

Charakterisierung und Kristallisierung der Biphenylsynthase I
von *Sorbus aucuparia*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Torben Raeth
aus Salzgitter

1. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues

2. Referent: Professor Dr. Rolf Müller

eingereicht am: 01.08.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.10.2007

Druckjahr 2008

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L. (2007)

Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase

Planta 225: 1495-1503

Beerhues, L., Liu, B., Raeth, T., Klundt, T., Beuerle, T., Bocola, M. (2007)

Benzoic acid-specific type III polyketide synthases

American Chemical Society Symposium Series 955 (Rimando A.M., Baerson, S.R., eds.):
97-108

Tagungsbeitrag in Form eines Vortrags

T.Raeth und L.Beerhues

Molecular cloning of biphenyl synthase from *Sorbus aucuparia* cell cultures

3. Kolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms "Evolution metabolischer Diversität" (SPP 1152), Halle, 4.10.2004

Tagungsbeiträge in Form einer Posterpräsentation

Benye Liu, Torben Raeth, Ludger Beerhues

Botanikertagung, Braunschweig, 5-10. September 2004

Biphenyl biosynthesis in *Sorbus aucuparia* cell cultures

Benye Liu, Torben Raeth, Tim Klundt, Marco Bocola, Ludger Beerhues

XVII International Botanical Congress, Wien, 17-23. Juli 2005

Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthase

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie der Carolo-Wilhelmina-Universität Braunschweig unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Beerhues angefertigt.

Meinem Doktorvater danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die stets fordernde Unterstützung während der Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch für die vielen Unternehmungen und Diskussionen außerhalb der Universität.

Herrn Prof. Dr. R. Müller danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg. Besonders danken möchte ich hier Beatrice Eppler, Christoph Partier und Piotr Neumann, die die Arbeit im Rahmen der DFG-Schwerpunkt-Kooperation erst ermöglichten.

Besonders erwähnt sei Herr Prof. Dr. Benye Liu, der mich durch zahlreiche Diskussionen und praktische Tipps stets gefördert und angeleitet hat.

Herrn Dr. Rainer Lindigkeit möchte ich für die Unterstützung als Systemadministrator und als Salzgitteraner danken. Herrn Dr. Till Beuerle danke ich für die Aufnahme der GC-MS-Spektren.

Es war mir ein besonderes Vergnügen, mit meinen lieben Kollegen zusammenzuarbeiten. Frau Nora Feye und Frau Susanne Kühle danke ich für die schöne Zeit im Labor. Des weiteren möchte ich Herrn Helge Scharnhop für so manches Basketballspiel und für die vielen angenehmen Bastelstunden an technischem Gerät danken. Mein Dank gilt auch Frau Ines Rahaus für Ihr organisatorisches Geschick und für das Mitbringen der Braunschweiger Zeitung.

Allen anderen nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für die großartige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwiegereltern. Dafür, dass Ihr mich bei und neben meiner Arbeit stets unterstützt habt, möchte ich Euch von ganzen Herzen danken.

Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich meiner Frau Iris, die mir immer den Rücken freigehalten hat und mir durch Ihre Arbeit erst meine Tätigkeit ermöglichte. Für die aufgebrauchte Geduld, das unendliche Verständnis und Deine Hilfe tausend Dank.

I	Abbildungsverzeichnis	10
II	Abkürzungsverzeichnis	13
1	EINLEITUNG	16
2	MATERIAL	25
2.1	Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie	26
2.1.3	Lösungen, Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation	28
2.1.4	Bakterienstämme und Plasmide	31
2.1.5	Lösungen und Puffer zur Kristallisierung	31
2.1.6	Geräte	46
3	METHODEN	47
3.1	Methoden der Molekularbiologie	47
3.1.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E.coli</i>	47
3.1.2	Aufbewahrung von <i>E.coli</i> -Kulturen	47
3.1.3	Messung der Zahl der Mikroorganismen	47
3.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation	48
3.1.5	Ethanol-fällung von Plasmid-DNA	48
3.1.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren	48
3.1.7	Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen	49
3.1.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	49
3.1.9	Ligation	49
3.1.10	Transformation in <i>E.coli</i>	50
3.1.11	Insertionskontrolle	50
3.1.12	Proteinexpression	50
3.1.13	Zellaufschluss	51
3.2	Methoden der Biochemie	51
3.2.1	Affinitätschromatographie	51
3.2.1.1	Proteinreinigung über Ni-NTA-Agarose	51
3.2.1.2	Proteinreinigung über FPLC	52
3.2.2	Bestimmung von Proteingehalten nach Bradford	53
3.2.3	SDS-Page / Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.2.3.1	Herstellung des Gels, Probenvorbereitung und Elektrophorese	54
3.2.3.2	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	54
3.2.3.3	Silbernitratfärbung von SDS-Gelen	54
3.2.3.4	Dokumentation von SDS-Gelen	55

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	55
3.2.4.1	Entsalzen und Umpuffern kleiner Volumina Proteinlösung	55
3.2.4.2	Entsalzen und Umpuffern großer Volumina Proteinlösung	55
3.2.5	Aufbewahrung des gereinigten Proteins	56
3.2.6	Abspaltung des Polyhistidinendes	56
3.2.6.1	Abspaltung des Polyhistidinendes von pRSet B codierten Proteinen	56
3.2.6.2	Abspaltung des Polyhistidinendes von pET 28c codierten Proteinen	57
3.3	Methoden der Analytik	57
3.3.1	Inkubation der Polyketid-Synthasen	57
3.3.2	HPLC/ Hochleistungsflüssigchromatographie	58
3.3.2.1	Instrumentierung HPLC 1	58
3.3.2.2	Instrumentierung HPLC 2	58
3.3.2.3	Mobile Phase	58
3.3.3	GC-MS	59
3.3.3.1	Instrumentierung	59
3.3.3.2	Probenvorbereitung	59
3.3.4	ESI-MS	59
3.3.4.1	Instrumentierung	60
3.3.4.2	Probenvorbereitung	61
3.3.5	Radiochemische Verfahren	61
3.3.5.1	<i>Flüssigszintillation</i>	61
3.3.5.2	<i>Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-DC)</i>	61
3.3.5.3	<i>Instrumentierung Radio-HPLC</i>	61
3.3.5.4	<i>Probenvorbereitung</i>	62
3.3.6	Gelfiltration	62
3.3.6.1	Instrumentierung	62
3.3.6.2	Mobile Phase	62
3.3.7	Charakterisierung der überexprimierten Proteine	63
3.3.7.1	<i>Bestimmung von Temperatur- und pH-Optima</i>	63
3.3.7.2	<i>Bestimmung des DTT-Optimums</i>	63
3.3.7.3	<i>Ermittlung der Substratspezifität</i>	63
3.3.7.4	<i>Bestimmung der kinetischen Daten</i>	64
3.4	Methoden der Proteinkristallisierung	64
3.4.1	Proteinkristallisierung	64
3.4.1.1	<i>Screening nach der „sitting drop“ Methode</i>	65
3.4.1.2	<i>Proteinkristallisation nach der „hanging drop“ Methode</i>	65
3.4.1.3	<i>Kristall-Seeding</i>	66
3.4.2	Co-Kristallisierung	66
3.4.3	Röntgenstrukturanalyse	67
3.4.4	Datenverarbeitung und Strukturaufklärung	67
3.4.4.1	<i>Datenverarbeitung</i>	67

3.4.4.2	Strukturlösung	68
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Grundlage dieser Arbeit	69
4.2	Expression der BIS I	71
4.3	Kontrolle der heterologen Expression	72
4.4	Affinitätschromatographie der rekombinanten BIS I	72
4.5	Test auf enzymatische Aktivität	73
4.6	Charakterisierung der rekombinanten BIS I	75
4.6.1	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit	75
4.6.2	Bestimmung der pH-Abhängigkeit	75
4.6.3	Bestimmung der DTT-Abhängigkeit	76
4.6.4	Bestimmung der Proteingröße	78
4.6.5	Bestimmung der kinetischen Parameter	79
4.6.6	Substratspezifität	80
4.6.6.1	Radio-DC-Analyse möglicher Produkte	80
4.6.6.2	Produktquantifizierung mittels Radio-HPLC	80
4.7	Analyse der enzymatischen Produkte	81
4.7.1	Analyse der Produkte mit Benzoyl-CoA	81
4.7.1.1	ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 8,9 min mit Benzoyl-CoA	83
4.7.1.2	ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 11,7 min mit Benzoyl-CoA	84
4.7.1.3	ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 12,6 min mit Benzoyl-CoA	84
4.7.2	Analyse der Produkte mit <i>meta</i> -Hydroxybenzoyl-CoA	85
4.7.3	Analyse der Produkte mit <i>ortho</i> -Hydroxybenzoyl-CoA	87
4.8	Aufreinigung BIS I für die Proteinkristallisierung	91
4.9	Puffer-Screening für BIS I mit His-Tag	93
4.10	Abspaltung des Polyhistidinrestes	95
4.11	Puffer-Screening für BIS I ohne His-Tag	97
4.12	Proteinkristalle mit der „hanging drop“ Methode	100
4.13	Kristallseeding	101
4.14	Kristallisierung in Gegenwart von Substraten und Produkt	102
4.15	Röntgenbeugungsanalyse	104
4.16	Synchrotron	105
4.17	Bestimmung der Kristallstruktur durch Molekularen Ersatz	105
4.18	Tertiärstruktur	108

Inhaltsverzeichnis

4.19	Aufreinigung und Puffer-Screening der BPS mit His-tag	112
4.20	Puffer-Screening der BPS ohne His-Tag	113
5	DISKUSSION	120
6	ZUSAMMENFASSUNG	135
7	LITERATURVERZEICHNIS	137
VIII	Lebenslauf	142

I Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Darstellung der beiden zuerst detektierten Typ III-PKS	17
Abb 1.2	Übersicht weiterer Typ III-PKS-Reaktionen	18
Abb 1.3	Stammbaum der Typ III-PKS	19
Abb 1.4	<i>Sorbus aucuparia</i>	20
Abb 1.5	<i>Hypericum perforatum</i>	21
Abb 1.6	Vergleich der Reaktionsmechanismen von BIS und BPS	23
Abb 3.1	Schematische Darstellung des „Sitting drop“ Verfahrens	65
Abb 3.2	Schematische Darstellung des „Hanging drop“ Verfahrens	66
Abb 4.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen der BIS I von <i>Sorbus aucuparia</i> , der BPS von <i>Hypericum androsaemum</i> und der CHS von <i>Medicago sativa</i>	70
Abb 4.2	Vektorkarte des pRset B-Vektors	71
Abb 4.3	SDS-PAGE zur Überprüfung der FPLC-Aufreinigung der BIS I	73
Abb 4.4	HPLC-Analyse von BIS I-Ansätzen mit Benzoyl-CoA	74
Abb 4.5	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der BIS I-Aktivität	76
Abb 4.6	Bestimmung des pH-Optimums der BIS I	77
Abb 4.7	Einfluss der DTT-Konzentration auf die Bildung des 3,5-Dihydroxybiphenyls	77
Abb 4.8	Einfluss der DTT-Konzentration auf die Bildung eines Nebenprodukts	77
Abb 4.9	Bestimmung der BIS I-Molekülmasse auf einer kalibrierten Gelfiltrationssäule	78
Abb 4.10	Bestimmung des K_m -Wertes für Benzoyl-CoA nach Lineweaver-Burk	79
Abb 4.11	Bestimmung des K_m -Wertes für Malonyl-CoA nach Lineweaver-Burk	79
Abb 4.12	HPLC-Chromatogramm einer Großinkubation mit Benzoyl-CoA, Detektion bei 257,0 nm	82
Abb 4.13	UV- Spektrum des Peaks R_t 8,9 min	82
Abb 4.14	UV-Spektrum des Peaks R_t 11,7 min	82
Abb 4.15	UV- Spektrum des Peaks R_t 12,6 min	82
Abb 4.16	ESI-MS-Spektrum des Produktpeaks bei R_t 8,9	83
Abb 4.17	UV-Spektrum der Referenzsubstanz 2,4,6-Trihydroxybenzophenon	83
Abb 4.18	Strukturformel des 2,4,6-Trihydroxybenzophenons	83
Abb 4.19	ESI-MS Spektrum des Produktpeaks bei R_t 11,7	84
Abb 4.20	Strukturformel des 3,5-Dihydroxybiphenyls	84
Abb 4.21	ESI-MS Spektrum des Produktpeaks bei R_t 12,6	85

Abb 4.22	UV-Spektrum der Phenylpyron-Referenz	85
Abb 4.23	Strukturformel des Phenylpyrons	85
Abb 4.24	HPLC-Chromatogramm der Großinkubation mit <i>m</i> -Hydroxybenzoyl-CoA, Detektion bei 324,0 nm	86
Abb 4.25	ESI-MS Spektrum des Produktpeaks R _t 11,2 min	86
Abb 4.26	UV-Spektrum des Peaks R _t 11,7 min	87
Abb 4.27	UV-Spektrum der 3',4-Dihydroxyphenylpyron Referenz	87
Abb 4.28	Strukturformel des 3',4-Dihydroxyphenylpyrons	87
Abb 4.29	HPLC-Chromatogramm der Großinkubation mit <i>o</i> -Hydroxybenzoyl-CoA, Detektion bei 281,0 nm	88
Abb 4.30	ESI-MS-Spektrum des Produktpeaks bei R _t 13,3 min	88
Abb 4.31	UV-Spektrum des Produktpeaks bei 13,3 min	89
Abb 4.32	UV-Spektrum der 4-Hydroxycumarin-Referenz	89
Abb 4.33	BIS-katalysierte Umsetzung von <i>o</i> -Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA zum Diketidlakton	89
Abb 4.34	GC-MS-Analyse des enzymatischen Produkts mit <i>o</i> -Hydroxybenzoyl-CoA	90
Abb 4.35	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der einfach über Ni-NTA aufgereinigten BIS I	91
Abb 4.36	SDS-PAGE und Coomassie Färbung der zweimal über Ni-NTA aufgereinigten BIS I	92
Abb 4.37	SDS-PAGE und Silbernitratfärbung der zweimal über Ni-NTA aufgereinigten BIS I	92
Abb. 4.38	HPLC –Analyse eines Enzymansatzes mit doppelt aufgereinigter BIS	93
Abb. 4.39	SDS-PAGE und Silbernitratfärbung der für das Puffer-Screening aufgereinigten BIS I	94
Abb. 4.40	SDS-PAGE und Silberfärbung der für das zweite Screening zweifach aufgereinigten BIS I	95
Abb. 4.41	SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Enterokinasespaltung	96
Abb. 4.42	SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Trypsinspaltung	96
Abb. 4.43	SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überprüfung der Reinheit	98
Abb. 4.44, a	Kristallisationskeime der BIS I in PEG 400 / Na-Hepes-Puffer	99
Abb. 4.44, b	Kristallisationskeime der BIS I in PEG 8000 / KH ₂ PO ₄ -Puffer	99
Abb. 4.45, a	BIS I-Kristalle mit der „hanging drop“ Methode in KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5,5	100
Abb. 4.45, b	BIS I-Kristalle mit der „hanging drop“ Methode in KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5,7	101
Abb. 4.46	BIS I-Satellitenkristall	102
Abb. 4.47, a	Kristallkeime bei der Co-Kristallisierung der BIS I mit Malonyl-CoA	103
Abb. 4.47, b	Kristallkeime bei der Co-Kristallisierung der BIS I mit Benzoyl-CoA	103
Abb. 4.48	Streubild der Röntgenstrukturanalyse der BIS I	104
Abb. 4.49	Asymmetrische Zelleinheit der P1 Struktur	106

Abb. 4.50	Asymmetrische Zelleinheit der P21-Struktur	107
Abb. 4.51	Homodimer der BIS I	109
Abb. 4.52	Bindeknopf zwischen den Monomeren	109
Abb. 4.53	Monomer der BIS	109
Abb. 4.54	Katalytische Triade der BIS I und das „gatekeeper“ Phe 212	110
Abb. 4.55	Darstellung der CoA-Bindetasche von der Außenhülle des Proteins	110
Abb. 4.56	Darstellung der Substratbindetasche	111
Abb. 4.57	Darstellung der Cyclisierungstasche	111
Abb. 4.58	SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung der Reinheit der BPS	112
Abb. 4.59	Salzkristall bei der Kristallisierung der BPS mit Polyhistidinende	113
Abb. 4.60	SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Enterokinasespaltung des BPS-Fusionspeptids	114
Abb. 4.61	SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Reinheit der BPS	115
Abb. 4.62	SDS-PAGE und Silberfärbung zur Überwachung der Reinheit der BPS	116
Abb. 4.63, a	SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überwachung der Reinheit der mittels zusätzlicher Gelfiltration gereinigten BPS	117
Abb. 4.63, b	SDS-PAGE mit Silberfärbung zur Überwachung der Reinheit der mittels zusätzlicher Gelfiltration gereinigten BPS	117
Abb. 4.64, a	„Kristalligel“ der BPS in Na-MES Puffer	118
Abb. 4.64, b	Kristalle der BPS in Na-Acetat Puffer	118
Abb. 4.65	Streubild eines BPS Kristalls	119
Abb. 5.1	Vergleich der Strukturformel von Vitamin K ₁ , 4-Hydroxycumarin und Dicumarol	123
Abb. 5.2	Schematische Darstellung des Vitamin K-Konversionszyklus	124
Abb. 5.3	Darstellung der Gerinnungskaskade	126
Abb. 5.4	Reaktionsmechanismus der BIS	129
Abb. 5.5	Vergleich der Bindungsverhältnisse in den aktiven Zentren der CHS und STS und einer <i>E. coli</i> -Thiosterase	130
Abb. 5.6	Vergleich der aktiven Zentren von BIS I und STS	132
Abb. 5.7	Vergleich der Konformation von BIS I und STS	133
Abb. 5.8	Vergleich der Konformation von BIS I und CHS	133
Abb. 5.9	Überlagerung der BIS I-Raumstruktur im Bereich des aktiven Zentrums mit der Elektronendichtekarte	134

II Abkürzungsverzeichnis

Å	Armströng
Abb.	Abbildung
ACP	Acylcarrierprotein
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
BIS	Biphenylsynthase
BPS	Benzophenonsynthase
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DANN
CHS	Chalkonsynthase
Co-A	Coenzym-A
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI/MS	Elektronenspray Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
<i>H.a.</i>	<i>Hypericum androsaemum</i>
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galaktopyranosid
K	Kelvin
kBq	Kilobecquerel
K _{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis Konstante
L	Liter
LB-Medium	Luria Bertrant Medium
LS-Medium	Linsmeier Skoog Medium
M	molare Masse
mA	Milliampere

MCS	multi cloning site
Mg	Magnesium
MeOH	Methanol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ml	Milliliter
min.	Minute
mM	Millimolar
MR	molekularer Ersatz
MS	Massenspektrometrie
<i>M.s.</i>	<i>Medicago sativa</i>
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoressigsäure
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
Na-HEPES	Natrium 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethylsulfonsäure
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriessigsäure
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthasen
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S.a.</i>	<i>Sorbus aucuparia</i>
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	super optimal broth Medium
STS	Stilbensynthase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Geschwindigkeit
VIS	sichtbares Licht
VT	Volumenteile
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galaktopyranosid

Aminosäuren

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

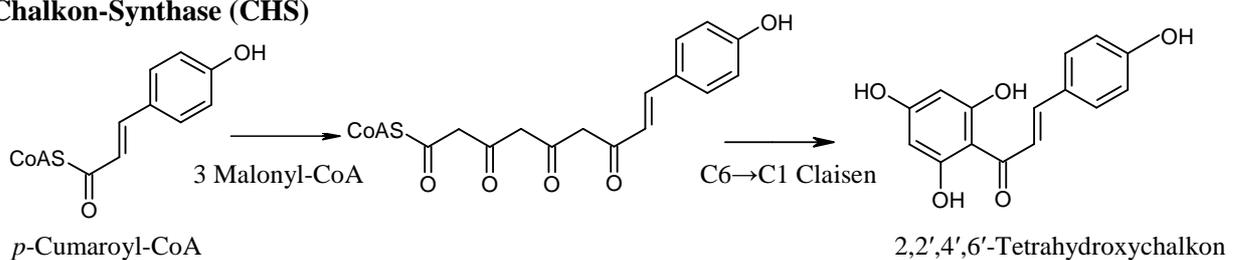
1 Einleitung

Über verschiedene Stoffwechselwege bilden die pflanzlichen Organismen ein großes Spektrum an Inhaltsstoffen. Grundsätzlich lassen sich diese als Produkte des Primär- und des Sekundärstoffwechsels einteilen. Primärstoffe sind in der gesamten Pflanzenwelt vorhanden und sind essentiell für die Entwicklung des pflanzlichen Organismus. Sie sind an Prozessen wie z.B. der Energiegewinnung sowie dem Wachstum und der Differenzierung von Pflanzenorganen beteiligt. Bei Sekundärstoffen handelt es sich um für die Entwicklung der Pflanze nicht lebensnotwendige Substanzen, die aber für das Überleben der Art im Ökosystem unverzichtbar sind. Diese Stoffe treten in einer großen strukturellen Vielfalt auf, sind häufig sogar artgebunden und werden in vielen Fällen in ganz bestimmten Pflanzenorganen gebildet und akkumuliert. Auf Grund ihrer großen Diversität sind nicht alle Strukturen identifiziert und nicht alle ihre Aufgaben bekannt. Sekundärmetabolite locken zum Beispiel als Farb- und Aromastoffe pollenverbreitende Insekten und samenverbreitende Tiere an. Außerdem dienen sie der Pflanze als effektive chemische Abwehrstoffe gegen Herbivoren und als Phytoalexine gegen pathogene Mikroorganismen. Herausgebildet unter dem Selektionsdruck der Herbivore und der mikrobiellen Infektion, verschaffen sie einer Pflanze einen Standortvorteil gegenüber anderen Pflanzen und sichern ihr Überleben in der Umwelt (Dixon, 2001). Die große strukturelle Vielfalt der Sekundärstoffe geht mit einem breiten Spektrum an pharmakologischen Wirkungen einher. So werden Zytostatika wie die Vinca-Alkaloide oder starke Analgetika wie das Morphin aus Pflanzen gewonnen. Auch die Nahrungsmittelindustrie hat die Bedeutung der Produkte des Sekundärstoffwechsels erkannt. Die positiven Effekte, wie z.B. die antioxidativen Wirkungen oder die lipidsenkenden Eigenschaften des Functional Food, werden oft den Sekundärstoffen zugesprochen (Stützel et al., 2004; Hagel, 2000).

Eine große Gruppe der Sekundärmetaboliten wird durch die Polyketid-Synthasen (PKS) gebildet. Trotz der mannigfaltigen Strukturen der Polyketide werden die meisten enzymatisch über eine Verknüpfung von aktivierten Acetyleinheiten zu Poly- β -Ketoverbindungen aufgebaut (Schröder, 1997). PKS wurden bisher aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen isoliert und lassen sich in drei Gruppen einteilen: PKS I, PKS II und PKS III. Evolutionär gesehen leiten sich alle drei Typen von der β -Ketoacylsynthase der Fettsäurebiosynthese ab (Austin und Noel, 2002). Um als Substrat für die PKS-Reaktion zur Verfügung zu stehen, müssen die zu verstoffwechselnden Substanzen und Intermediate aktiviert sein. Dieser Vorgang basiert

entweder auf einer Thioesterbildung mit dem Coenzym A oder der Veresterung an das 9 kDa große Acylcarrierprotein (ACP). Bei den Typ I-PKS handelt es sich um multifunktionale Enzymkomplexe aus mehreren Polypeptiden mit einer Größe von bis zu 350 kDa (Klingauf, 2004). Jede einzelne Domäne des Komplexes ist für einen eigenen katalytischen Prozess, meist eine C-C Verknüpfung und modifizierende Reaktionen, verantwortlich. Der bekannteste Vertreter der PKS I ist die Erythromycin-Synthase, durch die der Polyketidnukleus des Antibiotikums gebildet wird. Die Typ II-PKS sind ebenfalls multifunktionelle Proteinkomplexe, die die Bildung von cyclischen und aromatischen Produkten katalysieren, allerdings fehlt ihnen die Fähigkeit zur Reduktion. Häufigste Produktgruppe sind phenolische Verbindungen. Typ III-PKS sind Homodimere mit einer Proteingröße von ca. 80-85 kDa (Klingauf, 2004). Sie besitzen pro Untereinheit ein aktives Zentrum und haben die Fähigkeit, alle Schritte der Biosynthese von Sekundärstoffen wie z.B. Decarboxylierungs-, Kondensations-, Cyclisierungs- und Aromatisierungsreaktionen zu katalysieren. Sie unterscheiden sich in der Präferenz des an Coenzym A gebundenen Startermoleküls, der Zahl der Additionen von Acetyleinheiten und der Art der katalysierten Cyclisierung (Abb. 1.1 und 1.2). Die bekannteste Typ III-PKS ist die Chalkonsynthase (CHS), deren Produkt 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon von weiterführenden Enzymen als Vorstufe für die Synthese von Flavonoiden genutzt wird. Als Synonym für die funktionell diversen Typ III-PKS wird auch der Begriff der CHS-verwandten Enzyme genutzt, da sie durch Genduplizierung und Mutation aus der im Pflanzenreich ubiquitären CHS hervorgegangen sind. Dies kann durch einen Stammbaum der Enzyme verdeutlicht werden (Abb. 1.3, Liu et al., 2007).

Chalkon-Synthase (CHS)



Stilben-Synthase (STS)

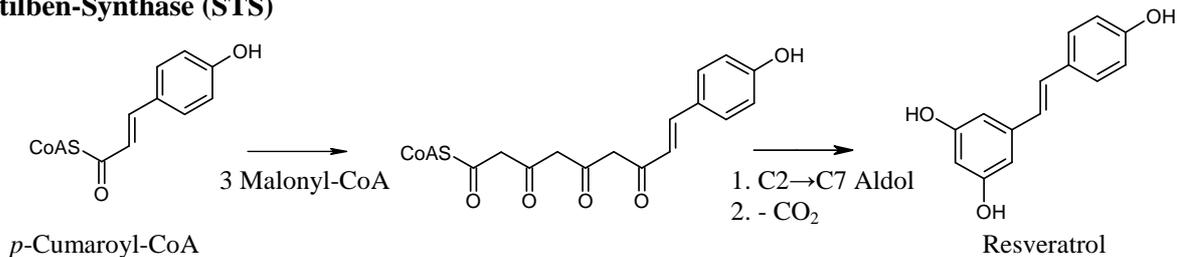


Abb.1.1 Darstellung der beiden zuerst detektierten Typ III-PKS

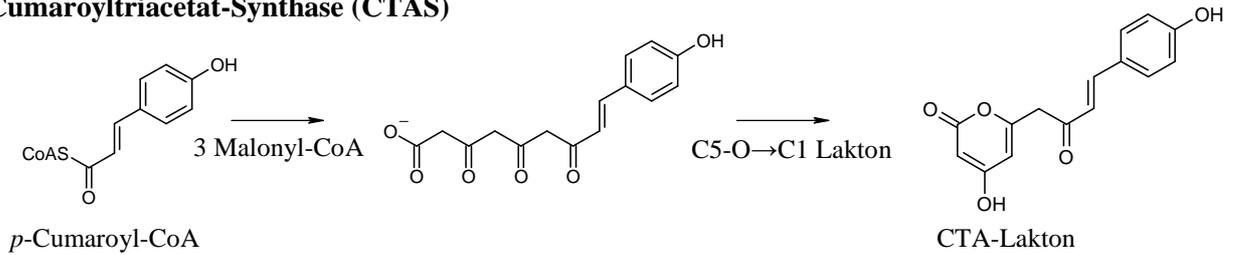
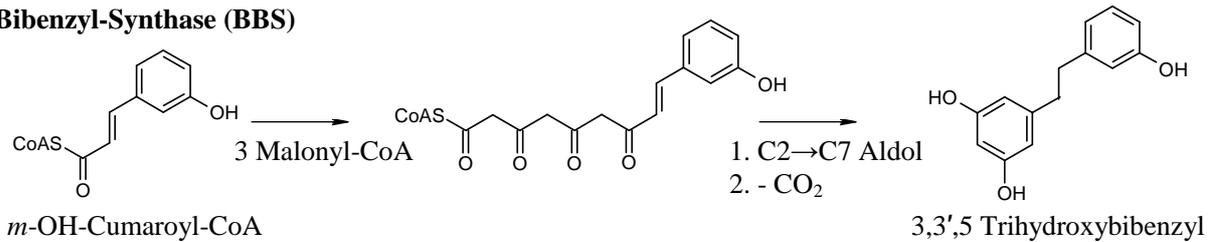
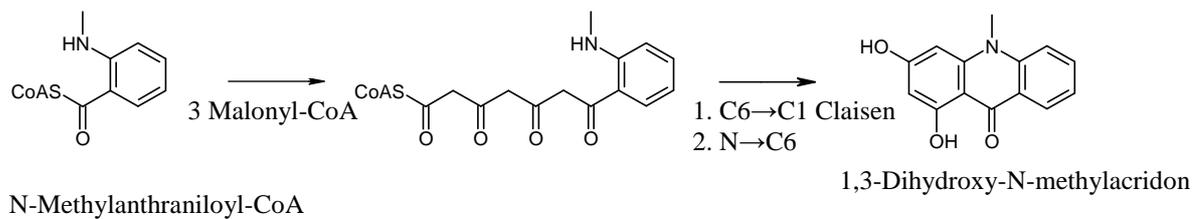
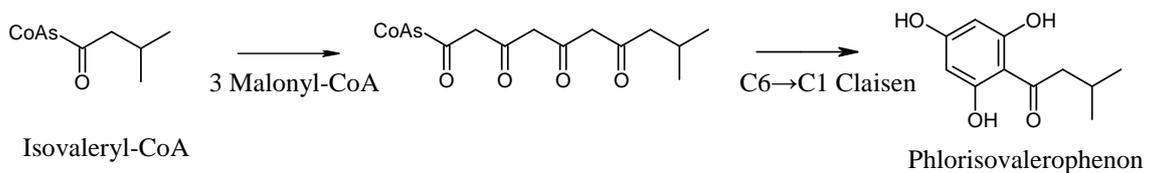
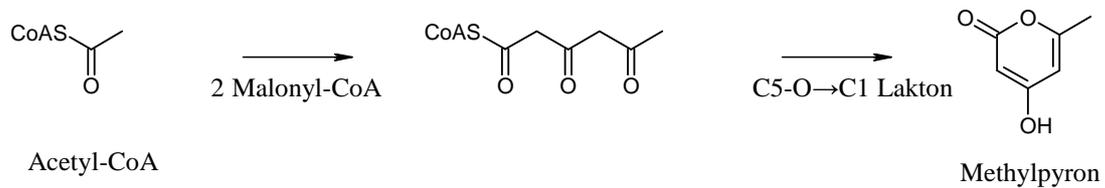
Cumaryltriacetat-Synthase (CTAS)**Bibenzyl-Synthase (BBS)****Acridon-Synthase (ACS)****Isovalerophenon-Synthase (VPS)****2-Pyron-Synthase (2-PS)**

Abb. 1.2 Übersicht weiterer Typ III-PKS-Reaktionen

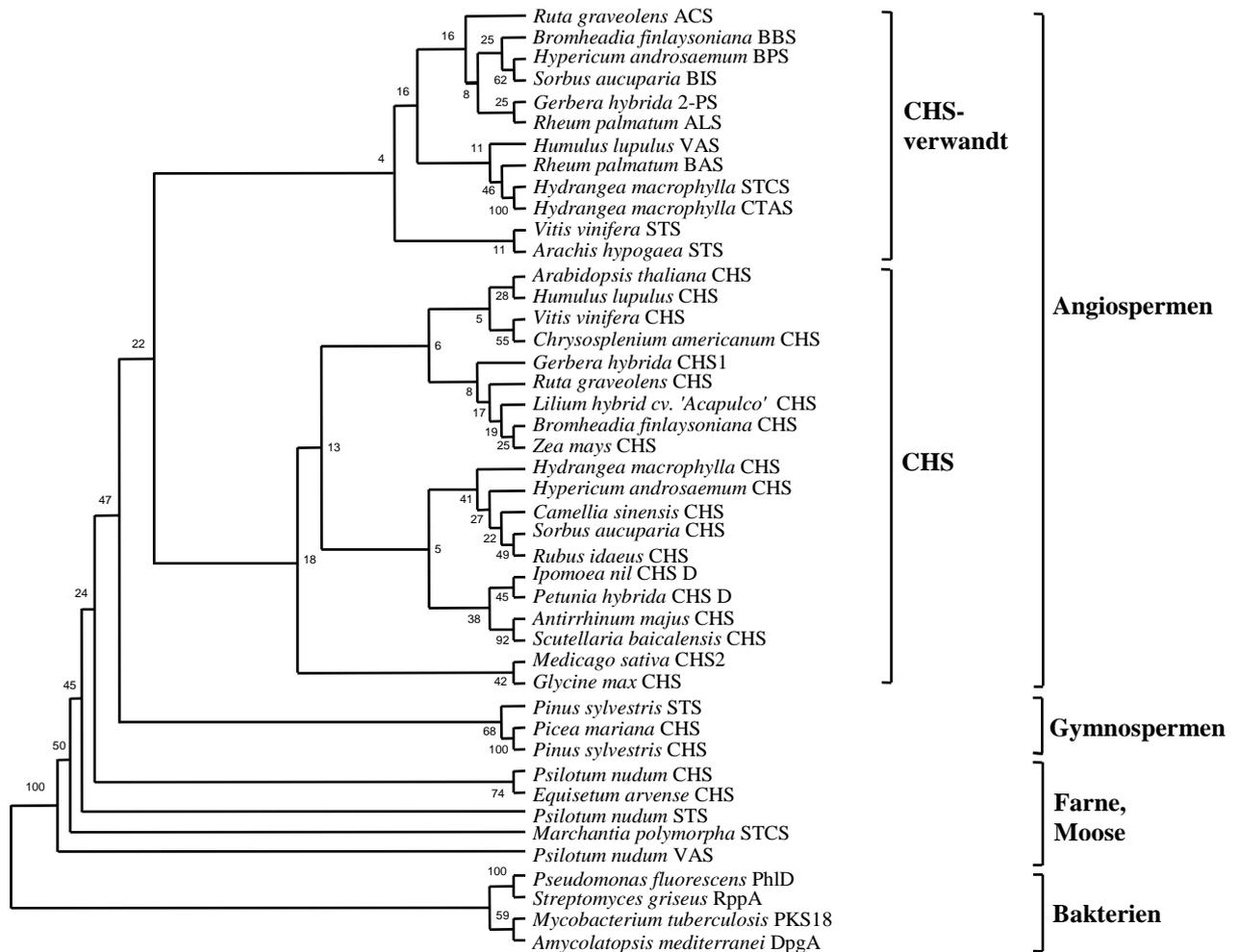


Abb. 1.3 Stammbaum der Typ III-PKS

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Typ III-PKS handelt es sich um Enzyme aus *Sorbus aucuparia* und *Hypericum androsaemum*. Zellkulturen dieser beiden Pflanzenarten hatten sich als experimentelle Systeme für die Familien Rosaceae und Clusiaceae hervorgetan, die aus ökonomischen bzw. pharmakologischen Gesichtspunkten interessant sind.



Abb. 1.4 *Sorbus aucuparia*

die Eberesche häufig als Zierpflanze im Gartenbau gepflanzt.

Der deutsche Name Eberesche leitet sich von dem altdeutschen Wort „eber“ ab, dessen Bedeutung heute mit „aber“ oder „falsch“ übersetzt werden kann. Somit wird die Eberesche als „falsche Esche“ bezeichnet, da die wechselständigen, unpaarigen Blätter beider Baumarten sich sehr ähnlich sind. Die wissenschaftliche Namensgebung „aucuparia“ setzt sich aus den lateinischen Wörtern „avis = au = Vogel“ und „capere = fangen“ zusammen und lässt sich frei mit „Vogelfang“ übersetzen. Grundlage für diese Namensgebung ist die Tatsache, dass die Früchte der Eberesche vielen Vogelarten als Nahrungsquelle dienen und diese dann leicht mit Schlingen gefangen werden konnten. Auch das im deutschen Sprachraum gebräuchliche Synonym „Vogelbeere“ hat den gleichen Ursprung (Häne, 2002).

In den Früchten können Parasorbinsäure, Sorbitol, Pektin, Tannine, Äpfelsäure, Carotinoide und Vitamin C (bis zu 1 mg/1 g) als Inhaltsstoffe identifiziert werden (Hunnius, 1998). Vor allem die Äpfelsäure und die Gerbstoffe prägen den bitteren Geschmack der Früchte. Die abführende Wirkung der Parasorbinsäure macht die rohen Früchte für den Menschen ungenießbar. Entgegen der weit verbreiteten Meinung sind die Früchte des Vogelbeerbaumes nicht giftig und so wird den Beeren von den Giftinformationszentren kein bzw. nur ein geringes Vergiftungspotenzial zugeordnet (Giftinformationszentrum der Länder Rheinland-Pfalz und Hessen). In der Volksmedizin ist die Eberesche seit langem bekannt, doch wird ihr keine große Bedeutung zugemessen. Ein aus den Blättern aufgebrühter Tee wurde z.B. zur Blutreinigung oder bei Husten und Heiserkeit verwendet und die getrockneten Früchte wurden bei Durchfall eingesetzt. Aufgrund des hohen Vitamin C-Gehaltes dienten die getrockneten Beeren auch zur Stärkung der Abwehrkräfte.

S. aucuparia, die Eberesche (Abb. 1.4), zählt in der Familie Rosaceae zur Unterfamilie Maloideae, zu der auch Apfel und Birne sowie Weißdorn gehören. Sie ist ein Pionierbaum, der z.B. nach Sturmschäden entstandene Brachflächen schnell besiedelt. Der bis zu 20 m hohe, winterharte Baum kann durch sein tiefgreifendes Wurzelwerk die Erosion des Bodens stark verringern, so dass er häufig als Schutzwaldbaumart bei biologischen Wildbach- und Lawinenverbauungen eingesetzt wird. Wegen der weißen Blüten, die ab August reifen, roten Fruchtstände und der prächtigen Herbstfärbung wird

Größere Bedeutung besitzt die Pflanze in der Mythologie (Häne, 2002). Die Germanen widmeten die Eberesche ihrem Gott Donar und dessen Ziege, die sich von den Blättern des Baumes ernährte. Bei den keltischen Volksgruppen diente der Vogelbeerbaum als Fruchtbarkeitssymbol und Schutz vor bösem Zauber. Heute findet die Vogelbeere hauptsächlich Anwendung in der Küche. Durch das Erhitzen der Früchte wird die Parasorbinsäure zur Sorbinsäure abgebaut und die diarrhoische Wirkung aufgehoben, so dass die Beeren zu Likören und Marmeladen verarbeitet werden können. 1997 wurde *S. aucuparia* zum Baum des Jahres ausgerufen.



Abb 1.5 *Hypericum perforatum*

Paracelsus setzte Anfang des 16. Jahrhunderts die Pflanze zur Behebung seelischer Störungen ein. Der Name *Hypericum* leitet sich von den griechischen Wörtern „hyper“ = über und „eikon“ = Bild ab. Im antiken Griechenland wurden die Pflanzen zur Abwehr böser Geister und Dämonen über die Götterdarstellungen gehängt. Die Römer übernahmen die Nomenklatur und etablierten so den Namen im lateinischen Wortschatz. Der Artname *perforatum* bezieht sich auf die durchscheinend punktierten Blätter, die wegen der vielen Sekretbehälter im Gegenlicht durchstoßen aussehen (Czygan, 1997, 2003). Die deutsche Bezeichnung Johanniskraut bezieht sich auf den Johannistag am 24. Juni, da die Pflanze zu diesem Zeitraum zu blühen beginnt. Der als gleichwertig benutzte Name Hartheu geht auf den stark verholzten Stängel zurück, der schon von Hildegard von Bingen (1088-1180) erwähnt wurde. Weitere Synonyme wie Herrgottsblut oder Blutkraut stehen mit dem rot austretenden Pflanzensaft in Verbindung, der beim Zerreiben vor allem der Blüten hervortritt.

H. androsaemum ist eine von ca. 340 *Hypericum*-Arten, die wegen ihrer komplexen Acyl- und Benzoylphloroglucin-Derivate interessant sind. Ein bekannter Vertreter der weltweit verbreiteten Familie Clusiaceae ist *H. perforatum* (Abb.1.5). Die medizinische Bedeutung dieser *Hypericum*-Arten wurde schon in der frühen Antike entdeckt. Plinius der Ältere (23-79 n. Chr.) erwähnt die Nutzung des Johanniskrautes bei der Behandlung von Brandwunden. Bei Celsius (47 n. Chr.) ist das Kraut Bestandteil eines allwirksamen Antidots, des Theriak, dessen Verwendung bis ins Mittelalter anhielt.

In der Neuzeit findet das Johanniskraut seinen Weg in die moderne Medizin. Die Kommission E des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte bewertet die Droge positiv. Als Anwendungsgebiete werden der innerliche Einsatz bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und nervöser Unruhe aufgeführt. Äußerlich können Johanniskraut-Zubereitungen zur Behandlung von Verbrennungen, Ekzemen und stumpfen Traumata eingesetzt werden. Vor allem die antidepressiven Eigenschaften haben das Johanniskraut in den Mittelpunkt des Interesses gestellt. Klinische Studien bestätigen die gleiche Wirksamkeit wie bei chemischen Antidepressiva (Philipp et al., 1999). Der genaue Mechanismus der antidepressiven Wirkung und welche Komponenten für die Wirksamkeit verantwortlich sind, muss noch geklärt werden. Als sicher gilt aber, dass durch die Einnahme von Johanniskraut-Präparaten die Wiederaufnahme verschiedener Neurotransmitter gehemmt wird und es so bei den behandelten Patienten nach einer Verzögerungszeit zu einer Stimmungsaufhellung kommt (Philipp et al., 1999).

Die Typ III-PKS, die in Zellkulturen von *S. aucuparia* und *H. androsaemum* detektiert und deren cDNAs kloniert wurden, sind die Biphenyl-Synthase (BIS) und die Benzophenon-Synthase (BPS). Beide Enzyme katalysieren die sich wiederholende Addition von Acetyleinheiten, die aus dem Malonyl-CoA hervorgehen, an das Benzoyl-CoA als Startersubstrat. Nach einer dreifachen Verlängerung entsteht bei beiden Enzymen ein identisches, lineares Tetraketid (Abb. 1.6). Dieses Intermediat wird in Anwesenheit der BPS durch eine Claisen-Kondensation in das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon überführt (Liu et al., 2003). Dies ist der gleiche Cyclisierungsmechanismus, der für die CHS beschrieben wird (Ferrer et al., 1999). Das Benzophenon dient anderen Enzymen als Vorstufe für die Bildung von polyprenylierten Derivaten und Xanthonen, denen mannigfaltige pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben werden. Garcinol ist ein potenter Inhibitor von Histon-Acetyltransferasen (Balasubramanyam et al., 2004). γ -Mangostin, ein zweifach prenyliertes Xanthon von *Garcinia mangostana*, besitzt eine inhibitorische Wirkung auf die Cyclooxygenasen I und II, so dass die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin E₂ verringert wird (Nakatani et al., 2002). Polyhydroxyxanthone hemmen unter *in vitro* Bedingungen das Wachstum von multiresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen (Ignatushchenko et al., 1997). In Anwesenheit der BIS I wird aus dem linearen Tetraketid über eine Aldol-Kondensation mit anschließender Decarboxylierung das 3,5-Dihydroxybiphenyl als Produkt gebildet (Abb. 1.6). Einen ähnlichen Cyclisierungsmechanismus katalysiert die Stilben-Synthase (STS), die aus Zellkulturen von *Pinus sylvestris* kloniert und kristallisiert werden konnte (Austin et al., 2004). Das Biphenyl

stellt die Vorstufe für das Phytoalexin Aucuparin dar, dessen Bildung in Kulturen von *Sorbus aucuparia* durch Zugabe von Hefeextrakt induziert werden konnte (Liu et al., 2003). Zum ersten Mal konnte das Biphenyl Anfang der 60er Jahre isoliert werden (Erdtmann et al., 1963). Danach wurde die Substanz in mehreren Rosaceen-Arten identifiziert, nachdem die Pflanzen mit verschiedenen Pilzarten infiziert wurden (Kokubun et al., 1995). Neben der antimykotischen Wirkung konnte dem Aucuparin unter *in vitro* Bedingungen auch eine antibakterielle Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden (Cortez et al., 2002).

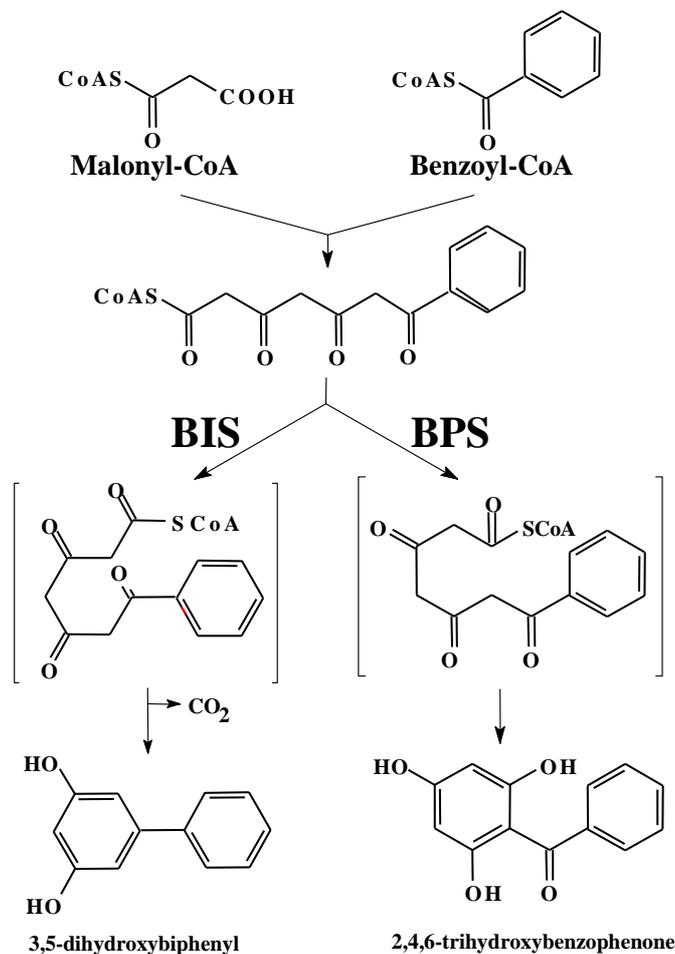


Abb. 1.6 Vergleich der Reaktionsmechanismen von BIS und BPS

Zielsetzung der Arbeit

Die BIS aus *S. aucuparia* und die BPS aus *H. androsaemum* sollten in großem Umfang aufgereinigt und zur Strukturaufklärung kristallisiert werden. Dies sollte Einblick in die beiden unterschiedlichen Cyclisierungsmechanismen geben, die von den Enzymen katalysiert werden. Besonderes Interesse lag dabei auf der Strukturaufklärung der BIS, um den nicht nur von der BPS, sondern auch von der STS abweichenden Mechanismus aufzuklären. Darüber hinaus sollte zur Charakterisierung der BIS mit biochemischen und analytischen Methoden beigetragen werden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

2.1.1 Chemikalien

Biochemische Reagenzien und Reagenzien zur Kristallisation

Substanz	Bezugsquelle
Malonyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
Benzoyl-CoA	Sigma Aldrich
IPTG	Sigma Aldrich
[2- ¹⁴ C] Malonyl-CoA	Amersham Biosciences
Kanamycinsulfat	Fluka
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Chloramphenicol	Fluka
HEPES Natriumsalz	Sigma Aldrich
Tris ultra pure	Biosolve
SDS ultra pure	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
Natriumcarbonat, wasserfrei	Roth
Imidazol	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Polyethylenglykol 400	Fluka
Polyethylenglykol 4000	Fluka
Polyethylenglykol 8000	Fluka
NaCl	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol, absolut	Riedel-de-Haen
Methanol	Fisher-Scientific
o-Phosphorsäure	Roth
Ethylacetat	Acros Organics
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Silbernitrat	Roth
Natriumthiosulfat	Fluka
Formaldehyd	Merck
Citronensäure-Monohydrat	Roth
Naringenin	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Life Technologies
Pepton aus Casein	Roth
Hefeextrakt	Roth
Agar-Agar	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (37:5.1)	Life Technologies

β-Mercaptoethanol	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Ethanol (vergällt)	Sonnenberg
Chloroform	Fisher Scientific
Ammoniumsulfat	Roth
Isopropanol	Acros Organics
X-Gal	Sigma Aldrich
EDTA Dinatrium Dihydrat	Roth
Natriumhydroxid	Fluka
Salzsäure 37%	Riedel-de-Haen
D-Glucose	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat	Roth

Alle Reagenzien und Chemikalien wurden in p.a. oder HPLC-Qualität eingesetzt.

2.1.2 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie

Medien zur Kultivierung von E.coli

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hinweise zur Herstellung und Lagerung
LB-Medium	Bacto-pepton 10,0 g Hefeextrakt 5,0 g NaCl 10,0 g H ₂ O bidest ad 1000,0 ml	pH auf 7,0 einstellen und autoklavieren

Den Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 15,0 g /l Agar-Agar zugesetzt.

SOC-Medium	Bacto-pepton 2,0 g Hefeextrakt 0,5 g 1 M NaCl 1,0 ml 1 M KCl 0,25 ml H ₂ O bidest 97,0 ml	autoklavieren und abkühlen lassen
dann zugeben	2 M Mg ²⁺ -Stammlösung 1,0 ml 2 M Glucose 1,0 ml H ₂ O bidest ad 100,0 ml	aliquotieren und bei -20,0 °C lagern
2 M Mg ²⁺ Stammlösung	MgCl ₂ x6H ₂ O 20,33 g MgSO ₄ x7H ₂ O 24,65 g H ₂ O bidest ad 100,0 ml	sterilfiltrieren

Puffer und Lösungen für die Plasmid-Isolierung

Puffer P1	Tris-HCl EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris- und EDTA- Lösungen sterilfiltrieren, mischen, pH 8,0 einstellen, RNase A kurz vor Gebrauch frisch zugeben
Puffer P2	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)	autoklavieren
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55 M	pH 4,8 einstellen und autoklavieren
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM	pH 7,6 einstellen

Lösungen für die Transformation und Selektion von E.coli

0,5 M IPTG	IPTG H ₂ O bidest	6,0 g ad 500,0 ml	sterilfiltrieren, bei -20,0 °C lagern
X-Gal	X-Gal N,N'- Dimethylformamid	100,0 mg 2,0 ml	unter UV-Verschluss bei -20,0 °C lagern

Antibiotika

Ampicillin	Ampicillin H ₂ O bidest	100,0 mg 1,0 ml	sterilfiltrieren, bei -20,0 °C lagern
Chloramphenicol	Chloramphenicol Ethanol 100%	30,0 mg 1,0 ml	bei -20,0 °C lagern
Kanamycin	Kanamycin H ₂ O bidest	30,0 mg 1,0 ml	sterilfiltrieren, bei -20,0 °C lagern

Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

50x TAE Puffer	Tris EDTA	2 M 0,05 M	mit Eisessig pH 8,0 einstellen
----------------	--------------	---------------	-----------------------------------

Enzyme

Restriktion	<i>EcoRI</i> <i>Nhe I</i>	Fermentas Fermentas
Enzyme zur His-tag Abspaltung	Thrombin Enterokinase Trypsin, modifiziert	Novagen Roche Inst. für Physikalische Biotechnologie, Halle
Weitere Enzyme	T4-Ligase RNase A	Fermentas Fermentas

2.1.3 Lösungen, Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation***Puffer zur Enzyminkubation***

Inkubationspuffer	0,1M KH ₂ PO ₄ H ₂ O bidest	1,36 g ad 50,0 ml	pH 7,0 einstellen, bei 4,0 °C lagern
-------------------	---	----------------------	---

Der Inkubationspuffer kann auch nach Umpuffern mit PD₁₀ Säulen als Aufbewahrungspuffer für die Enzyme genutzt werden.

Puffer zur Extraktion und Enzymreinigung mittels Ni-NTA Agarose

Lysispuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol H ₂ O bidest	50 mM 300 mM 30 mM 50,0 ml	mit frischer NaOH- Lösung: pH 8,0 einstellen
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol H ₂ O bidest	50 mM 1,5 M 70 mM 50,0 ml	mit frischer NaOH- Lösung: pH 8,0 einstellen
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol H ₂ O bidest	50 mM 300 mM 250 mM 50,0 ml	mit frischer NaOH- Lösung: pH 8,0 einstellen

Puffer zur Extraktion und Enzymreinigung mittels FPLC

Proteinpuffer	Tris	50 mM	mit HCl auf pH 7,5 einstellen und kühl lagern
	KCl	100 mM	
	H ₂ O bidest	ad 2000,0 ml	

Lösungen zur Bestimmung des Proteingehaltes

Bradford-Lösung	Coomassie Brilliant blue G-250	100,0 mg	Coomassie in Ethanol lösen, Phosphorsäure zugeben und mit H ₂ O auf 1,0 l auffüllen, nach Filtration bei 4,0 °C lagern
	Ethanol 96%	50,0 ml	
	o-Phosphorsäure	100,0 ml	
	H ₂ O bidest	ad 1000,0 ml	

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Sammelgel	H ₂ O bidest	3,0 ml	
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,3 ml	
	Acrylamid/BIS 30%	0,65 ml	
	10% (w/v) SDS	0,05 ml	
	10% (w/v) APS	0,1 ml	
	TEMED	5,0 µl	
Trenngel	H ₂ O bidest	3,3 ml	
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	
	Acrylamid/BIS 30%	4,0 ml	
	10% (w/v) SDS	0,05 ml	
	10% (w/v) APS	0,1 ml	
	TEMED	5,0 µl	
Probenpuffer	H ₂ O bidest	2,7 ml	bei 4,0 °C lagern
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0 ml	
	Glycerin	2,0 ml	
	10% (w/v) SDS	3,3 ml	
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml	
	0,5% (w/v) Bromphenolblau	0,5 ml	
10x Laufpuffer	Tris	15,0 g	bei RT lagern, vor Verbrauch 1:10 verdünnen
	Glycin	72,0 g	
	Na-SDS	5,0 g	
	H ₂ O bidest	ad 500,0 ml	

Lösungen zur Coomassie-Färbung von SDS-Page-Gelen

Färbelösung	Coomassie R 250 Stammlösung. 25,0 ml Methanol 100,0 ml Essigsäure 20,0 ml H ₂ O bidest ad 200,0 ml	
Coomassie-Stammlösung	Coomassie R 250 0,5 g H ₂ O bidest 50,0 ml	Farbstoff lösen, dann filtrieren
Entfärber	Methanol 30,0 ml Essigsäure 20,0 ml H ₂ O bidest ad 200,0 ml	

Lösungen zur Silbernitrat-Färbung von SDS-Page-Gelen

Silberfärbelösung I	Ethanol 60,0 ml Essigsäure 20,0 ml H ₂ O bidest 120,0 ml	Lagerung bei RT
Silberfärbelösung II	Ethanol 60,0 ml Natriumacetat 0,4 g Natriumthiosulfat 1,0 g H ₂ O bidest 140,0 ml	Lagerung bei RT
Silberlösung	Silbernitrat 0,2-0,4 g Formaldehyd 1 mM H ₂ O bidest 200,0 ml	frisch herstellen
Entwickler	Natriumdicarbonat 12,0 g Formaldehyd 6 mM H ₂ O bidest 200,0 ml	frisch herstellen
Stopplösung	Citronensäure 2,3 M H ₂ O bidest 200,0 ml	

Lösung zur Regeneration der PD₁₀ Säulen

NaOH-Stammlösung	NaOH 8,0 g H ₂ O bidest 200,0 ml	Lösung vor Gebrauch 8 : 50 mit H ₂ O bidest verdünnen
------------------	--	--

Puffer zur Gelfiltration

Proteinpuffer	Tris 50 mM KCl 100 mM H ₂ O bidest ad 2000,0 ml	mit HCl auf pH 7,5 einstellen und kühl lagern
---------------	--	---

2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide**Bakterienstämme**

<i>E.coli</i>	relevante Eigenschaften
K12 DH5 α	<i>F'</i> ϕ 80dlacZ Δ M15 <i>end A1 hsdR17 (rk⁻mk⁺) supE44 thi-1λ gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argFV 169) deoR</i>
BL 21	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS (rB⁻,mB⁻)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i>

Vektoren

Plasmid	Bezugsquelle
prSet B	Invitrogen
pET-28c	Novagen

2.1.5 Lösungen und Puffer zur Kristallisierung**Proteinpuffer**

Tris Puffer	Tris H ₂ O bidest	130,0 mg 50,0 ml	mit HCl pH 7,75 einstellen, sterilfiltrieren
Na-HEPES	Na-HEPES H ₂ O bidest	60,5 mg 50,0 ml	pH 7,75 einstellen, sterilfiltrieren

Screeningpuffer**Puffer zur Kristallisation der Firma Jena Bioscience**

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additiv um
15% PEG 400	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	100 mM CaCl ₂
15% PEG 400	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
15% PEG 400	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM MgCl ₂
15% PEG 400	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Na-Citrat
25% PEG 400	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	100 mM MgCl ₂
25% PEG 400	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
28% PEG 400	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM CaCl ₂
30% PEG 400	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	100 mM CaCl ₂
30% PEG 400	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	100 mM Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	100 mM MgCl ₂
30% PEG 400	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM MgCl ₂
30% PEG 400	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Na-Citrat
30% PEG 550	entfällt	100 mM Bicine	9	100 mM NaCl
25% PEG 550	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	10 mM ZnSO ₄
25% PEG 1000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt

30% PEG 1000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
25% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
20% PEG 1500	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
20% PEG 2000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM NiCl ₂
25% PEG 2000	entfällt	entfällt		entfällt
30% PEG 2000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	100 mM Na-Acetat
20% PEG 3000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Acetat
30% PEG 3000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
4% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt
8% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
10% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM MgCl ₂
12% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM Na-Acetat
12% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
16% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
16% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Na-Acetat
16% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM MgCl ₂
18% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
20% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
20% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM CaCl ₂
22% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Acetat
25% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
25% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM MgCl ₂
25% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM CaCl ₂
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	100 mM MgCl ₂
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM CaCl ₂
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Na-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		entfällt
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM MgCl ₂
8% PEG 4000	100 mM LiCl	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 4000	20% 2-Propanol	entfällt		entfällt
10% PEG 4000	10% 2-Propanol	100 mM Na-Citrat	5,6	entfällt
10% PEG 4000	5% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 4000	20% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
12% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
15% PEG 4000	entfällt	entfällt		200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
15% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
16% PEG 4000	10% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
20% PEG 4000	entfällt	entfällt		200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
20% PEG 4000	10% Glycerin	entfällt		200 mM MgSO ₄
20% PEG 4000	5% 2-Propanol	entfällt		100 mM Na-Citrat
20% PEG 4000	20% 2-Propanol	entfällt		100 mM Na-Citrat
20% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-HEPES	6,5	600 mM NaCl

20% PEG 4000	10% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
22% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 4000	200 mM Li ₂ SO ₄	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM Na-Acetat
25% PEG 4000	8% 2-Propanol	entfällt		100 mM Na-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	800 mM LiCl
25% PEG 5000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
30% PEG 5000	entfällt	100 mM Na-HEPES	6,5	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
3% PEG 6000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM KCl
10% PEG 6000	entfällt	entfällt		10 mM MgCl ₂
12% PEG 6000	2,0 M NaCl	entfällt		entfällt
15% PEG 6000	5% Glycerin	entfällt		entfällt
15% PEG 6000	50 mM KCl	entfällt		10 mM MgCl ₂
16% PEG 6000	entfällt	entfällt		10 mM Na-Citrat
20% PEG 6000	entfällt	50 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
25% PEG 6000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM LiCl
28% PEG 6000	0,5 M LiCl	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
30% PEG 6000	1,0 M LiCl	entfällt		100 mM Na-Acetat
33% PEG 6000	entfällt	entfällt		10 mM Na-Citrat
2% PEG 8000	0,5 M Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
2% PEG 8000	1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
4% PEG 8000	entfällt	entfällt		entfällt
8% PEG 800	200 mM LiCl	entfällt		50 mM MgSO ₄
8% PEG 8000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Zn-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Ca-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	50 mM Mg-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		200 mM Mg-Acetat
10% PEG 8000	entfällt	entfällt		200 mM Mg-Acetat
10% PEG 8000	10% Ethylenglykol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 8000	10% PEG 1000	entfällt		entfällt
12% PEG 8000	5% Glycerin	entfällt		100 mM KCl
12% PEG 8000	10% Glycerin	entfällt		500 mM KCl
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
15% PEG 8000	500 mM Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
15% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Na-Acetat
15% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-Citrat		50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
18% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Ca-Acetat
18% PEG 8000	2% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM Na-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Li ₂ SO ₄
20% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Mg-Acetat
20% PEG 8000	entfällt	100 mM CHES	9,5	entfällt

22% PEG 8000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 8000	entfällt	entfällt		200 mM LiCl
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
8% PEG 10000	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
14% PEG 10000	entfällt	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
16% PEG 10000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
18% PEG 10000	20% Glycerol	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM NaCl
20% PEG 10000	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 10000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
10% PEG 20000	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
17% PEG 20000	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM MgCl ₂
20% PEG 20000	entfällt	entfällt		entfällt
0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 M Li ₂ SO ₄	100 mM Na-Citrat		entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2% PEG 400	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	3% 2-Propanol	50 mM Na-Citrat		entfällt
1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15% Glycerin	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 M LiCl	entfällt		entfällt
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM NaCl
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2% 2-Propanol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 M NaCl	entfällt		entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5% PEG 400	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
2,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	20% Glycerin	entfällt		entfällt
2,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-Citrat		entfällt
3,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1% MPD	entfällt		entfällt
3,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	10% Glycerin	entfällt		entfällt
3,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1% MPD	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
3,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
10% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM Na-Citrat
12% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM MgCl ₂
15% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	20 mM CaCl ₂
15% 2-Methyl-2,4-pentandiol	5% PEG 4000	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
15% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄

15% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	100 mM Mg-Acetat
15% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Citrat
20% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM Na-Citrat
20% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
20% 2-Methyl-2,4-pentandiol	4% Glycerin	entfällt		200 mM NaCl
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	20 mM CaCl ₂
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	6,5	200 mM Mg-Acetat
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	500 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Citrat
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	5% PEG 4000	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	10% PEG 4000	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	20% Ethanol	entfällt		entfällt
35% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	entfällt		entfällt
35% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
40% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
47% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
47% 2-Methyl-2,4-pentandiol	2% tert.-Butanol	entfällt		entfällt
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	entfällt		entfällt
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	15% Ethanol	10 mM Na-Acetat		entfällt
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	20% 2-Propanol	50 mM Na-Acetat		50 mM NaCl
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM (NH ₄) ₂ PO ₄
55% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	entfällt		entfällt
60% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	10 mM CaCl ₂

60% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	20 mM Na-Acetat		entfällt
70% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
70% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% Methanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM CaCl ₂
2% Ethanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
5% Ethanol	5% 2-Methyl-2,4-pentandiol	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
5% Ethanol	5% 2-Methyl-2,4-pentandiol	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM NaCl
10% Ethanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
12% Ethanol	4% PEG 400	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
14% Ethanol	5% Glycerin	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
18% Ethanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
20% Ethanol	entfällt	entfällt		entfällt
20% Ethanol	10% Glycerin	entfällt		entfällt
30% Ethanol	10% PEG 6000	100 mM Na-Acetat		entfällt
45% Ethanol	entfällt	entfällt		entfällt
50% Ethanol	entfällt	100 mM Na-Acetat		entfällt
60% Ethanol	1,5% PEG 6000	50 mM Na-Acetat		entfällt
60% Ethanol	entfällt	entfällt		100 mM NaCl
2% 2-Propanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM MgSO ₄
5% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
10% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM CaCl ₂
10% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Citrat
10% 2-Propanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM MgCl ₂
12% 2-Propanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	50 mM NaCl
15% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Citrat
15% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Na-Citrat
15% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM MgCl ₂
15% 2-Propanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM NH ₄ -Acetat
20% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	200 mM CaCl ₂
20% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM Na-Citrat
25% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	100 mM MgCl ₂
30% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Na-Citrat
30% 2-Propanol	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	200 mM MgCl ₂
30% 2-Propanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM NH ₄ -Acetat
25% tert. Butanol	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	100 mM CaCl ₂
35% tert. Butanol	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	entfällt
200 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
400 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
200 mM K/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
200 mM Mg-Acetat	entfällt	entfällt		entfällt
400 mM K/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
400 mM K/Na-Tartrat	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt

500 mM (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	200 mM Na-Citrat		entfällt
0,5 M Na-Acetat	entfällt	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
0,7 M Na-Citrat	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
0,7 M Li ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
0,8 M K/Na-Tartrat	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	100 mM Na-Citrat	5,6	entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM NiCl ₂
1,0 M Na-Acetat	entfällt	100 mM Imidazol-HCl	8,0	entfällt
1,0 M Na-Formiat	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4 M Na-Acetat	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
1,4 M Na-Citrat	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
1,5 M Li ₂ SO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
1,5 M Na-Citrat	entfällt	entfällt	6,5	entfällt
1,6 M MgSO ₄	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
1,6 M K/Na-Tartrat	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
2,0 M NH ₄ -Formiat	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2,0 M NH ₄ -Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2,0 M MgCl ₂	entfällt	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
2,0 M NaCl	entfällt	100 mM Na-MES	6,5	200 mM Na-Acetat
2,0 M Na-Formiat	entfällt	100 mM Na-Acetat	4,6	entfällt
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	30% Glycerin	100 mM Tris-HCl	8,5	entfällt
4,0 M NaCl	entfällt	100 mM Na-HEPES	7,5	entfällt
3,0 M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt

Puffer zur Kristallisation der Firma Sigma Aldrich

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M CaCl ₂
0,4 M K/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
0,4 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M MgCl ₂
1,4 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M MgCl ₂
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Na-Citrat
28% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M CaCl ₂
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,5 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt

30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
20% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Mg-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M MgCl ₂
20% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M CaCl ₂
1 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Imidazol	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
20% Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Na-Acetat
0,8 M K/Na-Tartrat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
4,0 M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2,0 M Na-Formiat	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
0,8 M NaH ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,8 M KH ₂ PO ₄
8% PEG 8000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4 M Na-Citrat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2% PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 4000	20% 2-Propanol	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
20% PEG 4000	10% 2-Propanol	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,05 M KH ₂ PO ₄
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
0,2 M Mg-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Ca-Acetat
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
2,0 M (NH ₄)H ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
2% PEG 8000	1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
15% PEG 8000	0,5 M Li ₂ SO ₄	entfällt		entfällt
10% PEG 6000	entfällt	entfällt		2,0 M NaCl
0,01 M CTAB	0,5 M NaCl	entfällt		0,01 M MgCl ₂
25% Ethylenglykol	entfällt	entfällt		entfällt
35% Dioxan	entfällt	entfällt		entfällt
5% 2-Propanol	entfällt	entfällt		2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,0 M Imidazol	entfällt	entfällt	7,0	entfällt
10% PEG 8000	10% PEG 1000	entfällt		entfällt
10% Ethanol	entfällt	entfällt		1,5 M NaCl
entfällt	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	2,0 M NaCl
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M NaCl

1,0 M 1,6-Hexandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,01 M CoCl ₂
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,1 M CdCl ₂
30% PEG 2000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
0,2 M K/Na-Tartrat	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
2% Polyethylenimin	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,5 M NaCl
35% tert. Butanol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
10% Jeffamine M-600	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,1 M FeCl ₃
2,5 M 1,6-Hexandiol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
entfällt	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	1,6 M MgSO ₄
12% PEG 20000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	entfällt
10% Dioxane	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% Jeffamine M-600	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,05 M CsCl ₂
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,01 M CoCl ₂
30% PEG 5000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 550	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,01 M ZnSO ₄
entfällt	entfällt	1,6 M Na-Citrat	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
5% 2-Methyl-2,4-pentandiol	10% PEG 10000	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% Jeffamine M-600	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M NaCl
2,0 M NH ₄ -Formiat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
1,0 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,05 M CdSO ₄
70% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
4,3 M NaCl	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
8% Ethylenglykol	10% PEG 8000	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 20000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
3,4 M 1,6-Hexandiol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M MgCl ₂
25% tert. Butanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,01 M NiCl ₂
20% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
50% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M NH ₄ -Phosphat
20% Ethanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
20% PEG 2000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,01 M NiCl ₂
20% PEG 550	entfällt	0,1 M Bicine	9,0	0,1 M NaCl
entfällt	entfällt	0,1 M Bicine	7,5	2,0 M MgCl ₂
10% PEG 20000	2% Dioxan	0,1 M Bicine	9,0	entfällt
15% PEG 20000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,1 M MgCl ₂
20% PEG 20000	entfällt	entfällt		entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄

30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,3	0,02 M CaCl ₂
35% Glycerin	entfällt	entfällt		0,26 M Na/K-Tartrat
35% Glycerin	entfällt	entfällt		0,1 M NH ₄ -Phosphat
25% Glycerin	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
20% Glycerin	24% PEG 4000	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,16 M MgCl ₂
30% Glycerin	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,98 M Na-Acetat
30% Glycerin	21% 2-Propanol	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,14 M Na-Citrat
15% Glycerin	25,5% PEG 4000	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,17 M Na-Acetat
15% Glycerin	25,5% PEG 4000	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,17 M Na-Acetat
10% Glycerin	entfällt	0,07 M Na-Citrat	5,6	0,7 M (NH ₄)H ₂ PO ₄
10% Glycerin	27% 2-Propanol	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,18 M MgCl ₂
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Na-Citrat
5% Glycerin	26,6% PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,19 M CaCl ₂
15% Glycerin	25,5% PEG 8000	0,085 M Na-Cacodylat	6,5	0,17 M (NH ₄) ₂ SO ₄
25% Glycerin	entfällt	0,075 M Na-HEPES	7,5	1,125 M Li ₂ SO ₄
15% Glycerin	25,5% PEG 4000	0,085 M Tris-HCl	8,5	0,17 M Li ₂ SO ₄
20% Glycerin	16% PEG 8000	0,08 M Na-Cacodylat	6,5	0,16 M Mg-Acetat
20% Glycerin	24% 2-Propanol	0,08 M Tris-HCl	8,5	0,16 M NH ₄ -Acetat
20% Glycerin	20% PEG 4000	0,08 M Na-Acetat		0,16 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Mg-Acetat
15% Glycerin	25,5% PEG 4000	0,085 M Tris-HCl	8,5	0,17 M Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M MgCl ₂
30% Glycerin	14% 2-Propanol	0,07 M Na-Acetat	4,6	0,14 M CaCl ₂
30% Glycerin	entfällt	0,07 M Imidazol	6,5	0,7 M Na-Acetat
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% Glycerin	14% 2-Propanol	0,07 M Na-HEPES	7,5	0,14 M Na-Citrat
15% Glycerin	25,5% PEG 8000	0,085 M Na-Cacodylat	6,5	0,7 M Na-Acetat
35% Glycerin	entfällt	0,065 M Na-HEPES	7,5	0,52 M K/Na-Tartrat
15% Glycerin	25,5% PEG 4000	entfällt		0,17 M (NH ₄) ₂ SO ₄
15% Glycerin	25,5% PEG 8000	entfällt		0,17 M (NH ₄) ₂ SO ₄
25% Glycerin	entfällt	entfällt		1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
10% Glycerin	entfällt	entfällt		3,6 M Na-Formiat
30% Glycerin	entfällt	0,07 M Na-Acetat	4,6	1,4 M Na-Formiat
25% Glycerin	entfällt	0,075 M Na-HEPES	7,5	0,6 M (Na/K)H ₂ PO ₄
35% Glycerin	5,2% PEG 8000	0,065 M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% Glycerin	5,6% PEG 4000	0,07 M Na-Acetat	4,6	entfällt
10% Glycerin	entfällt	0,09 M Na-HEPES	7,5	1,26 M Na-Citrat
15% Glycerin	1,7% PEG 400	0,085 M Na-HEPES	7,5	1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄
5% Glycerin	19% PEG 4000	0,095 M Na-Citrat	5,6	19% 2-Propanol

15% Glycerin	17% PEG 4000	0,085 M Na-HEPES	7,5	8,5% 2-Propanol
20% Glycerin	16% PEG 8000	entfällt		0,04 M KH_2PO_4
20% Glycerin	24% PEG 1500	entfällt		entfällt
50% Glycerin	entfällt	entfällt		0,1 M Mg-Formiat
20% Glycerin	14,4% PEG 8000	0,08 M Na-Cacodylat	6,5	0,16 M Zn-Acetat
20% Glycerin	14,4% PEG 8000	0,08 M Na-Cacodylat	6,5	0,16 M Ca-Acetat
20% Glycerin	entfällt	0,08 M Na-Acetat	4,6	1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20% Glycerin	entfällt	0,08 M Tris-HCl	8,5	1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$
20% Glycerin	1,6% PEG 8000	entfällt		0,8 M Li_2SO_4
20% Glycerin	12% PEG 8000	entfällt		0,4 M Li_2SO_4

**Puffer zur Kristallisation aus dem Institut für Physikalische Biotechnologie,
Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg**

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additivum
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M CaCl_2
entfällt	entfällt	0,1 M Na-MES	6,4	0,1 M K/Na-Tartrat
0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	entfällt	entfällt	6,4	entfällt
3,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,3	entfällt
19% MPD	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,19 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,5	0,2 M MgCl_2
entfällt	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,9	1,2 M Na-Citrat
2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	entfällt	0,2 M Na-Citrat	5,6	entfällt
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,9	0,2 M NH_4 -Acetat
1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	entfällt	0,1 M Na-Acetat	5,9	entfällt
2,0 M (K/Na)-Phosphat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	6,6	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20% PEG 400	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,9	0,2 M Na-Citrat
25% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,0	0,2 M CaCl_2
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,1	0,2 M MgCl_2
29% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,9	0,19 M Li_2SO_4
1 M Na-Acetat	0,2 M Li_2SO_4	entfällt	8,2	entfällt
20% MPD	entfällt	0,07 M Tris-HCl	6,5	0,13 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$
2,0 M (K/Na)-Phosphat	entfällt	0,1 M Tris-HCl	6,6	0,2 M NH_4 -Acetat
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Citrat	6,1	0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-MES	6,2	entfällt
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,1	0,2 M MgCl_2
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,4	0,2 M Na-Acetat
1,0 M K/Na-Tartrat	entfällt	0,1 M Tris-HCl	9,1	entfällt
entfällt	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,4	0,2 M CaCl_2
20% MPD	entfällt	0,07 M Na-Citrat	6,4	0,33 M NH_4 -Acetat
entfällt	entfällt	0,1 M Na-MES	6,9	2 M Na-Acetat
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,2 M K/Na-Tartrat
entfällt	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,7	1,0 M K/Na-Tartrat
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,8	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,3	0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
entfällt	entfällt	0,1 M Na-MES	6,8	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% Ethanol	entfällt	0,1 M Na-MES	6,2	0,2 M NaCl
30% Ethanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,0	0,2 M MgCl ₂
30% Ethanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,2	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% Ethanol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,5	0,2 M CaCl ₂
30% Ethanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,4	0,2 M Na-Acetat
29% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	6,9	0,2 M MgCl ₂
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,3	entfällt
2,0 M Na-Formiat	entfällt	0,1 M Na-Acetat	5,3	entfällt
30% Isopropanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
20% PEG 4000	10% 2-Propanol	0,1 M Na-HEPES	7,4	entfällt
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 4000	0,2 M Li ₂ SO ₄	0,1 M Tris-HCl	8,6	entfällt
30% PEG 6000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,2	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,5 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Na-Acetat	6,1	entfällt
1,0 M (NH ₄)H ₂ PO ₄	entfällt	entfällt	4,9	entfällt
4,0 M Na-Formiat	entfällt	entfällt	8,4	entfällt
1,2 M Na-Citrat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,9	entfällt
entfällt	entfällt	entfällt	8,2	0,4 M K/Na-Tartrat
entfällt	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,2	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% MPD	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,3	0,2 M MgCl ₂
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-MES	6,3	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Citrat	6,4	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	5,7	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,0	0,2 M Na-Citrat
28% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,2	0,2 M CaCl ₂
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,3	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% MPD	entfällt	0,2 M Imidazol-HCl	7,0	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	6,3	0,2 M (NH ₄)H ₂ PO ₄
25% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,7	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-MES	6,1	entfällt
30% Isopropanol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,5	0,2 M CaCl ₂
entfällt	entfällt	0,1 M Imidazol-HCl	7,6	0,5 M Na-Acetat
30% MPD	entfällt	0,1 M Imidazol-HCl	7,2	0,2 M NH ₄ -Acetat
18% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	6,6	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	5,9	0,2 M Na-Acetat
entfällt	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,6	0,8 M K/Na-Tartrat
30% PEG 400	entfällt	entfällt	5,7	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	entfällt	6,0	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
entfällt	entfällt	entfällt	5,8	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,6 M K/Na-Phosphat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	9,0	entfällt
4% PEG 400	entfällt	0,1 M Tris-HCl	4,8	entfällt
2% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,5	entfällt
1% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,6	1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
20% PEG 4000	20% 2-Propanol	0,1 M Na-Citrat	8,8	entfällt

25% PEG 8000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	6,4	0,2 M (NH ₄) ₂ PO ₄
entfällt	entfällt	0,1 M Na-MES	6,8	1,4 M Na-Acetat
20% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,4	0,2 M Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,3	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-MES	6,4	0,2 M Mg-Acetat
22% MPD	entfällt	0,09 M Na-Citrat	6,3	0,19 M NH ₄ -Acetat
30% PEG 8000	entfällt	entfällt	6,0	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
8% PEG 8000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
8% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,7	entfällt
20% PEG 8000	entfällt	entfällt	9,4	0,05 M K ₂ HPO ₄
30% PEG 1000	entfällt	entfällt	7,2	entfällt
entfällt	entfällt	entfällt	7,3	0,2 M Mg-Formiat
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,3	0,2 M Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,2 M Ca-Acetat
entfällt	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,5	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
2% PEG 8000	1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	6,7	entfällt
9% PEG 8000	0,86 M Li ₂ SO ₄	entfällt	6,7	entfällt
entfällt	1,5 M Li ₂ SO ₄	0,1 M Na-HEPES	7,7	entfällt
40% MPD	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Na-Citrat
entfällt	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,8	1,35 M Na-Citrat
2% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,6	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄

Puffer zur Kristallisation der Firma Hampton

Präzipitant I	Präzipitant II	Puffer	pH	Additivum
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,02 M CaCl ₂
0,4 M K/Na-Tartrat	entfällt	entfällt		entfällt
1,4 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M MgCl ₂
1,4 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
1,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M MgCl ₂
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Na-Citrat
28% PEG400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M CaCl ₂
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,5 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
20% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Mg-Acetat
30% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M NH ₄ -Acetat
25% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄

30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Mg-Acetat
30% PEG 4000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M Na-Acetat
30% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M MgCl ₂
20% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M CaCl ₂
1,0 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Imidazol	6,5	entfällt
30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M NH ₄ -Acetat
20% 2-Propanol	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Na-Citrat
30% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Na-Acetat
0,8 M K/Na-Tartrat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
30% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% PEG 4000	entfällt	entfällt		0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	entfällt		entfällt
4,0 M Na-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
2,0 M Na-Formiat	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
0,8 M NaH ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
8% PEG 8000	0,8 M KH ₂ PO ₄	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
6% PEG 4000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
1,4 M Na-Citrat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
2% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% 2-Propanol	2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
10% 2-Propanol	20% PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 8000	20% PEG 4000	entfällt		0,05 M KH ₂ PO ₄
30% PEG 1500	entfällt	entfällt		entfällt
0,2 M Mg-Formiat	entfällt	entfällt		entfällt
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Zn-Acetat
18% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-Cacodylat	6,5	0,2 M Ca-Acetat
2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
2,0 M (NH ₄) ₂ PO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
2% PEG 8000	entfällt	entfällt		1,0 M Li ₂ SO ₄
15% PEG 8000	entfällt	entfällt		0,5 M Li ₂ SO ₄
10% PEG 6000	entfällt	entfällt		2,0 M NaCl
entfällt	entfällt	entfällt		0,01 M MgCl ₂
25% Ethylenglykol	entfällt	entfällt		entfällt
35% Dioxan	entfällt	entfällt		entfällt
5% 2-Popanol	entfällt	entfällt		2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1 M Imidazol	entfällt	entfällt	7,0	entfällt
10% PEG 1000	10% PEG 8000	entfällt		entfällt
10% Ethanol	entfällt	entfällt		1,5 M NaCl
2 M NaCl	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	entfällt
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M NaCl
1,0 M 1,6 Hexandiol	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,01 M CoCl ₂
1% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,1 M CdCl ₂
1% PEG 2000	entfällt	0,1 M Na-Acetat	4,6	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,2 M Na/K-Tartrat
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄

1% Ethylenimin	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,5 M NaCl
1% tert. Butanol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
1% Jeffamine	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	0,01 M FeCl ₃
1,0 M 1,6 Hexandiol	entfällt	0,1 M Na-Citrat	5,6	entfällt
1,0 M MgSO ₄	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	entfällt
1,0 M NaCl	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,1 M NaH ₂ PO ₄
entfällt	entfällt	entfällt		0,1 M KH ₂ PO ₄
12% PEG 20000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	entfällt
10% Dioxan	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄
30% Jeffamine	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,05 M CsCl ₂
1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,01 M CoCl ₂
30% PEG 5000	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
25% PEG 550	entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	0,01 M ZnSO ₄
1,6 M Na-Citrat	entfällt	entfällt	6,5	entfällt
30% MPD	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
10% PEG 6000	5% MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% Jeffamine	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M NaCl
2,0 M NH ₄ -Formiat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
1,0 M Na-Acetat	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,05 M CdSO ₄
70% MPD	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
4,3 M NaCl	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
10% PEG 8000	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
20% PEG 10000	8% Ethylenglykol	0,1 M Na-HEPES	7,5	entfällt
3,4 M 1,6 Hexandiol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M MgCl ₂
25% tert. Butanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
1,0 M Li ₂ SO ₄	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,01 M NiCl ₂
12% Glycerin	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄
50% MPD	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,2 M (NH ₄)H ₂ PO ₄
20% Ethanol	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	entfällt
20% PEG 2000	entfällt	0,1 M Tris-HCl	8,5	0,01 M NiCl ₂
20% PEG 550	entfällt	0,1 M Bicine	9,0	0,1 M NaCl
2,0 M MgCl ₂	entfällt	0,1 M Bicine	9,0	entfällt
2% Dioxan	10% PEG 20000	0,1 M Bicine	9,0	entfällt

Kryopuffer

Zur Verwendung als Kryopuffer wurden den entsprechenden Kristallisationspuffern 15% Glycerol (steril) zugesetzt.

2.1.6 Geräte

Elektrophorese	Standard Power Pack P25	Biometra
Geldokumentation	MultiImage Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech
pH Meter	pH 325	WTW
Schüttler	HAT	Infors
Steriltechnik	Vapoklav	Sterico
Temperierung	Dry Block DB 3D	Techne
	Wasserbad	Köttermann
Waagen	Analysenwaage	Sartorius
	Feinwaage	Sartorius
Zentrifugen	Universal 32 R	Hettich
	Biofuge 13	Heraeus
	Sorvall RC 5B	Du Pont
Vakuumkonzentrator	Genevac SF 50	Biometra
Zentrifugenkonzentratoren	Vivaspin 6-10	Vivascience
Reinluft	LiminAir HLB 2472	
Reinstwasser	Milli-Q Reagent Water	Millipore

3 Methoden

3.1 Methoden der Molekularbiologie

3.1.1 Anzucht und Kultivierung von *E.coli*

Im Allgemeinen erfolgte die Anzucht der verschiedenen *E.coli*-Stämme in LB-Medium (2.1.2). Für die Transformation wurde *E.coli* in SOC-Medium (2.1.2) angezogen und anschließend auf festem LB-Medium (2.1.2) in Petrischalen ausgestrichen. Zum Erhalt von Einzelkolonien wurden diese Platten über Nacht bei 37,0 °C im Brutschrank aufbewahrt. Für die Plasmidextraktion wurden 5,0 ml LB-Medium mit den Plattenkulturen angeimpft und über Nacht bei 37,0 °C kultiviert. Für die Ansätze zur Proteinexpression wurde *E.coli* in 50,0 - 400,0 ml LB-Medium bei 37,0 °C in einem Rundschtüttler angezogen. Zur besseren Durchlüftung erfolgte dies in Schikanekolben. Für die anschließende Expression wurde die Temperatur auf 25,0 °C gesenkt. Alle Medien wurden zur Selektion mit den entsprechenden Antibiotika (2.1.2) versetzt.

3.1.2 Aufbewahrung von *E.coli*-Kulturen

Die in 3.1.1 gewonnenen Plattenkulturen konnten für einen Zeitraum von max. sechs Wochen bei 4,0 °C im Kühlschrank gelagert werden. Für Dauerkulturen wurde von Übernachtskulturen nach 8,0 h bei 37 °C 0,8 ml abgenommen und dieses Volumen mit 0,2 ml autoklaviertem Glycerin (87%) vermischt. Diese Kulturen waren bei -80,0 °C lagerungsfähig.

3.1.3 Messung der Zahl der Mikroorganismen

Mittels Trübungsmessung wurde das Bakterienwachstum photometrisch überwacht. Dazu wurden jeweils 0,75 ml Bakteriensuspension bei $\lambda = 600$ nm gegen nicht beimpftes LB-Medium vermessen. Dabei entsprach die Absorption bei $OD_{600} = 1$ einer Zellenzahl von ca. 8×10^8 (Bertram und Gassen, 1991).

3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmiden aus *E.coli*-Kulturen wurden die Bakterienzellen der Übernachtskultur der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) unterworfen. Bei diesem Prozess wurden die Zellen durch SDS alkalisch lysiert, RNA durch RNase abgebaut, Proteine bzw. chromosomale DNA durch Natriumacetat-Zusatz gefällt und die gewaschene Plasmid-DNA durch Zusatz von Isopropanol präzipitiert.

Bei der Minipräparation wurden die Zellen aus 1,5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 5000 U/min geerntet. Das Zellpellet wurde in 300,0 µl Puffer P1 (2.1.2) resuspendiert, mit 300,0 µl Puffer P2 (2.1.2) versetzt und nach Klärung vorsichtig mit 300,0 µl Puffer P3 (2.1.2) vermischt. Nach einer Inkubationszeit auf Eis wurde 15,0 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand mit dem gleichen Volumenanteil an Chloroform versetzt, ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Zum Abschluss wurde aus der oberen wässrigen Phase die Plasmid-DNA durch Ethanol-fällung (3.1.5) präzipitiert.

3.1.5 Ethanol-fällung von Plasmid-DNA

Bei der Ethanol-fällung wurde die Lösung, die die DNA enthielt, mit 0,1 VT 3,0 M Na-Acetat pH 4,5 und 2,0 VT Ethanol abs. versetzt, kurz geschüttelt, 15,0 min auf Eis inkubiert und anschließend 15,0 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der entstandene Niederschlag wurde mit 500,0 µl Ethanol 70 % gewaschen. Nach der erneuten Zentrifugation wurden die Plasmide getrocknet und konnten bei -20,0 °C gelagert werden.

3.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nach Sambrook et al. (1989) wurde die Konzentration von Nukleinsäuren (C_{NA}) bestimmt. Hierbei kam allerdings nur die Mengenbestimmung von Doppelstrang-DNA zum Tragen. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt.

$$C_{NA} = A_{260} \times \text{Abs.} \times \text{Verdünnung}$$

Bei A_{260} handelte es sich um den Absorptionskoeffizienten, der für Doppelstrang-DNA bei $1,0 A_{260} \sim 50,0 \mu\text{g/ml}$ lag.

3.1.7 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen

Typ-II-Restriktionsendonukleasen hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen der DNA innerhalb einer festgelegten palindromischen Erkennungssequenz. Die zu schneidende DNA, der nach Hersteller vorgeschriebene Puffer und die entsprechende Endonuklease wurden vermischt und bei dem angegebenen Temperaturoptimum für mehrere Stunden inkubiert. Wurde die DNA in einem Ansatz mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, wurde der Puffer so gewählt, dass beide Enzyme ausreichende Aktivität besaßen. Ein Reaktionsansatz bestand aus ungefähr 500,0 ng DNA, 1,0 µl 10xRestriktionspuffer, Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers und Wasser bidest ad 10,0 µl.

3.1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das System Nucleo Extract II der Firma Machery & Nagel verwendet. Dafür wurde das gewünschte DNA-haltige Gelstück herausgeschnitten und die DNA in dem nach Hersteller vorgeschriebenen Puffer gelöst. Anschließend wurde die DNA nach Herstellervorschrift an Silicagel gebunden, gewaschen und eluiert.

3.1.9 Ligation

Unter einer Ligation versteht man die Kondensation von dsDNA unter der Bildung von intermolekularen Phosphodiesterbindungen. Die eingesetzten Enzyme katalysierten die Verknüpfung eines freien 5'-Phosphatrestes eines DNA-Stranges mit einer 3'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Stranges.

Für die Ligation wurden die Enden der zu verknüpfenden DNA-Fragmente mit Endonukleasen verdaut, so dass klebrige Enden entstanden. Für den Ligationsansatz wurde das Insert im Überschuss (ca. 200,0 ng) mit dem Plasmid (50,0 ng) versetzt. Nach Zugabe von 1,0 µl 10xLigationspuffer, T4-DNA-Ligase und Wasser bidest ad 10,0 µl wurde über Nacht bei 16,0 °C inkubiert.

3.1.10 Transformation in *E.coli*

Für jede Transformation wurden 50,0 µl CaCl₂-kompetente *E.coli*-Zellen mit 1,5 - 2,5 µl Plasmidlösung vermischt und 20,0 min auf Eis inkubiert. Nachdem der Transformationsansatz 50,0 sec bei 42,0 °C einem Hitzeschock ausgesetzt war, wurde der gesamte Ansatz sofort wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu den Zellen 950,0 µl SOC-Medium (2.1.2) zugegeben und 1,0 h bei 37,0 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation über 4,0 min bei 4000 U/min geerntet, der Überstand abgossen und die resuspendierten Zellen auf eine LB-Platte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die so beimpften Platten wurden über Nacht bei 37,0 °C im Brutschrank aufbewahrt und anschließend im Kühlschrank bei 4,0 °C gelagert.

3.1.11 Insertionskontrolle

Alle in der Arbeit eingesetzten Vektoren enthielten mindestens ein Antibiotikumresistenz-Gen. Durch Zugabe des Antibiotikums oder der Antibiotika zum Anzuchtmedium wurde eine Selektion auf transformierte und nicht transformierte *E.coli*-Zellen durchgeführt.

3.1.12 Proteinexpression

Das Vektor-DNA Konstrukt wurde in *E.coli* BL21 transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol für die BIS bzw. Kanamycin und Chloramphenicol für die BPS zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37,0 °C im Brutschrank gelagert. Ein Klon wurde dann über Nacht in 10,0 - 50,0 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium (2.1.2) aufgezogen. Von dieser Übernachtkultur wurden dann 3,0 - 10,0 ml zum Animpfen in 100,0-400,0 ml vorgewärmtes, mit den entsprechenden Antibiotika versetztes LB-Medium überführt und bei 37,0 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 inkubiert. Zur Induktion der gewünschten Proteine wurde der Bakteriensuspension 10 mM IPTG zugegeben und weiter 4,0 - 20,0 h bei 25,0 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6500 U/min geerntet.

3.1.13 Zellaufschluss

Das nach 3.1.12 erhaltene Zellpellet wurde in 800,0 µl Lysis-Puffer pro 50,0 ml Zellsuspension vollständig resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall am Sonifier aufgeschlossen. Die erhaltene Lösung wurde 10,0 min bei 13000 U/min und 4,0 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Zellbestandteile von den sich in Lösung befindlichen Proteinen zu trennen. Der so entstandene Überstand mit dem Proteinrohextrakt wurde der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie (3.2.1) unterzogen.

3.2 Methoden der Biochemie

3.2.1 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruhte auf speziellen Interaktionen zwischen dem zu reinigenden Protein und einer Matrix. Dadurch wurde das überexprimierte Protein leicht von dem bakteriellen Fremdprotein getrennt. Durch die hohe Spezifität und die sich anschließenden Waschschrte war es mit Hilfe der Affinitätschromatographie möglich, eine bis zu hundertfache Reinigung in einem Schritt zu erzielen. Zusätzlich hatte diese Art der Proteinaufreinigung einen Aufkonzentrierungseffekt, so dass aus verdünnten Proteinlösungen kleinvolumige Eluate mit hohem Proteinanteil gewonnen werden konnten.

3.2.1.1 *Proteinreinigung über Ni-NTA-Agarose*

Die immobilisierte Metall-Ionenmethode ist eine der effektivsten Affinitätschromatographien zur Reinigung von Proteinen. In dieser Arbeit aufgereinigte Proteine wurden alle über die Ni-NTA-Methode gewonnen. Hierbei ging der an Sepharose CL-6B gekoppelte Ligand Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) mit vier der insgesamt sechs koordinierten Bindungsstellen von Ni²⁺-Ionen stabile Interaktionen ein (Ni-NTA-Agarose). Die restlichen zwei Bindestellen der immobilisierten Ni²⁺-Ionen standen somit für eine spezifische Interaktion mit Histidinresten von Proteinen zur Verfügung. Diese 6x-Histidinreste oder auch Polyhistidinreste wurden durch die Expressionsvektoren (2.1.4) am C- oder N-Terminus an das aufzureinigende Protein angefügt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte entweder durch Protonierung der Histidinreste (Senkung des pH Wertes) oder durch die Verdrängung mit Imidazol (in dieser

Arbeit verwendete Variante). Die Reinigung der Enzyme erfolgte unter nativen Bedingungen nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen.

Der unter 3.1.13 gewonnene Proteinrohextrakt wurde mit 200,0 µl Ni-NTA Agarose (Fa. Qiagen) pro 50,0 ml Ausgangszellsuspension versetzt. Das gewünschte Protein wurde für mindestens 60,0 min bei 4,0 °C auf dem end-over-end Schüttler an die Matrix gekoppelt. Nach der Kopplung wurde die gesamte Lösung bei 4,0 °C in eine leere PD₁₀-Säule mit Fritte überführt, der Durchlauf aufgefangen und anschließend fünfmal mit 1,0 ml Waschpuffer (2.1.4) gewaschen. Auch die einzelnen Waschlösungen wurden aufgefangen. Nach dem Waschen wurde der Ni-NTA-Agarose/Proteinkomplex erneut mit 1,0 ml Lysispuffer gespült. Zur Elution wurde sechsmal mit 500,0 µl Elutionspuffer (2.1.4) gespült und die vereinigten Fraktionen wurden aufgefangen. Die Regeneration der Ni-NTA-Agarose erfolgte nach Vorschrift mit 0,2 M Essigsäure, 30 % Glycerin und Wasser bidest.

3.2.1.2 Proteinreinigung über FPLC

Nach dem gleichen Prinzip wie bei der Affinitätschromatographie mit freier Ni-NTA-Agarose wurde auch die Proteinaufreinigung mittels Fast-Protein-Liquid-Chromatography (FPLC) durchgeführt. Diese Methode wurde für kleine Expressionsansätze angewandt. Die Ni-Matrix lag in fertig gepackten HisTrap-Säulen der Firma Amersham Biosciences vor. Nach der Proteininduktion wurden die abzentrifugierten Bakterienzellen in FPLC-Bindungspuffer (2.1.3) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgebrochen. Die Zellbestandteile und unlösliche Proteinanteile wurden durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 10,0 min entfernt. Der klare Überstand wurde in die FPLC injiziert und die 6xHis-tag tragenden Proteine wurden aufgrund ihrer hohen in 3.2.1.1 beschriebenen Affinität zu der Matrix auf der Säule zurückgehalten. Nach dem Waschen der Säule, um noch evtl. anhaftendes Fremdprotein zu entfernen, wurde durch Erhöhung des Imidazolgehaltes im Elutionspuffer (2.1.3) das aufgereinigte Protein von der Trennsäule verdrängt. Anhand des Elutionsprofils wurde die proteinenthaltende Fraktion bestimmt und die Proteinmenge wurde nach Bradford (3.2.2) quantifiziert. Die Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen.

Volumen [ml]	Beschreibung	Bedingungen		Flussrate
0,0	UV-Lampe	anschalten	start	
0,0	isokratische Elution	Bindungspuffer	100%	0,5ml für 5,0ml
		Elutionspuffer	0%	
5,0	Probenaufgabe	Probe static loop	automatische Injektion über Ventil	0,5ml für 4,0ml
9,0	isokratische Elution	Bindungspuffer	100%	0,5ml für 5,0ml
		Elutionspuffer	0%	
14,0	binärer Gradient	Bindungspuffer	100% → 0%	0,5ml für 10,0ml
		Elutionspuffer	0% → 100%	
24,0	isokratische Elution	Bindungspuffer	0%	0,5ml für 5,0ml
		Elutionspuffer	100%	
29,0	isokratische Elution	Bindungspuffer	100%	0,5ml für 5,0ml
		Elutionspuffer	0%	
34,0	UV-Lampe	ausschalten	stop	

3.2.2 Bestimmung von Proteingehalten nach Bradford

Das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant Blue verschiebt sich im sauren Milieu in Gegenwart von Protein von 465 nm auf 595 nm. Diese Eigenschaft wurde zur Proteinquantifizierung genutzt (Bradford 1976). Für die Messung wurden 1,0 - 10,0 µl Proteinlösung mit Wasser bidest ad 100,0 µl und dann mit 900,0 µl Bradfordreagenz (2.1.3) versetzt. Nach 5,0 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Bradfordansatz ohne Protein (100,0 µl Wasser und 900,0 µl Bradfordreagenz) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand einer mit BSA im Konzentrationsbereich von 1,0 - 10,0 µg aufgenommenen Kalibriergeraden berechnet.

3.2.3 SDS-Page / Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach Laemmli (1970) können mit Hilfe dieser Methode Proteine nach ihrer Größe getrennt und anhand von Markern die Molekülmassen der einzelnen Polypeptide bestimmt werden. Bei dem Elektrophoreseigel handelt es sich um ein Molekularsieb, das aus Acrylamid-Polymeren besteht, die durch Bisacrylamid quervernetzt sind. Durch Erhitzen in Gegenwart von β-Mercaptoethanol und SDS werden die Proben denaturiert, in Untereinheiten gespalten und mit SDS beladen. Durch das SDS wird die Eigenladung des Proteins überdeckt und es entsteht eine negative Ladung auf der Oberfläche des Proteins, die in Abhängigkeit zur Masse steht. Dadurch hängt die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im Gel nur von seiner Masse ab.

3.2.3.1 Herstellung des Gels, Probenvorbereitung und Elektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde zuerst das Trenngel (2.1.3) hergestellt. Dafür wurden 1,5 M Tris Puffer, 10 % SDS, Wasser bidest und 10 % APS durch leichtes Schwenken vermischt. Erst ganz am Ende wurden Acrylamid und TEMED zugesetzt. Die erhaltene Lösung wurde anschließend zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 800,0 µl Wasser überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über 30,0 min bei Raumtemperatur. Nach Gelbildung im Trenngel wurde das Wasser mit Hilfe von Filterpapier wieder entfernt und das Sammelgel (2.1.3) vorbereitet. Dazu wurden 0,5 M Tris Puffer, 10 % SDS, 10 % APS und Wasser vorsichtig vermischt und nach der Zugabe von Acrylamid und TEMED ohne Luftblasen über das Trenngel geschichtet. Zur Taschenbildung wurde ein Haifischkamm in das noch nicht polymerisierte Gel eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt. Die Proben wurden abhängig vom Gesamtvolumen mit 1,0 - 5,0 µl Proteinprobenpuffer (2.1.3) versetzt und 10,0 min bei 90,0 °C denaturiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde das vollständige Probenvolumen und der Größenmarker (PageRuler, Firma Fermentas) in die Sammelgelkammern pipettiert. An die mit Elektrophoresepuffer (2.1.3) gefüllte Kammer wurde eine Spannung von 20,0 mA für das Sammelgel und 35,0 mA für das Trenngel angelegt. Die Elektrophorese der vertikalen Flachgele erfolgte unter Kühlung der Gelapparatur für ca. 3,0 h.

3.2.3.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Zur Detektion elektrophoretisch getrennter Proteine wurden die Gele mit Coomassie-Blau Lösung (2.1.3) für mindestens eine Stunde, besser über Nacht auf dem Schüttler gefärbt. Durch Anlagerung des Farbstoffs an basische und aromatische Aminosäuren wurden die Proteine angefärbt. Anschließend wurde das Gel für mehrere Stunden in der Entfärberlösung (2.1.3) entfärbt, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.2.3.3 Silbernitratfärbung von SDS-Gelen

Für die sensitive Silbernitratfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988) wurde das Gel zur Fixierung für 60,0 min oder über Nacht bei Raumtemperatur in Silberfärbelösung I (2.1.3) leicht geschüttelt. Dabei denaturierten die Proteine und eine weitere Wanderung im Gelbett wurde unterdrückt. Nach 60,0 min Sensitivierung mit Silberfärbelösung II (2.1.3) folgte dreimaliges Waschen für 10,0 min in Wasser bidest. Anschließend wurde das Gel 30,0 min in der Silbernitratlösung (2.1.3) gefärbt. Dabei lagerten sich Ag^+ -Ionen an die Proteine an und es

bildeten sich Silberalbuminte. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde das Gel in den Entwickler (2.1.3) überführt und geschüttelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Durch die Zugabe der alkalischen Formaldehydlösung wurden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und die Protein-Silber-Komplexe konnten im VIS-Licht detektiert werden. Gestoppt und aufbewahrt wurde das SDS-Gel in Stopplösung (2.1.3).

3.2.3.4 Dokumentation von SDS-Gelelen

Die Dokumentation der gefärbten SDS-Gele erfolgte im Fotoscanner (MultiImage Light Cabinet, Fa. Alpha Innotech) mit VIS-Durchlicht.

3.2.4 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Häufig war zur Lagerung oder für die Kristallisation ein Umpuffern bzw. Aufkonzentrieren der Proteine notwendig. Damit bei diesen Prozessen die Proteine nicht denaturierten, mussten Methoden angewandt werden, die einen schonenden Umgang mit dem Protein gewährleisteten.

3.2.4.1 Entsalzen und Umpuffern kleiner Volumina Proteinlösung

Zum Umpuffern und zum Entsalzen kleiner Volumina wurden PD₁₀-Fertigsäulen (Betthöhe 5,0 cm, Ø1,5 cm, Fa. Amersham Biosciences) eingesetzt. Diese Säulen waren mit einem Sephadex G-25 Material gefüllt, dessen Trennbereich zwischen 1000 und 5000 Da lag. Dadurch wurden niedermolekulare Substanzen wie Salze zurückgehalten, während Proteine mit dem Ausschlussvolumen eluiert wurden. Äquibriert wurde die Säule mit 30,0 ml des Elutionspuffers. Das Probenvolumen von 2,5 ml wurde nach der Äquibrierung aufgetragen und vollständig in das Gelbett einziehen gelassen. Zur Elution wurde mit 3,5 ml des Elutionspuffers das Protein aus dem Gelbett herausgewaschen. Zum Abschluss mussten die Säulen mit 30,0 ml 0,2 M Natronlauge und 30,0 ml Wasser bidest gespült werden.

3.2.4.2 Entsalzen und Umpuffern großer Volumina Proteinlösung

Zum Umpuffern und zum Entsalzen großer Volumina wurden Zentrifugenkonzentratoren eingesetzt. Hierbei kamen Vivaspin 6 (bis 6,0 ml Proteinlösung) und Vivaspin 20 (bis 20,0 ml Proteinlösung) mit einem „Molecular weight cut off“ von 10.000 (Firma Vivascience) zum

Einsatz. Die Proteinlösung wurde oberhalb der Filtermembran der Konzentratoren eingefüllt und bei 4,0 °C und 7000 U/min zentrifugiert, um durch die auftretenden Zentrifugalkräfte die Proteine von der Pufferlösung abzutrennen. Durch die Porengröße definiert, wurden die Proteine zurückgehalten, während niedermolekulare Verbindungen wie Salze oder abgespaltene Fusionspeptide mit dem Durchlauf eluiert wurden. Ein weiterer Vorteil dieser Konzentratoren war eine mögliche Aufkonzentrierung, indem das abgetrennte Puffervolumen durch ein kleineres Volumen des neuen Puffers ersetzt wurde.

3.2.5 Aufbewahrung des gereinigten Proteins

Nach Umpuffern von imidazolhaltigem Elutionspuffer auf 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 oder 0,1 M KH₂PO₄ Puffer pH 7,5 konnten die Proteine bei 4,0 °C auf Eis ohne Aktivitätsverlust für 2 Wochen gelagert werden.

3.2.6 Abspaltung des Polyhistidinendes

Um Störungen bei der Kristallisierung von Proteinen durch das polare Polyhistidin zu vermeiden, musste der 6xHis-tag mit Endonukleasen vom restlichen Protein abgetrennt werden.

3.2.6.1 *Abspaltung des Polyhistidinendes von pRSet B codierten Proteinen*

Der zur Expression verwendete pRSet B Vektor besaß zwischen dem 6xHis-tag codierenden Bereich und der MCS eine Region, die für eine Enterokinaschnittstelle codierte, so dass im exprimierten Protein das Polyhistidinende leicht abgespalten werden konnte. Eingesetzt wurde eine Trypsinmodifikation, die die gleiche Erkennungssequenz besitzt wie eine Enterokinase. Zur Abspaltung wurden Protein und Trypsinvariante im Massenverhältnis 100 : 1 vermischt und 2,0 h bei 37,0 °C inkubiert. Da das Trypsin selbst einen nicht abspaltbaren 6xHis-tag besaß, konnten nach der Inkubation mittels Affinitätschromatographie (3.2.1.1) nicht gespaltenes Protein, abgespaltene Polyhistidinenden und die Trypsinmodifikation von dem geschnittenen Protein abgetrennt werden.

3.2.6.2 Abspaltung des Polyhistidinendes von pET 28c codierten Proteinen

Der pET 28c Vektor besaß zwischen dem 6xHis-tag codierenden Bereich und der MCS eine Region, die für eine Thrombinschnittstelle codierte. Eingesetzt wurde Thrombin von der Firma Novagen. Zur Abspaltung wurden Protein und Thrombin im Massenverhältnis 2000 : 1 vermischt und 4,0 h bei 37,0 °C inkubiert. Das gespaltene Protein wurde mittels Gelfiltration (3.3.7) von den abgespaltenen Polyhistidinresten abgetrennt. Nicht gespaltenes Protein wurde mit Hilfe einer der Gelfiltration vorgelagerten HisTrap-Säule (Fa. Amersham Biosciences) aus dem Ansatz entfernt.

3.3 Methoden der Analytik

3.3.1 Inkubation der Polyketid-Synthasen

Alle Bestandteile des Inkubationsansatzes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 35,0° - 37,0 °C für 10,0 min inkubiert. Zum Stoppen der Inkubation wurden 27,0 µl Eisessig zum Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde der Enzymansatz zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert, wobei zur Phasentrennung jeweils 3,0 min bei 13000 U/min zentrifugiert wurde. Nach der Extraktion wurden die vereinigten Ethylacetatphasen im Vakuum getrocknet. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit gekochtem, also denaturiertem Protein.

Biphenyl-Synthase		
	Menge der Stammlösung	Endkonzentration
Benzoyl-CoA	8,0 µl	12,4 µM
Malonyl-CoA	10,0 µl	18.1 µM
Enzym		0,5-2,0 µg
KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7,0	ad 250,0 µl	

Benzophenon-Synthase		
	Menge der Stammlösung	Endkonzentration
Benzoyl-CoA	8,0 µl	12,4 µM
Malonyl-CoA	10,0µl	18.1 µM
Enzym		0,5-2,0 µg
KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7,0	ad 250,0 µl	

3.3.2 HPLC/ Hochleistungsflüssigchromatographie

Die unter 3.3.1 gewonnenen Rückstände wurden für die HPLC-Analyse in 100,0 µl Wasser bidest. : Methanol (50 : 50) aufgenommen und in die HPLC-Anlage eingespritzt.

3.3.2.1 Instrumentierung HPLC 1

Pumpe	Waters 1525 Binary Pump
Detektor	Waters 2487 Dual Detector
Degaser	TSP/ Thermo Seperation Products
Software	Waters Breeze GPC
Trennsäule	Hypersil Gold 150x 4,6/5µm Fa. Thermo Elektron Cooperation

3.3.2.2 Instrumentierung HPLC 2

Pumpe	Waters 616
Detektor	Waters 996 DAD
Degaser	TSP/ Thermo Seperation Products
Autosampler	Waters 717plus
Controller	Waters 600 s
Software	Milennium 2010 Chromatography Manager
Trennsäule	Varian

3.3.2.3 Mobile Phase

Die HPLC-Analyse der enzymatischen Produkte erfolgte mit einem binären Gradienten (Wasser bidest, pH 2,5 und Methanol) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Zusammensetzung des Fließmittelgemisches änderte sich innerhalb der angegebenen Zeitintervalle.

Zeit [min]	Methanol-Anteil [%]	Wasser-Anteil [%]
0,00	50	50
2,00	50	50
12,00	70	30
20,00	90	10
21,00	95	5
23,00	95	5
25,00	50	50
33,00	50	50

3.3.3 GC-MS

3.3.3.1 *Instrumentierung*

Vorsäule	2 m x 0,32 mm fused silica, deaktiviert, Fa. Phenomenex
Trennsäule	30 m x 0,32 mm ZB1, Fa. Phenomenex
Injektionsvolumen	1,0 µl
Injektor	250 °C, Splitverhältnis 1:20
Trärgas	He, 1,6 ml/min
Ionenquellentemperatur.	180 °C
Energie	70 eV
Temperaturprogramm	10 °C-300 °C, 10 °C/min

Die Kapillarsäule wurde über eine beheizte Verbindung (280 °C) direkt mit einem Triple-Quadropole-Massenspektrometer gekoppelt.

3.3.3.2 *Probenvorbereitung*

Abweichend zu 3.3.1 wurde den Extrakten der Enzymsätze für die GC-MS-Analyse vor dem Einengen mitüberführtes Wasser mit Na₂SO₄ entzogen. Anschließend wurden die Ethylacetatphasen nicht im Vakuum, sondern unter dem Stickstoffstrom getrocknet. Die zurückbleibenden Produkte wurden zur Derivatisierung in MSTFA [N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-tri-fluoroacetamid] aufgenommen und 30,0 min bei 75,0 °C erhitzt. Diese Lösung wurde dann ohne weitere Aufreinigung direkt in die GC-MS-Apparatur eingespritzt.

3.3.4 ESI-MS

Die Bestimmung der Masse von Molekülen mittels der Ionenspraymethode ist ein sehr häufig genutztes Verfahren, da es leicht mit einer HPLC gekoppelt werden kann und so als online-Methode gut zugänglich ist und leicht überwacht werden kann. Grundlage der ESI-MS ist die

Erzeugung von Nebeltropfen in einem Hochvakuum, aus denen Ionen freigesetzt werden. Die Ionisierung der Teilchen erfolgt durch ein starkes elektromagnetisches Feld, durch das das Aerosol gesprüht wird. In Abhängigkeit zur Stärke des elektrischen Feldes beruht die Ionisierung entweder auf der Protonierung basischer oder auf der Deprotonierung saurer funktioneller Gruppen der zu analysierenden Substanz. Diese Art der Ionisierung limitiert aber gleichzeitig das System, da unpolare Verbindungen aufgrund fehlender Ionisierungsmöglichkeiten nicht detektiert werden können. Da aber alle analysierten enzymatischen Produkte über eine ausreichende Polarität verfügten, war die ESI-MS die Methode der Wahl zur Charakterisierung und Strukturaufklärung der Substanzen.

3.3.4.1 Instrumentierung

Pumpe	Series 1100 - Bin Pump G1312 A, HP	
Injektor	Rheodyne 7725i mit 20,0 µl Probenschleife	
MS Anlage	Esquire-LC mit Elektronenspray-Ionisierung (ESI), Bruker Daltonic	
Detektor	Ion-Trap-Detektor, Bruker Daltonic	
Software	Esquire Control Software V. 4.5, Bruker Data	
	Analysis V.3.0, Bruker Data	
MS Parameter	Dry gas temperature	365 °C
	Dry gas flow	10,0 l/min
	Nebulizer gas (N ₂)	50,0 psi
	Capillary	3500,0 V
	End plate offset	500,0 V
	Skimmer 1	30,0 v
	Skimmer 2	5,0 V
	Cap exit offset	70,0 V
	Trap drive	55
	Scan range	m/z 50 - 1500
	Accu time	200,0 ms

3.3.4.2 *Probenvorbereitung*

Die Proben für die GC-MS-Analytik wurden nach dem gleichen Verfahren wie in 3.3.1 beschrieben hergestellt. Nur die Zusammensetzung der verschiedenen Inkubationsansätze änderte sich nach folgendem Scale up-Schema.

Startersubstrat-CoA	32,0 µl	49,6 µM
Malonyl-CoA	40,0 µl	72,4 µM
Enzym		10,0 µg
KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7,0	ad 250,0 µl	

Als Startersubstrate wurden Benzoyl-CoA, *o*-Hydroxybenzoyl-CoA und *m*-Hydroxybenzoyl-CoA eingesetzt.

3.3.5 Radiochemische Verfahren

3.3.5.1 *Flüssigszintillation*

Zur Messung der Radioaktivität wurde ein Phillips PW 4700 Szintillationszähler eingesetzt. Bis zu 10,0 µl wässriger Probe wurde in einem 4,0 ml Kunststoffszintillationsröhrchen mit 3,0 ml Aquasafe-Szintillationscocktail versetzt und im Szintillationszähler vermessen.

3.3.5.2 *Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-DC)*

Die Detektierung und die Quantifizierung radioaktiv markierter enzymatischer Produkte erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mit Hilfe des Radioscanners RITA (Firma Raytest). Zur radioaktiven Markierung wurde jeder Inkubationsansatz nach 3.3.1 mit [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (0,93 kBq) unterfüttert. Die getrockneten Produkte wurden in 50,0 µl Ethylacetat gelöst und auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten (20x20 cm, Schichtdicke 0,2 mm, Fa. Merck) dünnschichtchromatographisch getrennt. Das Fließmittel setzte sich aus Chloroform:Methanol:Wasser 69:27:4 (v/v/v) zusammen.

3.3.5.3 *Instrumentierung Radio-HPLC*

Pumpe	Merck Hitachi L-6200
Radiodetektor	HLPC Radioactivity Monitor LB 506 D
UV-Detektor	Merck Hitachi L-4200
Trennsäule	Nucleosil 100 C-18, 250 x 5,0 µm, Macherey&Nagel

3.3.5.4 *Probenvorbereitung*

Die wie in 3.3.1 beschriebenen Inkubationsansätze wurden zur Vermessung mit der Radio-HPLC mit [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (0,93 kBq) unterfüttert. Die getrockneten Rückstände wurden in 50,0 µl Methanol 50,0 % aufgenommen und davon 20,0 µl in die HPLC eingespritzt. Als Fließmittel diente der binäre Gradient nach 3.3.2.3. Die Detektion im UV/VIS-Bereich erfolgte bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der erwarteten Hauptprodukte. Für die Radiodetektion wurde dem HPLC-Eluat direkt vor dem Eintritt in die Messzelle des Radioaktivitäts-Monitors das dreifache Volumen an Szintillationscocktail (Aquasafe) beigemischt.

3.3.6 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein schonendes Verfahren, um Proteine nach ihrer Größe zu trennen oder um die genaue Proteinmasse zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration eingesetzt, um die Größe der aufgereinigten Proteine zu bestimmen.

3.3.6.1 *Instrumentierung*

Auto injection valve	Biorad
Biologic workstation	Biorad
Modell 2128 fraction collector	Biorad
Hi prep 16/60 Sephacryl S-200 Säule	Amersham Biosciences
Biologic HR Software	Biorad

3.3.6.2 *Mobile Phase*

Zur Bestimmung der Proteingröße musste das System zuerst äquilibriert werden.

Volumen [ml]	Beschreibung	Bedingungen		Flussrate
0,0	UV Lampe	anschalten	Start	
0,0	isokratische Elution	H ₂ O	100%	0,5 ml für 180,0 ml
180	isokratische Elution	50 mM Tris HCl KCl pH 7,5	100%	0,5 ml für 60,0 ml
240,0	UV Lampe	ausschalten	Stop	

Erst nach der Äquilibrierung wurden die Proteine zur Kalibrierung bzw. die zu untersuchenden Proteine in 2,0 ml Tris/HCl + 100 mM KCl Puffer pH 7,5 aufgenommen und nach folgendem Schema injiziert.

Volumen [ml]	Beschreibung	Bedingungen		Flussrate
0,0	UV Lampe	anschalten	Start	
0,0	Proben- aufgabe	Sample static loop	auto inject valve	0,5 ml für 2,0 ml
2,0	isokratische Elution	50 mM Tris HCl KCl pH 7,5	100%	0,3 ml für 242,0 ml
242,0	UV Lampe	ausschalten	Stop	

Mittels EDV konnte die Proteingröße anhand des Elutionsvolumens und der Kalibriergeraden errechnet werden.

3.3.7 Charakterisierung der überexprimierten Proteine

3.3.7.1 *Bestimmung von Temperatur- und pH-Optima*

Die Inkubationen (3.3.1) wurden mit KH_2PO_4 -Puffer im Bereich von pH 5,0 - 9,0 in 0,5er Schritten angesetzt und 10,0 min bei 35,0 °C inkubiert. Die Ansätze enthielten 5,0 µg Protein. Die enzymatischen Produkte wurden per HPLC-Analyse vermessen und nach Ermittlung des optimalen pH-Wertes wurde eine weitere Serie im Temperaturbereich von 15,0° - 45,0 °C inkubiert. Die optimale Temperatur wurde anhand der Produktmengen mittels HPLC-Analyse (3.3.2) bestimmt.

3.3.7.2 *Bestimmung des DTT-Optimums*

Zur Bestimmung der optimalen DTT Konzentration wurde den Ansätzen (3.3.1) DTT in den Konzentrationen von 0, 5, 10, 50, 100, bzw. 200 µM zugesetzt. Nach 10,0 minütiger Inkubation bei 35,0 °C wurden die Produkte extrahiert, getrocknet und per HPLC (3.3.2) vermessen.

3.3.7.3 *Ermittlung der Substratspezifität*

Für die Bestimmung der Substratspezifität wurden den Inkubationsansätzen nach 3.3.1 neben dem Kettenverlängerer Malonyl-CoA verschiedene Startersubstrate beigemischt. Zum Einsatz als Starter kamen:

Benzoyl-CoA, *o*-Hydroxybenzoyl-CoA, *m*-Hydroxybenzoyl-CoA, *p*-Hydroxybenzoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA, *o*-Hydroxycoumaryl-CoA, *m*-Hydroxycoumaryl-CoA, und *p*-Hydroxycoumaryl-CoA. Die Inkubation erfolgte bei 35,0 °C für 10,0 min. Die Produkte wurden mit

Ethylacetat extrahiert und im Vakuum getrocknet. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC (3.3.2). Beim Auftreten unbekannter Produkte im Chromatogramm wurde die Inkubation mit dem entsprechenden Startersubstrat wiederholt und die Produkte wurden per LC-MS (3.3.4) und GC-MS (3.3.3) identifiziert.

3.3.7.4 Bestimmung der kinetischen Daten

Bei der Bestimmung der K_m und K_{cat} Werte erfolgte die Inkubation mit den jeweils bevorzugten Substraten für das exprimierte Enzym. Dazu wurden 2,0 μg Protein mit verschiedenen Substratkonzentrationen im Temperatur- und pH-Optimum 10,0 min inkubiert. Die eingesetzten Substratkonzentrationen lagen bei 0,2 - 12,0 x K_m , das zweite Substrat wurde jedem Inkubationsansatz zur Sättigung zugegeben. Die extrahierten Produktmengen wurden mittels HPLC-Analyse (3.3.2) gegen eine zuvor aufgenommene Kalibriergerade quantitativ bestimmt und die kinetischen Daten mit EDV-Unterstützung berechnet.

3.4 Methoden der Proteinkristallisierung

3.4.1 Proteinkristallisierung

Die Experimente zur Proteinkristallisierung wurden nach den Methoden des Dampfdiffusionsverfahrens durchgeführt. Die ersten Screening-Versuche erfolgten nach der „sitting drop“ Methode, um alle möglichen Kristallisationsbedingungen festzulegen. Zur Gewinnung größerer Proteinkristalle und zur Optimierung der Kristallisation wurde die Methode des „hanging drop“ angewandt. Bei beiden Kristallisationsverfahren wurde eine hochkonzentrierte Proteinlösung (10,0 - 20,0 mg/ml) mit dem jeweiligen Kristallisationspuffer zu gleichen Volumenanteilen vermischt. In der so entstandenen Stammlösung (motherliquid) wurde die Löslichkeitsgrenze der Proteine durch langsame Dampfdiffusion aus der Stammlösung in das Pufferreservoir überschritten und das Protein konnte unter optimalen Bedingungen auskristallisieren. Wichtig bei der Proteinkristallisierung war es, alle Lösungen und Puffer vor dem Gebrauch steril zu filtrieren, um eine mögliche Kontamination von außen zu vermeiden.

3.4.1.1 Screening nach der „sitting drop“ Methode

Das Screenen diente zur Ermittlung der Parameter, unter denen ein optimales Kristallwachstum stattfand. Da alle diese Parameter empirisch ermittelt werden mussten, war das Screenen eine sehr aufwendige Aufgabe.

Für das Screening wurde das Dampfdiffusionsverfahren nach der „Sitting Drop“ Methode angewandt. Dafür wurde mit einem Pipettierroboter (Cartesian, Fa. Zinsser Analytic) 20,0 μ l Kristallisationspuffer (2.1.5) in die Reservoirkammern von Proteinkristallisations-Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Fa. Greiner) vorgelegt. Nach dem Einfüllen des Puffers wurden aus dem Reservoir mit Hilfe des Roboters 3,0 nl Kristallisationspuffer entnommen und auf das Plateau der jeweiligen Vertiefung pipettiert. Zu dem vorgelegten Puffer wurde dann das gleiche Volumen an Proteinlösung zupipettiert. Anschließend wurden die Platten mit durchsichtigen Klebefolien verschlossen. Die fertigen Wellplates wurden bei 13,0 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen auf Kristallbildung mittels Imager Oasis LS3 (Fa. Veeco) bzw. Mikroskop überprüft.

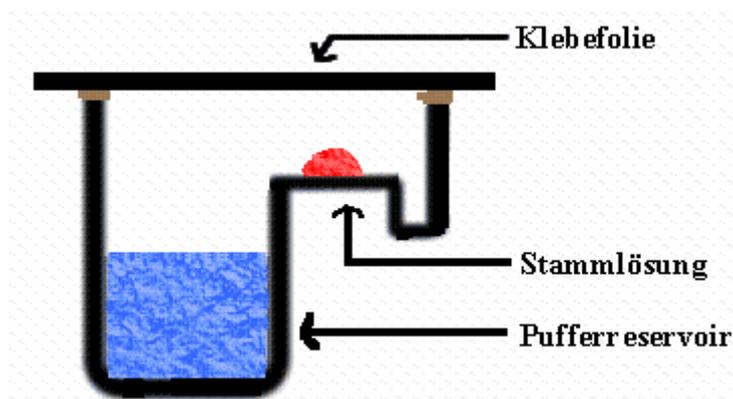


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des „Sitting drop“ Verfahrens

3.4.1.2 Proteinkristallisation nach der „hanging drop“ Methode

Die „hanging drop“ Methode wurde zur Gewinnung größerer Proteinkristalle und zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen angewandt. Durch Variation der Salzkonzentration, der pH Werte, der Pufferkonzentration und durch Zusatz verschiedener Präzipitanten sollte eine Verbesserung der Proteinkristallisation erzielt werden.

Bei dieser Methode wurden Platten (Fa. Nextal) mit jeweils 24 Kristallisationskammern eingesetzt. In die Kammern wurden 700,0 μ l des jeweiligen Kristallisationspuffers pipettiert. Auf die Innenseiten der Schraubdeckel wurden 2,0 - 5,0 μ l der Proteinlösung aufgetragen und das gleiche Volumen des jeweiligen Puffers zugegeben, so dass eine Stammlösung entstand.

Die Deckel wurden anschließend auf das Pufferreservoir geschraubt und die Platten unter regelmäßiger Kontrolle der Kristallisation bei 13,0 °C gelagert.

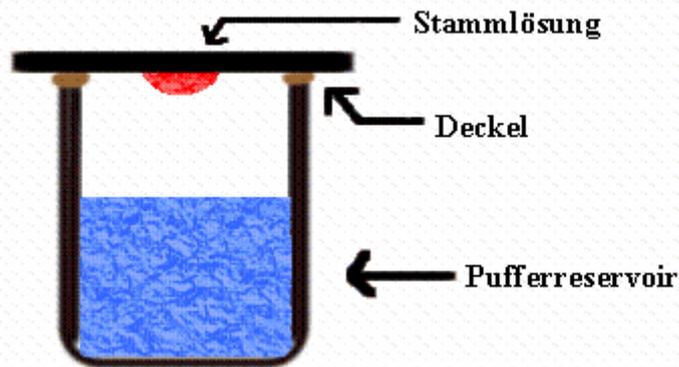


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des „Hanging drop“ Verfahrens

3.4.1.3 *Kristall-Seeding*

Das Makro seedingverfahren wurde als Methode eingesetzt, um größere Proteinkristalle zu erhalten. Dazu wurden mit Hilfe einer Nylonschleife aus einem Seedingansatz kleine Kristalle entnommen. Diese Kristalle wurden zweimal gewaschen, indem sie vorsichtig durch frische Pufferlösungen gezogen wurden. Nach dem Waschen wurden die Kristalle als Kristallisationskeime in frische Stammlösung überführt und nach der „hanging drop“ Methode (3.4.1.2) behandelt.

3.4.2 Co-Kristallisierung

Die Co-Kristallisierung diente zur Aufnahme von Kristallstrukturen, die Auskunft über die Bindungseigenschaften des Substrates im Proteinmolekül gaben. Neben dem direkten Einbau der Substrate während der Kristallisation können die Substrate auch durch Diffusion nachträglich in die einzelnen Proteinmoleküle aufgenommen werden. Da das Einbauverfahren für reproduzierbare Kristallisationsverfahren als Methode der Wahl gilt, wurde diese Methode in dieser Arbeit angewandt. Zu der Stammlösung wurde mit einem Massenverhältnis von 1:1 entweder Malonyl-CoA oder Benzoyl-CoA zupipettiert. Zur Bestimmung der Kristallisationsbedingungen wurde ein Screening (3.4.1.1) durchgeführt. Die Experimente zur Co-Kristallisierung sollten so angelegt werden, dass die katalytische Reaktion nicht

vollständig ablaufen kann, damit das Substrat gebunden an das aktive Zentrum detektiert werden kann. Zusätzlich ist eine Co-Kristallisierung nur möglich, wenn die Löslichkeit des Substrates unter den notwendigen Bedingungen und eine ausreichende Bindungsaffinität des Proteins zum Substrat garantiert sind.

3.4.3 Röntgenstrukturanalyse

Die Aufnahme der Beugungsmuster erfolgte mit einem Micromax 007 Generator (Fa. RigakuMSC). Dazu wurden die Kristalle mit einer Nylon-Öse aus der Stammlösung entnommen und in Kryopuffer gewaschen (2.1.4). Anschließend wurden die Kristalle wieder mit der Öse aufgenommen und in einem 100,0 K kalten, trockenen Stickstoffstrom (Xstream Cryo-cooler, Fa. RigakuMSC) schockgefrostet. Durch das zugesetzte Glycerin entstanden keine die Aufnahme störenden Eiskristalle, so dass der Kristall durch das Einfrieren in einen glasartigen Zustand überführt wurde. Um ein Auftauen zu vermeiden und um konstante Beugungsbedingungen gewährleisten zu können, wurde der Kristall im Laufe der Messung

weiter von kaltem Stickstoff umspült. Während der Messung mit einer Belichtungszeit von 2,0 min wurde der Kristall zur Aufnahme eines vollständigen Datensatzes im Bereich von 0 - 180° in 0,5° Winkelschritten gedreht. Die entstandenen Beugungsmuster wurden von einem R-Axisiv++ Flächendetektor (Fa. RigakuMSC) aufgenommen und gespeichert. Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Physikalische Biotechnologie (AG Prof. Milton T. Stubbs) an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.4.4 Datenverarbeitung und Strukturaufklärung

3.4.4.1 *Datenverarbeitung*

Aus den unter 3.4.3 gewonnenen Rohdaten konnte aufgrund des Auftretens bzw. des Fehlens von Reflexen eine Raumgruppe definiert werden. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten integriert, das heißt die genauen Positionen und Intensitäten der Reflexe wurden bestimmt. Nach der Integration fand eine Datenreduktion (Skalierung) statt. Hierbei wurden symmetrieverwandte Reflexe im Beugungsmuster zusammengefasst und normiert. Diese gesamten Vorgänge wurden EDV gestützt und in Kooperation mit dem Institut für

Physikalische Biotechnologie (AG Prof. Milton T. Stubbs) an der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.4.4.2 *Strukturlösung*

Zur Strukturaufklärung wurde die Methode des Molekularen Ersatzes oder Austausches (MR, molecular replacement) eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurden bereits strukturell beschriebene Proteine mit hoher Strukturhomologie als Suchmodelle eingesetzt. Anhand der vorhandenen Struktur konnte der Aufbau des eigenen Proteins unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Aminosäuresequenz berechnet werden. Als Suchmodell diente die Struktur der Chalkon-Synthase aus *Medicago sativa* und die Strukturaufklärung wurde mit dem Programm AMORE in Kooperation mit dem Institut für Physikalische Biotechnologie (AG Prof. Dr. Milton T. Stubbs) an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Grundlage dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Analyse der Biphenyl-Synthase sowie der strukturellen Aufklärung der Biphenyl-Synthase und der Benzophenon-Synthase. Untersuchungen wurden für die Biphenyl-Synthasen am Beispiel der BIS I von *Sorbus aucuparia* durchgeführt, während für die strukturelle Analyse der Benzophenon-Synthasen die BPS von *Hypericum androsaemum* als Beispielenzym ausgewählt wurde. Wie schon ausführlich in der Einleitung beschrieben, katalysieren beide Enzyme die Kondensation des Startersubstrates Benzoyl-CoA mit drei Acetyleinheiten, die aus dem Malonyl-CoA stammen. Das daraus resultierende lineare Tetraketid wird in Anwesenheit von BIS I mittels Aldol-Kondensation und anschließender endständiger Decarboxylierung in das 3,5-Dihydroxybiphenyl überführt, während das identische Tetraketid in Anwesenheit der BPS durch eine Claisen-Kondensation in das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon überführt wird. Diese beiden Cyclisierungen werden auch von der Stilben-Synthase (STS) bzw. Chalkon-Synthase katalysiert, allerdings ergab der Vergleich der Aminosäuresequenzen Hinweise auf Unterschiede in den Mechanismen, die durch Strukturaufklärung der BIS I und BPS geklärt werden sollten. Grundlage für die analytische Arbeit und die Tätigkeit im Bereich der Proteinkristallisierung war, dass bereits die codierenden Gene für die BIS I aus *S. aucuparia* und für die BPS aus *H. perforatum* in unserer Arbeitsgruppe cloniert wurden (Liu et al., 2003; Liu et al., 2006). Somit standen Proteine mit den in Abb. 4.1 gezeigten Aminosäuresequenzen zur Verfügung. Diese Proteine besitzen einen Homologiegrad von 52,9 % (BIS I) und 57,1 % (BPS) im Vergleich zur bereits kristallisierten CHS von *Medicago sativa* und verfügen über die für Typ III-PKS typischen, streng konservierten katalytischen Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums (Ferrer et al., 1999).

10	20	30	40	50	60	
MAPLV---KNHGEPQ---HAKILA IGTANP PNVYYQKDY P DFLFRVTKNEHRTDLREKFD						BIS I
MAPAMEYSTQNGQEGGKKRASVLA IGT TNP EHFILQEDY P D FYFRMTNSEHMTLKEKFK						BPS
MVSVSEIRKAQRAEG---PATILA IGTANPANCVEQSTY P D FYFKITNSEHKTELKEKFKQ						CHS
70	80	90	100	110	120	
RICEKSRTRKRYLHLTEEILKAMP S IYTYGAPSLDVRQDMLNSEV P KLGQQAALKAIKEW						BIS I
RICVKSHIRKRHFYLTTEEILKENQGIATY GAGSLDARQRILETEV P KLGQEAALKAI AEW						BPS
RMC DKSMIKRRYMYLTTEEILKENP MVCEYMAPSLDARQDMVVVEV P RLGKEAAVKAIKEW						CHS
130	140	150	160	170	180	
GQPISKITHLIFCTASCVDMPGAD FQLVKLLGLNPSVTRTMIYEAGC YAGATVLR LAKDF						BIS I
GQPISKITHVVFATTSGFMMPGAD YVITRLLGLNRTVRRVMLYNQGC FAGGTALRVAKDL						BPS
GQPKSKITHLIVCTTS GVDMPGADYQLTKLLGLRPYVKRYMMYQQGC FAGGTVLR LAKDL						CHS
190	200	210	220	230	240	
AENNEGARVLVVC AEITTVFFHGLTDTHLD ILVGQALFADGASAVIVGANPEPKI-ERPL						BIS I
AENNEGARVLVVC AENTAMTFHAPNESHLDVIVGQAMFSDGAAALIIGACPDVASGERAV						BPS
AENNKGARVLVVC SEVTAVTFRG PSDTHLDSL VGQALFGD GAAALIVGSDPVPEI-EKPI						CHS
250	260	270	280	290	300	
FEIVACRQTIIPNSEHGVVANI REMGF TYYLSGEVPK FVGGNVVDFLTKTFEKVDGKNKD						BIS I
FNILSASQTIVPGSDGAITAHFYEMGMSYFLKEDVIPLFRDNIAAVMEEAFSPLG--VSD						BPS
FEMVWTAQTIAPDSEGAIDGHLREAGLTFHLLKDVPGIVSKNITKALVEAFEPLG--ISD						CHS
310	320	330	340	350	360	
WNSLFFSVHPGGPAIVDQVEEQ LGLKEGKLRA TRHVLSEYGMTIGAPSVHFILDDMRK KSI						BIS I
WNSLFYSIHPGGRGIIDGVAGNLG IKDENLVA TRHVLGEYGMTIGSACVMFILD ELRKSSK						BPS
YNSIFWIAHPGGPAILDQVEQKLALKPEKM NATREVLSEYGMTISSACVLFILDEM RKKST						CHS
370	380	390				
EEGKSTTGEGLEWGVVIGIGPGLTVETAVLRSE SIPC.						BIS I
VNGKPTTGDGKEFGCLIGLGPGLTVEAVVLQSVPI LQ.						BPS
QNGLKTTGEGLEWGVLF GFGPGLT IETVVLRSVA---I						CHS

Abb. 4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der BIS I von *Sorbus aucuparia*, der BPS von *Hypericum androsaemum* und der CHS von *Medicago sativa*. Die streng konservierten katalytischen Aminosäuren des aktiven Zentrums sind rot markiert.

4.2 Expression der BIS I

Zur Expression der BIS I wurde die PKS-Sequenz in den pRset-B Vektor der Firma Invitrogen eingebaut. Dazu wurde die Sequenz mit *KpnI* und *NheI* verdaut, in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pRset-B ligiert und in die BL 21 Wirtszellen transformiert. Der pRset-B Vektor enthält einen T7-Promotor, der nach chemischer Induktion eine hohe Expressionsrate und damit eine hohe Proteinausbeute gewährleistet. Die für die Expression wichtige T7-RNA-Polymerase stammt aus den BL 21 Bakterien. Die Bakterienzellen tragen einen *lac*-Repressor in sich, der die Synthese der T7-Polymerase verhindert. Durch Addition von IPTG wurde diese Repression aufgehoben und die T7-Polymerase expremiert.

Zusammen mit dem inklonierten Insert wurde an dessen N-Terminus ein Fusionspeptid mitexpremiert. Dieses Fusionspeptid enthielt unter anderem einen Polyhistidinrest (6x His-tag), der für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie wichtig war, und eine Enterokinaseschnittstelle, so dass das Fusionspeptid leicht von der Biphenylsynthese wieder abgespalten werden kann.

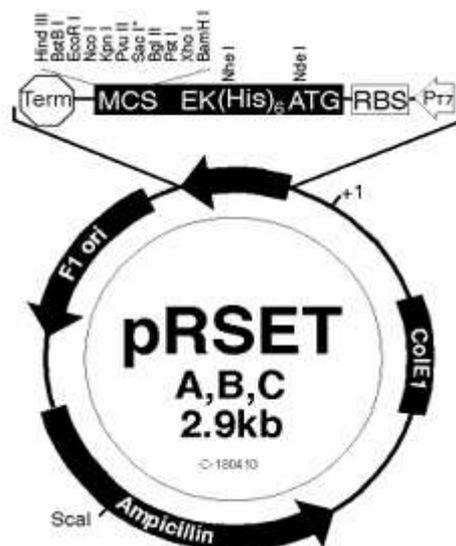


Abb. 4.2 Vektorkarte des pRset B-Vektors

4.3 Kontrolle der heterologen Expression

Die mit dem BIS I-Expressionsplasmid transformierten Bakterien wurden als Übernachtskultur angezogen und am nächsten Morgen in ein großes Volumen LB-Medium überführt. Nach erneuter Anzucht der Zellen bis $OD_{600} \sim 1,0$ wurde mit IPTG die Expression der BIS I bei 25,0 - 36,0 °C induziert. Die Expressionsbedingungen wurden so gewählt, dass der größte Anteil des exprimierten Enzyms löslich vorlag. So führte zum Beispiel eine zu hohe Temperatur während der Expression zur Bildung von falsch gefaltetem Protein. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinoberflächen in der wässrigen Umgebung aggregierten die Proteine und fielen als „inclusion bodies“ aus, so dass bei anschließenden Testinkubationen nur geringe Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Nach vierstündiger Induktion wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und nach 3.1.13 aufgeschlossen. Die Effizienz der Expression wurde mittels SDS-PAGE (3.2.3) von Proben der Zellsuspension vor, während und nach der Expression überprüft.

4.4 Affinitätschromatographie der rekombinanten BIS I

Zur Abtrennung der bakteriellen Proteine von der gewünschten Typ III-PKS wurde die Affinitätschromatographie mit Hilfe der FPLC (3.2.1.1) durchgeführt. Die Fremdproteine wurden durch die einprogrammierten Waschschriffe eluiert, während die BIS I aufgrund des N-terminalen 6x His-tag mit der Trennsäule interagiert und so zurückgehalten wurde. Durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer wurde abschließend das exprimierte Enzym von der Säule verdrängt und in der entsprechenden Elutionsfraktion nach Bradford (3.2.2) die Enzymkonzentration bestimmt. Die Reinheit des aufgereinigten Proteins wurde per SDS-PAGE (3.2.3) überprüft (Abb. 4.3). Da der zur Aufreinigung eingeführte Polyhistidinrest keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität bzw. Spezifität hatte (Liu, persönliche Mitteilung), konnte für die Charakterisierung der Biphenylsynthase auf eine Abspaltung verzichtet werden.

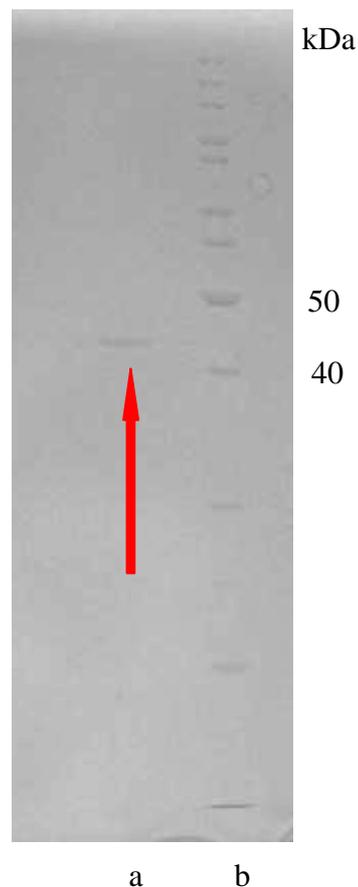


Abb. 4.3 SDS-PAGE zur Überprüfung der FPLC-Aufreinigung der BIS I. a) gereinigte BIS I (Pfeil), b) Proteinleiter

4.5 Test auf enzymatische Aktivität

In der Arbeitsgruppe bereits früher durchgeführte Experimente mit Hefeextrakt-behandelten Zellkulturen von *S. aucuparia* zeigten die Bildung von Aucuparin (Liu et al., 2004). In zellfreien Rohextrakten wurde die Biosynthese von 3,5-Dihydroxybiphenyl nachgewiesen. Dieses Produkt wurde auch für die heterolog exprimierte BIS I erwartet. Dafür wurden 5,0 µg des aufgereinigten Proteins mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA nach 3.3.1 inkubiert. Die nachfolgende HPLC-Analyse (3.3.2.1) zeigte die Bildung eines Produktes, das mittels Co-Chromatographie mit der authentischen Referenz als das erwartete 3,5-Dihydroxybiphenyl identifiziert wurde (Abb. 4.4). Eine Inkubation mit hitzedenaturiertem Protein zeigte keine Aktivität im HPLC-Chromatogramm, so dass es sich um ein enzymatisches Produkt handelte.

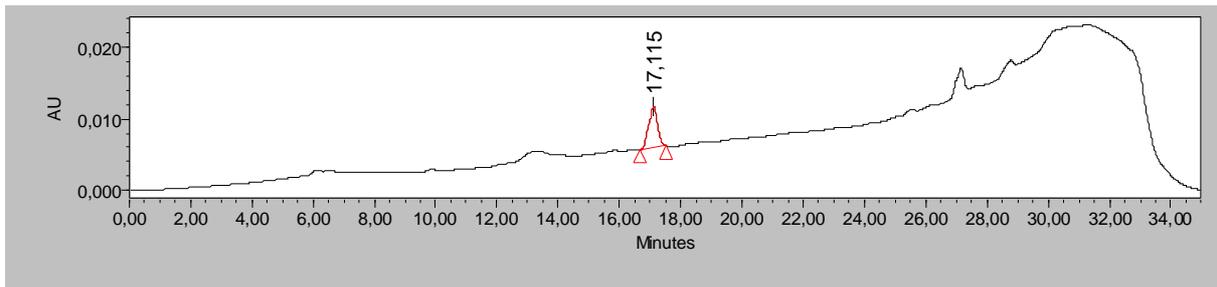


Abb. a

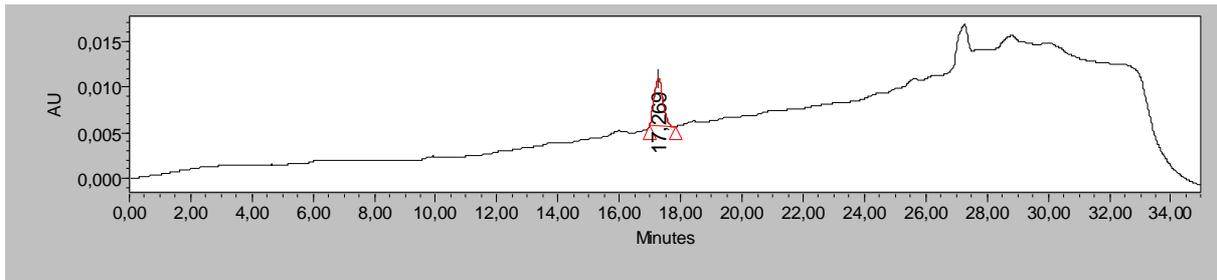


Abb. b

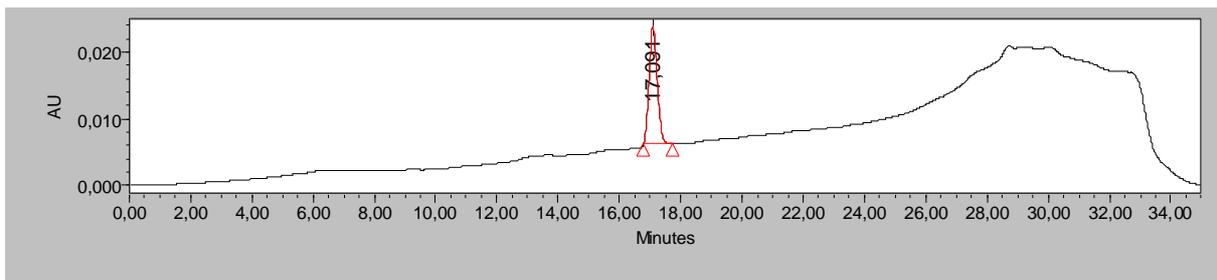


Abb. c

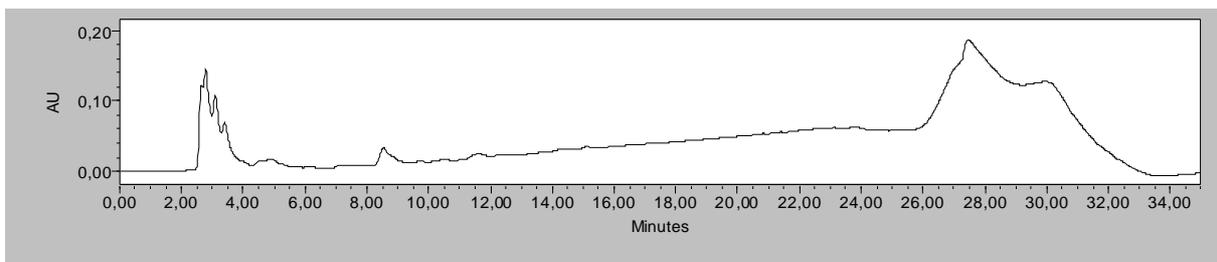


Abb. d

Abb. 4.4 HPLC-Analyse von BIS I-Ansätzen mit Benzoyl-CoA, a) Standardinkubation, b) Referenz, c) Co-Chromatographie, d) Inkubation mit hitzedenaturiertem Protein

4.6 Charakterisierung der rekombinanten BIS I

Um für die Charakterisierung der PKS ausreichende Mengen an Protein zur Verfügung zu haben, wurde das Anzuchtvolumen von 50,0 ml auf 400,0 ml erhöht und die Induktionszeit nach 3.3.12 auf 20,0 h verlängert. Gleichzeitig wurde auf die aufwendige und zeitintensive Proteinaufreinigung mittels FPLC verzichtet und die rekombinante BIS I nach 3.2.1.2 mit Hilfe von Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Zur Lagerung des Proteins wurden den Elutionsfraktionen entweder 20 % Glycerol (steril) zugesetzt oder die Eluate nach 3.2.4.1 in 0,1 M KH_2PO_4 Puffer pH 7,0 umgepuffert. Beide Stabilisierungsmethoden ermöglichten eine Lagerung des Proteins bei $-20,0\text{ }^\circ\text{C}$, ohne dass ein nennenswerter Aktivitätsverlust auftrat.

4.6.1 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit

Durch steigende Temperaturen nimmt die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu. Da Proteine aber thermolabil sind, beginnen sich oberhalb einer bestimmten Temperatur die intramolekularen Bindungen zu lösen und das Protein denaturiert. Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurde die BIS I bei 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Alle Versuche wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt und die gebildete Menge des Produktes wurde mittels HPLC-Analyse (3.3.2.2) bestimmt.

Das Temperaturoptimum für die BIS I lag bei ca. 35,0 $^\circ\text{C}$ (Abb. 4.5). Alle weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung wurden bei dieser Temperatur durchgeführt.

4.6.2 Bestimmung der pH-Abhängigkeit

Genau wie die Temperatur hat auch der pH-Wert einen großen Einfluss auf die katalytische Aktivität eines Enzyms. Die vorliegende Protonenkonzentration verändert die Ladung der funktionellen Gruppen der Aminosäuren eines Enzyms. Durch erhöhte bzw. reduzierte intramolekulare Wechselwirkungen der Aminosäuren kann es zu Konformationsänderungen kommen, die zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität führen. Da die meisten Enzyme ein pH-Optimum um pH 7,0 besitzen, wurde für die Inkubationen der BIS I Phosphatpuffer mit pH-Werten zwischen 5,0 und 9,0 eingesetzt. Alle Versuche wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt und die gebildete Menge des Produktes wurde mittels HPLC-Analyse (3.3.2.2) bestimmt. Die höchste Enzymaktivität wurde bei einem pH von ca.

7,0 gemessen (Abb. 4.6), so dass alle nachfolgenden Untersuchungen mit Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt wurden.

4.6.3 Bestimmung der DTT-Abhängigkeit

DTT (Dithiothreitol) ist eine reduzierende Substanz, die freie Thiol-Gruppen der Aminosäuren stabilisiert. Sollten sich aufgrund der thermischen Belastung während der Inkubation zwischen den funktionellen Gruppen der Aminosäuren Disulfidbrücken bilden, die Einfluss auf die Konformation und damit auf die Aktivität hätten, werden diese durch DTT reduziert und in die ursprüngliche Form zurücküberführt. Für die Inkubationen wurden 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 und 200 μM DTT eingesetzt. Alle Versuche wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt und die gebildete Menge des Produktes wurde mittels HPLC-Analyse (3.3.2.2) bestimmt.

DTT hatte keinen positiven Einfluss auf die Bildung des 3,5-Dihydroxybiphenyls (Abb. 4.7), wohl aber stimulierte es im erheblichem Maße die Biosynthese eines Nebenprodukts (Abb. 4.8). Daher wurde bei den nachfolgenden Inkubationen auf den Einsatz von DTT verzichtet.

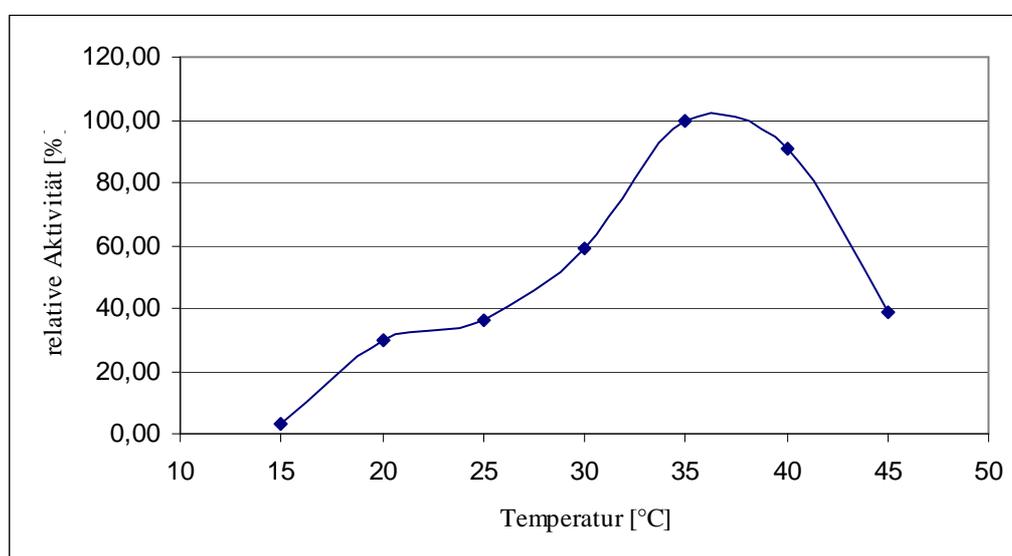


Abb. 4.5 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der BIS I-Aktivität

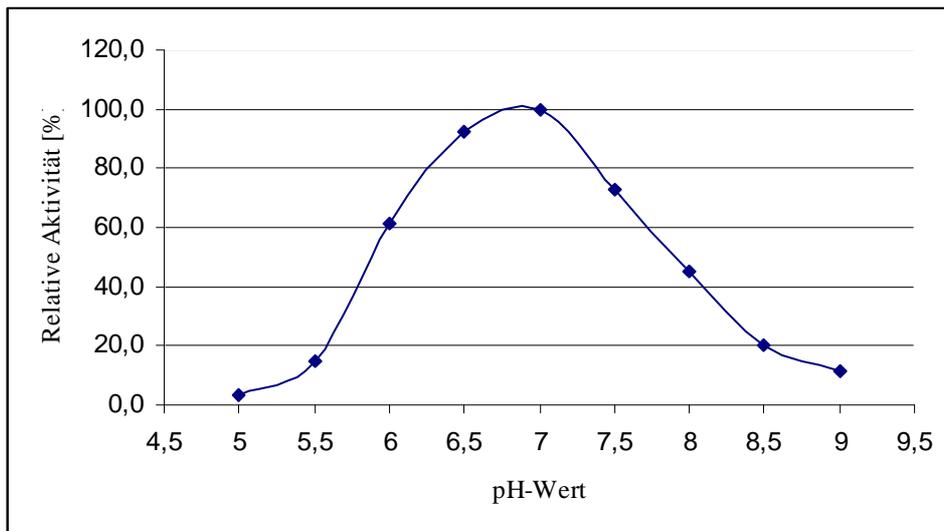


Abb. 4.6 Bestimmung des pH-Optimums der BIS I

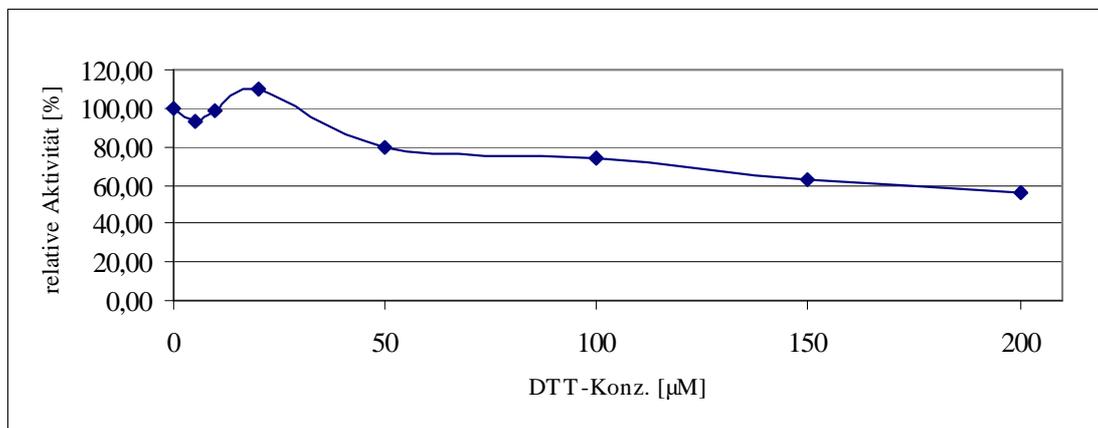


Abb. 4.7 Einfluss der DTT-Konzentration auf die Bildung des 3,5-Dihydroxybiphenyls

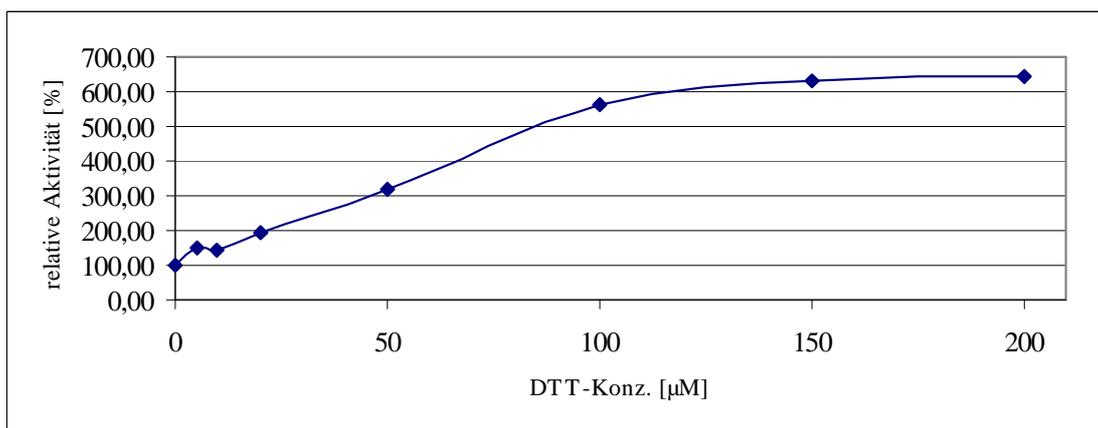


Abb. 4.8 Einfluss der DTT-Konzentration auf die Bildung eines Nebenprodukts

4.6.4 Bestimmung der Proteingröße

Zur Bestimmung der Proteingröße wurde die Gelfiltration (bzw. die Größenausschlusschromatographie) eingesetzt. Mit diesem Verfahren können Proteine, Polysaccharide oder Oligonucleotide der Größe nach getrennt werden. Bei der Gelfiltration besteht die stationäre Phase aus einem porösen Gelbett. Kleinere Proteine diffundieren während der Gelfiltration in die Poren der stationären Phase und werden so zurückgehalten. Größere Proteine haben weniger Möglichkeiten in das Gelbett zu diffundieren und werden früher von der Filtrationssäule eluiert. Wichtig für die Bestimmung der Proteingröße ist eine Kalibrierung des Systems, bevor die eigentliche Probe aufgetragen wird. Dazu wurde nach 3.3.6 gelöstes Blue Dextran mit einer Molekülmasse (MW) von 2000 kDa auf die Säule aufgetragen, um das Totvolumen (Void volume) der Säule zu bestimmen. Dann wurden β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und Albumin (66 kDa) als Größenmarker über die Säule getrennt und eine Kalibriergerade aus dem Logarithmus der Proteingröße und dem Quotienten von Elutionsvolumen/Totvolumen erstellt. Anschließend wurde die aufgereinigte BIS I in das System eingebracht und anhand der Kalibriergeraden eine relative Molekülmasse von etwa 83 kDa ermittelt (Abb. 4.9).

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem eluierten Protein um die Biphenylsynthase handelte, wurde der Proteingehalt nach Bradford (3.2.2) bestimmt, eine Inkubation nach 3.3.1 und eine SDS Gelelektrophorese (3.2.3.3) durchgeführt.

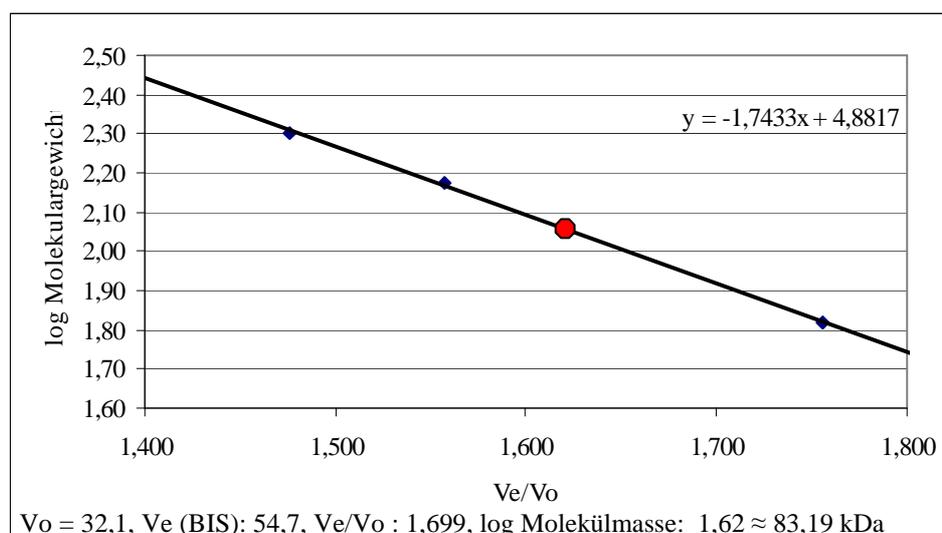


Abb. 4.9 Bestimmung der BIS I-Molekülmasse auf einer kalibrierten Gelfiltrationssäule

4.6.5 Bestimmung der kinetischen Parameter

Wichtig für die Charakterisierung der BIS I war auch die Festlegung der beiden kinetischen Größen Substrataffinität (K_m) und Wechselzahl (K_{cat}). Die Substrataffinität (Michaelis-Konstante) beschreibt die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration und wird bestimmt bei der Umsatzgeschwindigkeit $V_{max}/2$. Die Bestimmung von K_m erfolgte in drei unabhängigen Versuchsreihen nach 3.3.1 in 250,0 μl -Ansätzen mit je 2,0 μg Protein. Die Inkubationszeit wurde auf 10,0 min festgelegt. Die Substratkonzentrationen variierten für Benzoyl-CoA zwischen 0,1 und 2,8 μM und für Malonyl-CoA zwischen 1,0 und 45,0 μM , während das zweite Substrat in Sättigung vorlag. Nach Einengung der Ethylacetatphasen wurden die Produktmengen mittels HPLC anhand der Peakflächen und einer Kalibriergeraden quantifiziert. Da der K_m -Wert aus der graphischen Darstellung nach Michaelis-Menten schlecht abzulesen ist, wurde nach Lineweaver-Burk durch doppelt reziproke Umformung der Graph linearisiert (Abb. 4.10, 4.11). So kann der K_m -Wert als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse abgelesen werden, während der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate den Wert für V_{max} angibt. Nach Lineweaver-Burk ergab sich für Benzoyl-CoA ein K_m -Wert von $0,7 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Die Wechselzahl konnte mit $0,43 \text{ min}^{-1}$ angegeben werden. Daraus errechnete sich der K_{cat}/K_m -Wert von $10181 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, der die hohe katalytische Effizienz der BIS I beschreibt. Für Malonyl-CoA konnte ein K_m -Wert von $6,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ errechnet werden.

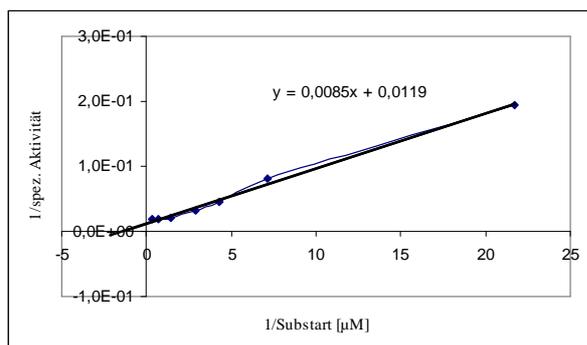


Abb. 4.10

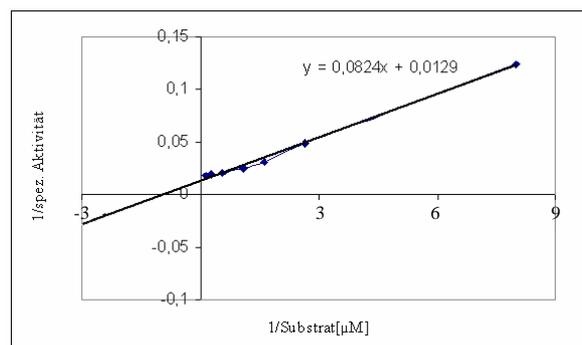


Abb. 4.11

Abb. 4.10 Bestimmung des K_m -Wertes für Benzoyl-CoA nach Lineweaver-Burk.

Abb. 4.11 Bestimmung des K_m -Wertes für Malonyl-CoA nach Lineweaver-Burk.

4.6.6 Substratspezifität

Es ist bekannt, dass PKS neben den Hauptstartsubstraten auch strukturell ähnliche Starter-CoA-Ester umsetzen. So wurde die BIS I neben Benzoyl-CoA mit den *ortho*- bis *para*-Hydroxybenzoyl-CoA-Estern inkubiert. Zusätzlich wurde BIS I mit den bevorzugten Substraten der CHS inkubiert (3.3.7.3).

4.6.6.1 Radio-DC-Analyse möglicher Produkte

Die Ermittlung der Substratspezifität erfolgte zunächst über die HPLC. Da in einigen Chromatogrammen aufgrund der sehr kleinen Peakflächen eine Auswertung nicht möglich war, musste ein sensibleres System gewählt werden, mit dem das Auftreten enzymatischer Produkte besser detektiert werden konnte. Dazu wurde die Radiodünnschicht-Analyse von radioaktiv unterfütterten Inkubationen (RITA, 3.3.5.2) eingesetzt. Die aus den Enzymansätzen extrahierten Produkte wurden in 50,0 µl Ethylacetat aufgenommen und 20,0 µl davon mit Hilfe einer Glaskapillare auf die DC-Platte aufgetragen. Die Detektion der entwickelten Platten zeigte, dass sich bei der Inkubation der BIS I enzymatische Produkte mit Benzoyl-CoA, *o*-Hydroxybenzoyl-CoA und *m*-Hydroxybenzoyl-CoA bildeten. Bei der Radiodünnschicht-Analyse der Benzoyl-CoA-haltigen Ansätze konnten drei radioaktiv markierte Produkte identifiziert werden, während bei den beiden anderen Startersubstraten jeweils nur ein Produkt detektiert werden konnte.

4.6.6.2 Produktquantifizierung mittels Radio-HPLC

Da eine exakte Bestimmung der Produktmenge mit dem RITA-Verfahren nicht möglich war, wurden die radioaktiv unterfütterten Inkubationen (3.3.5.4) mit den nach 4.6.6.1 ermittelten aktiven Substrat-CoA-Estern wiederholt und mittels Radio-HPLC analysiert. Die Quantifizierung der Produktmengen erfolgte über die vom Radiodetektor erfassten Peakflächen. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse zur Substratspezifität bezogen auf das 3,5-Dihydroxybiphenyl als Hauptprodukt.

Tab. 4.1 Substratspezifität der BIS I

Substrate	Rel. Enzymaktivität (%)
Benzoyl-CoA	100
2-Hydroxybenzoyl-CoA	52 ^a
3-Hydroxybenzoyl-CoA	68 ^a
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0
Cinnamoyl-CoA	0
2-Cumaroyl-CoA	0
3-Cumaroyl-CoA	0
4-Cumaroyl-CoA	0
Acetyl-CoA	0

^a) Bildung von Nebenprodukt, kein Biphenyl

4.7 Analyse der enzymatischen Produkte

Zur Identifizierung der Produkte wurden die Inkubationen nach dem angegebenen Scale up-Schema (3.3.4.2) wiederholt. Die Menge an eingesetzten Substraten und Protein wurden erhöht, um in der anschließenden HPLC-Analyse (3.3.2.2) möglichst große Produktpeaks zu erhalten.

4.7.1 Analyse der Produkte mit Benzoyl-CoA

Für die Analyse der Benzoyl-CoA-haltigen Inkubationen wurden die getrockneten Ethylacetatphasen in 100,0 µl wässrigem Methanol (50 %) gelöst und ein Aliquot von 50,0 µl mittels HPLC analysiert. Neben dem Hauptprodukt (R_t 11,7) konnten noch zwei Nebenprodukte (R_t 8,9 und R_t 12,6) detektiert werden (Abb. 4.12). Die anderen Peaks im Chromatogramm sind nichtenzymatischen Ursprungs. Die den drei Produkten zugeordneten UV-Spektren sind in Abb. 4.13 – 4.15 dargestellt. Sie weisen darauf hin, dass es sich bei dem Produkt mit der Retentionszeit von R_t 8,9 min um das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon handeln könnte. Der Peak bei R_t 11,7 min konnte durch das Spektrum (Abb. 4.14) und die Co-Chromatographie (4.5) mit authentischer Referenz eindeutig als das 3,5-Dihydroxybiphenyl identifiziert werden. Das UV-Spektrum (Abb. 4.17) des Peaks bei R_t 12,6 min lässt vermuten, dass es sich bei dem Produkt um ein Phenylpyron handelt.

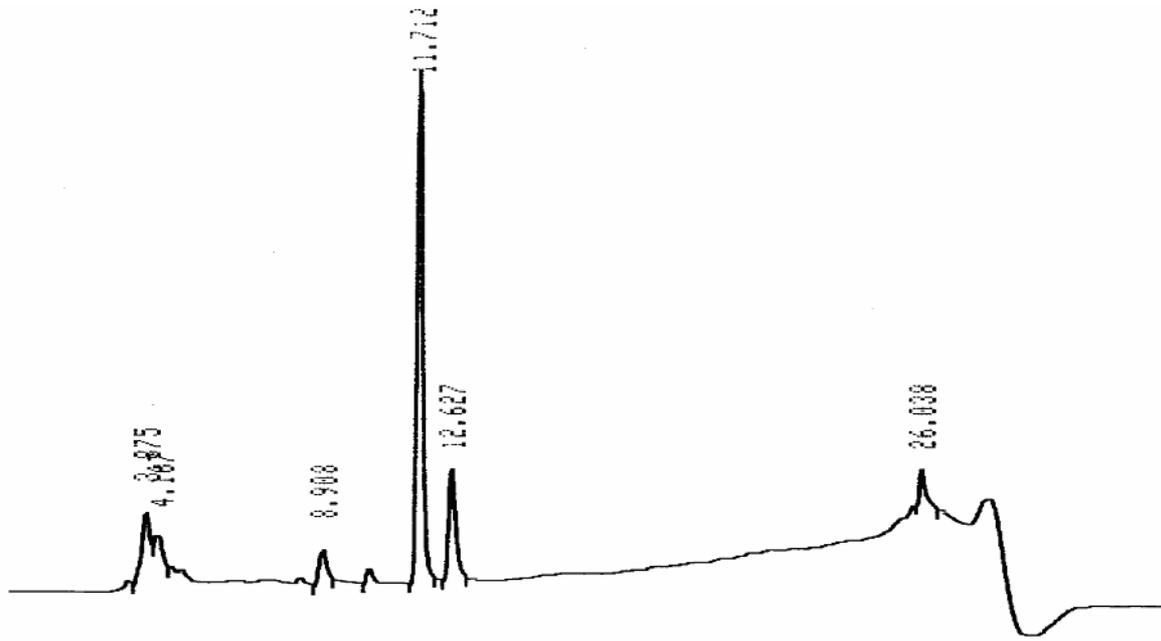


Abb. 4.12 HPLC-Chromatogramm einer Großinkubation mit Benzoyl-CoA, Detektion bei 257,0 nm

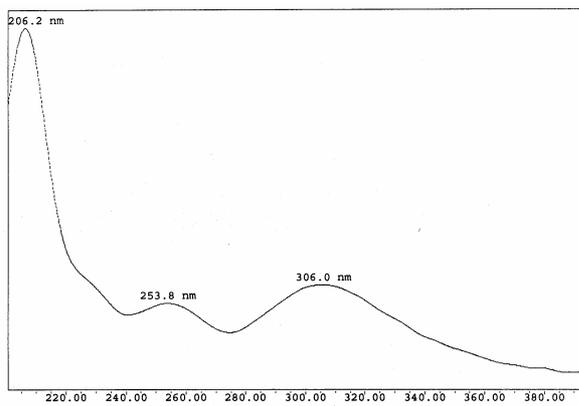


Abb. 4.13 UV- Spektrum des Peaks R_t 8,9 min

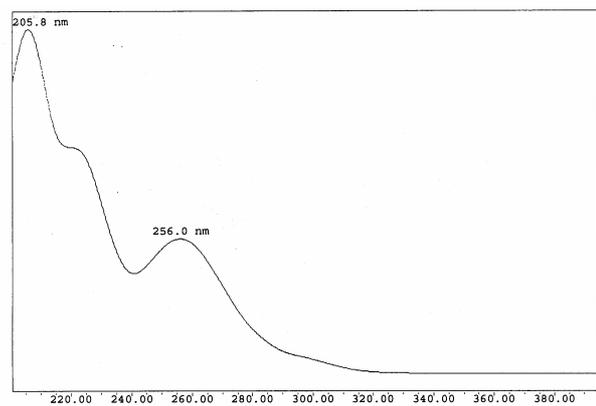


Abb. 4.14 UV-Spektrum des Peaks R_t 11,7 min

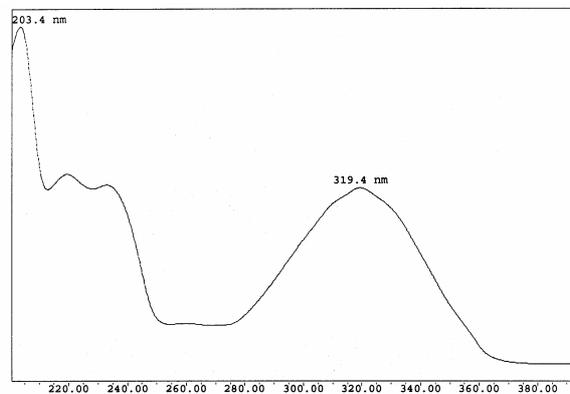


Abb. 4.15 UV- Spektrum des Peaks R_t 12,6 min

4.7.1.1 ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 8,9 min mit Benzoyl-CoA

Da eine eindeutige Identifizierung der enzymatischen Produkte durch die UV Spektren allein nicht möglich war, wurden die übrigen 50,0 μ l der obigen Probe zur weiteren Identifizierung der Molekülmassen und zur Strukturaufklärung in eine HPLC injiziert, die an eine ESI-MS (3.3.4) gekoppelt war. Anhand der MS-Spektren wurden die Produkte der mit Benzoyl-CoA als Startersubstrat inkubierten BIS eindeutig identifiziert. Das MS-Spektrum des ersten Peaks zeigte ein Molekulargewicht von 230 g/mol, welches der Masse des 2,4,6-Trihydroxybenzophenons entspricht (Abb. 4.16). Da auch das UV-Spektrum der vorliegenden Referenz (Abb. 4.17) mit dem Produktspektrum (Abb. 4.13) übereinstimmte, kann das Produkt als Phlorbenzophenon identifiziert werden (Abb. 4.18).

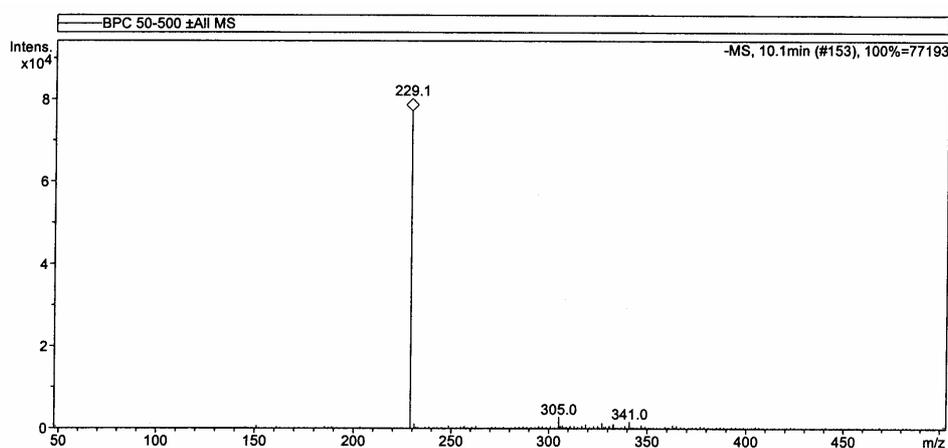


Abb. 4.16 ESI-MS-Spektrum des Produktpeaks bei R_t 8,9

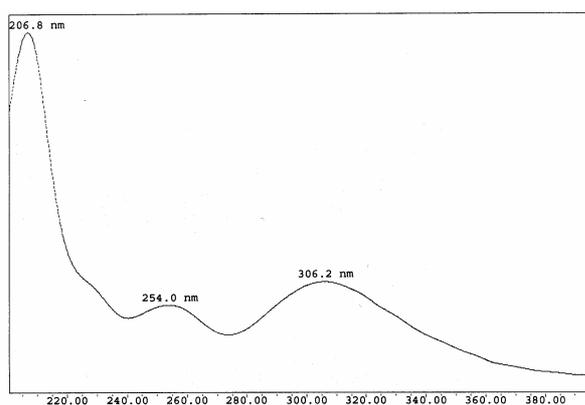
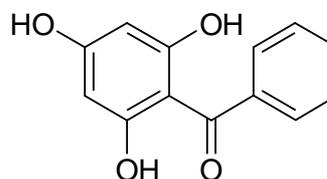


Abb. 4.17 UV-Spektrum der Referenzsubstanz 2,4,6-Trihydroxybenzophenon



$$M = 230 \text{ g/mol}$$

Abb. 4.18 Strukturformel des 2,4,6-Trihydroxybenzophenons

4.7.1.2 ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 11,7 min mit Benzoyl-CoA

Wie schon erwartet, wies das ESI-Massenspektrum für den zweiten Peak mit 186 g/mol die Masse des 3,5-Dihydroxybiphenyls auf (Abb. 4.19). Durch diese zusätzliche Untersuchung wurde die Identität des Hauptproduktes erneut bestätigt.

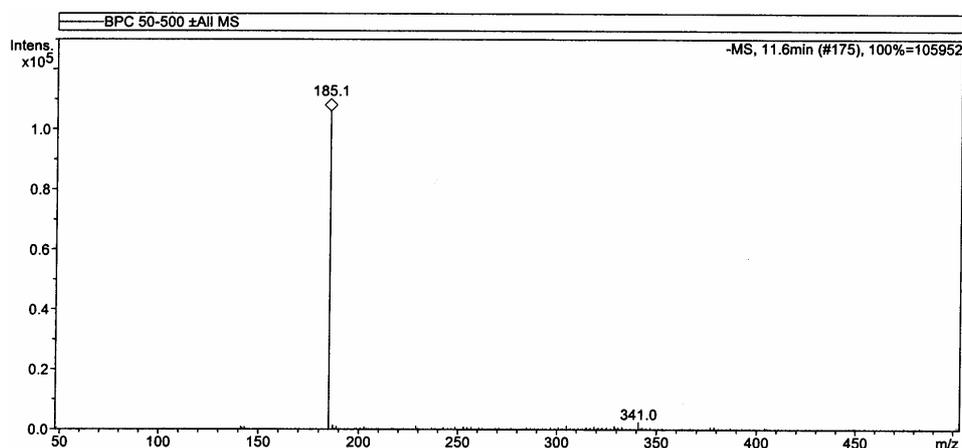
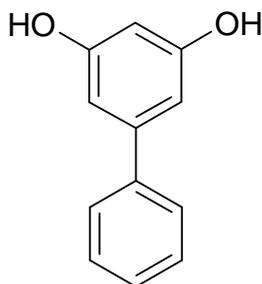


Abb. 4.19 ESI-MS Spektrum des Produktpeaks bei R_t 11,7



$$M = 186 \text{ g/mol}$$

Abb. 4.20 Strukturformel des 3,5-Dihydroxybiphenyls

4.7.1.3 ESI-MS-Analyse des Peaks R_t 12,6 mit Benzoyl-CoA

Dem dritten Peak im Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 12,6 min wurde durch die ESI-MS-Analyse eine Masse von 188 g/mol zugeordnet (Abb. 4.21). In Veröffentlichungen (Liu et al., 2003, Abe et al., 2004) wurde bereits beschrieben, dass PKS dazu neigen, die Kondensationsreaktionen der Kettenverlängerung mit Acetyleinheiten auf verschiedenen Ebenen abubrechen. Aus den so resultierenden Intermediaten entstehen durch eine anschließende Cyclisierungsreaktion im Säuren stabile Laktone, die als Nebenprodukte der eigentlichen enzymatischen Reaktion detektiert werden können. Die oben angegebene Masse von 188 g/mol deutete auf die Bildung des Benzoyldiacetat-Laktone hin, das nach zweifacher

Kettenverlängerung von Benzoyl-CoA mit Malonyl-CoA entstand. Da der Arbeitsgruppe auch für dieses 6-Phenyl-4-hydroxy-2*H*-pyran-2-on die entsprechende Referenz zur Verfügung stand, konnte anhand des UV-Spektrums und des MS-Spektrums die Identität des Nebenproduktes bestätigt werden (Abb. 4.21 – 4.23)

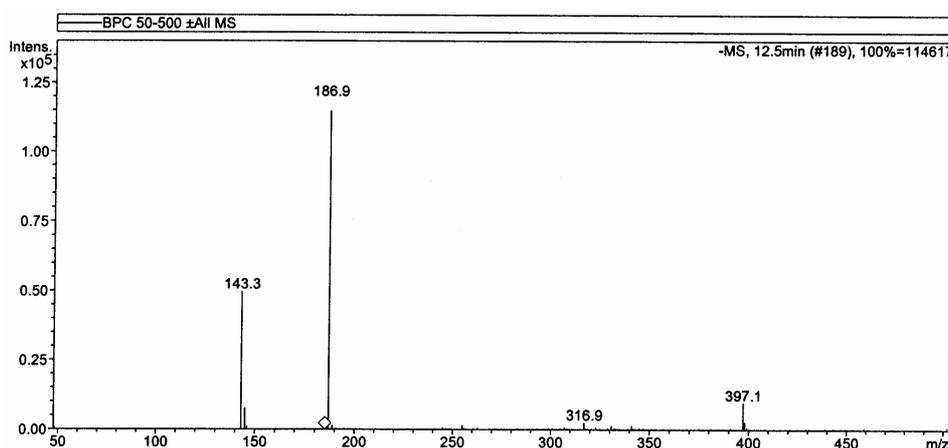


Abb. 4.21 ESI-MS Spektrum des Produktpeaks bei R_t 12,6

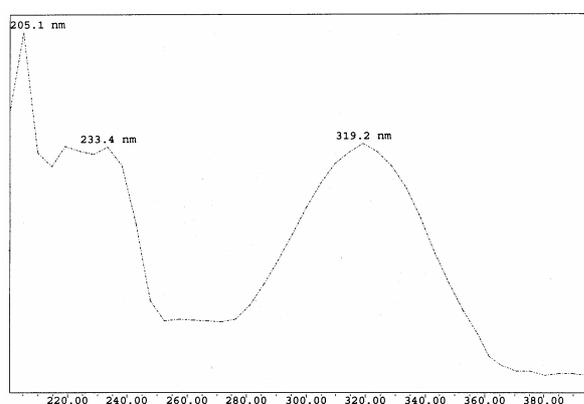


Abb. 4.22 UV-Spektrum der Phenylpyron-Referenz

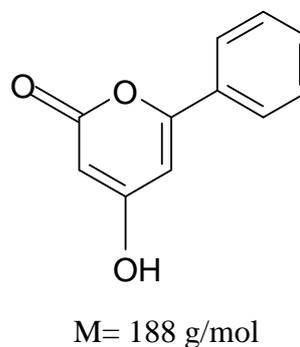


Abb. 4.23 Strukturformel des Phenylpyrons

4.7.2 Analyse der Produkte mit *meta*-Hydroxybenzoyl-CoA

Für die Analyse der *meta*-Hydroxybenzoyl-CoA-haltigen Inkubationen wurden die getrockneten Ethylacetatphasen in 100,0 μ l wässrigem Methanol (50 %) gelöst und ein Aliquot von 50,0 μ l mittels HPLC (3.3.2) analysiert. Das Chromatogramm zeigte einen enzymatischen Produktpeak mit einer Retentionszeit von 11,2 min (Abb. 4.24). Mit Hilfe des zugehörigen UV-Spektrums (Abb. 4.26) war keine eindeutige Identifizierung des Produktes

möglich, so dass die restlichen 50,0 μl des obigen Ansatzes mit Hilfe der ESI-MS (3.3.4) untersucht wurden. Das resultierende Massenspektrum wies ein Molekulargewicht von 204 g/mol aus (Abb. 4.25), welches der Masse des 6-Phenyl-3',4-dihydroxy-2*H*-pyran-2-ons entsprechen würde. Eine Co-Chromatographie und der Vergleich der UV-Spektren (Abb. 4.27) einer kommerziell erworbenen Referenz und des Produktes belegten die Identität des Laktons. Die kleineren Peaks im Chromatogramm bei R_t 6,7 min und R_t 10,0 min zeigten in der ESI-MS Analyse kein aussagekräftiges Massenspektrum.

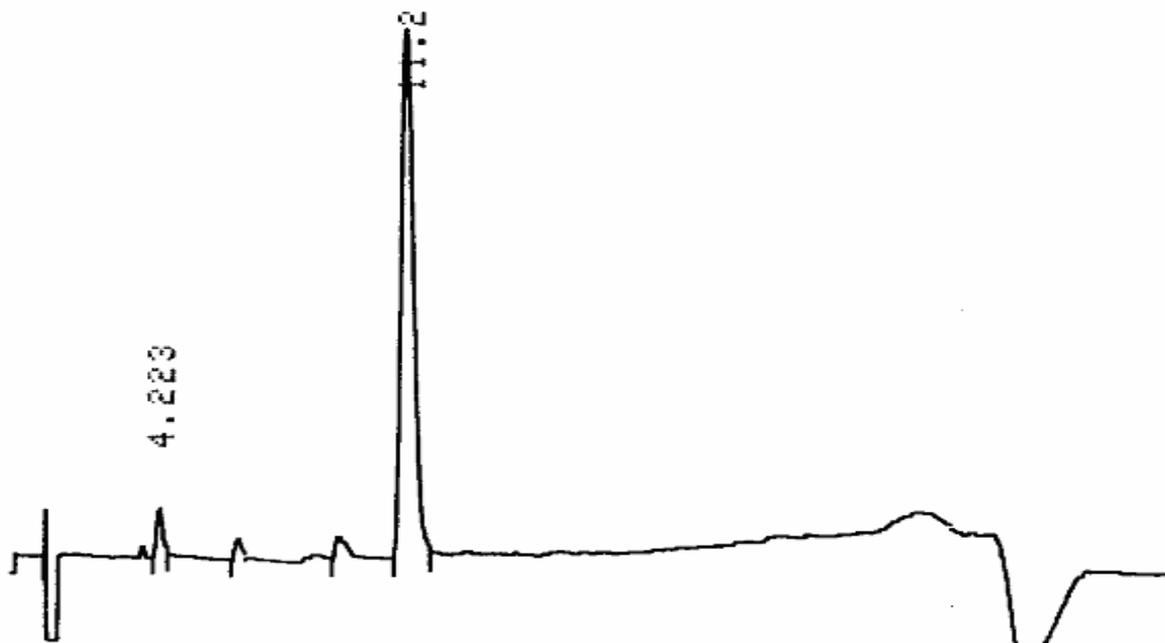


Abb. 4.24 HPLC-Chromatogramm der Großinkubation mit *m*-Hydroxybenzoyl-CoA, Detektion bei 324,0 nm

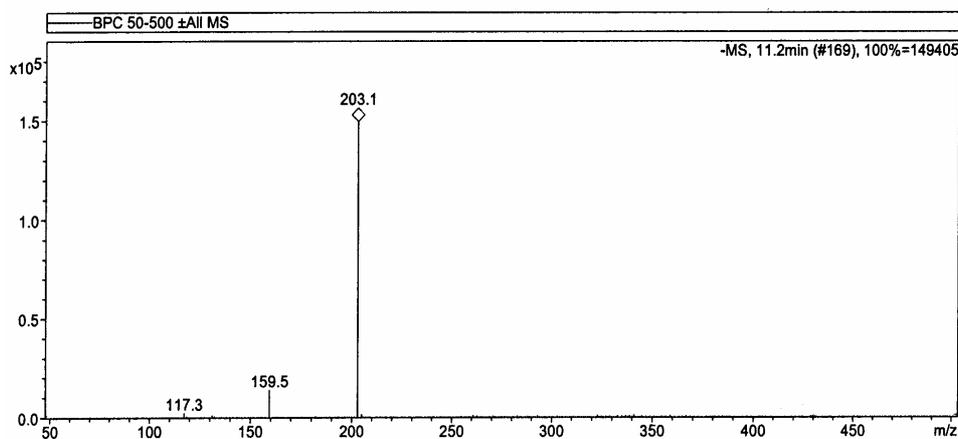


Abb. 4.25 ESI-MS Spektrum des Produktpeaks R_t 11,2 min

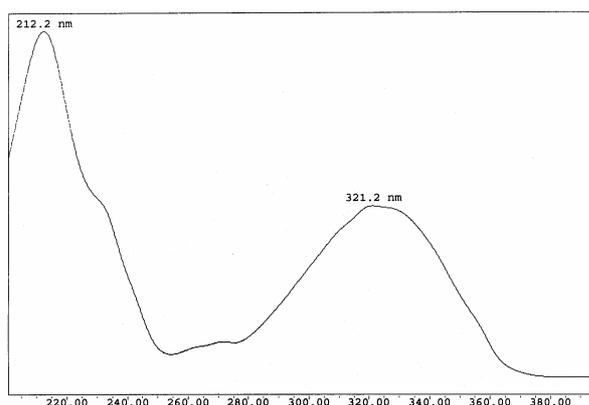
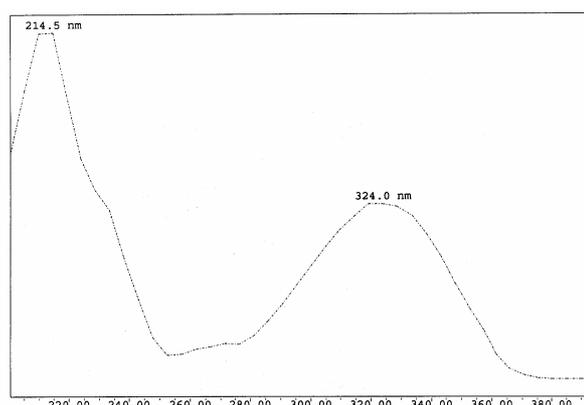
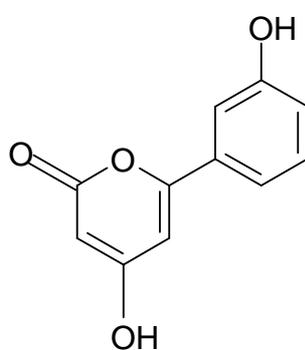
Abb. 4.26 UV-Spektrum des Peaks R_t 11,7 min

Abb. 4.27 UV-Spektrum der 3',4-Dihydroxyphenylpyron Referenz



M = 204 g/mol

Abb. 4.28 Strukturformel des 3',4-Dihydroxyphenylpyrons

4.7.3 Analyse der Produkte mit *ortho*-Hydroxybenzoyl-CoA

Für die Analyse der *ortho*-Hydroxybenzoyl-CoA-haltigen Inkubationen wurden die getrockneten Ethylacetatphasen in 100,0 μ l wässrigem Methanol (50 %) gelöst und ein Aliquot von 50,0 μ l mittels HPLC (3.3.2) analysiert. Das Chromatogramm zeigte einen enzymatischen Produktpeak mit einer Retentionszeit von 13,3 min (Abb. 4.29). Den anderen Peaks im Chromatogramm konnte kein enzymatischer Ursprung nachgewiesen werden. Auch bei dieser Inkubation war eine eindeutige Identifizierung mit Hilfe des UV-Spektrums (Abb. 4.31) nicht möglich, so dass die restliche Probe mittels einer ESI-MS-Analyse untersucht wurde. Die ermittelte Masse von 162 g/mol (Abb. 4.30) entsprach nicht dem erwarteten *o*-hydroxylierten Biphenyl. Wie zuvor bei den Inkubationen mit Benzoyl-CoA und *meta*-Hydroxybenzoyl-CoA wurde auch ein Laktone erwartet (Liu et al., 2004), das durch eine zweifache Kettenverlängerung des Startersubstrats mit Malonyl-CoA und anschließender Cyclisierung hervorgeht. Aufgrund der geringen Masse musste aber davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Produkt um eine Verbindung handelte, die nur aus einer

einfachen Kettenverlängerung hervorging. Ausgehend von dieser Annahme wurde eine BIS-katalysierte Biosynthese entwickelt (Abb. 4.33). Nach dieser These handelte es sich bei dem gebildeten Produkt um das 4-Hydroxycumarin. Da diese Substanz als authentische Referenz (Sigma Aldrich) zu erwerben war, wurde zur Identifizierung eine vergleichende GC-MS-Analyse (3.3.3) mit der Referenz und einer erneuten Inkubation (3.3.4.2) der BIS I mit *ortho*-Hydroxybenzoyl-CoA durchgeführt. Dazu wurden die Referenz und das getrocknete enzymatische Produkt mittels MSTFA derivatisiert und die Proben in die GC-MS-Anlage injiziert. Der Abgleich der identischen Massenspektren bestätigte, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt tatsächlich um das 4-Hydroxycumarin handelte (Abb. 4.34 a,b). Zusätzlich wurde eine Co-Chromatographie durchgeführt, welche die Identität des 4-Hydroxycumarins erneut belegte.

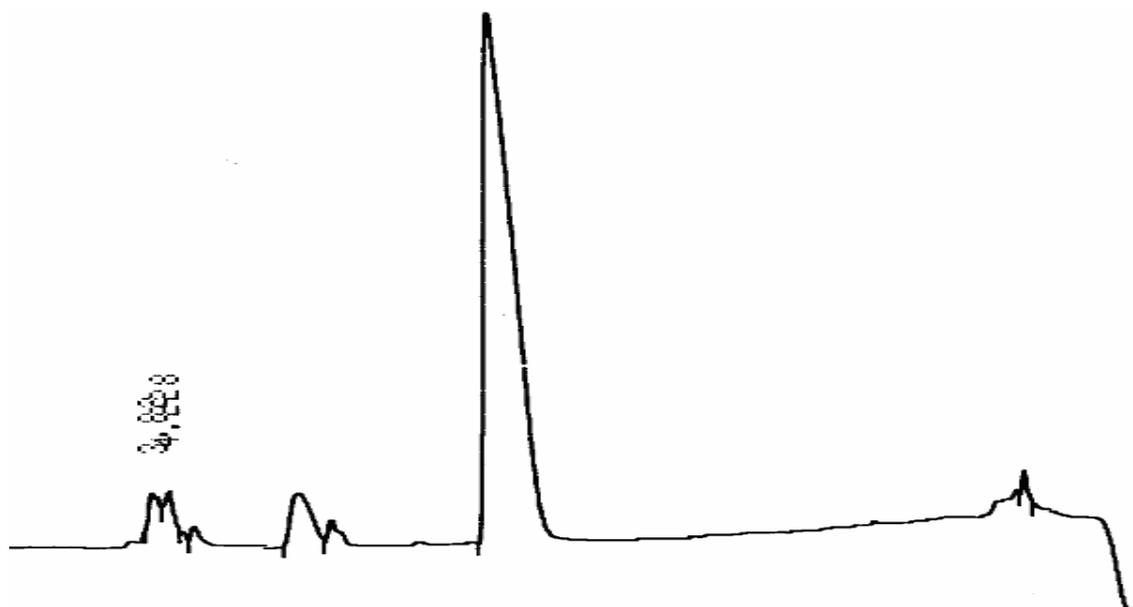


Abb. 4.29 HPLC-Chromatogramm der Großinkubation mit *o*-Hydroxybenzoyl-CoA, Detektion bei 281,0 nm

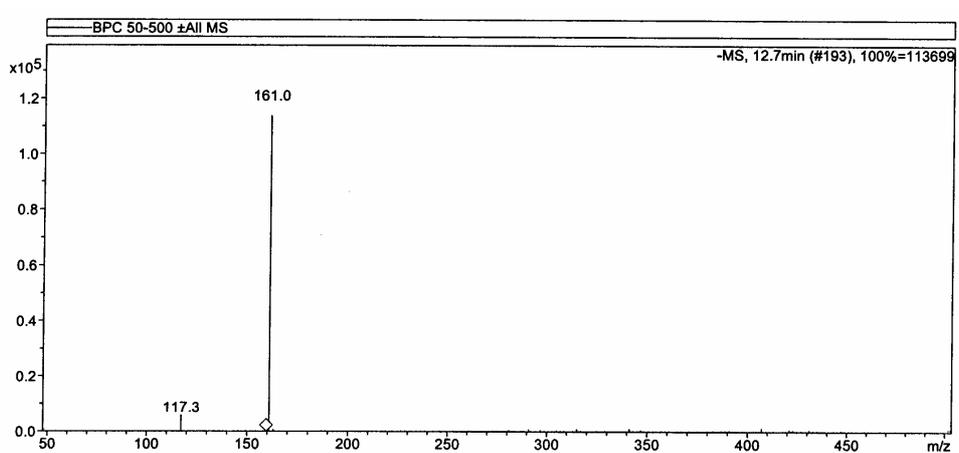


Abb. 4.30 ESI-MS-Spektrum des Produktpeaks bei R_t 13,3 min

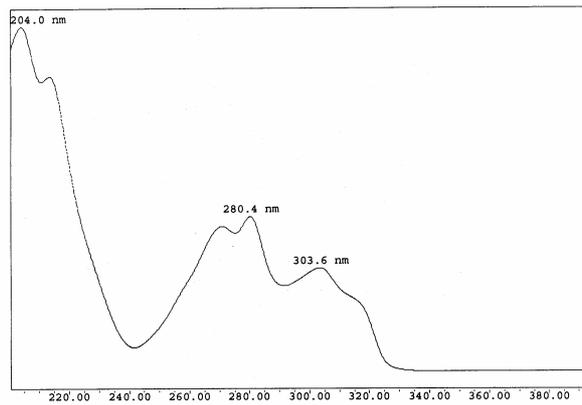


Abb. 4.31 UV-Spektrum des Produktpeaks bei 13,3 min

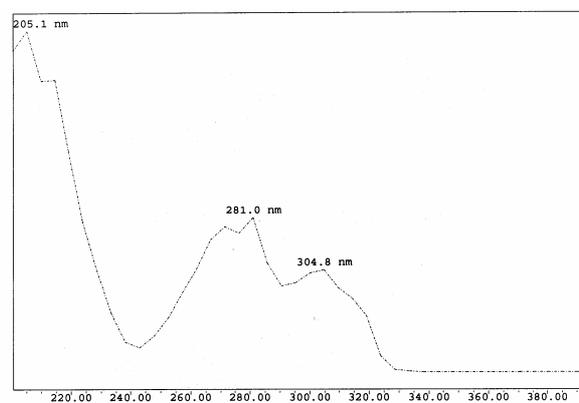
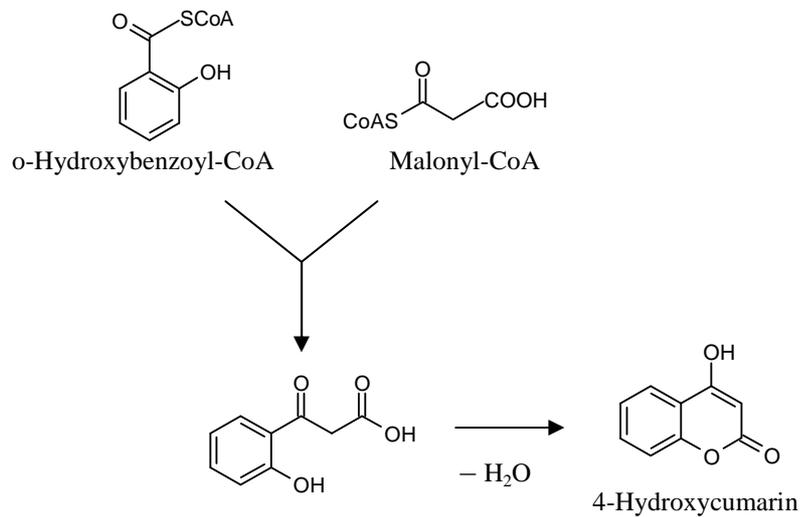
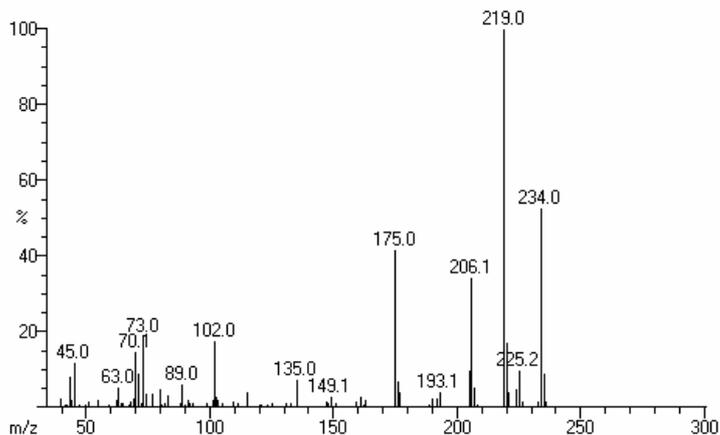


Abb. 4.32 UV-Spektrum der 4-Hydroxycumarin-Referenz

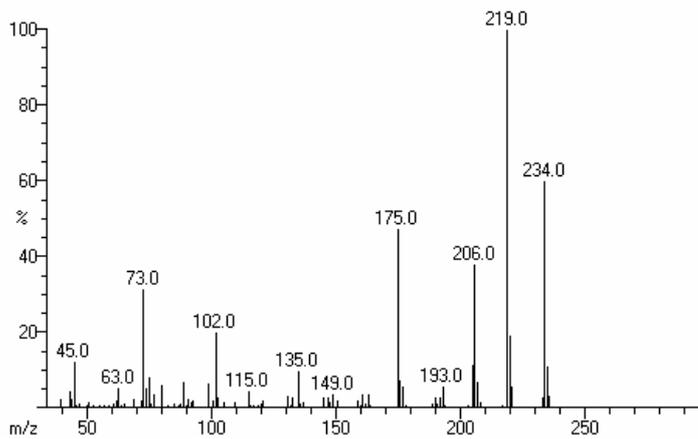
Abb. 4.33 BIS-katalysierte Umsetzung von *o*-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA zum Diketidlakton

FUGU01731
ortho-Dh-BenzCoA, enzymatic Products, EtOAc-extract, +MSTFA, s
Scan: 412-413(403-410) TIC=5278940 Base=5.8%FS #ions=288 RT=18.26



a) GC-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes mit *o*-Hydroxybenzoyl-CoA

FUGU01712
4-OH-Coumarin, + MSTFA, s 1:10
Scan: 713-715(705-711) TIC=67451080 Base=68.1%FS #ions=270 RT=18.3



b) GC-MS-Spektrum der 4-Hydroxycoumarin-Referenz

Abb. 4.34 GC-MS-Analyse des enzymatischen Produktes mit *o*-Hydroxybenzoyl-CoA (a) und der authentischen Referenz 4-Hydroxycoumarin (b), jeweils nach Trimethylsilylierung

4.8 Aufreinigung BIS I für die Proteinkristallisierung

Nach der Charakterisierung der BIS I sollte das Enzym kristallisiert werden, um die Raumstruktur und die Vorgänge während der Kettenverlängerung und der Cyclisierung besser zu verstehen. Da für die Kristallisierung besondere Anforderungen an die Reinheit (ca. 98 %, was einer Einzelbande des aufgereinigten Proteins im Coomassie-gefärbten SDS-Gel entspricht) und die Konzentration (10,0 mg/ml oder mehr) des Proteins gelten, musste ein Aufreinigungssystem entwickelt werden, das diese Bedingungen erfüllte. Wie in 4.2 beschrieben codiert der pRset B Vektor für ein Fusionspeptid, das am N-Terminus des Proteins mitexprimiert wird. In dieses Fusionspeptid eingelagert liegt ein Polyhistidinrest, der aufgrund seiner Affinität zu Nickel dazu diente, die BIS I mittels Ni-NTA Agarose aufzureinigen. Die Testexpressionen (3.1.12) wurden in einem Volumen von 100,0 ml LB Medium mit einer Induktionszeit von 20,0 h durchgeführt. Die Zellen wurden geerntet und nach 3.2.1.1 der Affinitätschromatographie unterzogen. Die Eluate wurden aufgefangen und der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Die Reinheit des Enzyms wurde mittels SDS-PAGE (3.2.3.2) überprüft (Abb. 4.35).

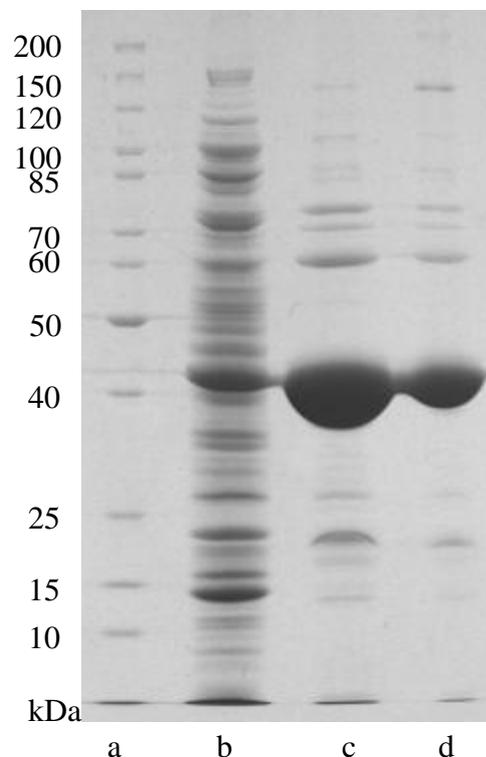


Abb. 4.35 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der einfach über Ni-NTA aufgereinigten BIS I. a) Proteinleiter, b) Protein vor der Aufreinigung (15,0 µg), c) aufgereinigtes Protein (15,0 µg), d) aufgereinigtes Protein (7,5 µg)

Das Gel zeigt neben dem gewünschten Protein in hoher Konzentration auch dünne Banden an Fremdproteinen. Deshalb wurde das vereinigte Eluat nach 3.2.4.2 mit PD 10 Säulen in Lysispuffer umgepuffert. Um das restliche ungewünschte Protein zu entfernen, wurde die BIS I erneut der Affinitätschromatographie nach 3.2.1.1 unterworfen. Wieder erfolgte die Kontrolle der Reinheit mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (3.2.3.2) (Abb. 4.36).

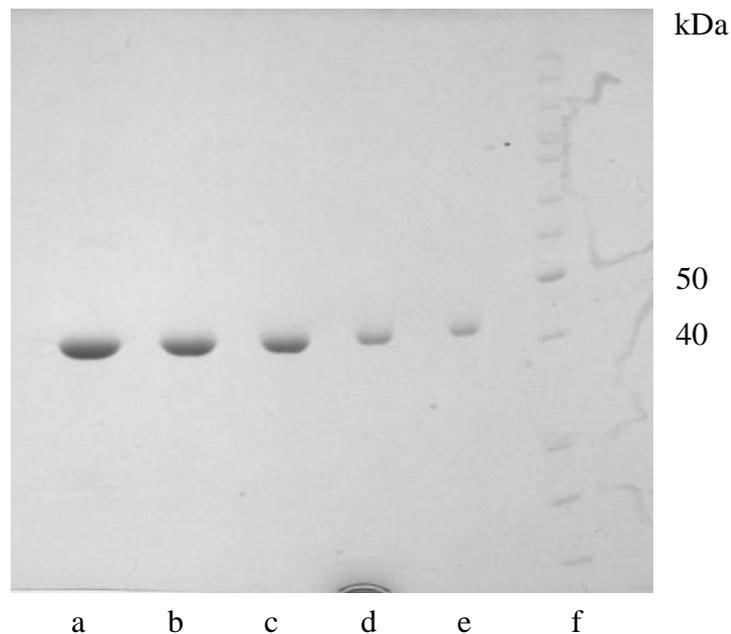


Abb. 4.36 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der zweimal über Ni-NTA aufgereinigten BIS I, a-e) 10,0 µg, 8,0 µg, 6,0 µg, 4,0 µg bzw. 2,0 µg des aufgereinigten Proteins f) Proteinleiter

Auch die Silberfärbung (3.2.3.3) der SDS-Gele wurde zur Überprüfung der Reinheit angewandt. Da dieses System viel sensibler ist als die sonst übliche Coomassie-Färbung, ließen sich Unreinheiten durch Fremdprotein viel besser detektieren (Abb. 4.37).

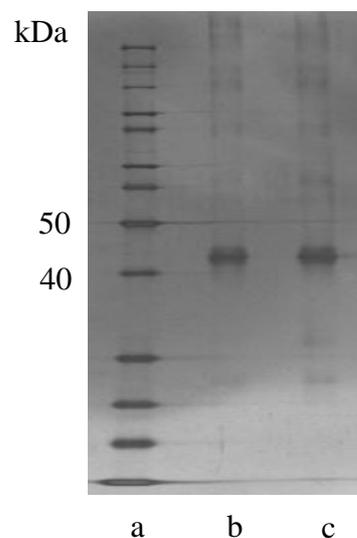


Abb. 4.37 SDS-PAGE und Silbernitratfärbung der zweimal über Ni-NTA aufgereinigten BIS I, a) Proteinleiter, b) BIS I 0,25 µg, c) BIS I 0,5 µg

Um sicherzustellen, dass nach der aufwendigen Proteinreinigung die Aktivität der BIS I nicht verloren gegangen ist, wurde eine Inkubation nach 3.3.1 mit 2,0 μg Protein durchgeführt. Anhand des R_f -Wertes und des zugehörigen UV Spektrums wurde die enzymatische Aktivität der BIS I bestätigt (Abb. 4.38).

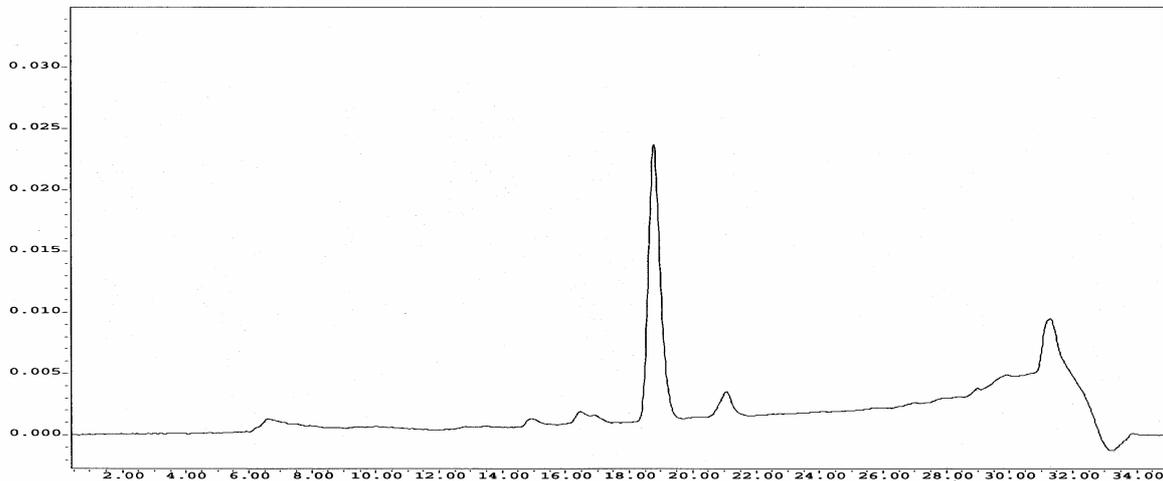


Abb. 4.38 HPLC –Analyse eines Enzymansatzes mit doppelt aufgereinigter BIS

4.9 Puffer-Screening für BIS I mit His-Tag

Da für die Kristallisierung hochkonzentrierte Proteinlösungen benötigt werden, wurden die Expressionsansätze auf 1600 ml Bakteriensuspension ausgeweitet. Die Induktionszeit mit IPTG wurde auf 20,0 h festgesetzt und das in 4.8 beschriebene Aufreinigungssystem für das Enzym angewandt. Um sicherzustellen, dass das Protein in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurden die Expressionen an vier Tagen hintereinander wiederholt. Aufgereinigtes Protein wurde mit 20 % Glycerol versetzt und bei $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die vereinigten Proteinfractionen wurden mit der Hilfe von Zentrifugenkonzentratoren (3.2.4.2) in 10 mM Tris/HCl Puffer (2.1.5) umgepuffert und aufkonzentriert. Mit der Proteinquantifizierungsmethode nach Bradford (1976) (3.2.2) wurden die Durchläufe der Konzentratoren auf die weitgehende Abwesenheit von Protein überprüft. Die Reinheit der konzentrierten Proteinlösung wurde mittels der SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung überprüft (Abb. 4.39).

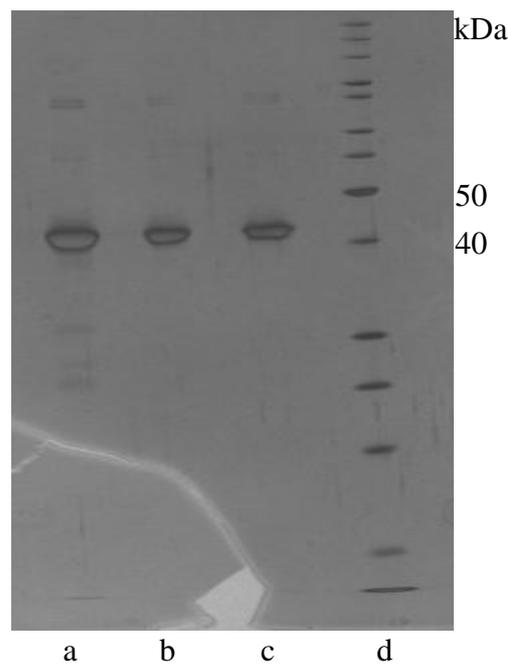


Abb. 4.39 SDS-PAGE und Silbernitratfärbung der für das Puffer-Screening aufgereinigten BIS I, a-c) 1,0 µg, 0,75 µg bzw. 0,5 µg, d) Proteinleiter

Die nach Bradford (1976) (3.2.2) ermittelte Endkonzentration der Lösung lag bei 12,06 mg/ml. Diese Lösung wurde für das erste Puffer-Screening nach 3.4.1.1 verwendet. Die Kristallisationsversuche fanden in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Institut für Physikalische Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt. Durch Dampfdiffusionsprozesse zwischen dem Kristallisationspuffer und der Proteinstammlösung sollte es zu einer Unterschreitung der Löslichkeitsgrenze des Proteins kommen, was unter optimalen Bedingungen zu einer Bildung von kleinen Proteinkristallen führt. Leider war eine Kristallisierung der BIS I im ersten Screening nicht möglich. In den angesetzten Kristallisationsplatten bildeten sich nur wolkenartige Präzipitate, aus denen keine Kristalle wuchsen. Als Ursache für die nicht erfolgte Kristallisation wurde angenommen, dass dafür die Lagerung des Proteins bei $-20,0\text{ °C}$ unter Zusatz von Glycerin verantwortlich sei. Aus späteren Aktivitätstests wurde bekannt, dass die in imidazolhaltigen Puffern eingefrorene BIS I schon nach *einem* Auftauzyklus eine verringerte enzymatische Aktivität besaß und somit ein Teil des Proteins denaturiert sein musste. Da schon kleine Mengen an denaturiertem Protein einen negativen Einfluss auf die Kristallisation haben, wurden die Expressionen und die anschließende Proteinaufreinigung über vier Tage wiederholt. Abweichend zu der vorherigen Aufreinigung wurde das Protein bei $4,0\text{ °C}$ auf Eis gelagert, um ein Einfrieren der

Lösung zu vermeiden. Die Proteinfractionen wurden erneut mit Hilfe der Zentrifugenkonzentratoren umgepuffert und aufkonzentriert. Nach Bradford (1976) (3.2.2) wurde eine Endkonzentration der Proteinlösung von 18.15 mg/ml bestimmt. Die Reinheit des neuen Ansatzes wurde per SDS-PAGE und Silberfärbung (3.2.3.3) überprüft (Abb. 4.40). Die Ansätze für das Screening (3.4.1.1) wurden wieder im Rahmen der obigen Kooperation durchgeführt. Aufgrund der großen Menge an aufgereinigter BIS I war es möglich, neben der hochkonzentrierten Proteinlösung auch eine geringer konzentrierte Proteinlösung gleichzeitig zu screenen. Die Platten zur Kristallisierung wurden bei 13,0 °C gelagert und regelmäßig auf die Anwesenheit von Kristallen überprüft. Leider kam es auch bei diesem Screeningversuch nur zu einer Präzipitat- und zu keiner Kristallbildung.

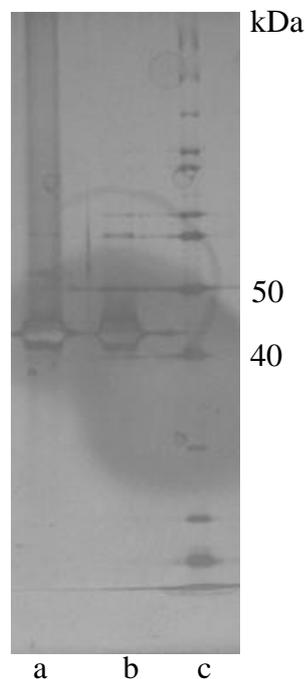


Abb. 4.40 SDS-PAGE und Silberfärbung der für das zweite Screening zweifach aufgereinigten BIS I, a) 0,75 µg, b) 0,5 µg, c) Proteinleiter

4.10 Abspaltung des Polyhistidinrestes

Als ein weiterer Grund für die nicht erfolgte Kristallisation wurde die Anwesenheit des Fusionspeptids mit dem dazugehörigen 6xHistidin-Tag angenommen. Die eingefügten Histidinreste könnten aufgrund ihrer hohen Polarität eine geordnete Proteinaggregation unterbinden. Da das Fusionspeptid selbst über eine Enterokinase-Schnittstelle verfügte, war eine Abspaltung des His-Tag leicht möglich. Neben einer Enterokinasespaltung wurde ein Verdau mit modifiziertem Trypsin durchgeführt (3.2.6.1). Das Trypsin wurde von der AG

Stubbs, Institut für Physikalische Biotechnologie gestellt und war in der Lage, die gleiche Schnittstelle zu erkennen. Zur Überprüfung der Spaltung wurden nach 5, 10, 15, 20, 30 min sowie nach 1,0 h, 2,0 h, 3,0 h, 4,0 h, und 24,0 h Aliquots der Lösung entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.3.2) (Abb. 4.41 u. 4.42).

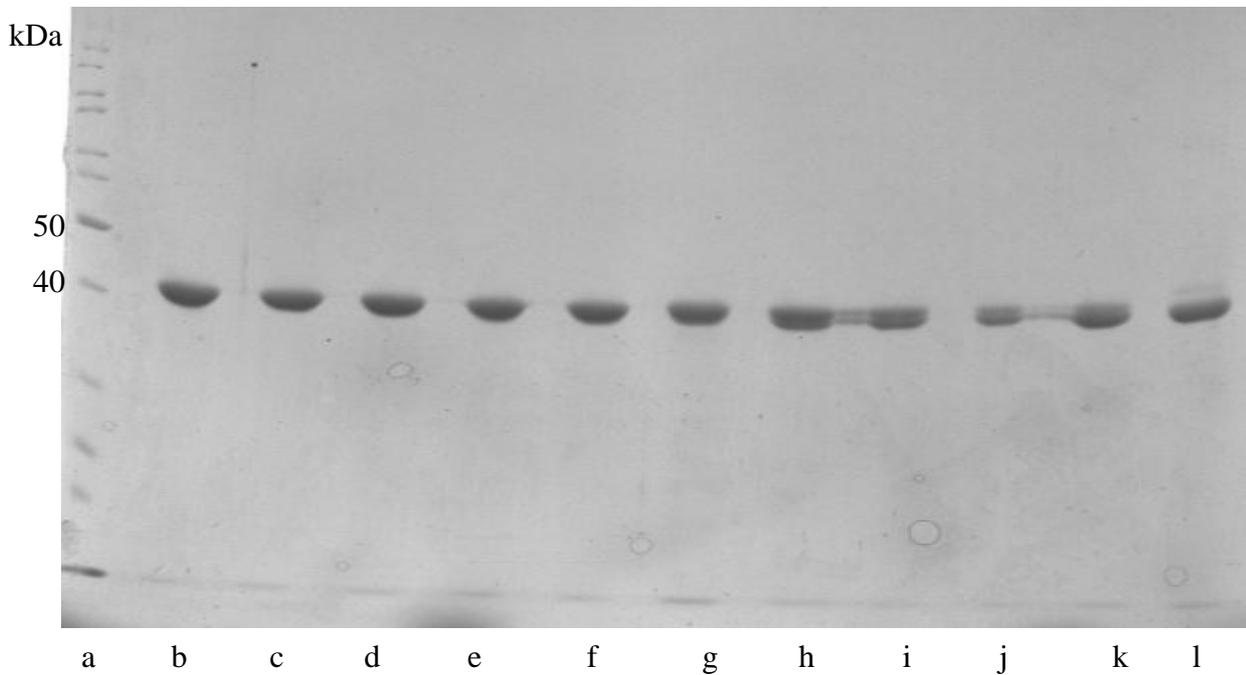


Abb 4.41 SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Enterokinasespaltung, a) Proteinleiter, b) ungespaltenes Protein, c) Spaltung nach 5 min, d) nach 10 min, e) nach 15 min, f) nach 20 min, g) nach 30 min, h) nach 1,0 h, i) nach 2,0 h, j) nach 3,0 h, k) nach 4,0 h, l) nach 24,0 h

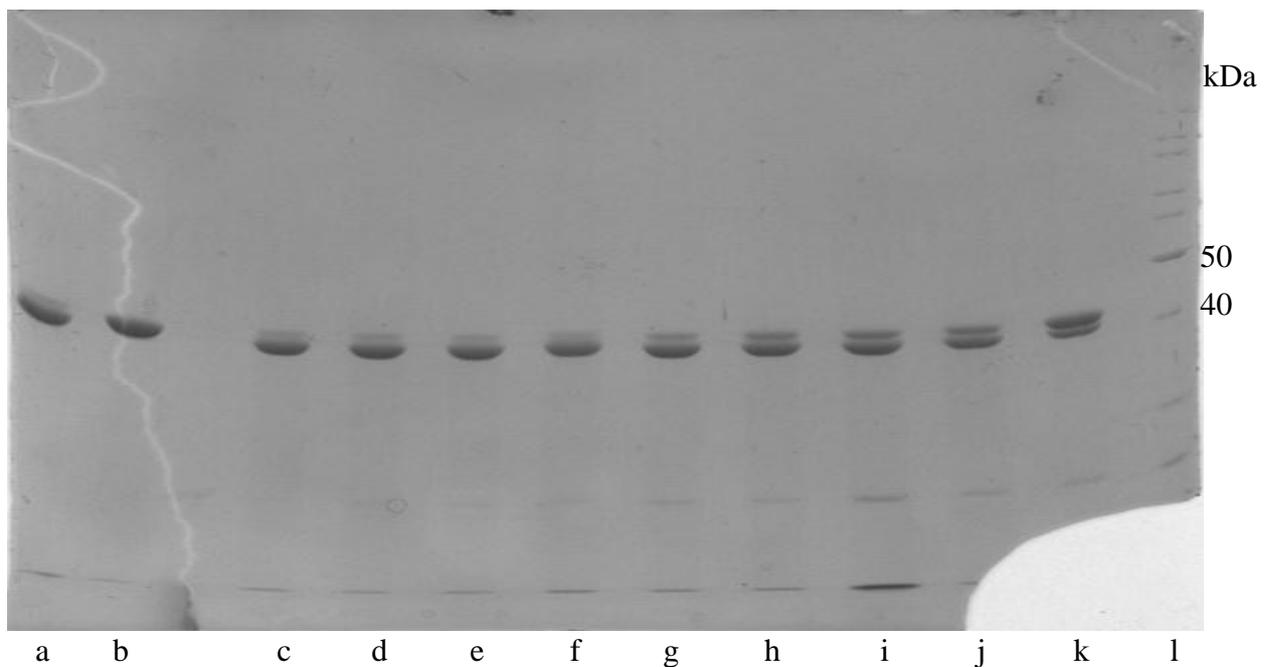


Abb 4.42 SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Trypsinspaltung, a) ungespaltenes Protein, b) Spaltung nach 24,0 h, c) nach 4,0 h, d) nach 3,0 h, e) nach 2,0 h, f) nach 1,0 h, g) nach 30 min, h) nach 20 min, i) nach 15 min, j) nach 10 min, k) nach 5 min, l) Proteinleiter

Die Auswertung der Elektrophoresegele zeigte, dass bei der Enterokinase erst nach vier Stunden und bei der Trypsinvariante die Abspaltung des 6xHis-Tag nach 1,0 h weitestgehend abgeschlossen war. Da die Trypsinvariante selbst über einen nicht abspaltbaren 6xHis-Tag verfügt, konnten nach Umpufferung (3.2.4.2) in Lysispuffer (2.1.3) das Trypsin, nicht gespaltenes Enzym und abgespaltene His-Tags mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose wieder von der BIS I getrennt werden. Die Enterokinase musste aufwendig mit Hilfe der Gelfiltration abgetrennt werden. Daher wurde für die folgenden Aufreinigungen die Spaltung mit Trypsin durchgeführt.

Zur Überprüfung der Enzymaktivität nach der Spaltung wurde eine Inkubation nach 3.3.1 mit 5,0 µg BIS I durchgeführt und vermessen. Die Chromatogramme zeigten nach Auswertung der Produkt-Peakflächen keinen Aktivitätsverlust der gespaltenen BIS I gegenüber dem ungespaltenen Protein (Tab. 4.2).

Tab. 4.2 Peakfläche des von der BIS I vor und nach His-Tag-Abstaltung gebildeten Produkts aus drei unabhängigen Messreihen

BIS I vor Spaltung [Peakfläche]	BIS I nach Spaltung [Peakfläche]
483.295	486.465
512.074	510.911
509.580	515.911

4.11 Puffer-Screening für BIS I ohne His-Tag

Die Gewinnung der Proteinlösung für die Proteinkristallisierung erfolgte in Expressions-Ansätzen (3.1.12) von 1600 ml über vier Tage. Nach der Aufreinigung (3.2.1.1) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) (3.2.2). Für die vorliegende Proteinmenge wurde das entsprechende Massenäquivalent an Trypsin errechnet und die Abspaltung des Polyhistidinrestes (3.2.6.1) über 2,0 h durchgeführt. Die Protein enthaltende Lösung wurde mit Hilfe der Zentrifugenkonzentratoren in 10,0 mM Tris / HCl (2.1.5) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Endkonzentration der Lösung lag bei 11,0 mg/ml und die Reinheit der BIS I wurde mittel SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.43). Das Durchmustern der Kristallisationsbedingungen (3.4.1.1) erfolgte wie oben in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Stubbs in Halle. Nach 14 Tagen bei 13,0° C konnten unter dem Mikroskop neben Präzipitat in

drei Kristallisationspuffern (Tab. 4.3) kleine Kristallisationskeime detektiert werden (Abb. 4.44 a und b). Zum Test, ob es sich bei den vorliegenden Kristallen um Protein oder um ausgefallene Puffersalze handelte, wurden die Kristalle mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse (3.4.2) untersucht. Durch das registrierte Streumuster am Detektor wurden die Kristallisationskeime als Proteinkristalle identifiziert.

Tab. 4.3 Kristallisationspuffer mit positiver Proteinkristallbildung

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additive
2% PEG 400	entfällt	0,1 M Na-HEPES	7,5	2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10% Isopropanol	20% PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	Entfällt
20% PEG 8000	entfällt	0,05 M KH_2PO_4	5,6	Entfällt

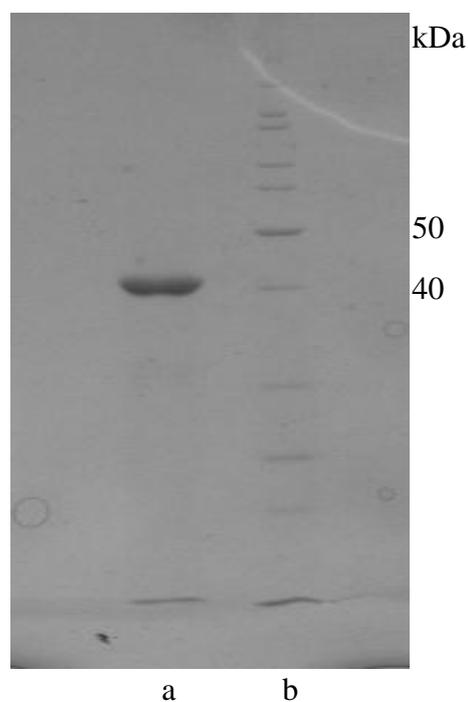


Abb. 4.43 SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überprüfung der Reinheit,
a) BIS I 8,0 μg , b) Proteinleiter

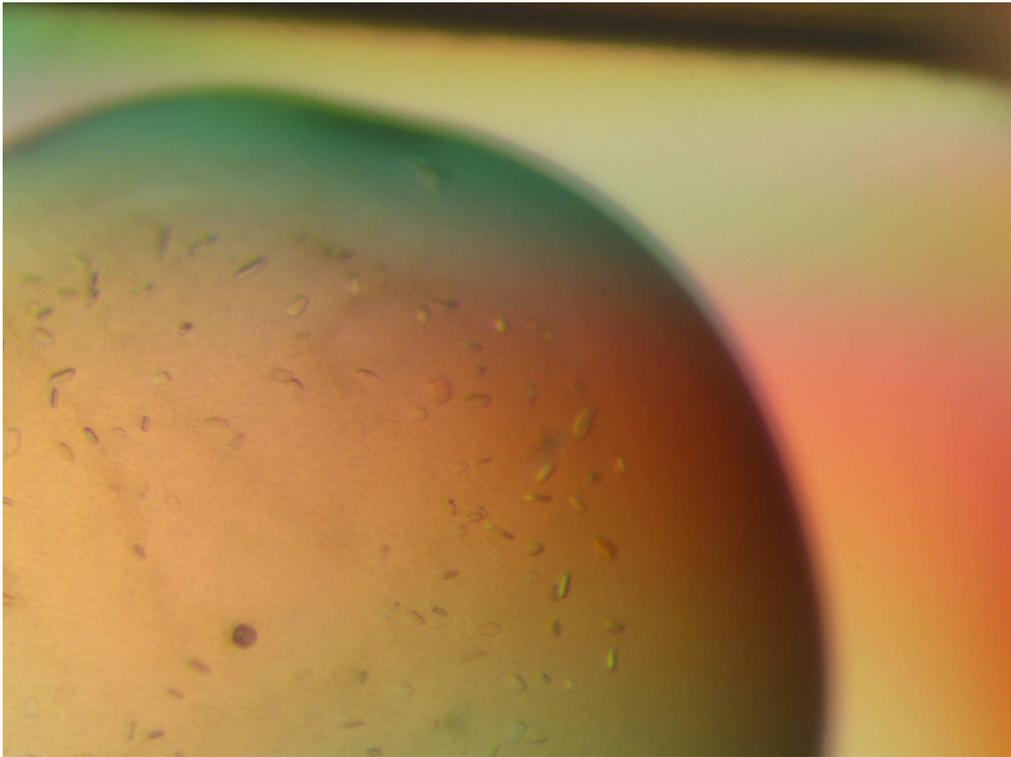


Abb. 4.44 a, Kristallisationskeime der BIS I in PEG 400 / Na-Hepes-Puffer

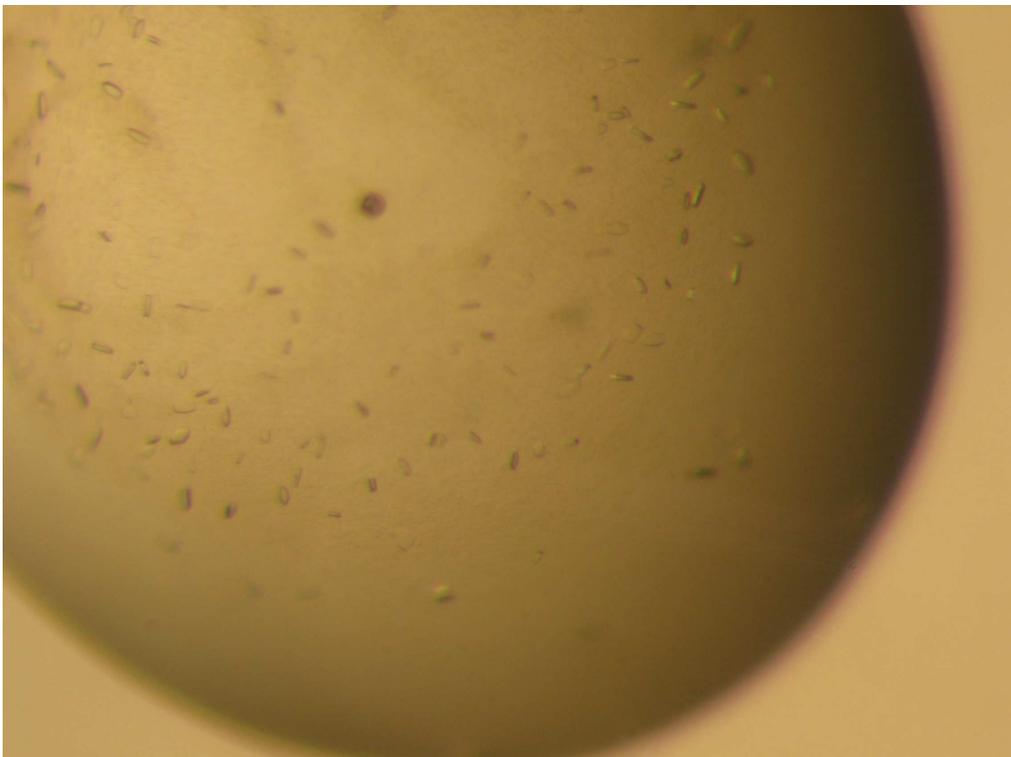


Abb. 4.44 b, Kristallisationskeime der BIS I in PEG 8000 / KH_2PO_4 -Puffer

4.12 Proteinkristalle mit der „hanging drop“ Methode

Nach Festlegung der Kristallisationsbedingungen wurden zur Gewinnung größerer Proteinkristalle, die zur Vermessung der Struktur geeignet wären, Kristallisationsansätze nach der „hanging drop“ Methode (3.4.1.2) angesetzt. Dazu wurde aufgereinigtes und gespaltenes Protein in Konzentrationen von 7,5, 10,0 und 12,5 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (2.1.5) sowie gelöstes Protein mit einer Konzentration von 8,0 mg/ml in 10 mM Na-HEPES verwendet. Als Kristallisationspuffer wurden die in Tab. 4.3 angegebenen Puffer benutzt. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde ein pH-Gradient der Pufferlösungen eingesetzt. Die Na-HEPES Kristallisationspuffer wurden im pH-Bereich von 7,0 - 8,0 verwendet, während der Phosphatkristallisationspuffer im Bereich von pH 5,1 - 6,1 eingestellt wurde. In fast allen Ansätzen bildete sich sofort Präzipitat. Nach 5 Tagen konnte im K-Phosphatpuffer die Bildung von Kristallisationskeimen beobachtet werden (Abb. 4.45 a, b), während die Kristallisierung in Na-HEPES Puffer nicht reproduzierbar war. Da die Kristallbildung unter verschiedenen pH-Werten stattfand, hatte der pH-Gradient offensichtlich keinen Einfluss auf die Kristallisation der BIS I. Leider wuchsen in den Ansätzen der „hanging drop“ Methode viele kleine Kristalle, so dass diese aufgrund ihrer Größe nicht der Röntgenstrukturanalyse zugänglich waren.

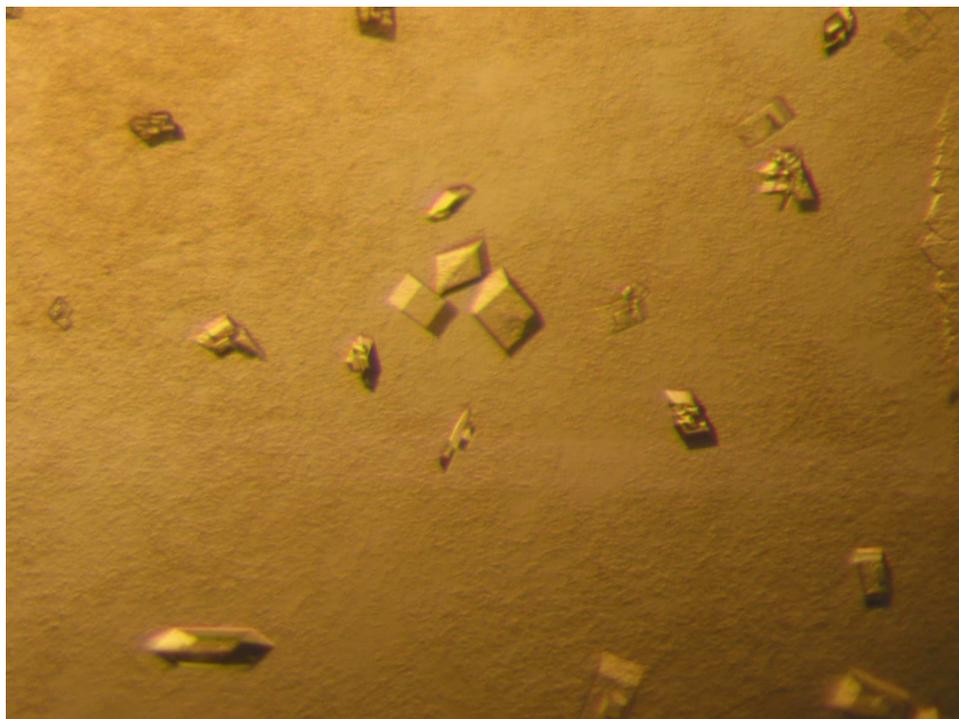


Abb. 4.45 a, BIS I-Kristalle mit der „hanging drop“ Methode in KH_2PO_4 -Puffer pH 5,5

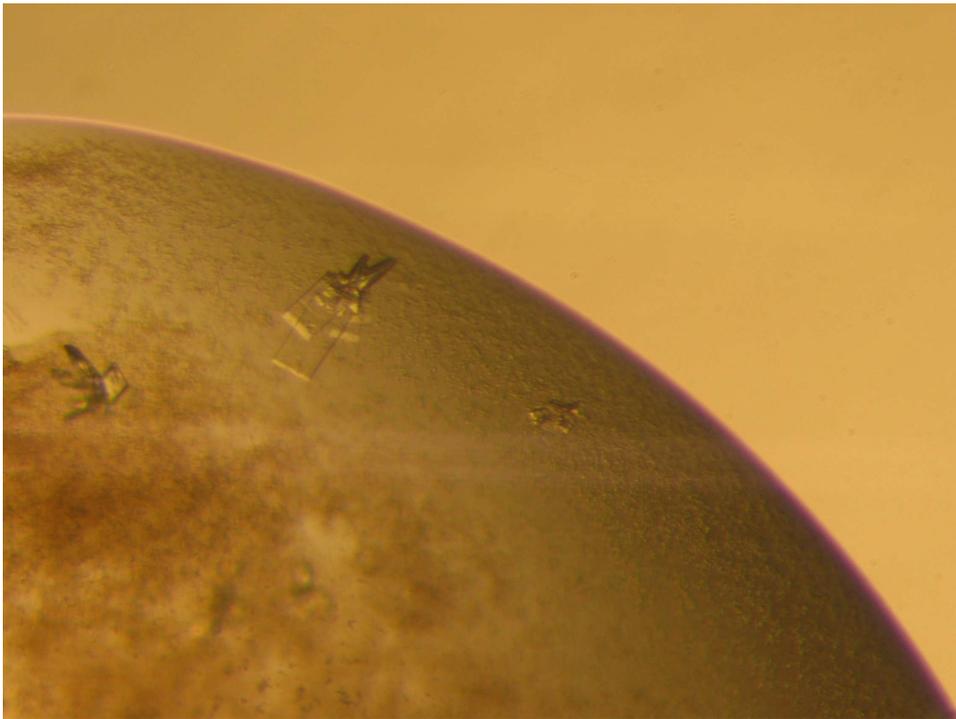


Abb. 4.45 b, BIS I-Kristalle mit der „hanging drop“ Methode in KH_2PO_4 -Puffer pH 5,7

4.13 Kristallseeding

Da die Kristalle zu klein waren, um sie mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse vermessen zu können, wurde das Makro seeding-Verfahren (3.4.1.3) angewandt. Die vorgelegten Kristalle dienten als Kristallisationskeime in der frischen Stammlösung, so dass eine Anlagerung der gelösten Proteine an den vorhandenen Kristall stattfand. Für die neue Stammlösung wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 16,4 mg/ml und 10,4 mg/ml in Na-HEPES Puffer (2.1.5) verwendet. Als Seedingkeime wurden die Kristalle der „hanging drop“ Methode in die neue Kristallisationslösung überführt. Nach zwei Wochen bei 13,0 °C konnten wenige Satellitenkristalle detektiert werden, die von der Größe her der Röntgenstrukturanalyse zugänglich waren (Abb. 4.46).

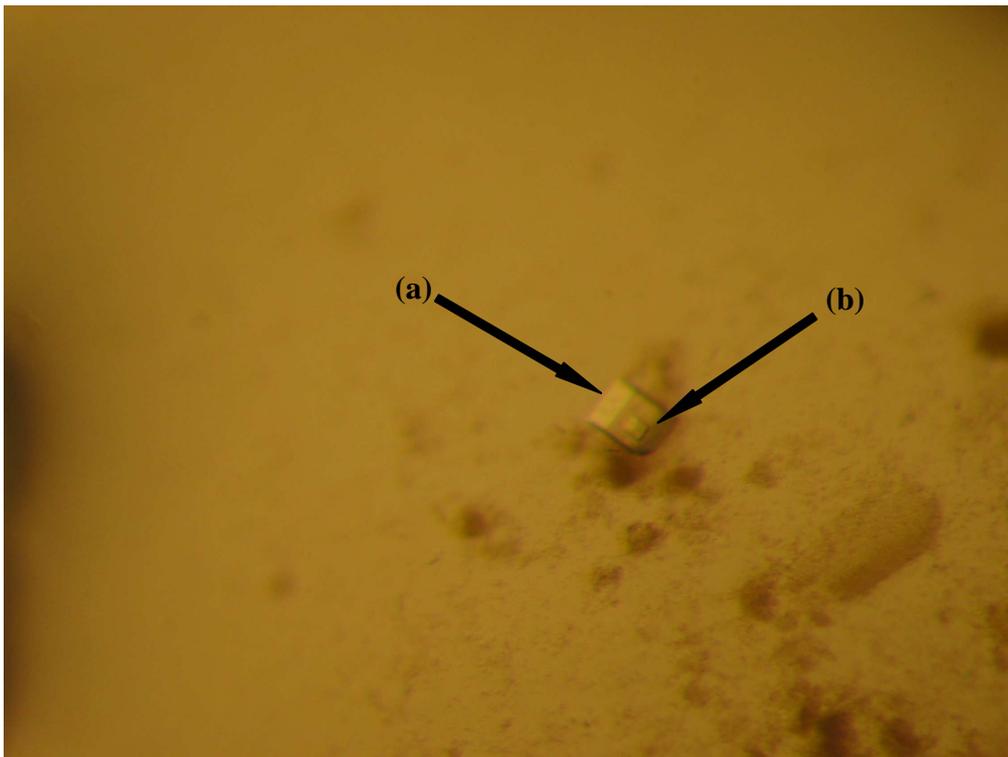


Abb. 4.46 BIS I-Satellitenkristall. Der große Kristallkörper (Pfeil a) entsteht durch Anlagerung neuer Proteinmoleküle, der oben liegende Satellit (Pfeil b) ist der in neue Stammlösung überführte Seedingkristall

4.14 Kristallisierung in Gegenwart von Substraten und Produkt

Zur Festlegung der Kristallstruktur im Komplex mit den Starter-CoA-Estern bzw. dem Produkt wurden Versuche nach 3.4.2 durchgeführt. Für die Kristallisierung wurde eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 16,4 mg/ml verwendet, als Substrate wurden das Malonyl-CoA und das Benzoyl-CoA in Wasser bidest. gelöst und in einem Massenverhältnis von 1:1 der Proteinlösung zugesetzt. Neben den Substraten wurde auch das 3,5-Dihydroxybiphenyl als Produkt der enzymatischen Reaktion für das Wachstum von Co-Kristallen verwendet. Zur Kristallisation wurde die „sitting drop“ Methode (3.4.1.1) angewandt. Als Kristallisationspuffer wurden die kommerziell erhältlichen Puffer nach 2.1.5 eingesetzt. Nach drei Wochen bei 13,0 °C konnten erste Kristallisationskeime bei den Screeningplatten mit Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA detektiert werden (Abb. 4.47 a,b). Die Kristallkeime mit Malonyl-CoA bildeten sich in 30% PEG 1500 Puffer, während die Co-Kristalle des Benzoyl-CoA-Esters in einem 30% PEG 5000, 0,1 M Na-MES, 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Puffer wuchsen. Leider konnte aufgrund der geringen Größe der Proteinkristalle keine Strukturanalyse mittels Röntgenbeugungsanalyse durchgeführt werden. Weitere

Versuche mit der „hanging drop“ Methode zur Co-Kristallisierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

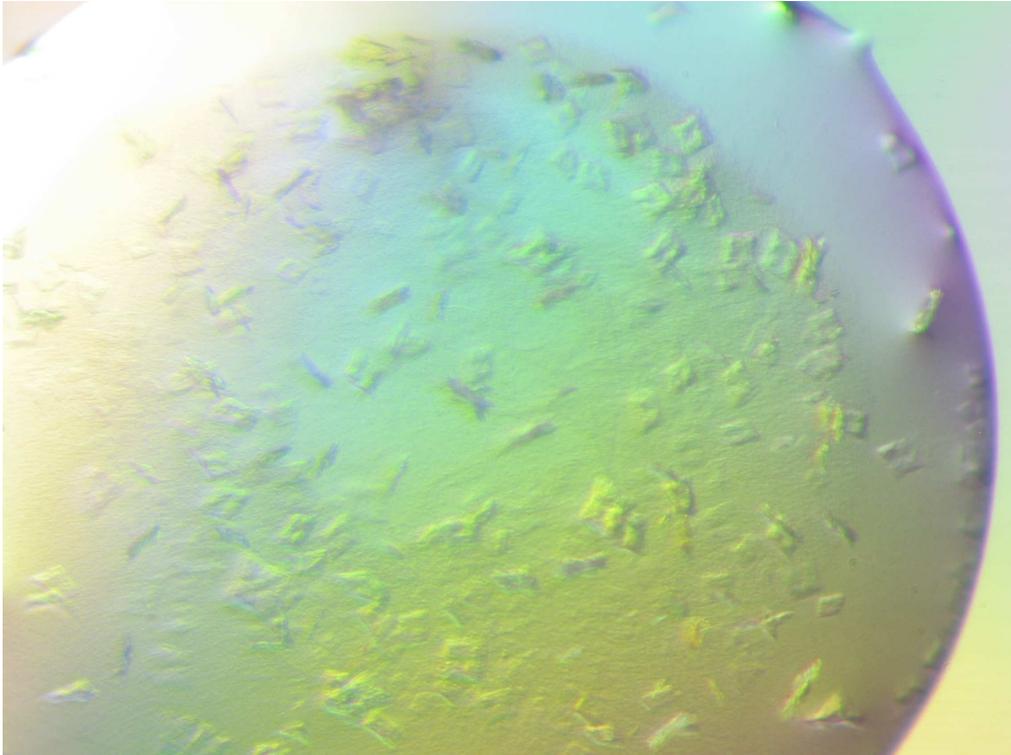


Abb. 4.47 a, Kristallkeime bei der Co-Kristallisierung der BIS I mit Malonyl-CoA

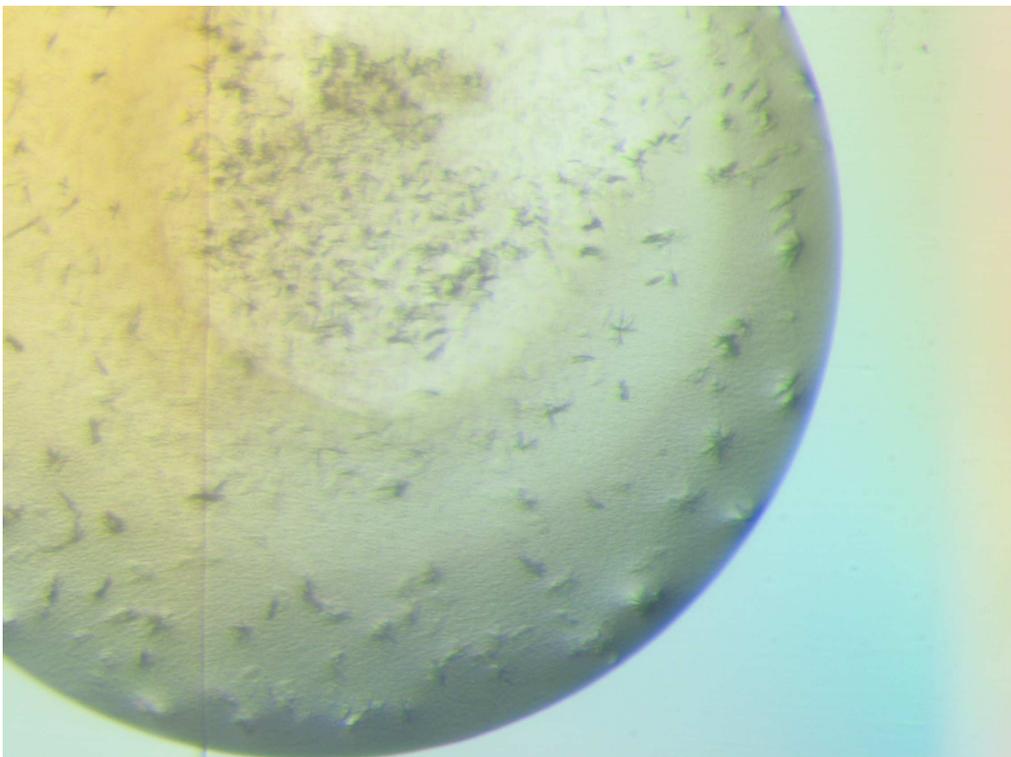


Abb. 4.47 b, Kristallkeime bei der Co-Kristallisierung der BIS I mit Benzoyl-CoA

4.15 Röntgenbeugungsanalyse

Die Röntgenbeugungsexperimente (3.4.3) fanden unter Tieftemperaturbedingungen in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Milton T. Stubbs an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg statt. Zur Aufnahme der Beugungsmuster wurden die Kristalle in neuen 0,1 M Kaliumphosphatpuffer überführt (Tab. 4.3), der einen Anteil von 15 % Glycerin besaß. Dieses Kälteschutzmittel gewährleistete, dass die Kristalle ohne Qualitätsverlust vermessen werden konnten. Niedrigere Glycerinkonzentrationen führten zu einer Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens, so dass das Beugungsbild durch die typischen Eisringe gestört wurde. Innerhalb einer Charge zeigten nur wenige Kristalle ausreichende Qualität für eine Datensammlung. Auch die wenigen geeigneten Kristalle wiesen eine Anisotropie aus, da sie in Abhängigkeit ihrer Orientierung zum Röntgenstrahl unterschiedlich stark streuten, so dass letztendlich nur zwei Streubilder zur Berechnung der Struktur geeignet waren.

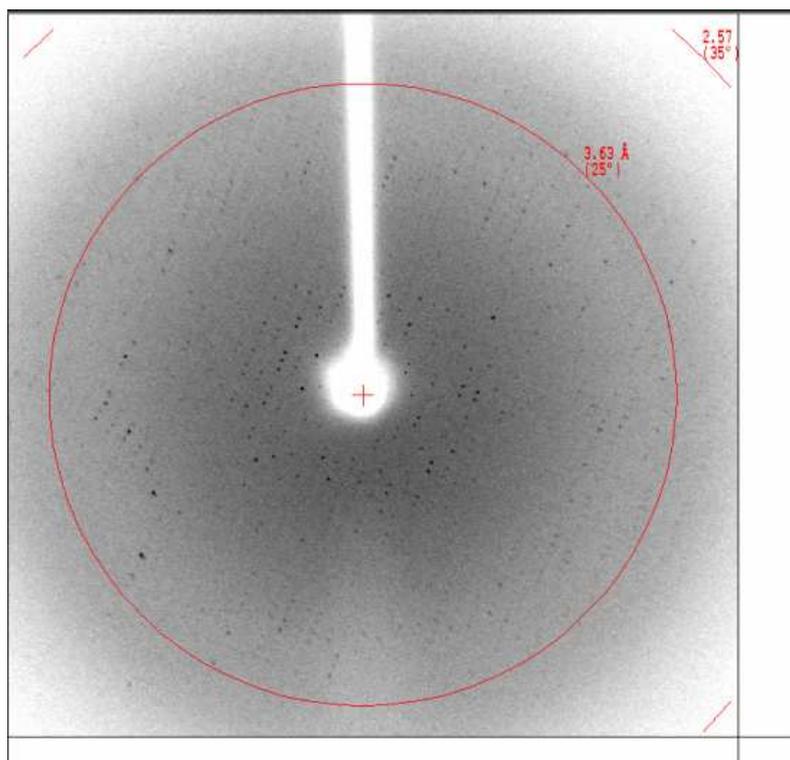


Abb. 4.48 Streubild der Röntgenstrukturanalyse der BIS I

4.16 Synchrotron

Zur Aufnahme eines verbesserten Datensatzes wurden die tiefgekühlten Kristalle mit dem BESSY Synchrotron in Berlin vermessen. Die mit dem Synchrotron generierte Röntgenstrahlung sollte Streubilder mit einer höheren Auflösung der Proteinkristalle erzeugen. Leider streuten die eingesetzten Kristalle nur bis zu einer Auflösung von max. 3,60 Å, so dass die gesammelten Daten für eine Berechnung der Struktur nicht ausreichend waren.

4.17 Bestimmung der Kristallstruktur durch Molekularen Ersatz

Die Kristallstruktur der BIS I wurde mittels Molekularem Ersatz (Rossmann & Blow, 1962) bestimmt. Dazu wurde ein nativer Datensatz (Tab. 4.4) mit einer Auflösung von 20,00 - 3,15 Å in den unter 3.4.1 angegebenen Bedingungen gesammelt. Im ersten sogenannten Refinement konnte die Raumgruppe P1 für den Proteinkristall bestimmt werden. Die Zellkonstanten wurden mit $a = 73,41$, $b = 93,88$, $c = 117,93$, $\alpha = 117,93$, $\beta = 89,80$, $\gamma = 68,30$ berechnet. In einer asymmetrischen Einheit befinden sich 8 Monomere bzw. 4 Dimere der BIS I (Abb. 4.49). Für die Festlegung der Kristallstruktur mittels Molecular Replacement (MR) wurde ein bereits kristallisiertes Protein mit ähnlicher Kristallstruktur benötigt. Da schon mehrere Polyketidsynthasen kristallisiert worden waren, konnte auf eine Chalkonsynthase von *Medicago sativa* als Suchmodell zurückgegriffen werden. Diese Chalkonsynthase besitzt eine Homologie von 52,9 % zu der BIS I, so dass die Struktur EDV-gestützt mit dem Programm AMORE berechnet werden konnte. Das Suchmodell wurde dabei mit der Elektronendichte der BIS I überlagert und mit Hilfe der Aminosäuresequenz konnte die Struktur berechnet werden.

Tab. 4.4 Nativer Datensatz der BIS I für die Berechnung der P1-Struktur

		Gesamt	Außenhülle
Raumgruppe	P1		
Zellkonstanten			
a	73,41		
b	93,88		
c	117,93		
α	73,26		
β	89,79		
γ	68,3		
Auflösung	20,00-3,16		
Zahl der gemessenen Reflexe		105709	15232
Zahl der unabhängigen Reflexe		53775	7799
Rmerge		0,178	0,327
Rmeas (within I+/I-)		0,252	0,462
Rmeas (all I+ & I-)		0,252	0,462
Rpim (within I+/I-)		0,178	0,327
Rpim (all I+ & I-)		0,178	0,327
Vollständigkeit der Daten (%)		96,5	95,5
Mean [(I)/sd(I)]		4,7	2,6

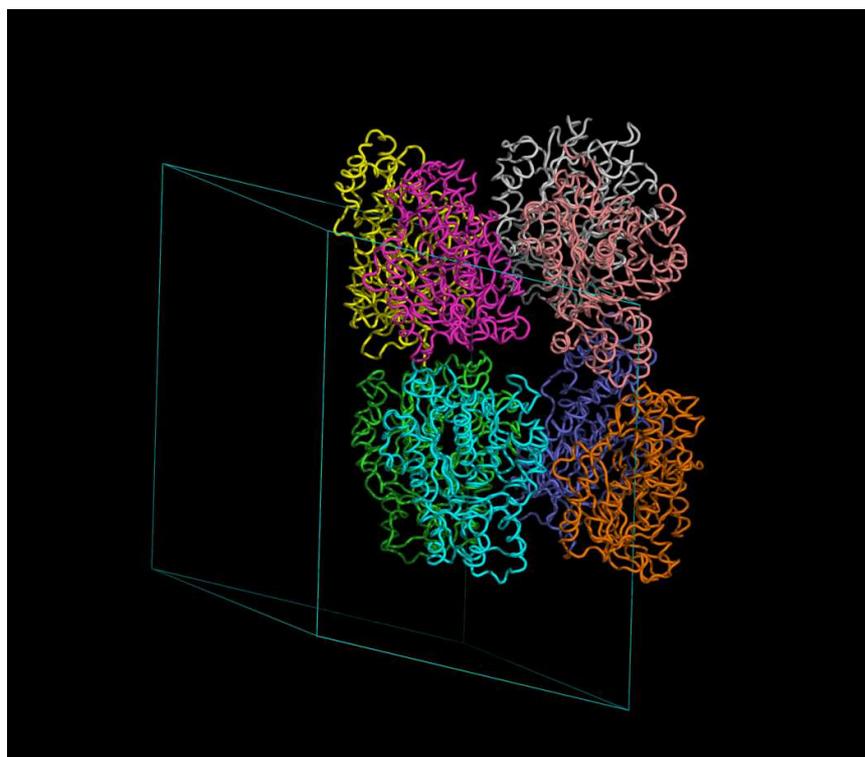


Abb. 4.49 Asymmetrische Zelleinheit der P1 Struktur

Ein weiteres Refinement mit einem zweiten Datensatz (Tab. 4.5), der bei einer Auflösung von 22,88-3,16 Å aufgenommen werden konnte, definierte eine P21-Raumgruppe für die Kristallisation der BIS I. Die Dimension der Zellachsen konnte mit $a = 73,18$, $b = 117,30$, $c = 92,22$, $\alpha = 90,00$, $\beta = 112,67$, $\gamma = 90,00$ berechnet werden. In einer asymmetrischen Zelleinheit befinden sich vier Monomere bzw. zwei Dimere (Abb. 4.50). Da nach dem ersten Refinement schon eine Struktur der Biphenylsynthase vorlag, konnte diese als Suchmodell für die zweite Strukturauflösung benutzt werden. Die EDV-gestützte Berechnung der Struktur erfolgte mit dem Programm AMORE über fünf Berechnungszyklen.

Tab. 4.5 Nativer Datensatz der BIS I für die Berechnung der P21-Struktur

		Gesamt	Außenhülle	Innenhülle
Raumgruppe	P21			
Zellkonstanten				
a	73,18			
b	117,31			
c	92,22			
α	90,00			
β	112,67			
γ	90,00			
Auflösung	22,88 - 3,16			
Zahl der gemessenen Reflexe		91198	3260	10490
Zahl der unabhängigen Reflexe		28587	886	4057
Rmerge		0,230	0,064	0,659
Rmeas (within I+/I-)		0,274	0,075	0,804
Rmeas (all I+ & I-)		0,274	0,075	0,804
Rpim (within I+/I-)		0,148	0,038	0,452
Rpim (all I+ & I-)		0,148	0,038	0,452
Vollständigkeit der Daten (%)		99,1	93,2	97,8
Mean [(I)/sd(I)]		4,7	16,1	1,4

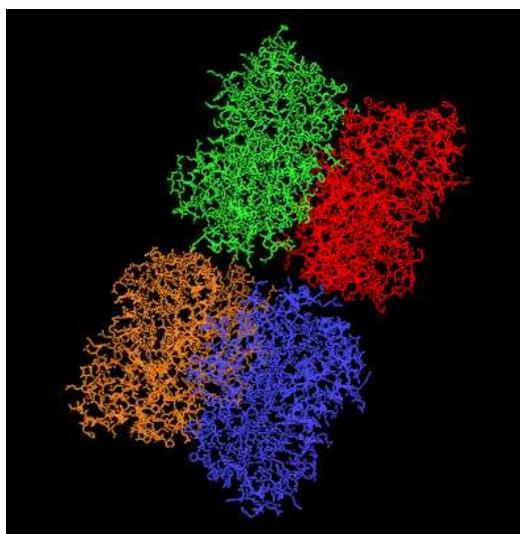


Abb. 4.50 Asymmetrische Zelleinheit der P21-Struktur

4.18 Tertiärstruktur

Die errechnete Tertiärstruktur bestätigte, dass das Enzym als Homodimer von ca. 84,0 kDa vorliegt. Entlang der zweifachen kristallographischen Rotationsachse sind die Monomere gegeneinander um 180° gedreht, so dass bei einer Untereinheit die „Frontseite“ und bei der anderen Untereinheit die „Rückseite“ erkennbar ist (Abb. 4.51). Verknüpft werden die Monomere durch eine Peptidschleife, die von den Aminosäuren Met 134 und Pro135 gebildet wird und die sich als Widerhaken in dem jeweils gegenüber liegenden Monomer verankert haben (Abb. 4.52). Am N-Terminus konnte aufgrund der schlechten Auflösung innerhalb der asymmetrischen Einheit keine weitere Bindungsstelle der Monomere berechnet werden, so dass die für Typ III-PKS typische Verknüpfung über zwei freie α -Helices am N-Terminus nicht bestätigt werden konnte.

Jedes BIS I Monomer kann in zwei strukturelle Bereiche eingeteilt werden. Die oben liegende Domäne kann durch die Lage der verknüpften Helices und Faltblattstrukturen als $\alpha\beta\alpha$ Struktur beschrieben werden (Abb. 4.53). Dieses Motiv wurde schon in mehreren kondensierenden Enzymen beschrieben und ist bei den Polyketidsynthasen weit verbreitet, ursprünglich wurde es zuerst bei den Thiolasen beschrieben (Matthieu et al., 1997). Im unteren Bereich befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms mit der katalytischen Triade, die aus den in allen Typ III-PKS hoch konservierten Aminosäuren Cys 161, His 302 und Asp 335 (Abb. 4.54) gebildet wird. Die zwei unabhängigen aktiven Zentren des Dimers sind bis auf das Met 134 vollständig von Aminosäureresten des jeweiligen Monomers umgeben. Direkt in Nachbarschaft zu den Aminosäuren im aktiven Zentrum befinden sich tunnelartige Strukturen, die für die Aktivität des Enzyms eine wichtige Rolle spielen. Ähnlich wie die Chalkonsynthase von *Medicago sativa* (Ferrer et al., 1999) verfügt die BIS I über eine CoA-Bindetasche (Abb. 4.55), die das aktive Zentrum mit dem umgebenden Lösungsmittel verbindet. Gebildet wird die Tasche durch die Aminosäuren Lys 52, Arg 55, Lys 59 und Ala 307. Aufgabe dieser Höhle ist es, das Benzoyl-CoA bzw. Malonyl-CoA durch Wechselwirkungen der Aminosäurereste mit dem Pantotheinarm des CoA-Esters in die richtige Position für Kettenstart und -verlängerung im aktiven Zentrum zu bringen. Am innen liegenden Ende der CoA-Bindetasche befindet sich eine zweite Höhle, die in der Literatur als die Substratbindetasche bezeichnet wird (Abb. 4.56). In dieser Tasche wird durch Interaktionen mit den Aminosäuren Ser 133, Glu 189, Thr 191, Phe 194 und Gly 338 das

Startersubstrat und der vom Substrat abgeleitete Teil des Tetraketids fixiert und so im Enzym verankert. In Richtung der Rotationsachse befindet sich als letzte enzymatisch entscheidende Struktur die Cyclisierungstasche (Abb. 4.57). In dieser relativ großen Höhle (22,19 Å), gebildet aus Ala 129, Met 134, Phe 212, Val 251, Ala 253, Tyr 262 und Pro 374 findet die Cyclisierung des linearen Tetraketids zum neuen Ringsystems statt, bevor das Produkt aus dem aktiven Zentrum in die Umgebung abgegeben wird.

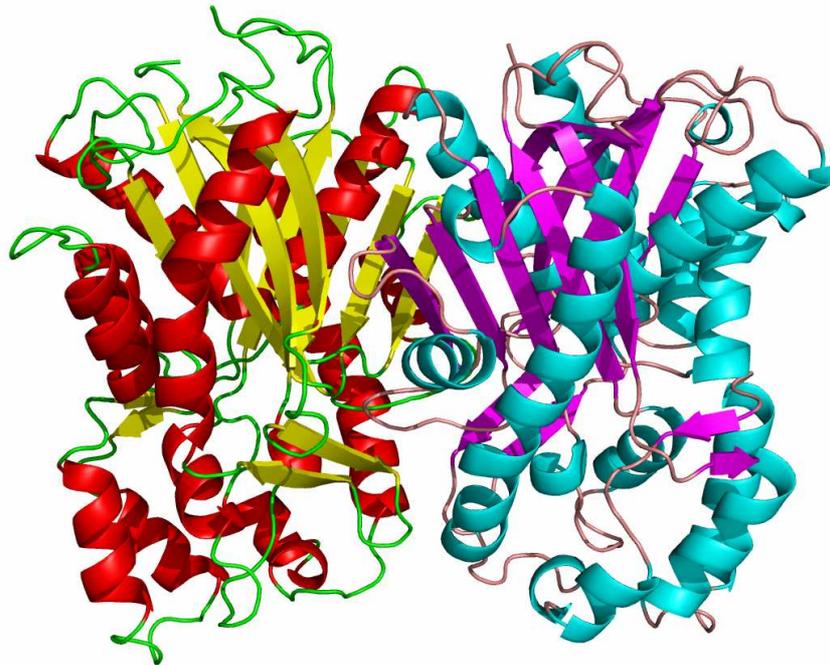


Abb. 4.51 Homodimer der BIS I

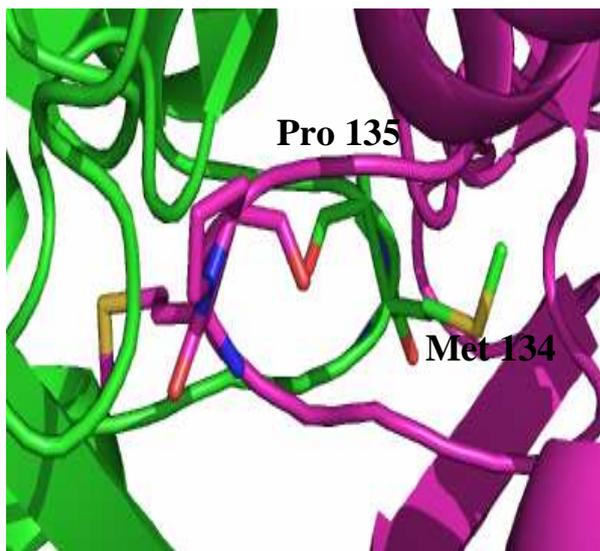


Abb. 4.52 Bindeknopf zwischen den Monomeren

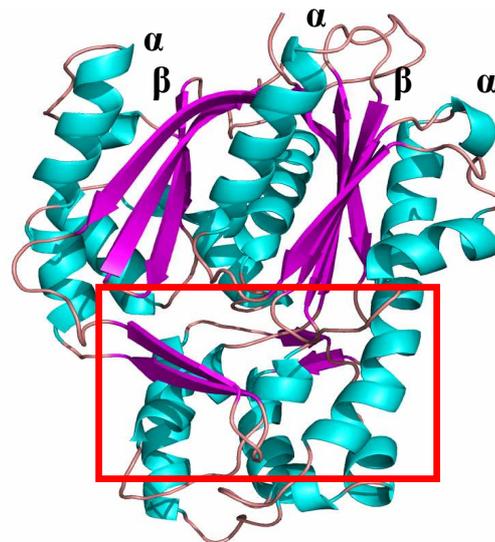


Abb. 4.53 Monomer der BIS. Der obere Bereich zeigt die $\alpha\beta\alpha$ -Struktur, der rot markierte Bereich zeigt die Lage des aktiven Zentrums

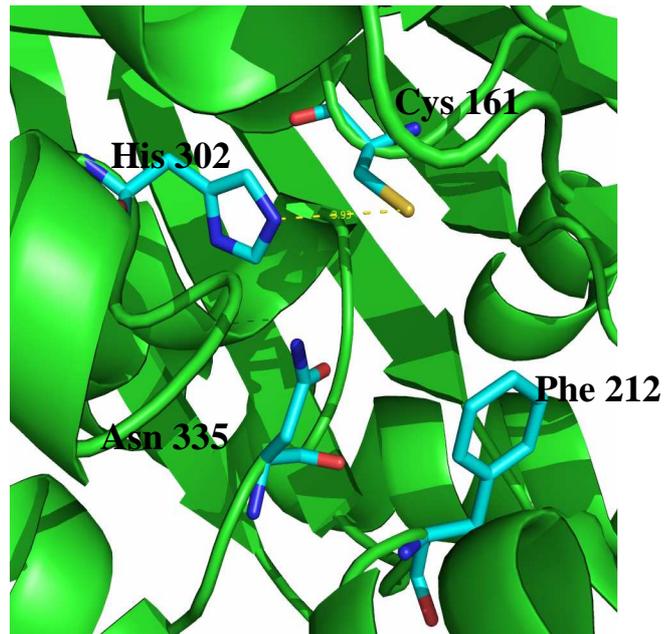


Abb. 4.54 Katalytische Triade der BIS I und das „gatekeeper“ Phe 212

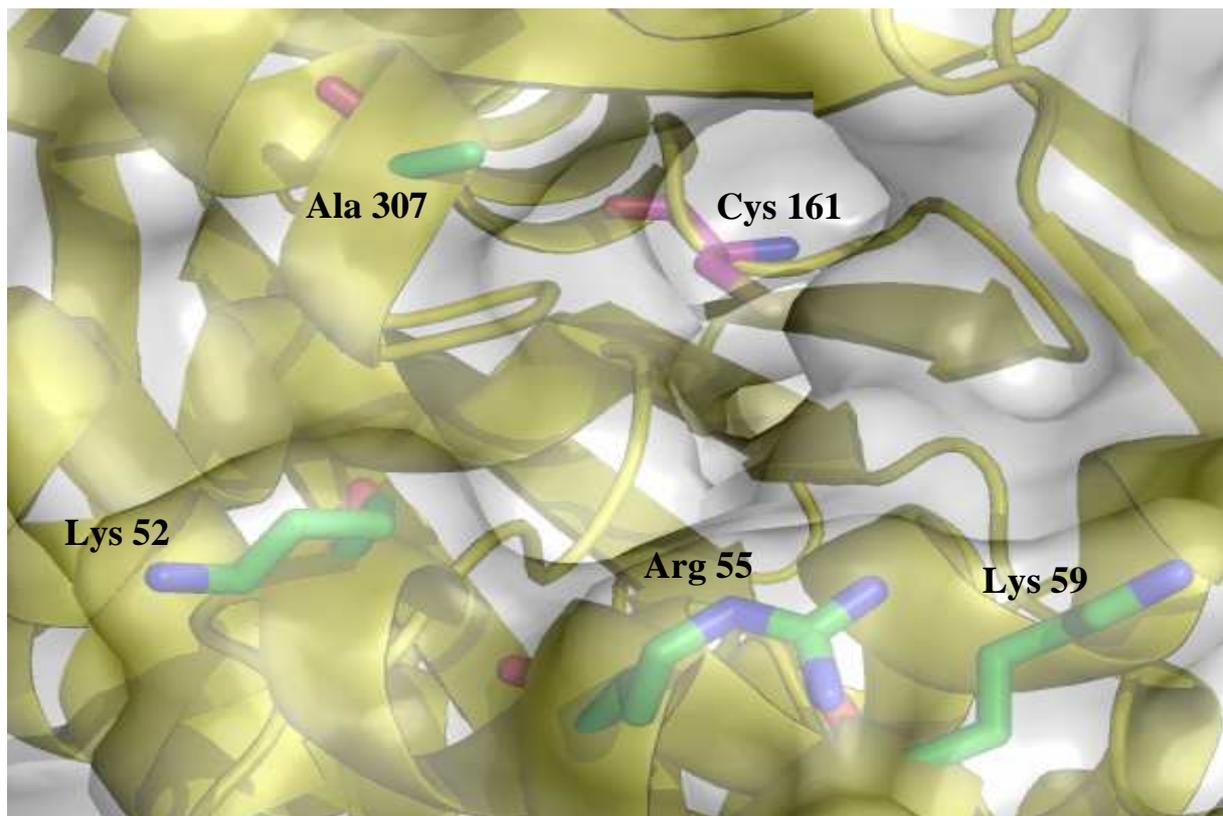


Abb. 4.55 Darstellung der CoA-Bindetasche von der Außenhülle des Proteins. Man erkennt deutlich die Bindetasche, die sich von der äußeren Hülle bis zum aktiven Zentrum ausbildet. Die Größe der Höhle beträgt 25,50 Å.

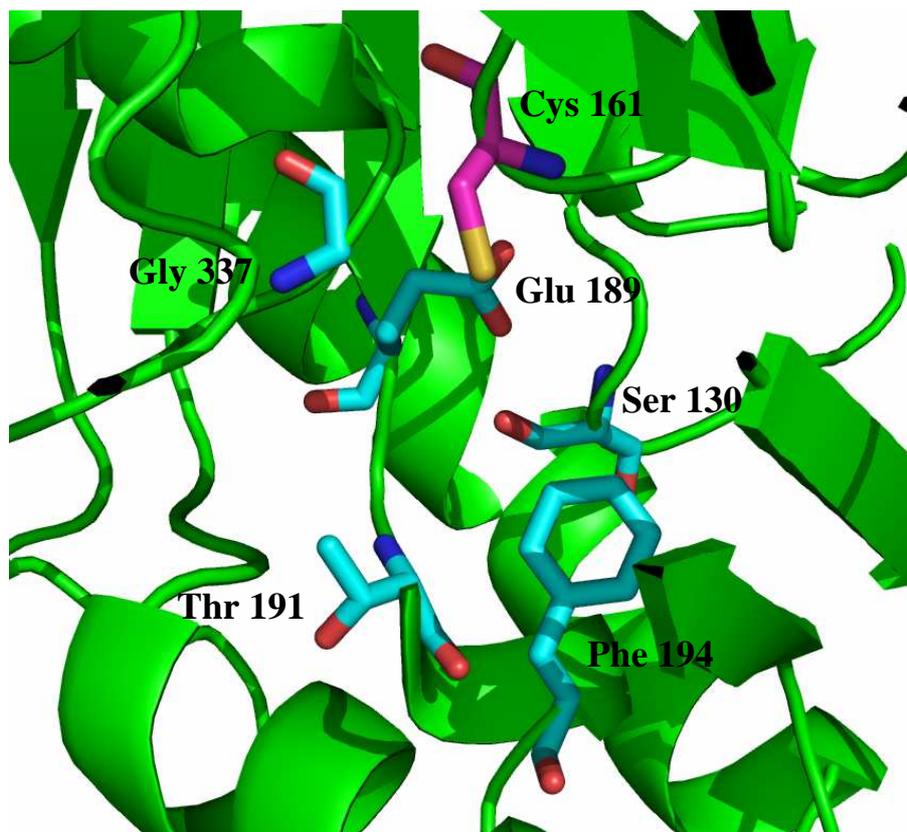


Abb. 4.56 Darstellung der Substratbindetasche

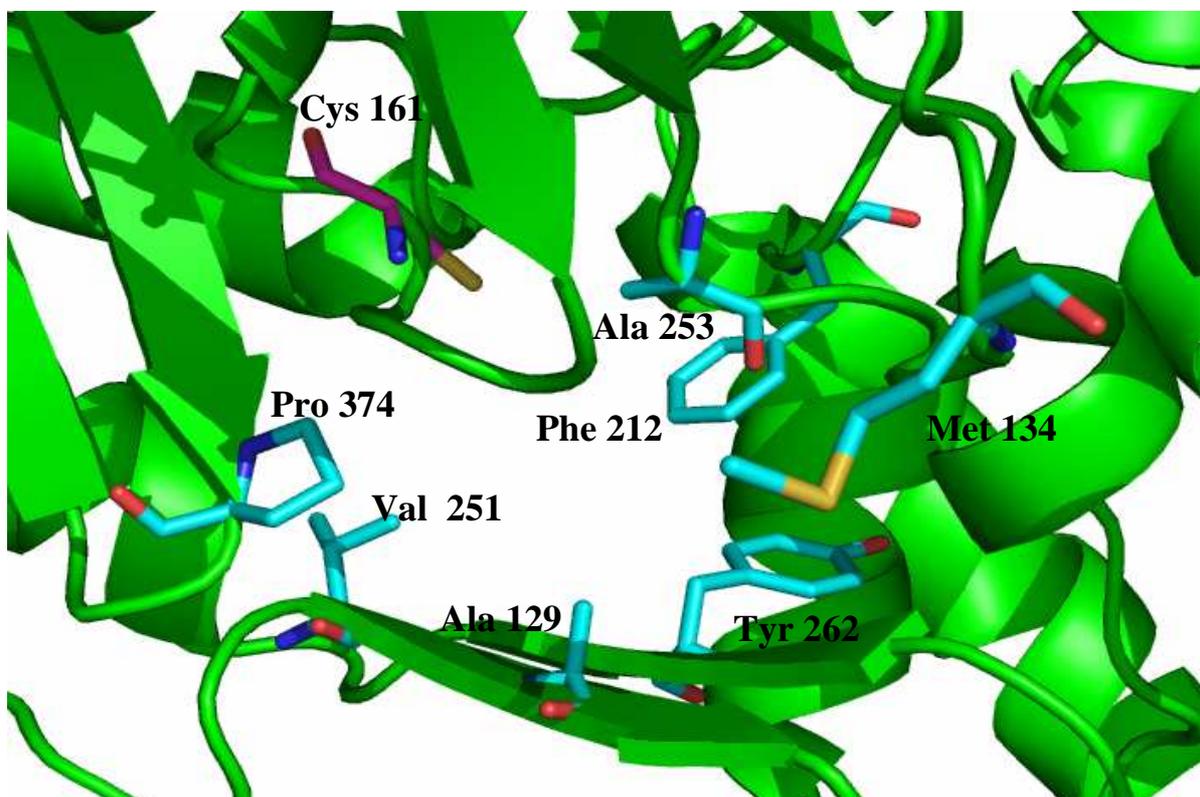


Abb. 4.57 Darstellung der Cyclisierungstasche

4.19 Aufreinigung und Puffer-Screening der BPS mit His-tag

Wie die BIS I sollte auch die BPS zur Aufklärung der Struktur und zur Bestimmung des Cyclisierungsmechanismus kristallisiert werden. Da die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (3.2.1.1) am Beispiel der BIS I gute Ergebnisse lieferte und der BPS-ORF in dem 6xHis-Tag codierenden pRset B Vektor vorlag, wurde das Aufreinigungssystem (4.8) übertragen. Auch bei der BPS wurde das Volumen der Ansätze mit den entsprechenden Antibiotika auf 1600 ml erhöht und die Induktionszeit wurde auf 20,0 h festgelegt. Nach Abschluss der zweifachen Aufreinigung wurde das Protein mittels Zentrifugenkonzentratoren (3.2.4.2) aufkonzentriert und in 10,0 mM Na-HEPES Puffer (2.1.5) pH 7,7 umgepuffert. Die Reinheit der BPS wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4.58) überprüft und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) (3.2.2) auf 13,6 mg/ml festgelegt. Zur Lagerung wurde die BPS bei 4,0 °C auf Eis aufbewahrt, um eine Störung der Kristallisation durch denaturiertes Protein zu vermeiden.

Das Screening (3.4.1.1) erfolgte mit den unter 2.1.5 beschriebenen, kommerziell erwerblichen Puffern an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg. In 80 % der Kristallisationsansätze konnte innerhalb der ersten 20,0 min die Bildung von Präzipitat beobachtet werden. Nach 7 Tagen konnte in den Vertiefungen die Bildung von einzelnen Kristallen beobachtet werden, die von ihrer Größe direkt der Röntgenstrukturanalyse zugänglich waren (Abb. 4.59). Die Vermessung dieser Kristalle im Tieftemperaturverfahren zeigte leider keine Streubilder, so dass es sich bei den Kristallen nicht um Protein, sondern um ausgefallene Puffersalze bzw. Präzipitanten handelte (Abb. 4.59).

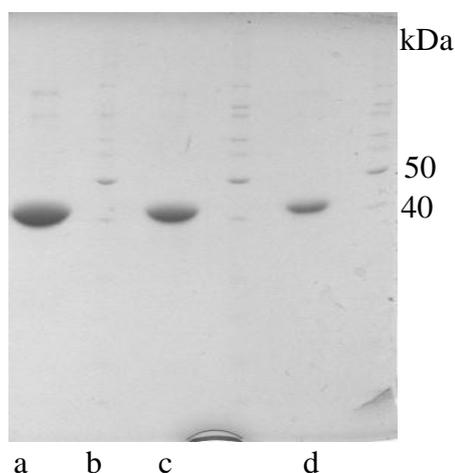


Abb. 4.58 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung der Reinheit der BPS a) BPS 10,0 µg, b) Proteinleiter, c) BPS 5,0 µg, d) BPS 2,5 µg

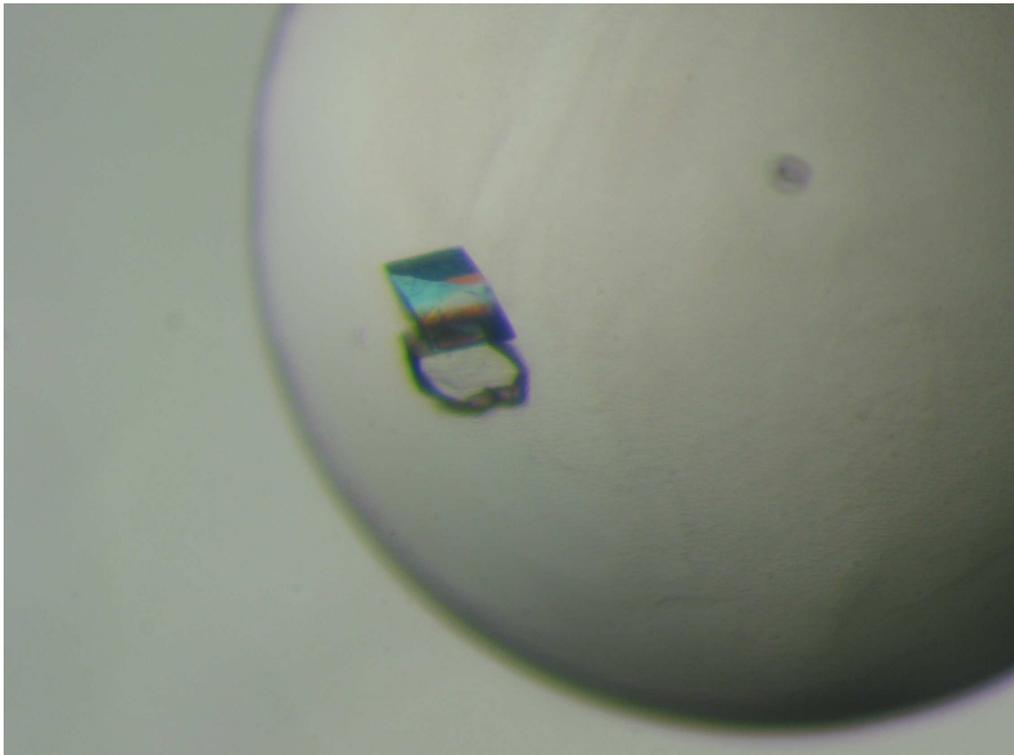


Abb. 4.59 Salzkristall bei der Kristallisierung der BPS mit Polyhistidinende

4.20 Puffer-Screening der BPS ohne His-Tag

Ein Grund für die nicht erfolgte Kristallisierung könnte bei der BPS die Anwesenheit des stark polaren Polyhistidinrestes sein. Durch die veränderte Polarität des am C-Terminus befindlichen Fusionspeptids könnte es zu leichten Konformationsveränderungen an der Proteinoberfläche gekommen sein, die die Kristallisierung des Proteins erschweren. Da für eine 6xHis-Tag-Abspaltung an der Enterokinaseschnittstelle des vom pRset B Vektor codierten Fusionsproteins das notwendige Trypsin nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stand, musste ein System entwickelt werden, mit dem das Fusionspeptid abgespalten werden konnte, ohne die Struktur und Qualität der BPS zu beeinflussen.

Dazu wurde der für die BPS codierende ORF aus dem pRset B Vektor durch Restriktion mit *EcoRI* und *NheI* isoliert und in den ebenfalls mit *EcoRI* und *NheI* geschnittenen Expressionsvektor PET 28c (Fa. Novagen) ligiert. Dieser Vektor codierte für ein N-terminales Fusionspeptid, das neben einem 6xHis-Tag für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie auch eine Erkennungssequenz besaß, die von Thrombin als proteolytisches Enzym zur Abspaltung des Polyhistidinrestes genutzt wurde. Da der PET 28c

Vektor ebenfalls über ein LAC Operon verfügte, konnte die Bildung der BPS mit IPTG induziert werden. Nach der Transformation des Konstruktes in BL21 kompetente Zellen (3.1.10) konnte die Biosynthese der BPS induziert werden. Zur Testexpression (3.1.12) für die Abspaltung wurden ein Volumen von 100,0 ml LB (2.1.2) inklusive Antibiotika und eine Induktionszeit von 4,0 h gewählt. Das Protein wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt (3.2.1.1) und 1,0 mg des Proteins nach Vorschrift mit Thrombin Restriction Grade (Fa, Novagen) versetzt und inkubiert. Zur Kontrolle der Abspaltung wurden nach 15, 30 und 45 min sowie 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 12,0 und 24,0 h Aliquots von 3,0 µg Protein entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.60). Das SDS-Gel zeigte, dass nach ca. drei Stunden der größte Teil der BPS gespalten war.

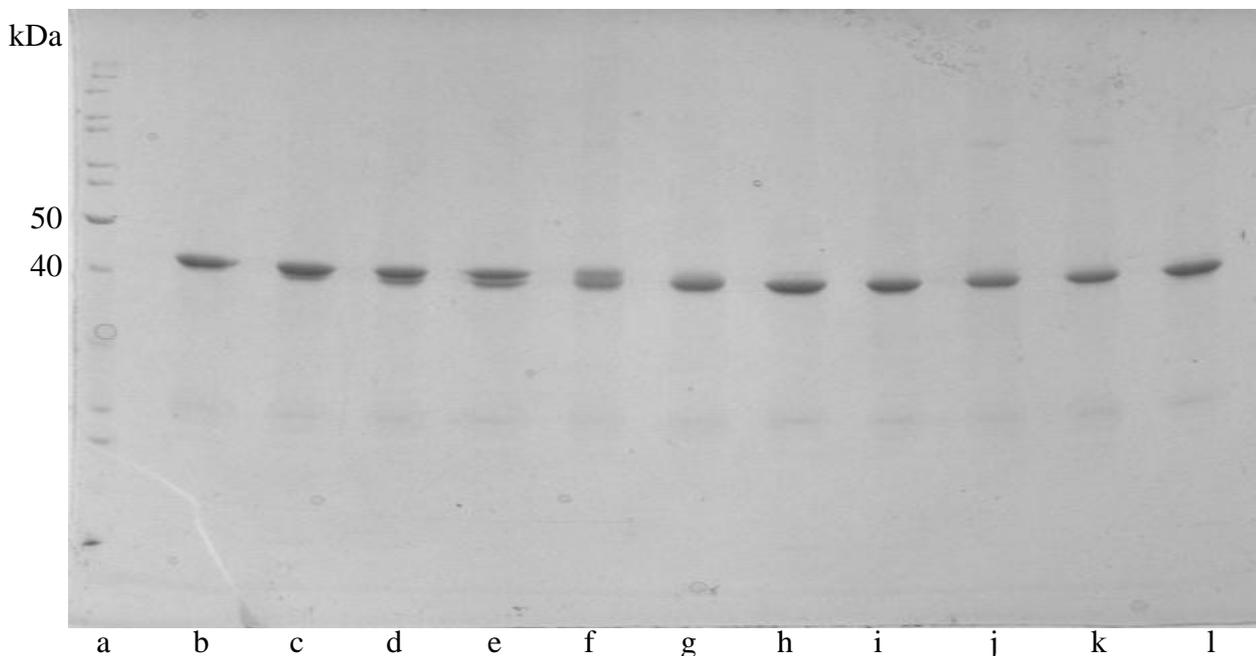


Abb 4.60 SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Enterokinasespaltung des BPS-Fusionspeptids, a) Proteinleiter, b) ungespaltenes Protein, c) nach 15 min, d) 30 min, e) 45 min, f) 1,0 h, g) 2,0 h, h) 3,0 h, i) 4,0 h, j) 5,0 h, k) 12,0 h, l) 24,0 h.

Für das Screenen der Kristallisationsbedingungen wurde Protein über vier Tage aus jeweils 1600 ml Bakteriensuspension isoliert. Anhand der mit Bradford (1976) (3.2.2) ermittelten Proteinkonzentration wurde die erforderliche Menge an Thrombin bestimmt und die Spaltung durchgeführt. Die Spaltung fand abweichend zum Protokoll im Lysispuffer (2.1.3) mit dem nötigen Korrekturfaktor der Thrombinmenge statt. Durch eine erneute Proteinaufreinigung mit Ni-NTA Agarose wurden nicht gespaltene Proteinmoleküle und abgespaltene Fusionspeptide entfernt. Für die Proteinkristallisierung wurde die Proteinlösung mit Hilfe von Zentrifugenkonzentratoren (3.2.4.2) in 10,0 mM Tris/HCl Puffer überführt und auf-

konzentriert. Dazu wurde der MWCO der Zentrifugensäulen so gewählt, dass das proteolytische Enzym mit einer molekularen Masse von 26,0 kDa entfernt wurde, während die BPS zurückgehalten wurde. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.61) und die nach Bradford (1976) (3.2.2) ermittelte Endkonzentration der Proteinlösung lag bei 11,7 mg/ml.

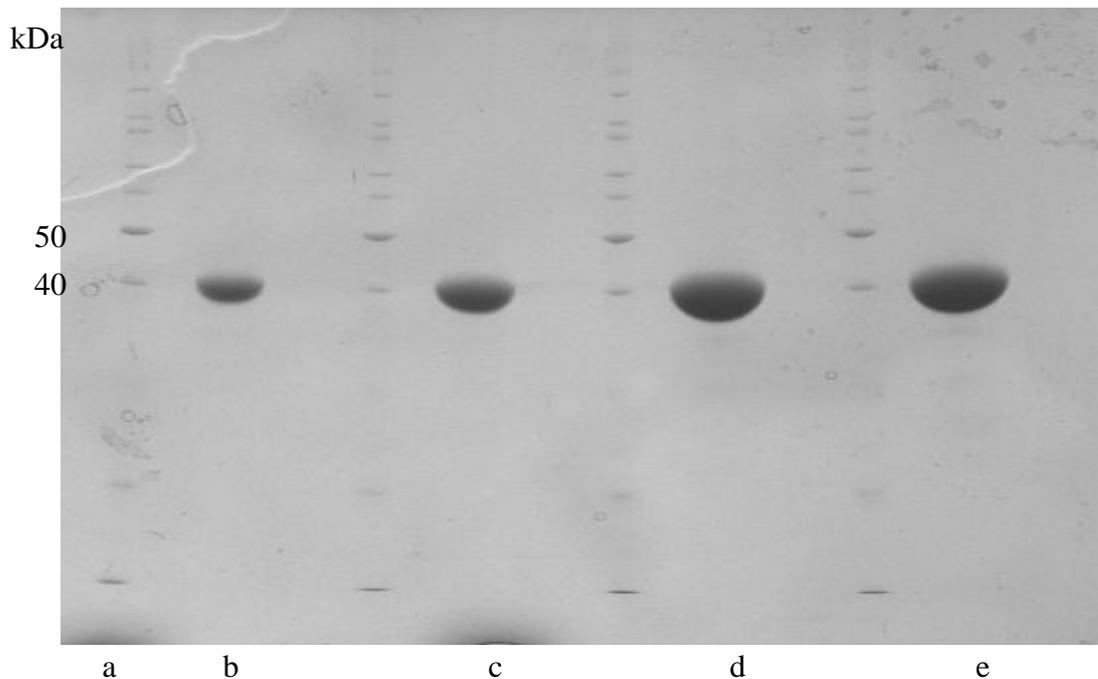


Abb 4.61 SDS-PAGE und Coomassiefärbung zur Überwachung der Reinheit der BPS, a) Proteinleiter, b) BPS 2,0 µg, c) BPS 5,0 µg, d) BPS 10,0 µg, e) BPS 15,0 µg

Die Screening-Versuche (3.4.1.1) wurden in der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. 80 % der angesetzten Proben zeigten nach wenigen Minuten die Bildung von Präzipitat, leider bildeten sich auch nach mehreren Wochen keine kristallinen Strukturen. Ursache für die nicht erfolgte Kristallisierung könnte ein nicht ausreichender Reinheitsgrad der Proben gewesen sein. Eine SDS-Gelelektrophorese der tiefgekühlten Rückstellproben der Charge mit anschließender Silberfärbung zeigte, dass im niedermolekularen Bereich noch mehrere Banden an Fremdprotein zu erkennen waren (Abb. 4.62). Das vorhandene Fremdprotein bewies, dass eine Abtrennung von kleineren Polypeptiden nicht quantitativ verlief und so die Kristallisierung gestört wurde.

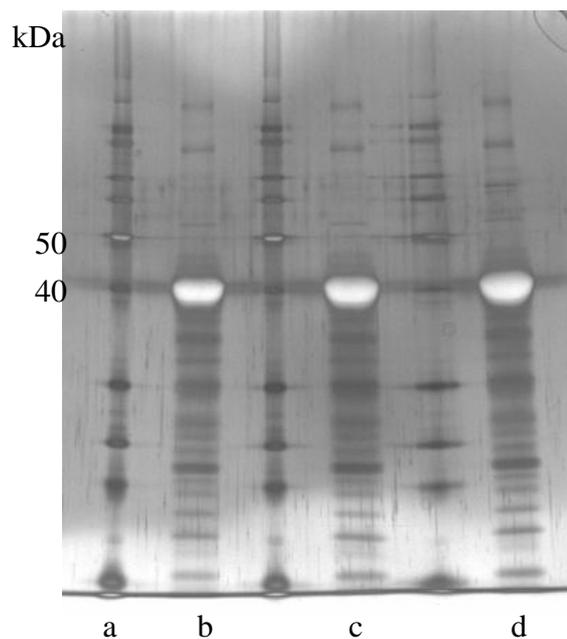


Abb 4.62 SDS-PAGE und Silberfärbung zur Überwachung der Reinheit der BPS, a) Proteinleiter, b) BPS 1,0 µg, c) BPS 2,0 µg, d) BPS 3,0 µg

Zur Optimierung des Proteinreinheitsgrades wurde die Proteinaufreinigung wiederholt und zur Abtrennung der Fremdproteine eine Gelfiltration (3.3.6) nachgelagert. Abweichend zu den bisherigen Aufreinigungen fand die Abspaltung des Fusionspeptids mit Thrombin nach Umpufferung in dem Basispuffer der Gelfiltration (2.1.3) statt. Modifiziert wurde die Gelfiltration durch eine vorgeschaltete HisTrap-Säule (Amersham Biosciences), um nicht gespaltenes Protein von dem gespaltenen Protein mittels Affinitätschromatographie abzutrennen. Anhand des Elutionsprofils (nicht gezeigt) wurde die proteinenthaltende Fraktion bestimmt. Für die Kristallisierung wurde die BPS mittels Zentrifugenkonzentratoren (3.2.4.2) in 10,0 mM Tris / HCl Puffer umgepuffert. Mit Hilfe der Bradford Methode (1976) (3.2.2) wurde die Endkonzentration der Proteinlösung auf 8,8 mg/ml festgelegt. Die Reinheit wurde durch die SDS-Gelelektrophorese (3.2.3) mit Coomassie und Silberfärbung (Abb. 4.63 a,b) überprüft. Beide Gele zeigten den hohen Aufreinigungsgrad der BPS, da selbst in hohen Proteinkonzentrationen kaum noch Banden von Fremdprotein zu erkennen waren. Das Puffer-Screening für das Protein fand im Zuge der obigen Kooperation statt. Mit 80 % der vorgelegten Kristallisationspuffer bildete sich innerhalb von 20,0 min ein Präzipitat. Nach 14 Tagen konnte die Bildung von kleinen Kristallisationskeimen unter zwei verschiedenen Pufferbedingungen beobachtet werden (Abb. 4.64 a und b, Tab. 4.6). Trotz ihrer geringen Größe wurde versucht, die Kristalle der Röntgenbeugungsanalyse zu unterziehen. Die Streubilder zeigten, dass es sich bei den Kristallen eindeutig um Protein handelte (Abb. 4.65).

Leider waren die registrierten Signale nicht ausreichend, um die Struktur der BPS zu berechnen. Versuche zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen und zur Vergrößerung der Kristalle wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

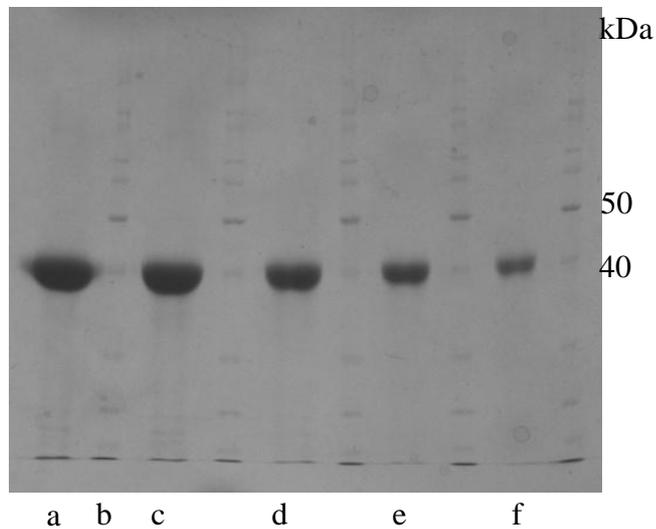


Abb. 4.63 a, SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überwachung der Reinheit der mittels zusätzlicher Gelfiltration gereinigten BPS, a) BPS 20,0 μg , b) Proteinleiter, c) BPS 15,0 μg , d) BPS 10,0 μg , e) BPS 5,0 μg , f) BPS 2,0 μg

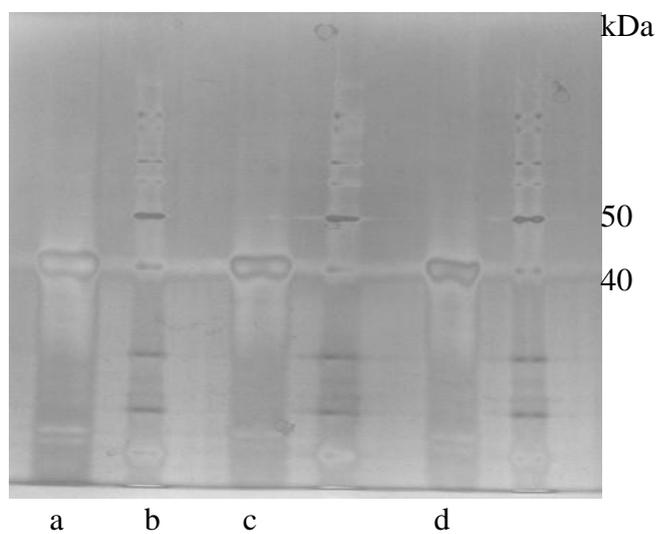


Abb. 4.63 b, SDS-PAGE mit Silberfärbung zur Überwachung der Reinheit der mittels zusätzlicher Gelfiltration gereinigten BPS, a) BPS 1,5 μg , b) Proteinleiter, c) BPS 0,75 μg , d) BPS 0,5 μg

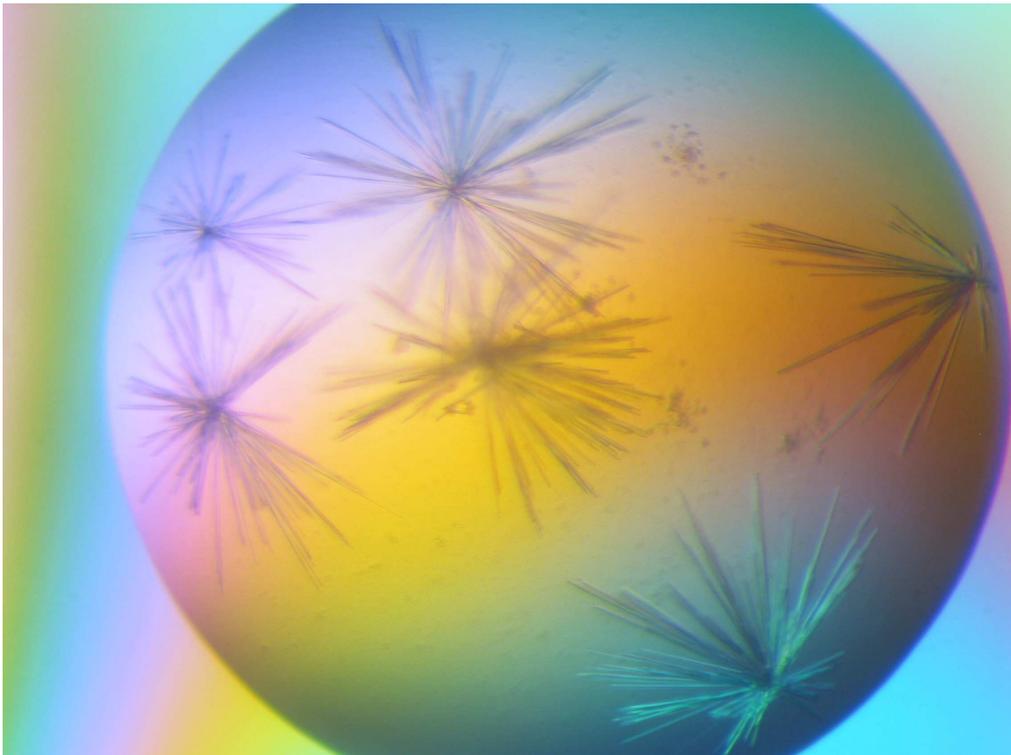


Abb. 4.64 a, „Kristalligel“ der BPS in Na-MES Puffer

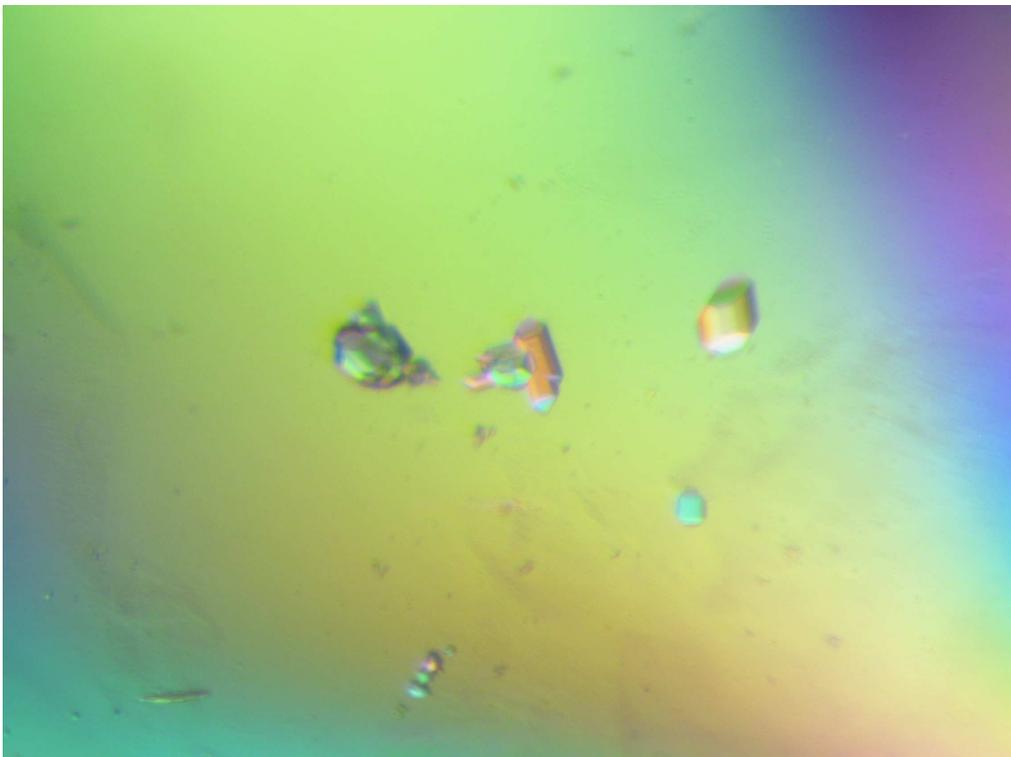


Abb. 4.64 b, Kristalle der BPS in Na-Acetat Puffer

Tab. 4.6 Zusammensetzung der für BPS erfolgreichen Kristallpuffer

Präzipitant 1	Präzipitant 2	Puffer	pH	Additive
30% PEG MME 2000	Entfällt	0,1 M Na-Actetat	4,6	2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10% Dioxane	Entfällt	0,1 M Na-MES	6,5	1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

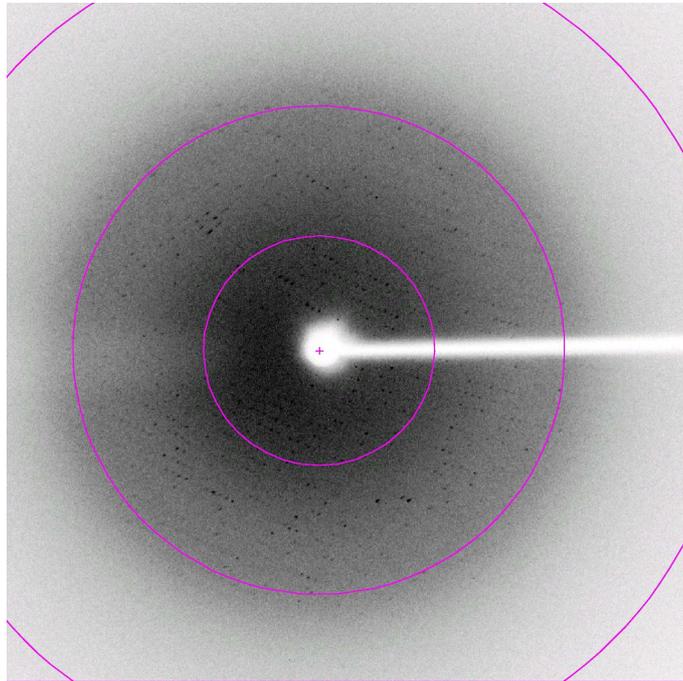


Abb. 4.65 Streubild eines BPS Kristalls

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische Untersuchung und Strukturbestimmung mittels Kristallisierung der Biphenyl-Synthase (BIS) von *Sorbus aucuparia*. Die BIS gehört zu der Familie der Typ III Polyketid-Synthasen (PKS), die für die Bildung einer ganzen Reihe von Naturstoffen im Sekundärmetabolismus der Pflanzen verantwortlich sind. Grundlegender Reaktionsmechanismus aller Typ III-PKS ist die Verlängerung CoA- bzw. enzymaktivierter Startersubstrate mit Acetyleinheiten, die durch Decarboxylierung gewonnen werden. Die entstandenen linearen Polyketide werden in einer anschließenden Cyclisierungsreaktion in die entsprechenden Endprodukte überführt (Schröder, 1997; Austin und Noel, 2002). Der erste vollständig strukturell und funktionell beschriebene Vertreter der Typ III-PKS-Superfamilie war die Chalkon-Synthase (CHS) von *Medicago sativa* (Ferrer et al., 1999). Neben differierenden Startersubstraten und Polyketidlängen der einzelnen PKS gibt es auch unterschiedliche Cyclisierungsmechanismen, die zu der Vielzahl der möglichen Produkte der Typ III-PKS führen. So wird für die CHS, die als evolutionärer Ursprung aller Typ III-PKS gilt, die Cyclisierung mittels Claisen-Kondensation beschrieben. Dieser Mechanismus liegt auch der Reaktion der Benzophenon-Synthase (BPS) zugrunde. Im Gegensatz dazu führt bei der Stilben-Synthase (STS) und bei der BIS eine Aldol-Kondensation zum Ringschluss und damit zur Bildung des Resveratrols bzw. des 3,5-Dihydroxybiphenyls (Austin und Noel, 2002). Eine Ursache für den Wechsel von der Claisen- zur Aldolreaktion des Cyclisierungsvorgangs konnte durch die Strukturaufklärung der STS von *Pinus sylvestris* erklärt werden (Austin et al., 2004). Wie die strukturelle Basis für die unterschiedliche Cyclisierung bei der BIS aussieht, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Die für die BIS codierende cDNA konnte in der Arbeitsgruppe aus *S. aucuparia*-Kulturen in voller Länge gewonnen werden. Identitätsvergleiche zu anderen Enzymen der gleichen Klasse zeigen eine hohe Homologie von 52,9 % zu der CHS von *Medicago sativa* und 57,4 % zu der STS von *Arachis hypogaea*. Da es sich bei der BIS um ein lösliches Protein handelt, konnte die Expression in einem prokaryontischen System durchgeführt werden. Bisher sind mehrere Beispiele für die erfolgreiche heterologe Expression in *E. coli* bekannt (Junghanns et al., 1995; Liu et al., 2003; Yamaguchi et al., 1999; Brand et al., 2006). Der Vorteil der Expression in Bakterienzellen gegenüber Hefen, tierischen Zellen oder anderen Expressionssystemen liegt in ihrer einfachen Handhabung. Unter optimalen Bedingungen lassen sich in

Bakterienkulturen in kurzer Zeit schnell große Mengen an Protein exprimieren, das über angehängte Tags oder Fusionsproteine leicht zugänglich ist. Für die biochemische Charakterisierung der BIS wurde das Protein direkt nach der Aufreinigung an Ni-NTA Agarose verwendet. Eine Lagerung des Enzyms bei Minustemperaturen war nicht möglich, da schon nach dem ersten Gefrier- und Auftauzyklus die Aktivität deutlich sank und nach mehrmaligem Auftauen gar nicht mehr vorhanden war. Ähnliche Instabilitäten von PKS sind auch aus Rohextrakten von *Hypericum calycinum*-Zellkulturen und aus Extrakten aus *Humulus lupulus* bekannt, die die Isobutyrophenon-Synthase bzw. Isovalerophenon-Synthase enthalten (Paniego et al., 1999; Klingauf, 2004). Der optimale pH-Wert zur Bildung des Biphenylproduktes lag bei 7,0. In der Literatur sind ähnliche Werte für andere PKS beschrieben. So liegt das pH-Optimum der WtPKS1 (Polyketidsynthase I von *Wachendorfia thyrsoiflora*) in 100,0 mM Tris/HCL bei pH 7,0 und in 100,0 mM Na-HEPES-Puffer bei pH 6,9 (Brand et al., 2006) und auch die BPS von *Hypericum androsaemum* (Liu et al., 2003) zeigt die größte Aktivität bei pH 7,0. Bei den CHS und anderen Typ III-PKS handelt es sich um Homodimere mit Untereinheiten von 40-45 kDa (Schröder, 1997). Mittels Gelfiltration wurde für die BIS eine relative Molekülmasse von etwa 83 kDa berechnet. Dies entspricht ungefähr der Masse der WtPKS I, die mit 43,08 kDa pro Untereinheit beschrieben wird (Brand et al., 2006) und der Molekülmasse der VPS von *Humulus lupulus*, die bei 45 kDa pro Monomer liegt (Paniego et al., 1999). Der K_m -Wert der BIS für Benzoyl-CoA liegt bei $0,7 \pm 0,03 \mu\text{M}$, was vergleichsweise gering ist. In der Literatur lässt sich ein K_m -Wert der CHS von *Scutellaria baicalensis* von $5,17 \pm 2,62 \mu\text{M}$ finden und für die STS von *Arachis hypogaea* wird ein K_m -Wert von $5,11 \pm 2,11 \mu\text{M}$ beschrieben (Abe et al., 2004). Nur der K_m -Wert der STS von *Pinus sylvestris* liegt mit $0,48 \pm 0,17 \mu\text{M}$ unter dem ermittelten Wert der BIS I. Für das als Kettenverlängerer dienende Malonyl-CoA wurde ein K_m -Wert von $6,2 \mu\text{M}$ ermittelt. Dieser Wert korreliert mit den in der Literatur angegebenen Werten. So wird der K_m -Wert für das Malonyl-CoA der CHS von *Sorbus aucuparia* mit $7,3 \mu\text{M}$ (Liu et al., 2006) und für die CHS von *Hypericum androsaemum* mit $10,8 \mu\text{M}$ (Liu et al., 2003) angegeben. Auffallend ist die hohe katalytische Effizienz der BIS, für die ein Wert von $10181 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ermittelt wurde. Dieser Wert übersteigt die Daten der CHS von *Scutellaria baicalensis* mit $3224 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ und der STS von *Arachis hypogaea* mit $2120 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ um ein Vielfaches (Abe et al., 2004). Nur die katalytische Effizienz der BPS von *Hypericum androsaemum* liegt mit $28345 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ deutlich höher (Liu et al., 2003). Die HPLC und LC-ESI-MS Analysen zur Bestimmung der Substratspezifität zeigen, dass Benzoyl-CoA als bevorzugtes Substrat umgesetzt wird. Neben

dem 3,5-Dihydroxybiphenyl als Hauptprodukt bildet sich in geringen Mengen auch 2,4,6-Trihydroxybenzophenon, welches das Produkt der BPS von *Hypericum androsaemum* (Liu et al., 2003) ist. Beide Enzyme nutzen die gleichen Substrate und auch die Bildung des Tetraketids durch dreifache Verlängerung des aktivierten Startersubstrats mit C₂-Einheiten aus dem Malonyl-CoA verläuft identisch. Durch unterschiedlich katalysierte Cyclisierungsmechanismen kommt es anschließend zur Bildung der jeweiligen Produkte. Ähnliche Kreuzreaktionen bei der Produktbildung durch PKS wurden schon in der Literatur beschrieben. So katalysiert die CHS von *Pueraria lobata* die Bildung von Naringenin-Chalkon, des weiteren wird in geringer Menge das Stilben Resveratrol freigesetzt (Yamaguchi et al., 1999). Zwei Hypothesen versuchen die Bildung von Kreuzreaktionsprodukten zu erklären. Zum einen könnten durch falsch gefaltete, aber noch lösliche Enzyme unnatürliche Konformationsänderungen auftreten, die zu einer Bildung des Kreuzproduktes führen könnten. Zum anderen wird diskutiert, dass unter nicht optimalen Bedingungen während der Überexpression des Proteins eine eingeschränkte Konformationsflexibilität im aktiven Zentrum entsteht, so dass neben dem Hauptprodukt unter *in vitro* Bedingungen ein anormales Cyclisierungsprodukt gebildet wird (Yamaguchi et al., 1999).

Neben dem Haupt- und Kreuzprodukt der BIS wurde bei der Inkubation mit Benzoyl-CoA auch das Phenylpyron als Produkt gebildet. Durch Kettenabbruchreaktionen unter nicht natürlichen *in vitro* Bedingungen entstehen intermediäre, unvollständige Polyketide. Diese werden in das umgebende Medium abgegeben und durch einen nicht enzymatischen Lactonringschluss in ein Pyron überführt (Yamaguchi et al., 1999). Welche Art von Pyron sich bildet, ist von dem Startersubstrat und von der unterschiedlichen Zahl an Verlängerungsschritten abhängig. So bildet die CHS von *Petroselinum hortense* Triketid- und Tetraketidlactone, die als Pyrone in Enzymansätzen identifiziert werden können (Kreuzaler et al., 1975). Neben aromatischen Startersubstraten werden auch langkettige, aliphatische Substrate wie zum Beispiel Hexanoyl-CoA und Decanoyl-CoA umgesetzt. So katalysiert die CHS von *Scutellaria baicalensis* mit den unnatürlichen Startersubstraten Hexanoyl-CoA und Octanoyl-CoA die Bildung von Triketidpyronen (Abe et al., 2004). Diese Untersuchungen zeigen, dass PKS *in vitro* eine relativ breite Substrat- und Produktspezifität besitzen. Die BIS akzeptiert neben dem Benzoyl-CoA als Hauptsubstrat das *o*-Hydroxybenzoyl-CoA und das *m*-Hydroxybenzoyl-CoA als Starter unter *in vitro* Bedingungen. Bei Inkubationen mit *m*-Hydroxybenzoyl-CoA konnte als Produkt ein 3,4-Dihydroxyphenylpyron identifiziert werden, das aus einer zweifachen Verlängerung und einer anschließenden Lactonringbildung

resultiert. Ähnliche Produkte wurden auch für die Inkubation mit *o*-Hydroxybenzoyl-CoA erwartet (Liu et al., 2003). Eine Massenanalyse des isolierten Produktes konnte diese Erwartung aber nicht bestätigen, da die gefundene Masse von 162 g/Mol für ein Triketidlaktone zu gering ist. Aufgrund der geringen Masse wurde angenommen, dass es sich um ein Diketidlactone handelt. Ein hypothetisch aufgestellter *in vitro* Syntheseweg, ausgehend von einer Verlängerung um eine C₂-Einheit mit anschließender Lactonisierung, hatte das 4-Hydroxycumarin als Endprodukt. Massenspektrometrische Untersuchungen und HPLC-Analysen der kommerziell erhältlichen Referenzsubstanz wiesen die Identität von 4-Hydroxycumarin eindeutig nach.

Durch die Sauerstofffunktion in Position vier sind Derivate dieser Substanz wie z.B. das Dicumarol pharmakologisch äußerst interessant, da sie aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Vitamin K die Blutgerinnung stören können (Abb. 5.1).

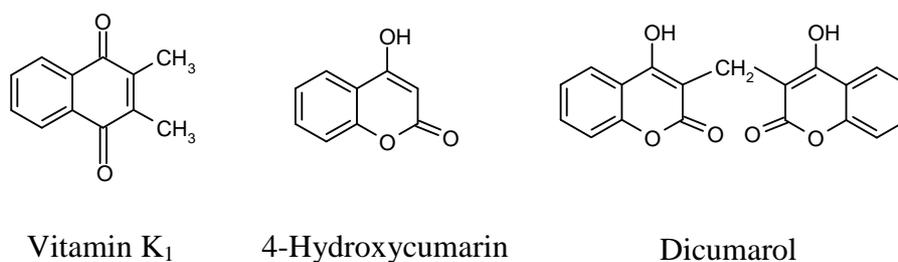


Abb. 5.1 Vergleich der Strukturformeln von Vitamin K₁, 4-Hydroxycumarin und Dicumarol

Die antikoagulierende Wirkung der Vitamin K-Antagonisten besteht in der Hemmung des Vitamin K-Konversionszyklus vom Vitamin K-Epoxid zum Vitamin K in reduzierter Form, welches dann als Hydrochinon vorliegt. Die in der Leber produzierten Gerinnungsfaktoren Faktor II (Prothrombin), Faktor VII (Proconvertin), Faktor IX (Antihämophiles Globulin B) und Faktor X (Stuart-Prower Faktor) werden in Anwesenheit von Vitamin K-Hydrochinon als Cofaktor durch Vitamin K-abhängige Proteine aktiviert, indem Glutamatreste der Faktoren durch posttranslationale Carboxylierung zu γ -Carboxyglutamat überführt werden (Abb. 5.2). Dabei werden die Hydrochinon-Moleküle in Anwesenheit von Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff zu Vitamin K-Epoxid oxidiert. Da für die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren aber Vitamin K-Hydrochinon benötigt wird, muss das Epoxid durch zwei Reduktasen wieder in den reduzierten Zustand überführt werden. Die erste dieser Reduktasen ist sehr sensitiv gegenüber Antikoagulanzen der Cumarinklasse, so dass durch deren Hemmpotenzial der initiale Reduktionsschritt zum natürlichen Vitamin K nicht stattfinden kann.

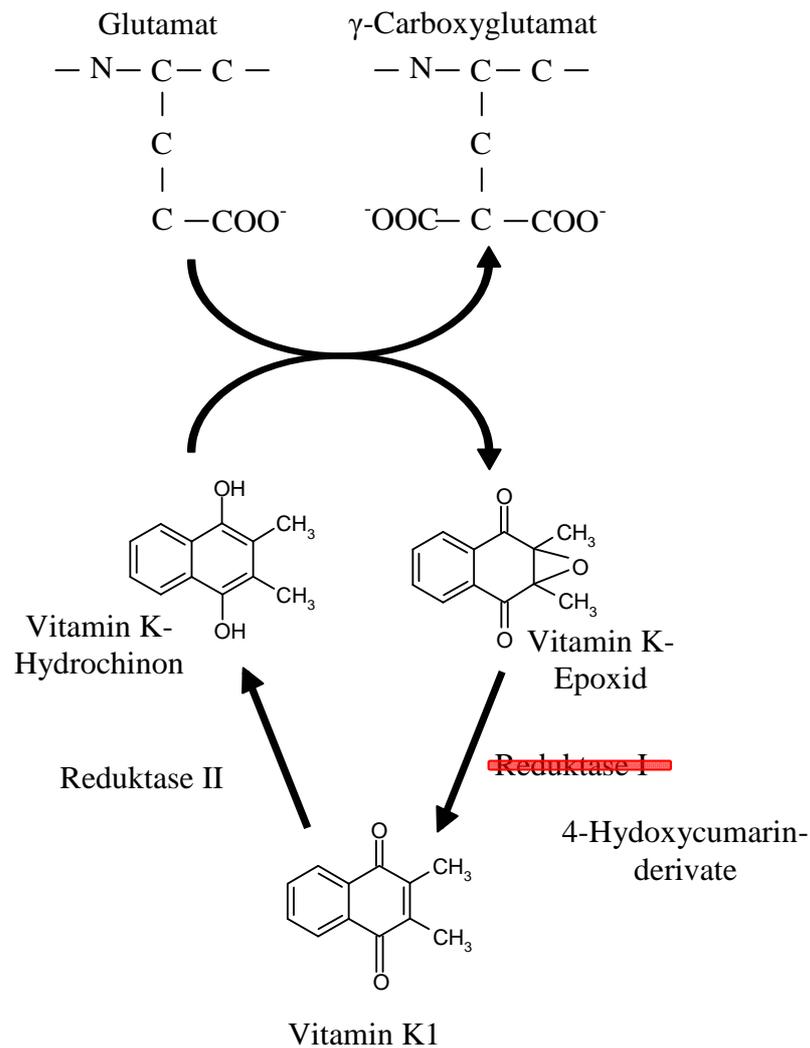


Abb. 5.2 Schematische Darstellung des Vitamin K-Konversionszyklus

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Cumarine mit Vitamin K blockieren die Antikoagulanzen irreversibel das aktive Zentrum der Reduktase I und die zur Verfügung stehende Anzahl der freien Vitamin K-Hydrochinon-Moleküle wird verringert. Durch die geringe Konzentration des Hydrochinons ist eine biologische Aktivierung der Gerinnungsfaktoren nicht mehr uneingeschränkt möglich und die Hämostase wird sowohl auf dem sofort eintretenden extravaskulären Weg als auch auf dem später vermittelten intravaskulären Weg der Blutgerinnung gestört (Hirsh et al., 2001). Zusätzlich zu der Wirkung auf die Gerinnungsfaktoren stört 4-Hydroxycumarin auch die γ -Carboxylierung der blutgerinnungsregulierenden Proteine C und S (Abb. 5.3), so dass die blutungsfördernde Wirkung zusätzlich verstärkt wird (Mutschler, 2003). Neben der antikoagulativen Eigenschaft

wird auch über eine cytotoxische Wirkung der Cumarine diskutiert. So wurde *in vitro* die cytotoxische Aktivität auf Tumorzellen von 4-Hydroxycumarin und anderen Cumarinderivaten nachgewiesen (Roskopf et al., 1992).

In der Literatur lassen sich als bekanntestes Beispiel für pflanzliche Vitamin K-Antagonisten die Inhaltsstoffe des *Melilotus officinalis* (Süßklee) aus der Familie Fabaceae finden. Diese vegetativ anspruchslose Pflanze ist vor allem im Bereich des Nordwestens der USA und dem westlichen Kanada weit verbreitet und wird in der Viehhaltung als Futterpflanze verwendet. In den Vakuolen der Pflanze wird als Vorstufe der Cumarine das Melilotosid akkumuliert. Trocknungsprozesse während der Lagerung setzen dieses Glukosid frei und cytosolische β -Glucosidasen hydrolysieren den Zucker, so dass als Aglykon die 2-Hydroxycumarinsäure ungebunden vorliegt. Durch eine cis-trans-Isomerisierung und anschließende Cyclisierung entsteht das Cumarin, das für den charakteristisch süßen Geruch des getrockneten Steinklees verantwortlich ist (Rimpler, 1999). Das Cumarin des Süßklee hat keine blutverdünnende Wirkung und daher kann das Heu als Futterpflanze eingesetzt werden. Unter feuchten Lagerungsbedingungen aber können verschiedene *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten die Cumarinmoleküle zu 3,3'-Methylen-bis-4-hydroxycumarin (Dicumarol) metabolisieren. Diese Verbindung besitzt ein hohes blutverdünnendes Potenzial mit einer geringen therapeutischen Breite und einer langen Halbwertszeit, so dass seit Anfang der 40er Jahre mehrere Veröffentlichungen von der „sweet clover disease“ berichten, an der nach dem Verzehr von verschimmeltem Süßkleeheu bis zu mehrere hundert Rinder verendeten (Blakley, 1980; Radostits et al., 1980). Nach der Isolierung und Strukturaufklärung des Dicumarols diente es als Grundlage für die Synthese von Strukturanalogen wie z.B. Phenprocumen und Warfarin, die aufgrund ihrer guten Wirksamkeit und kontrollierbaren Halbwertszeit als Basis der modernen antithrombischen Therapie gelten. Ein Vergleich des antikoagulierenden Potenzials des 4-Hydroxycumarins mit dem des Dicumarols zeigt, dass das Produkt der BIS mit dem Starter *o*-Hydroxybenzoyl-CoA nur ungefähr 1/800 der Wirkung des Dicumarols besitzt (Overman et al., 1943).

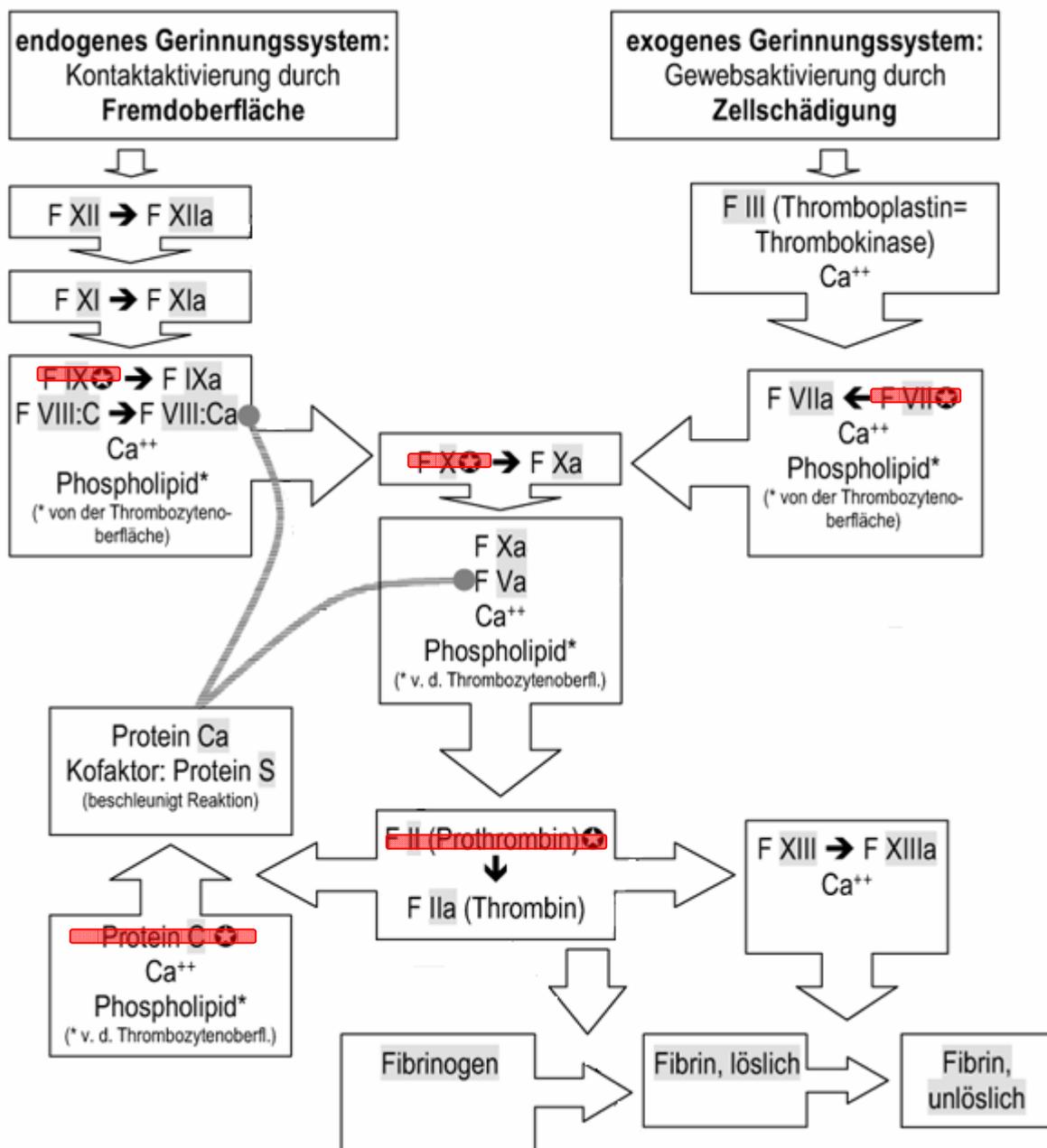


Abb. 5.3 Darstellung der Gerinnungskaskade. Die durch Cumarinderivate beeinflussten Gerinnungsfaktoren sind rot gekennzeichnet

Die Quartärstruktur der BIS I zeigt den für die PKS typischen Aufbau eines Homodimers. Untersuchungen an PKS zeigten, dass jedes Monomer ein aktives Zentrum besitzt, welches unabhängig von dem Zentrum des anderen Monomers katalytisch aktiv ist. Durch Coexpression konnten Heterodimere von aktiven und inaktiven STS-Monomeren erzeugt werden, bei denen nach Inkubation die Produkte in geringerer Menge im Vergleich zum

Wildtyp detektiert wurden (Tropf et al., 1995). Die einzelnen Monomere können in zwei strukturelle Bereiche eingeteilt werden. Die obere Domäne des BIS-Monomers kann als $\alpha\beta\alpha$ -Struktur beschrieben werden (Abb. 4.53). Dieses Motiv ist in verschiedenen Enzymklassen verbreitet und konnte zuerst durch die Kristallisierung einer 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben werden, die an den finalen Schritten der β -Oxidation beteiligt ist (Mathieu et al., 1997). In der Literatur lassen sich auch für kondensierende Enzyme wie die PKS diese Strukturelemente finden. Durch die Kristallstruktur der CHS von *Medicago sativa* konnte gezeigt werden, dass auch hier die $\alpha\beta\alpha$ -Struktur im oberen Bereich des Enzyms zu finden ist (Ferrer et al., 1999). Dasselbe gilt für die STS von *Pinus sylvestris* (Austin et al., 2004). Im unteren Bereich befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms. Die beiden aktiven Zentren der Homodimere sind bis auf die Verknüpfungspunkte vollständig von Aminosäureresten des jeweiligen Monomers umgeben. Die aufgeklärte Struktur zeigt, dass die einzelnen Ketten durch eine Schlaufe verknüpft werden, die zwischen den beiden Aminosäuren Met 134 und Pro 135 des jeweiligen Monomers entsteht (Abb. 4.52). Die CHS von *Medicago sativa* besitzt die gleiche Struktur zur Verknüpfung (Ferrer et al., 1999) und auch die Monomere der STS von *Pinus sylvestris* sind auf diese Weise verknüpft, nur dass hier das Met gegen ein Leu ausgetauscht ist (Austin et al., 2004). Neben dieser Verbindungsart sind die CHS- und STS-Monomere zusätzlich durch zwei α -Helices am N-Terminus verbunden, indem sich die Enden gegenseitig umschlingen. Im Gegensatz dazu lässt sich diese Bindestelle bei der BIS I nicht finden. Die Kristallstruktur der BIS zeigt auf der Aminosäureebene die drei in allen Typ III-PKS streng konservierten Aminosäuren (Cys 161, His 302 und Asn 335), die die katalytische Triade bilden. Durch Mutationsversuche an der STS von *Arachis hypogaea* und der CHS von *Sinapis alba* konnte die Bedeutung des Cysteins für die katalytische Aktivität schon früh belegt werden, da der Ersatz dieser zentralen Aminosäure durch einen anderen Rest eine vollständige Aktivitätslöschung zur Folge hatte (Lanz et al., 1991). Spätere Versuche mittels Blockade der schwefelhaltigen Aminosäure durch Zugabe von Iodoacetamid bestätigten, dass das Cystein an der Kondensierungsreaktion beteiligt ist, aber auf die ablaufende Decarboxylierungsreaktion des Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA keinen Einfluss hat. Erst durch die Zugabe eines Histidin-Inhibitors, Diethylpyrophosphat (DPC), kam es zu dem Effekt, dass sowohl die Kondensierungsreaktion als auch die Decarboxylierungsreaktion unterbunden wurde. Mit diesem Versuch konnte die katalytische Aktivität des Histidins im aktiven Zentrum der Typ III-PKS nachgewiesen werden (Suh et al., 2000). Mit der Kristallisierung

der CHS von *Medicago sativa* und den erhaltenen Angaben über die Elektronendichteverteilung konnten auch die Bedeutung des Asn und der gesamte Reaktionsmechanismus der Kondensationsreaktion geklärt werden. Initiiert wird die Bildung des linearen Ketidintermediates durch eine kovalente Bindung des als CoA-Ester aktivierten Substrates an das Cystein im aktiven Zentrum. Dazu wird der Cysteinrest 161 durch eine Imidazol (His 302)-Thiolat-Wasserstoffbrücke aktiviert (Abb. 5.4). Gleichzeitig wird über eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Substrat-CoA-Thioesters und der Seitenkette des Asn 335 das Startmolekül in der Nähe des aktivierten Cysteins stabilisiert. Durch Cokristallisierung der CHS von *Medicago sativa* mit Hexanoyl-CoA konnte die H-Brücke zwischen dem Asn und dem Carbonylsauerstoff des CoA-Thioesters nachgewiesen werden (Jez et al., 1999). Nach einem nucleophilen Angriff des Cysteins auf das Substrat und der gleichzeitigen Abspaltung des Coenzym A-Restes ist das Substrat fest über eine neue Thioesterbindung an den Cysteinrest 161 gekoppelt (Ferrer et al., 1999). Größere Bedeutung besitzt die Asparaginsäure 335 in der separat verlaufenden Decarboxylierungsreaktion. Zusammen mit dem Histidin 302 fixiert sie das Malonyl-CoA in der Nähe des kovalent gebundenen Substratthioesters über H-Brücken. Vor allem Wechselwirkungen zwischen der Seitenkette der Asparaginsäure und dem aus dem Malonyl-CoA resultierenden Carbanion-CoA stabilisieren dieses Anion in der Enolform. Mittels eines nucleophilen Angriffs des Carbanions wird die C₂-Einheit auf das Startersubstrat übertragen und das resultierende Produkt vom Cystein des aktiven Zentrums abgespalten. Der freie Diketid-CoA-Thioester kann dann wieder kovalent an den Cysteinrest gebunden werden und über weitere Verlängerungsschritte entsteht das lineare Polyketid-Intermediat (Ferrer et al., 1999) (Abb. 5.4). Eventuell ist Phenylalanin 212 beteiligt, das einen unpolaren „Schutzschild“ bildet, damit die Decarboxylierungsreaktion ungestört ablaufen kann (Jez et al., 2000).

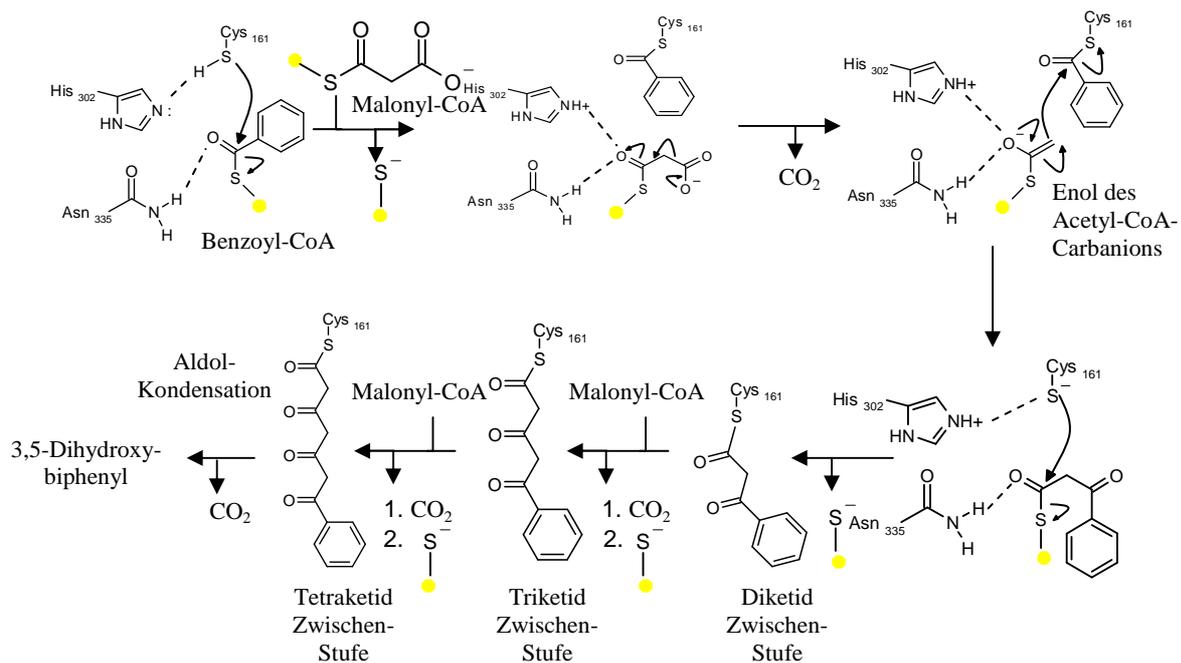


Abb. 5.4 Reaktionsmechanismus der BIS, auf dem die Bildung der Polyketid-Zwischenstufen basiert. ● = CoA

Direkt in Nachbarschaft zur katalytischen Triade befinden sich die tunnelartigen Strukturen, in denen sich die Substrate und Produkte während der Enzymreaktion befinden. Lys 52, Arg 55, Lys 59 und Ala 307 bilden den CoA-Bindetunnel, der die Substratbindetasche mit der Proteinoberfläche verbindet. Die Cokristallisierung der CHS von *Medicago sativa* mit Malonyl-CoA zeigte, dass die an der Proteinoberfläche liegenden Aminosäuren Lys 52, Arg 55 und Lys 59 ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Phosphatgruppen des CoA-Restes ausbilden. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amid-Stickstoff des Ala 307 im Rückgrat und der ersten Carbonylgruppe des Panthotenarmes des Coenzym A positionieren das Thioester-gebundene Substrat in der Nähe des Cys 161 (Ferrer et al., 1999). Am innenliegenden Ende des CoA-Bindetunnels befindet sich die Substratbindetasche, die durch die Aminosäuren Ser 130, Glu 189, Thr 191, Phe 194 und Gly 337 ausgekleidet wird. Die Cokristallisierung der *M. sativa* CHS mit dem Produkt Naringenin zeigte, dass das Substrat hauptsächlich durch van der Waals-Wechselwirkungen im Enzym fixiert wird. In Position 262 fungiert ein Tyrosinrest als Pfortner zwischen der Substratbindetasche und der Cyclisierungstasche. Eine ähnliche Funktion wird in der STS von *Pinus sylvestris* einem Phenylalaninrest zugeschrieben (Austin et al., 2004). Die Cyclisierungstasche bildet die größte Höhle des aktiven Zentrums und neben dem Pfortner Tyr 262 wird sie durch Ala 129, Met 134, Phe 212, Val 251, Ala 253 und Pro 374 definiert. In

dieser Tasche findet die Cyclisierung und Aromatisierung des intermediären Polyketids zum Produkt statt. Wie bereits erwähnt können die Produkte der PKS III-Superfamilie durch unterschiedliche Cyclisierungsreaktionen entstehen (Austin u. Noel, 2002). In der Literatur wird für den Ringschluss der ubiquitären CHS eine C6→C1 Claisen-Kondensation beschrieben. Während dieser Cyclisierungsreaktion wird gleichzeitig das Produkt vom katalytischen Cysteinrest des aktiven Zentrums abgespalten und freigesetzt (Jez et al, 2000). Dasselbe gilt offensichtlich für die BPS von *H. androsaemum*, die den Ringschluss ebenfalls mittels Claisen-Kondensation katalysiert. Der Cyclisierungsreaktion der STS von *Pinus sylvestris* liegt eine C2→C7 Aldol-Kondensation zu Grunde, bei der das Produkt nach der Cyclisierung vom katalytischen Cystein abgespalten werden muss. Anderenfalls könnte das Produkt des C2-C7-Ringschlusses nicht aus dem aktiven Zentrum entlassen werden. Durch Kristallisierung der STS konnte die Ursache für den sogenannten Aldolschalter ausgemacht werden. Der Vergleich der Kristallstrukturen von CHS und STS zeigt, dass der Austausch des Serinrestes 133 durch Threonin in der STS den direkt benachbarten Threoninrest 132 in Bindungslänge einer Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül bringt, das im aktiven Zentrum durch einen gegenüberliegenden Serinrest stabilisiert wird. Im Zusammenspiel mit der Carboxylgruppe eines in allen Typ III-PKS hoch konservierten Glutaminsäurerestes an der Rückseite des aktiven Zentrums entsteht so ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, das ganz ähnlich in einer Typ II Thioesterase aus *E.coli* vorkommt (Abb. 5.5).

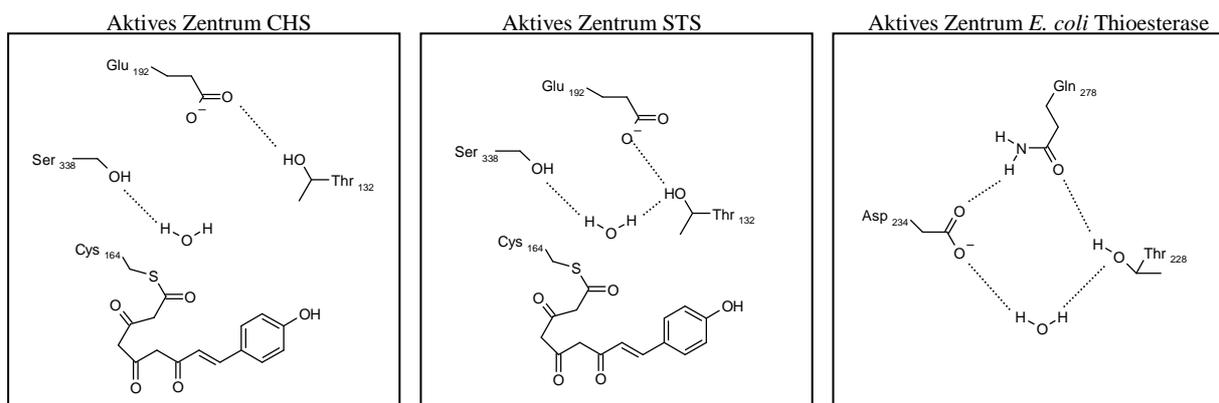


Abb. 5.5 Vergleich der Bindungsverhältnisse in den aktiven Zentren der CHS und STS und einer *E. coli*-Thioesterase

Durch diese kryptische Thioesteraseaktivität ist es möglich, das Polyketid vom katalytischen Cystein zu trennen (Austin et al., 2004). Die Erzeugung einer Thioesteraseaktivität durch Aminosäureaustausch scheint im Vergleich zu einem kompletten Umbau der Cyclisierungshöhle evolutionär gesehen die einfachste Variante für eine Funktionsänderung zu sein, da ein Umbau zwangsläufig zu einer vollständigen Konformationsänderung im Molekül führen würde. Auch die BIS bildet das 3,5-Dihydroxybiphenyl über eine Aldol-Kondensation des linearen Tetraketidintermediates. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der BIS I und der STS von *Pinus sylvestris* zeigt, dass bei der BIS ein anderer Mechanismus zur Spaltung des Thioesters vorliegen muss. Die für die Thioesteraseaktivität wichtigen polaren Aminosäuren Threonin 132 und Serin 338 der STS sind bei der BIS durch die unpolaren Aminosäuren Alanin 129 und Glycin 337 ausgetauscht, so dass es theoretisch zu keiner Ausbildung eines H-Brückennetzwerkes über ein fixiertes Wassermolekül nach dem Beispiel STS kommen kann. Ein Vergleich der Strukturen von BIS I und STS auf Aminosäureebene bestätigt, dass die STS ein Wasserstoffbrückennetz ausbilden kann, während die BIS I nicht über die benötigten Aminosäuren verfügt. Außerdem konnte das erforderliche Wassermolekül in der Nähe des katalytischen Cysteins nicht detektiert werden (Abb. 5.6). Die Struktur der BIS I zeigt im Bereich von Ala 129 bis Met 134 eine deutliche Konformationsänderung des Rückgrats im Vergleich zur STS in diesem Bereich (Abb. 5.7). Dieser Konformationsunterschied könnte auch für die Cyclisierung mittels Aldol-Kondensation verantwortlich sein. Allerdings beweist eine Gegenüberstellung von BIS I und CHS, dass diese beiden Enzyme im Bereich des aktiven Zentrums fast deckungsgleich sind (Abb. 5.8). Somit liegt bei der BIS I eine Grundstruktur vor, wie sie auch bei Enzymen mit Claisen-Kondensation als Cyclisierungsmechanismus vorkommt. Eine Überlagerung der Raumstruktur im Bereich des aktiven Zentrums mit der Karte der Elektronendichte zur Bestimmung weiterer Möglichkeiten für die veränderte Cyclisierung zeigt, dass das Schwefelatom des katalytischen Cys 161 durch zwei Sauerstoffatome in oxidierter Form vorliegt (Abb. 5.9). Durch diese Sauerstoffatome ist es nicht mehr möglich, den Originalzustand des aktiven Zentrums zu definieren, da die polaren Sauerstoffmoleküle alle möglichen nicht kovalenten Bindungsmöglichkeiten zur Ausbildung einer Thioesteraseaktivität unterdrücken. Deshalb bleibt der Mechanismus der Aldol-Kondensation bei der BIS von *Sorbus aucuparia* vorerst ungeklärt, so dass weitere Kristallisierungs- und Cokristallisierungsversuche notwendig sind, um das aktive Zentrum im nativen Zustand darzustellen.

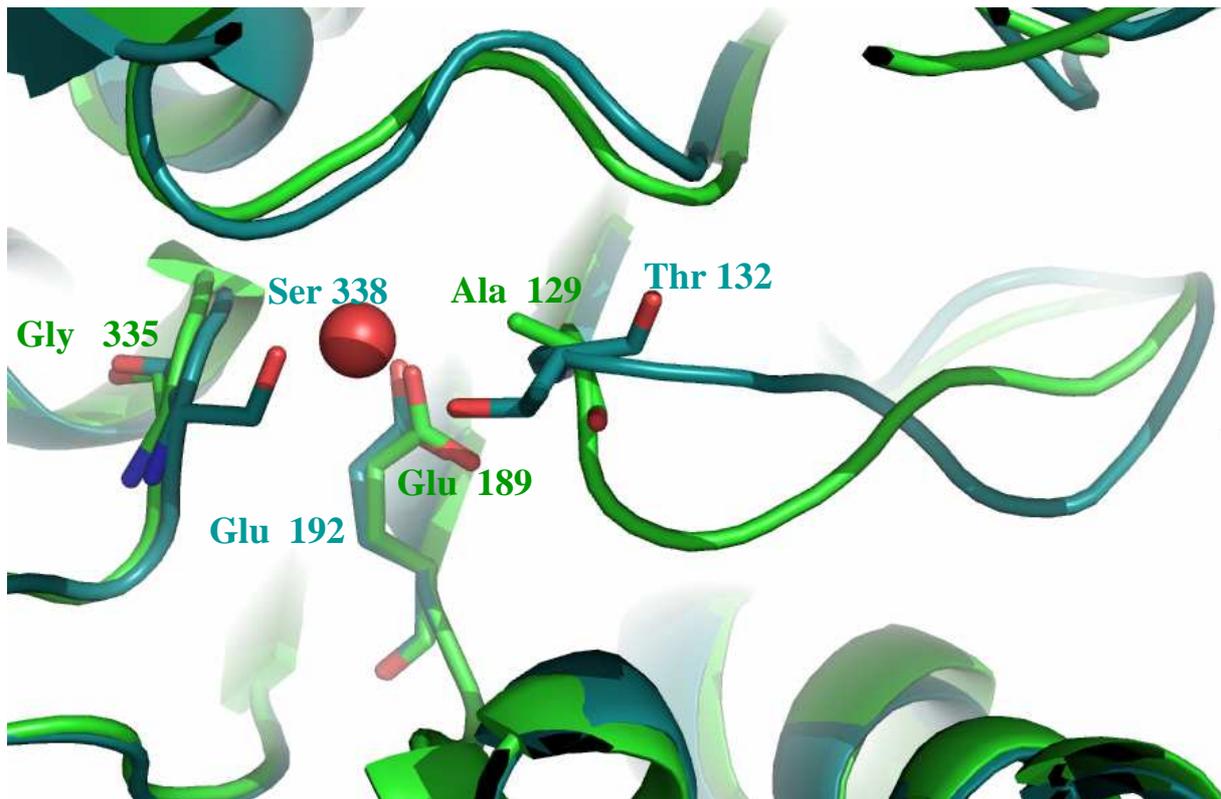


Abb. 5.6 Vergleich der aktiven Zentren von BIS I (grün) und STS (cyan). Die Zählung der Aminosäuren entspricht dem jeweiligen Enzym. Der rote Punkt symbolisiert das fixierte Wassermolekül in der STS, das über H-Brücken mit Threonin und Serin stabilisiert wird und als aktiviertes nukleophiles Wassermolekül die Grundlage für die Thioesteraseaktivität bildet. Rechts im aktiven Zentrum ist deutlich der Konformationsunterschied im Grundgerüst der Enzyme erkennbar.

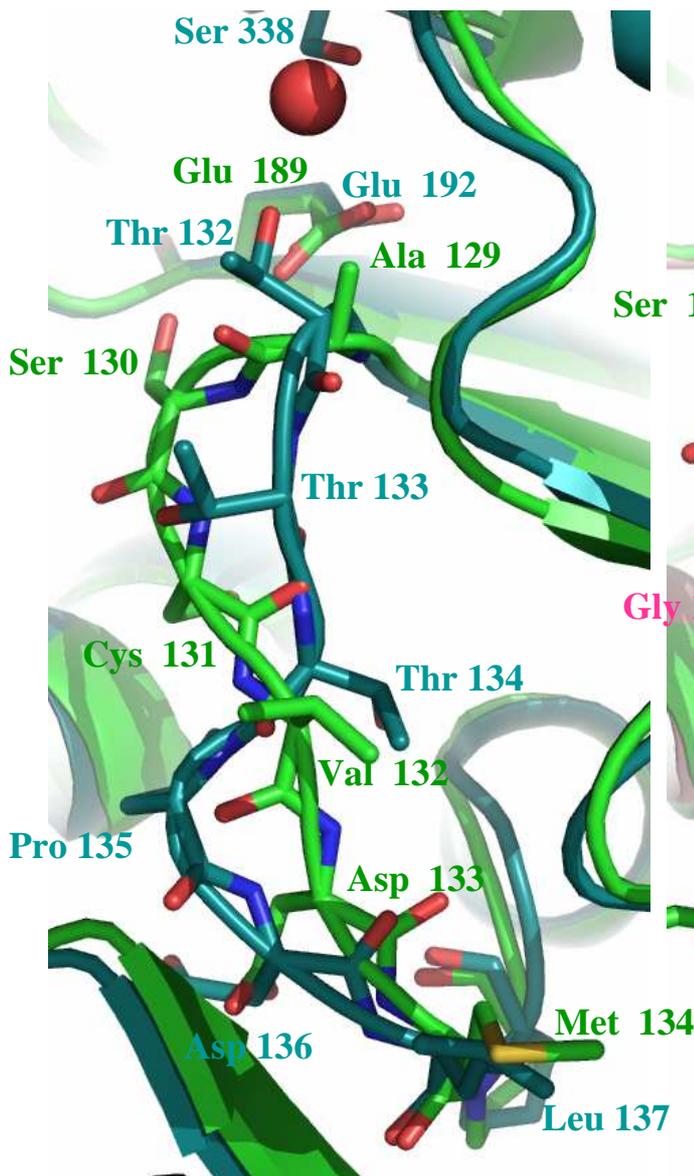


Abb. 5.7 Vergleich der Konformation von BIS I (grün) und STS (cyan). Die Zählung der Aminosäuren entspricht dem jeweiligen Enzym.

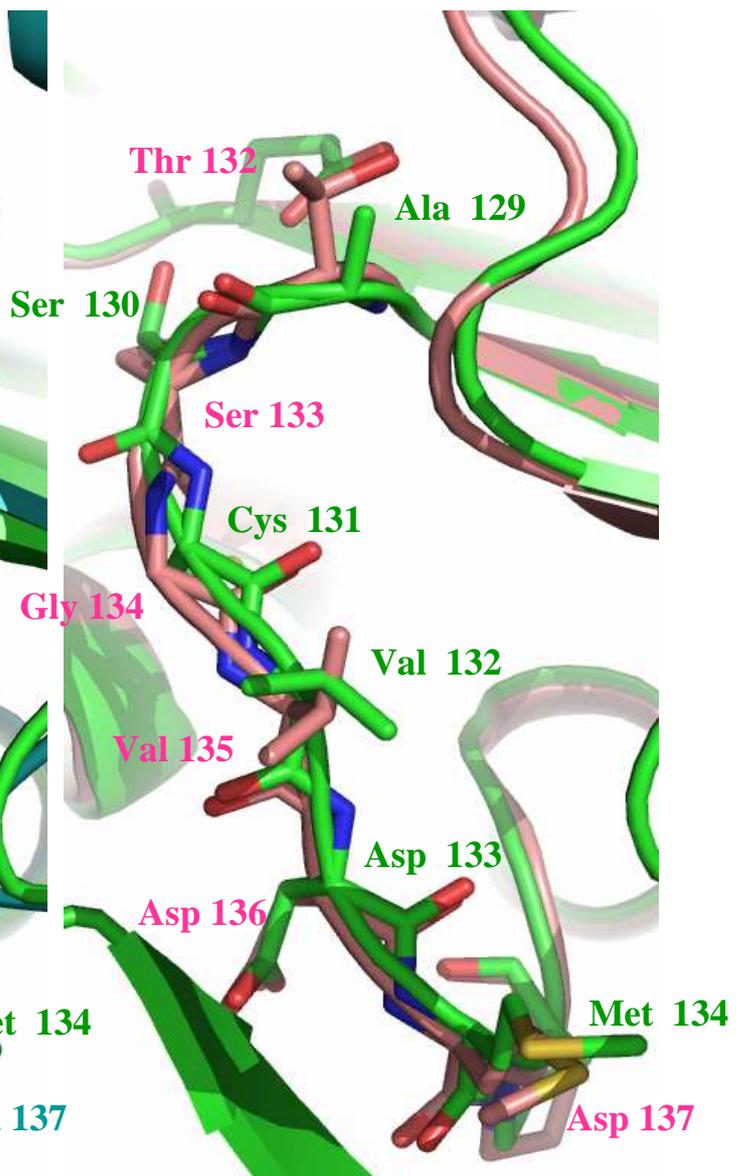


Abb. 5.8 Vergleich der Konformation von BIS I (grün) und CHS (pink). Die Zählung der Aminosäuren entspricht dem jeweiligen Enzym.

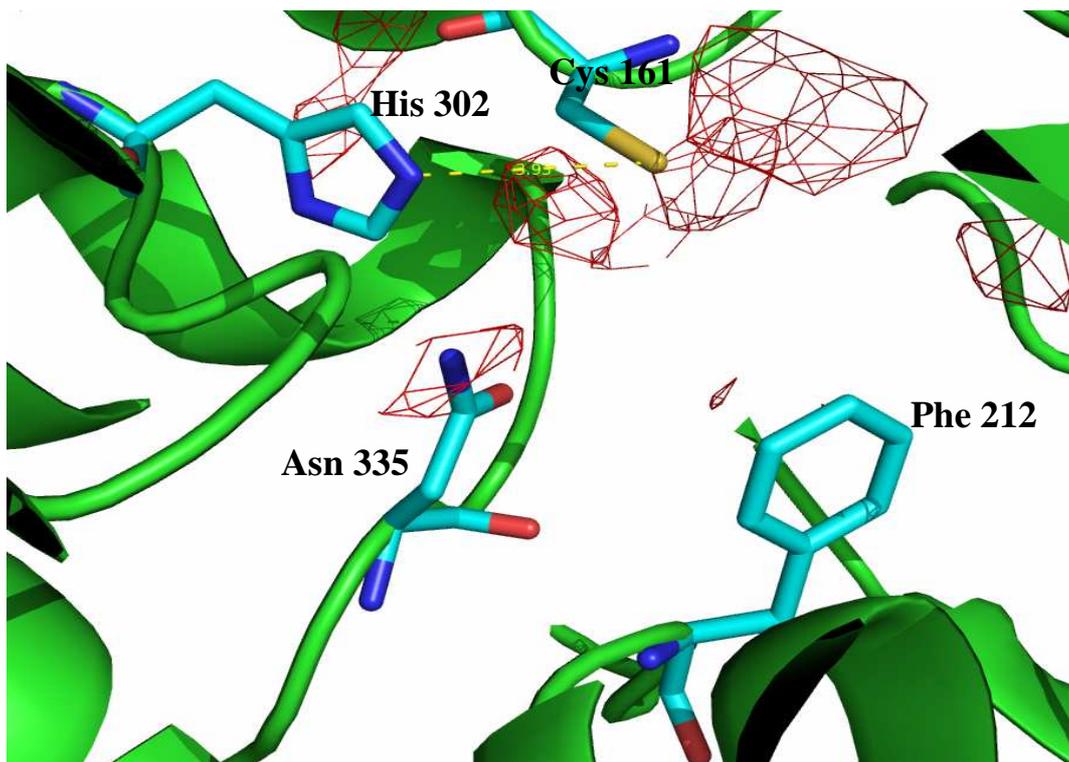


Abb. 5.9 Überlagerung der BIS I-Raumstruktur im Bereich des aktiven Zentrums mit der Elektronendichtekarte. In Nachbarschaft zum Cystein liegen die rot dargestellten Elektronenwolken der eingelagerten Sauerstoffmoleküle.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die enzymatische Charakterisierung der Biphenylsynthase I von *Sorbus aucuparia*. Da die Klonierung schon abgeschlossen war, musste ein Expressionssystem entwickelt werden, so dass die BIS I als wasserlösliches, enzymatisch aktives Protein vorlag. Die besten Proteinausbeuten nach Enzyminduktion mit IPTG wurden bei einer Temperatur von 25,0 °C über einen Zeitraum von 4,0 – 24,0 h erreicht.

Nach Zellaufschluss durch Ultraschall wurde mittels Affinitätschromatographie die BIS I aufgereinigt. Die kinetische Charakterisierung erbrachte ein Temperaturoptimum von 35,0 °C und ein pH-Optimum von pH 7,0 in 0,1 m KH₂PO₄. Als bevorzugtes Substrat wurde Benzoyl-CoA umgesetzt. Für die Inkubation der Polyketidsynthase mit Benzoyl-CoA ergab sich ein K_m-Wert von 0,7 ± 0,03 µM und der K_m-Wert für Malonyl-CoA konnte mit 6,38 ± 0,2 µM berechnet werden. Die Proteingröße konnte per Gelfiltration mit 83,16 kDa beschrieben werden. Für die katalytische Aktivität ergab sich ein Wert von 10181 M⁻¹sec⁻¹.

Außer dem physiologischen Substrat Benzoyl-CoA akzeptierte die Biphenylsynthase unter in vitro Bedingungen auch das *m*-Hydroxybenzoyl-CoA und das *o*-Hydroxybenzoyl-CoA als Startersubstrate. Die Produkte wurden mit Hilfe der ESI-MS Analyse untersucht und identifiziert. Bei Inkubationen der BIS I mit *m*-Hydroxybenzoyl-CoA konnte ein Dihydroxyphenylpyron und bei der Inkubation mit *o*-Hydroxybenzoyl-CoA konnte das 4-Hydroxycumarin als Produkt bestimmt werden.

Neben der Charakterisierung sollten zur Aufklärung der Cyclisierungsmechanismen die Biphenylsynthase von *Sorbus aucuparia* und die Benzophenonsynthase von *Hypericum androsaemum* kristallisiert und strukturell beschrieben werden. Dazu musste ein Aufreinigungssystem entwickelt werden, das den Anforderungen an Reinheit und Konzentration des Proteins gerecht wurde. Da die Proteine mit N-terminalen 6x His-Tags expremiert wurden, konnten diese leicht über eine zweifache Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Um Störungen der Kristallisation durch Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit dem His-Tag zu vermeiden, musste dieser vom gewollten Protein abgespalten und getrennt werden.

Bei der BIS I erfolgte die Abspaltung des His-Tags mit einer Trypsinmodifikation, die dabei eine Enterokinasesequenz zum Abbau erkannte. Da das Trypsin selbst über einen nicht abspaltbaren Polyhistidinrest verfügte, konnte es mittels Affinitätschromatographie leicht abgetrennt werden.

Bei der BPS erfolgte die Abspaltung des Fusionspeptides mit Hilfe von Thrombin (Novagen). Zur Abtrennung der Enterokinase und der abgespaltenen Polyhistidinreste musste eine Gelfiltration durchgeführt werden, um die Anforderungen an die Reinheit des Proteins erfüllen zu können.

Für die Kristallisierung der Proteine wurden die Methoden des Dampfdiffusionsverfahrens angewandt. Zur Festlegung der Kristallisationsparameter von BIS I und BPS wurde ein Screening mit verschiedenen Pufferbedingungen nach der „sitting drop“ Methode durchgeführt. Im Fall der BIS I konnte eine Optimierung der Kristallisierung durch Verwendung der „hanging drop“ Methode erzielt werden. Dieses Verfahren war am effektivsten, nachdem ein Kristallisationskeim nach der Methode des Makroseedingsverfahrens in den neuen Kristallisationsansatz überführt worden war.

Mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse konnten für die BIS I zwei vollständige Datensätze aufgenommen werden. Diese dienen der Berechnung der Struktur des Proteins nach der Methode des Molekularen Ersatzes, bei der die Struktur der CHS von *Medicago sativa* als Suchmodell benutzt wurde. Aus der berechneten Struktur konnten die Malonyl-CoA-, die Substratbinde- und die Cyclisierungstasche definiert und dargestellt werden. Die molekulare Beschreibung des Cyclisierungsmechanismus der Aldol-Kondensation konnte aus den gewonnenen Datensätzen leider nicht erfolgen.

Die Optimierung der Kristallisierung der BPS und die Aufnahme des Beugungsmusters für dieses Enzym wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, I., Watanabe, T., Noguchi, H., 2004. Enzymatic formation of long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases. *Phytochemistry* 65, 2447-2453.
- Austin, M.B., Bowman, M. E., Ferrer, J.-L., Schröder, J., Noel, J.P., 2004. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 11, 1179-1194.
- Austin, M.B., Noel, J.P., 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* 20, 79-110.
- Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R.A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P.P., Kundu, T.K., 2004. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 32, 33716-33726.
- Beasley, V., 1999. *Veterinary Toxicology*. Kapitel: Toxicants that interfere with the function of vitamin K. Ithaca Verlag, New York, 1. Auflage, Internet: www.Ivis.org (Intentional veterinary information service).
- Berkner, K.L., 2000. The vitamin K-dependent carboxylase. *The Journal of Nutrition* 130, 1877-1880.
- Blakley, B.R., 1985. Moldy sweet clover (dicoumarol) poisoning in Saskatchewan cattle. *Canadian Veterinary Journal* 26, 357-360.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 245-248.
- Brand, S., Hölscher, D., Schierhorn, A., Svatos, A., Schröder, J., Schneider, B., 2006. A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis. *Planta* 224, 413-428.
- Cortez, D.A.G., Filho, B.A.A., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., Martson, A., Hostettmann, K., 2002. Antibacterial activity of biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. *Pharmaceutical Biology* 7, 485-489.
- Czygan, F.-C., 2003. Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts. *Pharmazie in Unserer Zeit* 32, 184-190.

- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, S., Britsch, L., Schröder, J., 1992. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology* 18, 489-503.
- Ferrer, J.-L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P., 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* 8, 775-784.
- Giftinformationszentrum der Länder Rheinland-Pfalz und Hessen, 2006. Giftinfo Vogelbeere (*Sorbus aucuparia*). www.giftinfo.uni-mainz.de.
- Haene, K., 2002. Die Vogelbeere (*Sorbus aucuparia*) - Baum des Jahres 1997. www.Waldwissen.net. Zusammenfassung der Speierling-Jahrestagung 18-19. April 2002, Bremgarten (CH).
- Hagel, I., 2000. Sekundäre Pflanzenstoffe und Nahrungsmittelqualität. *Lebendige Erde* 5, 12-15.
- Harder, S., Bredinn, H.K., 2004. Gestern, heute und morgen: Antikoagulanzen im Überblick. *Pharmazie in Unserer Zeit* 33, 172-180.
- Hartmann, T., Dierich, B., 1998. Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence. *Planta* 3, 443-451.
- Heidinger, K., 2004. Anwendung der Vitamin-K-Antagonisten. *Pharmazie in Unserer Zeit* 3, 236-243.
- Hirsh, J., Dalen, J.E., Anderson, D.R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J., Deykin, D., 2001. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chestjournal* 119, 8-21.
- Ignatushchenko, M.V., Winter, R.W., Bächinger, H.P., Hinrichs, D.J., M.K. Riscoe, M.K., 1997. Xanthenes as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. *FEBS Letters* 409, 67-73.
- Jez, J.M., Bowman, M.E., Noel, J., 2002. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *PNAS* 8, 5319-5324.

- Jez, J.M., Ferrer, J.-L., Bowman, M. E., Dixon, R.A., 2000. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39, 890-902.
- Jez, J. M., Noel, J.P, 2000. Mechanism of chalcone synthase, pK_a of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 50, 39640-39646.
- Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Baumert, A., Maier, W., Gröger, D., U. Matern, U., 1995. Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 27, 681-692.
- Klingauf, P., 2004. Hyperforin-Biosynthese, Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*. Dissertation, TU Braunschweig.
- Knight, A.P., Walter, R.G., 2003. A guide to plant poisoning of animals in North America. Kapitel 5, Plants affecting the blood, Teton NewMedia Verlag New York, 1. Auflage.
- Kokubun, T., Harborne, J.B., Eagles, J., Waterman, P.G., 1995. Antifungal biphenyl compounds are the phytoalexins of the sapwood of *Sorbus aucuparia*. *Phytochemistry* 1, 57-59.
- Kokubun, T., Harborne, J.B., 1995. Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 6, 1649-1654.
- Kreuzaler, F., Hahlbruck, K., 1975. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants, formation of bis-noryangonin (4-hydroxy-6[4-hydroxystyryl]2-pyrone) from *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 169, 84-90.
- Lanz, T., Tropf, S., Marner, F.-J., Schröder, J., Schröder, G., 1991. The role of cysteines in polyketide synthases, site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 9971-9976.
- Liu, B., Beuerle, T., Klundt, T., Beerhues, L., 2003. Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* 218, 492-496.
- Liu, B., Falkenstein-Paul, H., Schmidt, W., Beerhues, L., 2003. Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *The Plant Journal* 34, 847-855.

- Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L., 2007. Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta* 225, 1495-1503.
- Mathieu, M., Modis, Y., Zeelen, J.P., Engel, C.K., Abagyan, R.A., Ahlberg, A., Rasmussen, B., Lamzin, V.S., Kunau, W.H., Wierenga, R.K., 1997. The 1.8Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology* 273, 714-728.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage.
- Nakatani, K., Nakahata, N., Arakawa, T., Yasuda, H., Ohizumi, Y., 2002. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E₂ synthesis by γ -mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochemical Pharmacology* 63, 73-79.
- Narasimhachari, N., Rudolff, E.v., 1973. Lyoniside and aucuparins from wood of North American *Sorbus* species. *Phytochemical Reports* 12, 2551-2552.
- Overman, R.S., Stahmann, M.A., Huebner, C.F., Sullivan, W.R., Spero, L., Doherty, D.G., Ikawa, M., Graf, L., Roseman, S., Link, K.P., 1943. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease: anticoagulant activity and structure in the 4-hydroxycoumarin group. *The Journal of Biological Chemistry* 8, 5-24.
- Paniego, N.B., Zuurbier, K.W.M., Fung, S.-J., Heijden, R.v.d., Scheffer, J.J.C., Verpoorte, R., 1999. Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *European Journal of Biochemistry* 262, 612-616.
- Radostits, M., Searcy, G. P., Mitchall, K. G. 1980. Moldy sweetclover poisoning in cattle. *Canadian Veterinary Journal* 21, 155-158.
- Rauh, D., 2003. Überführung der Faktor Xa Bindetasche in Trypsin: Ein Modellsystem für das Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und zur Charakterisierung von Selektivitätsdeterminanten. Dissertation, Universität Marburg.
- Rimpler, H, 1999. Biogene Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2.Auflage.
- Roskopf, F., Kraus, J., Franz, G., 1992. Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives. *Pharmazie* 47, 139-142.
- Schmidt, W., Beerhues, L., 1997. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Letters* 420, 143-146.

- Schröder, J., 1997. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. Trends in plant science reviews 10, 373-378.
- Schwarz, H., 2004. Cytochrom P450-Enzyme aus Zellkulturen von *Centaureum erythrea* und *Hypericum androsaemium*. Dissertation, TU Braunschweig.
- Stützel, H., Schreiner, M., 2004. Gesund durch bioaktive Substanzen im Gemüse. Unimagazin der Leibniz Universität Hannover „Was hält Gesund“ 1/2, 56-60.
- Suh, D.-Y., Fukuma, K., Kamagami, J., Yamazaki, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U., 2000. Identification of amino acid residues important in the cyclization reactions of chalcone and stilbene synthases. Biochemical Journal 350, 229-235.
- Suh, D.-Y., Kagami, J., Fukuma, K., Sankawa, U., 2000. Evidence for catalytic cysteine-histidine dyad in chalcone synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications 275, 725-730.
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., Schröder, J., 1995. Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase), a single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones and 6'-deoxychalcones. The Journal of Biological Chemistry 14, 7922-7928.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S.A., Schröder, J., Schröder, G., 1994. Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. Journal of Molecular Evolution. 38, 610-618.
- Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Suh, D.-Y., Sankawa, U., Nishioka, M., Akiyama, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 1999. Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. Federation of European Biochemical Science Letters 460, 457-461.
- Wagner, H., Bauer, R., 1999. Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 6. Auflage.
- Zuurbier, K.W.M., Leser, J., Berger, T., Hofte, A.J.P., Schröder, G., Verpoorte, R., Schröder, J., 1998. 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. Phytochemistry 7, 1945-1951.

Name: Torben Raeth

Geburtsdatum: 03. März 1978

Geburtsort: Salzgitter

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Dipl. Ing. Hartwig Raeth
Barbara Raeth, geb. Fessel

Schulbildung: 1984-1986 Grundschule Elbe, Landkreis Wolfenbüttel
1986-1988 Grundschule Altstadtchule, Stadt Salzgitter
1988-1990 Orientierungsstufe Wiesenschule, Stadt Salzgitter
1990-1997 Gymnasium Salzgitter Bad, Stadt Salzgitter
09.07.1997 Abitur

01.07.1997-30.04.1998 Grundwehrdienst, ABC-Abwehrbattalion,
Höxter

Hochschulstudium: 1998-2002 Studium der Pharmazie an der Technischen Universität
Braunschweig
15.03.2004 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit: 01.12.2002-31.05.2003 Praktisches Jahr in der Schützenplatz
Apotheke, Salzgitter
01.06.2003-30.11.2003 Praktisches Jahr bei der Schaper & Brümmer
GmbH & Co KG, Salzgitter
Seit 01.2004 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. L.
Beerhues in Braunschweig, Betreuung
verschiedener Praktika in der
Pharmazeutischen Biologie