

**Kristallisation der Arbutin-Synthase und
der Strictosidin Glukosidase - zwei
Enzyme aus dem sekundären Glyko-
sidstoffwechsel von *Rauvolfia serpentina***

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

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

**Leif Barleben
geb. in Essen,
Mainz, 2006**

Inhaltsverzeichnis

<u>I Einleitung</u>	1
1 Bedeutung und Vorkommen von Glykosiden	1
2 Zwei Enzyme im Glykosidmetabolismus von <i>Rauvolfia serpentina</i>	3
3 Strukturaufklärung von Proteinen	5
4 Zielsetzung der Arbeit	7
<u>II Material</u>	8
1 Bakterienstämme	8
2 Vektor	8
3 Bakterienmedium	9
4 Puffer	9
5 Säulen/Säulenmaterial	10
6 Kits, Enzyme und Zubehör für molekularbiologische Arbeiten	10
7 Materialien für die Kristallisation	11
8 Chemikalien und Zubehör	11
9 Geräte	12
<u>III Methoden</u>	16
1 Proteinchemische Methoden	16
1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	16
1.2 Präparative Expression von Enzymen in <i>E. coli</i>	16
1.3 Präparation von Enzymrohextrakten	17
1.4 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)	17
1.5 Enzymatischer Verdau des His-Tags	18
1.6 Anionenaustauscher MonoQ	18
1.7 Gelfiltration mit Sephacryl S-100 HR	18
1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
1.9 Pufferwechsel	20
1.10 Konzentrieren von Proteinlösungen	21
1.11 Optische Dichte von Bakteriensuspensionen	21

2 Aktivitätstests	22
2.1 Substrate der Arbutin-Synthase	22
2.1.1 Das natürliche Substrat, Hydrochinon	23
2.1.2 Phenylglycin und Tyrosin als mögliches Substrat	23
2.2 Substrate der Strictosidin-Glukosidase	24
2.3 Aktivität der Strictosidin-Synthase, Produktion von Strictosidin	25
3 Molekularbiologische Methoden	25
3.1 Polymerase-Kettenreaktionen	26
3.2 Restriktionsverdau	26
3.3 Elektrophoretische Trennung von DNA	26
3.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
3.5 Gehaltsbestimmung von DNA	27
3.6 Fällern und konzentrieren von Plasmid-DNA	27
3.7 Transformation	28
3.7.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen	28
3.7.2 Herstellung hitzekompetenter Bakterien	28
3.7.3 Elektroporation	29
3.7.4 Transformation durch Hitzeschock	29
3.8 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterien	29
4 Kristallographische Methoden	29
4.1 Dampfdiffusion	30
4.1.1 Hanging-Drop	30
4.1.2 Sitting-Drop	31
4.2 Mikrodialyse	31
4.3 Microbatch unter Öl	32
4.4 Kristallisation von Enzym und Ligand	32
4.5 Unterscheidung eines Salzkristalls von einem Kristall eines Makromoleküls	33
4.6 Einfrieren von Kristallen	34
4.7 Messungen von Datensätzen	34
5 Verwendete Computerprogramme und webbasierte Anwendungen	35
5.1 Prozessierung der Röntgendiffraktionsbilder	35
5.2 Strukturlösung und Verfeinerung	35
5.3 Verschiedenes	36

IV Ergebnisse	37
1 Zur Reinigung und Kristallisation der Arbutin-Synthase (AS)	37
1.1 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA	37
1.2 Testung verschiedener Substrate	38
1.3 Mutationen der AS zur Stereospezifität	40
1.4 Beginn der Kristallisation	42
1.4.1 Abspalten des His-tags mit dem TAGZyme-System	43
1.4.2 Abspalten des His-tags durch eine Endopeptidase	45
1.4.3 Wasserdampfdiffusions-Experimente	46
1.4.4 Microbatch unter Öl	47
1.5 Kristallisation von Teilen des Enzyms	48
1.6 Veränderungen der Oberfläche von AS durch Punktmutation	50
1.7 Veränderung der Oberfläche von AS durch reduktive Methylierung	53
1.8 Vergleich von verschiedenen Metallionen in der IMAC	55
1.9 Reinigung durch Gelfiltration	57
1.10 Anionenaustauscher-Chromatographie	58
2 Zur Reinigung, Kristallisation und Strukturaufklärung der Strictosidin-Glukosidase	60
2.1 Enzymatische Synthese des natürlichen Substrates Strictosidin	60
2.1.1 Synthese	60
2.1.2 Reinheitskontrolle und Identifizierung des Produktes	61
2.2 Reinigung der Strictosidin Glucosidase	61
2.2.1 Affinitäts-Chromatographie	62
2.2.2 Entfernen des His-Tag	62
2.2.3 Abschliessender Reinigungsschritt der Strictosidin Glucosidase über MonoQ	63
2.3 Kristallisation der Strictosidin Glucosidase	65
2.3.1 Mikrodialyse-Methode	65
2.3.2 Hanging Drop Versuche	65
2.3.3 High Throughput Screening	67
2.4 Aufnahme der Röntgenbeugungsmuster der nativen Strictosidin Glucosidase	69
2.5 Strukturlösung der nativen Strictosidin Glucosidase	70
2.6 Der Strictosidin Glucosidase/Strictosidin-Komplex	73
2.6.1 Herstellung inaktiver Mutanten der Strictosidin Glucosidase	73

2.6.2 Überprüfung der Inaktivität	77
2.6.3 Soaking-Experimente mit Strictosidin	77
2.7 Inhibierung des Enzyms	80
2.8 Mutationen der Substraterkennungsstelle	82
<u>V Diskussion</u>	85
1 Arbutin-Synthase	85
2 Strictosidin Glukosidase	96
<u>VI Anhang</u>	111
1 Strukturbasiertes Alignment der Sequenzen der Familie GH-1	111
2 Strukturbasiertes Alignment der Sequenzen der Familie GH-1, ohne Myrosinasen	116
3 Sequenzalignment der Familie GH-1, ohne Myrosinasen	120
<u>VII Zusammenfassung</u>	124
<u>VIII Literaturverzeichnis</u>	128
Abkürzungsverzeichnis	138
Abbildungsverzeichnis	140
Tabellenverzeichnis	142

I Einleitung

1 Bedeutung und Vorkommen von Glykosiden

Kohlenhydrate besitzen unter den Biopolymeren den höchsten Informationsgehalt. Ein Hexasaccharid aus linearen und verzweigten, reduzierenden Zuckern kann 1.05×10^{12} Isomere bilden, ein Hexapeptid nur $6,4 \times 10^7$ und ein Hexanukleotid nur 4096 (LAINE, 1994), obwohl nicht alle theoretisch möglichen Verbindungen in der Natur vorkommen. Aufgrund dieser grossen Vielfalt können Kohlenhydrate für viele Funktionen der Zelle eingesetzt werden. In Form von Stärke, Glykogen oder Inulin werden Kohlenhydrate als Energiereserven angelegt. Sie bestimmen die Oberfläche von Zellen, ermöglichen damit die Zellerkennung (HERMETIN, 1998) und sind somit sowohl für die Kommunikation der Zellen eines Organismus, als auch zur Abwehr von Infektionen durch Fremdkörper, Zellen oder Viren bedeutend. Denn das Komplementsystem des Menschen besteht aus mehr als 15 Glykoproteinen, und auch die Immunglobuline liegen glykosyliert vor (RITCHIE *et al.*, 2002). Das Heparin als Polysaccharid ist direkt an der Blutgerinnung beteiligt und bei der Entgiftung von Xenobiotika und toxischen Metaboliten spielen Zucker eine entscheidende Rolle. Zucker werden - im tierischen Organismus durch Konjugationen mit Glukuronsäure, in der Pflanze, meist im Zusammenhang mit Glukose -verwendet um die Wasserlöslichkeit von Substanzen zu steigern um sie besser ausscheiden bzw., im Fall der Pflanzen, sie in der Vakuole lagern zu können (KREUZ *et al.*, 1996). Gerade für Pflanzen, denen ein wirkungsvoller Ausscheidungsmechanismus fehlt, ist die selektive Glykosylierung und der Transport in die Vakuole lebenswichtig. Aus diesem, aber auch weiteren Gründen wie Frassschutz und bakterielle Abwehr, bilden Pflanzen eine Vielzahl von sekundären Inhaltstoffen. Dafür werden nicht nur verschiedene Aglyka verwendet, sondern auch einzelne Aglyka mit unterschiedlichen Zuckerketten verknüpft. Allein für das Flavonoid Quercetin sind 300 verschiedene, natürlich vorkommende Glykoside bekannt (HARBORNE UND BAXTER, 1999). Nicht nur qualitativ setzen Glykoside Rekorde, auch quantitativ sind Sie etwas Besonderes. So ist die Gerüstsubstanz Cellulose der häufigste Naturstoff der Erde (KLEENE UND BERGER, 1993).

Um eine solche Vielfalt an Strukturen zu ermöglichen, ist eine grosse Anzahl an verschiedenen, unterschiedlich selektiven Enzymen nötig. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden 3,3 % des Genoms als Glykosidasen oder als den Glykosyltransferasen verwandte Enzyme ausgemacht (HENRISSAT *et al.*, 2001). COUTINHO *et al.* (2003) haben, vor allem bei Organismen die direkt an dem Auf-oder Abbau der komplizier-

ten Pflanzenzellwand beteiligt sind, grosse Anteile von zuckerbearbeitenden Enzymen im Gesamtgenom gefunden. Die evolutionäre Weg die Information in einem Glykosid durch Mutation zu verändern, ist wesentlich schwieriger als bei anderen Information tragenden Molekülen. Die DNA kann direkt mutieren und so ihre Information verändern. Proteine sind von der Veränderung der DNA unmittelbar betroffen. Die Zucker jedoch können nur durch vorhergehende Veränderung der sie synthetisierenden Proteine neue Gestalt annehmen (LAINE, 1994). Dazu sind meist mehrere mutierte Enzyme und Rezeptoren nötig, die sich immer wieder an die neue Form der vorkommenden Glykoside anpassen müssen.

Unter den glykosylierten Naturstoffen gibt es auch einige, die als Arzneistoffe eingesetzt werden können. Vancomycin gehört zu den Glykopeptid-Antibiotika. Es wurde aus *Streptomyces orientalis* isoliert und wird unter anderem als Reserveantibiotikum gegen Methicilin-resistente Stämme des Keims *Staphylococcus aureus* (MRSA) eingesetzt (MULICHAK *et al.*, 2001). Eine andere Antibiotika-Klasse sind die Aminoglykoside, die aus einem zyklischen Zuckeralkohol und mehreren Aminozuckern bestehen. Von den Herzwirksamen Glykosiden wird vor allem Digitoxin verwendet, ein Steroidglykosid aus *Digitalis*-Arten. Das Steroidgrundgerüst ist mit drei Desoxy-Zuckern und einer Glukose verknüpft, wobei die Glucose nur wichtig für die Kinetik des Abbaus ist. Die anderen Zucker sind jedoch für die Wirkung bei Herzinsuffizienz essentiell. Ein partialsynthetisches Zytostatikum ist das Etoposid. Es ist ein Glykosyl-Derivat des natürlich vorkommenden Podophyllotoxins. Durch die Glykosylierung wird in diesem Fall die Wirkung von einer Mitosehemmung zu einer Topoisomerase II Inhibierung verschoben.

Als Gegenspieler des Anabolismus gibt es auch immer den Katabolismus. Wenn Glykosyltransferasen oft beim Aufbau von Metaboliten eine Rolle spielen und daher eher zur der Synthese von neuen Substanzen herangezogen werden, sind Glykosidasen eher als Target bei der Behandlung von Krankheiten bedeutend. Als Beispiele wird zur Behandlung von Morbus Gaucher als Standardtherapie das Enzym Imiglucerase substituiert (WEINREB *et al.*, 2005), eine Glykosidase die Glukocerebroside, Bestandteile der Erythrozytenwand, im natürlichen Zustand abbaut. Bei Morbus Gaucher-Erkrankten enthält das entsprechende Gen eine Mutation. Der Arzneistoff Acarbose ist ein kompetitiver Inhibitor intestinaler α -Glukosidasen. Er verlangsamt den Stärke Abbau während der Nahrungsaufnahme. Dadurch werden geringere postprandiale Blutzuckerspiegel erreicht. Arcabose wird zur Behandlung von Diabe-

tes mellitus eingesetzt (SAILER UND RODER, 1980). Ein weiteres Beispiel könnte die AIDS-Behandlung werden. So wurden Glykosidase-Inhibitoren entdeckt, die den Eintritt des HI-Virus in die menschliche Zelle verhindern konnten (ROBINA *et al.*, 2004). Vermutlich wirken sie über eine Neuordnung der Glykoproteine auf der Oberfläche von Virus und /oder Zelle und verhindern so die Zellerkennung. Zucker kommen also ubiquitär vor und die sie bearbeitenden Enzyme sind aus vielerlei Gründen interessant.

2 Zwei Enzyme im Glykosidmetabolismus von *Rauvolfia serpentina*

Rauvolfia serpentina (L.) ist eine seit über 3000 Jahren genutzte Arzneipflanze aus den tropischen Gebieten Südost-Asiens. Ihre pharmazeutisch interessanten Hauptinhaltsstoffe sind monoterpenoide Indolalkaloide, darunter Ajmalin, Reserpin und Ajmalicin. Es sind über 2000 Alkaloide dieser Stoffklasse bekannt, jedoch nur etwa 40 liegen glykosyliert vor (RUYTER *et al.*, 1988). Dennoch besitzt *Rauvolfia serpentina* auch sehr gute Glukosylierungskapazitäten. Bei Hydrochinon-Fütterungsversuchen mit Zellsuspensionskulturen wurden bis zu 18 g Arbutin /l Nährmedium erreicht (LUTTERBACH UND STÖCKIGT, 1992). Arbutin wird eher in anderen klassischen Heilpflanzen wie *Arctostaphylos uva-ursi* (FROHNE, 1997) oder in *Vaccinum vitis-ideae* (FUGMANN *et al.*, 1997) erwartet. Traditionell wird Arbutin zur Behandlung von Harnwegsinfekten (WEISS UND FINTELMANN, 1997) und im asiatischen Raum auch als Bleichmittel gegen Hautpigmentierung (NAKAJIMA *et al.*, 1998) eingesetzt. Nach dieser unerwarteten Glukosylierungskapazität wurde das dafür verantwortliche Enzym gesucht und gefunden (AREND *et al.*, 2000, AREND *et al.*, 2001). Die Arbutin-Synthase (AS, EC 2.4.1.218) ist eine O- β -D-Glukosyl-transferase. Sie katalysiert die Übertragung von Glukose auf Hydrochinon und synthetisiert so Arbutin. Die Bildung von Arbutin in der Pflanze kann als Entgiftungsmechanismus verstanden werden. Hydrochinon greift wahrscheinlich über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Zelle an (HORITA *et al.*, 2005), durch die Konjugation mit Glukose wird die Oxidation zum Chinon verhindert und die Bildung der ROS gesenkt. Gleichzeitig wird die Wasserlöslichkeit gesteigert. Danach kann Arbutin gut in der Vakuole gelagert werden.

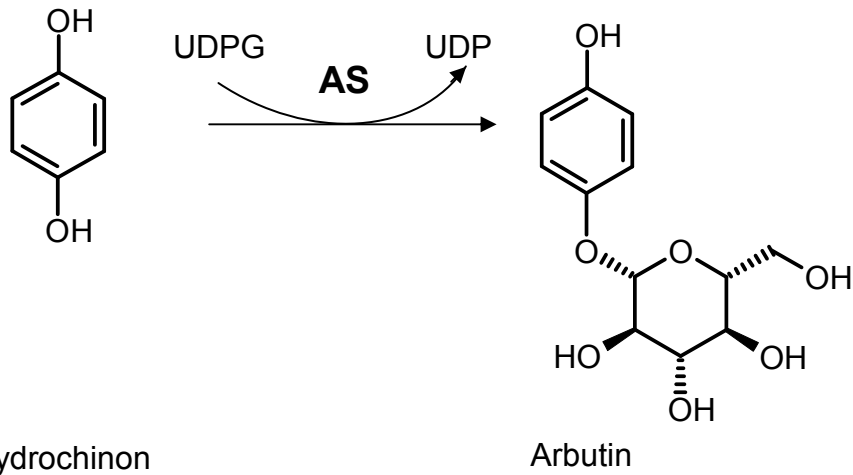


Abbildung 1: Glukosylierung von Hydrochinon durch die Arbutin-Synthase (AS)

Doch die Arbutin-Synthase kann nicht nur Hydrochinon umsetzen. HEFNER *et al.* (2002) testeten bereits 75 verschiedene mögliche Substrate aus verschiedenen Stoffklassen auf Umsetzung durch AS. Dabei wurde ein sehr breites Spektrum von akzeptierten Substanzen vorgefunden. 45 der angebotenen Substrate wurden von AS umgesetzt. Damit ist AS ein gutes Beispiel in der Gruppe der multifunktionalen Enzyme, die oft bei Entgiftungen zum Tragen kommen und für die grosse Strukturvielfalt vor allem im Pflanzenreich verantwortlich gemacht werden (SCHWAB, 2003). Insbesondere für die kommerzielle Anwendungen gewinnt damit das Enzym an Attraktivität.

Ein weiteres Enzym der *Rauvolfia serpentina* ist die Strictosidin-Glukosidase (SG, EC 3.2.1.105) (GERASIMENKO *et al.*, 2002). Dieses ist direkt an der Alkaloidbiosynthese der Pflanze beteiligt. Das Substrat, Strictosidin, ist der Schlüsselmetabolit in der Synthese von allen monoterpenoiden Indolalkaloiden. Es wird durch die Strictosidin-Synthase (STR1, EC 4.3.3.2) aus Tryptamin und Secologanin gebildet (TREIMER UND ZENK, 1979). Anschliessend deglukosyliert die SG das Strictosidin, wobei ein instabiles Halbacetal gebildet wird. Nun kann sich der Ring öffnen und das Produkt zu den verschiedenen Alkaloiden weiterreagieren (GERASIMENKO *et al.*, 2002). Es ist ungewöhnlich, dass ein Glykosid am Beginn eines langen Biosyntheseweges liegt. Im Allgemeinen werden eher Endprodukte glykosyliert um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Hier jedoch wird es als Ausgangsstoff eingesetzt und durch Deglukosylierung erst „aktiviert“.

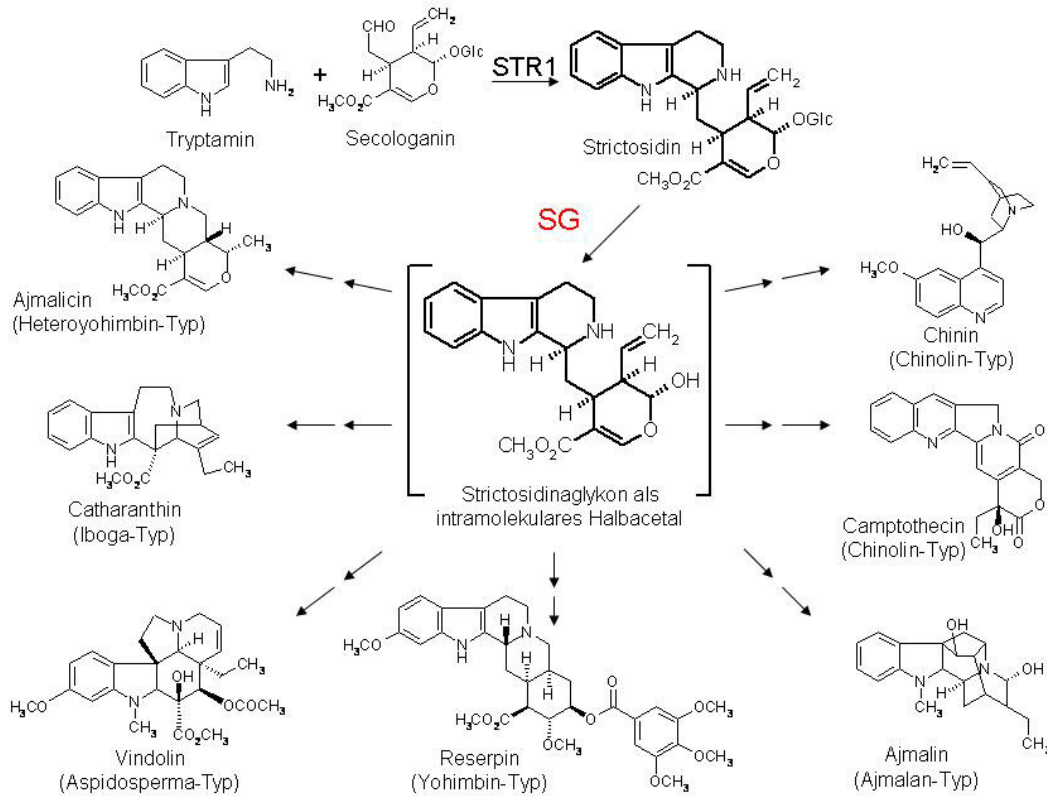


Abbildung 2: Strictosidin als Mittelpunkt in der monoterpenoiden Indolalkaloid-Biosynthese, STR1= Strictosidin Synthase, SG= Strictosidin Glukosidase

3 Strukturaufklärung von Proteinen

Die Struktur bestimmt die Funktion des Enzyms (FISCHER, 1894), die Sequenz bestimmt die Struktur (ANFINSSEN *et al.*, 1961). Doch obwohl diese Erkenntnis bereits 112 bzw. 45 Jahre alt ist, gibt es noch keine verlässliche Methode von der Sequenz die Struktur abzuleiten (BRADLEY *et al.*, 2005), um so etwas über den Mechanismus und Möglichkeiten diesen zu ändern zu lernen. So bleibt die Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung die Methode der Wahl um tiefere Einblicke in die Funktionsweise von Proteinen zu gewinnen.

Ein gutes Beispiel für die Bedeutung der Kenntnis der Struktur von Proteinen ist die Neuraminidase. Sie ist eine Glykosidase, die den Hauptanteil an der Oberfläche des Influenza-Virus bestreitet. Dort ist sie für den Ein- und Austritt des Virus in und aus der Zelle verantwortlich (OHUCHI *et al.*, 2006). Durch die Erforschung der 3D-Struktur konnten Transition-State-Inhibitoren entwickelt werden, die das Enzym blockieren und den Eintritt verhindern. Zanamivir und Oseltamivir sind die ersten Beispiele, weitere werden folgen (ZHANG UND XU, 2006).

Andererseits werden nicht nur Liganden an die Proteine angepasst, sondern auch Proteine direkt verändert. Dies kann verschiedenen Zwecken dienen, wie zum Beispiel der Anpassung an neue Rahmenbedingungen wie veränderte pH- Werte oder Temperaturen (RENUGOPALAKRISHNAN *et al.*, 2005) oder der Veränderung der Substratspezifität (WACKER *et al.*, 2006) um den Einsatz in biotechnologischen Prozessen zu ermöglichen.

Dabei hat sich die Forschung bisher stark auf bakterielle und tierische Enzyme konzentriert. Von über 36500 in der wwPDB, der weltweit einzigen Protein Datenbank, zurzeit abgelegten Strukturen sind nur etwa 1300 pflanzlichen Ursprungs. 33 verschiedene (Sequenzidentität unter 90%) pflanzliche Glykosidasen werden gezeigt, und nur sieben 3D-Strukturen beschreiben pflanzliche Glykosyltransferasen. Und das trotz der bereits aufgezeigten Substanzvielfalt, die auf vielfältig interessante Enzyme schliessen lässt.

Die AS wurde aufgrund ihrer Sequenz in die Familie 1 der Glykosyltransferasen eingeordnet (COUTINHO *et al.*, 2003). In dieser Familie mit 1400 Vertretern sind nur 5 Strukturen bekannt. Dabei liegt die Aminosäuresequenzidentität der beiden pflanzlichen Vertreter bei 33 % (UDP-Glucose: Triterpen Glukosyltransferase (UGT71G1) aus *Medicago truncatula*) bzw. 29 % (UDP-Glucose: Anthocyanidin 3-O-Glukosyltransferase aus *Vitis vinifera*). Zu den drei bakteriellen Vertretern konnte gar keine sequentielle Übereinstimmung gefunden werden. Dies lässt viel Raum für strukturelle Änderungen der AS im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Familie.

Auch im Bereich der Alkaloidbiosynthese sind bisher nicht viele 3D-Strukturen erzielt worden. Nur die Enzyme Tropinone Reduktase-I und II aus *Datura stramonium* (NAKAJIMA *et al.*, 1998), die Vinorine Synthase (MA *et al.*, 2005) und Strictosidin Synthase aus *Rauvolfia serpentina* (MA *et al.*, 2006) sind in der wwPDB bisher hinterlegt. Weiter sind die Perakin-Reduktase, die Raucaffricin-Glukosidase und die Polyneuraldinaldehyd-Esterase, allesamt aus *Rauvolfia serpentina*, in unserem Arbeitskreis bereits kristallisiert und ihre Struktur aufgeklärt worden. Damit ist der Biosyntheseweg zum Ajmalin der strukturell am Besten untersuchte Alkaloidstoffwechsel und hält viel Potential für biotechnologische Manipulationen zur Synthese neuer Substanzen. Mit der Raucaffricin-Glukosidase (RG) ist eine zweite Glukosidase im späteren Bereich des Alkaloidstoffwechsels vorhanden, die 56 % Aminosäure-Identität zur SG zeigt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität und der Ähnlichkeit der Substrate bieten diese

beiden Enzyme ein exzellentes Testmodell um die Substratspezifität der Glukosidasen zu untersuchen.

4 Zielsetzung der Arbeit

Mit der AS und SG liegen also zwei in vieler Hinsicht interessante Enzyme vor und aus dem Wissen um ihre Struktur könnten möglicherweise auch biotechnologische Anwendungen hervorgehen.

Die AS wurde bereits ausgiebig charakterisiert und erste Kristallisationsexperimente wurden erfolglos unternommen (HEFNER, 2002). Innerhalb dieser Dissertation sollten diese Experimente ausgeweitet werden und die aufgetretenen Probleme aufgeklärt werden. Die Substratspezifität sollte durch weitere Aktivitätstests und Mutationen eingehend untersucht werden.

Auch die SG ist bereits hinsichtlich Substratspezifität, pH- und Temperatur- Optimum und anderer biochemischer Parameter gut charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch ihre Struktur aufgeklärt werden und so ihre Substratbindung und daraus hervorgehende Substratspezifität erklärt werden. Dabei sollte besonders auf die Alkaloide Raucaffricin und Strictosidin eingegangen werden. Die RG setzt beide Substrate um, während SG nur Strictosidin als Substrat akzeptiert. Für dieses Verhalten sollte anhand der beiden Strukturen eine Erklärung gefunden werden.

Material

1 Bakterienstämme

Zur heterologen Expression der untersuchten Enzyme wurden zwei verschiedene Bakterienstämme verwendet. Beide Stämme genügen den Richtlinien der ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) um als Sicherheitsstamm eingestuft zu werden, der in Laboren der Klasse S1 verwendet werden darf.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
Top10F' (<i>E. coli</i>)	$F'\{lacI^q Tn10(Tet^R)\}$ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nup</i>
M15[pREP4] (<i>E. coli</i>)	<i>E. coli</i> K12 (Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺)

2 Vektor

Es wurde ausschliesslich der Vektor pQE-2 von Qiagen verwendet. Mit dem starken T5 – Promotor und einer Ampicillinresistenz ermöglicht er hohe Expressionsraten von (His)₆-tag tragenden Enzymen.

Tabelle 2: Die Eigenschaften des pQE-2-Vektors

pQE-2 (Qiagen)	ATG Vektor mit 4,8 kb, Schnittstellen: NdeI, SphI, SacI, NotI, SacII, KpnI, PmlI, Sall, PstI, HindIII lowcopy-Plasmid, der Familie der pDSPlasmide zugehörig, ermöglicht die Expression von N-terminalen (His) ₆ -tag- Enzymen und damit die Reinigung über Ni-NTA-Säulen Ampicillinresistenz, IPTG-induzierbar T5 Promotor
-------------------	--

3 Bakterienmedium

LB-Medium, SAMBROOK *et al.*, (1989)

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 1 g/l NaCl, pH 7,0

Bei Kulturplatten erfolgt die Zugabe von 15 g/l Agar.

Antibiotikazusätze:

50 bis 100 µg/ml Ampicillin in H₂O

50 µg/ml Kanamycin in H₂O

4 Puffer

Alle zur Chromatographie benutzten Puffer wurden im Ultraschallbad entgast. Die stabilen Puffer wurden in höher konzentrierten Stammlösungen angesetzt und bei Verwendung verdünnt. Die imidazolhaltigen Puffer mussten frisch angesetzt werden. Wenn nicht anders angegeben, wurde den Puffern zur Bearbeitung der AS 20 mM MSH zugesetzt. Die selbsthergestellten Puffer zur Kristallisation wurden alle aus Stammlösungen hergestellt und sterilfiltriert. Es wurde der pH-Wert der ausgewiesenen Puffersubstanz angegeben.

TAE	40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA [pH 8,0]
Ni-NTA-Ladepuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Imidazol [pH 8,0]
Elutions-Puffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 250 mM Imidazol [pH 8,0]
DAPase-Verdau-Puffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ [pH 8,0], 20 mM MSH

5 Säulen/Säulenmaterial

Tabelle 3: Säulenmaterialien, alphabetisch nach Hersteller

Hersteller	Produkt
GE Healthcare Europe (München) Früher: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Leersäule: HR 10/10 Fertigsäulen: Sephacryl S-100 HR 26/60 MonoQ HR16/10 HisTrap HP 1ml Hitrap Desalting 5ml
Macherey&Nagel (Düren)	Lichrospher 60 RP select B column
Quiagen (Hilden)	Ni-NTA-Agarose, Ni-NTA Superflow, gepackt in HR10/10 Leersäule

6 Kits, Enzyme und Zubehör für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 4: Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologie, alphabetisch nach Produkt

Produkt	Firma
Advantage-Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, USA)
Agarose, rein für Molekularbiologie	AppliChem (Darmstadt)
DAPase	Quiagen (Hilden)
dNTP's	Promega (Madison, USA)
LMW SDS Marker Kit	GE Healthcare Europe (München)
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
Nucleo Spin Plasmid/Extract Kit	Macherey&Nagel (Düren)
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Pfu Turbo-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Smart Ladder	Eurogentec (Seraing, Belgien)

7 Materialien für die Kristallisation

Tabelle 5: Kits, für die Kristallisation, alphabetisch nach Firma

Firma	Produkt
Hampton Research (Aliso Viejo, USA)	Crystal Screen 1&2, MembFac, Index
Jena Biosciences (Jena)	JBScreen Classics ampoules, Emerald Biosystems Wizard Screen I + II
Nextal (Montreal, Kanada)	The Classics, Anion Suite, Cation Suite, MPD Suite, PEGs Suite
Sigma (München)	Crystallization Basic Kit for Proteins, Crystallization Extension Kit for Proteins

Alle weiteren Hilfsmittel wurden bei Hampton Research bestellt, ausser dem Sillikonöl, das von Bayer (Leverkusen) bezogen wurde.

8 Chemikalien und Zubehör

Tabelle 6: Chemikalien und Zubehör, alphabetisch nach Hersteller

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amicon (Witten)	Microcon-, Centricon-und Centriprep-Konzentratoren (YM-10)
AppliChem (Darmstadt)	Antibiotika und Feinchemikalien v.a. für Molekulare Biologie, Agarose
Biozym (Hess. Oldendorf)	PCR-Gefässe, Reaktionsgefässe
Fresenius (Bad Homburg)	Ampuwa (Wasser für die Molekularbiologie)
Fischer Scientific (Schwerte)	Falkon-Röhrchen
ICN (Eschwege)	SDS
Intermedica (Klein-Winternheim)	Halbmikroküvetten
Life Technologies (Eggenstein)	Hefe-Extrakt, Pepton, Agar

Merck (Darmstadt)	Acetonitril für die HPLC, Feinchemikalien, Greiner-Röhrchen
Nalgene (Hamburg)	Sterile Kultur-und Zentrifugenröhrchen
Roth (Karlsruhe)	Trypton, Lagerboxen für Eppendorf-Caps
Sarstedt (Nümbrecht)	Pipettenspitzen
Schleicher & Schüll (Dassel)	Rundfilter Protran 0.45 µm
Serva (Heidelberg)	Nitrocellulosemembranen NC 0.45 µm Porendurchmesser, Servapor Dialyse- schläuche mit 9, 16 und 29 mm Ø; Coo- massie Brillant Blue G-250/R-250
Sigma (München)	Feinchemikalien
Alkaloidsammlung des Lehrstuhls der Pharmazeutischen Biologie (Mainz)	Sämtliche verwendete Alkaloide, v. a.: Cathenamin und Strictosidin, Raucaffricin

9 Geräte

Tabelle 7: Benutzte Geräte, alphabetisch nach Anwendungsgebiet

Geräte	Ausstattung und Herkunft
Agarosegel-Dokumentation	UV-Transilluminator /302 nm (Bachhofer, Reutlingen) mit Canon Powershot G5 Digitalkamera
Bakterienzellaufschluss	Sonotrode Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlin)
Computergestützte Dokumentation	Flachbettscanner Highscan, Highscreen

Elektrophorese	<p>Horizontalelektrophoresekamern:</p> <p>BlueMarine 100 und 200 (Serva, Heidelberg) und COMPHOR Midi Elektrophoresekamern;</p> <p>Vertikalelektrophoresekamern:</p> <p>SE 600 Hofer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg);</p> <p>Kühlung: Kryo-Thermostat 350 (Haake, Berlin);</p> <p>Netzgeräte: PowerPac 3000 (BioRad, München), E835 und E844 (Consort, Turnhout/Belgien)</p>
Elektroporation	Easyject Optima (EQUIBIO, Ashford, UK)
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6 (Fa. Christ, Osterode), mit Vakuumpumpe von AEG: Typ ADEB71N4R3
HPLC-Untersuchungen	<p>Merck-Hitachi-System (Darmstadt):</p> <p>Integrator D-2500</p> <p>Autosampler AS-2500</p> <p>UV/VIS-Detektor L-4250</p> <p>Pumpe L-6500</p> <p>Säule: LiChrospher 60 RP select B (5µm), 250mm</p> <p>Vorsäule: Select B</p>
HTS-Kristallisation	Cartesian MicroSys SQ Series (Cartesian Technologies, Irvine, USA)
Mikroskopie	Laborlux S (Leitz, Wetzlar), Stereomikroskop SM22-GT-14OF mit Polarisations-einrichtung WP II und Fotoausgang, Dokumentation mit Nikon Coolpix 4500 Set SM22
Mixen	Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim)
OD-Bestimmung	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
PCR-Cycler	<p>Genius Techne (Jepson Bolton, Watford, UK)</p> <p>Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg)</p>

pH-Einstellung	pH-Meter 537 und DIGI 500 (WTW, Weilheim), 761 Calmatic (Bacherhofer, Reutlingen)
Proteinreinigung	<p>a.) Reinigung mit Peristaltikpumpen: IPC-Pumpe (ISMATEC, Basel, Schweiz) UV/VIS-Detektor: 2158 UVICORD SD (LKB BROMMA, Schweden) Schreiber: REC 102 (Pharmacia LKB, Freiburg)</p> <p>b.) Reinigung mit Äkta-Explorer: System von GE Healthcare Europe (München) (früher: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)) bestehend aus: 2 Pumpen P-900 Durchflusszellen mit 22 µl und 88 µl Volumen zur Messung von Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit UV/VIS-Monitor UV-900 Betrieb der Anlage erfolgte im MaxiColdLab-Kühlschrank (LKB, Schweden) bei 4 °C Steuerung, Kontrolle und Auswertung wurde mit einem Pentium 133-MHz PC Compac durchgeführt (Software: UNICORN Control System; Betriebs-System OS/2 Warp, IBM), Drucker: HP Deskjet 690 C</p>
Steriles Arbeiten	Laminar-Flow-Box (Fröbel Labortechnik, Lindau), NU 440 -400E (Zapf, Sarstedt)

Temperieren	Ecocell 55 (MMM Medcenter, Gräfelfing) Schüttelinkubatoren 1083 und 3032 (GFL, Burgwedel) Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg) Wasserbad F20 HC (Julabo, Seelbach) Brutschrank (Mettler, Schwabach) Thermoshake (Gerhardt, Bonn)
Ultraschallwasserbad	SONOREX RK 510 S (Bandelin, Berlin)
UV-Spektroskopie	Lamda 2-Spektrometer, (Perkin-Elmer, Überlingen)
Zentrifugieren	Kühlzentrifuge J2-21, Rotoren JA 10, JA 20 (Beckmann, München) Kühlzentrifuge Z 320K (Hermle, Gosheim) Kühlzentrifuge Universal 16/16 R sowie Rotanta/RP (Hettich, Tuttlingen) Tischzentrifuge Biofuge 15, Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße (Heraeus/Sepatech, Osterode)

Methoden

1 Proteinchemische Methoden

1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der quantitativen Bestimmung von Proteinen wurde die nach BRADFORD (1976) modifizierte Methode von MEYERS UND LAMBERTS (1965) verwendet. Dabei nutzt man die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 an die kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Durch diese Komplexbildung erfährt der Indikator eine Verschiebung des Absorptionsmaximums vom rötlichen in den Blaubereich. Bei der Messung werden 50 µl Probe mit 950 µl Coomassie-Reagenz vermischt. Nach 5 min hat sich ein für etwa 30 min stabiler Komplex gebildet. Die Absorption wird bei 595 nm gemessen und mit einer Kalibrierungskurve, die mit definierten Mengen von BSA erstellt wurde, verglichen. Zuvor ist ein Nullabgleich mit dem verwendeten Puffer nötig. Um die Genauigkeit der Methode zu gewährleisten darf die Proteinkonzentration nur im linearen Bereich von 10-100 µg/ml liegen. Einige Puffer, z.B. Na-Acetat, können diese Bestimmung stören.

Um Coomassie-Reagenz herzustellen, werden 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 ml Ethanol (96 %) und 100 ml Phosphorsäure (85 %) gelöst, anschliessend mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und filtriert. Die Lösung kann bei 4 °C über mehrere Monate stabil gelagert werden.

Während der Proteinreinigung kann die Proteinkonzentration durch eine UV-Absorptionskurve bei 280 nm bestimmt werden. Die Absorption eines Proteins bei dieser Wellenlänge basiert hauptsächlich auf den aromatischen Seitenketten, ist also Sequenzabhängig. Auf der Internetseite <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html> ist ein Hilfsmittel um den Absorptionskoeffizienten abzuschätzen. Diese Methode ist jedoch relativ ungenau.

1.2 Präparative Expression von Enzymen in *E. coli*

Für die die beiden Enzyme AS und SG exprimierenden Bakterien mussten verschiedene Wachstumsbedingungen gewählt werden. In beiden Fällen wurden zuerst Einzelkolonien von einer Agarplatte gepickt und in 5-10 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C herangezogen. Das Volumen konnte dann auf 500 ml vergrössert werden und die Kultur weitere 24 h bei 24 °C inkubiert werden. Für die SG Produktion konnten damit 10 l LB-Medium angeimpft werden, bei einer $QD_{600} = 0,5$ (nach 8 h) konnte mit einer 250 µM Endkonzentration von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) die

Enzymproduktion induziert werden. Nach weiteren 16 h wurde durch Abzentrifugieren (7000 x g, 8 min) geerntet. Das erhaltene Bakterienpellet wurde bis zur Proteinaufreinigung in zwei Teilen eingefroren. Da die AS vor allem als „Inclusion Bodies“ heterolog exprimiert wurde, mussten hier andere Bedingungen gewählt werden. Nach dem eine Einzelkolonie wie bei SG auf 500 ml Volumen herangezogen wurde, wurden damit 20 l LB-Medium angeimpft und sofort IPTG bis zu einer Konzentration von 20 μ M hinzugegeben. Nach 18 h wurde geerntet. Auch hier wurde das Pellet in zwei Teilen eingefroren. In allen Medien für SG und AS wurden zur Selektion jeweils 50 mg/l Kanamycin und Ampicillin eingesetzt.

1.3 Präparation von Enzymrohextrakten

Die gefrorenen Zellen wurden im Ni-NTA-Ladepuffer (2 ml je g Bakterien) aufgetaut und resuspendiert. Mit 30 sec gepulstem Ultraschall wurde die Suspension homogenisiert. Anschliessend wurde mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Mit 40 weiteren Sekunden gepulstem Ultraschall wurde der Aufschluss abgeschlossen. Die Zellwandfragmente und unlöslichen Bestandteile konnten durch Zentrifugation abgetrennt werden. Im Überstand waren die löslichen Proteine enthalten. Der klare Überstand wurde direkt für die Reinigung verwendet. Eine unter Umständen erhöhte Viskosität durch freigesetzte DNA konnte bei Bedarf mittels Pressen durch eine 0,2 mm Kanüle verringert werden.

1.4 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)

Das Prinzip der IMAC beruht auf der starken Affinität von Histidinen zu mehrwertig positiven Metallionen. Diese Ionen wiederum sind über Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarosematrix gebunden. Das gebräuchlichste Ion ist Ni^{2+} , jedoch können auch andere Ionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} oder Co^{2+} verwendet werden. Jedes Protein hat für jedes Ion andere Bindungseigenschaften. Der verwendete Vektor pQE-2 codiert für einen N-terminalen 6-fach His-Tag. Durch das wiederholte Histidin bindet das so exprimierte Enzym stärker, als Proteine mit einzelnen nativ vorhandenen Histidinen an der Oberfläche. Das gebundene Protein kann durch Imidazol kompetitiv von der Säule verdrängt werden. Mit 20-50 mM Imidazol können Proteine mit vereinzelt Histidinen an ihrer Oberfläche von der Säule gewaschen werden. Mit höheren Konzentrationen (bis zu 250 mM) kann das Zielprotein eluiert werden.

Für die SG wurde ausschliesslich Ni^{2+} verwendet und mit 50 mM Imidazol gewaschen. Zur Reinigung der AS wurden alle oben genannten Ionen genutzt und verschiedene Konzentrationen Imidazol getestet.

1.5 Enzymatischer Verdau des His-Tags

Der His-Tag kann Konformationen annehmen, die für die Kristallisation unvorteilhaft sind. Deswegen ist es häufig notwendig, ihn nach der Affinitätschromatographie abzuspalten. Dazu wurde das TAGZym-System von Qiagen verwendet. Dabei wurde durch Dialyse in den DAPase-Verdau-Puffer umgepuffert. Für 2 mg Enzym wurden 50 U DAPase (5 μl Lösung) verwendet. Es wurde bei 37 °C 10 h verdaut. Die DAPase spaltet Dipeptide vom N-Terminus von Proteinen, bis sie auf unverdauliche Aminosäuren trifft. Sie selbst ist mit einem C-terminalen His-Tag versehen und konnte nach dem Verdau durch IMAC an Ni-NTA entfernt werden.

1.6 Anionenaustauscher MonoQ

Der Anionenaustauscher MonoQ besteht aus einer Matrix mit kovalent verknüpftem quartären Stickstoff. Er gehört zu den starken Anionenaustauschern. Geladen wurde das Protein in einem 10 mM Tris pH 7,5 Puffer, für AS wurde 20 mM MSH zusätzlich dazugegeben. Zur Elution wurde KCl genutzt. In einem linearen Gradienten wurde die Salzkonzentration über 20-30 CV von 0 mM bis 500 mM gesteigert.

1.7 Gelfiltration mit Sephacryl S-100 HR

Bei der Gelfiltration wird ein stark poröses Material eingesetzt. Je nach Grösse der Proteine können sie in mehr (bei kleineren Proteinen) oder weniger Poren (bei grossen Proteinen) eindringen. So wird das mögliche Säulenvolumen für die kleineren Proteine grösser als für die Grösseren, die dadurch früher eluiert werden. Adsorption an das Säulenmaterial soll vermieden werden. Dazu ist ein Salzgehalt von mindestens 0,15 M NaCl nötig. Der Trennbereich der Sephacryl S-100 HR liegt zwischen 1-100 kDa. Lufteintritt in die Säule ist unbedingt zu vermeiden. Es müssen entgaste Puffer verwendet werden, da es nicht möglich ist eingetretene Luft aus den Poren zu entfernen.

Die Hitrap Desalting Säule basiert auch auf dem Grössenausschlussprinzip, hat jedoch eine einheitliche Ausschlussgrösse von < 5 kDa. Damit können niedermolekulare Begleitstoffe gut entfernt und so der Puffer gewechselt werden.

1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist ein denaturierendes Verfahren zur Identifizierung von Proteinen (SHAPIRO *et al.*, 1967). Die Proteinlösung wird mit MSH und Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgekocht. Durch das überschüssige, reduzierende MSH werden etwaige Disulfidbrücken gebrochen. Das SDS maskiert durch Anlagerung die Eigenladung des Proteins und führt zusammen mit der Hitzebehandlung zu einer Linearisierung der Proteine. Dadurch haben sie ein konstantes Grösse/Ladungs-Verhältnis. Es ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen dem Logarithmus der relativen Molekülmasse und der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Auf dem Gel mitgelaufene Markerproteine geben so Aufschluss über die jeweiligen Proteingrößen. Auch die Reinheit kann hier gut beurteilt werden.

Tabelle 8: Bestandteile des benutzten SDS-PAGE Markers

Protein	Molekülmasse (Da)
Phosphorylase b (Hasenmuskel)	97.000
Albumin (BSA)	66.000
Ovalbumin (Hühnereiweiss)	45.000
Carbonic anhydrase (Rindererythrozyten)	30.000
Trypsin inhibitor (Sojabohne)	20.100
α -Lactalbumin (Rindermilch)	14.400

Nach LAEMMLI (1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen, grobporigen Sammelgel (5 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % (m/V) SDS) zu einer scharfen Bande konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche feinporige Trenngel (7,5–15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS). Zwischen zwei Glasplatten (16 x 18 cm, Abstand 1,5 mm) wurde zunächst das Trenngel gegossen. Nach dessen Polymerisierung (~ 45 min) wurde das Sammelgel aufgegeben und der Probenkamm für die späteren Probenfächer eingebracht. Nach weiteren 45 min wurde die Apparatur gemäss der Beschreibung des Geräteherstellers zusammengebaut und die Proben aufgetragen.

Um die während des Laufes auftretende Wärme abzuführen, wurde die Apparatur bei 4 °C im Kühlschrank aufgestellt.

2 fach Probenpuffer:

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

Laufpuffer:

50 mM Tris
 0,2 M Glycin
 0,15 % (m/V) SDS

Als Laufbedingungen hat sich bei einem 11 %igen Gel eine Stromstärke von 12 mA für 15 Stunden bewährt. Es ist auch möglich, ein Gel bei 40 mA in etwa 3 h laufen zu lassen, dies führt jedoch zu unschärferen Banden. Je nach gewünschtem Trennbereich kann die Acrylamid-Konzentration im Trenngel oder die Laufzeit verändert werden. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Gel 30 bis 60 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt (BLAKESLY UND BOEZI, 1977) und anschliessend mit der Entfärbelösung, unter mehrfachem wechseln der Lösung, entfärbt, bis einzelne Proteinbanden bei einem geringen Hintergrund sichtbar wurden.

Färbelösung:

0,25 % (m/V) Coomassie Blue R-250
 45 % (V/V) Methanol
 9 % (V/V) Essigsäure

Entfärbelösung:

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

Die Gele konnten in einer 10 %igen Glycerollösung konserviert werden.

1.9 Pufferwechsel

Zwischen verschiedenen Trennverfahren bzw. vor dem Kristallisationsansatz war es notwendig von einem Puffer zu einem anderen zu wechseln. Dazu wurde teils die in 1.7 beschriebene HiTrap Desalting Säule benutzt, teils wurden Dialyseschläuche genutzt. Bei der Dialyse kamen Schläuche mit 9, 16 oder 29 mm Durchmesser und einer Molekulargewichtsausschlussgrösse von 12-14 kDa zum Einsatz. Es wurde unter einmaligem Pufferwechsel gegen 5 l über 15 h dialysiert. Die HiTrap Desalting Säule ermöglichte zwar einen wesentlich schnelleren Wechsel, verdünnte die Proben aber stark (etwa 1 zu 3) und führte zu teils hohen Verlusten von Protein (bis zu 50 %).

1.10 Konzentrieren von Proteinlösungen

Für die Kristallisation benötigt man Enzymkonzentrationen weit über dem physiologischen Bereich. Um die aus den Aufreinigungen erhaltenen Proteinlösungen auf die benötigte Konzentration zu bringen wurden verschiedene Konzentratoren benutzt. Volumina > 2 ml wurden mit Hilfe von Centriprep YM10 Einwegkonzentratoren (Ausschlussgrösse 10 KDa (Millipore, Bedford, USA)) durch Zentrifugation bei $3.000 \times g$ auf ein Endvolumen von $100-500 \mu\text{l}$ eingeeengt. Bei Volumina < 2 ml wurden Microcon YM10 oder 30 Einwegkonzentratoren (Millipore, Bedford, USA) bei $10.000 \times g$ verwendet.

1.11 Optische Dichte von Bakteriensuspensionen

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm kontrolliert. Als Vergleich diente die leere Nährlösung mit dem gleichem Antibiotikazusatz.

2 Aktivitätstests

Beide Enzyme wurden mit verschiedenen Substraten getestet. Die starken Unterschiede in der Hydrophilie machten mehrere Trennsysteme notwendig. Alle Messungen konnten mittels HPLC vorgenommen werden. Alle verwendeten Puffer wurden filtriert und im Ultraschallbad entgast. Als Detektor diente ein UV-Messer bei der entsprechenden Wellenlänge. Die Auswertung wurde durch automatische Integration der Peakfläche und Quantifizierung mit externem Standard vorgenommen. Die Retentionszeiten können je nach Aussentemperatur um bis zu einer Minute voneinander abweichen.

2.1 Substrate der Arbutin-Synthase

Der Aktivitätstest für das natürliche Substrat Hydrochinon wurde von AREND (AREND *et al.*, 2000) entwickelt. Die Ansätze wurden gemäss Tabelle 9 zubereitet.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines Aktivitätstestes von AS für Hydrochinon

Bestandteil	Volumen [µl]	Endkonzentration [mM]	Abs. Konzentration [µmol]
Hydrochinon (25 mM)	5,0	1,0	0,125
UDP-Glucose (25 mM)	10,0	2,0	0,250
Tris/HCl (1 M, pH 7,5)	10,0	100,0	
Enzymlösung	variabel		
Wasser	ad 100,0		

Der Ansatz wurde je nach Enzym-Mutante 5 min bis zu 6 h bei 50 °C inkubiert. Standards mit denaturiertem Enzym wurden ebenso behandelt. Anschliessend wurde die Reaktion mit 300 µl Methanol abgestoppt. Die Probe wurde durch Zentrifugation (18.000 x g, 10 min) von Schwebeteilchen befreit und der Überstand in die HPLC injiziert. Für andere Substrate wurde das gleiche Pipetierschema verwendet, wobei das Hydrochinon durch 25 mM Lösungen des jeweiligen Substrates ersetzt wurde. Die HPLC Programme wurden jedoch variiert.

2.1.1 Das natürliche Substrat, Hydrochinon

Auch dieses HPLC-Programm entstammt AREND *et al.* (2000).

Chromatographiebedingungen:

Säule:	LiChrospher 60 RP select B (5 µm), 250 x 4 mm
Vorsäule:	LiChrospher 60 RP select B (5 µm), 4 x 4 mm
Flussrate:	2 ml/min
Injektionsvolumen:	40-100 µl
Detektion:	UV 285 nm
Elution:	isokratisch über 10 min: 2 % Acetonitril, 98 % H ₂ O (pH 2,3, eingestellt mit H ₃ PO ₄)

Dieses Programm wurde für Hydrochinon und eine Vielzahl der anderen Substrate verwendet. Nur für die getesteten Aminosäuren wurde ein anderes Programm gebraucht.

2.1.2 Phenylglycin und Tyrosin als mögliches Substrat

Auf Grund von schlechter Trennung von Phenylglycin bzw. Tyrosin und UDPG konnte für diese Substrate nicht das Standard-HPLC-Programm verwendet werden. Es musste ein neues Programm entwickelt werden:

Säule:	LiChrospher 60 RP select B (5 µm), 250 x 4 mm
Vorsäule:	LiChrospher 60 RP select B (5 µm), 4 x 4 mm
Flussrate:	2 ml/min
Injektionsvolumen:	40-100 µl
Detektion:	UV 285 nm
Elution:	Eluent A: Acetonitril Eluent B: H ₂ O (pH 7,0)

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	50	50
3,0	50	50
10,0	100	0
13,0	100	0
13,5	50	50
18,0	50	50

2.2 Substrate der Strictosidin-Glukosidase

Für die Aktivitätsbestimmung der Strictosidin-Glukosidase wurde für alle Versuche das gleiche Programm genutzt.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines Aktivitätstestes von SG

Bestandteil	Volumen [μ l]
Substrat (1 mg/ml)	5,0
KP _i (1M, pH 5,2)	10,0
Enzymlösung	Variabel
Wasser	ad 100,0

Der Ansatz wurde bei 30 °C für 5 min bis zu 6 h inkubiert und mit 100 μ l Methanol abgestoppt. Anschliessend durch Zentrifugation von Schwebeteilchen befreit und in die HPLC eingespritzt.

Säule: LiChrospher 60 RP select B (5 μ m), 250 x 4 mm

Vorsäule: LiChrospher 60 RP select B (5 μ m), 4 x 4 mm

Flussrate: 1,68 ml/min

Injektionsvolumen: 40-100 μ l

Detektion: UV 280 nm

Elution: Eluent A: Acetonitril

Eluent B: H₂O (pH 2,3, eingestellt mit H₃PO₄)

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	28	72
4,0	30	70
6,0	35	65
6,1	28	72
10,0	28	72

2.3 Aktivität der Strictosidin-Synthase, Produktion von Strictosidin

Bei der enzymatischen Synthese von Strictosidin wurde der Verlauf der Reaktion durch HPLC analysiert. Zur Trennung von Tryptamin, Secologanin und Strictosidin wurde folgendes Programm verwendet:

Säule:	LiChrospher 60 RP select B (5µm), 250 x 4 mm
Vorsäule:	LiChrospher 60 RP select B (5µm), 4 x 4 mm
Flussrate:	1,5 ml/min
Injektionsvolumen:	60 µl
Detektion:	UV 250 nm
Elution:	Eluent A: Acetonitril Eluent B: H ₂ O (pH 2,3, eingestellt mit H ₃ PO ₄)
Gradient:	

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	10	90
8,0	50	50
11,0	80	20
11,5	10	90
15,0	10	90

3 Molekularbiologische Methoden

Der Austausch von einzelnen Aminosäuren in den untersuchten Proteinen wurde durch Einführung von Punktmutationen in das jeweilige Gen bewerkstelligt. Dafür wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) genutzt, wie im Handbuch des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolia, USA) beschrieben. Diese Methode ersparte langwieriges umklonieren, da der komplette Vektor mit Insert amplifiziert wurde. Die benötigte Mutation wurde durch den Primer bereitgestellt. Nach der PCR konnte durch die Endonuklease *DpnI* das Template verdaut werden. Anschliessend konnte der neue Vektor durch Elektrophorese über ein Agarosegel gereinigt und in TOP 10-Zellen transformiert werden. Dort wurde der noch offene Vektor zyklisiert und weiter vervielfältigt. Nach einer Wachstumsphase konnten die Bakterien geerntet und das Plasmid extrahiert werden. Die bei der PCR benutzte Polymerase (Phusion DNA Polymerase) hatte die Eigenheit den Primer teilweise mehrfach einzubauen. Um eine Zelllinie mit dem korrekten Gen

zu ermitteln wurden mehrere Kolonien weiterbearbeitet. Nach der Extraktion der Plasmide aus den Zellen wurden sie mit den Restriktionsendonukleasen geschnitten, die auch zum Einklonieren des Genes in den Vektor benutzt wurden. Auf einem weiteren Agarosegel konnte anhand der Laufstrecke die nutzbaren Zelllinien ermittelt werden. Zur Kontrolle der Mutation wurde ein Teil der gewonnenen DNA an Genterprise (Mainz) zur Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER *et al.*, 1977) übergeben. Ein weiterer Teil konnte in M15-Zellen transformiert werden, die zur Produktion des gesuchten Enzyms benutzt wurden.

3.1 Polymerase-Kettenreaktionen

Mit diesem Verfahren kann DNA selektiv vermehrt werden. Die Zusammensetzung der Ansätze und die Temperaturprogramme werden bei den jeweiligen Experimenten näher spezifiziert. Alle Reaktionen wurden als „hot start“ durchgeführt. Dabei wurde die Polymerase erst nach dem anfänglichen Denaturierungsschritt zugegeben. Dadurch wurden unspezifische Kettenverlängerungen während des Aufheizens verhindert.

3.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen kamen bei Testverdauen nach der ortsgerichteten Mutagenese und beim Verdau des Templates nach der PCR zum Einsatz. Es wurden meist 3 U Endonuklease je μg DNA benutzt. Bei 37 °C dauert die Reaktion etwa 1 h. Gerade beim Verdau der Template DNA wurde meist ein Sicherheitsabstand von bis zu insgesamt 2 h eingehalten. Es wurden die von New England Biolabs mitgelieferten Puffer verwendet.

3.3 Elektrophoretische Trennung von DNA

Zur Reinigung, Auftrennung und Ergebnisverifizierung von DNA wurde, je nach Grösse der erwarteten Fragmente, ein 0,7 bis 1,5 %iges Agarose-Horizontalgel gegossen. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und die verdunstete Flüssigkeit mit Seral-Wasser ergänzt. Dem Gel wurde zur Visualisierung der DNA etwa 0,005% (V/V) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzugegeben. Bei einer Temperatur von etwa 55 °C wurde die Lösung in die Elektrophoresekammer gegossen und härtete innerhalb von ca. 30 min aus. Als Laufpuffer diente 1 \times TAE, als 10 \times Probenpuffer eine Mischung aus 0,25% (m/V) Bromphenolblau und 30% (V/V) Glycerol in Wasser.

Bei einer Spannung von 4-6 V/cm Gel lief die Elektrophorese bis die Bromphenolblaufront etwa die Hälfte des Gels erreicht hatte. *BstEII* verdaute Lambdaphagen-DNA (New England Biolabs, Beverly, Frankfurt am Main) oder die DNA-Leiter Smart Ladder dienten als Marker. Anhand der Marker wurden Grösse und Menge der DNA abgeschätzt. Auf einem Transilluminator wurde der DNA-Ethidiumbromid-Komplex bei 302 nm sichtbar gemacht. Wurde die DNA weiterverarbeitet, war auf einen schnellen Ablauf der Auswertung und Dokumentation zu achten, da die UV-Strahlung zu Mutationen führen kann.

3.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Reinigung eines PCR-Ansatzes über ein Agarosegel wurde die gefundene DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die eigentliche Extraktion wurde mit dem NucleoSpin Extract Kit (Macherey&Nagel (Düren)) durchgeführt.

3.5 Gehaltsbestimmung von DNA

In wässriger Lösung (pH 7,5) konnte die Konzentration von DNA photometrisch bei 260 nm bestimmt werden (WILLFINGER *et al.*, 1997). Dabei entsprach eine $OD_{260} = 1$ etwa 50 µg/ml DNA. Da Verunreinigungen wie zum Beispiel Proteine ebenfalls im UV-Bereich absorbieren, wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Bei einer sauberen Probe sollte der Faktor bei 1,8 liegen. Geringe DNA-Konzentrationen wurden durch einen Vergleich mit dem Marker auf einem Agarosegel bestimmt.

3.6 Fällern und Konzentrieren von Plasmid-DNA

Um die Ausbeute bei den NucleoSpin Kits zu erhöhen, wurde teilweise mit bis zu 100 µl Puffer eluiert. Dabei stieg zwar die absolute Menge an DNA, die Konzentration sank jedoch unter die benötigte Grenze. Um die DNA zu konzentrieren wurde sie mit 0,1 VT 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 VT Isopropanol 1 h bei -80 °C gefällt und abzentrifugiert (18.000 x g, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % (V/V) eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C). Anschliessend wurde der Überstand abgenommen und der restliche Ethanol bei Raumtemperatur verdampft. Das trockene Pellet wurde in 10-30 µl H₂O aufgenommen.

3.7 Transformation

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle. In dieser Arbeit wurden dafür zwei Methoden verwendet, ein thermisch-chemisches Verfahren („Hitzeschock“ (Hanahan, 1985) und ein elektrisches Verfahren (Elektroporation (DOWER *et al.*, 1988)). In beiden Fällen mussten die Bakterien auf die Aufnahme vorbereitet werden.

3.7.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

1 l LB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur des benötigten Bakterienstammes inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 herangezogen. Um die Zellen möglichst gering zu belasten wurden alle weiteren Schritte bei 0 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (4.000 x g, 15 min, 0 °C). Das Medium wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig in 1 l eiskaltem, keimfreien H₂O resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt mit 0,5 l eiskaltem, keimfreien H₂O. Die Zellen wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem, 10 %igen Glycerol (V/V in H₂O) aufgenommen. Dabei wurde eine Konzentration von $\sim 1 - 3 \times 10^{10}$ Zellen/ml erreicht. Die Lösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7.2 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Ausgehend von 1 l LB-Medium wurde eine Kultur der benötigten Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und danach 5 min bei 4 °C mit 1000 x g abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen, während das Pellet mit etwa 15 ml TFB I-Puffer resuspendiert und für etwa 90 min auf Eis inkubiert wurde. Die Lösung wurde erneut abzentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, unter ständiger Kühlung, vorsichtig in 2 ml kaltem TFB II resuspendiert. Nachdem die erhaltene Suspension aliquotiert wurde, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB I: 100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM KOAc

10 mM CaCl₂

15 % (V/V) Glycerol

auf pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt

TFB II:

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl

10 mM MOPS

15 % (V/V) Glycerol

auf pH 6,8 mit KOH eingestellt

3.7.3 Elektroporation

Ein Aliquot der benötigten kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Etwa 50 μ l Bakteriensuspension wurden mit 5 μ l Plasmidlösung (1-100 ng) vorsichtig gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte, sterile 2 mm-Elektroporationsküvette gefüllt und in das Elektroporationsgerät geführt. Es wurde das Programm für *E. coli* Bakterien gewählt (2200 V, 15 μ F, 335 R) und der Impuls ausgelöst. Direkt anschliessend wurden 500 μ l, auf 37 °C vorgewärmtes, LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten, mit entsprechenden Antibiotikazusatz als Selektionsmarker, ausplattiert.

3.7.4 Transformation durch Hitzeschock

Je Ansatz wurden etwa 50 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Durch die vorangegangene chemische Behandlung waren die Bakterien sehr anfällig für jeglichen Stress und wurden nur mit Spitzen pipettiert, deren Öffnung durch abschneiden erweitert wurde. Zu den Zellen wurde etwa 5 μ l Plasmidlösung (1-100 ng) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dabei lagerten sich die Plasmide an der Zelloberfläche an. Durch einen Hitzeschritt (90 s, 40 °C) und anschliessendem Abkühlen (2 min auf Eis) wurde das Plasmid inkorporiert. Danach durften die Bakterien in 450 μ l LB-Medium 30 min bei 37 °C regenerieren. Abschliessend wurde auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikazusatz ausplattiert. Nach etwa 14 h bei 37 °C wurden einzelne Kolonien auf den Platten sichtbar.

3.8 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden TOP 10 Zellen genutzt. Nach der Vermehrung konnten hochreine Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid Kit gewonnen werden. Zur Elution wurde H₂O verwendet, was für die folgende Sequenzierungsmethode besser geeignet war als der mitgelieferte Puffer.

4 Kristallographische Methoden

Zur Beschreibung eines Enzyms wird die 3-D-Struktur ein immer wichtigerer Bestandteil. Um eine solche Struktur ermitteln zu können ist die zu bevorzugende Methode die Röntgenstrukturaufklärung. „Bottleneck“ dieser Methode sind gut streuende

Kristalle des gesuchten Makromoleküls. In dieser Arbeit wurden auf der Suche nach den benötigten Kristallen verschiedene Methoden getestet.

Vor der Kristallisation wurden alle Puffer filtriert (0,02 µm Filter) und die Proteinlösung durch Zentrifugation (18.000 x g, 10 min) von Schwebeteilchen befreit. Alle Kristallisationsansätze wurden in den ersten 3 Tagen täglich, dann 4 Wochen wöchentlich, danach unregelmässig auf Kristallwachstum überprüft bis die Proben eingetrocknet waren. Die Konzentration der Enzymlösungen schwankte zwischen 1 und 15 mg/ml. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4, 18, 20, 23, 25, 30 oder 32 °C erschütterungsfrei gelagert.

4.1 Dampfdiffusion

Bei den Dampfdiffusionsmethoden sind die Probe und das Reservoir räumlich getrennt und durch eine Gasphase miteinander verbunden. Die Probe enthält eine geringere Konzentration an Puffer als das Reservoir, so dass überschüssiges Lösungsmittel verdunstet und im konzentrierteren Reservoir kondensiert. Innerhalb von etwa 24 h geschieht so ein Konzentrationsausgleich, der durch den Überschuss an Reservoir durch eben jenes bestimmt wird. Nach 24 h kann weitere Konzentrierung nur durch Verlassen von Lösungsmittel aus dem Reaktionsgefäss geschehen. Dabei nimmt das Silikonöl zum Verschliessen des Wells eine grosse Rolle ein. Auch wenn die Konzentration von Enzym/Präzipitant vom metastabilen Bereich in den Bereich der spontanen Nucleusbildung gewechselt hat, können kinetische Gründe die Kristallisation verzögern, so dass regelmässige Kontrolle des Kristallisationsansatzes nötig ist.

4.1.1 Hanging-Drop

Hanging- und Sitting-Drop bedienen sich beide der Dampfdiffusion.

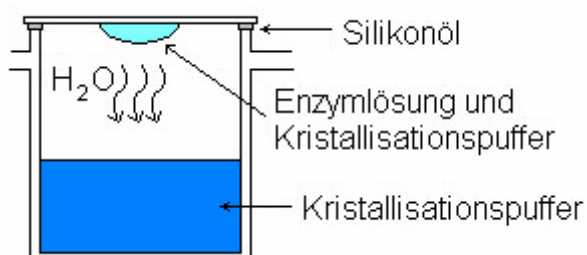


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Hanging-Drop Experimentes

Es wurden VDX Platten und silikonisierte Deckgläschen von Hampton Research (Aliso Viejo, USA) verwendet. Als Reservoir dienten 0,7 -1 ml Pufferlösung entweder aus einem der verwendeten Kits oder selbst hergestellter Puffer. Davon wurden 1 bis 4

mal 1 – 4 μl auf ein Deckgläschen pipettiert. Zu jedem dieser Tropfen wurde je nach Experiment die gleiche bis anderthalbfache Menge Enzymlösung gegeben. Bei verschiedenen Experimenten wurden weitere Additive und Detergentien den Puffern zugesetzt. Die Deckgläschen wurden umgedreht über dem Reservoir platziert und mit Silikonöl verschiedener Viskositäten versiegelt.

4.1.2 Sitting-Drop

Sitting-Drop-Experimente wurden mittels verschiedener High-Throughput-Systeme (HTS) durchgeführt. HTS wurden am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt, am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg und in Hamburg (EMBL Outstation) genutzt. Dabei wurden puffer- und enzymsparende Tropfengrößen von 100 bis 300 nl gewählt und Reservoirmengen von 100 μl . Es kamen ausschließlich käufliche Kits zum Einsatz.

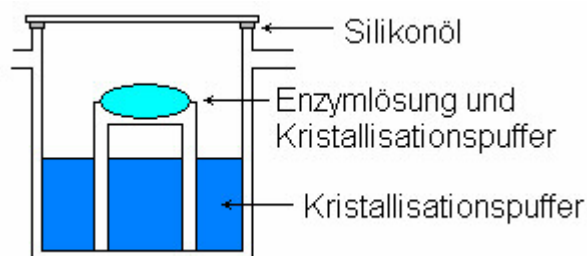


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Sitting-Drop Experimentes

4.2 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse erlaubt einen direkteren Eingriff in die Kinetik der Anreicherung des Präzipitanten als die Dampfdiffusion. Mikrodialyseknöpfe wurden mit einer zu equilibrierenden Enzymlösung gefüllt. Die Einbuchtung im Knopf wurde mit einer Dialysemembran verschlossen, die durch einen Gummiring festgehalten wurde. Der Knopf wurde direkt in eine Pufferlösung gelegt.

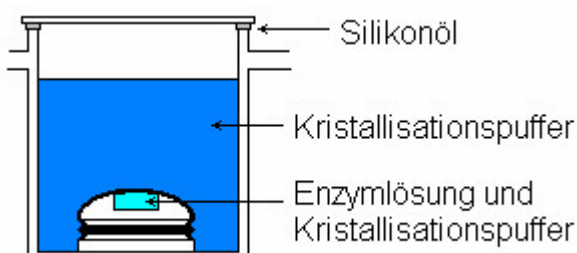


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kristallisation durch Mikrodialyse

Je nach Planung des Experimentes konnte so durch regelmässiges Tauschen der Pufferlösung entweder die Konzentration eines Präzipitantes langsam erhöht oder die Konzentration eines stabilisierenden Agens langsam gesenkt werden. Zum Ansetzen wurden VDX-Platten mit Microdialysis Button`s von Hampton Research genutzt. Die Wells wurden mit Deckgläschen und hochviskosem Silikonöl verschlossen. Das Probenvolumen lag zwischen 5 und 350 μl , das Reservoirvolumen bei 2 ml.

4.3 Microbatch unter Öl

Beim Microbatchverfahren wurden Enzym und Puffer direkt in 96 Well Microbatch Platten von Hampton Research gemischt. Das Gemisch wurde mit Öl überschichtet. Je nach verwendetem Öl fand während des Experimentes keine bis langsame Veränderungen der Konzentrationen in der Lösung statt. Paraffinöl ist wasserundurchlässig, Silikonöl lässt Diffusion und damit Verdunstung von Wasser aus dem Kristallisationsansatz zu. Üblicherweise wurde bei diesem Verfahren ein 1:1 Gemisch aus beiden Ölen verwendet (Al`s Oil (D`ARCY *et al.*, 1996)). Dabei wurden Enzymlösungsvolumen von 4-10 μl mit der gleichen Menge Puffer versetzt und mit 6 ml Öl überschichtet. Der Einsatz eines Reservoirs ist hierbei möglich um die Diffusionsgeschwindigkeit weiter zu senken.

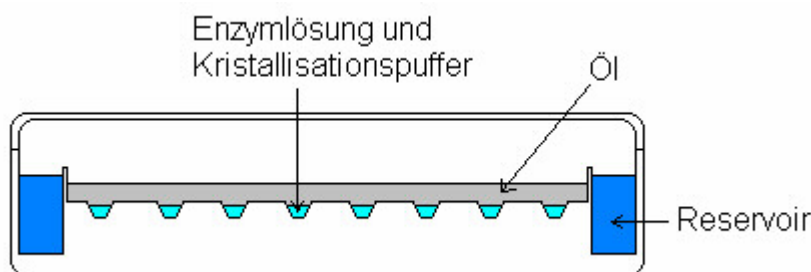


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Microbatch Kristallisation unter Öl

4.4 Kristallisation von Enzym und Ligand

Um das Bindungsverhalten von Enzym zu Substrat oder Kosubstrat zu analysieren war die Kristallisation von einem Enzym/Liganden-Komplex nötig. Dazu wurde entweder die Kokristallisationsmethode oder das „Soaken“ von gewachsenen Kristallen mit Ligand genutzt. Für die Kokristallisation wurde der Enzymlösung zwischen 1 und 5 mM Endkonzentration Ligand beigemischt. Diese Lösung wurde dann bei den verschiedenen Kristallisationsmethoden eingesetzt. Der Ligand kann teilweise ein flexibles Enzym stabilisieren und so die Kristallisation erst ermöglichen. Im Allgemeinen

liegt eine erfolgreiche Kokristallisationsbedingung in der Nähe von der ursprünglichen Kristallisationsbedingung.

Beim „Soaken“ von Kristallen wurden gewachsene Kristalle aus Ihrer Mutterlösung entfernt und in eine neue Lösung eingebracht. Die neue Lösung sollte im optimalen Fall die gleichen Bestandteile wie die Mutterlösung haben und zusätzlich den gesuchten Liganden. Eingesetzt wurden Ligandkonzentrationen zwischen 1 und 5 mM. Der Kristall verblieb zwischen 1 s und 8 h in dieser Lösung. Im Gegensatz zu niedermolekularen Kristallen haben kristallisierte Makromoleküle grosse Solventkanäle, durch die der Ligand in das aktive Zentrum des Enzyms vordringen kann und sich dort anlagert. Wurde der Kristall zu lange mit zu viel Ligand belastet, litt die Qualität der Kristalle sowie die erreichte Auflösung der Röntgenaufnahme darunter. Auch falsche Pufferkonzentrationen können den Kristall durch osmotischen Druck zerstören. Nur durch Austesten konnten die besten Bedingungen gefunden werden.

4.5 Unterscheidung eines Salzkristalls von einem Kristall eines Makromoleküls

Beim Einkonzentrieren der Mutterlösung konnte es passieren, dass die Löslichkeit der Salze überstiegen wurde. Dabei bildeten sich Kristalle, die optisch nicht von Makromolekül Kristallen zu unterscheiden sind. Um dennoch eine Unterscheidung treffen zu können, wurden verschiedene Methoden herangezogen. So wurden, wo möglich, mit denselben Puffern jedoch ohne Enzym Kontrollansätze produziert. Zeigten sich auch hier Kristalle konnte man davon ausgehen, dass es sich um Salzkristalle handelte. Ausserdem wurde ausgenutzt, dass Makromolekülkristalle grosse Solventkanäle beinhalten. Ähnlich wie beim „Soaken“ konnten dadurch Proteinkristalle mit einem Farbstoff beladen werden, während Salzkristalle farblos blieben. Dazu wurde IZIT Crystal Dye von Hampton Research verwendet. 0,1 bis 1 µl des Farbstoffes wurden direkt oder 1 zu 10 verdünnt auf den Kristalltropfen gegeben. Nach 1-4 h musste der Kristall sich stärker angefärbt haben als die Umgebung.

Ausserdem wurde der Bruchtest verwendet. Durch die Solventkanäle sind Makromolekülkristalle wesentlich fragiler als Salzkristalle. Bei dem Versuch einen Salzkristall zu zerbrechen, musste mehr Kraft eingesetzt werden. Beim Brechen gibt es ein hörbares Geräusch und eine glatte Bruchfläche. Ein Makromolekülkristall zerbricht dagegen sehr viel leichter und zerbröselt dabei in viele kleine Bruchstücke. Dies waren alles nur indizielle Vorversuche, wirkliche Gewissheit konnte nur eine Röntgenauf-

nahme liefern. Der Abstand der gemessenen Reflexe ist reziprok zu der Größe der Einheitszelle im Kristall. Daher sind bei den niedermolekularen Salzkristallen mit einer kleinen Einheitszelle nur wenige, versprengte Reflexe zu beobachten. Proteine hingegen zeigen ein charakteristisches, bogenförmiges Muster.

4.6 Einfrieren von Kristallen

Um Strahlungsschäden zu verringern und die Transportfähigkeit zu erhöhen, wurden die gefundenen Kristalle schockgefroren. Dazu wurden sie mit einer Nylonschlaufe passender Größe (0,1-0,3 μm , Hampton Research) aus ihrer Mutterlösung gefischt und für 1-2 s in eine der Mutterlösung entsprechenden Lösung mit zusätzlichem Kryoprotektanten gehalten. Als Kryoprotektant wurde 15-25 % (V/V) Glycerol verwendet. Anschliessend wurde der Kristall entweder in einem Bad aus flüssigem Stickstoff oder in einem Strom aus frischverdampftem Stickstoff (100 K) eingefroren. Während der Messung wurde der Kristall durch einen Strom aus verdampfendem Stickstoff im gefrorenen Zustand gehalten.

4.7 Messungen von Datensätzen

Datensätze wurde an verschiedenen Röntgenquellen gemessen. Die jeweilige Quelle ist bei der tabellarischen Zusammenfassung von Schlüsseldaten des jeweiligen Datensatzes angegeben. Alle Datensätze wurde bei 100 K aufgenommen. Ein erster Eindruck wurde durch die Messung eines einzelnen Bildes gewonnen, anhand dessen das Beugungslimit und damit der optimale Abstand zwischen Kristall und Detektor, der Abstand der einzelnen Reflexe (wichtig für den optimalen Oscillationswinkel) und die Intensität der Reflexe (zur Korrektur der Belichtungszeit) zu bestimmen. Kristalle mit Eisringen wurden verworfen. Der Kristall wurde auf den Röntgenstrahl fokussiert und zwischen 180 und 1440 Bilder während einer Drehung von $0,25\text{-}1^\circ$ aufgenommen. Auch wenn die Symmetrie des Kristalls nur Daten im Bereich von 90° nötig machte, wurden Daten über $180\text{-}360^\circ$ gesammelt um später durch Abgleich von mehrfach gemessenen Daten die Statistik zu verbessern. Die Belichtungszeit variierte je nach Qualität des Kristalls und Intensität der Röntgenquelle. Zur Vereinfachung des Prozessierens der Daten wurde die Belichtungszeit an die Gesamtstrahlendosis gekoppelt.

5 Verwendete Computerprogramme und webbasierte Anwendungen

5.1 Prozessierung der Röntgendiffraktionsbilder

Die Rohdaten der gemessenen Röntgendiffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (HKL-Suite, OTWINOWSKI UND MINOR, 1997) bearbeitet. Für schwierigere Fälle wurde das Programm XDS verwendet. Beides diente dazu zuerst den Kristall zu indizieren (Bestimmung von Kristallorientierung, Raumgruppe und Zellparametern), dann die beobachteten Reflexe zu integrieren und gleichzeitig die Kristall-, Strahlen- und Detektor- Parameter zu verfeinern um schliesslich die Daten in die gebräuchliche Form der Miller-Indices (hkl) zu skalieren, wobei die beobachteten Reflexe zu einem Datensatz zusammengefügt wurden. Aus den so zusammengefassten Intensitäten wurden dann mit TRUNCATE (CCP4, 1994) die Strukturfaktoramplituden berechnet. Mit UNIQUEIFY (CCP4, 1994) wurden je Datensatz etwa 1000 Reflexe ausgewählt und markiert, die später zur Berechnung des R_{free} -Wertes genutzt werden sollten, also bei der Berechnung der verwendeten Elektronendichtekarte nicht berücksichtigt werden durften.

5.2 Strukturlösung und Verfeinerung

Bei der Messung der Röntgenreflexe geht unweigerlich eine der drei Informationen einer Welle verloren. Die Phase ist nicht direkt experimentell bestimmbar. Um das Phasenproblem zu lösen wurde mit dem Programm EPMR (KISSINGER *et al.*, 1999) ein Molecular Replacement durchgeführt. Dabei wird versucht ein dem gesuchten Enzym ähnliches Modell in die gemessenen Daten zu legen und darüber die Phase unseres Experimentes zu bestimmen. Je höher die Sequenzidentität der Referenz zur Probe ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges. Ab 30-40 % Identität lohnt sich ein Versuch. Dabei wurde nicht nur die Phase ermittelt, sondern es konnte auch das Referenzmodell als Basis zur Strukturaufklärung genutzt werden. Die Aminosäuresequenz musste korrigiert und einige Loops neu gestaltet werden. Initial wurde das Model mit CNS einem Rigid Body Refinement unterzogen (BRÜNGER *et al.*, 1998). Besonders in Bereiche, in denen das Sequenzalignment Gaps in einem der beiden Enzyme zeigte, wurden Umbauten nötig. Diese Arbeiten wurden mit Xfit aus dem Xtalview-Package (MCREE, 1999) vorgenommen. Während dieser Arbeiten wurde immer wieder das Model und die Elektronendichtekarte mit Hilfe von REFMAC (MURSHUDOV *et al.*, 1997; WINN *et al.*, 2001) verfeinert.

5.3 Verschiedenes

Für multiple Sequenzvergleiche von DNA und Proteinen wurde ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/, THOMPSON *et al.*, 1994), für den direkten Vergleich zweier Sequenzen „BLAST 2 SEQUENCES“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, TATUSOVA UND MADDEN, 1999) verwendet.

Die Primer wurden unter Zuhilfenahme des „Oligonucleotide Properties Calculator“ (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) entwickelt.

Als wichtige Informationsquellen zu existierenden Strukturen wurde die wwPDB (worldwide Protein Data Bank, <http://www.wwpdb.org/>) und insbesondere für kohlenhydrataktive Enzyme der CAZy~ Carbohydrate-Active enZymes -Server (<http://www.cazy.org/CAZY/>, COUTINHO UND HENRISSAT, 1999) genutzt.

Zur Bildverarbeitung wurde von Rasmol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) und Pymol (DELANO, 2002) gebrauch gemacht.

Die verwendeten Liganden wurden für die Computerbearbeitung mit PRODRG (SCHUETTELKOPF UND VAN AALTEN, 2004) dargestellt.

IV Ergebnisse

1 Zur Reinigung und Kristallisation der Arbutin-Synthase (AS)

1.1 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA

Um ein Enzym auf verschiedene Substrate bzw. verschiedene Mutanten gegen das native Enzym zu testen ist es wichtig, das Enzym in gleich bleibender und möglichst reiner Form zu erhalten. Dazu wurde ein von HEFNER (2002) hergestellter *E. coli* M15-Klon, der den AS-pQE-2 Vektor beinhaltet, verwendet. Wie in Methoden 1.2 bzw. 1.3 beschrieben, wurde der Klon herangezogen und daraus der Proteinrohextrakt hergestellt. Dieser Rohextrakt wurde auf eine HisTrap HP 1 ml-Säule oder eine, mit Ni-NTA Superflow gefüllte, HR 10/10 Leersäule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine mit vereinzelt Oberflächen Histidinen wurden durch einen Waschschritt mit 20 mM Imidazol (entspricht 4,2 % Elutions-Puffer) entfernt. Da die AS trotz 6-fach His-tag`s nicht sehr stark am NI-NTA bindet, waren keine rigideren Waschbedingungen möglich. Anschliessend wurde mit 250 mM Imidazol (entspricht 100 % Elutions-Puffer) die AS von der Säule eluiert (Abbildung 7). Dabei konnten aus 10 l LB-Medium etwa 8 mg Enzym gewonnen werden.

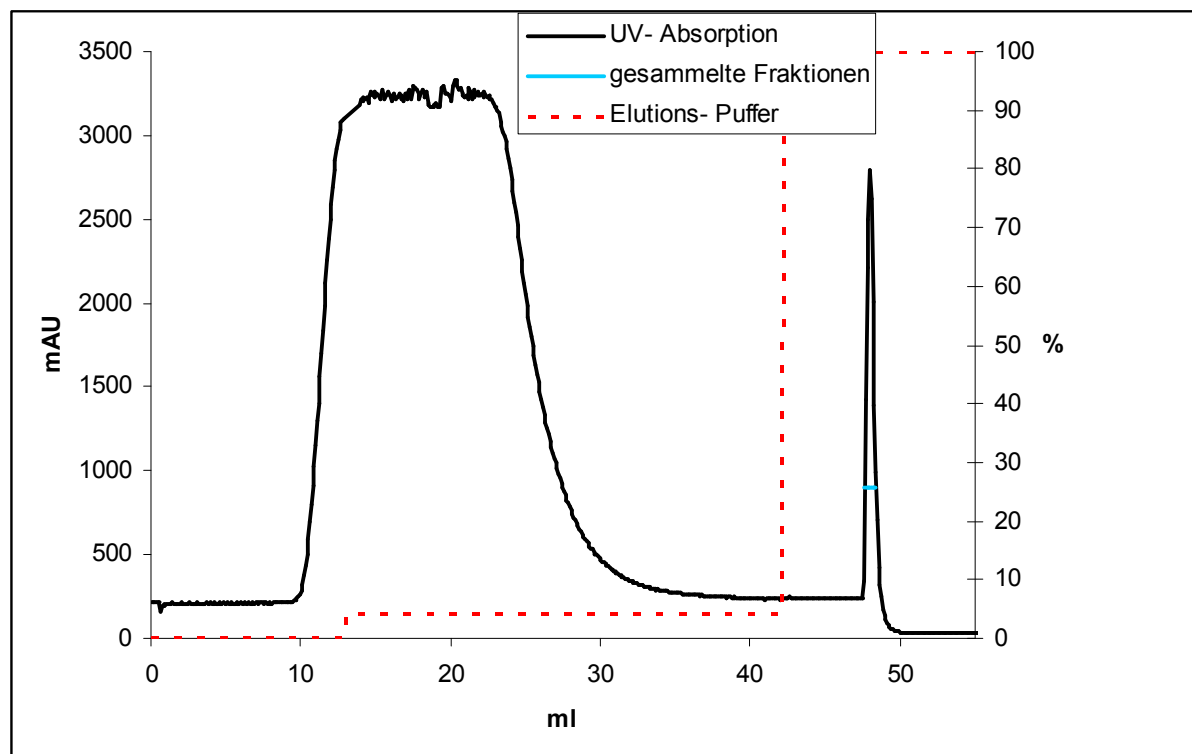


Abbildung 7: Reinigung der AS an Ni-NTA, Elutionsprofil

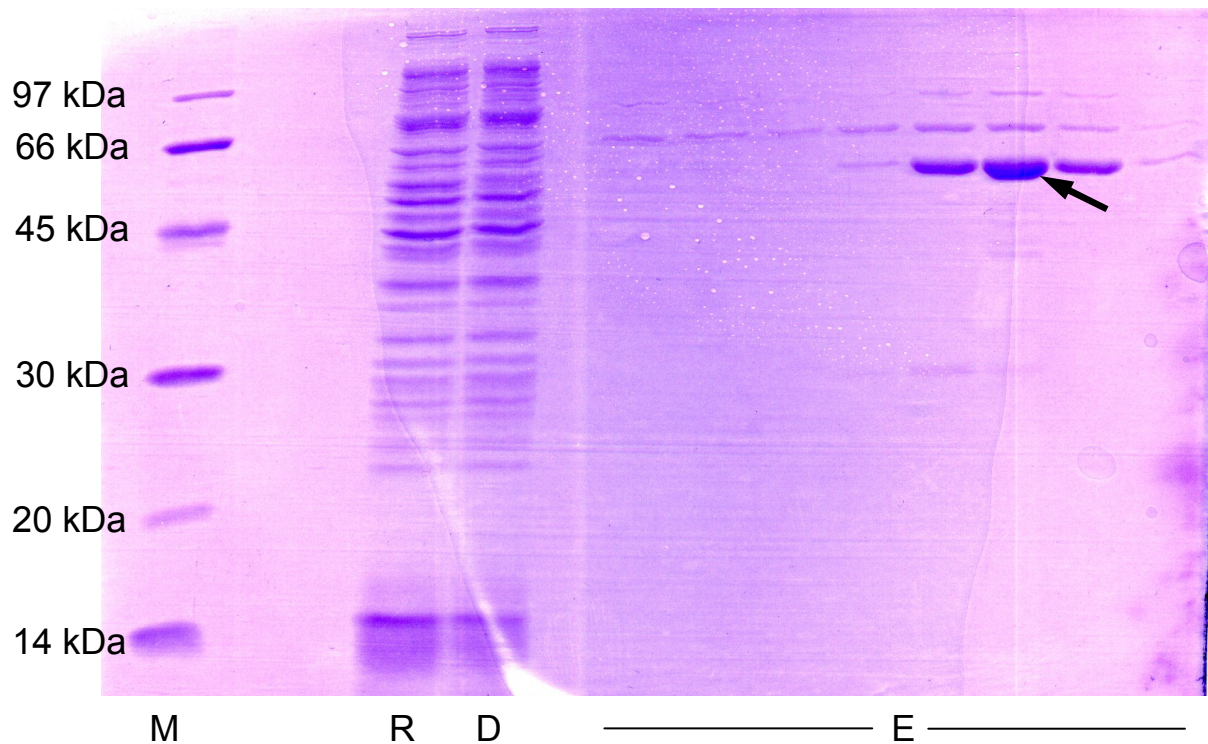


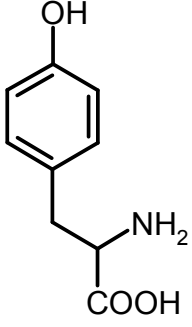
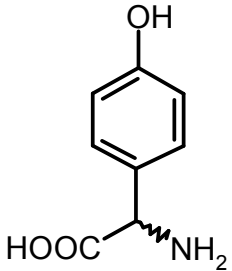
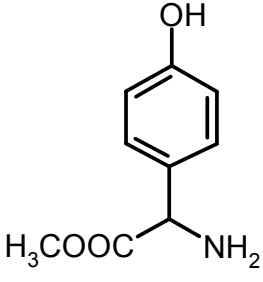
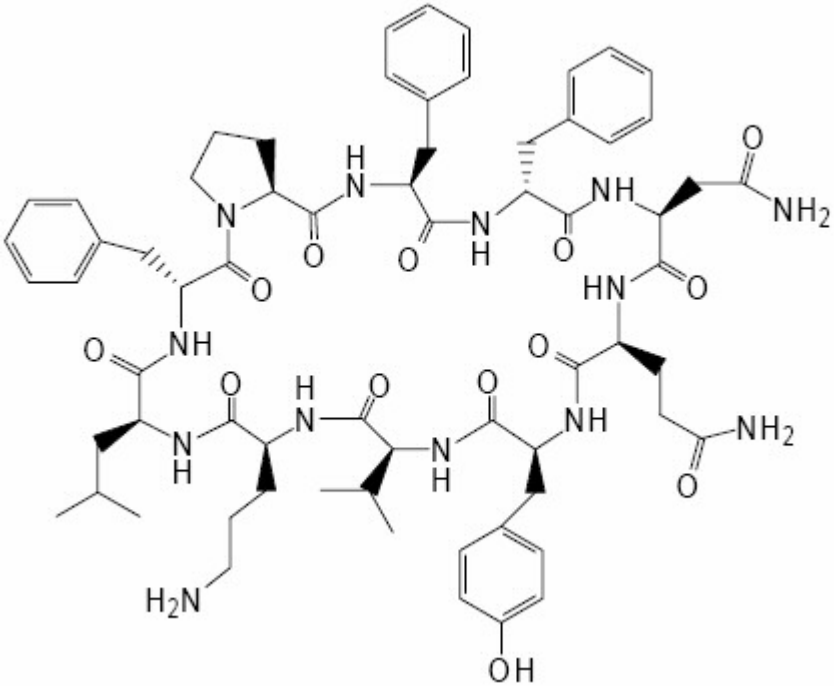
Abbildung 8: SDS-Gel einer Ni-NTA Reinigung der AS
 Der Pfeil zeigt die Banden der Arbutinsynthase, M-Markerproteine, R-Rohextrakt, D-Durchfluss, E-Eluierte Fraktionen.

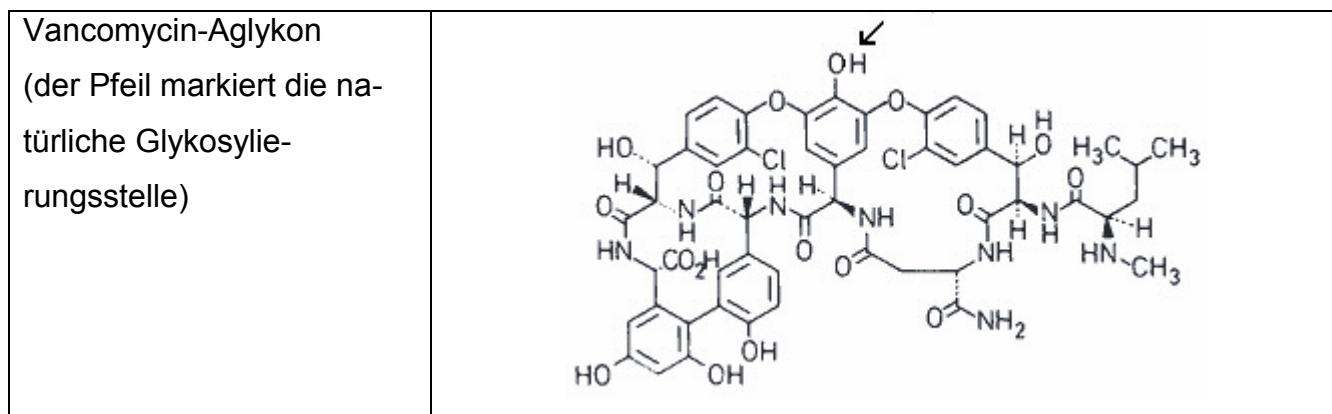
Wie in Abbildung 8 zu sehen gab es parallel zu dem Anstieg der Menge an AS einen Anstieg der Menge der Verunreinigungen. Da die Verunreinigungen jedoch nur einen kleinen Teil am Gesamtzym einnahmen und die Reinheit bei wiederholten Versuchen unverändert blieb, konnte das Enzym so für die Tests verwendet werden.

1.2 Testung verschiedener Substrate

Unter den 75 von HEFNER *et al.* (2002) getesteten Substanzen befand sich mit Tryptophan jedoch nur eine Aminosäure. Diese wurde nicht glykosyliert. Gerade mit Hinblick auf die Antibiotika-Klasse der Glykopeptide waren Aminosäuren jedoch von grossem Interesse. Anknüpfend an HEFNER's Experimenten wurden im Rahmen dieser Dissertation die Substanzen der Tabelle 11 getestet. Die Substanzen wurden hinsichtlich der Antibiotika-Klasse der Glykopeptide ausgewählt und haben dementsprechend alle einen Aminosäure-Charakter.

Tabelle 11: Auf AS-Aktivität getestete Substanzen

Bezeichnung	Struktur
L-Tyrosin	
D- und L-4-Hydroxy-Phenylglycin	
L-4-Hydroxy-Phenylglycinmethylester	
Tyrocidin A	



Die Substrate wurden in MeOH/H₂O (1:1) gelöst. Folgender Ansatz wurde benutzt:

Bestandteil	Volumen [µl]	Endkonzentration [mM]	Abs. Konzentration [µmol]
Testsubstanz (25 mM)	5,0	1,0	0,125
UDP-Glucose (25 mM)	10,0	2,0	0,250
Tris/HCl (1M, pH 7,5)	10,0	100,0	
Enzymlösung	Variabel		
Wasser	ad 100,0		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet, mit 300 µl MeOH abgestoppt und durch HPLC analysiert (siehe Methoden 2.1.1 für Hydrochinon, Vancomycin-Aglykon und Tyrocidin A, Methoden 2.1.2 für Tyrosin, D- und L-4-OH-Phenylglycin und der entsprechenden Methylester). Eine gleichermaßen zusammengesetzte Inkubationsmischung mit Hydrochinon zeigte in Gegenwart von 2 µg Enzym nach 30 min bei 50 °C einen Umsatz von etwa 40 %. Bei allen anderen Testsubstanzen konnte mit bis zu 800 µg und bis zu 4 h keine Enzymaktivität gemessen werden.

1.3 Mutationen der AS zur Stereospezifität

HEFNER *et al.* (2003) überprüfte durch ortsggerichtete Mutagenese, ob die Stereospezifität der AS durch den Austausch einzelner Aminosäuren umzukehren sei. Dazu mutierte er jeweils einzeln His360 zu Lys, Arg oder Glu und Glu368 zu Asp oder Ala. Die Stereospezifität des Enzyms wurde dadurch jedoch nicht verändert. Nur die Aktivität der Mutanten wurde drastisch gesenkt. Diese beiden Aminosäuren übertragen nach KAPTINOV UND YU (1999) in einer S_N2-Reaktion die Glucose. Nach der Reduzierung der Aktivität durch die Einzelmutationen wurde nun das Zusammenspiel der Aminosäuren bei einer doppelten Mutation überprüft. Histidin und Glutamat wurden zu

diesem Zweck jeweils getauscht. Dazu wurde das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Als Template für die geplante PCR diente das AS-His360Glu-pQE-2-Konstrukt (HEFNER *et al.*, 2003). Der folgende, die Mutation beinhaltende, Primer wurden entworfen.

Glu368His	
Peptidsequenz:	G W N S I L E S V V N
cDNA-Sequenz:	5`-GC GGG TGG AAC TCT ATT CTT GAG AGT GTA GTT AAT
	G V P
	GGG GTG CCG C -3`
	H
Primer E368H-for:	5`-GC GGG TGG AAC TCT ATT CTT cAc AGT GTA GTT AAT
	GGG GTG CCG C -3`
Primer E368H-rev:	5`- G CGG CAC CCC ATT AAC TAC ACT gTg AAG AAT AGA
	GTT CCA CCC GC -3`

Abbildung 9: Primer für die Mutation AS His360Glu,Glu368His

Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von dem gewählten „Forward“ (for) und „Reverse“ (rev) Primern, in denen die geänderten Nucleotide klein geschrieben sind.

Durch den Einsatz des bereits einfach mutierten Templates musste nur noch eine Mutation eingefügt werden. Folgender Ansatz sowie folgendes Zeitprogramm wurden dafür verwendet:

PCR-Reaktionsansätze:

AS-His360Glu -pQE-2 (10 ng/µl)	1µl
Primer (10 pM)	je 1 µl
10x Puffer	5 µl
dNTP`s (40mM)	1 µl
<i>Pfu</i> Turbo-	1µl
Polymerase (2,5 U/µl)	
H ₂ O	40 µl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,5	
60	1	20
68	7	
68	10	1

Nach erfolgter PCR wurde das Template durch Restriktionsverdau mit *DpnI* entfernt. *DpnI* hydrolysiert nur DNA aus einem *dam*⁺-Bakterienstamm, der Adenosin methyliert. Das Template stammte aus solch einem Stamm. Die für die PCR eingesetzten dNTP's waren nicht methyliert, so konnte selektiv das Template entfernt werden. *DpnI* ist in nahezu jedem Puffer aktiv und konnte nach der PCR direkt in das Reaktionsgemisch gegeben (1 μ l, 20 U) und für 1 h bei 37 °C inkubiert werden. Der Ansatz wurden anschliessend durch ein 1 %iges Agarosegel gereinigt. Mit dem Nucleo Spin Extract Kit wurde die DNA aus dem Gel extrahiert. Die Probe wurden anschliessend zur weiteren Vermehrung in Top10-Zellen transformiert (siehe Methoden 3.7.4, Transformation durch Hitzeschock). Daraus wurde die DNA mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit gewonnen. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde ein Teil zur Sequenzierung zu Genterprise (Mainz) geschickt, ein anderer Teil wurde zur Transformation in M15 genutzt. Das veränderte Protein konnte genau wie das Native in LB-Medium herangezogen, mit Ultraschall aufgeschlossen und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA gereinigt werden. Das so gereinigte Enzym wurde durch den selben Ansatz, der schon bei der Substrattestung verwendet wurde, mit dem nativen Enzym verglichen:

Bestandteil	Volumen [μl]	Endkonzentration [mM]	Abs. Konzentration [μmol]
Hydrochinon (25 mM)	5,0	1,0	0,125
UDP-Glucose (25 mM)	10,0	2,0	0,250
Tris/HCl (1M, pH 7,5)	10,0	100,0	
Enzymlösung	Variabel		
Wasser	ad 100,0		

Nach Analyse durch das HPLC-Programm für Hydrochinon (Methoden 2.1.1) konnte keinerlei Aktivität für Enzym Mengen bis 20 μ g bei 4 h, 50 °C detektiert werden. Die Umkehr der Stereospezifität konnte also nicht bestätigt werden.

1.4 Beginn der Kristallisation

Die grosse Breite der akzeptierten Substrate liefert eine gute Ausgangsposition um die Arbutin-Synthase zur Synthese der verschiedensten Stoffe einzusetzen. Jedoch werden, wie festgestellt wurde, einige wichtige Edukte für zum Beispiel Antibiotika

nicht akzeptiert. Um zu erkennen warum dies so ist und um eine Substratazeptanz durch gezielte Mutation herbeizuführen, sollte versucht werden durch Röntgenstrukturaufklärung die exakte Art der Bindung des Substrates in der AS zu ermitteln.

1.4.1 Abspalten des His-tags mit dem TAGZyme-System

Für die Reinigung durch Affinitätschromatographie wurde ein zusätzlicher Anhang von 6 Histidinen, ein sogenannter His-tag, benötigt. Dieser muss an der Oberfläche des Enzyms liegen und verändert damit diese und auch das Kristallisationsverhalten des Enzyms. Daher wurde die Kristallisation grundsätzlich mit und ohne His-tag getestet.

Das TAGZyme-System von Qiagen lieferte eine gängige Möglichkeit den His-tag abzuspalten. Dabei trennte die DAPase jeweils zwei Aminosäuren vom N-Terminus des Proteins ab, bis sie an einen Stopppunkt gelangte. Um das native Enzym zu erhalten ist im pQE-2-Vektor ein Glutamin direkt vor dem Startmethionin des Zielproteins vorgesehen. Durch einen Überschuss des Enzyms Qcyclase wurde dieses Glutamin zum Pyroglutamat zyklisiert, und kann so als Stopppunkt dienen. Abschliessend kann das Pyroglutamat durch die pGAPase abgespalten werden. Alle drei eingesetzten Enzyme besitzen selbst einen C-terminalen His-tag und können dadurch mit Ni-NTA chromatographisch entfernt werden. Um Zeit, Geld und Enzym zu sparen wurde auch der Verdau mit ausschliesslich der DAPase getestet. In diesem Fall diente Pro5 als interner Stopppunkt für den Verdau.

	a	MKHHHHHHHM	b	Q	c	MEH	d	TPHIA	e	MVPTPG	f	MGHL
						1		5		9		15
Rel. Aktivität		100%				100%	100%			3%		2%

Abbildung 10: N-Terminus der AS nach Expression im pQE-2-Vektor

Die zweite Reihe nennt die Position in der AS (a Translationsstart im pQE-2-Vektor, b Stop der DAPase mit Überschuss an Qcyclase, c nach Verdau mit pGAPase bzw. nativer Translationsstart, d Stop der DAPase mit P5 als internen Stopppunkt, e und f von HEFNER (2002) getestete alternative Translationsstarts).

Vor den jeweiligen Versuchen wurde das Enzym gegen 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM MSH, pH 6,8 (eingestellt mit NaOH) dialysiert. Bei dem Verdau mit Qcyclase wurde folgender Ansatz verwendet:

Erster Verdau:

AS-Lösung (Konzentration zwischen 0,3 und 5 mg/ml)	Je 1 mg
DAPase (10 U/ml)*	5 µl
Qcyclase (50 U/ml)	60 µl
Cysteamin (20 mM)*	5 µl

*DAPase musste vor der Reaktion mit Cysteamin aktiviert werden, 5 min RT

Der erste Verdau wurde 1 h bei 37 °C durchgeführt. Anschliessend wurde die DAPase und die Qcyclase durch Ni-NTA entfernt. Dafür wurde der gesamte Ansatz auf eine vorher mit Ni-NTA-Ladepuffer equilibrierte Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und mit einem Säulenvolumen Ni-NTA-Ladepuffer nachgewaschen. Die so gewonnene Lösung wurde direkt im zweiten Verdau mit pGAPase eingesetzt:

Zweiter Verdau:

AS-Lösung	Je 1 mg
pGAPase (25 U/ml)*	40 µl
Cysteamin (20 mM)*	40 µl

*pGAPase musste vor der Reaktion mit Cysteamin aktiviert werden, 5 min RT

Der zweite Verdau wurde über 90 min bei 37 °C durchgeführt und wieder durch das Abtrennen durch Ni-NTA beendet. Auch hier war AS im Durchfluss zu finden. Bei dieser Prozedur lag die Ausbeute in der Regel um 30 %, wahrscheinlich auf Grund von noch nicht vollständig abgespaltenem His-tag. Die Ausbeute konnte jedoch nicht durch im Überschuss eingesetztes Enzym oder längere Verdauungszeiten vergrößert werden.

Der Verdau mit ausschliesslich DAPase wurde ebenso angesetzt, nur ohne Qcyclase und ohne zweiten Verdau. Hier lag die Ausbeute bei bis zu 60 %. Die mit den in Abbildung 10 angegebenen Spaltpunkten a-d erhaltenen Enzymbruchstücke wurden auf Ihre Aktivität verglichen. Dazu wurde derselbe Ansatz wie zum Vergleich der Mutanten (Ergebnisse 1.3) verwendet. Alle Proben zeigten die gleiche Aktivität. Die Spaltstellen e und f wurden von HEFNER (2002) als mögliche Translationsbeginne der nativen AS getestet, sie wurden jedoch von Ihm verworfen, da sie nur 3 bzw 2 % relative Aktivität im Vergleich zu dem jetzt angenommenen Translationsstart hatten.

1.4.2 Abspalten des His-tags durch eine Endopeptidase

Um die Ausbeute beim Abspalten des His-tags zu erhöhen, wurde ein zweites System getestet. Der Blutgerinnungsfaktor X in seiner aktiven Form, Xa, ist eine Endopeptidase mit der selektiven Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg. In der Blutgerinnungskaskade ist er verantwortlich für die Aktivierung des Prothrombins zum Thrombin. Dieses Enzym ist käuflich erwerblich. Um es zu nutzen, musste zunächst die Erkennungssequenz codierende DNA-Sequenz vor dem Startmethionin der AS einkloniert werden. Dazu wurden folgende Primer entworfen:

AS-Xa	
Peptidsequenz:	M K H H H H H H H M Q / M
cDNA-Sequenz:	5`-ATG AAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT ATG CAG ATG
	E H T P H I A M V P
	GAG CAT ACA CCT CAC ATT GCT ATG GTG CCC-3`
	I E G R
Primer AS-Xa-for:	5`-ATT GAA GGG CGT /ATG
	GAG CAT ACA CCT CAC ATT GCT ATG GTG CCC -3`
Primer AS-Xa-rev:	5`-ACG CCC TTC AAT /CTG CAT ATG GTG ATG GTG ATG GTG
	ATG TTT CAT -3`

Abbildung 11: Primer um die Faktor Xa-Erkennungssequenz einzufügen

Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von dem gewählten „Forward“ (for) und „Reverse“ (rev) Primern. Der rote Schrägstrich kennzeichnet die Stelle, in der die Erkennungssequenz eingefügt wurde.

Mit diesen Primern und dem AS-pQE-2-Vektor als Template wurde folgende PCR durchgeführt:

PCR-Reaktionsansätze:

AS-pQE-2 (10 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
10 x Puffer	5 μl
dNTP`s (20mM)	2,5 μl
<i>Pfu</i> Turbo-	1 μl
Polymerase (2,5 U/μl)	
H ₂ O	39,5 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,5	
56	1	20
72	7	
72	10	1

Das Template wurde durch die *DpnI* Restriktionsendonuklease verdaut und der Ansatz über ein Agarosegel gereinigt. Dabei wurde ein Reaktionsprodukt in der passenden Grösse sichtbar. Die gereinigte DNA wurde in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert, darinnen vermehrt und anschliessend extrahiert. Zur Kontrolle wurde die DNA sequenziert. Das fehlerfreie DNA-Konstrukt wurde in *E. coli* M15-Zellen transformiert. Mit diesen Zellen sollte das mutierte Protein, wie schon das Native zuvor, produziert werden. Nach der bereits beschriebenen Anzucht und Reinigung mit Ni-NTA wurden jedoch aus 10 l LB-Medium nur 100 µg Enzym gewonnen. Es wurde daraufhin die IPTG-Konzentration während der Wachstumsphase auf 0,1 mM, 0,5 mM bzw. 1 mM erhöht, und erneut versucht mit Ni-NTA das Protein zu reinigen. Dennoch wurde keine höhere Ausbeute erreicht. Daher wurde mit dem zuerst beschriebenen TAGZyme-System weitergearbeitet.

1.4.3 Wasserdampfdiffusions-Experimente

In den Kristallisation Experimenten wurde sowohl AS mit His-tag als auch nach Abspalten des Histidinschwanzes eingesetzt. Tabelle 12 gibt die verwendeten käuflichen Kits an. Für die meisten Experimente wurden HTS Kristallisationsanlagen genutzt.

Tabelle 12: Zur Kristallisation der AS eingesetzte Kits
(^H nur mit His-tag getestet, ^L auch mit UDPG und MgCl₂ getestet)

Bezeichnung	Anzahl der Puffer	Getestete Temperaturen [°C]
Hampton Research Crystal Screen 1&2 ^L	100	4, 20, 25, 30
Hampton Research MembFac ^L	50	20
Hampton Research Index ^H	96	20
JBScreen Classics ampoules ^L	240	20
Emerald Biosystems Wizard Screen I + II ^H	96	20
Nextal The Classics ^H	96	20
Nextal Anion Suite ^H	96	20
Nextal Cation Suite ^H	96	20
Nextal MPD Suite ^H	96	4, 20, 30
Nextal PEGs ^H	96	20
Sigma Crystallization Basic Kit for Proteins & Crystallization Extension Kit for Proteins	100	4, 20

Unter den Kits befanden sich Sparse matrix Systeme (JANCARIK UND KIM, 1991), wie zum Beispiel Hampton Research Crystal Screen 1&2, die auf der Erfahrung von bereits kristallisierten Proteinen aufbauten. Außerdem wurden Grid Screens verwendet, die systematisch Salze oder organische Verbindungen einsetzen, um sich so an eine möglicherweise erfolgreiche Bedingung heranzutesten. Insgesamt wurden 1162 Puffer genutzt, die sich teilweise von Firma zu Firma überschneiden. Es wurden Enzymkonzentrationen von erst 8 mg/ml, später, als durchweg nur Präzipitat auftrat, von 4 mg/ml oder 1 mg/ml verwendet. Die Ansätze wurden die erste Woche täglich, dann einen Monat wöchentlich und anschliessend gelegentlich kontrolliert. Bei einigen Bedingungen wurden winzige kristalline Strukturen sichtbar. Nichts davon konnte jedoch reproduziert werden, obwohl Puffer und Enzym um den Erstfund im weiten Konzentrationsbereich variiert wurden.

Missglückte Kristallisation kann durch flexible Domänen im Enzym verursacht werden. Diese ordnen sich nicht regelmässig in ein Kristallgitter, sondern ergeben ein ungeordnetes, amorphes Präzipitat. In weiteren Versuchen wurde zu dem Enzym sein Cosubstrat UDPG gegeben. Dieser Ligand sollte das Enzym stabilisieren (UVERSKY *et al.*, 2002, QASBA *et al.*, 2005). Auch wurde Mg^{2+} als Additiv hinzugegeben. Von mehreren getesteten Metallen steigerte nur Mg^{2+} die Aktivität von AS (HEFNER *et al.*, 2002). Auf Grund dieses offensichtlichen Einflusses wurde es auch in der Kristallisation eingesetzt. Dazu wurde der Enzymlösung (4mg/ml His-tag-AS) 2,5 oder 10 mM UDPG bzw. 10 mM $MgCl_2$ zugefügt und die Lösung so zur Kristallisation eingesetzt. Dabei wurden die in Tabelle 12 gekennzeichneten Kits genutzt. Im direkten Vergleich mit der Enzymlösung ohne Additiv konnte keine Verbesserung erkannt werden, vielmehr förderten die Additive gerade bei Phosphat-Puffern die Bildung von Salzkristallen.

1.4.4 Microbatch unter Öl

Bei den vorigen Versuchen mit der Hanging- und Sitting-Drop-Methode zeigte sich oft besonders starkes Präzipitat an der Oberfläche des Tropfens bzw. an der Oberfläche von, manchmal versehentlich eingeschlossenen, Luftblasen. Als nächstes wurde also die Kristallisation unter Luftausschluss versucht werden. Im „Microbatch unter Öl“-Verfahren wurden Enzymlösung und Kristallisationspuffer durch eine Ölschicht in ihren Well pipettiert, wo sie vor Luft geschützt sind. Zum Übersichten wurden 6 ml eines 1:1 Gemisches aus Paraffin- und Silikonöl verwendet (Al's Oil

(D'ARCY *et al.*, 1996). 2 µl AS-Lösung (4mg/ml) wurden mit 2 µl Kristallisationspuffer gemischt. Dabei wurden Hampton Research Crystal Screen 1&2 eingesetzt. Parallel wurden 3 µl AS-Lösung (4mg/ml) mit 1,5 µl H₂O und 1,5 µl Kristallisationspuffer getestet. Wie erwartet bildete sich weniger schweres Präzipitat, dafür jedoch eine Haut aus denaturiertem Protein an der Grenzschicht Wasser/Öl. Zwei Kristalle wurden unter diesen Bedingungen gefunden. In beiden Fällen handelte es sich um Salz, wie die bei „Methoden 4.5“ genannten Tests zeigten.

1.5 Kristallisation von Teilen des Enzyms

Wie einzelne Domänen des Enzyms flexibel sein können, trifft das in noch stärkerem Masse auf die beiden Termini des Enzyms zu. Anstatt diese zu stabilisieren können sie auch gentechnisch entfernt werden. Da der Mechanismus der AS untersucht werden sollte musste die Aktivität beibehalten werden. Also musste der N-Terminus unberührt bleiben. Wie in Abbildung 4 sichtbar ist, hat HEFNER (2002) schon die Rolle des N-Terminus für die Aktivität des Enzyms gezeigt. Es wurde also der C-Terminus geändert. HUGHES UND HUGHES (1994) beschrieben eine 40 Aminosäuren grosse Konsensussequenz, die sie „plant secondary product glycosyltransferase“- (PSPG) Box nannten. Sie ist die Nucleotid-Zucker-Bindungsstelle in nicht nur pflanzlichen Glykosyltransferasen, sondern auch tierischer und bakterieller Glucuronosyltransferasen (VOGT UND JONES, 2000) und liegt im hinteren Viertel des Enzyms. Bei der Verkürzung der AS wurde die Sequenz hinter der PSPG-Box bei 382, 412 und 443 in drei etwa gleich grosse Stücke geteilt. Durch Punktmutation der DNA von einzelnen, für Aminosäuren codierenden, Triplets zu Stop-Codons wurde an diesen Stellen das Enzym verkürzt. Die dafür entworfenen Primer sind in Abbildung 5 dargestellt.

Tyr382Stop	
Peptidsequenz:	A W P L Y A E Q K M N A
cDNA-Sequenz:	5`-GCT TGG CCT CTT TAT GCA GAG CAA AAG ATG AAC GCC G -3`
	Stop
Pr. Y382Stop-for:	5`-GCT TGG CCT CTT TAA GCA GAG CAA AAG ATG AAC GCC G -3`
Pr. Y382Stop-rev:	5`- C GGC GTT CAT CTT TTG CTC TGC tTA AAG AGG CCA AGC-3`
Arg412Stop	
Peptidsequenz:	G E N G L I G R V E I A N
cDNA-Sequenz:	5`-GGT GAA AAT GGC TTG ATA GGC CGA GTC GAG ATC GCC AAT G-3`
	Stop
Pr. R412Stop-for:	5`-GGT GAA AAT GGC TTG ATA GGC taA GTC GAG ATC GCC AAT G-3`
Pr. R412Stop-rev:	5`-C ATT GGC GAT CTC GAC Tta GCC TAT CAA GCC ATT TTC ACC-3`
Ser443Stop	
Peptidsequenz:	L K D A A S R A L S D D
cDNA-Sequenz:	5`- C CTA AAA GAT GCG GCA TCG AGG GCG CTA AGT GAT GAC GG -3`
	Stop
Pr. S443Stop-for:	5`- C CTA AAA GAT GCG GCA Taa AGG GCG CTA AGT GAT GAC GG -3`
Pr. S443Stop-rev:	5`-CC GTC ATC ACT TAG CGC CCT tta TGC CGC ATC TTT TAG G -3`

Abbildung 12: Primer zur Verkürzung des C-Terminus der Arbutin-Synthase

Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von dem gewählten „Forward“ (for) und „Reverse“ (rev) Primern, in denen die geänderten Nucleotide klein geschrieben sind.

Mit diesen Primern und dem AS-pQE-2-Konstrukt als Template wurde folgende PCR durchgeführt:

PCR-Reaktionsansätze:

AS-pQE-2 (10 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
10x Puffer	5 μl
dNTP`s (40mM)	1 μl
<i>Pfu</i> Turbo-	1 μl
Polymerase (2,5 U/μl)	
H ₂ O	40 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,5	
60	1	20
68	7	
68	10	1

Wie bei den letzten Mutationen wurde das Template mit *DpnI* verdaut, der Ansatz durch ein Agarosegel gereinigt, daraus extrahiert, in *E. coli* TOP10-Zellen transfor-

miert, daraus extrahiert, sequenziert und in *E. coli* M15-Zellen transformiert. Darin konnten alle drei Enzyme, unter denselben Bedingungen wie das native Enzym, exprimiert werden. Die Expressionsrate war bei allen drei Mutanten geringer als beim nativen Enzym. Aus 1,5 l LB-Medium konnten 900 µg AS-Tyr382Stop, 375 µg AS-Arg412Stop und 425 µg AS-Ser443Stop gereinigt werden.

Wie die letzten Mutationen wurden auch diese auf Ihre Aktivität getestet. Dabei wurde der Ansatz aus Ergebnisse 1.3 verwendet. Es wurden bis zu 10 µg Enzym eingesetzt, 30 min bei 50 °C inkubiert und durch HPLC analysiert. Keine der drei Mutanten zeigte dabei Aktivität. Daher wurde die Idee, Teile der AS zu kristallisieren, verworfen.

1.6 Veränderungen der Oberfläche von AS durch Punktmutation

Um speziell einzelne ungeordnete Loops im Enzym zu finden, wurde DisEMBL, ein webbasiertes Programm, genutzt (<http://dis.embl.de/>, LINDING *et al.*, 2003). Dabei wird davon ausgegangen, dass Sekundärstrukturmotive nicht ungeordnet sein können. In den Bereichen des Proteins, die nicht zu Sekundärstrukturen gehören, werden durch Vergleiche mit in der PDB gespeicherten Daten Teilsequenzen ermittelt mit hohem kristallographischen B-Faktor. Der B-Faktor, oder Temperaturfaktor, gibt bei einer kristallographisch ermittelten Struktur die Beweglichkeit jedes einzelnen Atoms an, und ist damit ein gutes Mass für ungeordnete Strukturen. Das Programm DisEMBL gab 5 mögliche ungeordnete Loops an (Hotloops Abbildung 13).

```
HOTLOOPS 1-16, 86-94, 401-411, 418-432, 444-453
MEHTPHIAMV PTPGMGhlip lvefakrlvl rhnfgvtfii ptdgplpkaq ksflaldapag
vnyvllppvs fddlpadvri etricLTITR SLPFvrdavk tllattklaa lvvdlfgtda fdvai-
efkvs pyifypttam clslffhlpk ldqmvscyr dvpeplqipg cipihgkdf1 dpaqdrknda
ykcllhqakr yrlaegimvn tfndlepppl kalqeedqgk ppvypigpli radssskvdd
ceclkwlddq prgsvlfisf gsggavshnq fielalglem seqrflwvvr spndkianat yf-
siqnqnda laylpegfle rtkgrcllvv swapqteils hgstggflth cgwnsilesv vngvpli-
awp lyaeqkmnav mlteglkval RPKAGENGLI GrveianAVK GLMEGEEGKK FRstmkdlkd
aasRALSDDG SSTkalaela ckwenkisst
```

Abbildung 13: DisEMBL-Vorhersage für ungeordnete Loops in der AS
Die ungeordneten Loops sind **fett und rot** dargestellt.

Ausser durch ungeordnete Regionen kann die Kristallisation auch durch ungünstige Oberflächenstrukturen behindert werden (DEREWENDA, 2004). Bei der Kristallisation von Makromolekülen kommen drei thermodynamische Grössen zum Einsatz. Zuerst

der Gewinn an Enthalpie durch den neuen intermolekularen Kontakt. Dabei handelt es sich jedoch um relativ kleine Werte, die Kristallkontakte von Makromolekülen sind relativ schwach. Hinzu kommt ein Gewinn an Entropie der freigesetzten Wassermoleküle. Wo erst Wassermoleküle an Seitenketten gebunden waren, bindet nach der Kristallisation ein anderes Makromolekül. Dadurch werden die Wassermoleküle freigesetzt und gewinnen an Entropie. Dies kann eine treibende Kraft für die Kristallisation sein (VEKILOV, 2003). Dagegen steht ein Verlust an Entropie bei der Ordnung von langen Seitenketten, der die Kristallisation verhindern kann. DEREWENDA (2004) spricht dabei von einem Entropie-Schild und zeigt einige Beispiele, in denen Glutamat und Lysin ersetzt wurden, was zu einer verbesserten Kristallisation führte. Dabei wurden beide Aminosäuren meist durch Alanin ersetzt, was gleichzeitig zu einer verringerten Löslichkeit des Enzyms führte. Da die AS schon bei 1 mg/ml in allen Kristallisationsansätzen Präzipitat zeigt, wurde nicht Alanin zum Austausch gewählt. Stattdessen wurde Glutamat mit Serin und Lysin mit Asparagin, beides kurze hydrophile Aminosäuren, substituiert.

In einer der fünf Hotloops (418-432) wurden zwei Glutamate (426, 427) und zwei Lysine (429, 430) als Ziele zur Mutation ausgemacht. Gerade das gehäufte Auftreten von vier ungünstigen in fünf Aminosäuren machte diese Stelle interessant und ermöglichte den Austausch aller vier durch eine PCR. Dazu wurde folgender Primer entwickelt:

AS-2S2N	
Peptidsequenz:	422 L M E G E E G K K F
cDNA-Sequenz:	5`- C TTA ATG GAG GGA GAG GAA GGA AAG AAG TTC R S T M CGC AGC ACA ATG-3`
Primer AS-2S2N-for:	5`- C TTA ATG GAG GGA agc agc GGA AAc AAC TTC CGC AGC ACA ATG-3`
Primer AS-2S2N-rev:	5`-CAT TGT GCT GCG GAA gTT gTT TCC gct gct TCC CTC CAT TAA G -3`

Abbildung 14: Primer für die gleichzeitige Mutation der Aminosäuren Glu426Ser, Glu427Ser, Lys429Asn, Lys430Asn

Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von den gewählten „Forward“ (for) und „Reverse“ (rev) Primern, in denen die geänderten Nucleotide klein geschrieben sind.

Mit diesem Primer und dem AS-pQE-2-Konstrukt als Template wurden folgende Ansätze bei nebenstehendem Programm verwendet:

PCR-Reaktionsansätze:

AS-pQE-2 (10 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
5 x Puffer	10 μl
dNTP`s (10mM)	2,5 μl
Phusion-	1 μl
Polymerase (2 U/μl)	
H ₂ O	34,5 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,33	
53	1	25
72	3,5	
72	10	1

Dabei kam eine neue Polymerase, Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) zum Einsatz, die eine höhere Effizienz und eine höhere Lesegenauigkeit besass. Leider baute sie gelegentlich mehrfach hintereinander den Primer ein. Nach dem üblichen Verdau mit *DpnI*, dem Reinigen über ein Agarosegel mit anschließender Extraktion und Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen musste ein Klon mit korrekt eingebautem Primer gefunden werden. Dazu wurde eine Test-PCR mit mehreren TOP10-Kolonien durchgeführt. Es wurden Übernachtskulturen von sieben Kolonien herangezogen. In folgendem Ansatz mit nebenstehendem Programm wurden diese direkt als Template verwendet. Das AS-Gen wurde von HEFNER (2002) mit den Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Sac* II in den pQE-2-Vektor inkloniert. Dieselben Primer wurden nun für die Test-PCR verwendet.

PCR-Reaktionsansätze:

Übernachtskultur 1-7	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
5 x Puffer	10 μl
dNTP`s (10mM)	2,5 μl
Phusion-	1 μl
Polymerase (2 U/μl)	
H ₂ O	34,5 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,33	
56	1	25
72	3,5	
72	10	1

Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz durch ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 15). Durch Vergleich-PCR's mit unmutiertem AS-pQE-2-Vektor konnten darauf Kolonien ausgewählt werden, deren DNA zum Sequenzieren gegeben wurde.

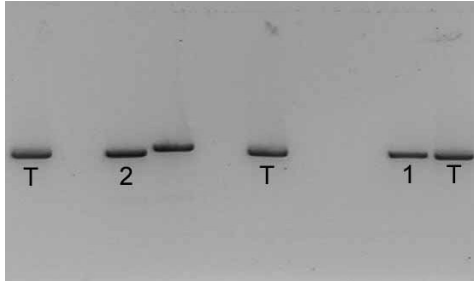


Abbildung 15: Agarosegel nach Test-PCR der AS-2S2N-Mutante (T Vergleich mit AS-pQE-2-Vektor, 1 und 2 gewählte Kolonien)

Nicht alle Reaktionen lieferten ein Produkt, wahrscheinlich durch den direkten Einsatz von Kulturmedium mit Verunreinigungen und DNA im unbekanntem Massstab. Aber beide zur Sequenzierung gegebenen Proben beinhalteten die korrekte Sequenz. Die DNA der Kolonie 1 wurde in M15-Zellen transformiert, mit denen das Protein auf dieselbe Weise herangezogen und gereinigt werden konnte, wie die native AS. Das gereinigte Protein wurde zur Kristallisation im Hanging Drop Verfahren mit den Kits Hampton Research Crystal Screen 1&2 eingesetzt. Beim direkten Vergleich mit ebenso angesetzter nativer AS zeigte sich kein Unterschied, also auch keine Kristallisation

1.7 Veränderung der Oberfläche von AS durch reduktive Methylierung

Einen Schritt weg von der Überlegung der ungeordneten Bereiche eines Enzyms mehr hin zu der Idee des „Entropie-Schildes“ und der störenden langkettigen, hydrophilen Seitenketten bringt uns die Methode der reduktiven Methylierung von Lysinen. Bei dieser Methode werden alle primären Amine durch Formaldehyd/Dimethylaminoboran (DMAB) methyliert bzw. in zwei Schritten dimethyliert. Für Proteine trifft das für den N-Terminus und alle dem Solvens zugänglichen Lysine zu. Es wird vermutet, dass so die Lysin-Seitenketten hydrophober werden, weniger mit dem Solvens interagieren und sich bereits vor der Kristallisation ordnen (SCHUBOT UND WAUGH, 2004). Dadurch wäre der „Entropie-Schild“ der zuordnenden Seitenketten geschwächt und die Kristallisation erleichtert.

Eingesetzt wurde Enzymlösung, die zuvor durch IMAC gereinigt wurde. Diese Lösung wurde über Nacht gegen 5 l 50 mM NaP_i pH 7,0 dialysiert. Generell waren auch andere Puffer möglich, jedoch sollten sie einen neutralen pH und keine freien Hydro-

xyl-Gruppen besitzen oder Amine enthalten, da sie mit dem Formaldehyd/DMAB interagiert hätten. Also konnte auch kein MSH oder DTT zum Schutz der Cysteine eingesetzt werden. Nach der Dialyse wurde das Protein auf 5 mg/ml konzentriert. Es wurden folgende Lösungen vorbereitet:

- Lösung A: 1 M DMAB in 50 mM NaP_i pH 7,0
 Lösung B: 1 M Formaldehyd in 50 mM NaP_i pH 7,0
 Lösung C: 1 M Ammoniumsulfat in 50 mM NaP_i pH 7,0

Alle folgenden Schritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt.

1. Je 1 ml Enzymlösung wurden 20 µl Lösung A hinzugegeben, die Lösung kurz gemischt und sofort anschliessend wurden je 1 ml Enzymlösung 40 µl Lösung B hinzugegeben. Es wurde 2 h auf Eis inkubiert.
2. Schritt 1. wurde wiederholt.
3. Je 1 ml Enzymlösung wurden 10 µl Lösung A hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
4. Je 1 ml Enzymlösung wurden 100 µl Lösung C hinzugegeben um das restliche Formaldehyd zu binden. Dafür wurde 1 h bei 4 °C inkubiert.
5. Die Reaktion war abgeschlossen und die verbrauchten Reagenzien konnten durch zweifache Dialyse gegen einen beliebigen Puffer entfernt werden. Jetzt konnte auch wieder MSH eingesetzt werden. In diesem Fall wurde 10 mM Tris pH 7.5, 20 mM MSH gewählt.

Während der Methylierung bildete sich deutlich amorphes Präzipitat. Nach dem Pufferwechsel löste sich dieses jedoch vollständig auf.

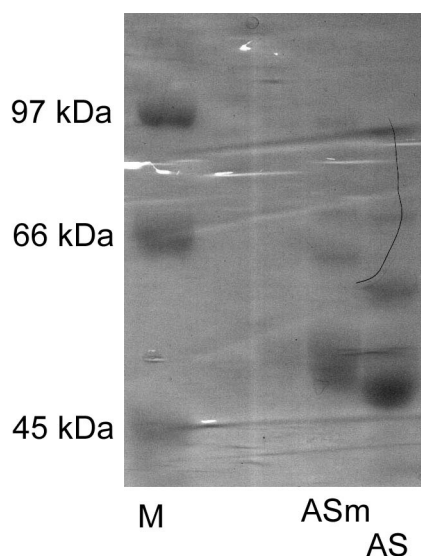


Abbildung 16: Vergleich der AS vor und nach Methylierung M-Markerproteine mit Grössenangaben an der Seite, ASm-Methylierte AS, AS-AS nach Ni-NTA.

Die Reaktion wurde durch eine SDS-PAGE kontrolliert. Auf dem Gel konnte sehr gut die Vergrößerung der AS durch die Methylierung beobachtet werden.

Das methylierte Enzym wurde zur Kristallisation eingesetzt. Dabei wurden die Kits Hampton Research Crystal Screen 1&2 mit der Hanging-Drop Methode benutzt. Es wurden 2 µl einer 2 bzw. 4 mg/ml AS-Lösung mit 2 µl Puffer gemischt und gegen 1 ml Reservoir equilibriert. Verglichen mit dem nativen, nicht methylierten Enzym war keine Verbesserung erkennbar, es war eher stärkeres Präzipitat zu beobachten.

1.8 Vergleich von verschiedenen Metallionen in der IMAC

Auf allen SDS-Gelen konnten bisher verschiedene, immer wiederkehrende Verunreinigungen gesichtet werden. Diese wurden bisher ignoriert, da sie nur in geringen Konzentrationen vorkamen und allgemein angenommen wurde, dass unter Verunreinigungen nur die Auflösung von Kristallen leidet, nicht unbedingt das Kristallwachstum. Es gibt auch Beispiele, in denen Kristallisation zur Reinigung von Makromolekülen verwendet wurde (JAKOBY *et al.*, 1971, JUDGE *et al.*, 1995). Nach den bisherigen Fehlschlägen wurden nun jedoch die Verunreinigungen als Ursache betrachtet und versucht ein Reinigungsprotokoll zu erstellen, das eine homogene Proteinlösung gewährleistet.

Dazu sollte zuerst der erste Reinigungsschritt, IMAC, ausgereizt werden. Im Gegensatz zur SG bindet AS wesentlich schwächer an Ni-NTA. Bei mehr als 20 mM Imidazol ist AS im Durchfluss zu finden. SG bindet bei 50 mM noch an Ni-NTA. Das so nach dem Waschen erhaltene Protein ist wesentlich reiner, als das für AS der Fall ist. IMAC kann auch mit anderen Ionen als Ni²⁺ betrieben werden. Alle Ionen zeigen unterschiedliche Bindungseigenschaften (SULKOWSKI, 1985). Es wurde nun ein Ion mit einer eventuell günstigeren Bindung gesucht. Dafür wurde das Ni-NTA-Material nach Anleitung (The QIAexpressionist™, Seite 109) regeneriert. Bei dieser Prozedur wird durch EDTA das Ni²⁺ vom Material gelöst, und neues geladen. Um andere Ionen zu testen wurde das NiSO₄ dabei durch CoCl₂, ZnSO₄ bzw. CuSO₄ ersetzt. 2 ml des so gewonnenen Säulenmaterials wurden jeweils mit der gleichen Menge eines Standardaufschlusses (Methoden 1.3, enthält 10 mM Imidazol) aus 10 l LB-Mediums geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschliessend wurde die Säule mit jeweils 10 ml 20, 30, 40, 50 und 250 mM Imidazol in 300 mM NaCl, 20 mM MSH, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 gewaschen. Für die Co²⁺-Reinigung musste auf MSH verzichtet werden, da es das Metall reduzierte und es präzipitierte. Bei jedem neuen Schritt

wurde das erste Säulenvolumen Eluat verworfen und anschliessend 1 ml Probe gezogen. Die gesammelten Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Proben der mit Zn^{2+} und Cu^{2+} durchgeführten Reinigung zeigten keine Proteinbanden bei den einzelnen Reinigungsschritten. Jedoch im Durchfluss befand sich eine starke Bande auf der erwarteten Höhe der AS (ohne Abbildung). Es schien kein Protein an diesen Metallionen gebunden zu haben. Die Proben der Ni-NTA und Co-NTA Reinigung sind in Abbildung 17 dargestellt.

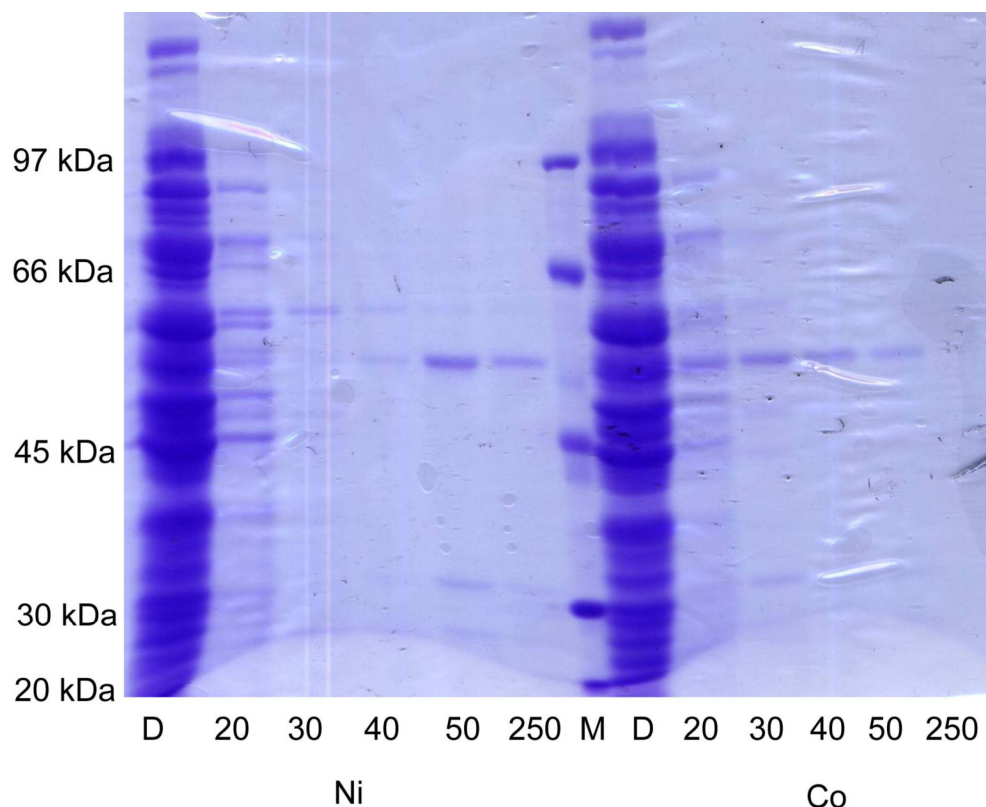


Abbildung 17: Vergleich von verschiedenen Metallionen im IMAC-Verfahren
 Links die Proben mit Ni-NTA, rechts Proben der Reinigung mit Co-NTA,
 M-Markerproteine mit Grössenangabe an der Seite, D-Durchfluss, 20, 30, 40, 50, 250-
 Elutionsschritte mit entsprechend viel mM Imidazol.

Bei der Ni-NTA Reinigung sah man deutlich die AS Bande bei 52 kDa. Das Maximum der Elution lag bei 50 mM Imidazol. Allerdings wurden auch bei niedrigeren Imidazol-Konzentrationen schon Anteile des Proteins eluiert. Eine Verunreinigung bei ~60 kDa wird zu grossen Teilen bereits vor 50 mM Imidazol eluiert, jedoch auch in spätere Fraktionen verschleppt. Eine zweite Verunreinigung bei ~30 kDa hatte ihr Elutionsmaximum auch bei 50 mM Imidazol. Diese beiden Verunreinigungen wurden bereits früher beobachtet, und können durch IMAC mit Ni-NTA nicht entfernt werden. Bei der Co-NTA Reinigung band AS wesentlich schwächer als bei der Ni-NTA Reinigung. Bereits bei 20 mM Imidazol wurde zusammen mit vielen anderen Proteinen ein Teil

des Proteins eluiert. Bei höheren Imidazol Konzentrationen konnte immer noch AS gefunden werden, jedoch auch mit der Verunreinigung bei ~30 kDa. Bei 50 mM Imidazol lag die reinste Fraktion, jedoch auch mit einer sehr geringen Ausbeute. Auf Grund der geringen Ausbeute und der schlechten Handhabbarkeit des Kobalts wurde die Reinigung mit Ni-NTA fortgesetzt.

1.9 Reinigung durch Gelfiltration

Da die regelmässig gefundenen Verunreinigungen deutliche Grössenunterschiede zur Arbutin-Synthase aufwiesen, wurde die Gelfiltration als Trennsystem getestet. Nach einer Ni-NTA- Reinigung wurde das Protein gegen 300 mM NaCl, 20 mM MSH, 50 mM Tris pH7,5 dialysiert. Eine Sephacryl S-100 HR 26/60 Säule wurde mit demselben Puffer äquilibriert. Das Protein wurde konzentriert auf 1 ml mit 8 mg/ml. Das gesamte Protein wurde auf die Säule geladen und bei einer Flussrate von 1,6 ml/min getrennt. Nach dem bekannten Totvolumen von 100 ml wurden 2 ml Fraktionen aufgefangen. Auf die gleiche Weise wurde die Säule mit einem Gemisch der Markerproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin aus Hühnerei (45 kDa) und α -Chymotrypsin (25 kDa) kalibriert.

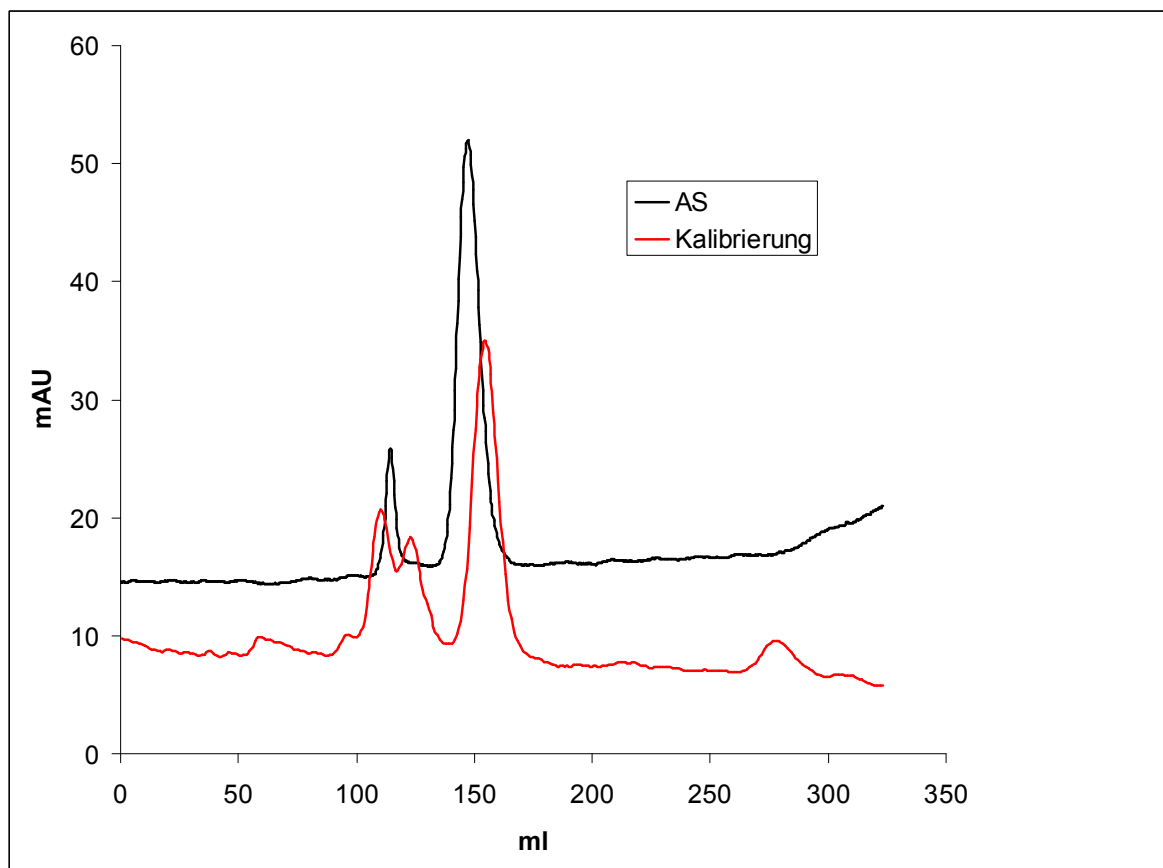


Abbildung 18: Elutionsprofil der Sephacryl S-100 HR 26/60 Säule
In rot der Kalibrierungslauf mit Markerproteinen der Grösse 66, 45 und 25 kDa.

Die Fraktionen im Bereich der UV-Absorptionsmaxima wurden durch SDS-PAGE analysiert. Dabei erkannte man, dass der Peak bei 115 ml recht sauber aus der ~60 kDa-Verunreinigung bestand. Auch im Vergleich mit dem Kalibrierungslauf wurde diese Grösse bestätigt. Der zweite und Hauptpeak hatte im Vergleich mit den Kalibrierungsproteinen eine Grösse von ~30 kDa. Auf dem SDS-Gel jedoch konnten zwei Banden beobachtet werden: eine mit ~52 kDa, entsprechend der AS, und eine bei ~32 kDa entsprechend der zweiten Verunreinigung, die bisher auch gefunden wurde. Beide lagen im Verhältnis 1:1 vor. Ein weiterer Reinigungsschritt war nötig.

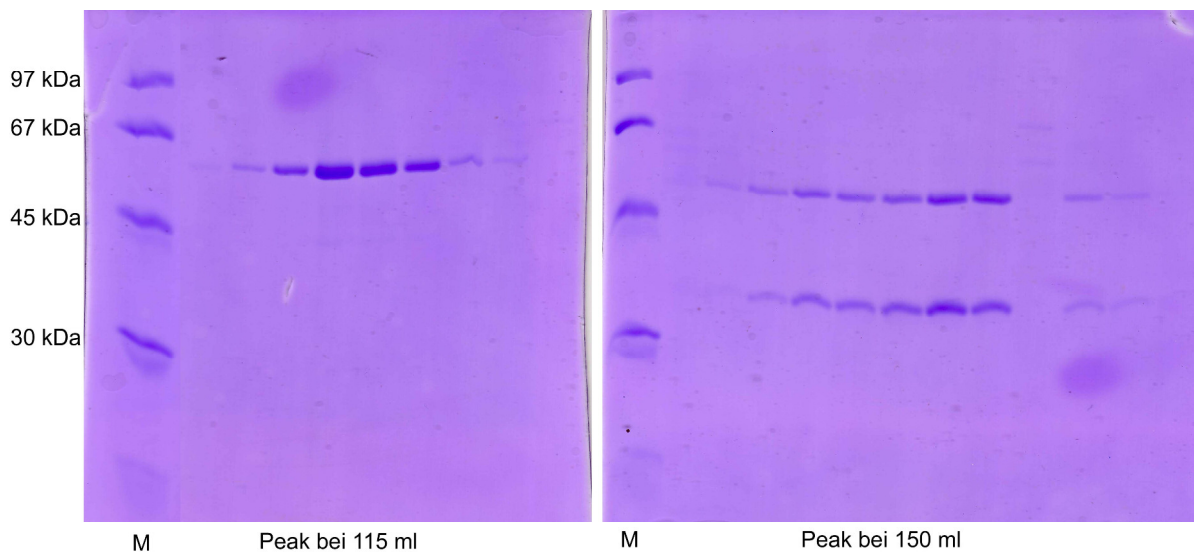


Abbildung 19: SDS-Gel der Peaks während der Gelfiltration
M: Markerproteine mit Grössenangabe an der Seite, Links: Fraktionen des Peaks um 115 ml, Rechts: Fraktionen des Peaks um 150 ml.

1.10 Anionenaustauscher-Chromatographie

Auf Grund der guten Erfahrung bei der Reinigung der SG wurde als weiteres Trennprinzip die Anionenaustauscher-Chromatographie an MonoQ gewählt. Die Fraktionen, die auf dem SDS-Gel nach der Gelfiltration AS Banden zeigten, wurden vereinigt und gegen 10 mM Tris pH 7,5, 20 mM MSH dialysiert. Mit diesem Puffer wurde auch die MonoQ HR16/10 Säule äquillibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Bei diesem pH-Wert wurden eventuell nicht bindende Proteine mit 2 CV Puffer von der Säule gewaschen. Das Chromatogramm zeigte jedoch keine Proteine an. Anschliessend wurde die Elution gestartet. Dazu wurde über 30 min ein Gradient von 0 – 500 mM KCl in 10 mM Tris pH 7,5, 20 mM MSH gefahren. Währenddessen wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen. Der Gradient war im Chromatogramm an der Leitfähigkeitskurve direkt zu er-

kennen. Die UV-Absorption zeigte einen Hauptpeak bei etwa 14 mS/cm, das entspricht etwa 150 mM KCl.

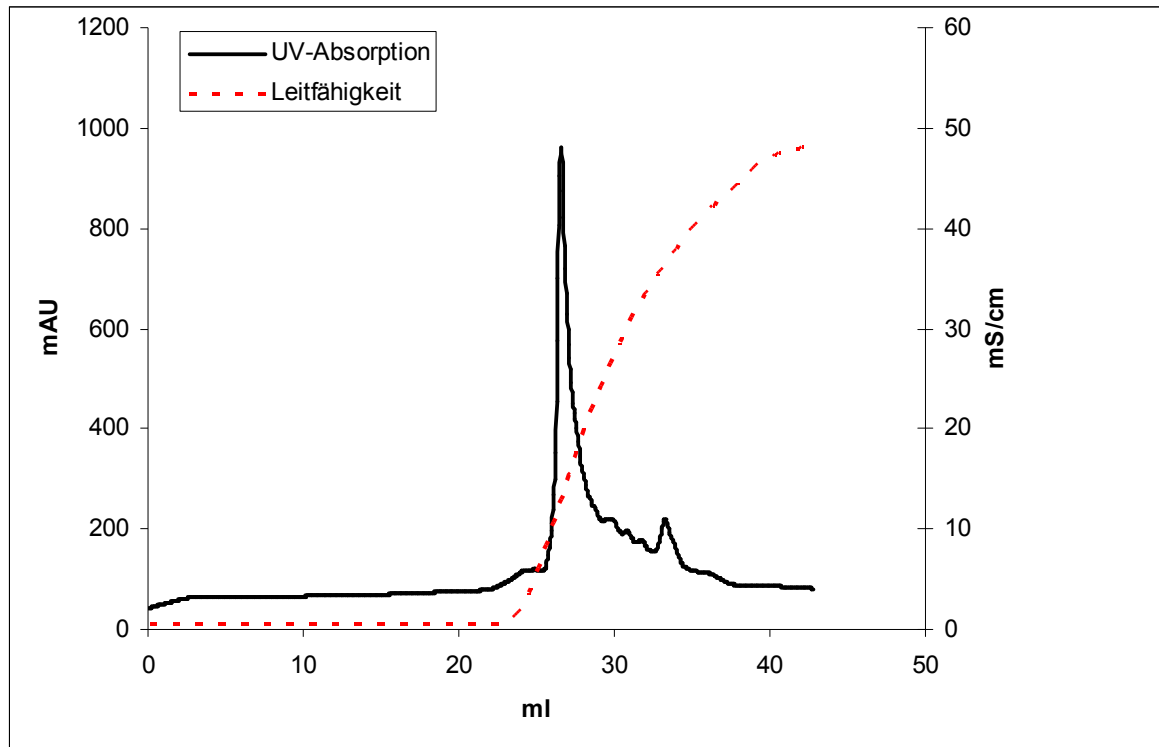
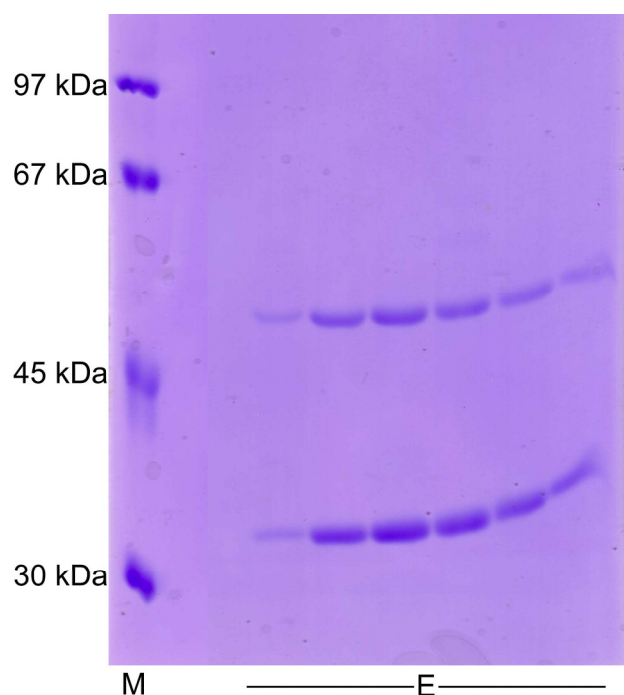


Abbildung 20: Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie, MonoQ

Die rote, gestrichelte Linie gibt die Leitfähigkeit und damit indirekt die Konzentration des KCl's während der Elution an. Die schwarze durchgezogene Linie zeigt die UV-Absorption bei 280 nm, die Proportional zur Enzymkonzentration steigt.

Die Fraktionen während der Elution dieses Peaks wurden durch SDS-PAGE analysiert. Das Gel zeigte dieselben Proteinbanden, die auch nach der Gelfiltration zu beobachten waren.



Nach dem Hauptpeak erschienen weitere kleinere Peaks, die wahrscheinlich weiteren Verunreinigungen der Proteinlösung entsprachen, die auf Grund ihrer zu geringen Konzentration auf SDS-Gelen nicht sichtbar waren. Die heterolog exprimierte AS war also durch drei verschiedene Trennverfahren nicht bis zur Homogenität zu reinigen.

Abbildung 21: SDS-Gel nach Anionenaustauscherchromatographie, MonoQ
M: Markerproteine mit Größenangabe an der Seite, E: Eluierte Fraktionen im Hauptpeak.

2 Zur Reinigung, Kristallisation und Strukturaufklärung der Strictosidin-Glukosidase

2.1 Enzymatische Synthese des natürlichen Substrates Strictosidin

2.1.1 Synthese

Für Aktivitätstests, K_i -Wert Bestimmungen und Strukturanalyse des SG-Strictosidin-Komplexes wurden mehrere mg des Alkaloids Strictosidin verbraucht. Obwohl der reichhaltige Fundus der Sammlung an Alkaloiden genutzt werden konnte, machte diese Menge die Eigenherstellung der Substanz nötig. Strictosidin ist mit 3 chiralen Zentren allein am Aglykon chemisch nur schwer zugänglich. Die Extraktion dieses Glykosids aus Pflanzenmaterial liefert meist nur unzureichend reine Substanz. Deswegen wurde der Weg der Biosynthese über käuflich erworbenes Secologanin und Tryptamin mittels der STR zu Strictosidin genutzt. Das Enzym wurde von Elke Loris zur Verfügung gestellt. Um keine weiteren Reinigungsschritte zu benötigen wurden Secologanin und Tryptamin in äquimolaren Mengen eingesetzt. Das Enzym wurde, unter einmaligem Pufferwechsel, gegen 10 mM Tris/HCl pH 7.5 dialysiert. Dadurch sollte der Salzgehalt so niedrig wie möglich gehalten werden, ohne die Aktivität des Enzyms zu gefährden. Tris/HCl wurde gewählt, da es weder die Aktivität von SG noch von STR beeinflusst und da es der übliche Puffer des Enzyms für den Kristallisationsansatz ist, also beim Soaken von Kristallen mit dem biosynthetisch gewonnenen Strictosidin keine neue Substanz an den Kristall herangetragen wird. Die verringerte Aktivität durch den nicht optimalen pH-Wert wurde durch erhöhte Enzymmengen und verlängerte Inkubationszeit ausgeglichen.

Der Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 13: Ansatz zur enzymatischen Produktion von Strictosidin

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Masse
Secologanin (in H ₂ O)	44 mg/ml	100 µl	4,4 mg
Tryptamin (in H ₂ O/EtOH, 1:1)	16,35 mg/ml	136,7 µl	2,23 mg
Enzymlösung	1 mg/ml	22 µl	22 µg
Wasser		Ad 10 ml	

Um den Zeitpunkt des vollständigen Umsatzes abzugleichen wurden regelmässig Proben gezogen und durch HPLC analysiert. Nach 5 h 30 min bei 35 °C war seit den

letzten 30 min kein weiterer Umsatz sichtbar geworden. Das Reaktionsgemisch wurde in einen Rundkolben überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde es gefriergetrocknet. Aus den eingesetzten 11,3 μmol Edukten konnten 8,4 μmol Strictosidin (entspricht 74 %) gewonnen werden. Für die HPLC wurden 1,3 ml (entspricht 13 %) aus dem Reaktionsansatz entnommen.

2.1.2 Reinheitskontrolle und Identifizierung des Produktes

Die Reinheitskontrolle und Identifizierung des Produktes wurden mittels MS durchgeführt. Da es sich bei Strictosidin um ein Glykosid handelt, welches sich erst nach umständlicher Acetylierung verdampfen lässt, wurde nicht das institutseigene Spektrometer genutzt. Stattdessen konnte über Herrn Norbert Hanold ein Elektrospray-Ionisations-(ESI) MS genutzt werden.

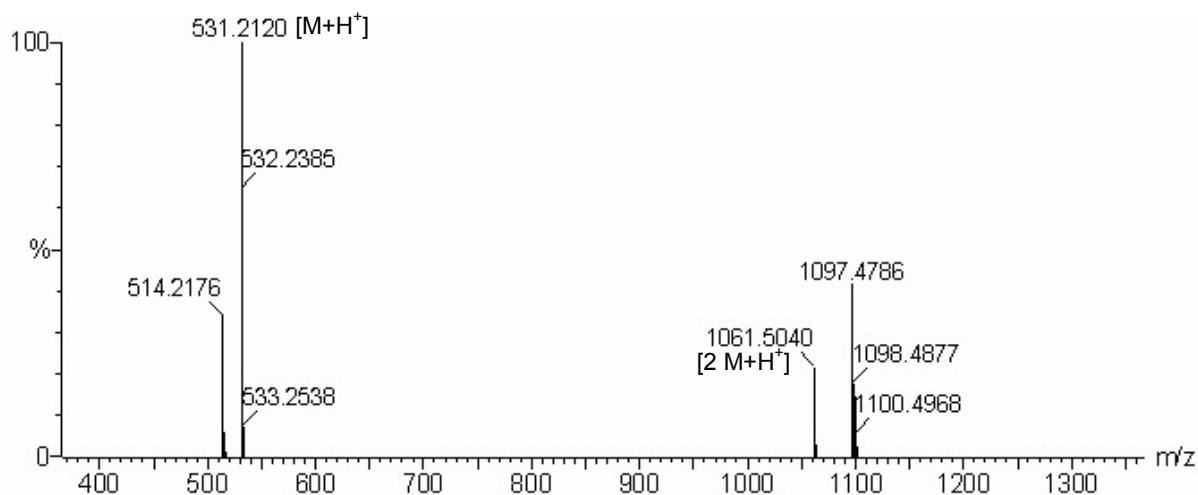


Abbildung 22: ESI-MS Spektrum des Produktes der Strictosidin-Synthese

Die Peaks bei 531, 532 und 533 m/z entsprechen der Masse des Strictosidins ($M_r=530$ U) plus einem Proton und natürlichen Mengen C^{13} . 1061 m/z entsprach zwei Molekülen und einem Proton. Damit wurde das synthetisierte Strictosidin als weitgehend rein angesehen.

2.2 Reinigung der Strictosidin Glucosidase

Zur Kristallisation des Enzyms wurde ein Reinigungsprotokoll entworfen, welches bei gleich bleibender Qualität reines Enzym liefern sollte. Das nötige Genkonstrukt wurde von Frau Dr. Xueyan Ma bereitgestellt.

2.2.1 Affinitäts-Chromatographie

Der wie in Methoden 1.3 hergestellte Rohextrakt wurde auf eine Ni-NTA-Säule (HisTrap HP 1 ml Säulenvolumen) geladen, mit 50 mM Imidazol (entspricht 18 % Elutions-Puffer) gewaschen und mit 250 mM Imidazol (100 % Elutions-Puffer) eluiert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Dabei wurden in einem Arbeitsgang Bakterien aus 5 l LB-Medium prozessiert. Um jetzt schon grösstmögliche Reinheit der Probe zu gewährleisten, wurden nur die Fraktionen mit einer UV-Absorption ab etwa einem Drittel der maximalen Absorption gesammelt. Damit wurden ~25 mg Enzym erhalten.

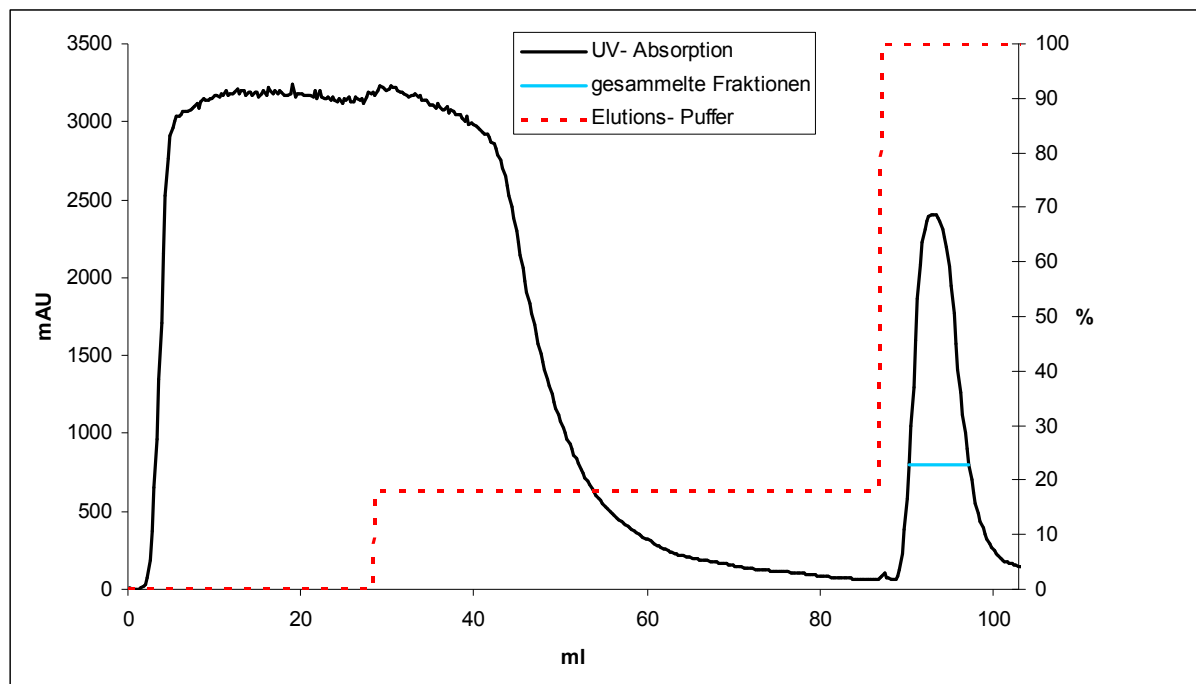


Abbildung 23: Typischer Verlauf einer Ni-NTA-Aufreinigung der Strictosidin Glucosidase

2.2.2 Entfernen des His-Tag

Auch für SG sollte die Kristallisation ohne His-tag verfolgt werden. Neben den bei der AS erwähnten Gründen war SG mit His-tag in einer Vielzahl von Puffern nicht löslich, ohne His-tag gab es solche Probleme nicht. Mit 300 mM NaCl, 20 mM MSH, 50 mM NaP_i pH 6,8 wurde ein Puffer gefunden, in dem das Abspalten des His-tags möglich ist und nur etwa 50 % des Enzyms beim Pufferwechsel ausfällt. Durch Zugabe von 10 mM EDTA (Endkonzentration) zur Enzymlösung vor der Dialyse konnte der Verlust auf 0 % reduziert werden.

Wie bei der AS konnte auch hier ein Prolin als Stoppunkt für den Verdau verwendet werden.

a **MKHHHHHHMHAQ** b **MDNTQAE** c **PLVVAIVP**

1

8

Abbildung 24: N-Terminus der SG nach Expression im pQE-2-Vektor

Die Zahlen beziehen sich auf die Sequenz der SG (a Translationsbeginn im pQE-2-Vektor, b Translationsbeginn in *Rauvolfia serpentina*, c Spaltpunkt bei Verdau mit DAPase).

Zu dem Enzym in diesem Puffer wurden 50 mU DAPase je 2 mg SG gegeben. Die DAPase wurde vorher mit dem gleichen Volumen 20 mM Cysteamin/HCl aktiviert. Der Ansatz wurde 10 h bei 37 °C inkubiert. Abschliessend wurde die DAPase über ihren C-terminalen His-Tag mit einer Ni-NTA-Säule entfernt. Der Verdau war oftmals unvollständig und die Ausbeute lag zwischen 50 und 80 %. Die Aktivität des Enzyms mit His-tag und nach Verdau bis Pro8 wurden miteinander verglichen. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

Bestandteil	Volumen [µl]	Masse	Endkonzentration
Substrat (1 mg/ml)	5,0	5,0 µg	50 µg/ml
KP _i (1M, pH 5,2)	10,0		100 mM
Enzymlösung	Variabel	0,5 µg	5 µg/ml
Wasser	ad 100,0		

Der Ansatz wurde 10 min bei 30 °C inkubiert, mit 100 µl MeOH abgestoppt und durch HPLC analysiert (Methoden 2.2). Die Aktivität war identisch. Das Enzym konnte also so zur Kristallisation eingesetzt werden.

2.2.3 Abschliessender Reinigungsschritt der SG über MonoQ

Nach dem Verdau sollten mit dem starken Anionenaustauscher MonoQ letzte Verunreinigungen aus der SG-Lösung entfernt werden. Dazu wurde gegen 10 mM Tris pH 7,5 dialysiert, dann die Lösung auf die Säule geladen, mit 10 mM Tris pH 7,5 nachgewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 500 mM KCl, 10 mM Tris pH 7,5 im Gradienten über 20 min eluiert. Im Graphen zu sehen war zunächst im Durchfluss Enzym das auf Grund seiner positiven Gesamtladung nicht an die Säule binden konnte, dann eine kleine Schulter am grossen Hauptpeak und später noch zwei weitere Verunreinigungen. Nach dem Hauptpeak wurde der Gradient abgebrochen und direkt mit 500 mM KCl das restliche Enzym eluiert.

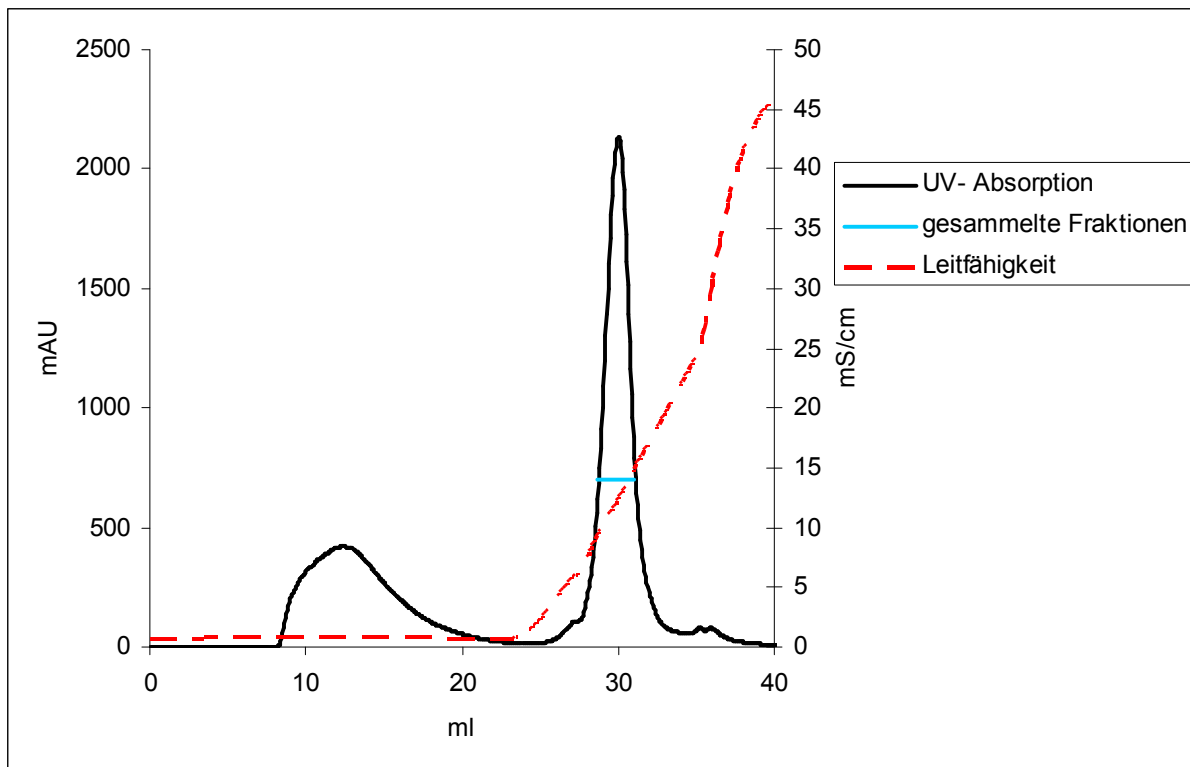
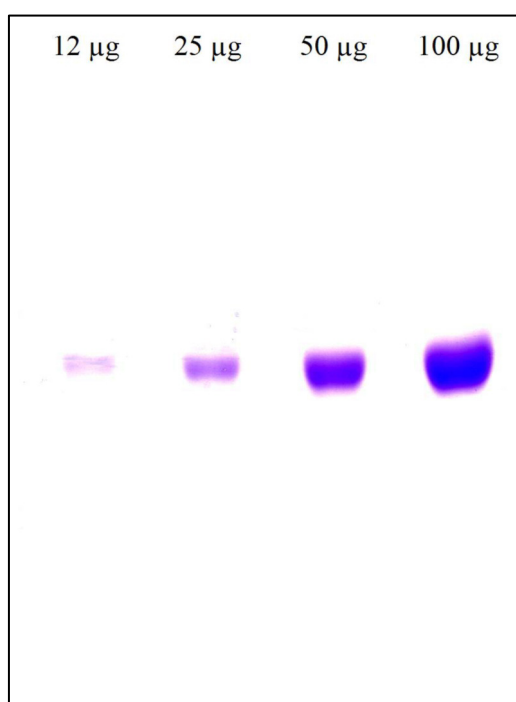


Abbildung 25: Typischer Verlauf einer MonoQ-Reinigung der Strictosidin Glukosidase

Wieder wurden, um grösstmögliche Reinheit zu gewährleisten, nur Fraktionen ab etwa einem Drittel der maximalen UV-Absorption gesammelt. Aus den anfänglichen 5 l LB-Medium wurden so zwischen 4 und 8 mg SG erhalten. Wie in Abbildung 25 gezeigt, waren nach der abschliessenden MonoQ-Reinigung keine weiteren Enzyme detektierbar. Bei der gezeigten SDS-PAGE (Abbildung 26) wurden unterschiedliche



Mengen SG aufgetragen. So wären sowohl sehr geringe Konzentrationen an Verunreinigung, als auch dicht bei der SG-Bande befindliche Fremdbanden, die sonst überdeckt worden wären, aufzuspüren gewesen. Die 12 µg Bande war direkt auf dem Gel als eine Bande sichtbar. Die so vorbereitete Enzymlösung wurde auf das benötigte Mass konzentriert und zur Kristallisation eingesetzt.

Abbildung 26: SDS-PAGE der Strictosidin Glukosidase nach dem MonoQ-Reinigungsschritt

2.3 Kristallisation der Strictosidin Glucosidase

2.3.1 Mikrodialyse-Methode

Da bekannt war, dass die SG bei einem Pufferwechsel von dem Elutions-Puffer der Ni-NTA-Reinigung in die meisten anderen Puffer ausfällt, sollte versucht werden durch langsames Absenken des Imidazolgehaltes, ein kontrolliertes, möglichst kristallines, Aggregieren zu erreichen.

Dazu wurde die Enzymlösung direkt nach dem Ni-NTA-Reinigungsschritt verwendet. Um verschiedene Kinetiken gleichzeitig zu überprüfen, wurde die Lösung in verschiedenen grosse Mikrodialyse-Knöpfe (5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 350 µl) gefüllt. Diese wurden mit Dialysemembran, festgehalten von einem Gummiring, verschlossen und jeweils in ein Well einer VDX Platte gelegt. Dazu wurden 2 ml des gleichen Elutions-Puffers als Reservoir pipettiert. Die Wells wurden jeweils mit Silikonöl und Deckgläschen verschlossen und die Platten bei 4 °C gelagert. Es wurde nun täglich die Veränderung beobachtet und anschliessend 500 µl des Reservoirs gegen 500 µl imidazolfreien Puffer getauscht (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0). Nach 4-5 Tagen fiel SG als amorphes Präzipitat in allen Versuchen aus.

2.3.2 Hanging Drop Versuche

Erste Kristallisationsversuche wurden bereits von Frau Dr. Xueyan Ma unternommen. Dabei wurden für 5 mg/ml SG zwei Bedingungen gefunden, die Kristalle bei Raumtemperatur lieferten:

20 % (V/V) iso-Propanol, 0,2 M Na-Citrat, 0,1 M HEPES-Na pH 7,5

10 % (m/V) PEG 6000, 1 M NaCl, Tris/HCl pH 8,0

Diese Kristalle wuchsen als Nadeln, und wenn man durch Röntgenbeugung auch beweisen konnte, dass es sich um Protein handelte, war die Auflösung bei weitem zu schlecht, als dass man sie für die Strukturaufklärung gebrauchen könnte. Deswegen wurde zuerst versucht, ausgehend von diesen Bedingungen, das Kristallwachstum zu verbessern. Es wurden Hanging Drop Experimente angesetzt, bei denen in einem 4-dimensionalen Screening die Konzentration von Präzipitant (PEG) und Salz (NaCl), der pH Wert und die Umgebungstemperatur geändert wurden. Dies wurde mit 3 verschiedenen SG-Konzentrationen (2, 4, 8 mg/ml) durchgeführt. Tabelle 13 gibt die verwendeten Konzentrationen bzw. Werte wieder.

Tabelle 14: Bei der Veränderung der ursprünglichen Kristallisationsbedingungen verwendete Werte

PEG 6000 (in %)	NaCl (in M)	pH-Wert	Temperatur (in °C)
2	0,4	7,5	4
3	0,5	8	20
4	0,6	8,5	23
5	0,9	9	30
6	1,0		35
7	1,1		
8	2,0		
9			
10			
12			

Bei allen pH-Werten und Temperaturen konnte beobachtet werden, wie die Anzahl und Länge der gewachsenen Nadeln mit steigender NaCl- und PEG-Konzentration startend bei einem klaren Tropfen erst zunahm, dann stagnierte und zugunsten von amorphem Präzipitat wieder abnahm. Dabei wurde keine Bedingung gefunden, die ein mehrdimensionales Kristallwachstum förderte.

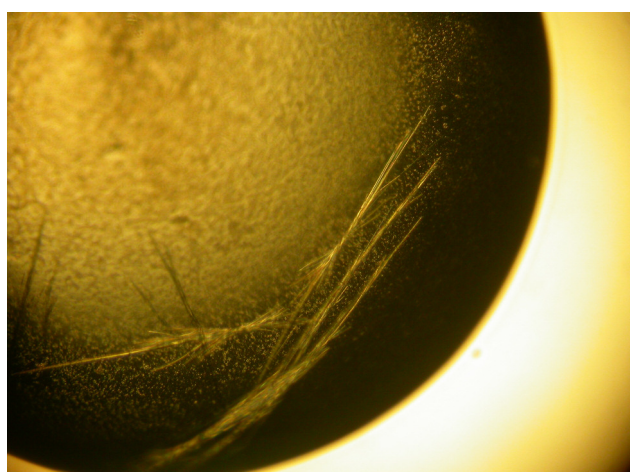
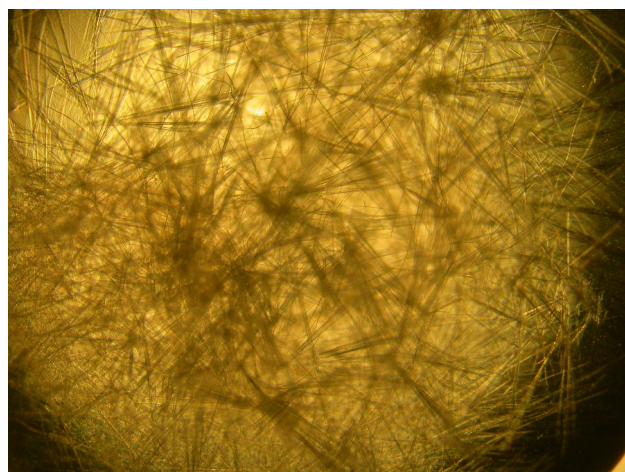
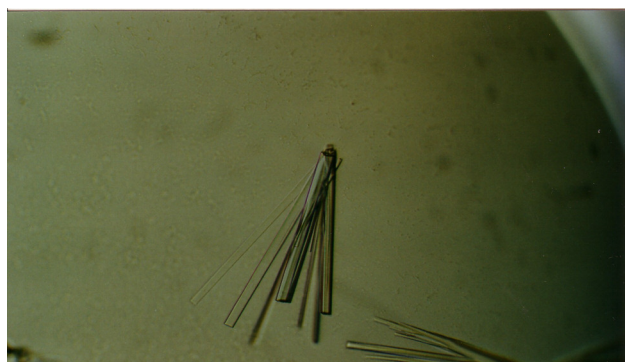


Abbildung 27: Beispiele für das Kristallwachstum der Strictosidin Glukosidase mit NaCl-Puffern
 links oben-anfängliche Bedingung
 rechts oben-Maximale Kristallisation
 links-erhöhte PEG/NaCl-Konzentration.

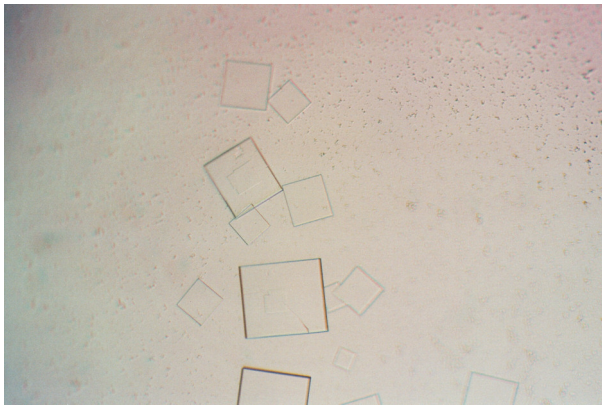
Weiter wurde der Einfluss des durchschnittlichen Molekulargewichts des PEG's getestet. Bei den Bedingungen: 4 % PEG, 0,6 M NaCl, 2 oder 4 mg/ml; 5 % PEG, 0,9 M NaCl, 4 oder 5 mg/ml und 10 % PEG, 0,9 M NaCl 4 oder 5 mg/ml wurden die Größen 200, 300, 400, 600, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 und 20000 untersucht. Alle Ansätze erfolgten bei Raumtemperatur ohne weitere pH-Pufferung. Die unterschiedlichen PEG's hatten jedoch nur einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Kristallisation. Die Höhermolekularen lieferten nach 1-24 h Kristallsand bzw. die bekannten Nadeln, die Niedermolekularen (unter M_r 4000) brauchten 2-3 Tage für dasselbe Ergebnis.

Um Einfluss auf die Kontaktflächen im Kristall zu nehmen wurde das Detergent Screen 1 von Hampton Research verwendet. Bei Raumtemperatur wurden mit 1 M NaCl, 8 % PEG 6000, 100 mM Tris pH 8,5 und 4 oder 5 mg/ml SG die 24 verschiedenen Detergentien bei einer Konzentration entsprechend ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration, cmc) bzw. dem Doppelten davon getestet. Die unterschiedlichen Tenside schienen tatsächlich die Löslichkeit der SG zu erhöhen, was sich aber nur in einer verlangsamten Kristallisation bemerkbar machte. Dadurch wurden einzelne grosse Nadeln produziert, die teilweise von einer Seite des Tropfens bis zur Anderen reichten (ca 3 mm). Auch diese waren für die Strukturaufklärung ungeeignet. Daraufhin wurden die bisher genutzte NaCl/PEG-Basis für den Puffer aufgegeben.

2.3.3 High Throughput Screening

Es wurden neue Bestandteile für den Kristallisationspuffer gesucht. Dazu wurde ein Cartesian MicroSys Roboter der SQ Serie (Cartesian Technologies, Irvine, USA) am MPI für Biophysik in Frankfurt genutzt. Mit der Sitting Drop Methode wurden dort 300 nl + 300 nl grosse Tropfen bei einem 100 μ l grossen Reservoir pipettiert. Genutzt wurden die käuflichen Kits JBScreen Classics 1-10 und Crystal Screen 1&2 und MembFac von Hampton Research. Es wurden zwei verschiedene Enzymkonzentrationen bei Raumtemperatur getestet (4 und 8 mg/ml). Die Platten wurden täglich kontrolliert und nach 4 Tagen wurden neben mehreren Tropfen mit Nadeln auch zwei mit Platten und Quadern sichtbar. Die beiden dazugehörigen Puffer stammten aus den JBScreen Classics 3 und Hampton Research MembFac Kits und ähnelten sich stark (10 bzw. 12 % (m/V) PEG 4000, 0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 M Na-Acetat pH 4,6). Die so gefundene Bedingung wurde durch Hanging Drop Experimente wiederholt. Durch

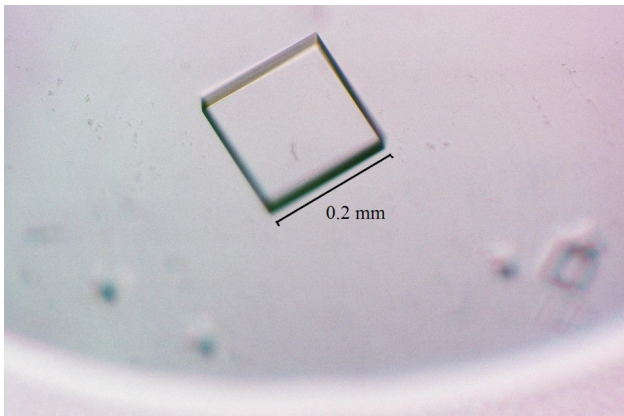
die Veränderung von Tropfen- und Reservoirgröße und den Wechsel von Sitting nach Hanging drop verschieben sich meist die benötigten Konzentrationen von Präzipitant und Salz. Es wurden also in einem ersten Versuch PEG 4000 8, 9, 10, 11 % (m/V) mit 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 und 0,35 M Ammoniumsulfat getestet (Tropfengröße 2+2 μ l, Reservoir 1 ml, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6, Raumtemperatur). Dieser Versuch wurde dreifach angesetzt um drei verschiedenen viskosen Siliconöle zum Verschluss der Wells zu testen. Nach nur einem Tag konnten bei 11 % (m/V) PEG 4000, 0,3 oder 0,35 M Ammoniumsulfat und dem niedrigviskosen Silikonöl die gleichen Platten beobachtet werden, wie zuvor bei dem HTS-Versuch.



Nach nur einem Tag konnten bei 11 % (m/V) PEG 4000, 0,3 oder 0,35 M Ammoniumsulfat und dem niedrigviskosen Silikonöl die gleichen Platten beobachtet werden, wie zuvor bei dem HTS-Versuch.

Abbildung 28: Erste mehrdimensionale SG Kristalle

Darauf aufbauend wurden die Ammoniumsulfat- und PEG-Konzentrationen in einem zweiten Versuch erhöht (10, 11, 12, 13 (m/V) PEG 4000, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5 M Ammoniumsulfat). Die optimalen Bedingungen wurden mit 10 % (m/V) PEG



4000, 0,3 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6, 20 °C (Tropfengröße 2+2 μ l, Reservoir 1 ml) gefunden. Bei jeder neuen Proteinaufreinigung musste jedoch die optimale Bedingung neu gesucht werden.

Abbildung 29: Einkristall der Strictosidin Glukosidase

2.4 Aufnahme der Röntgenbeugungsmuster der nativen Strictosidin Glukosidase

Am MPI für Biophysik in Frankfurt wurden verschiedene Konzentrationen an Glycerol getestet, um den optimalen Kryopuffer zu finden. Dazu wurde Puffer aus dem Reservoir genommen, mit der entsprechenden Menge Glycerol gemischt und mittels einer Loop in den Kryostrom gehalten. Ab 20 % Glycerol bildet sich kein sichtbares Eis mehr in der Loop. Um den osmotischen Druck auf den Kristall möglichst gering zu halten wurde diese niedrigste mögliche Konzentration für alle Kristalle genutzt. Ausserdem wurden alle Kristalle nur kurz in den Kryopuffer eingetaucht, sofort wieder hinausgenommen und im Kryostrom eingefroren. Bei dieser Gelegenheit wurde von 10 Kristallen jeweils 2 um 90° versetzte Bilder an einer Rigaku-Homesource aufgenommen. Ein Kristall lieferte gut abgegrenzte Reflexe bis zu einer Auflösung von 3,5 Å. Dieser Kristall wurde in flüssigem Stickstoff gelagert bis zu einem Messtermin am ESRF BM14 in Grenoble. Dank der höheren Intensität der Synchrotron-Strahlung konnte dort ein vollständiger Datensatz bis 2,48 Å aufgezeichnet werden.

Tabelle 15: Statistik des nativen SG Datensatzes
Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchstaflösende Schale.

Datensatz	SG nativ
Beamline	ESRF BM14
λ (Å)	1,2828
Raumgruppe	P 4 ₂ 2
Einheitszelle	a=b=157,63 Å, c=103,59 Å $\alpha=\beta=\lambda=90^\circ$
Gemessene Reflektionen	441757 (72544)
Unabhängige Reflektionen	46616 (8271)
Redundancy	9,48 (8,77)
Bereich der Auflösung (Å)	20,0 -2,48 (2,65-2,48)
I/ σ (I)	14,60 (4,58)
R _{sym} (%)	9,1 (27,5)
Vollständigkeit (%)	99,7 (100,0)
Mosaizität (°)	0,22

2.5 Strukturlösung der nativen Strictosidin Glukosidase

Mit dem Matthews-Koeffizienten wurden zwei Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorhergesagt (MATTHEWS, 1968). Die Struktur der nativen SG wurde durch Molecular Replacement gelöst. Dafür wurde das Programm EPMR (KISSINGER *et al.*, 1999) genutzt. Als Suchmodell diente die Struktur 1E1E der β -Glukosidase ZmGlu1 aus *Zea mays* (CZJZEK *et al.*, 2001). Zwischen den beiden Glukosidasen besteht eine Aminosäuresequenzidentität von 42 %. Mit dem Monomer von ZmGlu1 lieferte EPMR, wie mit dem Matthews-Koeffizienten berechnet, zwei Lösungen, die den beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit entsprachen. Die beiden Lösungen hatten Korrelationskoeffizienten von 0,26 bzw. 0,48, wobei Messdaten im Bereich von 10,0-4,0 Å verwendet wurden. Diese erste Struktur wurde mit CNS (BRÜNGER *et al.*, 1998) einem „Rigid body refinement“ unterzogen. Dabei wird das gesamte Model als starres Objekt gedreht und verschoben um es besser an die gemessene Elektronendichte anzupassen. Dafür wurde der Bereich der verwendeten Daten auf 20,0-3,0 Å erweitert. Für die weitere Verfeinerung der Struktur wurden die gesamten Daten von 20,0-2,48 Å verwendet. Davon wurden allerdings 2,4 % markiert und ausgeschlossen. Sie wurden nicht in der Verfeinerung benutzt, sondern um den R_{free} zu berechnen und damit den Erfolg der Verfeinerung unverfälscht zu bewerten (BRÜNGER *et al.*, 1992). Bis zu diesem Punkt wurde die Strukturlösung von Herrn Dr. Jürgen Köpke durchgeführt. Der erste berechnete R_{free} betrug 40,4 %. Also lagen 40,4 % der zu dem Modell berechenbaren Elektronendichte nicht in der Elektronendichte, die mit den 2,4 % der ausgeschlossenen Daten berechnet wurden. Als Richtwert wird erwartet, dass ein R_{free} erreicht wird, der dem 10-fachen der maximalen Auflösung entspricht. Bei der Auflösung der SG von 2,48 Å also etwa $R_{\text{free}} = 24,8$ %. Zu diesem Zeitpunkt war am Model selbst noch nichts verändert worden. In der gemessenen Elektronendichte der SG lag also noch das Model von ZmGlu1. Mit dem Programm XtalView/Xfit (MCREE, 1999) wurde die Sequenz nach und nach ausgetauscht und abweichende Strukturelemente neu gebaut. In regelmässigen Abständen wurde mit dem Programm Refmac (MURSHUDOV *et al.*, 1997, WINN *et al.*, 2001) die Struktur verfeinert und die Elektronendichte neu berechnet. Nachdem das erste Molekül fertiggestellt war, konnte auf das zweite kopiert werden. Die beiden Moleküle wurden anschliessend mit dem „simulated annealing protocol“ von CNS einzeln weiter verfeinert. Diese Methodik wurde benutzt um lokale Minima bei der Verfeinerung zu umgehen. Ausgehend von der alten Position werden alle Atome um einen bestimmten

Betrag zufällig versetzt und anschliessend neu verfeinert. Daran schlossen sich Verfeinerungsrunden an, in denen abwechselnd die Struktur manuell verbessert und dann Refmac benutzt wurde. Als Hilfe für die manuelle Verfeinerung dienten die fo-fc Elektronendichtekarte und der Ramachandran-Plot. In der fo-fc Elektronendichtekarte wurde die Elektronendichtefunktion des Modells von der gemessenen Elektronendichte subtrahiert. Wurde dies visualisiert, erkannte man Bereiche, in denen Teile des Modells lagen, ohne dass eine entsprechende, gemessene Dichte vorhanden war, als negative Dichten und Bereiche denen keine Atome zugeordnet waren, obwohl dort Dichte gemessen wurde, als positive Dichten.

Der Ramachandran-Plot ist eine statistische Auswertung von bekannten Proteinstrukturen (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Im Protein sind die Bindungslängen und –winkel der Aminosäuren ähnlich denen der Aminosäuren als Monomer. Das gibt dem Protein zur Faltung nur die Möglichkeit der Drehung um Torsionswinkel.

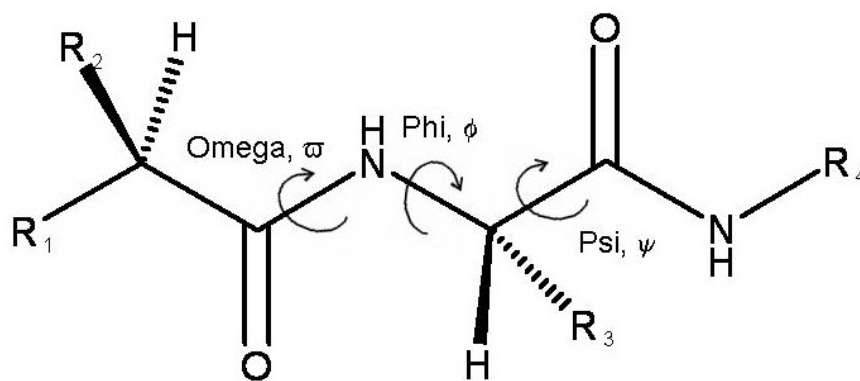


Abbildung 30: Torsionswinkel in der Peptidkette

Von den drei Bindungen einer Aminosäure im Protein fällt die Peptidbindung weg. Diese kann nur die Cis-oder Trans-Stellung einnehmen. In Proteinen überwiegt die Trans-Stellung statistisch mit etwa 99%. Im Ramachandranplot werden ψ und ϕ einer Aminosäure gegeneinander aufgetragen. Durch den Vergleich bekannter Strukturen sind dabei erlaubte Regionen definiert worden. Strukturmerkmale, deren Aminosäuren nicht in den erlaubten Regionen lagen, wurden eingehend geprüft. Das Programm Procheck wurde für den Ramachandranplot verwendet (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

In den letzten Runden der Verfeinerung wurden 145 Wassermoleküle der Struktur hinzugefügt. Bei einem $R_{\text{free}} = 24.2\%$ wurde die Verfeinerung abgeschlossen. Für die Aminosäuren an den Termini 1-36, 509-532 und für einen Loop an der Enzymober-

fläche von 355-359 war keine deutliche Elektronendichte sichtbar. Dies weist üblicherweise auf eine hohe Flexibilität hin und hat die Auswertung der Struktur nicht beeinflusst. Keine Aminosäure liegt in verbotenen Bereichen des Ramachandranplots, 88,5 % der Aminosäuren liegen in den bevorzugten Bereichen. Damit liegt die Struktur über dem statistischen Mittel der Strukturen mit der entsprechenden Auflösung. Tabelle 14 listet weitere Kennzahlen der Struktur auf.

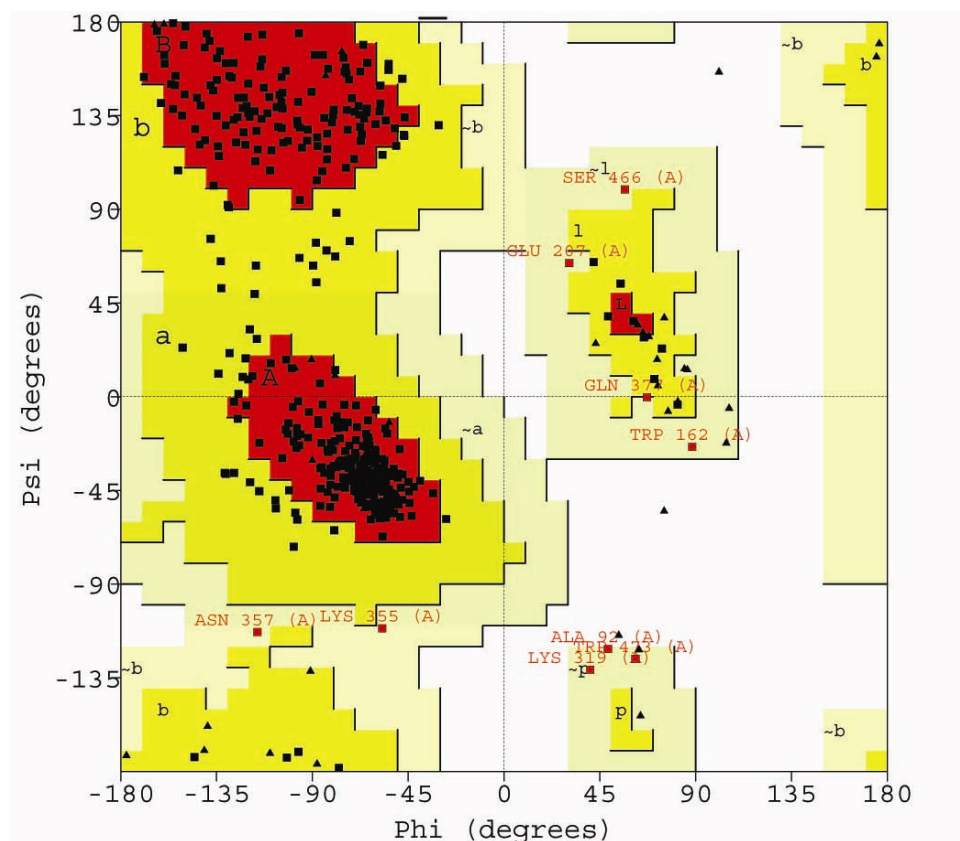


Abbildung 31: Ramachandranplot der nativen Strictosidin Glukosidase Struktur

Tabelle 16: Statistik zur Struktur der nativen Strictosidin-Glukosidase

SG nativ	
Auflösung (Å)	20,0-2,48
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) ^c	21,1/24,2
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Proteins	28,0
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Wassers	70,0
Anzahl der Atome	
Nicht-Wasserstoff	7679
Wasser (ohne Wasserstoff)	145
Standardabweichung	
Bindungen (Å)	0,013
Winkel (°)	1,60

2.6 Der Strictosidin Glukosidase/Strictosidin-Komplex

Zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand ist das Vermessen von Röntgenbeugungsmustern eines Komplexes der beiden Moleküle eine gängige Methode. Um solch einen Komplex zu erhalten sollten Enzymkristalle mit dem gewünschten Substrat in Mutterlauge inkubiert werden („soaking“). Durch die hohe Umsatzgeschwindigkeit der SG war es nicht direkt möglich einen Komplex mit dem intakten Substrat zu erhalten. Stattdessen wurden inaktive Mutanten der SG durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt, kristallisiert, „gesoakt“ und so als Komplex mit Strictosidin vermessen.

2.6.1 Herstellung inaktiver Mutanten der Strictosidin Glukosidase

Von BARRETT (BARRETT *et al.*, 1995) wurden zwei Glutaminsäuren im Inneren einer Tasche einer cyanogenen β -Glucosidase aus *Trifolium repens* L. als Protonendonator und Nucleophil in einer doppelten Austauschreaktion vorgeschlagen. Ausserdem wurde in der gleichen Publikation ein Histidin als verantwortlich für die Stabilisierung des wahrscheinlichen Übergangszustandes erörtert. SG gehört zu der gleichen Familie von Glykosidasen. Die diesen drei Aminosäuren entsprechenden Positionen der SG wurden durch ein Sequenzalignment gefunden und als Ziele für Mutationen ausgewählt. In Tabelle 32 ist das Alignment dargestellt. Glu207, Glu416 und His161 (die Zahlen entsprechen der Sequenz der SG) sind als die drei gewählten Ziele hervorgehoben. Alle drei Aminosäuren wurden in jeweils zwei andere mutiert. Für die Glutamate wurde Aspartat und Glutamin gewählt. Da der korrekte Abstand der zwei Carboxygruppen der Glutamate essentiell für die Reaktion ist (JENKINS *et al.*, 1995), sollte durch die Verkürzung der Seitenketten dieser Abstand vergrößert werden, die eventuell für die Bindung wichtige Polarität jedoch beibehalten werden. Alternativ führte der Tausch der Carboxygruppen der Glutamate zu Amidinen zum Fehlen des Protonendonators bzw. zum Abschwächen des Nucleophils. Das Histidin wurde durch Leucin bzw. Asparagin ersetzt, da beide Aminosäuren kleiner sind als das ursprüngliche Histidin, müßte der Übergangszustand instabiler werden und die Aktivität sinken. Mit einer polaren und einer unpolaren Aminosäure blieben genug Möglichkeiten für die Bildung eines Komplexes.

Identities = 248/475 (52%), Positives = 325/475 (68%), Gaps = 6/475 (1%)			
Cyβgl	14	LNRSCFAPGFVFGTASSAFQYEGAAFEDGKGPSIWDTFTTHKYPEKIKDRTNGDVAIDEYH	73
		++R F F+FG SA+Q EGA E +GPSIWDTFT + P KI D +NG+ AI+ YH	
SG	38	VHRRDFPQDFIFGAGGSAYQCEGAYNEGNRGPSIWDTFTQRSPAKISDGSNGNQAINCYH	97
Cyβgl	74	RYKEDIGIMKDMNLDAYRFSISWPRVLPKGKLSGGVNREGINYNNLINEVLANGMQPYV	133
		YKEDI IMK L++YRFSISW RVLP G+L+ GVN++G+ +Y++ I+E+LANG++P V	
SG	98	MYKEDIKIMKQTGLESYRFSISWSRVLPGGRLAAGVNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPSV	157
Cyβgl	134	TLFHWDVPOALEDEYRGLGRNIVDDFRDYAELCFKEFGDRVKHWITLNEPVGVS MNAYA	193
		TLFHWD+POALEDEY GFL IVDDF +YAE CF EFGD++K+W T NEP ++N YA	
SG	158	TLFHWDLPQALEDEYGGFLSHRIVDDFCEYAEFCFWEFGDKIKYWTTFNEPHTFAVNGYA	217
Cyβgl	194	YGTAFAPGRCSDWLKLNCTGGDSGREPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTKYQASQNGIIGITL	253
		G FAPGR + GD EPY+ H LLAH AA Y+ K+Q Q G IGI L	
SG	218	LGEFAPGRGGKGD-----GDPAIEPYVVTNILLAHKAAVEEYRNKFKQCQEIGEIGIVL	272
Cyβgl	254	VSHWFEPASKEKADVDAAKRGLDFMLGWFMHPLTKGRYPESMRYLVRKRLPKFSTEE SKE	313
		S W EP S +AD+DA KR LDFMLGWF+ PLT G YP+SMR LV+ RLPKFS ++S++	
SG	273	NSMWMEPLSDVQADIDAQKRALDFMLGWFLEPLTTGDYPKSMRELVKGR LPKFSADDSEK	332
Cyβgl	314	LTGSFDFLGLNYYSSYAAKAPRIPNARPAIQTDSLINATFEHNGKPLGPMAASSWLCIY	373
		L G +DF+G+NYY++ Y A + + + + +TD + TFE N KP+G W +	
SG	333	LKGCYDFIGMNYTATYVTNAVKSNSEKLSYETDDQVTKTFERNQKPIGHALYGGWQHVV	392
Cyβgl	374	PQGIRKLLLYVKNHYNNPVIYITENGRNEFNDPTLSLQESLLDTPRIDYYRHLYYVLTA	433
		P G+ KLL+Y K Y+ PV+Y+TE+G E N + L E+ D R DY+ +HL V A	
SG	393	PWGLYKLLVYTKETYHVPVLYVTESGMVEENKTKILLSEARRDAERTDYHQHLASVRDA	452
Cyβgl	434	IGDGVNVKGYFAWSLFDNMEWDSGYTVRFLGVFVDFKNNLKRHPKLSAHWFKSFL	488
		I DGVNVKGYF WS FDN EW+ GY R+G++ VD+K + +R+PK SA W+K+F+	
SG	453	IDDGVNVKGYFVWSFFDNFEWNLGYICRYGIIHVDYK-SFERYPKESAIWYKNFI	506

Abbildung 32: Sequenzalignment der cyanogenen β-Glucosidase aus *Trifolium repens* mit SG Cyβgl entspricht der cyanogenen β-Glucosidase aus *Trifolium repens* L.. Die drei mutierten Aminosäuren sind rot unterstrichen.

Die Mutationen sollten durch Amplifikation mittels PCR hergestellt werden. Die Mutation wurde dabei, wie im QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit beschrieben, durch geschickte Wahl des Primers eingefügt. Es wurden folgende Reaktionsansätze mit folgendem Programm genutzt. Nachdem die Anzahl der Zyklen von, in der Anleitung vorgeschlagenen, 20 auf 25 erhöht wurde, lieferten alle Versuche brauchbare Mengen an mutiertem Vektor.

PCR-Reaktionsansätze:

SG-pQE-2 (10 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
10x Puffer	5 μl
dNTP's (20mM)	2,5 μl
<i>Pfu</i> Turbo-	1 μl
Polymerase (2,5 U/μl)	
H ₂ O	38,5 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,5	
56	1	25
72	7	
72	10	1

Analog zu den Mutationen der AS wurde das Template nach erfolgter PCR durch Restriktionsverdau mit *DpnI* entfernt. *DpnI* ist in nahezu jedem Puffer aktiv und konnte nach der PCR direkt in das Reaktionsgemisch gegeben (1 μl, 20 U) und für 1 h bei 37 °C inkubiert werden. Die Ansätze wurden anschliessend durch ein 1 %iges Agarsegel gereinigt. Mit dem Nucleo Spin Extract Kit wurde die DNA aus dem Gel extrahiert. Die Proben wurden anschliessend zur weiteren Vermehrung in Top10-Zellen transformiert (siehe Methoden 3.7.3 Elektroporation). Daraus wurde die DNA mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit gewonnen. Ein Teil wurde zur Sequenzierung zu Gen-terprise (Mainz) geschickt, ein anderer Teil zur Transformation in M15 genutzt. Die mutierten Proteine konnten mit den so gewonnenen M15-Zellen genauso produziert und aufgereinigt werden, wie für den nativen Vorgänger beschrieben. Die Expressionsraten waren generell verringert (Tabelle 16).

Mutante	mg Enzym aus 2 l Kulturmedium
Glu207Asp	3,3
Glu207Gln	8,9
Glu416Asp	2,4
Glu416Gln	0,7
His161Leu	2,4
His161Asn	0,9

Tabelle 17: Expressionsraten der inaktiven Mutanten der Strictosidin Glukosidase

Abbildung 33 (umseitig): Primer zur Herstellung inaktiver Mutanten der SG

Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von dem gewählten „Forward“ und „Reverse“ Primern, in denen die geänderten Nucleotide klein geschrieben sind.

Glu207Asp

Peptidsequenz: W T T F N E P H T F

cDNA-Sequenz: 5`-TGG ACG ACG TTC AAT GAA CCA CAT ACC TTC GCT-3`

D

Primer E207D-for: 5`-GG ACG ACG TTC AAT GAt CCA CAT ACC TTC GC -3`

Primer E207D-rev: 5`-GC GAA GGT ATG TGG aTC ATT GAA CGT CGT CC -3`

Glu207Gln

Peptidsequenz: W T T F N E P H T F

cDNA-Sequenz: 5`-TGG ACG ACG TTC AAT GAA CCA CAT ACC TTC GCT-3`

Q

Primer E207Q-for: 5`-GG ACG ACG TTC AAT cAg CCA CAT ACC TTC GC -3`

Primer E207Q-rev: 5`-GC GAA GGT ATG TGG cTG ATT GAA CGT CGT CC -3`

Glu416Asp

Peptidsequenz: P V L Y V T E S G M V

cDNA-Sequenz: 5`-CCG GTG CTA TAT GTC ACA GAA AGT GGG ATG GTT-3`

D

Primer E416D-for: 5`-CCG GTG CTA TAT GTC ACA GAt AGT GGG ATG G -3`

Primer E416D-rev: 5`- C CAT CCC ACT aTC TGT GAC ATA TAG CAC CGG-3`

Glu416Gln

Peptidsequenz: P V L Y V T E S G M V

cDNA-Sequenz: 5`-CCG GTG CTA TAT GTC ACA GAA AGT GGG ATG GTT-3`

Q

Primer E416Q-for: 5`-CCG GTG CTA TAT GTC ACA cAg AGT GGG ATG G -3`

Primer E416Q-rev: 5`- C CAT CCC ACT cTg TGT GAC ATA TAG CAC CGG-3`

His161Leu

Peptidsequenz: S V T L F H W D L P Q

cDNA-Sequenz: 5`-TCC GTA ACT CTC TTC CAC TGG GAT CTT CCT CAA-3`

L

Primer H161L-for: 5`-CC GTA ACT CTC TTC aAa TGG GAT CTT CCT C -3`

Primer H161L-rev: 5`- G AGG AAG ATC CCA tTt GAA GAG AGT TAC GG-3`

His161Asn

Peptidsequenz: S V T L F H W D L P Q

cDNA-Sequenz: 5`-TCC GTA ACT CTC TTC CAC TGG GAT CTT CCT CAA-3`

N

Primer H161N-for: 5`-CC GTA ACT CTC TTC aAC TGG GAT CTT CCT C -3`

Primer H161N-rev: 5`- G AGG AAG ATC CCA GTt GAA GAG AGT TAC GG-3`

2.6.2 Überprüfung der Inaktivität

Zum Vergleich der Aktivitäten der Mutanten wurde zuerst eine Bedingung gesucht, bei der die native SG etwa 50 % des eingesetzten Strictosidins umsetzt. Folgender Ansatz wurde 5 min bei 30 °C inkubiert und damit diese Bedingung gefunden:

Bestandteil	Volumen [µl]	Masse
Strictosidin (1 mg/ml)	5,0	5,0 µg
KP _i (1M, pH 5,2)	10,0	
Enzymlösung	Variabel	0,5 µg
Wasser	ad 100,0	

Die Reaktion wurde durch HPLC analysiert (Methoden 2.2). Für die Mutanten wurden solange die Masse des eingesetzten Enzyms und die Inkubationszeit erhöht, bis zusammen die etwa 1000-fache Aktivität zu erwarten gewesen wäre. Jedoch zeigte keine Mutante bis hier Umsatz. Die Aktivität aller 6 Mutanten Glu207Asp, Glu207Gln, Glu416Asp, Glu416Gln, His161Leu und His161Asn konnte damit als <0,1% angegeben werden. Das war gering genug für Soaking-Experimente, deren Dauer bei einigen Stunden liegen kann, in denen das Substrat nicht umgesetzt werden darf.

2.6.3 Soaking-Experimente mit Strictosidin

Glu207Gln wurde wegen der höchsten Expressionsrate der sechs Mutanten für Soaking-Experimente ausgewählt. Zur Kristallisation der Mutante konnten etwa dieselben Bedingungen wie für das native Enzym genutzt werden. Als optimale Bedingung wurde 11 % (m/V) PEG, 0,35 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6 und 4 mg/ml SG gefunden. Es wurde eine Microbatch Platte vorbereitet. Das äussere Reservoir wurde mit Kristallisationspuffer gefüllt, um ein Austrocknen der Wells zu verhindern. Diese wurden mit Kristallisationspuffer inklusive 2 mg/ml SG und 1, 2, 5 oder 10 mM Strictosidin gefüllt. Die ausgewachsenen Kristalle wurden anschliessend aus ihrer Mutterlauge in die Wells überführt. Dort verblieben sie 2, 3, 4 oder 6 h, bevor sie erst in einen Kryopuffer (11 % (m/V) PEG, 0,35 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6, 2 mg/ml SG, 20 % (m/V) Glycerol) getaucht und anschliessend direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff bis zur Messung am EMBL Hamburg Outstation gelagert. Dort wurde die Auflösung der Kristalle überprüft und diese dann direkt vermessen. Es wurde ein voll-

ständiger Datensatz eines 4 h mit 5 mM Strictosidin gesoakten Kristalls aufgenommen. Dafür wurden 1440 Bilder bei einer Drehung von jeweils $0,25^\circ$ vermessen. Da die Dimensionen der Einheitszelle dieses Datensatzes mit denen des nativen Datensatzes annähernd übereinstimmten, konnte eine Elektronendichtekarte direkt errechnet werden. In der fo-fc Karte war deutlich eine durchgehende, positive Dichte mit Grösse und Form des Strictosidins in der Nähe des erwarteten katalytischen Zentrums sichtbar.

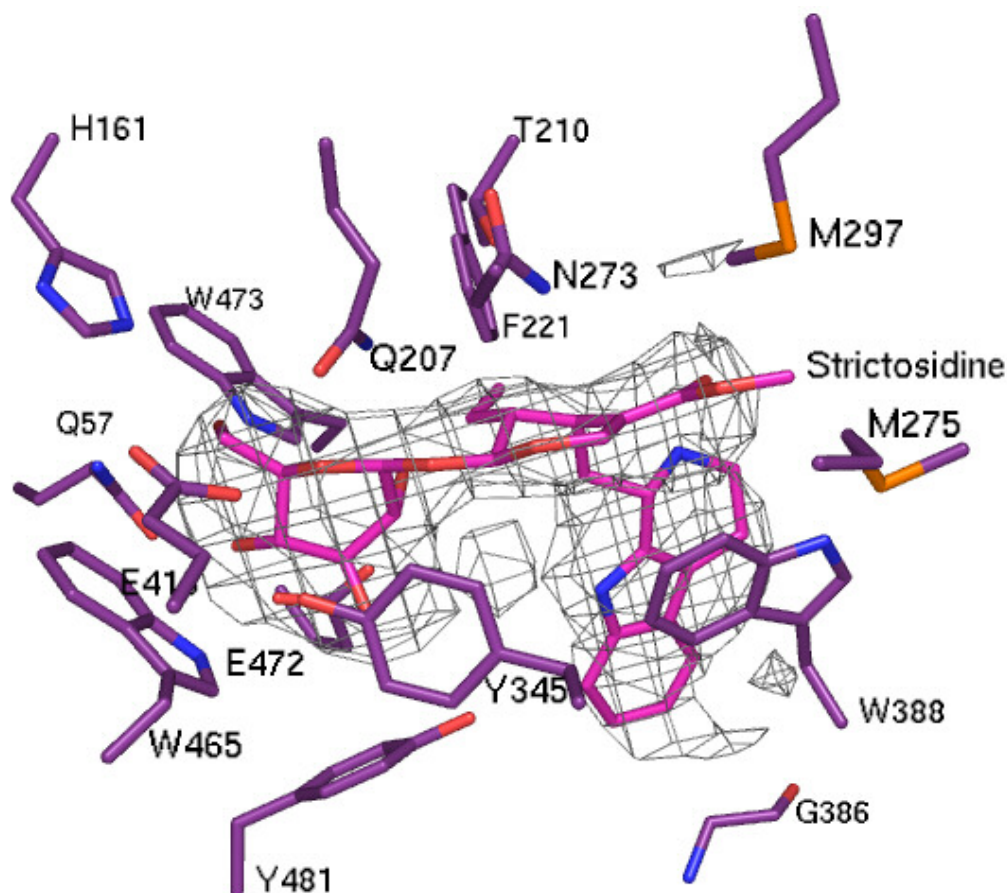


Abbildung 34: Anfängliche fo-fc Elektronendichte des Strictosidins im SG-E207Q/Strictosidin-Komplex

Die Struktur wurde analog zur nativen Struktur verfeinert. Tabelle 17 gibt die kristallographischen Kennwerte wieder. Zwischen der nativen Struktur und dem Komplex der Mutante bestand grosse Ähnlichkeit. Die Standardabweichung aller $C\alpha$ -Atome betrug für Kette A $0,29 \text{ \AA}$ und für Kette B $0,39 \text{ \AA}$. Der grösste Unterschied lag in einer Loop von 354-359, die eine hohe Flexibilität aufwies.

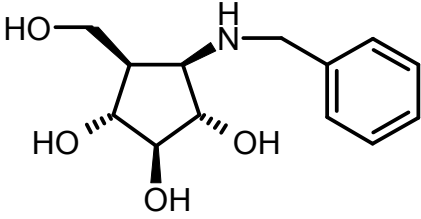
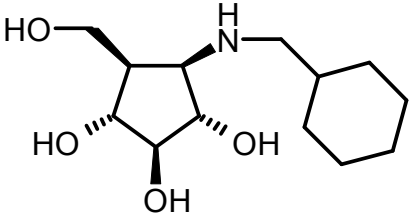
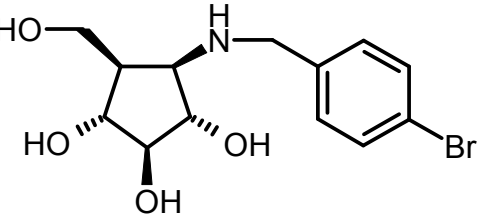
Tabelle 18: Statistik der Struktur des Strictosidin-Glukosidase Glu207Gln/Strictosidin-Komplexes

Kristall	
Datensatz	SG-Glu207Gln/Strictosidin-Komplex
Beamline	X13 EMBL Hamburg
λ (Å)	0,8048
Raumgruppe	P 4 ₂ 2
Einheitszelle	a=b=158,99 Å, c=102,86 Å $\alpha=\beta=\lambda=90^\circ$
Gemessene Reflektionen	930353
Unabhängige Reflektionen	32951
Bereich der Auflösung (Å)	20-2,82
I/ σ (I)	20,18 (7,6)
R _{sym} (%)	5,8 (11,0)
Vollständigkeit (%)	98,4 (99,8)
Mosaizität (°)	0,32
Struktur	
Auflösung (Å)	20,0-2,82
R _{cryst} / R _{free} (%)	22,2/28,1
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Proteins	22,0
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Wassers	20,0
Durchschnittlicher B-Faktor (Å) des Strictosidins	34,0
Anzahl der Atome	
Nicht-Wasserstoff	7607
Wasser (ohne Wasserstoff)	77
Standardabweichung	
Bindungen (Å)	0,016
Winkel (°)	1,715

2.7 Inhibierung des Enzyms

Nachdem GERASIMENKO *et al.* (2002) verschiedene mögliche Substrate getestet hatten und so die sehr hohe Substratspezifität der Strictosidin Glukosidase festgestellt hatten, sollte nun die Inhibierung des Enzyms durch verschiedene Substanzen getestet werden. Dafür wurden drei Inhibitoren vom Arbeitskreis Prof. Jägers, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart bereitgestellt (Tabelle 18).

Tabelle 19: Namen und Strukturformeln der verwendeten Glukosidase-Inhibitoren

Verbindungsname	Strukturformel	K _i -Wert
<i>N</i> -Benzyl-β-D-gluco-1,5-desoxypyranosylamin (VJ-01)		8,22 mM
<i>N</i> -(Cyclohexylmethyl)-β-D-gluco-1,5-desoxypyranosylamin (VJ-02)		0,82 mM
<i>N</i> -(<i>p</i> -Brombenzyl)-β-D-gluco-1,5-desoxypyranosylamin (VJ-03)		0,82 mM

Zur Feststellung des K_i-Wertes der drei Inhibitoren wurde der veränderte K_m-Wert von Strictosidin in Anwesenheit einer definierten Menge Inhibitor durch ein Lineweaver-Burk-Diagramm bestimmt. Daraus konnte der jeweilige K_i-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$K_m' = K_m \times (1 + I/K_i) \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} K_m = K_m\text{-Wert des Strictosidins ohne Inhibitor} \\ K_m' = K_m\text{-Wert des Strictosidins mit Inhibitor} \\ I = \text{Konzentration des Inhibitors} \end{array}$$

Zur Erstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms wurde der Strictosidin Umsatz in folgenden Ansätzen gemessen:

Bestandteil	Endkonzentration	Volumen [μ l]
Strictosidin	10, 20, 50, 75, 100 oder 180 μ M	5,0
Inhibitor	5 mM	10,0
KP _i (1M, pH 5,2)	100 mM	10,0
Enzymlösung	1 μ g/ml	Variabel
Wasser		ad 100,0

Zuerst wurde dabei das Enzym mit dem Inhibitor alleine für 15 min bei 30 °C inkubiert. Dadurch sollte dem Inhibitor Zeit gegeben werden, an das Enzym zu binden. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Strictosidins gestartet. Die Ansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l MeOH gestoppt und durch HPLC analysiert. Bei den Berechnungen ergaben sich die in Tabelle 19 angegebenen K_i-Werte.

Ausser den drei Inhibitoren wurde auch Raucaffricin auf eine eventuelle Inhibitor-Funktion getestet. Raucaffricin ist ein weiteres glucosyliertes Alkaloid aus dem *Rauvolfia*-Stoffwechsel. Es wurde von GERASIMENKO *et al.* (2002) auch mit SG getestet, es wurde aber kein Umsatz festgestellt. Zur Klärung, ob Raucaffricine dennoch an der SG bindet, wurde die Aktivität der SG gegenüber Strictosidin in Gegenwart von der gleichen Menge Raucaffricin getestet. Dazu wurde folgender Ansatz erst 15 min ohne Strictosidin vorinkubiert (30 °C), dann Strictosidin hinzugefügt und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert.

Bestandteil	Volumen [μ l]	Masse
Strictosidin (1 mg/ml)	5,0	5,0 μ g
Raucaffricin (1 mg/ml)	5,0	5,0 μ g
KP _i (1M, pH 5,2)	10,0	
Enzymlösung	Variabel	0,5 μ g
Wasser	ad 100,0	

Anschliessend wurde die Reaktion mit 100 μ l MeOH gestoppt und durch HPLC analysiert. Der Umsatz wurde mit einem gleichartigen Ansatz ohne Raucaffricin verglichen und kein Unterschied festgestellt. Demnach wird Raucaffricin von der SG weder umgesetzt, noch kann Raucaffricin die SG inhibieren. Es bindet also nicht an die SG.

2.8 Mutationen der Substraterkennungsstelle

Anhand des Modells des SG/Strictosidin-Komplexes wurden vier Aminosäuren ausgewählt, deren Einfluss auf die Substratbindung und damit auf die Aktivität durch Mutation überprüft wurden. Dabei wurde auch die Sequenz der Raucaffricin-Glukosidase berücksichtigt, deren korrespondierende Aminosäuren teilweise zur Auswahl der Substituenten genutzt wurden. Für die Mutationen Phe373Thr, Gly386Ser, Trp388Ala und Tyr481Phe wurden folgende Primer entwickelt:

Phe373Thr	
Peptidsequenz:	D Q V T K T F E R N Q K P
cDNA-Sequenz:	5`-GAT CAA GTT ACT AAG ACT TTT GAA CGG AAC CAA AAA CCC-3`
	T
Primer F373T -for:	5`-GAT CAA GTT ACT AAG ACT acT GAA CGG AAC CAA AAA CCC-3`
Primer F373T -rev:	5`-GGG TTT TTG GTT CCG TTC Agt AGT CTT AGT AAC TTG ATC-3`
Gly386Ser	
Peptidsequenz:	P I G H A L Y G G W Q
cDNA-Sequenz:	5`-CCC ATT GGT CAT GCG TTG TAT GGA GGG TGG CAG-3`
	S
Primer G386S -for:	5`-CCC ATT GGT CAT GCG TTG TAT aGc GGG TGG CAG-3`
Primer G386S -rev:	5`-CTG CCA CCC gCt ATA CAA CGC ATG ACC AAT GGG-3`
Trp388Ala	
Peptidsequenz:	A L Y G G W Q H V V P
cDNA-Sequenz:	5`-CG TTG TAT GGA GGG TGG CAG CAT GTC GTT CCT TGG-3`
	A
Primer W388A -for:	5`-CG TTG TAT GGA GGG gcG CAG CAT GTC GTT CCT TGG-3`
Primer W388A -rev:	5`-CCA AGG AAC GAC ATG CTG Cgc CCC TCC ATA CAA CG -3`
Tyr481Phe	
Peptidsequenz:	G Y I C R Y G I I H V
cDNA-Sequenz:	5`-G GGT TAT ATA TGT CGT TAT GGA ATT ATT CAT GTT G-3`
	F
Primer Y481F -for:	5`-G GGT TAT ATA TGT CGT TtT GGA ATT ATT CAT GTT G-3`
Primer Y481F -rev:	5`-C AAC ATG AAT AAT TCC AaA ACG ACA TAT ATA ACC C-3`

Abbildung 35: Bei der Mutation der Aglykon-Erkennungsstelle benutzte Primer
Es ist die native Peptidsequenz und die dazu codierende DNA angegeben, gefolgt von dem
gewählten „Forward“ (for) und „Reverse“ (rev) Primern, in denen die geänderten Nucleotide
klein geschrieben sind.

Mit diesen Primern und dem SG-pQE-2-Konstrukt als Template wurden mit folgendem Ansatz und Temperaturprogramm PCR's durchgeführt:

PCR-Reaktionsansätze:

SG-pQE-2 (10 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pM)	je 1 μl
5 x Puffer	10 μl
dNTP's (10mM)	2,5 μl
Phusion-	1 μl
Polymerase (2 U/μl)	
H ₂ O	34,5 μl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,33	
56	1	25
72	3,5	
72	10	1

Wie bei den zuvor beschriebenen Mutationen wurde das Template mit *DpnI* verdaut, die Ansätze mit einem Agarosegel gereinigt und die aus dem Gel ausgeschnittene und extrahierte DNA in TOP 10 *E. coli*-Zellen transformiert. Drei der Vier Ansätze zeigten direkt Reaktionsprodukte. Nur die Reaktion Gly386Ser wollte nicht gelingen. Nach mehrfachen Versuchen mit gesenkter Annealing-Temperatur und dem Zusatz von Magnesium-Ionen wurde auch der Zusatz von DMSO getestet. DMSO stört die Struktur der DNA und kann so für die Polymerase komplizierte Strukturen aufbrechen. Mit 2 % DMSO und einer Annealing-Temperatur von 72 °C konnte ein Reaktionsprodukt erhalten werden. Nun mussten, wie bei der Mutation AS-2S2N beschrieben, Klone mit nur einfach eingebautem Primer gefunden werden, dazu wurde eine entsprechende Test-PCR und ein Agarosegel genutzt. Die gewählten Klone wurden sequenziert. Nachdem man so Lesefehler der Polymerase ausgeschlossen hatte, wurde die entsprechende DNA in M15 *E. coli*-Zellen transformiert und das veränderte Protein wie das Native exprimiert. Nach der Aufreinigung mit Ni-NTA wurden die Aktivitäten der Mutanten gegen Strictosidin und Raucaffricin bestimmt. Dazu wurde vorgegangen wie schon beim Vergleich der Aktivitäten der sechs inaktiven Mutanten (Ergebnisse 2.6.2). Aus dem Vergleich an Umsatz bei verlängerter Reaktionszeit und erhöhtem Enzymeinsatz von den Mutanten und dem nativen Enzym wurden die in Tabelle 19 wiedergegebenen Aktivitäten festgestellt.

Tabelle 20: Relative Aktivitäten der an der Aglykonerkennungsstelle mutierten Enzyme

Mutante	Rel. Aktivität Strictosidin	Umsatz Raucaffricin
Phe373Thr	100%	0%
Trp388Ala	1%	0%
Tyr481Phe	90%	0%
Gly386Ser	10%	0%

V Diskussion

1 Arbutin-Synthase

Die Arbutin-Synthase ist eine UDPG-abhängige Glukosyltransferase. Ihr Hauptsubstrat ist das Hydrochinon, welches durch Übertragung einer Glukosyl-Gruppe zum namensgebenden Arbutin wird. Abhängig von ihrer DNA-Sequenz wurde AS in die Familie 1 der Glykosyltransferasen (GT-1) eingeordnet, auch wenn die Sequenzidentität untereinander in der Familie teilweise nicht sehr hoch ist (Tabelle 20). Alle Enzyme dieser Familie zeigen einen Reaktionsmechanismus, der die Konformation der glykosidischen Bindung invertiert (COUTINHO *et al.*, 2003). In Tabelle 20 werden die fünf Enzyme mit bekannter Struktur der Familie 1 der Glycosyltransferasen untereinander und mit der AS verglichen.

Tabelle 21: Aminosäuresequenzidentität der fünf bekannten Glycosyltransferasen (Familie GT-1) und der Arbutinsynthase untereinander

AS: Arbutinsynthase aus *Rauvolfia serpentina*, **GtfA:** dTDP- β -L-4-epi-Epivancosamin: Epivancosaminyltransferase aus *Amycolatopsis orientalis*, **GtfB:** TDP/UDP-Glucose:Aglycosyl-Vancomycin Glucosyltransferase aus *Amycolatopsis orientalis*, **GtfD:** UDP- β -L-4-epi-Vancosamin:Vancomycin-Pseudoaglykon Vancosaminyltransferase aus *Amycolatopsis orientalis*, **UGT71G1:** UDP-Glucose: Triterpene Glucosyltransferase aus *Medicago truncatula*, **VvGT1:** UDP-Glucose:Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase aus *Vitis vinifera*; k.S.: keine Signifikanz im Alignment.

Seq.-identität [%]/ Standardabw. der C α [Å]	GtfA	GtfB	GtfD	UGT71G1	VvGT1	AS
GtfA	/	62/1,8	54/1,2	k.S./11,3	k.S./13,4	k.S.
GtfB	62/1,8	/	62/1,3	k.S./9,8	k.S./8,9	k.S.
GtfD	54/1,2	62/1,3	/	k.S./14,5	k.S./13,9	k.S.
UGT71G1	k.S./11,3	k.S./9,8	k.S./14,5	/	29/2,9	33
VvGT1	k.S./13,4	k.S./8,9	k.S./13,9	29/2,9	/	29
AS	k.S.	k.S.	k.S.	33	29	/

Es zeigt sich, dass die drei Enzyme aus dem Bakterium *Amycolatopsis orientalis* (GtfA, GtfB und GtfD, MULICHAK *et al.*, 2001, 2003, 2004) wie zu erwarten eine hohe Sequenzidentität von 54 bis 62 % untereinander aufweisen. Zu den pflanzlichen Transferasen UGT71G1 aus *Medicago truncatula* (SHAO *et al.*, 2005), VvGT1 aus *Vitis vinifera* (OFFEN *et al.*, 2006) und der AS aus *Rauvolfia serpentina* konnte dagegen keine signifikante Übereinstimmung gefunden werden. Darüberhinaus zeigten die pflanzlichen Enzyme untereinander auch nur eine geringe Identität von etwa

30%. Strukturell betrachtet ist die Familie wesentlich homogener. Denn alle fünf bisher aufgeklärten Strukturen zeigen denselben Faltungstypen, GT-B, der aus zwei separaten Rossmannfold-Domänen und einer Linker Region besteht. Zwischen diesen Domänen liegt das katalytische Zentrum (QASBA *et al.*, 2005). Dabei steuert die C-terminale Domäne die Substratbindungsstelle des Zuckerdonors und die N-terminale Domäne die des Akzeptors bei. Die Standardabweichung der Positionen der C α 's zeigt, wie bei der Aminosäuresequenz, den deutlichen Unterschied zwischen den bakteriellen und den pflanzlichen Transferasen. Der strukturelle Unterschied äussert sich vor allem in der N-terminalen Domäne, und dort vor allem in Loops und Helices, die dem katalytischen Zentrum zugewandt sind (BRETON *et al.*, 2006). Trotz der geringen Sequenzidentität ermöglicht die konservierte Faltung Rückschlüsse auf die Struktur der AS. Gerade im Bezug auf die Bindung des Zuckerdonors UDP-Glukose lassen sich weitgehende Übereinstimmungen in der Sequenz von AS und den beiden pflanzlichen Glykosyltransferasen erkennen. Substantielle Unterschiede am katalytischen Zentrum auf der Seite der Aglykonbindung erschweren jedoch Aussagen zum Reaktionsmechanismus und zur Substratbindung. Um diese genauer zu studieren bleibt die kristallographische Strukturaufklärung der AS von Nöten. Es soll hier jedoch versucht werden, einige der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den neu zugänglichen Strukturen im Folgenden zu erklären.

Bei allen Enzymen der Familie 1 der Glykosyltransferasen wurde ein invertierender Reaktionsmechanismus festgestellt. Das bedeutet, die Konformation des anomeren C1 des Zuckers wechselt von α nach β oder umgekehrt. Dazu wird angenommen, dass eine Hydroxyl-Gruppe des Zuckerakzeptors durch Deprotonierung aktiviert wird und direkt an dem aktivierten Zucker angreift.

Abbildung 36 (umseitig): Sequenz und Strukturbasiertes Alignment der Arbutin-Synthase mit Glykosyltransferasen bekannter Struktur
 AS-Arbutin-Synthase; 2ACV-UGT71G1 aus *Medicago truncatula*; 2C1X-VvGT1 aus *Vitis vinifera*; 1PNV, 1IIR, 1RRV-GtfA, GtfB und GtfD jeweils aus *Amycolatopsis orientalis*
 * katalytische Aminosäuren, # den Zucker oder Phosphat bindende Aminosäuren in den pflanzlichen Enzymen, Buchstaben geben im Rahmen dieser Arbeit veränderte Aminosäuren, C-terminale Verkürzungen. α -Helices in den bekannten Strukturen sind rot, β -sheets oliv dargestellt. Die Cysteine der AS sind fett grün hervorgehoben. Kleingeschriebene Aminosäuren zeigen Unsicherheiten im Alignment.

```

*
AS 001 .....MEHTPHIAMVPTPGMGHLIPLVEFAKRLVLRH.NFGVTFI.IPTDG.P.LPKAQ.KSFL
2ACV 001 MSmsDINKNSELI FIPAPGIGHLASALEFAKLLTNHDKNLYITVFCIKFPGMP.FADSYIKSVL
2C1X 001 .msqtttNPHVAVLAFPFSTHAAPLLAVVRRLA AAA.PHAVFSF.FSTSQ.S.NASIF.hdsm
1IIR 001 M.....RVLLATCGSRGDTEPLVALAVRVR...DLGADVRCAPPDCAERLAEVGVPHVP
1PNV 001 M.....RVLLITGCGSRGDTEPLVALAARLR...ELGADARMCLPPDYVERCAEVGVMVP
1RRV 001 M.....RVLLSVCGTRGDVEIGVALADRLK...ALGVQTRMCAPPAAEERLAEVGVPHVP
*
AS 055 DALPAGVNYVLLPPVSFD.DLPADVRIETRICLTITRSLPFVRDAVKTLAT.TK.LAALVVDL
2ACV 064 ASQPQ.IQLIDLPEVEPP.PQELLKSPEFYILTFLES LI PHVKATIKTILSN..K.VVGLVLDLDF
2C1X 058 htmQCNIKSYDISDGVPE.GYVFAGRPQEDIELFTRAAPESFRQGMVMAVAETGREVSCLVADA
1IIR 053 VGPs...aRapiqraKPLTAE.....DVRRTTEAIATQF..DEIPAAEGC..AAVVTGLL
1PNV 053 VGRA...VRAGAREPGELPP.....GAAEVVTEVVAEWF..DKVPAAIEGC..DAVVTGLL
1RRV 053 VGLP...QHMLQEGMPPPPPE.....EEQRLAAMTVEMQF..DAVPGAEGC..AAVVAVGDL
#
AS 116 F.GTDAFDVAIEFKVSPYIFYPTTAMCLSLFFHLP...KLDQMVSC EYRDVPEPLQ.IPGCIP
2ACV 123 F.CVSMIDVGNFEGIPSYLFLTSNVGFLSLMLSLKN..RQIEEVFDDSDRD.HQLLN.IPGISN
2C1X 121 F.IWFAADMAAEMGVAWLPFWTAGPNSLSTHVYIDE.IREKIGVSGIQGRE.DELLNFI PGMSK
1IIR 104 AAAIGVRSVAEKL GIPYF.YAFHCPSYVSPYPPPlgeps.....tqdtID
1PNV 103 PAAVAVRSMAEKL GIPYR.YTVLSPDHL PSE.....Q
1RRV 105 AAATGVRSVAEKLGLPFF.YSVSPVYL ASPHLPPA.YDEPT.....TPGVTD
#
AS 174 IHGKDFLDPAQDRKND.AYKCLL.HQAKRYRLAEGIMVNTF.NDLEPGPLKALQEEDQGKPPVY
2ACV 182 QVPSNVLPDACFNKDG.GYIAYY.KLAERFRDTKGIIVNTF.SDLEQSSIDALYDHDEKIPPIY
2C1X 182 VRFRDLQEGIVFGNLNSLFSRMLHRMGQVLPKATAVFINSF.EELDDSLTN...DLKSKLKTYL
1IIR 151 I.....PAQWE.RNNQSAYQRYGGLLN SHRDAIGLPPVEDIFTFGYTDHPWV
1PNV 134 S.....QAERD.MYNQGADRLFGDAVNSHRASIGLPPVEHLYDYGYTDQPWL
1RRV 151 I.....RVLWE.ERARFADRYGPTLNRRRAEIGLPPVEDVFGYGHGERPLL
#
AS 235 PIGPLIR..ADSSS.KVDDCE...CLKWL..DDQPRGSV.....LFISFGSGG.AVSH
2ACV 243 AVGPLLDLKGQPNP.KLDQAQHDLILKWL..DEQPKSV.....VFLCFGSMGVSF GP
2C1X 242 NIGPFNLI..Tppp.vvpnttG..CLQWL..KERKPTSV.....VYISFGTVT.TPPP
1IIR 197 AADPVL...APLQPTDLDAVQTGA...WILPDERPLSPELAAFLDAGPPP VYLGFGsIga.P..
1PNV 180 AADPVL...SPLRPTDLGTVQTGA...WILPDERPLSAELEAFLAAGSTPVYVGFSSSR.PAT
1RRV 197 AADPVL...APLQP.DVDAVQTGA...WLLSDERPLPPELEAFLAAGSPVHIGFGSSSG.RGI
#
AS 279 NQFIELA.LGLEMSEQRFLWVVRSPNDKIANATYFSIQNQNDALAYLPEGFLE..RTKGRCLLV
2ACV 293 SQIREIA.LGLKHS GVRFLWSNS.AE.....KKV.FPEGFLEWMELE GKGMIC
2C1X 287 AEVVALS.EALEASRVPFIWSLR.DK.....ARVHLPEGFLE..KTRGYGMVV
1IIR 252 ADAVRVAIDAIRAHGRRVILS.RGWADLV.....LPDDGADC.....
1PNV 237 ADAAKMAIKAVRASGRRIVLS.RGWADLV.....LPDDGADC.....
1RRV 253 ADAAKVAEIRAQGRRIVLS.RGWTELV.....LPDDRDC.....
# # # #
AS 340 PSWAPQTEILS.HGSTGGFLTHCGWNSILES SVVNGVPLIAWPLYAE...QKMNVA MLT.EG.L
2ACV 338 .GWAPQVEVLA.HKAIGGFVSHCGWNSILESMWFGVPIITWPIYAE...QQLNAFRLVKEWGV
2C1X 331 P.WAPQAEVLA.HEAVGAFVTHCGWNSLWESVAGGVPLICRPFPGD...QRLNGRMVE.DV.L
1IIR 288 .FAIGEVNHQVLFGRVA AVIHHGGAGTTHVAARAGAPQIILLPQMAD...QPYYAGRVA...EL
1PNV 273 .FVVGEVNLQELFGRVA AAIHHD SAGTLLAMRAGIPQIVVRRVv dnvveqaYHADRVA...EL
1RRV 289 .FAIDEVNFQALFRRVA AVIHHGSAGTEHVATRAGVPLVIPRNTD...QPYFAGRVA...AL
! (SS NN) !
AS 397 KVALRPKAGENG.LIGRVEIANAVKGLMEGEEGKKFRSTMKDLKDAASRALSDDGSSTKALAE L
2ACV 396 GLGLRVDYRKGSDVVAEEIEKGLKDLM..DKDSIVHKKVQEMKEMSRNAVVDGSSLSISVGKL
2C1X 387 EIGVRIE...G.GVFTKSGLMSCFDQILS QEKGKLLRENLRALRETADRAVGPKGSSTENFITL
1IIR 344 GVGVAHD....GPIPTFDSL SAALATALTPET.....HARATAVAGTIRT DGAAVAARLLL
1PNV 333 GVGVAVD....GPVPTIDSL SAALDTALAPEI.....RARATTVADTIRADGTTVA AQLLF
1RRV 345 GIGVAHD....GPTPTFESLSAALTTVLAPET.....RARAEAVAGMVLTDGAAAAADLVL
#
AS 460 ACKWE...NKISST.....
2ACV 458 IDDTG.....
2C1X 447 VDLVSKPKDV.....
1IIR 396 DAVSR...Ekptvsalehhhhh
1PNV 385 DAVSL...Ekptvpalehhhhh
1RRV 397 AAVGR...ekpavpalehhhhh

```

Während keine Mutation einer räumlich möglichen Aminosäure in GtfB zu vollständigem Aktivitätsverlust führte, und somit keine Aminosäure eindeutig für diese Aktivierung identifiziert werden konnte (MULICHAK *et al.*, 2001), wurde für UGT71G1 und VvGT1 His22 bzw. His20 als katalytische Aminosäure bewiesen (SHAO *et al.*, 2005, OFFEN *et al.*, 2006). An Hand der entsprechenden Strukturen konnte gezeigt werden, dass das deprotonierende His durch ein Asp (119 für VvGt1, 121 für UGT71G1) stabilisiert wird. In AS sind sowohl His als auch Asp vorhanden. Bei den drei bakteriellen Enzymen liegt an der Position des Histidins ein konserviertes Aspartat (Abbildung 36). Auch die im Ergebnis Teil erwähnte PSPG-Box (AS-Sequenz 342-385) kann bei den drei Enzymen aus *Amycolatopsis orientalis* nicht gefunden werden. Offensichtlich weichen die Reaktionsmechanismen der beobachteten bakteriellen Enzyme erheblich von denen der Pflanzlichen ab.

Im folgenden Absatz wird AS deshalb nur noch mit den beiden pflanzlichen Enzymen verglichen. Dazu werden die Strukturen von UGT71G1 und VvGt1 herangezogen und mit dem Alignment in Abbildung 36 die Positionen der in der Arbutin-Synthase betrachteten Aminosäuren in diesen Strukturen bestimmt.

Auf der Suche nach dem nativen Translationsstart synthetisierte HEFNER N-terminal verkürzte Proteine, beginnend mit Met9 und Met15, und verglich deren Aktivität mit dem bisher genutzten Translationsstart Met1 (HEFNER, 2002).

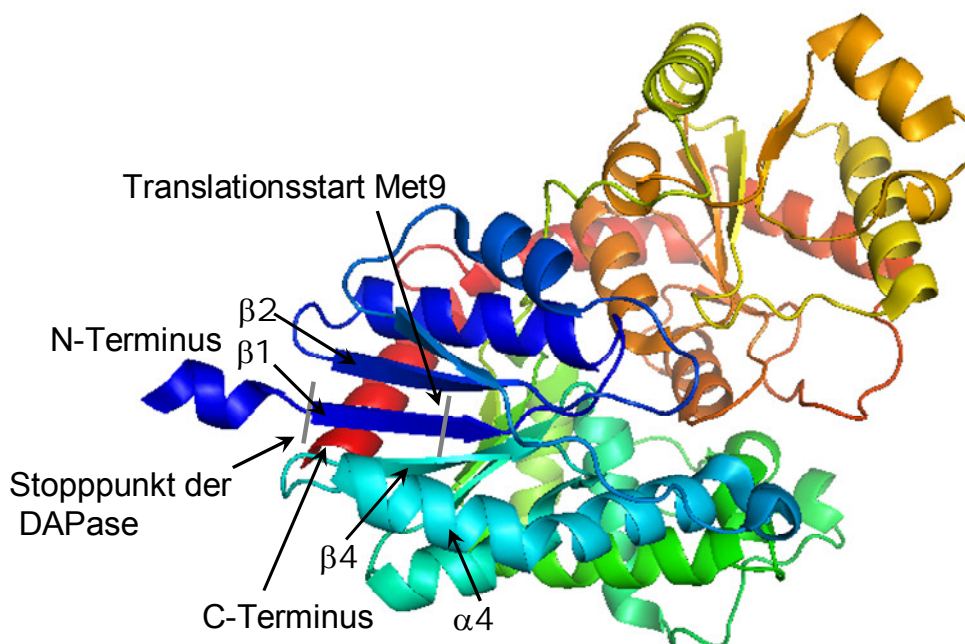


Abbildung 37: Bedeutung des N-Terminus für die Faltung der Familie GT-1
 Struktur der UGT71G1 vom N-Terminus in dunkelblau zum C-Terminus in rot gefärbt. Gezeigt werden die veränderten N-Termini nach der DAPase bzw. mit Met9 als Translationsstart, anhand des Sequenzalignments (Positionen der Aminosäuren der Arbutin-Synthase). β 1,2,4 und α 4 zeigen die Sekundärstrukturelemente um β -Strang1.

Die Aktivität sank auf 3 bzw 2 % ab. Ein Hinweis für die Bedeutung des N-Terminus für die Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnten die für die Aktivität essentiellen Aminosäuren durch den Einsatz der DAPase mit dem intrinsischen Stopppunkt Pro5 weiter eingegrenzt werden. Durch die DAPase wurden die ersten vier Aminosäuren ohne Aktivitätsverlust entfernt. Ein deutlicher Unterschied zu den 3% rel. Aktivität der Met9-Mutante. In Abbildung 37 erkennt man die Bedeutung des N-Terminus. Keine der in diesem Bereich vorhandenen Aminosäuren ist direkt an der Reaktion oder an der Bindung der Substrate beteiligt, stattdessen bilden sie den ersten Strang des zentralen β -Faltblattes der N-terminalen Domäne. Er ist umgeben von Strang 2 (dunkelblau), Strang 4 (hellblau), Helix 4 (hellblau) und dem C-Terminus (rot). Die verringerten Aktivitäten lassen auf eine falsche Ausbildung der N-terminalen Domäne schließen.

An den erst seit kurzem zugänglichen Strukturen lassen sich auch die getesteten Mutationen bewerten. Der Versuch C-terminal die AS zu verkleinern brachte nur inaktive Mutanten zustande (Ergebnisse 1.5). Im Vergleich mit den Strukturen von UGT71G1 und VvGT1 wird ersichtlich, wie der C-Terminus in Form einer α -Helix von der C-terminalen Domäne zur N-terminalen Domäne verläuft. Dies trägt auf der einen Seite zur Stabilisierung der N-terminalen Domäne bei, da die teils hydrophoben Seitenketten des Zentralen β -Faltblattes gegen das Solvenz abgeschirmt werden, auf der anderen Seite fixiert der C-Terminus so auch die Position der beiden Domänen

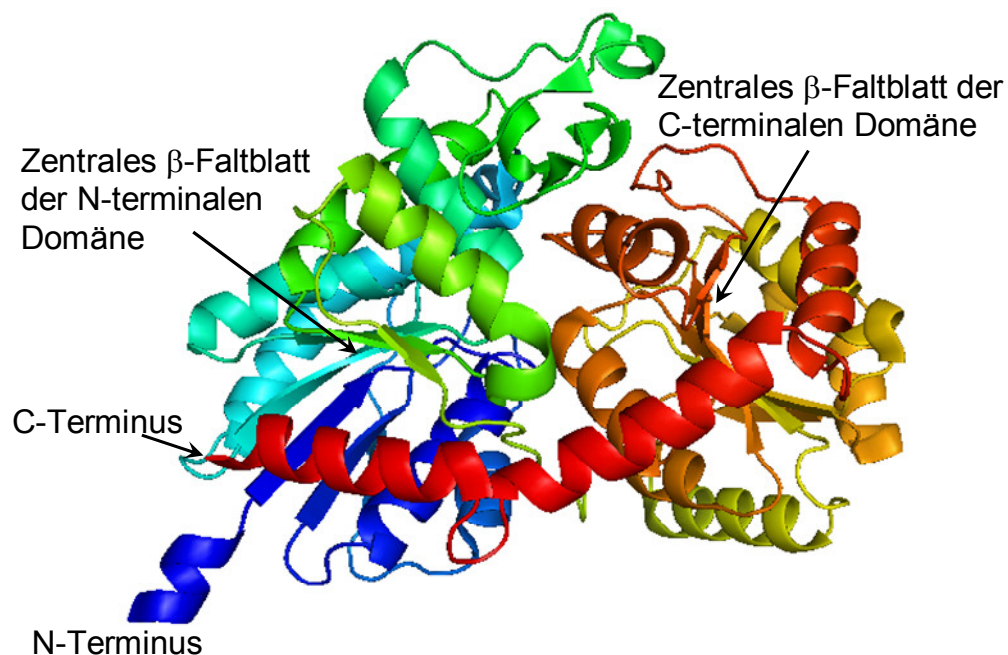


Abbildung 38: Bedeutung des C-Terminus für die Faltung der Familie GT-1
Struktur der UGT71G1 vom N-Terminus in dunkelblau zum C-Terminus in rot gefärbt. Zu erkennen ist, wie der C-Terminus die beiden Domänen verbindet.

zu einander fest. Möglicherweise kann auch die niedrige Expressionsrate damit erklärt werden. Denn CHRISTOPHER UND BALDWIN (1996) fanden eine statistische Häufung der ausgesprochenen Nähe der beiden Termini, die sie damit erklärten, dass der N-Terminus während der Synthese des Proteins festgehalten wird und zum Schluss das fertige Enzym abgegeben wird. Dadurch sollte sich das Protein falten unter definierten Positionen für N- und C-Terminus. In den betrachteten Glykosyltransferasen überbrückt der C-Terminus eine weite Strecke mit den letzten Aminosäuren, so dass eine korrekte Faltung, bei der der verkürzte C-Terminus in der Nähe des N-Terminus sein soll, erschwert wird.

Der Versuch, durch die Doppelmutation His360Glu, Glu368His eine veränderte Stereospezifität zu erzeugen (von invertierend zu beibehaltend), war gescheitert. Stattdessen wurde das Enzym vollständig inaktiviert. Anhand der Struktur von VvGT1 im Komplex mit dem Substrat Kämpferol und der nicht-transferierenden UDP-2-deoxy-2-fluoro-Galaktose kann im Nachhinein auch dieses Ergebnis erklärt werden. Die mutierten Aminosäuren liegen in der konservierten PSPG-Box, so dass auch ihre Struktur wahrscheinlich konserviert ist. Die Aminosäuren, die in VvGT1 den Aminosäuren His360 und Glu368 aus AS entsprechen, sind His350 und Glu368. Wie in Abbildung 39 gezeigt, sind sie an der Bindung des Zuckerdonors beteiligt. Dabei nimmt besonders His350 einen wichtigen Part ein, da es die sehr bewegliche Diphospho-Bindung räumlich stabilisiert. Bei Veränderung dieser Aminosäuren nimmt die Aktivität des Enzyms deutlich ab, doch um die Stereospezifität des Enzyms zu ändern müsste das Substrat den Zucker von der anderen Seite angreifen. Dafür sind weitere reichende Veränderungen nötig, wie zum Beispiel das Design einer neuen Zuckerbindungsstelle oder das Design eines zweiseitigen Reaktionsmechanismus.

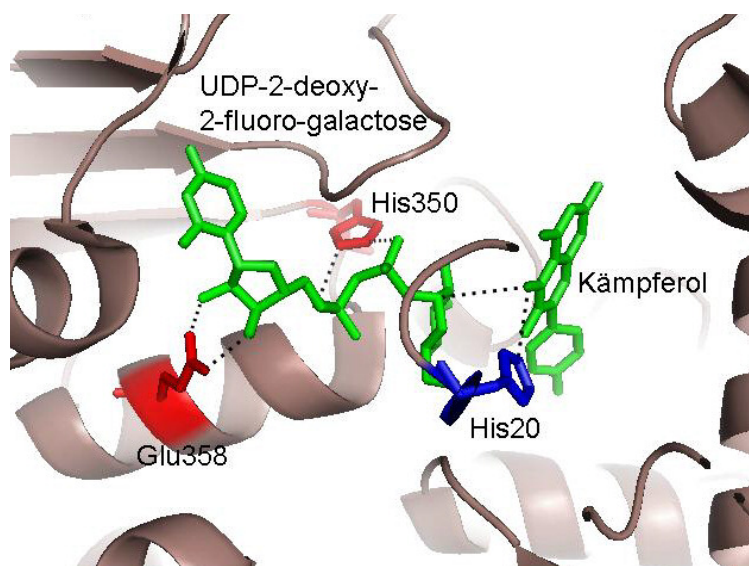


Abbildung 39: Das Katalytische Zentrum von VvGT1

In grün das Substrat Kämpferol und der Cofaktor UDP mit der nicht übertragbaren 2-deoxy-2-fluoro-Galaktose, in blau das katalytisch wirksame His20, in rot die zu den in der Arbutin-Synthese mutierten, analogen Aminosäuren Glu350 und His358 (AS-Glu360 und His368), als gepunktete Linien die möglichen H-Brückenbindungen zwischen den Aminosäuren und den Substraten, bzw. der mögliche Angriff des aktivierten Kämpferols am Zucker.

Für beide sehr anspruchsvollen Beispiele spielen die Aminosäuren His360 und Glu368 eine untergeordnete Rolle, da sie das Grundgerüst des Zuckerdonors binden. Vorschläge für eine Verwirklichung dieser Stereospezifitätsumkehr an der AS lassen sich ohne eine aufgeklärte 3D-Struktur nicht machen, da die genetisch sehr flexible Aglykonbindungstelle involviert ist. Da alle Kristallisationsversuche missglückten, steht die benötigte 3D-Struktur der AS nicht zur Verfügung.

Ein Ansatz zur Verbesserung der Kristallisation war der Ausschluss von flexiblen Domänen. Wie bereits beschrieben eigneten sich die beiden Termini nicht dafür. Anhand der neuen Strukturen der pflanzlichen Glykosyltransferasen konnte bereits die Bedeutung der Termini gezeigt werden. Daneben wurde auch ein Sequenzabschnitt in der Mitte der AS mutiert. Abbildung 40 zeigt, an der Struktur der UGT71G1, die Lage der analogen Aminosäuren in der AS. Die Struktur ist nach ihrem kristallographischen Temperaturfaktor gefärbt. Rot zeigt Regionen mit besonders hohem Temperaturfaktor (über 80 \AA^2), was eine besondere Flexibilität zeigt. Zu erkennen sind zwei solcher Regionen. Die mit Hilfe von DisEMBL gewählte, mutierte Region ist nur gelb eingefärbt (um 40 \AA^2), besitzt also nur mässige Flexibilität. Allerdings ist die Sequenz bei beiden Enzymen vollständig verschieden, was einen Vergleich der möglichen Flexibilität erschwert.

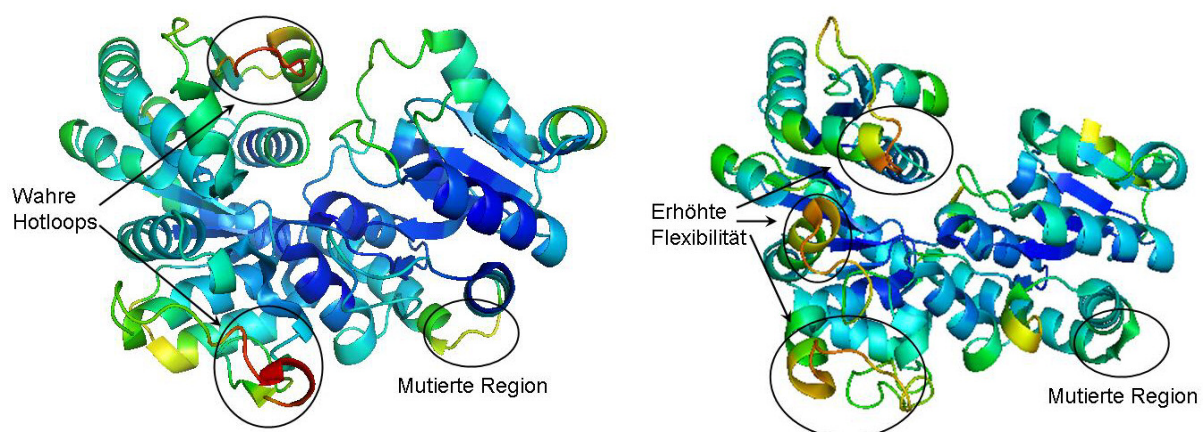


Abbildung 40: Struktur der UGT71G1 (links) und VvGT1 (rechts), eingefärbt nach kristallographischem Temperaturfaktor
 Gekennzeichnet sind die Regionen hoher Flexibilität in der Struktur 2ACV (links) und 2C1X (rechts), und die dem Sequenzalignment nach der in der Arbutin-Synthase mutierten Region entsprechende Region.

Die Struktur von VvGT1 zeigt in der Region kaum Flexibilität, obwohl die Sequenzen an der Position weitgehend übereinstimmen. Dies zeigt, zusammen mit dem negativen Ergebnis der Kristallisationsversuche der AS, das diese Region nicht im gedachten Sinne eine Rolle für die Kristallisation spielt. In der Abbildung 40 erkennt man jedoch weiter, dass es andere flexible Regionen gibt, die in einem geordneten

Bindemechanismus diskutiert werden (SHAO *et al.*, 2005, QASBA *et al.*, 2005). Dabei wird davon ausgegangen, dass bei verschiedenen Enzymen zuerst Substrat oder Cosubstrat an das Enzym binden und dabei von einem flexiblen Teil des Enzyms umschlossen werden. Dieser Teil wird so stabilisiert und formt zusammen mit dem bereits gebundenen (Co-) Substrat die Bindungsstelle für den zweiten Reaktionspartner. Diese Stabilisierung erleichtert die Kristallisation, so dass die meisten strukturell aufgeklärten Glykosyltransferasen nur als Komplexe mit Substrat oder Cosubstrat in der PDB verzeichnet sind. Auch für die AS macht es also Sinn, die Kristallisationsversuche mit Substrat, Cosubstrat oder dem kompetitiven Inhibitor Dichlorphen fortzusetzen.

Zum Abschluss meiner Arbeit war es nicht möglich, hochreine Arbutin-Synthase zu gewinnen. Auch wenn es Beispiele für die Reinigung von Makromolekülen durch Kristallisation gibt (JAKOBY *et al.*, 1971, JUDGE *et al.*, 1995), einer bei niedermolekularen Substanzen üblichen Technik, kann die fehlende Homogenität einer Proteinlösung zu Wachstumsfehlern in einem Kristall führen (THOMAS *et al.*, 1996, VEKILOV UND ROSENBERGER, 1996). Bei der Vielzahl der Kristallisationsansätze und der verwendeten Techniken bleibt der Schluss, dass in diesem Fall die Wachstumsfehler zum Ausbleiben erkennbarer Kristalle führten. Die Arbutin-Synthase wurde mit verschiedenen Techniken versucht aufzureinigen, zuerst die „Immobilized Metal Affinity Chromatography“ (IMAC) mit Ni-NTA (neben anderen Metallionen). IMAC ist ein sehr leistungsfähiges Verfahren, das in anderen Fällen ohne weitere Reinigungsschritte auf Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ein homogenes Protein liefern kann (ROSENTHAL, persönl. Mitteilung, HILL, persönl. Mitteilung), das direkt zur Kristallisation eingesetzt werden kann. Die schwache Bindung der AS an das Säulenmaterial (siehe Ergebnisse 1.8) ist sicher ein Grund dafür, dass diese Chromatographie hier nicht ihr volles Potential entfalten kann. Zusätzlich wurde mit der Gelfiltration (Sephadex) ein Grössenausschlussverfahren verwendet. Diese Methode ist besonders üblich für die Kristallisation von Proteinen, um verschiedene Oligomerisationszustände des gleichen Proteins voneinander zu trennen. Der Hauptpeak der AS-Aufreinigung zeigt auf einem SDS-Gel zwei gleichstarke Banden. Also konnte das Produkt einer Grössenausschlusschromatographie, nach Denaturierung, durch eine elektrophoretische Grössentrennung in zwei deutlich unterschiedliche Banden getrennt werden. Zuletzt wurde der starke Anionenaustauscher MonoQ verwendet. Während im UV-Elutionsprofil mehrere kleine Peaks sichtbar wurden, die abgetrennt werden konnten,

zeigte ein anschliessendes SDS-Gel dieselben Banden, die nach der Grösse-nausschlusschromatographie vorhanden waren. Ausser auf denaturierendem Weg scheinen die Proteine nicht zu trennen zu sein. Dieses Ergebnis spricht für eine kovalente Verknüpfung der Proteine. Diese Überlegung wird von dem deutlich über dem Durchschnitt liegende Anteil an Cysteinen in der Sequenz der AS unterstützt. Die Aminosäurezusammensetzung der in der SWISS-PROT Datenbank eingetragenen Enzyme wurde statistisch untersucht und dabei nehmen Cystein (1,5 %) und Tryptophan (1,1 %) die letzten Plätze ein (Abbildung 41, <http://www.expasy.ch/sprot/relnotes/relstat.html>).

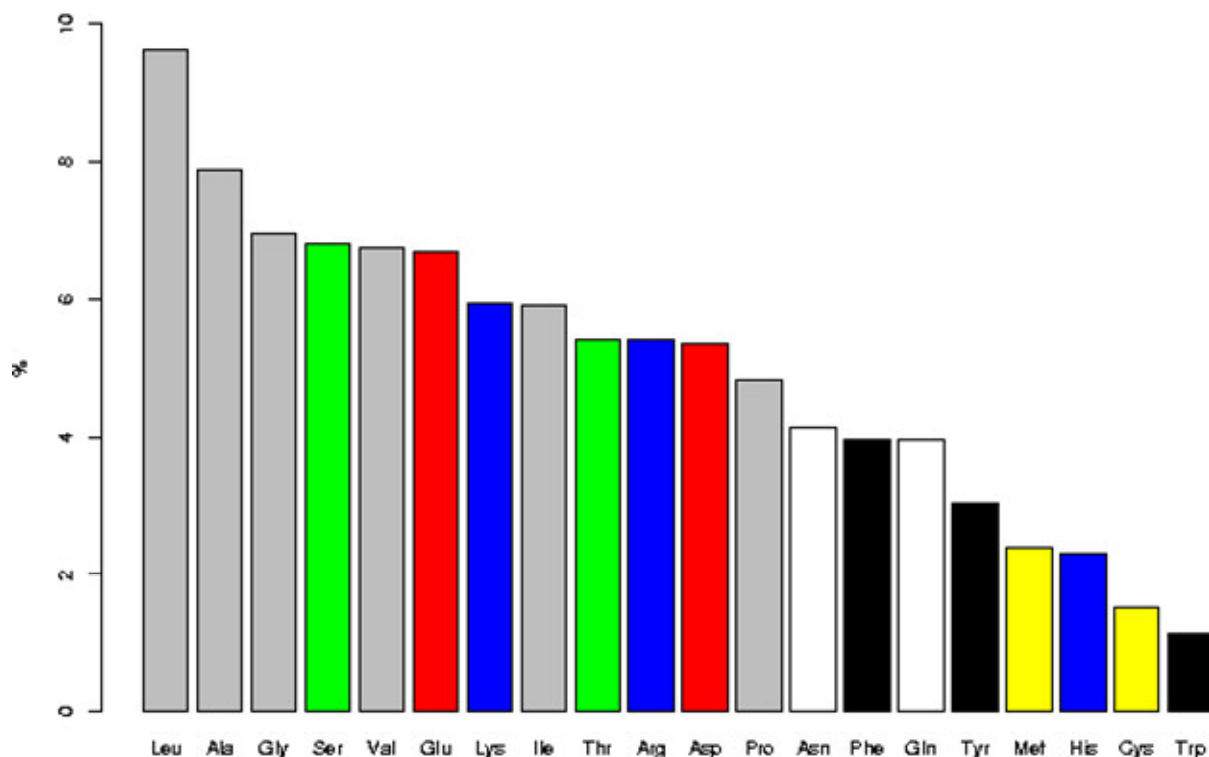


Abbildung 41: Durchschnittliche Aminosäurezusammensetzung der Enzyme in der SwissProt-Datenbank

grau = aliphatisch und hydrophob, rot = sauer, grün = Alkohol, blau = basisch, schwarz = aromatisch, weiss = Amidstruktur, Gelb = Schwefelhaltig.

In der AS sind 10 der 470 Aminosäuren (2,1 %) Cysteine. Durch diese Häufung von Cysteinen werden Disulfid-Brücken zwischen verschiedenen Molekülen wahrscheinlicher. Dabei ist die Bildung von Homo- aber auch Heteromeren möglich. Die nicht mehr globuläre Form eines solchen Aggregates würde auch die verlängerte Retentionszeit, im Vergleich zur Kalibrierung, während der Gelfiltration erklären. Der kleinere Bindungspartner der AS hält das Aggregat länger auf der Säule, als es der Gesamt-molmasse nach zu erwarten wären. Die Notwendigkeit von MSH für die Aktivität des Enzyms ohne Beteiligung von Cysteinen am Reaktionsmechanismus ist auch ein

allgemeiner Hinweis auf die Bedeutung von freien Sulfhydryl-Gruppen für das Enzym. MSH schützt diese Gruppen vor der Oxidation und Bildung von zum Beispiel Disulfid-Brücken. Ohne MSH verliert das sonst sehr stabile Enzym innerhalb weniger Stunden reversibel seine Aktivität. Nach Zugabe von MSH kann die Aktivität vollständig wiederhergestellt werden.

Um doch noch die Kristallisation der AS zu ermöglichen wäre es von Vorteil, zunächst die Identität der Verunreinigung über eine Sequenzierung der Bande auf dem SDS-Gel festzustellen. Eventuell ist sie ein Abbauprodukt der AS. Dagegen spricht jedoch die bereits erwähnte Stabilität des Enzyms. Bei der Aufreinigung aus Pflanzenmaterial war die gefundene Verunreinigung nicht vorhanden (AREND *et al.*, 2000). Ist sie kein Abbauprodukt, wäre es also möglich die Coexpression der Verunreinigung durch einen Wechsel des Expressionssystems zu, zum Beispiel, Hefezellen zu umgehen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hefezellen einen neuen Reaktionspartner für die freien Sulfhydrylgruppen der AS bereitstellen. Eine zweite Möglichkeit wäre einzelne oder mehrere Cysteine zu Serinen zu mutieren. Durch den formalen Ersatz des Schwefelatoms durch ein Sauerstoffatom bleibt die Hydrophilie gewahrt, und damit die Faltung bestehen, während die Bildung von Disulfid-Brücken unmöglich wird. Abbildung 42 zeigt die Positionen der Cysteine analog zum Alignment (Abbildung 36) anhand der Struktur der UGT71G1. Sechs der zehn Cysteine liegen auf den Sekundärstrukturelementen der konservierten doppelten Rossmann-Domänen. Durch die konservierte Faltung kann man davon ausgehen, dass Sie in der AS an ähnlichen Positionen liegen.

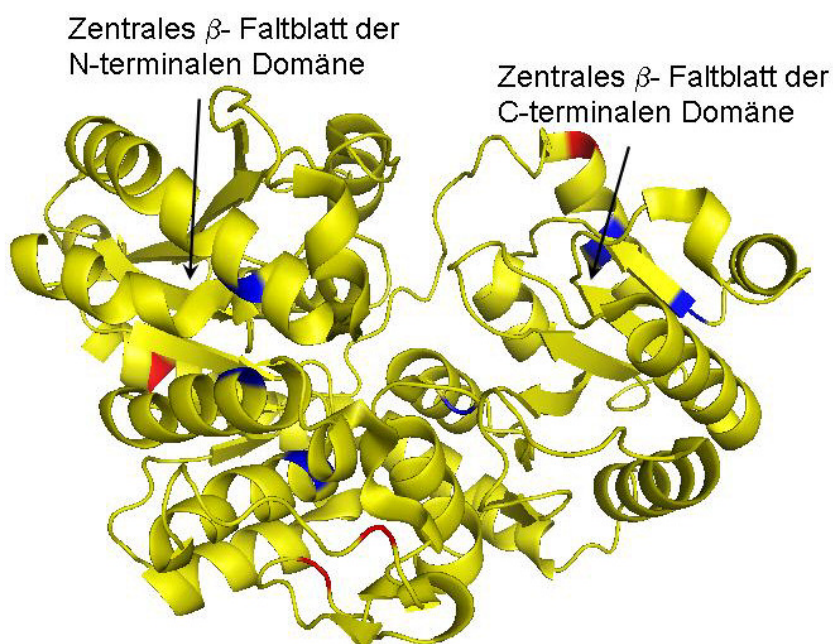


Abbildung 42: Positionen von Cysteinen der Arbutin-Synthase, analog dem Alignment, an der Struktur der UGT71G1

In blau innenliegende Cysteine, in rot an der Oberfläche des Enzyms liegende Cysteine.

Fünf dieser Cysteine liegen im Inneren des Enzyms. Ile266 von UGT71G1 entspricht im Alignment dem Cys253 der AS. Es liegt auf der letzten α -Helix der N-terminalen Rossmann-Domäne. Danach folgt eine lange undefinierte Schleife zur C-terminalen Rossmann-Domäne. Ile266 liegt direkt vor einer zwischen AS und UGT71G1 übereinstimmenden Sequenz, die diese Helix abschliesst. Es ist also wahrscheinlich, dass AS-Cys253 genau wie UGT71G1-Ile266 dem Solvens, und damit anderen Molekülen, zugänglich ist. AS-Cys253Ser ist daher die erste Mutation, die zu einer erfolgreichen Kristallisation führen könnte.

UGT71G1-Asp459 liegt nahe dem C-Terminus, auf der beide Rossmann-Domänen verbindenden α -Helix, und entspricht AS-Cys461. Typisch für eine an ein Enzym anliegende α -Helix ist das Abwechseln von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren, die im Verlauf der Helix abwechselnd in das Enzyminnere und zum Solvens zeigen. Da in der Sequenz der AS in der Umgebung von Cys461 dieses abwechselnde Verhalten vorliegt, kann man davon ausgehen, dass Cys461 dem Solvens hingewandt ist. Die Mutante AS-Cys461Ser wäre vielleicht die zweite Möglichkeit Kristalle der AS zu erhalten.

Die letzten drei Cysteine liegen in der variablen Verbindungsdomäne zwischen den beiden Rossmann-Domänen. AS-Cys171 ist davon auf Grund der entsprechenden Lage in UGT71G1 und der umgebenden konservierten Sequenz auch ein zusätzliches Ziel für eine Mutation.

Mit der dreifachen Mutante AS-Cys253Ser, Cys461Ser, Cys171Ser und einem Wechsel des Expressionssystems kann in Zukunft die Kristallisation der AS hoffentlich erfolgreich fortgeführt werden.

2 Strictosidin Glukosidase

Die Strictosidin Glukosidase wurde auf Grund ihrer Sequenz in die Familie 1 der Glykosylhydrolasen (GH-1) eingeordnet (HENRISSAT, 1991, HENRISSAT UND DAVIES, 1997). Von den 723 Enzymen der Familie GH-1 sind lediglich 16 Strukturen (~2 %) bekannt, sechs sind eukaryotischen Ursprungs, fünf kommen aus dem Pflanzenreich. Neu hinzukommen die Strictosidin Glukosidase und die, von Dr. Martin Ruppert kristallisierte, Raucaffricin Glukosidase (noch unveröffentlicht). Dabei grenzt sich die SG durch ihre biosynthetische Aufgabe in der Zelle stark von den anderen bekannten, pflanzlichen Glukosidasen ab. Die anderen Glukosidasen, die cyanogene β -Glukosidase, CBG (EC 3.2.1.21) aus *Trifolium repens*; ZmGlu1 (EC 3.2.1.21) aus *Zea maize*; Zmp60.1 (EC 3.2.1.21) aus *Z. maize*; die Myrosinase (EC 3.2.1.147) aus *Sinapis alba* und die Dhurrinase1, Dhr1 (EC 3.2.1.21) aus *Sorghum bicolor*, setzen Abwehrstoffe aus ihrer glukosylierten Speicherform frei. Die Enzyme und ihre Substrate sind in unterschiedlichen Kompartimenten oder Zellen gelagert. Erst bei Verletzung der Zelle können die Enzyme zu den Substraten gelangen und diese in ihre aktive Form umsetzen. Eine ähnliche Bedeutung wurde auch für die Strictosidin Glukosidase angenommen. Strictosidin wird in der Vakuole gespeichert (STEVENS *et al.*, 1993), getrennt von der SG im endoplasmatischem Retikulum (ER) (LUIJENDIJK *et al.*, 1998). Besonders für die reaktiven Strictosidin-Produkte aus *C. roseus* konnten antimikrobielle Aktivitäten nachgewiesen werden (LUIJENDIJK *et al.*, 1996). Soweit scheinen sich all diese Enzyme zu ähneln. SG steht jedoch am Anfang langer Biosynthese Wege zu antimikrobiellen Produkten, in denen noch eine Vielzahl anderer Enzyme benötigt wird. Daher, wegen der Instabilität des direkten Produktes der SG und auf Grund der Nachweisbarkeit der Endprodukte bereits vor einer Verletzung, kann man der SG eine synthetische Aufgabe zuordnen.

SG zeigt die familien-typische TIM-(β/α)₈-Barrel Faltung. Das TIM-(β/α)₈-Barrel ist nach der Triosephosphat-Isomerase, dem ersten aufgeklärten Enzym mit dieser Faltung, benannt. Diese Faltung ist enorm weit verbreitet und kann sehr unterschiedliche Reaktionen katalysieren, dabei zeigen die jeweiligen Enzyme jedoch wenig Homologie zueinander (GERLT UND RAUSHEL, 2003). Für die Faltung charakteristisch sind acht parallele Stränge, die ein β -Faltblatt im Inneren des Enzyms bilden. Die Verbindung wird durch acht α -Helices hergestellt, die die Hauptkette zurück zur N-terminalen Seite der β -Faltblätter führen. Es entsteht ein „Fass“, wobei der Boden aus dem β -Faltblatt und die Wänden aus α -Helices gebildet werden. Die Innenseite

der Wände bestimmen undefinierte Loops. Bei den Glykosidasen findet man $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels in den Clans GH-A, GH-D, GH-H und GH-K. Zu den Clans gehören 24 verschiedene Familien mit Enzymen aus allen Organismen Reichen.

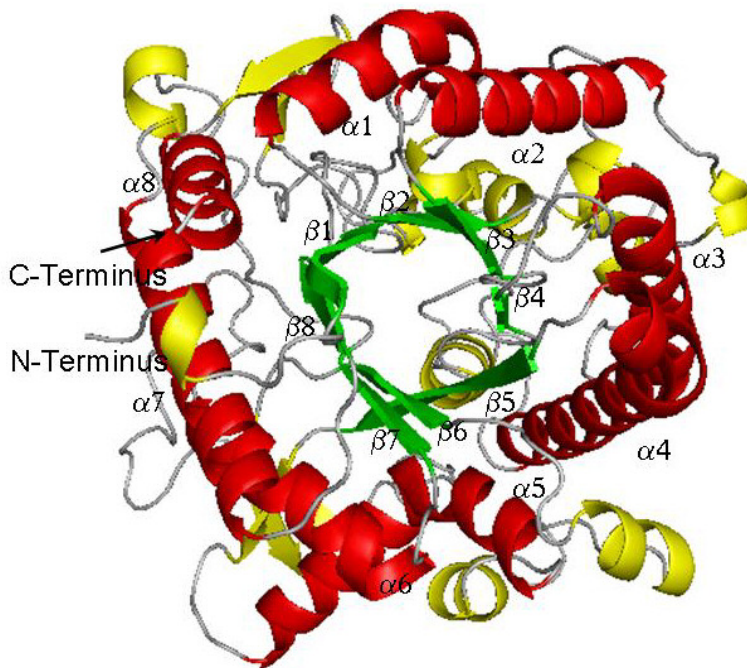
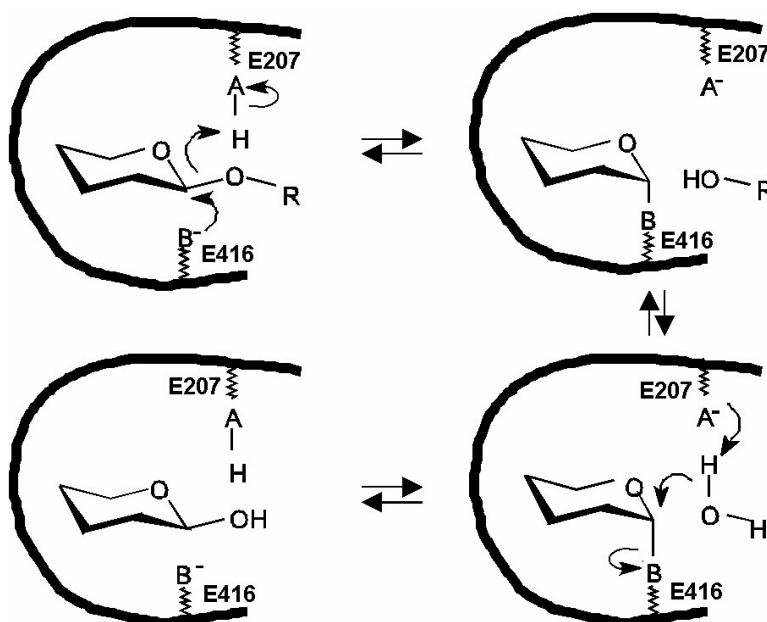


Abbildung 43: Die $(\beta/\alpha)_8$ -Faltung der Strictosidin Glukosidase

Die acht, sich wiederholenden β -Stränge und α -Helices sind grün bzw. rot gefärbt. Alle weiteren Sekundärstruktur-elemente sind gelb gefärbt. Das Enzym wird von der Bindungs-taschen abgewandten Seite gezeigt.

Die Clans wurden auf Grund von vermuteten gemeinsamen Vorfahren und Ähnlichkeit der Tertiärstruktur eingeteilt (HENRISSAT UND BAIROCH, 1996). Die Familie GH-1, und damit auch die Strictosidin

Glukosidase, gehört zu dem Clan GH-A. Bei den Glykosidasen des Clans GH-A wird die Reaktion durch zwei Glutamate katalysiert. Beide Glutamate liegen immer auf den Strängen 4 und 7 des β -Faltblattes, so dass für den Clan der Name "Superfamily 4/7" benutzt wurde (JENKINS *et al.*, 1995). Während der Reaktion überträgt ein Glutamat (in der SG Glu207) ein H^+ auf den Sauerstoff der glykosidischen Bindung, während ein weiteres Glutamat (Glu416) am C1 der Glukose nukleophil angreift. Dadurch wird die glykosidische Bindung gespalten und das Aglykon kann abdiffundieren. Der



Zucker ist kovalent mit dem Enzym verknüpft. In einem zweiten Schritt wird das Enzym mit einem Wassermolekül regeneriert. Das erste Glutamat (Glu207) fungiert nun als Base und übernimmt ein H^+ vom Wasser.

Abbildung 44: Der Reaktionsmechanismus der Strictosidin Glukosidase

Das dabei gebildete Hydroxylion greift nun am C1 der Glukose an und spaltet die Bindung zum Enzym (SANZ-APARICIO *et al.*, 1998). Das pH-Optimum der SG liegt bei 5,2. Bei diesem pH-Wert ist die duale Natur von Glu207 erst als Säure, dann als Base, am Besten zu erreichen. WHITE und ROSE haben 1997 gezeigt, wie der pK_a -Wert der beteiligten Aminosäuren während der Reaktion zwischen 4,6 und 6,7 schwankt. Durch Mutationsexperimente konnten sie auch zeigen, wie die Ladung des Nukleophils (Glu416) den Protonendonator beeinflusst. Auch die stark hydrophile Umgebung mit den Aminosäuren Trp162, Asn206, Thr210, Asn273 und Asn343 um Glu207 bzw. Trp465 und Tyr345 um Glu416 kann die beiden Aminosäuren entsprechend beeinflussen (DAVOODI *et al.*, 1995). Bei dem Design der inaktiven Mutante für den Strictosidin/Enzym-Komplex wurde ausgenutzt, dass für die Reaktion der Abstand zwischen den beiden Glutamaten um 5 Å liegen muss. Durch die Mutationen der beiden Glutamate zu kürzeren Aspartaten wurde der Abstand vergrößert, und das Enzym inaktiviert.

Der Zuckeranteil des Substrats liegt tief im Enzym und das Aglykon zeigt zum Lösungsmittel. An der Zuckerbindung sind nur hydrophile Aminosäuren beteiligt, obwohl in einigen Glykosidasen die zu Tyr481 analoge Aminosäure zu einem Phenylalanin mutiert ist. Diese steht dann im Kontakt zu der hydrophoben Seite des Zuckers um C5 und C6. Die entsprechende Mutation an der SG, Tyr481Phe, reduzierte die Aktivität des Enzyms nur geringfügig. Vergleiche der Strukturen und ein Sequenzalignment aller Enzyme der Familie GH-1 mit bekannter Struktur zeigen, dass die Kontakte zum Zucker ansonsten konserviert sind in dieser Familie. Im Übergangszustand der Reaktion werden verschiedene Zuckerkonformationen diskutiert. Gemeinsam ist Ihnen, dass C1, C2, O5 und C5 in einer Ebene liegen, um einen Oxocarbeniumionartigen Zustand zu ermöglichen (DAVIES *et al.*, 2003). Dafür sind anscheinend ein Netzwerk an Kontakten zwischen Zucker und Enzym notwendig. His161 hält Kontakt zu O6, dem durch die CH_2 -Brücke beweglichsten Teil des Zuckers. O6 wird weiter durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Gln57 und Trp473 in seiner Position gehalten. Dennoch senkt bereits die einfache Mutation von His161 zu Asparagin oder Leucin die Aktivität auf unter 0,1%. Abbildung 45 zeigt die Vielfalt der Kontakte zwischen Enzym und Substrat im Bereich bis 4 Å.

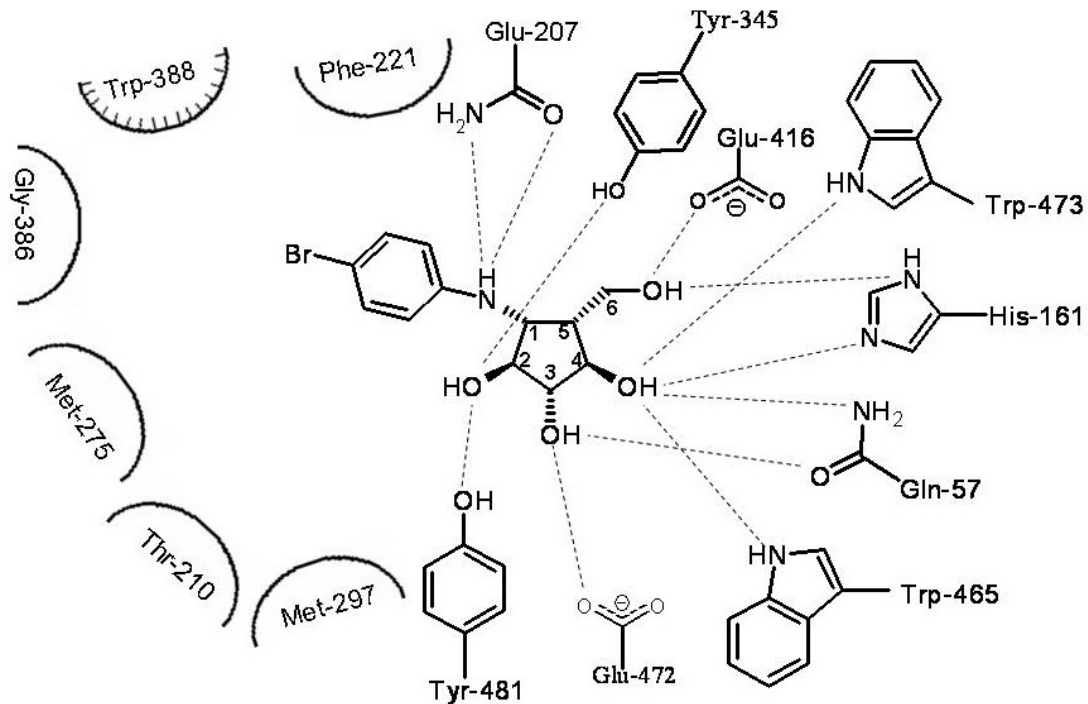


Abbildung 46: Kontakte im gemodelten Inhibitor/Strictosidin Glukosidase-Komplex
 Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Da es sich um eine Modellierung des Inhibitor/Enzymkomplexes handelt, sind keine Distanzen angegeben. Halbkreise mit innen liegenden Markierungen zeigen hydrophobe Kontakte. Zum Vergleich mit dem Strictosidin/Enzym-Komplex sind Aminosäuren, die ausser Reichweite ($> 4.0 \text{ \AA}$) für hydrophobe Kontakte sind, durch Halbkreise ohne innen liegende Markierungen dargestellt.

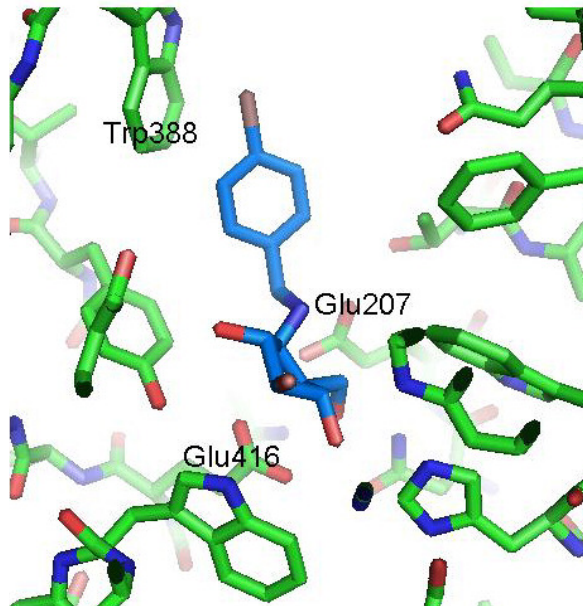


Abbildung 47 (links): Der Glukosidase-Inhibitor VJ-03 im Komplex mit der Strictosidin Glukosidase
 VJ-03 ist in Blau dargestellt. Zusätzlich zu den katalytischen Aminosäuren Glu207 und Glu416 ist das konservierte Trp388 markiert.

von Glu416 wird verhindert. Dadurch kann der Inhibitor kompetitiv das Substrat von der Bindungsstelle verdrängen, ohne selbst gespalten zu werden. Im Unterschied zu vielen anderen Inhibitoren, wie zum Beispiel 1-Deoxynojirimycin, Hydroximolactamen und 2-Fluoroglykosiden, besitzt VJ-03 einen Molekülteil, der das Aglykon simuliert. Wie in Abbildung 46 und 47 zu sehen, tritt dieser ausschliesslich mit dem in Familie GH-1 stark konservierten Trp388 in Kontakt. Zusammen mit der konservierten Zuckerbindungsstelle bindet VJ-03 also ausschliesslich an konservierte Aminosäuren. Dadurch kann der Inhibitor wahrscheinlich an alle Enzyme dieser Familie binden. *N*-Benzyl- β -D-glucosylamin (VJ-01) fehlt im Vergleich zu VJ-03 das Brom am

Aryl-Ring. Dadurch wird sein K_i um eine 10er Potenz herabgesetzt. Die freien Elektronenpaare des Brom scheinen in intensiven Kontakt mit dem π -Elektronensystem des Trp388 zu treten. Auch *N*-(Cyclohexylmethyl)- β -D-gluco-1,5-desoxy-pyranosylamin (VJ-02) fehlt das Brom am entsprechenden Cyclohexyl-Ring. Dennoch zeigt VJ-02 eine vergleichbare Inhibierungskonstante wie VJ-03. Möglicherweise kann der aliphatische Ring von VJ-02 eine Konformation einnehmen, die sich besser in die hydrophobe Umgebung des Trp388 einpassen kann, als der starre aromatische Ring des VJ-01. Durch kristallographische Studien eines entsprechenden Inhibitor/Enzym-Komplexes könnte diese Fragestellung endgültig geklärt werden.

Trp388 ist auch in die Bindung des Strictosidin-Aglykon involviert. Weitere für die Aglykonbindung verantwortliche Aminosäuren sind in Abbildung 45 dargestellt. Von diesen nimmt Trp388 jedoch eine besonders zu betonende Rolle ein. Nicht nur senkt seine Mutation (Trp388Ala) die rel. Aktivität gegenüber Strictosidin auf 1 %. In einem strukturbasierten Sequenzalignment (siehe Anhang) erkennt man, dass Trp388 in den bekannten Strukturen der Familie GH-1 konserviert ist, während die weiteren bindenden Aminosäuren äussert variabel sind. Nur in den beiden Myrosinasen aus *Brevicoryne brassicae* (BMY1, pdb-Eintrag 1WCG) und *Sinapis alba* (pdb-Eintrag 1MYR) kommt Trp388 nicht vor. Diese beiden Enzyme spalten jedoch thioglykosidische Bindungen und setzen sich durch weitere Unterschiede in der Sequenz und dem benötigten Cofaktor Ascorbinsäure weiter von den anderen Enzymen ab (BURMEISTER *et al.*, 2000, HUSEBYE *et al.*, 2005). Sie werden im folgenden Vergleich der bekannten Strukturen der Familie GH-1 nicht weiter berücksichtigt. In den weiteren 15 Enzymen (inklusive der SG) nimmt die Indolseitenkette des Trp388 drei verschiedene Konformationen ein (Abbildung 48). Die bakteriellen und archaeellen Glykosidasen zeigen eine Konformation, bei der der Indolteil des Tryptophans direkt in die Bindungstasche hineinzeigt ($\chi_{1/2} = -60/0$). Mit den Torsionswinkeln $\chi_1 = 65$ und $\chi_2 = -80$ nimmt das Tryptophan in den pflanzlichen Glykosidasen eine Konformation ein, bei der der Indolteil sich an die Hauptkette in Richtung des N-Terminus (kleiner werdende Sequenznummern) anlehnt. Davon weicht die Strictosidin Glukosidase als erstes Beispiel bei den pflanzlichen Glykosidasen ab. Mit $\chi_1 = 180$ und $\chi_2 = 80$ zeigt sie eine dritte Konformation, die entgegengesetzt zu den anderen pflanzlichen Glykosidasen sich an der Hauptkette in Richtung des C-Terminus (höhere Sequenznummern) anlehnt. Auch in der 6-**P**- β -Galactosidase aus dem Bakterium *Lactococcus lactis* Z268 findet sich eine Konformation des Tryptophans, die den pflanzlichen

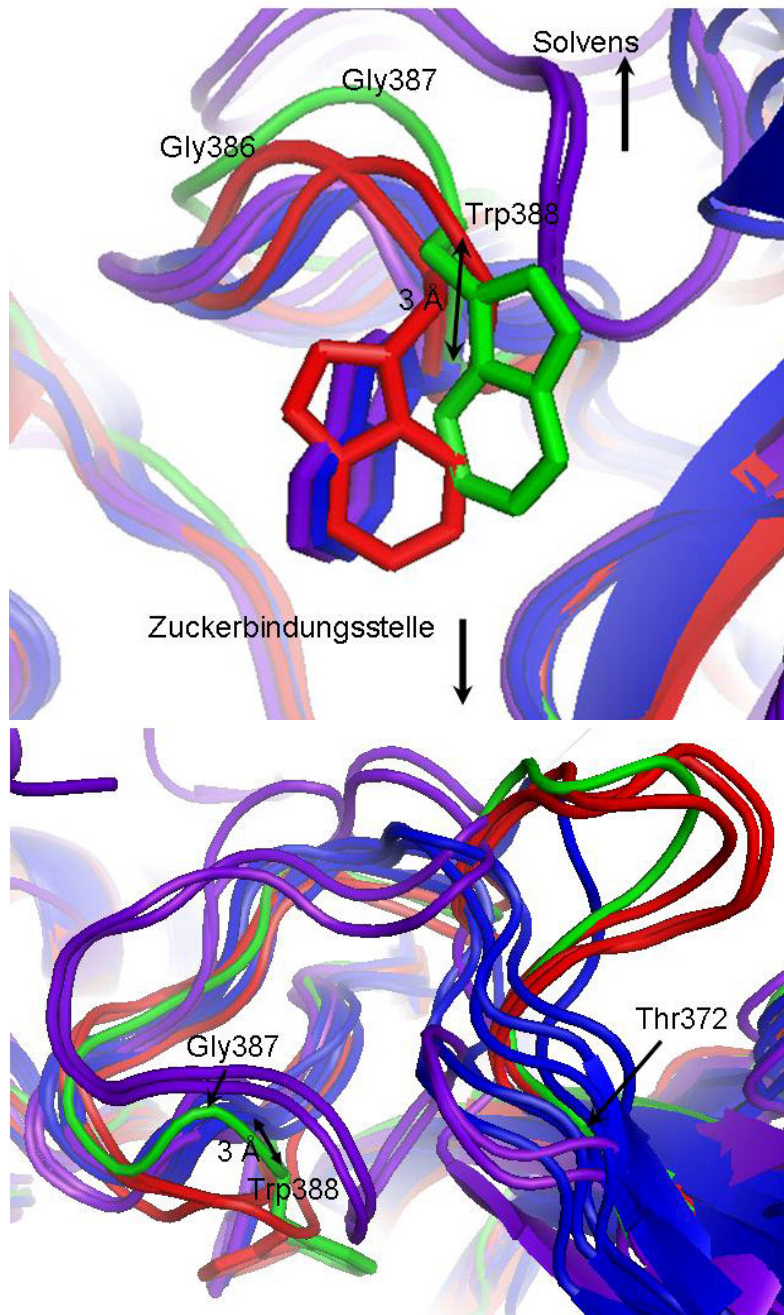


Abbildung 48: Die Konformation von Trp388 in den verschiedenen Enzymen. Die Strictosidin Glukosidase wird in grün, die anderen pflanzlichen Glykosidasen in rot, die Bakteriellen in blau und die Archaeellen in violett dargestellt. Zur Orientierung sind die Richtung zur Protein-Oberfläche (Solvens), zum Inneren (Zuckerbindungsstelle) und die Richtung des Sequenzverlaufs (durch die Aminosäuren) angegeben.

Abbildung 49: Die Region um Trp388. Ein grösserer Überblick über Abbildung 48, die ausserdem um 90 ° nach vorne geklappt wurde. Angegeben sind die Position des Thr372, an der sich die Verläufe der Hauptkette trennen, die Position von Trp388 und der mittlere Abstand zwischen den C α 's der Tryptophane. Ausserdem ist zur Orientierung die Position von Gly387 gezeigt. Die Zucker-Bindungsstelle liegt in der Papierebene hinein, die Protein-Oberfläche liegt in Richtung des Betrachters.

Enzymen ähnelt. Jedoch fehlen die N-terminal folgenden Aminosäuren und auch die Seitenkette des Tryptophans besitzt einen so hohen Temperaturfaktor, dass die wahre Konformation unsicher ist. Mit diesen verschiedenen Konformationen dirigiert die Aminosäure Trp388 das Substrat des Enzyms auf die verschiedenen Seiten der Bindungstasche. Dadurch dass das C α des Tryptophans der bakteriellen und archaeellen Glykosidasen etwa 3 Å tiefer in einer Schlaufe liegt als bei den pflanzlichen Enzymen, nimmt der Indolteil des Tryptophans, trotz der $\chi_{1/2} = -60/0$ Konformation, etwa die gleiche Position wie bei den pflanzlichen Enzymen ein. Damit wird dieser Teil der Bindungstasche blockiert und das Substrat auf die andere Seite gelenkt

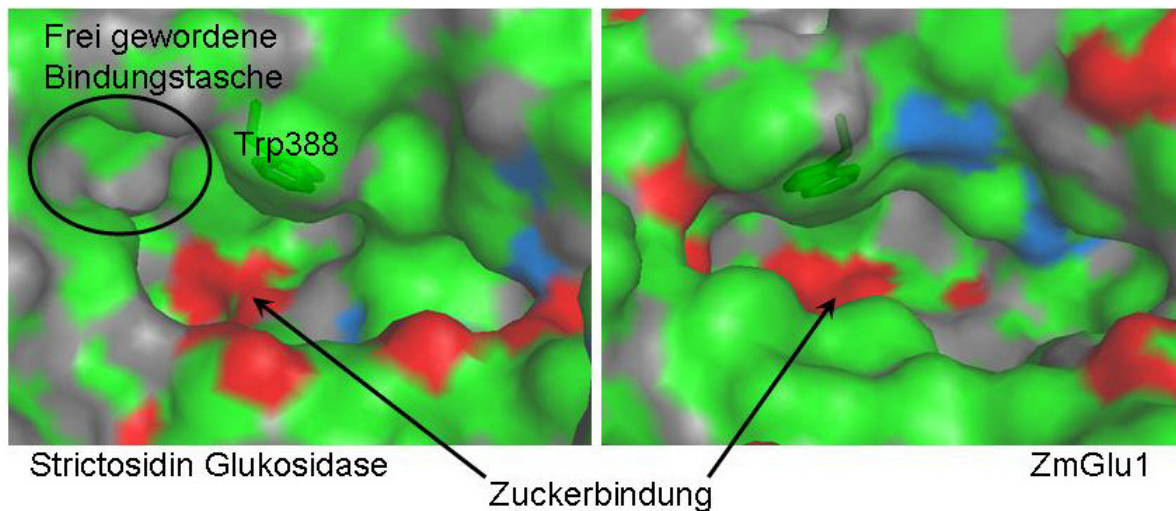


Abbildung 50: Oberflächen-Darstellung der Strictosidin Glukosidase im Vergleich zu einer weiteren pflanzlichen Glykosidase
 Die zweite Glykosidase ist ZmGlu1 aus *Zea mays*. Grün sind hydrophobe, grau hydrophile ungeladene, rot negativ geladene und blau positiv geladene Oberflächen.

(in Abbildung 49 und 50 rechts). In der SG wird somit zum ersten Mal überhaupt beobachtet, dass der Indolteil des Tryptophans eine andere Position einnimmt. Mit der Konformation $\chi_{1/2} = 180/80$ blockiert er hier die „alte“ Bindungstasche und gibt eine neue Bindungstasche, mit anderen für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren, frei (Abbildung 50). Für zukünftige Versuche, aus der Aminosäure-Sequenz eines Enzyms seine Substrate vorherzusagen, wie sie im Zeitalter der Genomprojekte immer wichtiger werden, ist solch eine mögliche Einteilung der Enzyme nach bindenden Aminosäuren von eminenter Bedeutung. Anhand der Struktur von ZmGlu1 aus *Zea mays* wurden bereits vier Aminosäuren identifiziert, die für die Substratbindung verantwortlich sein sollen (CZJZEK *et al.*, 2000). Einem Sequenzalignment mit der SG nach, handelt es sich um Trp388, Asn214, Phe221 und Asn474. Davon sind in der SG aber nur Trp388 und Phe221 an der Substratbindung beteiligt. Phe221 bindet entfernt an den Ethylen-Substituenten des vormaligen Secologanins, und beeinflusst damit die Substraterkennung des Enzyms nur unwesentlich. Also ist für eine Vorhersage des Substrates anhand der Sequenz nicht nur die Art der Aminosäure an einer bestimmten Position von Bedeutung, sondern auch die Unterscheidung, welche Positionen betrachtet werden müssen. Da Trp388 dafür „die Weichen stellt“, muss versucht werden seine Konformation vorherzusagen. Die bakterielle und archaelle Konformation wird durch die veränderte Lage des C_{α} -Atoms veranlasst. Durch die zurückgezogene Lage und die durchweg hydrophoben Aminosäuren in N-terminaler Richtung der Sequenz wird die Seitenkette fixiert. Für eine Vorhersage reichen die hydrophoben Aminosäuren offensichtlich nicht, da sie auch bei den anderen Enzy-

men vorkommen. In Abbildung 49 sieht man, wie die Faltung der Hauptkette bei Thr372 noch beinahe konserviert ist. Danach spaltet sich die Faltung in die verschiedenen Reiche der Organismen auf. Während die bakteriellen Enzyme (blau) in einem weiten Bogen direkt zum Trp388 führen, besitzen die archaeellen (violett) und pflanzlichen Enzyme (rot) und auch die SG verschiedene zusätzliche Schlaufen bevor sich die Hauptketten wieder treffen. Mit dem Abstand von 3 Å zwischen den C α 's liegt etwa eine halbe Aminosäure zwischen den Positionen. Dieser Abstand muss während der zusätzlichen Schlaufe eingeführt werden, da sich der Verlauf der Hauptkette nach den Schlaufen wieder ähnelt. Im strukturbasierten Sequenzalignment (siehe Anhang 2) werden die zusätzlichen Schlaufen anhand der Gaps an den richtigen Positionen dargestellt. In einem „normalen“ Sequenzalignment (Anhang 3) sind diese Schlaufen nicht an den richtigen Positionen. Allerdings sieht man die Verschiebung des Tryptophans um eine Position und zusätzliche Aminosäuren bei den pflanzlichen Enzymen. Darüber kann man die $\chi_{1/2} = -60/0$ Konformation der Archaeen und Bakterien erkennen. Um die geänderte Konformation der SG zu erklären, muss ihre Struktur näher analysiert werden. Deshalb muss die Struktur der SG mit den bekannten Strukturen von Zmglu1 (E.C. 3.2.1.21, 1E1E) aus *Zea mays*, Zmp60.1 (E.C. 3.2.1.21, 1HXJ) aus *Zea mays*, der cyanogenen β -Glukosidase (CBG, E.C. 3.2.1.21, 1CBG) aus *Trifolium repens* und der Dhurrinase 1 (Dhr1, E.C. 3.2.1.21, 1V02) aus *Sorghum bicolor* verglichen werden. Zmglu1 und Zmp60.1 besitzen dieselbe Sequenz und Struktur mit Ausnahme einer Signalsequenz am N-Terminus. Daher wird nur ZmGlu1 diskutiert. Mit seiner $\chi_{1/2} = 180/80$ Konformation tritt Trp388 in der SG in Kontakt mit Tyr345, Thr346, Phe373 und Met275. Tyr345 ist auch Teil der Zuckerkennungsstelle und ist konserviert in allen Enzymen dieser Familie. Thr346 ist ebenso konserviert, ausser in der CBG. Phe373 ist von den genannten Enzymen nur in der CBG vorhanden. Jedoch ist es in der Sequenz der SG aus *C. roseus* auch ersetzt worden. Trotzdem kann man, auf Grund des gleichen Substrates, dieselbe Konformation für Trp388 annehmen. Eine ortsgerichtete Mutation zu Threonin (Phe373Thr) ergab keine Änderung der Enzymaktivität. Phe373 kann also keine entscheidende Rolle für die Katalyse innehaben. In der Sequenz der beiden Glukosidasen aus *Z. maize* steht an SG-Met275 entsprechender Position auch ein Met. Dies zeigt, dass Met275 die Konformation des Trp388 nicht ändert. Durch neue Kontaktmöglichkeiten kann die neue Konformation in SG also nicht hervorgerufen werden. Für ZmGlu1 wurde beschrieben, dass das entsprechende Tryptophan mit seinem

Stickstoff eine H-Brücke zu einem Tyrosin bildet (CZJZEK *et al.*, 2000). In ZmGlu1 sind das Trp378 und Tyr 473. Dieses Tyrosin entspricht in SG dem Tyr481, welches auch in der Zuckerbindung beteiligt ist. In einigen Enzymen ist dieses Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt, trotzdem ändert sich die Konformation des Tryptophans nicht. Auch durch eine ortsgerichtete Mutation an der SG (Tyr481Phe) wurde nur eine mässige Aktivitätsreduktion (ca. 90 % rel. Aktivität) erreicht, ein Zeichen, dass die Konformation von Trp388 unverändert blieb und diese Aminosäure keinen Einfluss darauf hat. Eine weitere interessante Position ist (SG Nummerierung) 386. In verglichenen Strukturen ist dort eine kleine hydrophile Aminosäure. Sie ist in der Reichweite einer H-Brücke zum N des Tryptophans. In SG ist diese Aminosäure aber durch Glycin ersetzt. Einerseits wird der freigewordene Platz vom Strictosidin beansprucht (Abstand Gly386-C α \leftrightarrow Strictosidin-C10: 2.9 Å) andererseits fehlt eventuell die zusätzliche Stabilisierung durch die entsprechende H-Brücke. Eine Mutation von SG (Gly386Ser) reduzierte die relative Aktivität auf 10 %. Diese noch recht hohe Restaktivität macht ein Umklappen des Indolteils des Trp388 von der $\chi_{1/2} = 180/80$ zur $\chi_{1/2} = 65/-80$ Konformation, verbunden mit der kompletten Veränderung der Bindungsstelle unwahrscheinlich. Durch fehlende Kontakte auf der anderen Seite kann die neue Konformation in SG also auch nicht hervorgerufen werden. Betrachtet man die Strukturen weiter, fällt auf, dass der für den Indolteil benötigte Platz in der SG in anderen Enzymen durch andere Aminosäuren eingenommen wird. In Zmglu1 drückt Arg336 (die entsprechende Position in SG wäre Thr348) Trp388 durch seine Grösse und Hydrophilie in seine Position. In CBG steht an der strukturell gleichen Position Tyr329. In Dhr1 ist SG-Met275 zu Phe261 mutiert. Das grössere Phenylalanin kommt der hypothetischen Position des Tryptophans auf etwa 2 Å nahe, zu nahe für die SG-typische C-terminale Konformation. In den gerade verglichenen Glukosidasen ist kein vergrösserter Substituent für SG-Thr346 vorhanden. Jedoch durch seine Nähe zu Trp388 ist es möglich, dass in zukünftigen Strukturen eine grössere Aminosäure an dieser Position das Einnehmen der C-terminalen Konformation von Trp388 blockiert. So wird also insgesamt durch das Fehlen der verschiedenen, grossen Seitenketten an den Positionen 275, 346 und 348 eine hydrophobe Einbuchtung (Abbildung 51) gebildet, die die in SG beobachtete Konformation von Trp388 ermöglicht.

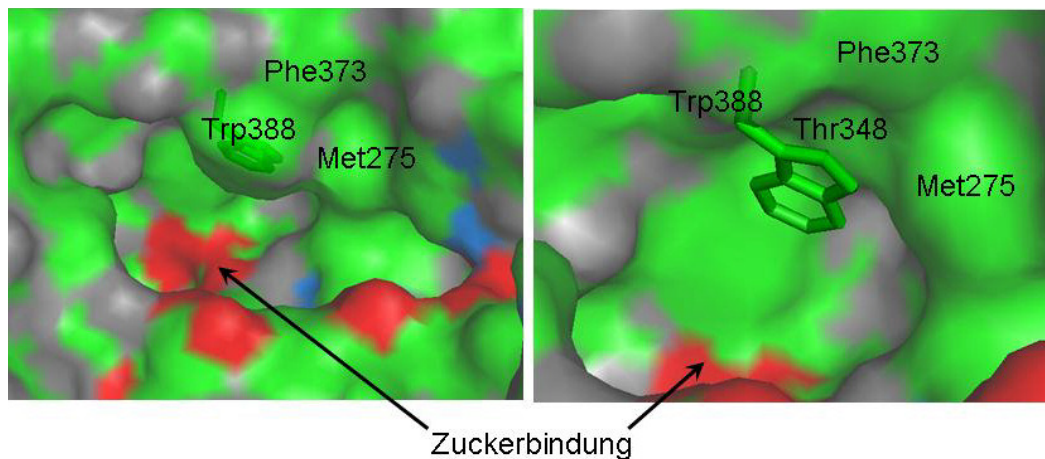


Abbildung 51: Hydrophobe Umgebung der Seitenkette von Trp388 in der Strictosidin Glukosidase

Grün sind hydrophobe, grau hydrophile ungeladene, rot negativ geladene und blau positiv geladene Oberflächen. Zusätzlich zum Trp388 sind die drei Aminosäuren Met275, Thr348 und Phe373 gekennzeichnet, die die hydrophobe Umgebung für die Seitenkette von Trp388 gewährleisten. Links ist zur Orientierung die Bindungstasche wie bereits gezeigt zu sehen, rechts ist der Vergrößerte Ausschnitt mit dem Schwerpunkt auf Trp388 abgebildet.

Die von CZJZEK (2000) beschriebenen Aminosäuren Trp388, Asn214, Phe221 und Asn474 übernehmen also die Substraterkennung, wenn:

- an den Positionen 275, 346 und 348 wenigstens eine Aminosäure 7 oder mehr Nicht-Wasserstoff-Atome in der Seitenkette besitzt,
- die Hydrophobizität der Einbuchtung durch diese Aminosäuren verändert wird (Abbildung 51) oder
- im Sequenzalignment eine Zugehörigkeit zu den bakteriellen/archaeellen Glykosidasen sichtbar wird.

Ist dies nicht der Fall, liegt die SG-typische Konformation von Trp388 vor und damit die Substraterkennung wie sie Abbildung 45 zeigt.

In den Biosynthesewegen mit Strictosidin im Mittelpunkt folgt auf die Strictosidin Synthese durch die Strictosidin Synthase (STR1) direkt die Deglukosylierung durch die SG. Der STR1/Tryptamin bzw. Secologanin-Komplex wurde kürzlich beschrieben (MA *et al.*, 2006) und auch der STR1/Strictosidin-Komplex wurde bereits ermittelt (noch unveröffentlicht). In diesen Komplexen kann beobachtet werden, dass das hydrophobe Tryptamin im Inneren des Enzyms liegt, während das Secologanin mit der hydrophilen Glukose weiter zum Solvens liegt. In der SG liegt das Strictosidin, wie bereits beschrieben, umgekehrt mit dem Glukosylrest innen im Enzym und dem Aglykon zum Solvens. Ausserdem bietet die SG durch verlängerte Helices und Schlaufen auf der Enzymoberfläche eine Mulde, in die eventuell die STR1 hineinpassen würde (Abbildung 52). Beides zusammen gibt Hinweise auf eine direkte Interak-

tion der beiden Enzyme. Dagegen spricht ein Konformationswechsel des Strictosidins, für den es Raum und Zeit benötigt.

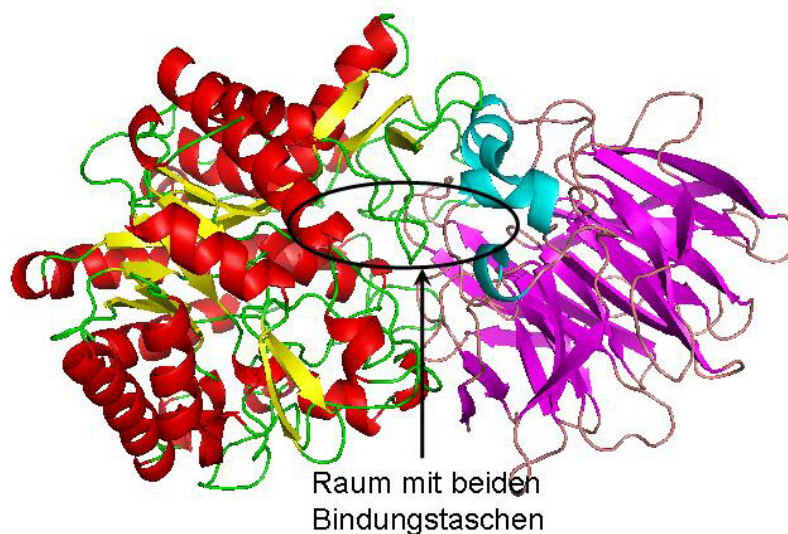


Abbildung 52: Möglicher Kontakt zwischen der Strictosidin Synthase und der Strictosidin Glukosidase.

Links in Rot/Gelb/Grün die Strictosidin Glukosidase, rechts in Blau/Rosa/Braun die Strictosidin Synthase.

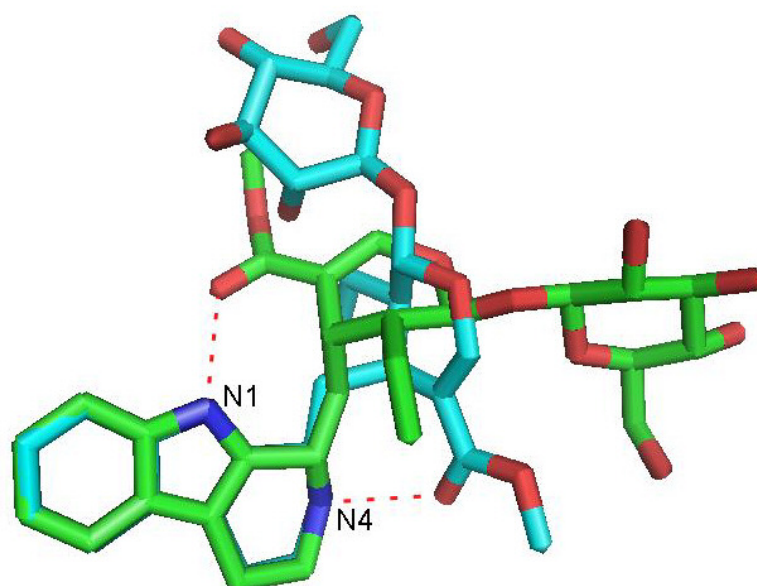


Abbildung 53: Verschiedene Konformationen des Strictosidins.

Die in der Strictosidin Glukosidase eingenommene Konformation ist in blau, die in der Synthase grün dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen die H-Brückenbindungen der Estergruppe zu den verschiedenen Stickstoffen.

Während die Estergruppe des Secologanins in der STR1 eine H-Brückenbindung zum Stickstoff N1 des Tryptamin-Indolteils bildet, bindet dieselbe Estergruppe in der SG an den Stickstoff N4, dem Amin des ehemaligen Tryptamins (Abbildung 53). Beide Enzyme stellen nunmehr ein exzellentes Möglichkeit dar, um eine eventuelle Proteininteraktion durch Cokristallisation und Small Angle X-Ray Scattering (SAXS)-Experimente näher zu untersuchen.

Im Vergleich der biochemischen Eigenschaften beider Enzyme AS und SG fällt deren unterschiedlich starke Bindung an Ni-NTA auf. AS wird schon bei einem Zusatz von 40 mM Imidazol eluiert. SG kann mit 50 mM Imidazol ohne Verluste gewaschen werden, wodurch schneller eine höhere Reinheit erhalten wird. Selbst nach einer Regeneration des Säulenmaterials nach Angaben des Herstellers kann noch eine Resten-

zymaktivität der SG gemessen werden. In beiden Enzymen wurde der His-tag an den N-Terminus angefügt. Wie hier bereits beschrieben ist der N-Terminus der AS sehr eng mit der N-terminalen Rossmann-Domäne verbunden und dadurch unflexibel. Bei dem Vergleich mit Enzymen mit derselben Faltung wurde festgestellt, dass ab Pro5 die Hauptkette als β -Strang in das Innere des Enzyms verschwindet. Dadurch besitzt der N-Terminus eine geringe Flexibilität. Bei der SG hingegen ist der N-Terminus so wenig gebunden und so flexibel, dass die ersten 36 Aminosäuren nicht in der Kristallstruktur ermittelt werden konnten, da sie keine klare Elektronendichte lieferten. KHAN *et al.* (2006) haben kürzlich, auf der Suche nach stärker bindenden Affinitäts-Trennsystemen, ein doppeltes Hexahistidin mit Spacer Sequenz getestet. Sie erreichten damit eine wesentlich höhere Bindungsstärke als mit dem einfachen His₆-tag oder jeweils einem His₆-tag an jedem Terminus. Dabei testeten sie jedoch nicht den Einfluss der Spacersequenz ohne den zweiten His₆-tag. Die Vermutung liegt nahe, dass die Länge der Sequenz vor einer geordneten, gefestigten Struktur die Bindungsstärke beeinflusst, da eine grössere Länge mehr Freiheitsgrade für eine stark bindende Konformation des His₆-tags und eine bessere Zugänglichkeit für das Säulenmaterial bietet. Durch Mutationen von SG und AS, bei denen AS mit der Anfangssequenz der SG versehen wird und bei der SG die Anfangssequenz entfernt wird, könnte diese Vermutung überprüft werden. Am Besten geschieht dies im direkten Vergleich zu dem doppelten Hexahistidin-Tag von KHAN *et al.* jeweils mit und ohne dem zweiten His₆-tag.

Die Struktur der Raucaffricin Glukosidase (RG) ist noch nicht veröffentlicht. Sie wurde allerdings in unserem Arbeitskreis bereits gelöst. Die RG deglukosyliert das Raucaffricin, ein weiteres Glukoalkaloid aus Rauwolfia, das jedoch in einem Nebenweg der Biosynthese des Ajmalins liegt. Ausser dem Raucaffricin setzt die RG, mit einer 10fach niedrigeren Aktivität, auch das Strictosidin um. Die Strictosidin Glukosidase akzeptiert jedoch nicht das Raucaffricin und wird auch nicht durch 10mal mehr Raucaffricin im Vergleich zum Strictosidin inhibiert. Dies ist ein Zeichen dafür, dass das

Raucaffricin in keiner Weise an die SG binden kann. Die Molekülmasse der beiden

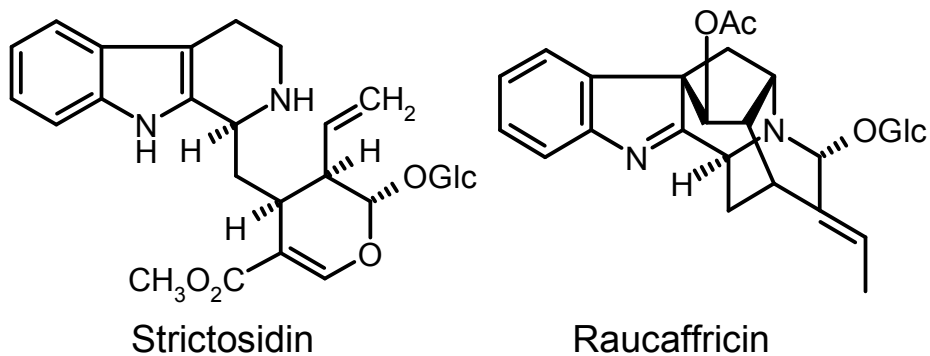


Abbildung 54: Strukturformeln von Strictosidin und Raucaffricin im Vergleich

Alkaloide ist mit $M_r = 530$ für Strictosidin und $M_r = 512$ für Raucaffricin nahezu gleich gross. Durch das kondensierte Ringsystem des Raucaffricins ist dieses aber wesentlich kompakter. Die benötigte Bindungstasche müsste also nicht lang und schmal sein, wie sie für das Strictosidin ist, sondern sie muss kürzer und breiter sein. Zwar ist ein Komplex der RG mit Raucaffricin bisher noch nicht vermessen worden, doch in der nativen Struktur sieht man, das SG-Met275 in RG durch Gln276 ersetzt ist. Dadurch wird die Hydrophobizität der für SG-Trp388 benötigten Einbuchtung aufgehoben. Das entsprechende RG-Trp392 nimmt dadurch die in den anderen pflanzlichen Glykosidasen übliche $\chi_{1/2} = 65/-80$ Konformation ein.

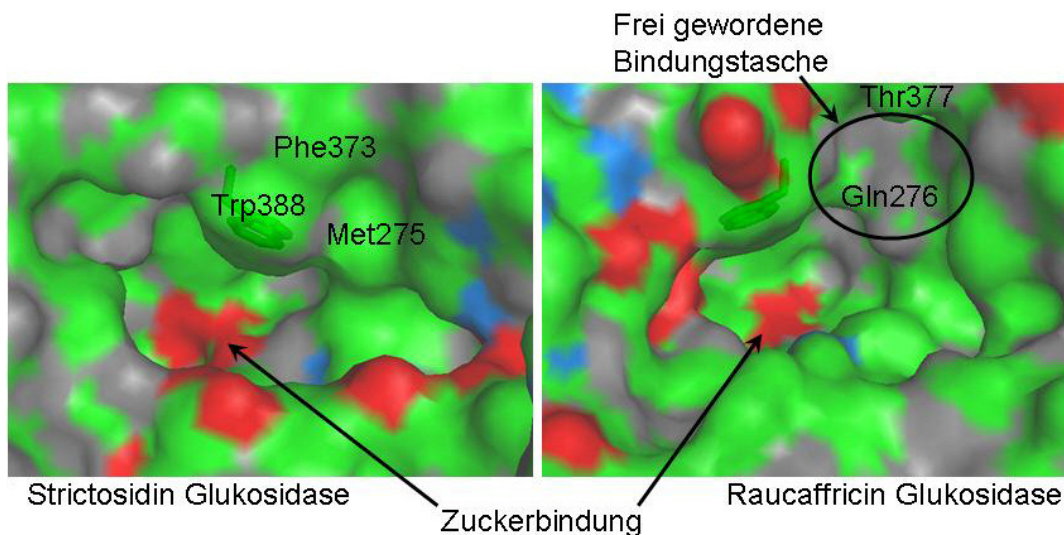


Abbildung 55: Vergleich der Bindungstaschen von der Strictosidin Glucosidase und der Raucaffricin Glucosidase

Der dabei gebildete Raum wird noch durch die Wandlung von SG-Phe373 zu RG-Thr377 vergrößert. Der fehlende Arylring gibt eine Fläche frei, die für die Bindung von Raucaffricin ausreichen könnte. Die Fläche ist auch lang genug, um Platz für

Strictosidin zu bieten. Durch die Doppelmutante SG-Phe373Thr, Met275Gln könnte diese These bestätigt werden. Endgültige Sicherheit über das Bindungsverhalten des Raucaffricins im Enzym RG wird aber erst ein entsprechender Substrat/Enzym-Komplex liefern.

VI Anhang

1 Strukturbasiertes Alignment der Sequenzen der Familie GH-1

1GOW: β -Glykosidase S (LacS; S- β -gly; SSO3019) *Sulfolobus solfataricus* P2;
 1QVB: β -Glykosidase *Thermosphaera aggregans* M11TL; 1PBG: 6-P- β -Galaktosidase *Lactococcus lactis* Z268; 1VFF: alkyl β -Glykosidase (membrangebunden) (BGPh; PH0366) *Pyrococcus horikoshii* OT3; 1GNX: β -Glukosidase (Bgl3) *Streptomyces* sp. QM-B814; 1OD0: β -Glukosidase A (BglA) *Thermotoga maritima* MSB8; 1NP2: β -Glykosidase *Thermus nonproteolyticus* HG102; 1UG6: β -Glykosidase (TTHB087) *Thermus thermophilus* HB8; 1E4I: β -Glukosidase A (BglA) *Paenibacillus polymyxa*; 1QOX: β -Glukosidase (BglA) *Bacillus circulans* subsp. *Alkalophilus*; 1HXJ: β -Glukosidase Zm-p60.1 *Zea mays*; 1E1E: β -Glukosidase ZmGlu1 *Zea mays*; 1V02: cyanogene β -Glukosidase (Dhurrinase 1) *Sorghum bicolor* P721N; 1CBG: β -Glukosidase 2 (cyanogen) *Trifolium repens*; SG: Strictosidin Glukosidase *Rauvolfia serpentina*; 1WCG: Myrosinase (BMY1) *Brevicoryne brassicae*; 1MYR: Myrosinase *Sinapis alba*

α -Helices sind rot, β -sheets oliv dargestellt. Kleinbuchstaben weisen auf unsicherheiten im Alignment hin.

```
sg .....
1cbg .....FKP
1e1e .....sarvgsqn
1hxj .....sQn
1gnx mvpAaqqtatapd.....
1e4i .....
1od0 mgsshhhhhssgLVprgshmasn.....
1np2 .....
1ug6 .....
1v02 malllasainhtahpaglRshpnesfsrhhLcSsPqniskrrsnlsfrpraqtissesa
1qox .....
1pbg .....
1gow M.....
1qvb .....
1vff .....
1myr dEeITC.....QEN
1wcg .....
```

```
sg .....VVHRRDFPQDFIFGAGGSAYQCEG.....AYNEGHRGSPSIWDTFTQRSPA.
1cbg LPISFDDFSDLNRSCFAPGFVFGTASSAFQYEG.....AAFEDGKGSPSIWDTFTHKYPE.
1e1e gVqMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGESNWDHFCHNHPE.
1hxj gVqMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGESNWDHFCHNHPE.
1gnx .....aaLTFPEGFLWGSATASYQIEG.....AAAEDGRTPSIWDTYAR.TPG.
1e4i .....TIFQFPQDFMWGTATAAYQIEG.....AYQEDGRGLSIWDTFAH.TPG.
1od0 .....vKKFPEGFLWGVATASYQIEG.....SPLADGAGMSIWHTFSSH.TPG.
1np2 .....mteNAEKFLWGVATSAYQIEG.....ATQEDGRGSPSIWDTFAR.RPG.
1ug6 .....mteNAEKFLWGVATSAYQIEG.....ATQEDGRGSPSIWDAFAQ.RPG.
1v02 gihrLspWEIPRRDWFPSDFLFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGPSIWDHFCHNFPE.
1qox .....SIHMFPSDFKQGVATAAYQIEG.....AYNEDGRGMSIWDTFAH.TPG.
1pbg .....MTKTLPKDFIFGGATAAYQAEQ.....ATHTDGKGPVAVDCKYLE.DN..
1gow .....YSFPNSFRFGWSQAGFQSEMGTGSEDP.....NTDWYKVVH.DPEN
1qvb .....MKFPKDFMIGYSSSPFFQFEAGIPGSEDP.....NSDWWVVVH.DPEN
1vff .....MPLKFPPEMFLFGTATSSHQIEG.....NNR.....WNDWWYYEQ.IGK.
1myr NPFTCGNTDGLNSSFEADFIFGVASSAYQIEG.....TIG...RGLNIWDGFTHRYPD.
1wcg .....mdYKFPKDFMFGTSTASYQIEG.....GWNEDGKGENIWDRLVHTSPE.
```


sg TFAVNGYALGE..FAPGRGGK.....GDEGDPAIEPYVVTHNILLAHKAAVEEYRNKFQK
 lcbg GVSMNAYAYGT..FAPGRCSDWLKLNCTGGDSGREPYLA AHYQLLAHAAAAARLYKTKYQA
 lele TFTSFSYGTGV..FAPGRCSPLDCA YPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYNKHYKR
 lhxj TFTSFSYGTGV..FAPGRCSPLDCA YPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYNKHYKR
 lgnx CSAFLGYGSGV..HAPGRT.....DPVAALRAAHHLNLGHGLAVQALRDR LPA
 le4i CIAFLSNMLGV..HAPGLT.....NLQTAIDVGHLLVAHGLSVRRFRELGT.
 lod0 VVAIVGHLYGV..HAPGMR.....DIYVAFRAVHNLLRAHARAVKVFRET.V.
 lnp2 CSAFLGHWTGE..HAPGLR.....NLEAALRAAHHLNLGHGLAVEALRAA.G.
 lug6 CSAFLGHWTGE..HAPGLR.....NLEAALRAAHHLNLGHGLAVEALRAA.G.
 lv02 TFCSVSYGTGV..LAPGRCSPGVSCAVPTGNSLSEPYIVAHNLLRAHAETVDIYNKYHKG
 lqox CMAFLSNYLGV..HAPGNK.....DLQLAIDVSHHLLVAHGRAVTLFRELGI.
 lpbg PIGDGQYLVGK..FPPGIKY.....DLAKVFQSHHNMVSHARAVKLYKDKGY.
 lgow VVGGLGYVGVKSGFPPGYL.....SFELSRRAMYNI IQAHARAYDGIKSV.S.
 lqvb VVYEQGYMFVKGGFPPGYL.....SLEAADKARRNMIQAHARAYDN IKRF.S.
 lvff VYVMGYLTAY..WPPFIR.....SPFKAFKVAANLLKAHA IAYEL LH...G.
 lmyr YSVPTRGYGSAL..DAPGRCSPTVDPSCYAGNSSTEPYIVAHHQLLAHAKVVDLYRKNY T
 lwcg IAVCK.GYSIKA..YAPNLN.....LKTTHGYLAGHTQLIAHGKAYRLYEEMFK

sg CQE.GEIGIVLNSMWMMEP.....LS.DVQADIDAQKRALDFML.GWFLEPLTT.....
 lcbg SQN.GIIGITLVSHWFEP.....AS.KEKADVDA AKRGLDFML.GWFMHPLTK.....
 lele .DD.TRIGLAFDVMGRVP.....YG.TSFLDKQAEERSWDINL.GWFLEPVVR.....
 lhxj .DD.TRIGLAFDVMGRVP.....YG.TSFLDKQAEERSWDINL.GWFLEPVVR.....
 lgnx ..D.AQCSVTLNIIHVRP.....LT.DSDADADAVRRIDALAN.RVFTG PMLQ.....
 le4i ..S.GQIGIAPNVSWAVP.....YS.TSEEDKAACARTISLHS.DWFLQPIYQ.....
 lod0 ..KDGKIGIVFNNGYFEPASEkee.....dirAVRFMHQFN NYPLFLNPIYR.....
 lnp2 ..A.RRVGIVLNFAPAYG.....E.....DPEAVDVADRYHN.RYFLDPILG.....
 lug6 ..A.RRVGIVLNFAPAYG.....E.....DPEAVDVADRYHN.RFFLDPI LG.....
 lv02 .AD.GRIGLALNVFGRVP.....YT.NTFLDQQAQERSMDKCL.GWFLEPVVR.....
 lqox ..S.GEIGIAPNTSWAVP.....YR.RTKEDMEACL RVNGWSG.DWYLDPIYF.....
 lpbg ..K.GEIGVVALPTKYP.....YDPENPADVRAAELEDI IHN.KFILDATYL.....
 lgow ..K.KPVGIIYANSSFQPL...TD.KDM...EAVEMAENDNR.WWFFDAIIRGEI..TR
 lqvb ..K.KPVGLIYAFQWFEL.....LE.GPA...EVFDKFKSSKL.YYFTDIVSKGSSIIN.
 lvff ..K.FKVGIVKNIPILP.....AS.DKERDRKAAEKADNLFN.WHFLDAIWS.....
 lmyr .HQG.GKIGPTMITRWF LP.....YNDTDRHSIAATERMKQFFL.GWFMGPLTN.....
 lwcg PTQN.GKISISISGVFFMP.....KNAESDDDIETAERANQFER.GWFGHPVYK.....

sgGDYPKSMRELV..K.....GRLPKFSADDSEK LKG...CYDFIGMNY YTA
 lcbgGRYPESMRYL V..R.....KRLPKFSTEESKELTG...SDFFLGLNYYS S
 leleGDYPFSMRSLA..R.....ERLPFFKDEQKEKLAG...SYNMLGLNYYS T
 lhxjGDYPFSMRSLA..R.....ERLPFFKDEQKEKLAG...SYNMLGLNYYS T
 lgnxGAYPEDLVKDT..AG...LTDWSFVRDGD LRLAHQ...KLDFLGVNYYS P
 le4iGSYPQFLVDWF..AE...QGATVPIQDGM DIIGE...PIDMIGINYYS M
 lod0GDYPE...LVLEFA...REYLPENYKDDMSEIQE...KIDFVGLNYYS G
 lnp2RGYPE...SP...FQ...DPPPAPILSRDLEAIAR...PLDFLGVNYYS AP
 lug6KGYPE...SP...FR...DPPPAPILSRDLELVAR...PLDFLGVNYYS AP
 lv02GDYPFSMRVSA..R.....DRVPYFKEKEQEKLVG...SYDMIGINYYS T
 lqoxGEYPKFMLDWY..EN...LGYPKPIVDGDMELIHQ...PIDFIGINYYS T
 lpbgGHYSDKTMEGV..NHILAENG GELDLRDEDFQALDAAKDLNDFLGINYYMS
 lgow GNEKIVRDDL.....KG...RLDWIGVNYYS TR
 lqvb ...VEYRRDL.....AN...RLDWLGVNYYS R
 lvffGKYR.....GVFKTY...RIP..QS...DADFIVGNYYS TA
 lmyrGTYPQIMIDTV..G.....ARLPTFSPEETNLVKG...SYD
 lwcgGDYPPIMKKWV..DQ...KSKEEGLPWSKLPKFTKDEIKLLKG...TAD

sg TYVT.....N.....AVKSNS.EKLSYE.....T....DD.....QVTK..TFER
 lcbg YYAA.....K.....APRIPN.ARPAIQ.....T....DS.....LINA..TFEH
 le1e RFSK.....N.....IDISPNYSPVLNT.....D....DA.....YASQ..EVNG
 lhxj RFSK.....N.....IDISPNYSPVLNT.....D....DA.....YASQ..EVNG
 lgnx TLVS.....eAdgsgtHnSdgh.....grsa.hsPWPFGADRVAF..HQ..
 le4i SVNR.....F.....NPE.....AG.FL.....QSEE..IN..
 lod0 HLVK.....F.....DP.....dApa.....KVSF..VE..
 lnp2 VRVA.....P.....GT.....G.PL.....PVRV..LP..
 lug6 VRVA.....P.....GT.....G.TL.....PVRV..LP..
 lv02 TFSK.....H.....IDLSPNNSPVLNT.....D....DA.....YASQ..ETKG
 lqox SMNR.....Y.....NPG.....EAGG.ML.....SEA..IS..
 lpbg DWMQ.....A.....FDGETEIIhngKgekgsYQI.KG.....VGRR..VA..
 lgow TVVKRTEKGY.....VSLGGYGH
 lqvb LVYKIVDDKP.....IILHGYPG
 lvff SEVR.....H.....TWN.....PL.KF.....FEVVKLAD..
 lmyr FLGLNYYFTQYAQ.....P.....SPN...PVNATNHTAM.....M....DA..
 lwcg FYALNHYSRLVT.....F.....GS.....DPNPNFNP....DA..

sg N.QK.....PI.GHALYGGWQHVVVPWGLYKLLVYTKE.T.YH.VPVLVYVTESGMVEENKT
 lcbg N.GK.....PL.GPMAASSWLCIYPQGIRKLLLYVKN.H.YN.NPVIYITENGRNEFNDP
 le1e PDGK.....PI.GPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKN.K.YG.NPPIYITENGIGDVDTK
 lhxj PDGK.....PI.GPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKN.K.YG.NPPIYITENGIGDVDTK
 lgnxPP.GETTAMG.WAVDPSGLYELLRRLSS.D.FP.ALPLVITENGAAAFH...
 le4iMG.LPVTDIG.WPVESRGLYEVLLHYLQ..K.YG.NIDYITENGACIN...
 lod0RD.LPKTAMG.WEIVPEGIYWILKKVKEEY.NP..PEVYITENGAAFD...
 lnp2PE.GPVTAMG.WEVYPEGLYHLLKRLGR.E.VP..WPLYITENGAAYP...
 lug6PE.GPATAMG.WEVYPEGLYHLLKRLGR.E.VP..WPLYITENGAAYP...
 lv02 PDGN.....AI.GPPTGNAWINMYPKGLHDILMTMKN.K.YG.NPPIYITENGMGDIDKG
 lqoxMG.APKTDIG.WEIIYAEGLYDLLRYTAD.K.YG.NPTLYITENGACYN...
 lpbgPDYVPRtdWd.wIIPYPEGLYDQIMRVKN.D.YPNYKKIYITENGLGYK...
 lgow GCERNSVSLAG.LPTSDFG.WEFFPEGLYDVLTKYW..NRYH..LYMYVTENGIADD...
 lqvb LCTPGGISPAE.NPCSDFG.WEVYPEGLYLLLKELY..NRYG..VDLIVTENGVSIDS...
 lvffIS.ERKTQMG.WSVYPKGIYMALKKAS..R.YG..RPLYITENGIATL...
 lmyrGAKL..TYINASGH.....YI.GP...LFESDGGDGSSNIYYPKGIYSVMDFK
 lwcgSYVT..SVD.....EA.WLKPNETP.....YIIPVPEGLRKLILLWLK

sg ..KILLSEA.....RRDAERTDYHQHLASVRDAIDDGVNVKGYFVWSFFDNFEWNLG
 lcbg ..TSLQES.....LLDTPRIDYRHLVYVLTALIGDGVNVKGYFAWSLFDNMEWDSG
 le1e ETPLPMEAA.....LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLLDNFEWFAG
 lhxj ETPLPMEAA.....LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLLDNFEWFAG
 lgnxDYADPEGNVNDPERIAYVRDHLAAVHRAIKDGSVVRGYFLWSLLDNFEWAHG
 le4iDEVV.NGKVQDDRRISYMQOHLVQVHRTIHDGLHVKGYMAWSLLDNFEWAEG
 lod0DVVSEDGRVHDQNRIDYLKAHIGQAWKAIQEGVPLKGYFVWSLLDNFEWAEG
 lnp2DLWTGEAVVEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG
 lug6DLWTGEAVVEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG
 lv02 ..DLPKPVA.....LEDHTRLDYIQRHLSVLKQSIDLGADVRGYFAWSLLDNFEWSSG
 lqoxDGLSLDGRIDHQRIDYLAHLLIQASRAIEDGINLKGMEWSLMDNFEWAEG
 lpbgDEFV.DNTVYDDGRIDYVQHLVLSDAIADGANVKGYPVWSLMDVFSWSNG
 lgowA.....DYQRPYYLVSHVYQVHRAINSGADVRYLHWSLADNYEWASG
 lqvbR.....DALRPAYLVSHVYSVWKAANEGIPVKGYLHWSLTDNYEWAQG
 lvffD.....DEWRVEFIIQHLQYVHKAIEDGLDVRGYFYWSFMDNYEWKEG
 lmyr N.K.YY.NPLIYVTENGISTPGS...ENRKES.....MLDYTRIDYLCSHLCLFNKV
 lwcg N.E.YG.NPQLLITENGYGDDG.....Q.....LDDFEKISYLNKYNLNLATLQA

sg YICRYGI^IHVDYK.SFERY^PKE^SAIWYKNFIAG.....

lcbg YTVRFGLVFVDFKNNL^KRHPKLSA^HWFKS^FLKK.....

le1e FTERYGIVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFN^TAkkpskkiltpa.....

lhxj FTERYGIVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFN^TTakkpskkiltpa.....

lgnx YSKRFGAVYVDYP.TGTRI^PKASARWYAEVARTG^VL^Pta.....

le4i YNMRFGMI^HVDFR.TQVRT^PKQSYWYRNVVSN^NWLETRR.....

lod0 YSKRFGIVYVDYS.TQKRI^VKDSGYWYSNVVKN^NGLEd.....

lnp2 YTRRFGLYYVDFP.SQ^RRI^PKRSALWYRERIARA^Qtggsah.....

lug6 YTRRFGLYYVDFP.SQ^RRI^PKRSALWYRERIARA^Qt.....

lv02 YTERFGIVYVDRENGCERTMKRSARWLQEFNGaakkvennkiltpagqln.....

lqox YGMRFGLVHVDYD.TLVRT^PKDSFYWYKGVISRG^WL^DL.....

lpbg YEKRYGLFYVDFD.TQ^ERY^PKKSAHWYK^KLAETQVIE.....

lgow F^SMRFGL^LKVDYN.TK^RLYWRPSALVYREIATNGAIT^DE^IEHLNSVPPVKPLRH.....

lqvb FRQKFG^LVMVDFK.TK^KRYLRPSALVFREIATHNGIPDELQHL^TLIQ.....

lvff FGPRFGLVEVDYQ.TF^ERR^PKRSAYVYGEIAR^SKE^IKDELLKRYGLPELQL.....

lmyr I^KEKDVNVKGYLAWALGDNYEFNNGFTVRFGLSYINW^NNV..TDRDLK^KSGQWYQ^KFISP

lwcg MYEDKCNVIGYTVWSLLDNFEW^FYGY^SIHFGLV^KIDFN.DPQRT^RT^KRESYTYFKNV^VST

2 Strukturbasiertes Alignment der Sequenzen der Familie GH-1, ohne Myrosinasen

```

sg .....
1cbg .....FKP
1e1e .....sarvgsqn
1hxj .....sQn
lgnx mvpAaqqtatapd.....
1e4i .....
lod0 mgsshhhhhhssglVprgshmasn.....
lnp2 .....
lug6 .....
1v02 malllasainhtahpaglRshpnesfsrhhLcSsPqniskrrsnlsfrpraqtissesa
lqox .....
lpbg .....
lgow M.....
lqvb .....
lvff .....

sg .....VVHRRDFPQDFIFGAGGSAYQCEG.....AYNEGNRGPSIWDFTFTQRSPA.
1cbg LPISFDDFSDLNRSCFAPGFVFGTASSAFQYEG.....AAFEDGKGPSIWDFTFTHKYPE.
1e1e gvgMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGESNWDHFCHNHPE.
1hxj gvgMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGESNWDHFCHNHPE.
lgnx .....aaLTFPEGFLWGSATASYQIEG.....AAAEDGRTPSIWDTYAR.TPG.
1e4i .....TIFQFPQDFMWGTATAAYQIEG.....AYQEDGRGLSIWDTFAH.TPG.
lod0 .....vKKFPEGFLWGVATASYQIEG.....SPLADGAGMSIWHTFSH.TPG.
lnp2 .....mtenAEKFLWGVATASYQIEG.....ATQEDGRGPSIWDTFAR.RPG.
lug6 .....mteNAEKFLWGVATASYQIEG.....ATQEDGRGPSIWDAFAQ.RPG.
1v02 gihrlspWEIPRRDWFPPSFLFGAATSAYQIEG.....AWNEDGKGPSTWDHFCHNFPE.
lqox .....SIHMFPSDFKQGVATAAYQIEG.....AYNEDGRGMSIWDTFAH.TPG.
lpbg .....MTKTLPKDFIFGGATAAYQAEQ.....ATHTDGKGPVAVDKYLE.DN..
lgow .....YSFPNSFRFGWSQAGFQSEMGTGSEDP.....NTDWYKVVH.DPEN
lqvb .....MKFPKDFMIGYSSSPFQFEAGIPGSEDP.....NSDWWWVVH.DPEN
lvff .....MPLKFPPEMFLFGTATSSHQIEG.....NNR.....WNDWWYYEQ.IGK.

sg ....KISDGSNGNQ..AINCYHMYKEDIKIMKQTGLESYRFSISWSRVLPGGRLAA....
1cbg ....KIKDRTNGDV..AIDEYHRYKEDIGIMKDMNLDAYRFSISWPRVLPKGGKLSG....
1e1e ....RILDGSNSDI..GANSYHMYKTDVRLLEKMGMDAYRFSISWPRI LPKGTKEG....
1hxj ....RILDGSNSDI..GANSYHMYKTDVRLLEKMGMDAYRFSISWPRI LPKGTKEG....
lgnx ....RVRNGDTGDV..ATDHYHRWREDVALMAELGLGAYRFSLAWPRIQPTGRG.....
1e4i ....KVFNGDNGNV..ACDSYHRYEEDIIRLMKELGIRTYRFSVSWPRIFPNGDG.....
lod0 ....NVKNGDTGDV..ACDHYNRWKEDIEIEKLGVKAYRFSISWPRILPEGTG.....
lnp2 ....AIRDGSTGEP..ACDHYHRYEEDIALMQSLGVRAYRFSVAWPRILPEGRG.....
lug6 ....AIRDGSTGEP..ACDHYHRYEEDIALMQSLGVRAYRFSVAWPRILPEGRG.....
1v02 ....WIVDRSNGDV..AADS YHMYAEDVRLLEKMGMDAYRFSISWPRI LPKGTLAG....
lqox ....KVKNGDNGNV..ACDSYHRVEEDVQLLKD LGVKVYRFSISWPRVLPQGTG.....
lpbg .....YWYTAEP..ASDFYHKYPVDLELAEEYGVNGIRISIAWSRIFPTGYG.....
lgow MAAGLV..SGDL.PENGPYWGNYKTFHDNAQKMGLKIARLNSEWSRQFPN.PLPRQNF
lqvb TAAGLV..SGDF.PENGPYWNLNQNDHDLAEKLGVNTIRVGVIEWSRIFPK.PTFNVKVP
lvff ....LP..YRSG.K..ACNHWE LYRDDIQLMTSLGYNAYRFSIEWSR LFPE.EN.....

```

sgGVNKDGVKIFYHDFIDELLANGIKPSVTLFHWDL
 lcbgGVNREGINYNNLINEVLANGMQPYVTLFHWDV
 leleGINPDGIKYRNLINLLENGIEPYVTIFHWDV
 lhxjGINPDGIKYRNLINLLENGIEPYVTIFHWDV
 lgnxPALQKGLDFYRRLADELLAKGIQPVATLYHWDL
 le4iEVNQKGLDYYHRVVDLLNDNGIEPFCITLYHWDL
 lod0RVNQKGLDFYNRIIDTLLLEKGITPFFVTIYHWDL
 lnp2RINPKGLAFYDRLVDRLLAAGITPFFVTIYHWDL
 lug6RINPKGLAFYDRLVDRLLASGITPFFVTIYHWDL
 lv02GINEKRVEYYNKLIDLLENGIEPYITIFHWDT
 lqoxEVNRAGLDYYHRLVDELLANGIEPFCITLYHWDL
 lpbgEVNEKGVFHYHKLFAECHKRHVEPFFVTLHHFDT
 lgow DESK....QDVTEVEINENELKRLDEYANKDALNHYREIFKDLKSRGLYFIQNMHYHWPL
 lqvb ...VERDENGSIHVVDVDDKAVERLDELANKEAVNHVEMYKDWVERGRKLILNLYHWPL
 lvffKFNEDAFMKYREIIDLLLTRGITPLVTLHHFTS

sg PQALEDE.....YGGFLS...HRIVDDFCEYAEFCF.WEFGDKIKYWTTFNEPH
 lcbg PQALEDE.....YRGFLG...RNIVDDFRDYAELCF.KFEGDRVKHWITLNEPW
 lele PQALEEK.....YGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCF.DNFQDKVKNWTLTFNEPQ
 lhxj PQALEEK.....YGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCF.DNFQDKVKNWTLTFNEPQ
 lgnx PQELEN.....AGGWPE...RATAERFAEYAAIAA.DALGDRVKTWTTLNEPW
 le4i PQALQD.....AGGWGN...RRTIQAFVQFAETMF.REFHGKIQHWTTFNEPW
 lod0 PFALQL.....KGGWAN...REIADWFAEYSRVLF.ENFGDRVKNWITLNEPW
 lnp2 PQALED.....RGGWRS...RETAFafaEYAEAVA.RALADRVPFFATLNEPW
 lug6 PLALEE.....RGGWRS...RETAFafaEYAEAVA.RALADRVPFFATLNEPW
 lv02 PQALVDA.....YGGFLD...ERIKDYTDFAKVCF.EKFGKTVKNWTLTFNEPE
 lqox PQALQD.....QGGWGS...RITIDAFaEYAEELMF.KELGGKIKQWITTFNEPW
 lpbg PEALHS.....NGDFLN...RENIEHFIDYAAFCE.EEF.PEVNYWTFNEIG
 lgow PLWLHDPiRVRRGD.FTGPSGWS...TRTYEFARFSAYTAWKFDD.LVDEYSTMNEPN
 lqvb PLWLHNPiMVRMGPDRApSGWLN...EESVVEFAKYAAYIAWKMGELPVMWSTMNEPN
 lvff PLWFMK.....KGGFLR...EENLKHWEKYIEKVA.ELLE.KVKLVATTFNEPM

sg TFAVNGYALGE..FAPGRGGK....GDEGPAIEPYVVTHNILLAHKAAVEEYRNKFQK
 lcbg GVSMMAYAYGT..FAPGRCSDWLKLNCTGGDSGREPYLAAHYQLLAHAAAARLYKTKYQA
 lele TFTSFSYGTGV..FAPGRCSPLDCAYPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYNKHYKR
 lhxj TFTSFSYGTGV..FAPGRCSPLDCAYPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYNKHYKR
 lgnx CSAFLGYGSGV..HAPGRT.....DPVAALRAAHHLLNGHGLAVQALRDRLPA
 le4i CIAFLSNMLGV..HAPGLT.....NLQTAIDVGHLLVAHGLSVRRFRELGT.
 lod0 VVAIVGHLYGV..HAPGMR.....DIYVAFRAVHNLRAHARAVKVFRET.V.
 lnp2 CSAFLGHWTGE..HAPGLR.....NLEAALRAAHHLLNGHGLAVEALRAA.G.
 lug6 CSAFLGHWTGE..HAPGLR.....NLEAALRAAHHLLNGHGLAVEALRAA.G.
 lv02 TFCSVSYGTGV..LAPGRCSPGVSCAVPTGNSLSEPYIVAHNLLRAHAETVDIYNKYHKG
 lqox CMAFLSNYLGV..HAPGNK.....DLQLAIDVSHLLVAHGRAVTLFRELGI.
 lpbg PIGDGQYLVGK..FPPGIKY.....DLAKVFQSHHNMVSHARAVKLYKDKGY.
 lgow VVGGLGYVGVKSGFPPGYL.....SFELSRRAMYNIQAHARAYDGIKSV.S.
 lqvb VVYEQGYMFVKGGFPPGYL.....SLEAADKARRNMIQAHARAYDNIKRF.S.
 lvff VYVMGYLTAY..WPPFIR.....SPFKAFKVAANLLKAHAIAAYELLH...G.

sg CQE.GEIGIVLNSMWMPE....LS.DVQADIDAQKRALDFML.GWFLEPLTT.....
 lcbg SQN.GIIGITLVSHWFEP....AS.KEKADVDAKRGLDFML.GWFMHPLTK.....
 lele .DD.TRIGLAFDVMGRVP....YG.TSFLDKQAEERSWDINL.GWFLEPVVR.....
 lhxj .DD.TRIGLAFDVMGRVP....YG.TSFLDKQAEERSWDINL.GWFLEPVVR.....
 lgnx .D.AQCSVTLNiHHVRP....LT.DSDADADAVRRIDALAN.RVFTGPMLQ.....
 le4i .S.GQIGIAPNVSWAVP....YS.TSEEDKAACARTISLHS.DWFLQPIYQ.....
 lod0 .KDGKIGIVFNNGYFEPASEkee.....diRAVRFMHQFNNYPLFLNPIYR.....
 lnp2 .A.RRVGIVLNFAPAYG....E.....DPEAVDVADRYHN.RYFLDPILG.....
 lug6 .A.RRVGIVLNFAPAYG....E.....DPEAVDVADRYHN.RYFLDPILG.....
 lv02 .AD.GRIGLALNVFGRVP....YT.NTFLDQQAQERSMDKCL.GWFLEPVVR.....
 lqox .S.GEIGIAPNTSWAVP....YR.RTKEDMEACLrvNGWSG.DWYLDPIYF.....
 lpbg .K.GEIGIVHALPTKYP....YDPENPADVRAAELEDIiHN.KFILDATYLL.....
 lgow .K.KPVGLIYANSSFQPL....TD.KDM...EAVEMAENDNR.WWFFDAIRGEI..TR
 lqvb .K.KPVGLIYAFQWFEL....LE.GPA...EVFDKFKSSKL.YYFTDIVSKGSSiIN.
 lvff .K.FKVGIVKNIPiILP....AS.DKERDRKAAEKADNLFN.WHFLDAIWS.....

sgGDYPKSMRELV..K.....GRLPKFSADDSEKLG...CYDFIGMNYITA
lcbgGRYPESMRYLV..R.....KRLPKFSTEESKELTG...SDFLGLNYYSS
leleGDYPFSMRSLA..R.....ERLPFFKDEQKEKLAG...SYNMLGLNYYTS
lhxjGDYPFSMRSLA..R.....ERLPFFKDEQKEKLAG...SYNMLGLNYYTS
lgnxGAYPEDLVKDT..AG....LTDWSFVRDGDRLAHO...KLDLFGVNYISP
le4iGSYPQFLVDWF..AE....QGATVPIQDGDMDIIGE...PIDMIGINYYSM
lod0GDYPE....LVLEFA....REYLPENYKDDMSEIQE...KIDFVGLNYYSG
lnp2RGYPE....SP..FQ....DPPPAPILSRDLEAIAR...PLDFLGVNYIAP
lug6KGYPE....SP..FR....DPPPVPILSRDLELVAR...PLDFLGVNYIAP
lv02GDYPFSMRVSA..R.....DRVPYFKEKEQEKLVG...SYDMIGINYYTS
lqoxGEYPKFMLDWY..EN....LGYKPPIVDGMELIHQ...PIDFIGINYITS
lpgbGHYSDKTMEGV..NHILAENGELDLRDEDFQALDAAKDLNDFLGINYYMS
lgow GNEKIVRDDL.....KG...RLDWIGVNYITR
lqvb ...VEYRRDL.....AN...RLDWLGVNYISR
lvffGKYR.....GVFKTY...RIP..QS...DADFIVGNYITA

sg TYVT.....N.....AVKSNS.EKLSYE.....T....DD.....QVTK..TFER
lcbg YYAA.....K.....APRIPN.ARPAIQ.....T....DS.....LINA..TFEH
lele RFSK.....N.....IDISPNSPVLNT.....D....DA.....YASQ..EVNG
lhxj RFSK.....N.....IDISPNSPVLNT.....D....DA.....YASQ..EVNG
lgnx TLVS.....eAdgsgtHnSdgh.....grsa.hsPWPAGDRVAF..HQ..
le4i SVNR.....F.....NPE.....AG.FL.....QSEE..IN..
lod0 HLVK.....F.....DP.....dApa.....KVSF..VE..
lnp2 VRVA.....P.....GT.....G.PL.....PVRV..LP..
lug6 VRVA.....P.....GT.....G.TL.....PVRV..LP..
lv02 TFSK.....H.....IDLSPNSPVLNT.....D....DA.....YASQ..ETKG
lqox SMNR.....Y.....NPG.....EAGG.ML.....SSEA..IS..
lpgb DWMQ.....A.....FDGETEIIhngKgekgsYQI.KG.....VGRR..VA..
lgow TVVKRTEKGY.....VSLGGYGH
lqvb LVYKIVDDKP.....IILHGYGF
lvff SEVR.....H.....TWN.....PL.KF.....FPEVKLAD..

sg N.QK.....PI.GHALYGGWQHVVWGLYKLLVYTKE.T.YH.VPVLVYVTESGMVEENKT
lcbg N.GK.....PL.GPMAASSWLCIYPQGIRKLLLYVKN.H.YN.NPVIYITENGRNEFNDP
lele PDGK.....PI.GPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKN.K.YG.NPPIYITENGIGDVIDTK
lhxj PDGK.....PI.GPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKN.K.YG.NPPIYITENGIGDVIDTK
lgnxPP.GETTAMG.WAVDPSGLYELLRRLSS.D.FP.ALPLVITENGAAAFH...
le4iMG.LPVTDIG.WPVESRGLYEVHLHLQ..K.YG.NIDYITENGACIN...
lod0RD.LPKTAMG.WEIVPEGIYWILKKVKEEY.NP..PEVYITENGAAAFD...
lnp2PE.GPVTAMG.WEVYPEGLYHLLKRLGR.E.VP..WPLYITENGAAAP...
lug6PE.GPATAMG.WEVYPEGLYHLLKRLGR.E.VP..WPLYITENGAAAP...
lv02 PDGN.....AI.GPPTGNAWINMYPKGLHDILMTMKN.K.YG.NPPMYITENGMGDIDKG
lqoxMG.APKTDIG.WEIIYAEGLYDLLRYTAD.K.YG.NPTLYITENGACYN...
lpgbPDYVPRtdWd.wIIYPEGLYDQIMRVKN.D.YPNYKKIYITENGLGYK...
lgow GCERNVSLAG.LPTSDFG.WEFFPEGLYDVLTKYW..NRYH..LYMYVTENGIADD...
lqvb LCTPGGISPAE.NPCSDFG.WEVYPEGLYLLLKELY..NRYG..VDLIVTENGVSIDS...
lvffIS.ERKTQMG.WSVYPKGIYMALKKAS..R.YG..RPLYITENGIATL...

sg ..KILLSEA.....RRDAERTDYHQHLASVRDAIDDGVNVKGYFVWSFFDNFEWNLG
lcbg ..TLSLQES.....LLDTPRIDYYRHLYYVLTAIIGDGVNVKGYFAWSLFDNMEWDSG
lele ETPLPMEAA.....LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLFDNFEWFAG
lhxj ETPLPMEAA.....LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLFDNFEWFAG
lgnxDYADPEGNVNDPERIAYVRDHLAAVHRAIKDGSVVRGYFLWSLFDNFEWAHG
le4iDEVV.NGKVQDDRRISYMQQHLVQVHRTIHDGLHVKGYMAWSLFDNFEWAEG
lod0DVVSEDGRVHDQNRIDYLKAHIGQAWKAIQEGVPLKGYFVWSLFDNFEWAEG
lnp2DLWTGEAVVEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG
lug6DLWTGEAVVEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG
lv02 ..DLPKPVA.....LEDHTRLDYIQRHLSVLKQSIDLGADVRGYFAWSLFDNFEWSSG
lqoxDGLSLDGRIHDQRRIDYLAHLIQASRAIEDGINLKGMEWSLMDNFEWAEG
lpgbDEFV.DNTVYDDGRIDYVVKQHLVLSDAIADGANVKGYFIWSLMDVFSWSNG
lgowA.....DYQRPYYLVSHVYQVHRAINSGADVVRGYLHWSLADNYEWAAG
lqvbR.....DALRPAYLVSHVYVWKAANEGIPVKGYLHWSLTDNYEWAQG
lvffD.....DEWRVEFIQHLQYVHKAIEDGLDVRGYFYWSFMDNYEWKEG

sg YICRYGIHVDYK.SFERYPKESAIWYKNFIAG.....
lcbg YTVRFGLVFVDFKNNLKRHPKLSAHWFKSFLLK.....
le1e FTERYGIVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFNTAkkpskkiltpa.....
lhxj FTERYGIVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFNTAkkpskkiltpa.....
lgnx YSKRFGAVYVDYP.TGTRIPKASARWYAEVARTGVLpta.....
le4i YNMRFGMIHVDFR.TQVRTPKQSYWYRNVSNNWLETRR.....
lod0 YSKRFGIVYVDYS.TQKRIVKDSGYWYSNVVKNNGLEd.....
lnp2 YTRRFGLYYVDFP.SQRRIPKRSALWYRERIARAQtggsah.....
lug6 YTRRFGLYYVDFP.SQRRIPKRSALWYRERIARAqt.....
lv02 YTERFGIVYVDRENGCERTMKRSARWLQEFNGaakkvennkiltpagqln....
lqox YGMRFGLVHVDYD.TLVRTPKDSFYWYKGVISRGWLDL.....
lpbg YEKRYGLFYVDFD.TQERYPKKSAHWYKLAETQVIE.....
lgow FSMRFGLLKVDYN.TKRLYWRPSALVYREIATNGAITDEIEHLNSVPPVKPLRH
lqvb FRQKFGVMVDFK.TKKRYLRPSALVFREIATHNGIPDELQHLTLIQ.....
lvff FGPRFGLVEVDYQ.TFERRPRKSAYVYGEIARSKKIKDELLKRYGLPELQL...

3 Sequenzalignment der Familie GH-1, ohne Myrosinasen

```

SG          -----MDNTQAEPLVVAIVPKPNASTEHTNSH
lcbg       -----FKPLPISFDDFSD--
1v02       MALLLASAINHTAHPAGLRSHPNNESFSRHHLCSSPQNI SKRRSNLSFRPRAQTISSESA
1e1e       -----SARVGSQ-N
1hxj       -----SQ-N
1qox       -----
1e4i       -----
1ug6       -----
1np2       -----
1od0       -----MGSSHHHHHHSSGLV
lgnx       -----MV
1vff       -----
1pbg       -----
1qvb       -----
lgow       -----

```

```

SG          LIPVTRSKIIVVHRRDFPQDFIFGAGGSAYQCEGAYNEGNRGPSIWDTFTQRS---PAKIS
lcbg       -----LNRSCFAPGFVFGTASSAFQYEGAAFEDGKGPSIWDTFTHKY---PEKIK
1v02       GIHRLSPWEIPRRDWFPPSFLFGAATSAYQIEGAWNEDGKGPSTWDHFCHNF---PEWIV
1e1e       GVQMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDGKGESNWDHFCHNH---PERIL
1hxj       GVQMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDGKGESNWDHFCHNH---PERIL
1qox       ----MSIHM-----FPSDFKWGVATAAYQIEGAYNEDGRGMSIWDTFAHT----PGKVK
1e4i       ----MTIFQ-----FPQDFMWTATAAYQIEGAYQEDGRGLSIWDTFAHT----PGKVF
1ug6       ----MTENA-----EKFLWGVATSAYQIEGATQEDGRGPSIWDAFAQR----PGAIR
1np2       ----MTENA-----EKFLWGVATSAYQIEGATQEDGRGPSIWDTFARR----PGAIR
1od0       PRGSHMASN---VKKFPEGFLWGVATASYQIEGSPADGAGMSIWHTFSHT----PGNVK
lgnx       PAAQQTATAPDAALTFPEGFLWGSATASYQIEGAAAEDGRTPSIWDTYART----PGRVR
1vff       -----MPLKFPEMFLFGTATSSHQIEGN-----NRWNDWWYYE---QIGKL
1pbg       -----MTKTLPKDFIFGGATAAYQAEGATHTDGKGPVAVDKYLED-----N
1qvb       -----MKFKPKDFMIGYSSSPFQFEAGIPGSEDPNSDWWVWVHDPENTAAGLV
lgow       -----MYSFPNSFRFGWSQAGFQSEMGTGPGSEDPNTDWYKVVHDPENMAAGLV
          * * . : . * * * *

```

```

SG          DGSNGNQAINCYHMYKEDIKIMKQTGLESYRFSISWSRVLPGGRL-----
lcbg       DRTNGDVAIDEYHRYKEDIKIMKDMNLDAYRFSISWPRVLPKGKL-----
1v02       DRNNGDVAADSYHMYAEDVRLKEMGMDAYRFSISWPRILPKGTL-----
1e1e       DGSNSDIGANSYHMYKTDVRLKEMGMDAYRFSISWPRILPKGTK-----
1hxj       DGSNSDIGANSYHMYKTDVRLKEMGMDAYRFSISWPRILPKGTK-----
1qox       NGDNGNVACDSYHRVEEDVQLLKDGLGVKYRFSISWPRVLPQGT-----
1e4i       NGDNGNVACDSYHRYEEDIIRLMKELGIRTYRFSVSWPRIFPNGD-----
1ug6       DGSTGEPACDHYHRYEEDIALMQSLGVRAYRFSVAVPRILPEGR-----
1np2       DGSTGEPACDHYHRYEEDIALMQSLGVGYRFSVAVPRILPEGR-----
1od0       NGDTGDVACDHYNRWKEDIEIEKLGVKAYRFSISWPRILPEGT-----
lgnx       NGDTGDVATDHYHRWREDVALMAELGLGAYRFSLAWPRIQPTGR-----
1vff       PYRSGK-ACNHWELYRDDIQLMTSLGYNAYRFSIEWSRLFPEEN-----
1pbg       YWYTAEPASDFYHKYPVDLELAEYGVNGIRISIAWSRIFPTGY-----
1qvb       SGDFPENGPGYWNLNQNNDHDLAEKLGVNTIRVGVEWSRIFPKPTFNVKVPVERDEN-GSI
lgow       SGDLPENGPGYWGNYKTFHDNAQKMGLKIARLNSEWSRQFPNP---LPRPQNFDESKQDV
          . . . : . . *.. *.* *

```

```

SG -----AAGV NKDG VKFYHDFIDELLANGIKPSVTLFHWDLPQALEDEY----
lcbg -----SGGVNREGINYNNLINEVLANGMQPYVTLFHWDPQALEDEY----
lv02 -----AGGINEKRV EYNNKLIDLLLENGIEPYITIFHWDTPQALVDAY----
le1e -----EGGINPDGIKYYRNLI NLLLENGIEPYVTIFHWDVPQALEEKY----
lhxj -----EGGINPDGIKYYRNLI NLLLENGIEPYVTIFHWDVPQALEEKY----
lqox -----GEVNRAGLDYYHRLVDELLANGIEPFCTLYHWDLPQALQDQ----
le4i -----GEVNQEGLDYYHRVVDLLNDNGIEPFCTLYHWDLPQALQDA----
lug6 -----GRINPKGLAFYDRLVDRLLASGITPFFLTLYHWDLPALALEER----
lnp2 -----GRINPKGLAFYDRLVDRLLAAGITPFFLTLYHWDLPQALEDR----
lod0 -----GRVNQKGLDFYRNRIIDTLLLEKGITPFFVTIYHWDLPFALQLK----
lgnx -----GPALQKGLDFYRRLADELLAKGIQPVATLYHWDLPQELENA----
lvff -----KFNE DAFMKYREIIDLLLTRGITPLVTLHHTSPLWFMKK----
lpbg -----GEVNEKGV EYHKLFAECHKRHVEPFVTLHHTFTPEALHSN----
lqvb VHVVDVDDKAVERLDELANKEAVNHYVEMYKDWVERGRKLI LNLYHWPLPLWLHNPIMVRR
lgow TEVEINENELKRLDEYANKDALNHYREIFKDLKSRGLYFIQNMHYHWPLPLWLHDP IRVRR

```

. * : * :

```

SG -----GGFLSHR---IVDDFCEYAEFCFWEFGDKIKYWTTFNEPHTFAVNGYA--LGE
lcbg -----RGFLGRN---IVDDFRDYAELCFKEFGDRVKHWITLNEPWGVS MNAYA--YGT
lv02 -----GGFLDER---IIKDYTDFAKVCFEKFGKTVKNWLT FNEPETFC SVSYG--TGV
le1e -----GGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCFDNFGDKVKNWLT FNEPQTF TSFSYG--TGV
lhxj -----GGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCFDNFGDKVKNWLT FNEPQTF TSFSYG--TGV
lqox -----GGWGSRI---TIDAF AEYAE LMFKELGGKIKQWIT FNEPWCMAFLSNY--LGV
le4i -----GGWGNRR---TIQAFVQFAETMFR EFHGKIQHWLTF NEPWCI AFLSNM--LGV
lug6 -----GGWRSRE---TAF AFAEYAEAVARALADRVPFFATLNEPWCSAFLGHW--TGE
lnp2 -----GGWRSRE---TAF AFAEYAEAVARALADRVPFFATLNEPWCSAFLGHW--TGE
lod0 -----GGWANRE---IADWFAEYSRVL FENFGDRVKNWITLNEPWWVAIVGHL--YGV
lgnx -----GGWPERA---TAERFAEYAAIAADALGDRVKTWTTLNEPWCSAFLGYG--SGV
lvff -----GGFLREE---NLKHWEKYIEKVA-ELLEKVKLVATFNEPMVYVMGYL--TAY
lpbg -----GDFLNRE---NIEHFIDYAAFCFE EFP-EVNYWTT FNEIGPIGDGQYL--VGK
lqvb MGPDRAPSGWLNEE---SVVEFAKYAAYIAWKMGELPVMWSTMNEPNVVYEQQYMFVKGG
lgow -GDFTGPSGWLSTR---TVYEFARFSAYTAWKFDDL VDEYSTMNEPNVVGGLYGVVKSG

```

. : : : : * : * :

```

SG FAPGRGG-----KGDEGDPAIEPYVVTHNILLAHKAAVEEYRNKFQKCQEGEIGIVLNSM
lcbg FAPGRCSDWLKLNCTGGDSGREPYLAAHYQLLAHAAAARLYKTKYQASQNGIIGITLVSH
lv02 LAPGRCSPGVSCAVPTGNSLSEPIYVAHNLLRAHAETVDIYN-KYHKGADGRIGLALNVF
le1e FAPGRCSPLDCA YPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYN-KHYKRDDTRIGLAFDVM
lhxj FAPGRCSPLDCA YPTGNSLVEPYTAGHNILLAHAEAVDLYN-KHYKRDDTRIGLAFDVM
lqox HAPGNKD-----LQLAIDVSHHLLVAHGRAVTLFR-ELGISG--EIGIAPNTS
le4i HAPGLTN-----LQTAIDVGHLLVAHGLSVRRFR-ELGTSG--QIGIAPNVS
lug6 HAPGLRN-----LEAALRAAHLLLGHLAVEALR--AAGAR--RVGIVLNFA
lnp2 HAPGLRN-----LEAALRAAHLLLGHLAVEALR--AAGAR--RVGIVLNFA
lod0 HAPGMRD-----IYVAFRAVHNLRAHARAVKVFR-ETVKDG--KIGIVFNNG
lgnx HAPGRTD-----PVAALRAAHLLNLGHGLAVQALRDRLPADA--QCSVTLNIH
lvff WPPFIRS-----PFKAFKVAANLLKAHAIA YELLH-----GKFKVGIVKNIP
lpbg FPPGIKYD-----LAKVFQSHHNMVSHARAVKLYK---DKGYKGEIGVVHALP
lqvb FPPGYLS-----LEAADKARRNMIQAHARAYDNIK----RFSKPKVGLIYAFQ
lgow FPPGYLS-----FELSRRAMYNIQAHARAYDGIK----SVSKPKVGI IYANS

```

. * . * : . :

SG WMEPLSDVQADIDAQKRALDFMLG-WFLEPLTTGDYPKSMRELVKGRLP-----KFSAD
 1cbg WFEPASKEKADVDAAKRGLDFMLG-WFMHPLTKGRYPESMRYLVKRRLP-----KFSTE
 1v02 GRVPYTNFTFLDQQAQERSMDKCLG-WFLEPVVRGDYPFMSMRVSARDRVP-----YFKEK
 1e1e GRVPYGTSTFLDKQAEERSWDINLG-WFLEPVVRGDYPFMSMRSLARERLP-----FFKDE
 1hxj GRVPYGTSTFLDKQAEERSWDINLG-WFLEPVVRGDYPFMSMRSLARERLP-----FFKDE
 1qox WAVPYRRTKEDMEACLVRVNGWSD-WYLDPIYFGEYPKFMLDWYENLGYKP----PIVDG
 1e4i WAVPYSTSEEDKAACARTISLHSD-WFLQPIYQGSYPQFLVDWFAEQGATV----PIQDG
 1ug6 PAY-----GEDPEAVDVADRYHNR-FFLDPIILGKGYPESPFRDPPPVP-----ILSR
 1np2 PAY-----GEDPEAVDVADRYHNR-YFLDPIILGKGYPESPFRDPPPVP-----ILSR
 1od0 YFEPASEKEEDIRAVRFMHQFNNYPLFLNPIYRGDYPELVLEFAREYLP-----ENYKD
 1gnx HVRPLTDSADADAVRRIDALANR-VFTGPMQLQGAYPEDLVKDTAGLTDWS----FVRDG
 1vff IILPASDKERDRKAAEKADNLFNW-HFLDAIWSGKYRGVFKTYRIPQSD-----
 1pbg TKYPYDPENPADVRAAELEDI IHNFILDATYLGHYSDKTMEGVNHILAENGGELDLRDE
 1qvb WFELEGG-PAEVFDKFKSS---KLYYFTDIVSKGSSI INVE--YRRDLANR-----
 1gow SFQPLTDKDMEAVEMAEND---NRWWFFDAIIRGEITRGNEKIVRDDLKGR-----

SG DSEKLGKC---YDFIGMNYTATYVTNAVKSNSEKL-----SYETDDQVTKTFER--
 1cbg ESKELTGS---FDLGLNYYSSYYAAKAPRIPNARP-----AIQTDSLINATFEH--
 1v02 EQEKLVS---YDMIGINYYTSTFSKHIDLSPNNSP-----VLNTDDAYASQETKGP
 1e1e QKEKLAGS---YNMLGLNYYTSRFSKNIDISPNYSP-----VLNTDDAYASQEVNGP
 1hxj QKEKLAGS---YNMLGLNYYTSRFSKNIDISPNYSP-----VLNTDDAYASQEVNGP
 1qox DMELIHQP---IDFIGINYYTSSMNRYPNG-----EAGGMLSSEAISMGA
 1e4i DMDIIGEP---IDMIGINYYSMSVNRFP-----EAG-FLQSEEINMGL
 1ug6 DLELVARP---LDFLGVNYYAPVRVAPGTG-----TLP----VRYLPPEG
 1np2 DLEAIARP---LDFLGVNYYAPVRVAPGTG-----PLP----VRYLPPEG
 1od0 DMSEIQEK---IDFVGLNYYSGHLVKFDPD-----AP--AKVSFVERDL
 1gnx DLRLAHQK---LDFLGVNYYSPTLVSEADSGTHNSDGHGRSAHSPWPGADRVAFHQPPG
 1vff -----ADFIGVNYTASEVRHTWN-----PLKFFFVVKLADISE
 1pbg DFQALDAAKDLNDFLGINYYMSDWMQAFDGETE I IHNG-----KGEKGSKYQIKGVGR
 1qvb -----LDWLVNYYSRVYKIVDDKPIILHG-----YGFLECTPGGISPAEN
 1gow -----LDWLVNYYTRTVVKRTEKGYVSLGG-----YHGHCERNVSVSLAGL
 : :*:***

SG NQKPIGHALYGGWQHVPWGLYKLLVYTKETYHV-PVLYVTESGM--VEENKTKILLSEA
 1cbg NGKPLGPMAASSWLCIYPQGIRKLLLYVKNHYNN-PVIYITENGR--NEFNDPTLSLQES
 1v02 DGNAIGPPTGNAWINMYPKGLHDI LMTMKNKYGN-PPMIYITENGMGDIKGD--LPKPVA
 1e1e DGKPIGPPMGNPWIIYMYPEGLKDLLMIMKNKYGN-PIIYITENGI GDVDTKETPLPMEAA
 1hxj DGKPIGPPMGNPWIIYMYPEGLKDLLMIMKNKYGN-PIIYITENGI GDVDTKETPLPMEAA
 1qox PKTDIG-----WEIYAEGLYDLLRYTADKYGN-PTLYITENGA----CYNDGLSLDGR
 1e4i PVTDIG-----WPVESRGLYEVLHY-LQKYGN-IDIYITENGA----CIND-EVVNGK
 1ug6 PATAMG-----WEVYPEGLYHLLKRLGREVP--WPLYVTENGA----AYPDLWTGEAV
 1np2 PVTAMG-----WEVYPEGLYHLLKRLGREVP--WPLYITENGA----AYPDLWTGEAV
 1od0 PKTAMG-----WEIVPEGIYWLKVKVEEYNP-PEVYITENGA----AFDDVVSSEDGR
 1gnx ETTAMG-----WAVDPSGLYELLRRLSSDFPA-LPLVITENGA----AFHDYADPEGN
 1vff RKTQMG-----WSVYPKGIYMALKKASRYGRP---LYITENGI-----AT
 1pbg RVAPDYVPRTDWDWI IYPEGLYDQIMRVKNDYPNYKKIYITENGLG-----YKDQFVDKT
 1qvb PCSDFG-----WEVYPEGLYLLLKELYNRYGV--DLIVTENGVS-----D
 1gow PTSDFG-----WEFFPEGLYDVLTKYWNRYHL--YMYVTENGIA-----D
 . . *: : : :*:.*

SG RRDAERTDYHQKHLASVRDAIDDDGVNVKGYFVWSFFDNFEWNLGYICRYGIIHVVDYKS-F
 1cbg LLDTPRIDYRHLYYVLTAIIGDGVNVKGYFAWSLFDNMEWDSGYTVRFGLVFVDFKNNL
 1v02 LEDHTRLDYIQRHLSVLKQSIDLGADVRYFAWSLLDNFEWSSGYTERFGIVYVDRENGC
 1e1e LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLLDNFEWFAGFTERYGIVYVDRNNNC
 1hxj LNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLLDNFEWFAGFTERYGIVYVDRNNNC
 1qox IHDQRRIDYLAHMLIQASRAIEDGINLKGYMEWSLMDNFEWAEGYGMRFGLVHVVDYDT-L
 1e4i VQDDRRISYMQQHLVQVHRTIHDGLHVKGYMAWSLLDNFEWAEGYNMRFGLVHVDFRT-Q
 1ug6 VEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFGYTRRFGLYYVDFPS-Q
 1np2 VEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFGYTRRFGLYYVDFPS-Q
 1od0 VHDQNRIDYLAHMLIQASRAIEDGINLKGYMEWSLMDNFEWAEGYGMRFGLVHVVDYDT-L
 1gnx VNDPERIAYVRDHLAAVHRAIKDGSVDRGYFLWSLLDNFEWAHGYSKRFGAVYVDYPT-G
 1vff LDDEWRVEFIIQHLQYVHKAIEDGLDVRGYFYWSFMDNYEWKEGFGPRFGLVEVDYQT-F
 1pbg VYDDGRIDYVVKQHLEVLSDAIADGANVKGYFIWSLMDVFSWSNGYEKRYGLFYVDFDT-Q
 1qvb SRDALRPAYLVSHVYSVWKAANEGIPVKGYLHWSLTDNYEWAQGFQKFGGLVMVDFKT-K
 1gow DADYQRPYYLVSHVYQVHRAINSGADVRYLHWSLADNYEWASGFSMRFGLLKVDYNT-K
 * * : * : : * : : * : * . * * : : * ** .

SG ERYPKESAIWYKNFIAGKSTTSPAKRRREEAQVELVKRQKT
 1cbg KRHPKLSAHWFKSFLKK-----
 1v02 ERTMKRSARWLQEFNGAAKKVENNKILTPAGQLN-----
 1e1e TRYMKESAKWLKEFN-TAKKP-SKKILTPA-----
 1hxj TRYMKESAKWLKEFN-TAKKP-SKKILTPA-----
 1qox VRTPKDSFYWYKGVISRGWLDL-----
 1e4i VRTPKESYVYWRNVVSNWLETRR-----
 1ug6 RRIPKRSALWYRERIARAQT-----
 1np2 RRIPKRSALWYRERIARAQTGGSAAH-----
 1od0 KRIVKDSGYWYSNVVKNNGLED-----
 1gnx TRIPKASARWYAE-VARTGVLPTA-----
 1vff ERRPRKSAYVYGEIARSKEIKDELLKRYGLPELQL-----
 1pbg ERYPKSAHWYKLAETQVIE-----
 1qvb KRYLRPSALVFREIATHNGIPDELQHLTLIQ-----
 1gow RLYWRPSALVYREIATNGAITDEIEHLNSVPPVKPLRH---
 : *

VII Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Kristallisation und der strukturellen Beschreibung der Enzyme Arbutin-Synthase (AS) und Strictosidin Glukosidase (SG). Beide stammen aus der Medizinalpflanze *Rauvolfia serpentina*.

Für die Kristallisation der Arbutin-Synthase wurden ca. 2500 verschiedene Bedingungen experimentell untersucht. Bei Vortests („Screenings“) kamen „High-Through-Put“-Systeme zum Einsatz. Für die Optimierung wurden alle Kristallisationsansätze manuell pipettiert. Neben dem „Hanging“ bzw. „Sitting Drop“ Verfahren wurde die Kristallisation im „Microbatch“ unter Öl eingesetzt. Das Enzym wurde molekularbiologisch und chemisch verändert um es der Kristallisation zugänglich zu machen. Insbesondere die Termini wurden dafür mutiert, trotzdem konnten keine Kristalle erhalten werden. Die Arbutin-Synthase gehört zu der Familie 1 der Glykosyltransferasen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anhand von Vergleichen mit Strukturen anderer Glykosyltransferasen der gleichen Familie analysiert. Diese zeigen zwei konservierte Rossmann-Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind.

Verkürzungen des N-Terminus` gingen mit einer Reduzierung der Enzymaktivität einher. Da nach den ersten fünf Aminosäuren des N-Terminus` alle weiteren Aminosäuren fest in die Enzymstruktur integriert sind, führt ein Fehlen weiterer Aminosäuren möglicherweise zu einer falschen Faltung des Proteins, die verantwortlich ist für den Verlust der Enzymaktivität.

Der C-Terminus verläuft von der C-terminalen Rossmann-Domäne zur N-Terminalen und stabilisiert so die Positionierung beider Domänen zueinander. Verkürzungen der Peptidkette vom C-Terminus her reduzierten die Enzymaktivität, da die Stabilisierung zwischen beiden Domänen fehlte.

Durch Punktmutationen und Vergleiche mit anderen 3D-Strukturen konnten mit His350 und Glu358 2 Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung des Zuckerdonors verantwortlich sind.

Über den Vergleich mit anderen Proteinen wurde auch festgestellt, warum sich einige Verunreinigungen in heterolog exprimierter Synthase auf einem denaturierenden SDS-Gel von der AS trennen liessen. Der Grund für diese mangelnde Reinheit, und damit der wahrscheinliche Grund für die noch nicht gelungene Kristallisation, liegt in der überdurchschnittlich hohen Anzahl an Cysteinen in der Proteinsequenz. Mit den Aminosäuren Cys171, Cys253 und Cys461 wurden drei Cysteine gefunden, die wahrscheinlich an der Proteinoberfläche liegen und durch Quervernetzungen mit an-

deren Proteinmolekülen ein heterogenes Gemisch bilden, das nicht geordnet kristallisieren kann. Durch gezielte Mutationen dieser drei Aminosäuren könnte die Kristallisation zukünftig ermöglicht werden. Auch ein Wechsel des Expressionssystems könnte hilfreich sein.

Die SG konnte bis zur Homogenität, entsprechend einem Coomassie-blau gefärbten SDS-Gel, gereinigt und anschliessend kristallisiert werden. Mit den erhaltenen Kristallen konnte erstmals die native 3-D Struktur des Enzyms (Auflösung 2,48 Å) und der Substrat/Enzym-Komplex (Auflösung 2,82 Å) vermessen und aufgeklärt werden. Die Kenntnis der Bindungsverhältnisse des Strictosidins in der Strictosidin Glukosidase ermöglicht rationale Mutationen des Enzyms, so dass Derivate des Strictosidins von der mutierten SG akzeptiert werden und in die Biosynthesewege zu den monoterpenoiden Indolalkaloide eingeschleust werden könnten. Da eine Vielzahl dieser Alkaloide biologisch hochaktiv sind, können auch von so produzierten Derivaten verschiedene, verstärkte oder auch neuartige Wirkungen erwartet werden.

Die SG gehört zur Familie 1 der Glukosidasen (GH-1) und besitzt die in dieser Familie konservierte (β/α)₈-Barrel-Faltung. Die Reaktion wird durch die Glutaminsäuren 207 und 416 katalysiert. Im Vergleich mit 16 bekannten Glykosidasen der Familie GH-1 wurde die Substratbindung untersucht. An der Zuckerbindungen sind die konservierten Aminosäuren Gln57, His161, Tyr345, Trp465, Glu472, Trp473 und Tyr481 beteiligt. Da diese Aminosäuren in der Familie GH-1 konserviert sind, ist die Aglykonbindung ausschlaggebend für die Substraterkennung.

An der SG konnte gezeigt werden, wie das konservierte Trp388 das Aglykon in verschiedene Seiten der Bindungstasche dirigiert. Dabei wird Trp388 selbst von den umliegenden Aminosäuren beeinflusst und kann drei verschiedene Konformationen einnehmen. Die für bakterielle/archaeelle Glykosidasen-typische Konformation kann an der Verschiebung des Tryptophans in einem Sequenzalignment um eine Position erkannt werden. Für die SG-typische Konformation von Trp388 muss eine hydrophobe Einbuchtung an der entsprechenden Seite des Tryptophans bereitstehen. Wenn an den Positionen 275, 346 und 348 wenigstens eine Aminosäure die Hydrophobizität der Einbuchtung ändert oder 7 oder mehr Nicht-Wasserstoff-Atome ihrer Seitenkette auftreten und die Aminosäure so die Einbuchtung ausfüllt, ist die für pflanzliche Glykosidasen typische $\chi_{1/2} = 65/-80$ Konformation von Trp388 vorzufinden. Für bakterielle/archaeelle Glykosidasen und Glykosidasen mit der $\chi_{1/2} = 65/-80$ Konformation übernehmen die Aminosäuren Trp388, Asn214, Phe221 und Asn474 die Sub-

straterkennung. Liegt die Konformation von Trp388 aus der SG vor, binden Thr210, Phe221, Met275, Met297, Gly386 und Trp388 das Substrat.

Diese Beobachtung trifft auch auf die Raucaffricin Glukosidase (RG) zu, einer weiteren Glukosidase aus *Rauvolfia serpentina*. Diese setzt vornehmlich Raucaffricin zu Vomilenin um, besitzt jedoch auch 10 % relative Aktivität gegenüber Strictosidin. Das Trp388 entsprechende Tryptophan in RG liegt in der typisch pflanzlichen Konformation vor, da an der SG-Met275 entsprechenden Position ein hydrophiles Glutamin vorliegt (RG-Gln276). In dieser Konformation blockiert das Tryptophan die in SG genutzte Seite der Substratbindungstasche und öffnet eine andere, breitere Seite. Durch diese strukturelle Modifikation kann das kompaktere Raucaffricin von der RG umgesetzt werden, das lang gestreckte Strictosidin bindet jedoch deutlich schlechter.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Als Poster:

BARLEBEN, L., MA, X., KOEPKE, J., PENG, G., MICHEL, H. UND STÖCKIGT, J. X-Ray Analysis of Strictosidine Glucosidase, a Central Enzyme of Indole Alkaloid Biosynthesis
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft – Joint Meeting (2004)
Regensburg, Deutschland

BARLEBEN, L., PANJIKAR, S., KOEPKE, J., MA, X. UND STÖCKIGT, J. Crystal Structure of Strictosidine Glucosidase
“Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids” Kongress der Phytochemical Society of Europe (2006) Belek, Türkei

Als Vortrag:

BARLEBEN, L., MA, X., KOEPKE, J., PENG, G., MICHEL, H. UND STÖCKIGT, J. X-Ray Analysis of Strictosidine Glucosidase, a Central Enzyme of Indole Alkaloid Biosynthesis
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft – Joint Meeting (2004)
Regensburg, Deutschland

BARLEBEN, L., MA, X., KOEPKE, J. UND STÖCKIGT, J. Molecular Analysis of Strictosidine Glucosidase from *Rauvolfia serpentina*

Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop (2005) Halle, Deutschland

Als Artikel in Fachzeitschriften:

BARLEBEN, L., MA, X., KOEPKE, J., PENG, G., MICHEL, H. UND STÖCKIGT J. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1747 (2005) 89-92

RUPPERT, M., PANJIKAR, S., BARLEBEN, L., UND STOECKIGT, J. Heterologous expression, purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of raucaffricine glucosidase – a plant enzyme specifically involved in *Rauvolfia* alkaloid biosynthesis. *Acta Cryst. F.* 62 (2006) 257-260

STÖCKIGT, J., PANJIKAR, S., RUPPERT, M., BARLEBEN, L., MA, X., LORIS, E. UND HILL, M. The Molecular Architecture of Major Enzymes from Ajmaline Biosynthetic Pathway. *Phytochem. Rev.* (in press)

BARLEBEN, L., PANJIKAR, S., RUPPERT, M., KOEPKE, J. UND STÖCKIGT, J. Molecular Architecture of Strictosidine Glucosidase – the Gateway to the Biosynthesis of the Monoterpenoid Indole Alkaloid Family. *Plant Cell* (submitted)

VIII Literaturverzeichnis

- ANFINSEN, CB., HABER, E., SELA, M. AND WHITE, FH. JR. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 47 (1961) 1309-1314
- AREND, J., WARZECHA, H. AND STÖCKIGT, J. Hydroquinone: O-glucosyltransferase from cultivated *Rauwolfia* cells: Enrichment and partial amino acid sequences. *Phytochemistry* 53 (2000) 187-193
- AREND, J., WARZECHA, H., HEFNER, T. AND STÖCKIGT, J. Utilizing Genetically Engineered Bacteria to Produce Plant Specific Glucosides. *Biotechnology and Bioengi.* 76 (2001) 126-131
- BARRETT, T., SURESH, CG., TOLLEY, SP., DODSON, EJ. AND HUGHES, MA. The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3 (1995) 951-60
- BLAKESLY, RW. AND BOEZI, JA. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82 (1977) 580-582
- BRADFORD, MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254
- BRADLEY, P., MISURA, KM. AND BAKER, D. Toward high-resolution de novo structure prediction for small proteins. *Science.* 309 (2005) 1868-1871
- BRETON, C., SNAJDROVA, L., JEANNEAU, C., KOCA, J. AND IMBERTY, A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 2 (2006) 29-37
- BRÜNGER, AT. Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 49 (1993) 24-36
- BRÜNGER, AT., ADAMS, PD., CLORE, GM., DELANO, WL., GROS, P., GROSSE-KUNSTLERE, RW., JIANG, JS., KUSZEWSKI, J., NILGES, M., PANNU, NS., READ, RJ., RICE, LM., SIMONSON, T. AND WARREN, GL. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 905-921

- BURMEISTER, WP., COTTAZ, S., ROLLIN, P., VASELLA, A. AND HENRISSAT, B. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39385-39393
- CCP4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* 50 (1994) 760-763
- CHRISTOPHER, JA. AND BALDWIN, TO. Implications of N and C-terminal proximity for protein folding. *J. Mol. Biol.* 257 (1996) 175-187
- COUTINHO, PM. AND HENRISSAT, B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1999) 3-12
- COUTINHO, PM., DELEURY, E., DAVIES, GJ. AND HENRISSAT, B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328 (2003) 307-317
- COUTINHO, PM., STAM, M., BLANC, E. AND HENRISSAT, B. Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? *Trends in Plant Science* 8 (2003) 563-565
- CZJZEK, M., CICEK, M., ZAMBONI, V., BEVAN, DR., HENRISSAT, B. AND ESEN, A. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 13555-13560
- CZJZEK, M., CICEK, M., ZAMBONI, V., BURMEISTER, W.P. BEVAN, D.R., HENRISSAT, B. AND ESEN, A. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-D-thioglucoside. *Biochem. J.* 354 (2001) 37-46
- D'ARCY, A., ELMORE, C., STIHLE, M. AND JOHNSTON J.E. A novel approach to crystallising proteins under oil. *J. Crystal Growth* 168 (1996) 175-180
- DAVIES, GJ., DUCROS, VM., VARROT, A. AND ZECHEL. DL. Mapping the conformational itinerary of beta-glycosidases by X-ray crystallography. *Biochem. Soc. Trans.* 3 (2003) 523-527

- DAVOODI, J., WAKARCHUK, WW., CAMPBELL, RL., CAREY, PR. AND SUREWICZ, WK. Abnormally high pka of an active-site glutamic acid residue in *Bacillus circulans* xylanase. The role of electrostatic interactions. Eur. J. Biochem. 232 (1995) 839-843
- DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (San Carlos, CA: DeLano Scientific). (2002)
- DEREWENDA, ZS. Rational protein crystallization by mutational surface engineering. Structure 12 (2004) 529-535
- DOWER, WJ., MILLER, JF AND RAGSDALE, CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 16 (1988) 6127-6145
- FISCHER, E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. Ber. Dt. Chem. Ges. 27 (1894) 2985-2993
- FROHNE, D. Uvae ursi folium. Teedrogen und Phytopharmaka. WICHTL, M. (eds.), WVG, Stuttgart (1996)
- FUGMANN, B., LANG-FUGMANN, S. UND STEGLICH, W. (eds) RÖMPP Lexikon – Naturstoffe-George Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1997)
- GERASIMENKO, I., SHELUDKO, Y., MA, X. AND STÖCKIGT, J. Heterologous expression of a Rauwolfia cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2204-2213
- GERLT, JA. AND RAUSHEL FM. Evolution of function in $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 252– 264
- HANAHAN D. Techniques for transformation in *E. coli*. DNA Cloning Volume I -A practical Approach, GLOVER, D.M. (Ed.). Oxford – Washington D.C., IRL Press. (1985)
- HARBORNE, JB. AND BAXTER, H. The Handbook of natural Flavonoids, Vol. 1, Chichester, Wiley (1999)
- HEFNER T., Charakterisierung einer neuen Glukosyltransferase aus *Rauwolfia serpentina*. Dissertation (2002), Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

- HEFNER, T. AND STÖCKIGT, J. Probing suggested catalytic domains of glycosyltransferases by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 533-538
- HEFNER, T., AREND, J., WARZECHA, H., SIEMS, K. AND STÖCKIGT, J. 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 (2002) 1731-1741
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (1991) 309-316
- HENRISSAT, B. AND BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 (1996) 695-696
- HENRISSAT, B. AND DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 637-644
- HENRISSAT, B., COUTINHO, PM. AND DAVIES, GJ. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 47 (2001) 55-72
- HERMETIN, P. Kohlenhydratanalytik. LOTTSPREICH, F. UND ZORBAS, H.(Ed.), Heidelberg-Berlin, Spektrum Akademischer Verlag (1998)
- HORITA, M., WANG, DH., TSUTSUI, K., SANO, K., MASUOKA, N. AND KIRA S. Involvement of oxidative stress in hydroquinone-induced cytotoxicity in catalase-deficient *Escherichia coli* mutants. *Free Radic. Res.* 39 (2005) 1035-1041
- HUGHES, J. AND HUGHES, MA. Multiple secondary plant product UDP-glucose glycosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ) cotyledons. *DNA Seq.* 5 (1994) 41-49
- HUSEBYE, H., ARZT, S., BURMEISTER, WP., HARTEL, FV., BRANDT, A., ROSSITER, JT. AND BONES AM. Crystal structure at 1.1 Angstroms resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to beta-glucosidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (2005) 1311-1320
- JAKOBY, WB. Crystallization as a purification technique. *Methods in Enzymology* 22 (1971) 248-252
- JANCARIK, J. AND KIM, SH. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24 (1991) 409-411

- JENKINS, J., LEGGIO, LL., HARRIS, G. AND PICKERSGILL, R. β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. FEBS Lett. 362 (1995) 281-285
- JUDGE, RA., JOHNS, MR. AND WHITE ET. Protein purification by bulk crystallization: The recovery of ovalbumin. Biotech.Bioeng. 48 (1995) 316-323
- KABSCH, W., Automatic indexing of rotation diffraction patterns. J. Appl. Cryst. 21 (1988a) 67-71
- KABSCH, W., Evaluation of single crystal X-ray diffraction data from a position sensitive detector. J. Appl. Cryst. 21 (1988b) 916-924
- KABSCH, W., Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800
- KAPTINOV, D. AND YU, K. Conserved domains of glucosyltransferases. Glycobiology 9 (1999) 961-978
- KHAN, F., HE, M. AND TAUSSIG, MJ. Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on ni-nitrilotriacetic acid surfaces. Anal. Chem. 78 (2006) 3072-3079
- KISSINGER, CR., GEHLHAAR DK. AND FOGEL DB. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. Acta Cryst. D 55 (1999) 484-491
- KLEENE, R. AND BERGER, EG. The molecular and cell biology of glycosyltransferases. Biochim. Biophys. Acta-Reviews on Biomembranes 1154 (1993) 283-325
- KREUZ, K., TOMMASINI, R. AND MARTINOIA, E. Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). Plant Physiol. 111 (1996) 349-353
- KUTCHAN, TM., HAMPP, N., LOTTSPEICH, F., BEYREUTHER, K. AND ZENK, MH. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 237 (1988) 40-44
- LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685

- LAINE, RA. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* 4 (1994) 759-767
- LASKOWSKI, RA., MACARTHUR, MW., MOSS, DS. AND THORNTON, JM. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283-291
- LINDING, R., JENSEN, LJ., DIELLA, F., BORK, P., GIBSON, TJ AND RUSSELL, RB. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics *Structure* 11 (2003) 1453-1459
- LUIJENDIJK, TJC., STEVENS, LH. AND VERPOORTE, R. Purification and characterisation of strictosidine β -d-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 36 (1998) 419-425
- LUIJENDIJK, TJC., VAN DER MEIJDEN, E. AND VERPOORTE, R. Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. *J. Chem. Ecol.* 22 (1996) 1573-1561
- LUTTERBACH, R. AND STÖCKIGT, J. High-yield formation of arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Helv. Chim. Acta* 75 (1992) 2009-2011
- MA, X., PANJIKAR, S., KOEPKE, J., LORIS, E. AND STÖCKIGT, J. The structure of *Rauvolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed beta-propeller fold in plant proteins. *The Plant Cell* 18 (2006) 907-920
- MA, X., KOEPKE, J., PANJIKAR, S., FRITZSCH, G. AND STÖCKIGT, J. Crystal Structure of Vinorine Synthase, the First Representative of the BAHD Family *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13576-13583
- MATTHEWS, BW. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 491-497
- McREE DE. *Practical Protein Crystallography*. McRee DE. San Diego, Academic Press (1999)
- MULICHAK, AM., LOSEY, HC., LU, W., WAWRZAK, Z., WALSH, CT. AND GARAVITO, RM. Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 9238-9243

- MULICHAK, AM., LOSEY, HC., WALSH, CT. AND GARAVITO RM. Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure* 7 (2001) 547-57
- MULICHAK, AM., LU, W., LOSEY, HC., WALSH, CT. AND GARAVITO, RM. Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: interactions with acceptor and nucleotide ligands. *Biochemistry* 43 (2004) 5170-5180
- MURSHUDOV, GN., VAGIN, AA. AND DODSON, EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* 53 (1997) 240-255
- MUTSCHLER, E. UND SCHÄFER-KORTING, M. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Mutschler, E. (Ed.), Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (1997)
- NAKAJIMA, K., YAMASHITA, A., AKAMA, H., NAKATSU, T., KATO, H., HASHIMOTO, T., ODA, J. AND YAMADA, Y. Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95 (1998) 4876-4881
- NAKAJIMA, M., SHINODA, I., FUKUWATARI, Y. AND HAYASAWA, H. Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity. *Pigment Cell Res.* 11 (1998) 12-17
- OFFEN, W., MARTINEZ-FLEITES, C., YANG, M., KIAT-LIM, E., DAVIS, BG., TARLING, CA., FORD, CM., BOWLES, DJ. AND DAVIES, GJ.. Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* 25 (2006) 1396-1405
- OHUCHI, M., ASAOKA, N., SAKAI, T. AND OHUCHI, R. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect.* (2006) [Epub ahead of print]
- OTWINOWSKI, Z. AND MINOR, W. Processing of X-Ray Diffraction Data Collection in Oscillation Mode. *Meth. Enzymol.* 276 (1997) 407-426
- QASBA, PK., RAMAKRISHNAN, B. AND BOEGGEMAN, E. Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 1 (2005) 53-62
- RAMACHANDRAN, GN., RAMAKRISHNAN, C. AND SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain conformations. *J. Mol. Biol.* 7 (1963) 95-99

- RENUGOPALAKRISHNAN, V., GARDUNO-JUAREZ, R., NARASIMHAN, G., VERMA, CS., WIE, X. AND LI, P. Rational design of thermally stable proteins: relevance to bionanotechnology. *J Nanosci. Nanotechnol.* 11 (2005) 1759-1767
- RITCHIE, GE., MOFFATT, BE., SIM., RB., MORGAN, BP., DWEK, RA. AND RUDD, PM. Glycosylation and the complement system. *Chem. Rev.* 102 (2002) 305-320
- ROBINA, I., MORENO-VARGAS, AJ., CARMONA, AT. AND VOGEL, P. Glycosidase inhibitors as potential HIV entry inhibitors? *Curr. Drug. Metabol.* 5 (2004) 329-361
- RYTER, CM., SCHÜBEL, H. AND STÖCKIGT, J. Novel glucoalkaloids from *Rauvolfia* cell cultures-acetyltrauglucine and related glucosides. *Z. NATURFORSCH.* 43C (1988) 479-484
- SAIKI, RK., GELFUND, DH., STOFFEL, S., SCHARF, SJ., HIGUCHI, R., HORN, GT., MULLIS, KB. AND ERLICH, HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491
- SAILER, D. AND RODER, G. Treatment of non-insulin dependent diabetic adults with a new glycoside hydrolase inhibitor (Bay g 5421). *Arzneimittelforschung* 30 (1980) 2182-2185
- SAMBROOK, J., FRITSCH, EF. AND MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* J. Sambrook, E.F. Fritsch and T Maniatis. New York, Cold Spring Harbour Press. (1989)
- SANGER, F., NICKLEIN, S. AND COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J.A., MARTINEZ-RIPOLL, M., LEQUERICA, J.L. AND POLAINA, J. Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.* 275 (1998) 491-502
- SCHUBOT, FD. AND WAUGH, DS. 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 Cryst. D* 60 (2004) 1981-1986
- SCHUETTELKOPF AW. AND VAN AALTEN DMF. PRODRG -a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica D* 60 (2004) 1355-1363

- SCHWAB, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*. 62 (2003) 837-849
- SHAO, H., HE, X., ACHNINE, L., BLOUNT, JW., DIXON, RA. AND WANG, X. Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 17 (2005) 3141-3154
- SHAPIRO, AL., VIÑUELA, E. AND MAIZEL, JV. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 815-820
- STEVENS, LH., BLOM, TJM. AND VERPOORTE, R. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep.* 12 (1993) 573-576
- SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 1-7
- TATUSOVA, TA. AND MADDEN, TL. Blast 2 sequences -a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174 (1999) 247-250
- THOMAS, BR., VEKILOV, PG. AND ROSENBERGER, F. Heterogeneity determination and purification of commercial hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 52 (1996) 776-784.
- THOMPSON, JD., HIGGINS, DG. AND GIBSON, TJ. CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 4673-4680
- TREIMER, JF. AND ZENK, MH. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur. J. Biochem.* 101 (1979) 225-233.
- UVERSKY, VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 11 (2002) 739-756
- VEKILOV, PG. Solvent Entropy Effects in the Formation of Protein Solid Phases. *Methods Enzymol.* 368 (2003) 84-105
- VEKILOV, PG. AND ROSENBERGER, F. Dependence of lysozyme growth kinetics on step sources and impurities. *J. Cryst. Growth* 158 (1996) 540-551

- VOGT, T. AND JONES, P. Glucosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5 (2000) 380-386
- WACKER, M., FELDMAN, MF., CALLEWAERT, N., KOWARIK, M., CLARKE, BR., POHL, NL., HERNANDEZ, M., VINES, ED., VALVANO, MA., WHITFIELD, C. AND AEBI, M. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103 (2006) 7088-7093
- WEINREB, NJ., BARRANGER, JA., CHARROW, J., GRABOWSKI, GA., MANKIN, HJ. AND MISTRY, P. Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 80 (2005) 223-229
- WEISS, RF. UND FINTELMANN, V. (eds.) *Lehrbuch der Phytotherapie.* Hippokrates Verlag, Stuttgart (1997)
- WHITE, A. AND ROSE, DR. Mechanism of catalysis by retaining beta-glucosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 645-651
- WILLFINGER, WW., MACKAY, K. AND CHOMCYNski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 (1997) 474-476
- WINN, MD., ISUPOV, MN. AND MURSHUDOV, GN. Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D* 57 (2001) 122-133
- ZHANG, J. AND XU, W. Recent advances in anti-influenza agents with neuraminidase as target. *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (2006) 429-448

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
Amp	Ampicillin
AS	Arbutin-Synthase
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
cmc	Kritische Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration)
CV	Säulenvolumen (Column Volumina)
DAPase	Dipeptidyl Aminopeptidase
DMAB	Dimethylaminoboran (Methylierungsreagenz)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
EtOH	Ethanol
g	Gravitationskonstante ($g = 9.81 \text{ m/s}^2$)
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HTS	High-Throughput-System
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LB	Luria-Bertani (Komplexmedium)
min	Minute
MeOH	Methanol
MRSA	Methicilin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MSH	β -Mercaptoethanol (=β-me)
NaP _i	Natrium-Phosphat-Puffer
NTA	Nitrilotriessigsäure (nitrilotriacetic acid)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PDB	Brookhaven Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
RG	Raucaffricin-Glucosidase
ROS	Reaktive Sauerstoff (O) Spezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SG	Strictosidin Glucosidase
STR1	Strictosidin Synthase
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	UDP-Glucose
UV	Ultraviolettes Licht
VJ-01	<i>N</i> -Benzyl- β -D-gluco-1,5-desoxy pyranosylamin
VJ-02	<i>N</i> -(Cyclohexylmethyl)- β -D-gluco-1,5-desoxy pyranosylamin
VJ-03	<i>N</i> -(<i>p</i> -Brombenzyl)- β -D-gluco-1,5-desoxy pyranosylamin
VT	Volumenteil

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Glukosylierung von Hydrochinon durch die Arbutinsynthase	4
Abbildung 2: Strictosidin als Mittelpunkt in der monoterpenoid Indolalkaloid-Biosynthese	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Hanging-Drop Experimentes	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Sitting-Drop Experimentes	31
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kristallisation durch Mikrodialyse	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Microbatch Kristallisation unter Öl	32
Abbildung 7: Reinigung der AS an Ni-NTA, Elutionsprofil	37
Abbildung 8: SDS-Gel einer Ni-NTA Reinigung der AS	38
Abbildung 9: Primer für die zweifache Mutation AS H360E,E368H	41
Abbildung 10: N-Terminus der AS nach Expression im pQE-2-Vektor	43
Abbildung 11: Primer um die Faktor Xa-Erkennungssequenz einzufügen	45
Abbildung 12: Primer zur Verkürzung des C-Terminus der Arbutin-Synthase	49
Abbildung 13: DisEMBL-Vorhersage für ungeordnete Loops in der AS	50
Abbildung 14: Primer für die gleichzeitige Mutation der Aminosäuren Glu426Ser, Glu427Ser, Lys429Asn, Lys430Asn	51
Abbildung 15: Agarosegel nach Test-PCR der AS-2S2N-Mutante	53
Abbildung 16: Vergleich der AS vor und nach Methylierung	54
Abbildung 17: Vergleich von verschiedenen Metallionen im IMAC-Verfahren	56
Abbildung 18: Elutionsprofil der Sephacryl S100 HR 26/60 Säule	57
Abbildung 19: SDS-Gel der Peaks während der Gelfiltration	58
Abbildung 20: Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie, MonoQ	59
Abbildung 21: SDS-Gel nach Anionenaustauscherchromatographie, MonoQ	59
Abbildung 22: ESI-MS Spektrum des Produktes der Strictosidin-Synthese	61
Abbildung 23: Typischer Verlauf einer Ni-NTA-Aufreinigung der Strictosidin Glukosidase	62
Abbildung 24: N-Terminus der SG nach Expression im pQE-2-Vektor	63
Abbildung 25: Typischer Verlauf einer MonoQ-Reinigung der Strictosidin Glukosidase	64
Abbildung 26: SDS-PAGE von SG nach MonoQ	64
Abbildung 27: Beispiele für das Kristallwachstum der Strictosidin Glukosidase mit NaCl-Puffer	66
Abbildung 28: Erste mehrdimensionale SG Kristalle	68
Abbildung 29: Einkristall der Strictosidin Glukosidase	68

Abbildung 30: Torsionswinkel in der Peptidkette	71
Abbildung 31: Ramachandranplot der nativen Strictosidin Glukosidase Struktur	72
Abbildung 32: Sequenzalignment der cyanogenen β -Glukosidase aus <i>Trifolium repens</i> mit Strictosidin Glukosidase	74
Abbildung 33: Primer zur Herstellung inaktiver Mutanten der SG	76
Abbildung 34: Anfängliche fo-fc Elektronendichte des Strictosidins im SG/Strictosidin-Komplex	78
Abbildung 35: Bei der Mutation der Aglykon-Erkennungsstelle benutzte Primer	82
Abbildung 36: Sequenz und Strukturbasiertes Alignment der Arbutin-Synthase mit Glykosyltransferasen bekannter Struktur	87
Abbildung 37: Bedeutung des N-Terminus für die Faltung der Familie GT-1	88
Abbildung 38: Bedeutung des C-Terminus für die Faltung der Familie GT-1	89
Abbildung 39: Das Katalytische Zentrum von VvGT1	90
Abbildung 40: Struktur der UGT71G1, eingefärbt nach kristallographischem Temperaturfaktor	91
Abbildung 41: Durchschnittliche Aminosäurezusammensetzung der Enzyme in der SwissProt-Datenbank	93
Abbildung 42: Positionen von Cysteinen der Arbutin-Synthase, analog dem Alignment, an der Struktur der UGT71G1	94
Abbildung 43: Die $(\beta/\alpha)_8$ -Faltung der Strictosidin Glukosidase	97
Abbildung 44: Der Reaktionsmechanismus der Strictosidin Glukosidase	97
Abbildung 45: Kontakte zwischen der Strictosidin Glukosidase und ihrem Substrat, Strictosidin	99
Abbildung 46: Kontakte im gemodelten Inhibitor/Strictosidin Glukosidase-Komplex	100
Abbildung 47: Der Glukosidase-Inhibitor VJ-03 im Komplex mit der Strictosidin Glukosidase	100
Abbildung 48: Die Konformation von Trp388 in den verschiedenen Enzymen	102
Abbildung 49: Die Region um Trp388	102
Abbildung 50: Oberflächen Darstellung der Strictosidin Glukosidase im Vergleich zu einer weiteren pflanzlichen Glykosidase	103
Abbildung 51: Hydrophobe Umgebung der Seitenkette von Trp388 in der Strictosidin Glukosidase	106
Abbildung 52: Möglicher Kontakt zwischen der Strictosidin Synthase und der Strictosidin Glukosidase	107
Abbildung 53: Verschiedene Konformationen des Strictosidins	107
Abbildung 54: Strukturformeln von Strictosidin und Raucaffricin im Vergleich	109
Abbildung 55: Vergleich der Bindungstaschen von der Strictosidin Glukosidase und der Raucaffricin Glukosidase	109

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Bakterienstämme	8
Tabelle 2: Die Eigenschaften des pQE-2-Vektors	8
Tabelle 3: Säulenmaterialien, alphabetisch nach Hersteller	10
Tabelle 4: Kits, Enzyme und Zubehör für Molekularbiologie, alphabetisch nach Produkt	10
Tabelle 5: Kits, für die Kristallisation, alphabetisch nach Firma	11
Tabelle 6: Chemikalien und Zubehör, alphabetisch nach Hersteller	11
Tabelle 7: Benutzte Geräte, alphabetisch nach Anwendungsgebiet	12
Tabelle 8: Bestandteile des benutzten SDS-PAGE Markers	19
Tabelle 9: Zusammensetzung eines Aktivitätstestes von AS für Hydrochinon	22
Tabelle 10: Zusammensetzung eines Aktivitätstestes der Strictosidin Glukosidase	24
Tabelle 11: Auf AS-Aktivität getestete Substanzen	39
Tabelle 12: Zur Kristallisation der AS eingesetzte Kits	46
Tabelle 13: Ansatz zur enzymatischen Produktion von Strictosidin	60
Tabelle 14: Bei der Veränderung der ursprünglichen Kristallisationsbedingungen verwendete Werte	66
Tabelle 15: Statistik des nativen Strictosidin Glukosidase Datensatzes	69
Tabelle 16: Statistik zur Struktur der nativen Strictosidin Glukosidase	72
Tabelle 17: Expressionsraten der inaktiven Mutanten der Strictosidin Glukosidase	75
Tabelle 18: Statistik der Struktur des Strictosidin-Glukosidase E207Q/Strictosidin-Komplexes	79
Tabelle 19: Namen und Strukturformeln der verwendeten Glukosidase-Inhibitoren	80
Tabelle 20: Relative Aktivitäten der an der Aglykonerkennungsstelle mutierten Enzyme	84
Tabelle 21: Aminosäuresequenzidentität der fünf bekannten Glycosyltransferasen (Familie 1) und der Arbutinsynthase untereinander	85