAGQESAARR----GSLGLVSEQCLYNLAVR----HAELEVLPAARA-YGIGVFAWS	212
9A1	VVAKCNEYARFH---GLTRFCVYQGRWACSYRDFER----EILPMCQS-EGLALAPWG	233
14A1	RTQKMVELLREWK---IPLLIHQPSYNLLNRWVD----KSGLLDTLQ-NGVGCIAFT	223
10A2	RVREAVGYAREQGLPAPAGVSNQLSLIDMVQPIYPGTMGSHDPRWRWLTPVTLYPWA	216
7A1	EVAEICTLCKKNG--WIMPTVYQGMYNATRQVET-----ELFPCLR-FLRFYAFN	194
4A1	PL-----RKGASRGPNEVMENDVLKEIAEA	241
4B2	VLG-----AIGAPWGSNAVMDSKVLHQIAVA	240
4C1	PLG-----SSEK-----NLAHDPVVEKVANK	236
2A1	PLGGA-----AANKDMFGSVSPLDDPVLNDVAKK	239
1C5	ALGSH-----REPEWVDQSAPVLEDDPLIGALAKK	247
1D2	PLGTC-----RNPLWVNVSSPPLLKDELTLGK	250
1B2	PLGSP-----DRP-WAKPEDPSLEDPRIKATADK	239
1A2	PLGSS-----DRA-WRDPNEPVLLPEPVVQALAEK	239
2B2	SFGPVVSL-----ELENKKALNTPTLFEHDTIKSIASK	255
5A1	PLG-----QKLLSNPILSAIGAK	217
5B	PIGGA-IN-----DGDGDNHGGRKHPLTDPVITITIAEA	221
5D	PLAR-----RSELLTEQLLQELAVV	208
3A1	PLGS-----TDAPLLKEPVILEIAK	241
PR	PIGRGLFAGKAIK-ESLPENS---V-----LTSHPRFVGENLEKNKQIYYRIEALSQK	254
13A1	PLGRGFLLTGAYKSPDDFPEGD----F-----RRKAPRYQKENFYKNLELVTKIEKIATA	258
8A1	PFRCRGLLTGRIKTVELDKFAKSFPP-----LEYLDRFSPDVFAKNLPLQAVEQLAKK	257
11A	EDTTFPEGDLRNE-----QEHFKGERFKENIRKVNKLAPIAEK	254
12A	PLHGGLLSGALRKLAEGTAVK-----SQGQRAQRTLPAALRDTIARYERFCAR	259
9A1	ALGRGQYKSAEEFQQE-----GTRNMGPEEKHRLMGAKLTEVGER	274
14A1	PLAQGLLTGKYLNGIPQDSRMHRE-G-----NKVRGLTPKMLTEANLNSLRLLNEMAQQ	276
10A2	SQCRGAHALADPAELR-----TSPLAECWYSETNVERLRRARTLAER	258
7A1	PLAGGLLTGRYKYQDKDGNPESRFFGNPFSQLYMDRYWKEEHFNIALVEKALKTTYPG	254

4A1	HGKSIAQVSLRWLYEQGV-----TFVPKSYDKERMNQNLIHFD--WALTEQDHHKISQ	292
4B2	RGKSVAQVSMRWVYQQGA-----SLVVKSFNEGRMKENLKIFD--WELTAEDMEKISE	291
4C1	LNKTPGQVLIKWALQRGT-----SVIPKSSKDERIKENIQVFG--WEIPEEDFKVLCS	287
2A1	YGKSWAQICLRWGIQRKT-----AVIPKSSKIQRLENLEVL--FQLSDEDMQLIYS	290
1C5	HQQTPALIALRYQLQRGI-----VVLAKSFTEKRIKENIQVFE--FQLPSEDMDKVIDS	298
1D2	YNKTQAQIVLRFDIQRGL-----VVIIPKSTTPERIKENFQIFD--FSLTKKEEMKDIEA	301
1B2	HKKTTAQVLIIRFPMQRNL-----VVIPKSVTPARIAENFQVFD--FELSSSEDMTLLS	290
1A2	YNRSPAQILLRWVQRKV-----ICIPKSVTPSRIPQNIQVFD--FTFSPEEMKQLDA	290
2B2	HKVTPQQVLLRWATQNGI-----AIIIPKSSKKERLLDNLRLINDA-LTLTDDELKQISG	307
5A1	YNKTAQVILRWNIQKNL-----ITIPKSVHRERIEENADIFD--FELGAEDVMSIDA	268
5B	HGRSAAQVILRWHFQNDV-----VAIPKSVNPERIAKNIDVFD--FALSDAEMAQLDE	272
5D	YGVTPPTQVVLRWVQLGS-----TPIPKSADPDRQRENADVFG--FALTADQVDAISG	259
3A1	NNVQPGHVVISWHVQRGY-----VVLPKSVNPDRIKTNRIFT--LSTEDFEAINNIS	292
PR	HGCTPVQLALAWVLHQGE-D---VVPIPGTTKIKNLHNNVGALK--VKLTKEIDLKETS	307
13A1	NNITPGQLSLAWLLAQGD-D---ILPIPGTKRVKYLEENFGALK--VKLSDATVKEIRE	311
8A1	FGMTMPEFSLLFIMASGNGL---VIPIPGSTSVSRTKSNLNLALN--KSLSPEQFKEAKE	311
11A	HNVDPHIVLAWYLARPEID---ILIPGAKRADQLIDNIKTAD--VTLSQEDISFIDK	307
12A	VGRDPAEVGLAWLLSRPG-V---SGAVIGPRTTGHVLSALRAVE--LELSEEHRELEA	312
9A1	KGVAAAIALAYLLHKSP-Y---VFPVIGCRTVEQLEANITSLG--VELSDEEIEYIED	327
14A1	RGQSMQMALSWLLKDDR-V---TSVLIGASRAEQLEENVQALNN-LTFSTKELAQIDQ	330
10A2	RGVSSTGIALAWTLSQPFR-----VVALIGPRQPEVVRDSLAAAELRLTEAERDWLNGT	313
7A1	TAPSMISA AVRWMYHHSQLKGTQGDVILGMSLSLEQLQNLAALVEE-GPLEPAVVDAFDQ	313
4A1	ISQSR-----LISGPTKP--QLADLWDDQI-----	315
4B2	IPQSRITSSA--AFLLSPTGPFKTEEEFWDEKD-----	321
4C1	IKDEKRVLTGEELFVNKTHGYPYRSAADVWDHEN-----	320
2A1	IDRKYR-----TSLPSKRWGLDVYA-----	310
1C5	LNRNFRYVTADFAIG-----HPNYPFSDEY-----	323
1D2	LNKNVRFVEMLMWSD-----HPEYPFHDEY-----	326
1B2	YNRNWRVCALVSCAS-----HKDYPFHAEF-----	315
1A2	LNKNLRFIVPMLTVDGKRVPRDAGHPLYPFNDPY-----	324
2B2	LNQNIRFNDPWEWLD-----NEFPTFI-----	329
5A1	LNTNSRY-GPDP-----DEAQF-----	284
5B	LDTGVRI-GPDPDRV-----DTSFSAEFV-----	295
5D	LERGRLW-DGDP-----DTHEEM-----	276
3A1	KEKGEKR-VVHP-----NWSPFVFK-----	312
PR	AVPLDEVAGESIHEVIAVTNWKFANTPPLK-----	337
13A1	ACDNAEIVIGARYPPGAGSK--IFMDTPMPK-----	340
8A1	VLSKYPYGLRYNEQLAGTLSV-----	333
11A	LFA-----	310
12A	LFPPVGS GGVEVPEAWQN-----	329
9A1	TIPFDVGFPM AFLFESPQQYRSDMTTRHIWQVTCNARIESVPKPRPIEPKQGYKQMDRK	387
14A1	HIADGELNLWQASSDK-----	346
10A2	GEPPRE-----	319
7A1	AWNLAHECPNYFR-----	327

Abbildung 37. Multiples Alignment der PR mit repräsentativen Vertretern bestehender Familien der AKR-Superfamilie. Die höchste Sequenzidentität (43,7 %) hat die PR mit AKR13A1 (YakC Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*, Q09923). Die Aminosäuresequenzen wurden der SwissProt-Datenbank entnommen und mit ClustalW verglichen. Grau hinterlegt sind konservierte Aminosäuren, von denen die eingerahmten Aminosäuren das katalytische Zentrum darstellen. AKR4A1 Chalconpolyketid-Reduktase aus *Glycine max* (P26690), AKR4B2 Codeinon-Reduktase aus *Papaver somniferum* (AF108435), AKR4C1 Aldehyd-Reduktase aus *Hordeum vulgare* (P23901), AKR2A1 Sorbitol-6-phosphat-Reduktase aus *Malus domestica* (P28475), AKR1C5 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Oryctolagus cuniculus* (P80508), AKR1D2 3-Ketosteroid-5 β -Reduktase aus *Rattus norvegicus* (P31210), AKR1B2 Aldose-Reduktase aus *Oryctolagus cuniculus* (P15122), AKR1A2 Aldehyd-Reduktase aus *Sus scrofa* (P50578), AKR2B2 Xylose-Reduktase aus *Kluyveromyces lactis* (P49378), AKR5A1 Reduktase aus *Leishmania major* (P22045), AKR5B Morphin-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (Q02198), AKR5D 2,5-Diketo-D-Gluconsäure-Reduktase aus *Erwinia citreus* (P15339), AKR3A1 Gcy1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (P14065), AKR8A1 Pyridoxal-Reduktase aus *Schizosaccharomyces pombe* (T39218), AKR11A Vegetatives Protein 147 aus *Bacillus subtilis* (P46336), AKR12A NDP-Hexose-2,3-Enoyl-Reduktase aus *Streptomyces fradiae* (AAD41821), AKR9A1 Sterigmatocystin-Dehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* (Q00727), AKR6A1 β -Untereinheit eines Kanalproteins aus *Bos taurus* (A53131), AKR14A1 Aldehyd-Reduktase aus *Escherichia coli* (AAA69168), AKR10A2 Streptomycin-AKR aus *Streptomyces glaucescens* (CAA07384), AKR7A1 Aflatoxinaldehyd-Reduktase aus *Rattus norvegicus* (P38918).

Veröffentlichungen

Posterpräsentationen:

ROSENTHAL C, RUPPERT M, STÖCKIGT J (2004) Perakine Reductase from *Rauwolfia serpentina*: Cloning, heterologously expression and characterisation. Deutsche Botanikertagung, September 2004, Braunschweig

ROSENTHAL C, MÜLLER U, PANJIKAR S, STÖCKIGT J (2006) Cloning, Expression, Crystallization and preliminary X-RAY Structure analysis of Perakine Reductase from *Rauwolfia serpentina*. International Symposium of “Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids”. 25.-29. April 2006, Belek (Türkei)

Lebenslauf

Name	Cindy Rosenthal
E-mail	rosentha@uni-mainz.de
Geburtsdatum,- ort	20.03.1977 in Bad Saarow
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	Grundschule 10, Fürstenwalde 09/1983 – 06/1992 Städtisches Gymnasium, Fürstenwalde 09/1992 – 06/1993 Oberstufenzentrum Fürstenwalde 09/1993 – 06/1996 Abschluss: Abitur
Studium	Humboldt-Universität zu Berlin 10/96 – 12/2002 am Fachbereich Biologie Abschluss als Diplom-Biologin am Lehrstuhl für Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. R. Ehwald
Praktikum	BASF Plant Science, Limburgerhof 04/2002 – 09/2002
Promotion	Johannes Gutenberg Universität Mainz 02/2003 – 07/2006 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Bio- logie unter Leitung von Prof. Dr. J. Stöckigt Titel der Doktorarbeit: „Klonierung, heterologe Expression, Kristallisation und Struktur der Perakin-Reduktase aus <i>Rau- wolfia serpentina</i> “