

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen  
von Hydroxycinnamoyltransferasen aus  
*Coleus blumei* und *Glechoma hederacea***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Marion Sander**

**aus Hesborn**

Hesborn im Mai 2010



**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen  
von Hydroxycinnamoyltransferasen aus  
*Coleus blumei* und *Glechoma hederacea***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Marion Sander**

**aus Hesborn**

Hesborn im Mai 2010

---

*Vom Fachbereich Pharmazie*

*der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ 2010 angenommen.*

*Erstgutachterin: Prof. Dr. M. Petersen*

*Zweitgutachter: Prof. Dr. S. M. Li*

*Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2010*

*Der Weg ist das Ziel.*

## Veröffentlichungen, Vorträge und Präsentationen

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden in den folgenden Beiträgen veröffentlicht:

### Publikationen:

1. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **70**:1663-1679
2. Sander M, Petersen M (submitted 2010) Distinct substrate specificities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase, from *Coleus blumei*.

### Vorträge:

1. Strukturelle und biochemische Unterscheidung von Hydroxyzimtsäuretransferasen in Lamiaceen. Treffen der Sektion Naturstoffe der Deutsche Botanischen Gesellschaft in Fulda 2009
2. Rosmarinsäure-Synthase aus *Coleus blumei*. Charakterisierung, Kristallisation und Mutation. Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg 2008
3. Biochemical and structural studies of hydroxycinnamoyltransferases in *Coleus blumei*. Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg 2008
4. Biochemische Untersuchungen zu BAHD-Acyltransferasen aus Lamiaceen. Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg 2009

### Posterpräsentation:

1. Marion Sander and Maike Petersen. Structural and biochemical differences of hydroxycinnamoyltransferases in Lamiaceae. Botanikertagung Leipzig 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. COLEUS BLUMEI UND GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Coleus blumei</i>	1
1.1.2. <i>Glechoma hederacea</i>	1
<b>1.2. ROSMARINSÄURE, CHLOROGENSÄURE UND LIGNIN</b>	<b>2</b>
1.2.1. Rosmarinsäure	3
1.2.2. Chlorogensäure	3
1.2.3. Lignin	4
<b>1.3. BIOSYNTHESE VON ROSMARINSÄURE, CHLOROGENSÄURE UND LIGNIN</b>	<b>4</b>
1.3.1. Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel	5
1.3.2. Ligninbiosynthese	7
1.3.3. Chlorogensäurebiosynthese	8
1.3.4. Rosmarinsäurebiosynthese	9
1.3.5. Biosynthese der Akzeptorsubstrate Shikimisäure, Chinasäure und <i>p</i> -Hydroxyphenyllactat	10
<b>1.4. COA-ESTER ABHÄNGIGE BAHD-HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASEN</b>	<b>11</b>
1.4.1. Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST)	14
1.4.2. Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT)	15
1.4.3. Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyl-transferase (RAS)	17
<b>1.5. BAHD-ACYLTRANSFERASEN</b>	<b>18</b>
<b>1.6. ZIELE DIESER ARBEIT</b>	<b>21</b>
1.6.1. Projekt 1: Hydroxycinnamoyltransferasen aus <i>Coleus blumei</i>	21
1.6.2. Projekt 2: Hydroxycinnamoyltransferasen aus <i>Glechoma hederacea</i>	22
1.6.3. Projekt 3: Evolution von Hydroxycinnamoyltransferasen	22
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1. VERSUCHE ZUR cDNA-KLONIERUNG EINER HST AUS COLEUS BLUMEI</b>	<b>23</b>
2.1.1. RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi	23
2.1.2. cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)	24
2.1.3. Polymerase Kettenreaktion zur Amplifizierung von cDNA	25
2.1.4. Agarosegelelektrophorese	27
2.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit Nucleo-Spin® Extract II	28
2.1.6. Ligation in pGEM®-T-Vektor	29
2.1.7. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation mit Roti®-Transform	30
2.1.8. Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen	32
2.1.9. Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA	33
2.1.10. Anlegen einer Bakteriendauerkultur	33
2.1.11. Quantifizierung der DNA	34
2.1.12. Sequenzierung	34
2.1.13. Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank	34
2.1.14. Isolierung der 5'- und 3'-Enden mit GeneRacer™ Kit	35
2.1.15. Amplifikation der HST aus <i>Coleus blumei</i> zur Vollängensequenz	41
2.1.16. Einbau des PCR-Produkts in den Expressionsvektor pET-15b	43
2.1.17. pET-Vektoren	45
2.1.18. Transformation von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	45
2.1.19. Heterologe Expression der CbHST	46
2.1.20. Reinigung des exprimierten Proteins	47
2.1.21. Abspaltung des His-Tags mit Thrombin	47
2.1.22. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität	48

<b>2.2. VERSUCHE ZUR HERSTELLUNG VON CBRAS-PROTEINKRISTALLEN</b>	<b>49</b>
2.2.1. Expression des CbRAS-Proteins	49
2.2.2. Optimierung der Expression	50
2.2.3. Reinigung des Proteins über His-Tag Affinitätschromatographie	53
2.2.4. Umpuffern der Elutionsfraktion über PD10-Säulen	55
2.2.5. Umpuffern und Aufkonzentrierung durch Dialyse	55
2.2.6. Optimierung der Aufkonzentrierung der CbRAS	56
2.2.7. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	57
2.2.8. Kontrolle der Überexpression und der Proteinreinigung über SDS-PAGE	58
2.2.9. TCA-Fällung zur Aufkonzentrierung der Fraktionen	61
2.2.10. Aktivitätstests zur Kontrolle des Reinigungseffekts	61
2.2.11. Reinigung des Proteins über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	61
2.2.12. Reinigung des Proteins über TSK AF-Blue Affinitätschromatographie	62
2.2.13. Aufreinigung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies	63
2.2.14. Abspaltung des His-Tags mit dem Thrombin CleanCleave™-Kit	65
2.2.15. Untersuchung Stabilität der CbRAS	67
2.2.16. Versuche zur Kristallisation der CbRAS	68
<b>2.3. VERSUCHE ZUR EXPRESSION DER CBRAS ALS GST-FUSIONSPROTEIN</b>	<b>70</b>
2.3.1. pET-41a-Vektor	70
2.3.2. Umklonierung der CbRAS in den Expressionsvektor pET-41a	70
<b>2.4. VERSUCHE ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASEN CBRAS UND CBHST AUS COLEUS BLUMEI</b>	<b>73</b>
2.4.1. In den Enzymtests verwendete Substrate	73
2.4.2. Synthese der CoA-aktivierten Säuren pC-CoA, Caf-CoA, Cin-CoA, Fer-CoA und Sin-CoA	74
2.4.3. Gewinnung von DHPL aus Rosmarinsäure	75
2.4.4. Standardenzymtest zur Bestimmung der RAS-, HST- und HQT-Aktivität	76
2.4.5. HPLC-Analyse	78
2.4.6. Enzymtests zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums	79
2.4.7. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität der CbHST und der CbRAS	80
2.4.8. Hydrolyse der Reaktionsprodukte	85
2.4.9. Enzymtests zur Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max}/K_m$	86
<b>2.5. VERSUCHE ZUR MUTAGENESE DER CBRAS</b>	<b>88</b>
2.5.1. Mutagenese der RAS aus Coleus blumei	88
2.5.2. Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären I	90
2.5.3. Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären II	92
2.5.4. 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	93
<b>2.6. VERSUCHE ZUR KLONIERUNG EINER RAS, EINER HST UND EINER HQT AUS GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>95</b>
2.6.1. Untersuchung von Coleus blumei und Glechoma hederacea auf sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: Rosmarinsäure und Chlorogensäure	95
2.6.2. Versuche zur Klonierung einer Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase aus Glechoma hederacea	95
2.6.2.1. Amplifikation des 5'-Endes der GhRAS mit GeneRacer™ Kit	95
2.6.2.2. Amplifikation des 3'-Endes der GhRAS mit GeneRacer™ Kit	97
2.6.2.3. Amplifikation der RAS aus Glechoma hederacea zur Vollängensequenz	99
2.6.2.4. Herstellung elektrokompenter Zellen	100
2.6.2.5. Transformation von elektrokompenten Zellen	100
2.6.3. Versuche zur Klonierung einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase aus Glechoma hederacea	101
2.6.3.1. Amplifikation des 5'-Endes der GhHST mit GeneRacer™ Kit	101
2.6.3.2. Amplifikation des 3'-Endes der GhHST mit dem GeneRacer™ Kit	102
2.6.3.3. Amplifikation der HST aus Glechoma hederacea zur Vollängensequenz	103



2.6.4.	<i>Versuche zur Klonierung einer HQT</i>	103
2.6.4.1.	Amplifikation des 5'-Endes der putativen GhHQT mit GeneRacer™ Kit	103
2.6.4.2.	Amplifikation des 3'-Endes der putativen GhHQT mit GeneRacer™ Kit	104
2.6.4.3.	Amplifikation der putativen HQT aus <i>Glechoma hederacea</i> zur Vollängensequenz	104
<b>2.7.</b>	<b>VERSUCHE ZUR EXPRESSION UND AUFRÄUIGUNG DER GHRAS, GHHST UND GHHQT SOWIE BESTIMMUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄTEN</b>	<b>105</b>
2.7.1.	<i>Heterologe Expression der GhHCTs</i>	105
2.7.2.	<i>Aufreinigung der GhHCTs über His-Tag-Affinitätschromatographie</i>	105
2.7.3.	<i>Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität der GhHCTs</i>	106
<b>2.8.</b>	<b>VERSUCHE ZUR UNTERSUCHUNG DER EVOLUTION VON HCTS: GENOMISCHE ORGANISATION UND PHYLOGENIE</b>	<b>107</b>
2.8.1.	<i>Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial von <i>Coleus blumei</i> und <i>Glechoma hederacea</i></i>	107
2.8.2.	<i>Isolierung von RAS-, HST und HQT-Genen aus <i>Coleus blumei</i> und <i>Glechoma hederacea</i></i>	108
2.8.3.	<i>Berechnung der Intronspleißstellen mit NetPlant Gene Server</i>	108
2.8.4.	<i>Suche nach BAHD-Acyltransferasen in der UniProt Datenbank</i>	109
2.8.5.	<i>Phylogenetische Analyse von BAHD-Acyltransferasen mit MEGA 4.0</i>	109
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>110</b>
<b>3.1.</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR CDNA-KLONIERUNG EINER CbHST</b>	<b>110</b>
3.1.1.	<i>Entwurf von Primern für eine HST</i>	110
3.1.2.	<i>Polymerase Kettenreaktion mit Primern gegen die konservierten Regionen</i>	110
3.1.3.	<i>Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit RACE-PCR</i>	112
3.1.4.	<i>Bestimmung der Gesamtsequenz der CbHST</i>	114
3.1.5.	<i>Bestimmung der Schnittstellen in der CbHST-Sequenz</i>	114
3.1.6.	<i>Primerdesign von Vollängenprimern und Amplifikation der CbHST-Gesamtsequenz</i>	115
3.1.7.	<i>CbHST-Vollängensequenz</i>	116
3.1.8.	<i>Vergleich der CbHST-Aminosäuresequenz mit anderen Hydroxycinnamoyltransferasen</i>	117
3.1.9.	<i>Bestimmung der Enzymaktivität</i>	118
3.1.10.	<i>Expression und Aufreinigung des CbHST-Proteins</i>	118
<b>3.2.</b>	<b>DISKUSSION ZUR KLONIERUNG EINER CbHST</b>	<b>120</b>
<b>3.3.</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR EXPRESSION UND AUFRÄUIGUNG DER CBRAS ZUR HERSTELLUNG VON CBRAS-PROTEINKRISTALLEN</b>	<b>124</b>
3.3.1.	<i>Expression der CbRAS</i>	124
3.3.2.	<i>Optimierung der Expression</i>	124
3.3.3.	<i>Aufreinigung des exprimierten Proteins</i>	127
3.3.4.	<i>His-Tag-Aufreinigung</i>	128
3.3.5.	<i>Umpuffern der Elutionsfraktionen über PD10-Säulen</i>	128
3.3.6.	<i>Umpuffern und Aufkonzentrierung über Dialyse</i>	128
3.3.7.	<i>Reinigung des Proteins über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung</i>	129
3.3.8.	<i>Reinigung des Proteins über TSK AF-Blue Affinitätschromatographie</i>	129
3.3.9.	<i>Optimiertes Herstellungsprotokoll zur Gewinnung der CbRAS aus dem Proteinrohextrakt</i>	131
3.3.10.	<i>Gewinnung der CbRAS aus inclusion bodies</i>	133
3.3.11.	<i>Optimiertes Herstellungsprotokoll zur Gewinnung der CbRAS aus inclusion bodies</i>	134
3.3.12.	<i>Kristallisation der CbRAS</i>	135
3.3.13.	<i>Abspaltung des His-Tags</i>	136
3.3.14.	<i>Stabilität der CbRAS</i>	136
3.3.15.	<i>Expression der CbRAS als GST-Fusionsprotein</i>	137

<b>3.4. DISKUSSION ZUR EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER CbRAS UND ZUR HERSTELLUNG VON CbRAS-PROTEINKRISTALLEN</b>	<b>139</b>
<b>3.5. ERGEBNISSE ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASEN CBRAS UND CbHST AUS COLEUS BLUMEI</b>	<b>142</b>
3.5.1. <i>Temperatur- und pH-Optimum</i>	142
3.5.1.1. Temperatur- und pH-Optimum der CbHST	142
3.5.1.2. Temperatur- und pH-Optimum der CbRAS	143
3.5.2. <i>Untersuchung der Substratspezifität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen der CbHST und der CbRAS</i>	145
3.5.2.1. Untersuchung der Substratspezifität des Proteins CbHST I	145
3.5.2.2. Untersuchung der Substratspezifität der CbHST II	146
3.5.2.3. Strukturelle Erfordernisse der Akzeptorsubstrate der CbHST	147
3.5.2.4. Untersuchung der Substratspezifität der CbRAS I	148
3.5.2.5. Untersuchung der Substratspezifität der CbRAS II	149
3.5.2.6. Strukturelle Erfordernisse der Akzeptorsubstrate der CbRAS	150
3.5.3. <i>Bestimmung der kinetischen Parameter <math>K_m</math>, <math>V_{max}</math> und <math>V_{max}/K_m</math> der CbHST</i>	150
3.5.3.1. Untersuchung des natürlichen Akzeptors Shikimisäure	150
3.5.3.1.1. pC-CoA plus Shikimisäure	151
3.5.3.1.2. Caf-CoA plus Shikimisäure	151
3.5.3.1.3. Cin-CoA plus Shikimisäure	152
3.5.3.1.4. Fer-CoA plus Shikimisäure	152
3.5.3.1.5. Sin-CoA plus Shikimisäure	153
3.5.3.1.6. Shikimisäure plus pC-CoA	154
3.5.3.1.7. Shikimisäure plus Caf-CoA	155
3.5.3.1.8. Shikimisäure plus Cin-CoA	156
3.5.3.1.9. Shikimisäure plus Fer-CoA	156
3.5.3.1.10. Shikimisäure plus Sin-CoA	157
3.5.3.1.11. Zusammenstellung der mit Shikimat als Akzeptor bestimmten $K_m$ -Werte	158
3.5.3.2. Weitere Akzeptoren: 3-Hydroxyanthranilsäure	158
3.5.3.2.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 3-Hydroxyanthranilsäure	159
3.5.3.2.2. 3-Hydroxyanthranilsäure plus pC-CoA und Caf-CoA	160
3.5.3.3. 2,3-Dihydroxybenzoesäure	161
3.5.3.3.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 2,3 Dihydroxybenzoesäure	161
3.5.3.3.2. 2,3-Dihydroxybenzoesäure plus pC-CoA und Caf-CoA	162
3.5.3.4. 3-Aminobenzoessäure	163
3.5.3.4.1. pC-CoA plus 3-Aminobenzoessäure	163
3.5.3.5. 3-Hydroxybenzoesäure	164
3.5.3.5.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 3OHB	164
3.5.3.5.2. 3OHB plus pC-CoA und Caf-CoA	165
3.5.4. <i>Bestimmung der kinetischen Parameter <math>K_m</math>, <math>V_{max}</math> und <math>V_{max}/K_m</math> der CbRAS</i>	166
3.5.4.1. Untersuchung der Akzeptorsubstrate pHPL und DHPL	167
3.5.4.1.1. pC-CoA plus pHPL	167
3.5.4.1.2. pC-CoA plus DHPL	168
3.5.4.1.3. Caf-CoA plus pHPL	169
3.5.4.1.4. Caf-CoA plus DHPL	170
3.5.4.1.5. pHPL plus pC-CoA	171
3.5.4.1.6. pHPL plus Caf-CoA	173
3.5.4.1.7. DHPL plus pC-CoA	174
3.5.4.1.8. DHPL plus Caf-CoA	175
3.5.4.1.9. Zusammenstellung der $K_m$ -Werte der CbRAS mit und ohne His-Tag	177
3.5.4.1.10. Cin-CoA plus pHPL/DHPL	177
3.5.4.1.11. pHPL/DHPL plus Cin-CoA	178
3.5.4.1.12. Fer-CoA plus pHPL/DHPL	179
3.5.4.1.13. pHPL/DHPL plus Fer-CoA	180
3.5.4.2. Weitere Akzeptoren: Phenyllactat	181
3.5.4.2.1. pC-CoA, Caf-CoA und Cin-CoA plus Phenyllactat	181
3.5.4.2.2. Phenyllactat plus pC-CoA, Caf-CoA und Cin-CoA	182

3.5.4.3.	Weitere Akzeptoren: Tyrosin	184
3.5.4.3.1.	pC-CoA und Caf-CoA plus DL-Tyrosin	184
3.5.4.3.2.	Tyrosin plus pC-CoA und Caf-CoA	185
<b>3.6.</b>	<b>DISKUSSION ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER HYDROXY-CINNAMOYLTRANSFERASEN CbRAS UND CbHST AUS COLEUS BLUMEI</b>	<b>187</b>
3.6.1.	Substratspezifitäten der BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen CbHST und CbRAS aus <i>Coleus blumei</i>	187
3.6.1.1.	Substratspezifität der CbHST	188
3.6.1.2.	Substratspezifität der CbRAS	192
3.6.2.	Übersicht über die Substratspezifitäten der CbHST und der CbRAS	194
3.6.3.	Kinetische Parameter der CbHST und der CbRAS	196
<b>3.7.</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR MUTAGENESE DER CbRAS UND ZU CbRAS-CbHST-CHIMÄREN</b>	<b>204</b>
3.7.1.	Ergebnisse zur Mutagenese der CbRAS	204
3.7.2.	Ergebnisse zur Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären	206
<b>3.8.</b>	<b>DISKUSSION ZUR MUTAGENESE DER CbRAS UND CbRAS-CbHST-CHIMÄREN</b>	<b>209</b>
3.8.1.	Diskussion zur Mutagenese der CbRAS	209
3.8.2.	Diskussion zur Mutagenese der CbRAS-CbHST-Chimären	211
<b>3.9.</b>	<b>ERGEBNISSE: VERSUCHE ZUR KLONIERUNG EINER RAS, EINER HST UND EINER HQT AUS GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>213</b>
3.9.1.	Untersuchung von <i>Coleus blumei</i> und <i>Glechoma hederacea</i> auf sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: Rosmarinsäure und Chlorogensäure	213
3.9.2.	Versuche zur cDNA-Klonierung einer GhRAS	213
3.9.2.1.	Amplifikation des 5'-cDNA-Endes mit einem RAS-spezifischen Primer	213
3.9.2.2.	Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der GhRAS	214
3.9.2.3.	Amplifikation der Vollängensequenz der GhRAS	215
3.9.2.4.	Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der GhRAS	219
3.9.3.	Versuche zur cDNA-Klonierung einer GhHST	220
3.9.3.1.	Amplifikation des 5'-cDNA-Endes mit einem HST-spezifischen Primer	220
3.9.3.2.	Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der GhHST	221
3.9.3.3.	Amplifikation der Vollängensequenz der GhHST	222
3.9.3.4.	Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der GhHST	226
3.9.4.	Versuche zur cDNA-Klonierung einer putativen GhHQT	227
3.9.4.1.	Amplifikation des 5'-cDNA-Endes mit einem RAS-spezifischen Primer	227
3.9.4.2.	Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der putativen GhHQT	227
3.9.4.3.	Amplifikation der Vollängensequenz der putativen GhHQT	228
3.9.4.4.	Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der putativen GhHQT	231
<b>3.10.</b>	<b>DISKUSSION ZUR KLONIERUNG UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EINER RAS, EINER HST UND EINER PUTATIVEN HQT AUS GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>232</b>
3.10.1.	Klonierung einer GhRAS, GhHST und putativen GhHQT	232
3.10.2.	Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung von RAS, HST und putativer HQT	233
<b>3.11.</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR GENOMISCHEN ORGANISATION UND DER PHYLOGENIE DER HCTs AUS COLEUS BLUMEI UND GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>237</b>
3.11.1.	Isolierung des HST-Gens aus <i>Coleus blumei</i>	237
3.11.2.	Isolierung der RAS-, HST- und HQT-Gene aus <i>Glechoma hederacea</i>	239
3.11.3.	Datenbankrecherche nach cDNA- und gDNA-Sequenzen von biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen	243
3.11.4.	Phylogenie	250
3.11.5.	Konservierte Bereiche der BAHD-Acyltransferasen	254
<b>3.12.</b>	<b>DISKUSSION: EVOLUTION VON HCTs: GENOMISCHE ORGANISATION UND PHYLOGENIE DER HCTs AUS COLEUS BLUMEI UND GLECHOMA HEDERACEA</b>	<b>261</b>
3.12.1.	Grundlagen zur Evolution von Sundärstoffwechselwegen	261
3.12.2.	Evolution von BAHD-Acyltransferasen	262
3.12.3.	Evolution von HCTs	263

3.12.4.	<i>Datenbankrecherche nach cDNA-Sequenzen von biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen</i>	264
3.12.5.	<i>Konservierte Bereiche der BAHD-Acyltransferasen</i>	264
3.12.6.	<i>Verwandtschaftsbeziehungen von Hydroxycinnamoyltransferasen</i>	267
3.12.7.	<i>Struktur der genomischen HCT-Sequenzen aus Coleus blumei und Glechoma hederacea</i>	269
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>272</b>
<b>5.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>274</b>
5.1.	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>274</b>
5.2.	<b>AMINOSÄUREN</b>	<b>276</b>
5.3.	<b>NUKLEOBASEN</b>	<b>277</b>
5.4.	<b>IUPAC-STANDARDISIERTE SYMBOLE FÜR UNSPEZIFISCHE NUKLEOBASEN (ZWEI ODER MEHR NUKLEOBASEN KÖNNEN ALTERNATIV EINGESETZT WERDEN)</b>	<b>277</b>
5.5.	<b>VERWENDETE SUBSTRATE IN DEN HCT-ENZYMTESTS</b>	<b>278</b>
5.6.	<b>ABKÜRZUNGEN VON ENZYMEN UND INTERMEDIATEN IN STOFFWECHSELWEGEN</b>	<b>279</b>
5.7.	<b>VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>280</b>
5.7.1.	<i>Chemikalien</i>	280
5.7.2.	<i>Enzyme</i>	281
5.7.3.	<i>Molekularbiologische Reagenzien und Kits</i>	281
5.7.4.	<i>Geräte</i>	282
5.8.	<b>VEKTORKARTEN</b>	<b>284</b>
5.8.1.	<i>pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor</i>	284
5.8.2.	<i>pGEM<sup>®</sup>-4Z-Vektor</i>	285
5.8.3.	<i>pET-15b-Vektor</i>	286
5.8.4.	<i>pET-41a-Vektor</i>	287
5.9.	<b>HPLC-ANALYSE</b>	<b>288</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>310</b>

# Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1. *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*

#### 1.1.1. *Coleus blumei*

Die Buntnessel (*Solenostemon scutellarioides*) ist eine in Europa weit verbreitete Zierpflanze, die v.a. wegen ihrer vielfältigen, meist bunt gefärbten Blätter beliebt ist (Abbildung 1). Obwohl der offizielle botanische Name der Buntnessel *Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd. ist (Rogers 2007), wird in dieser Arbeit der ältere und bekanntere botanische Name *Coleus blumei* verwendet. *Coleus blumei* gehört zur Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae) und weist die typischen Merkmale dieser Pflanzenfamilie auf. Die Buntnessel ist eine krautige Pflanze mit vierkantigem Stengel und dekussierter Blattstellung sowie meist lila gefärbten Lippenblüten. *Coleus blumei* hat als Arzneipflanze in Europa keine Bedeutung. Sie ist weder im Europäischen Arzneibuch noch im Deutschen Arzneibuch monographiert.



**Abbildung 1:** Buntnessel (*Solenostemon scutellarioides*)  
(aus [www.plantoftheweek.org](http://www.plantoftheweek.org))

#### 1.1.2. *Glechoma hederacea*

*Glechoma hederacea* L. (efeublättriger Gundermann, Gundelrebe, Abbildung 2) ist ein in Mitteleuropa beheimatetes ausdauerndes Kraut mit kriechendem Hauptstengel. Der vierkantige Stengel ist wie die Blattstiele häufig blauviolett überlaufen und die Laubblätter sind kreuzgegenständig. *Glechoma hederacea* gehört der Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae) an (Kaufmann und Wink 1994). Die meist lila gefärbten Blüten sitzen in Scheinquirlen in den Achseln der Laubblätter. Das Gundelrebenkraut (*Glechomae*

## Einleitung

*hederaceae herba*, engl.: gill herb, ground ivy herb) ist wegen seines Triterpen-Gehalts an Ursol- und Oleanolsäure, dem antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, im Deutschen Arzneimittel Codex (DAC) monographiert. Experimentelle Wirksamkeitsbelege fehlen allerdings. Es existieren zahlreiche volkstümliche Anwendungsgebiete, wie z.B. Magen-Darmkatarrhe, Erkrankungen der oberen Bronchien, Rheuma und Arthritis.



**Abbildung 2:** Gundermann (*Glechoma hederacea* L.)

© 2005-2010 Dorothy E. Pugh.

Obwohl *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* als Arzneipflanzen bislang kaum von Bedeutung sind, produzieren sie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe von pharmazeutischem Interesse. Dazu zählen Rosmarinsäure und Chlorogensäure.

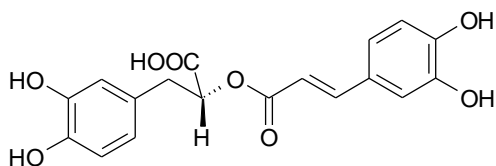
### 1.2. Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Lignin

Rosmarinsäure und Chlorogensäure sind im Pflanzenreich weit verbreitet und werden vermutlich als Abwehrstoffe gegen Herbivore und/oder Pathogene gebildet (Petersen et al. 2009). Es handelt sich um nichtflüchtige, lösliche Phenylpropanoide, die überwiegend in den Solanaceae und den Lamiales zu finden sind (Vogt 2010). Chlorogensäure akkumuliert zudem reichlich in Äpfeln, Birnen, Pflaumen und Kaffee (Niggeweg et al. 2004). Ihr Vorkommen erstreckt sich jedoch weit über das Pflanzenreich. So konnten Rosmarinsäure und Chlorogensäure in frühen Landpflanzen wie Farnen der Gattung *Blechnum* nachgewiesen werden, genauso wie in einigen Monocotylen und höher entwickelten Dicotylen (Petersen et al. 2009). Die meisten der untersuchten Pflanzenarten produzieren entweder Rosmarinsäure oder Chlorogensäure. Einige produzieren beide Phenylpropanoide nebeneinander. So wurde in *Coleus forskohlii* nur Rosmarinsäure und in *Glechoma hederacea* beide phenolische Naturstoffe nachgewiesen (Petersen et al. 2009).

## Einleitung

### 1.2.1. Rosmarinsäure

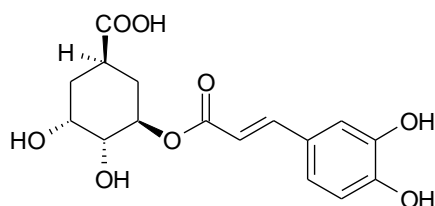
Rosmarinsäure (Abbildung 3) ist ein Ester aus Kaffeesäure und Dihydroxyphenylmilchsäure. Sie wurde erstmals als Reinstoff aus *Rosmarinus officinalis* isoliert (Scarpati und Oriente 1958) und macht den Hauptbestandteil der sogenannten Labiatengerbstoffe aus. Sie besitzt antivirale, antibakterielle und antiinflammatorische Eigenschaften (Petersen und Simmonds 2002). Viele Lamiaceen finden u.a. wegen ihres Rosmarinsäuregehalts breite Anwendung. Durch die reduzierenden und radikalfangenden Eigenschaften eignen sich Salbei, Majoran, Bohnenkraut und Thymian als natürliche Konservierungsmittel für Öle und fetthaltige Speisen. In Deutschland ist ein Fertigarzneimittel zugelassen, dessen Wirksamkeit u.a. auf den Rosmarinsäure-Gehalt zurückzuführen ist: Lomaherpan® ist eine Lippenherpescreme, die einen Melissenblätter-Trockenextrakt enthalten (Rote Liste 2009).



**Abbildung 3:** Rosmarinsäure

### 1.2.2. Chlorogensäure

Chlorogensäure (Abbildung 4) ist ein Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure. Sie besitzt antioxidative Eigenschaften und akkumuliert in einigen Nutzpflanzen. Sie ist vor allem in Solanaceen wie Kartoffeln, Tomaten und Auberginen zu finden. Ihre antioxidativen Eigenschaften schützen den Menschen vor degenerativen, altersbedingten Krankheiten. Es gibt gentechnologische Bemühungen, den Chlorogensäuregehalt einiger Nutzpflanzen zu erhöhen (Niggeweg et al. 2004). Solche Functional Foods sollen einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen ausüben.



**Abbildung 4:** Chlorogensäure (Caffeoylchinasäure)

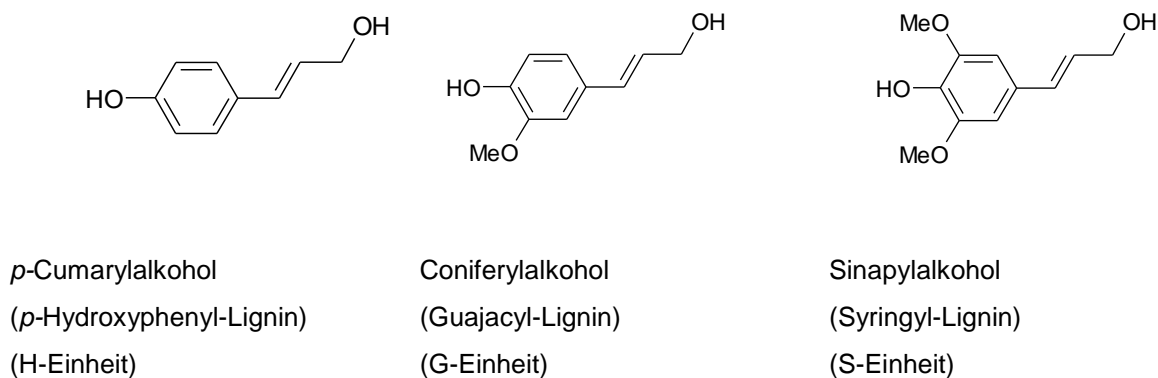
## Einleitung

### 1.2.3. Lignin

Lignin ist neben Cellulose das bedeutendste Polymer der Erde. Es ist in der pflanzlichen Zellwand eingelagert und sorgt für die mechanische Stabilität der Pflanze. Die Bildung von Lignin war eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Evolution großer, aufrecht wachsender Landpflanzen (Boudet 2000).

Die Ligninmonomere, die als Monolignole bezeichnet werden, sind *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (Abbildung 5). Die Lignine der verschiedenen Pflanzenarten unterscheiden sich durch unterschiedliche prozentuale Anteile der verschiedenen Monolignole und dem Vernetzungsgrad.

In Lebensmitteln zählt Lignin zu den Ballaststoffen.



**Abbildung 5:** Monolignole

### 1.3. Biosynthese von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Lignin

Ausgehend vom allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel wird eine Vielzahl von Sekundärstoffen gebildet, die für die Entwicklung der Pflanze und die Interaktion mit ihrer biotischen und abiotischen Umwelt von großer Bedeutung sind (Petersen et al. 1999). Flavonoide können der Pflanze als UV-Schutz dienen und einige sind Phytoalexine mit hemmender Wirkung auf Bakterien, Viren und Pilze. Die auffälligste Eigenschaft vieler Flavonoide ist ihr Beitrag zur Farbe von Blüten, Früchten und Blättern. Vor allem die orange bis dunkelblau gefärbten Anthocyane dienen der Anlockung von Bestäubern (Gebhardt 2007). Einige Phenylpropene (z.B. Isoeugenol) sind flüchtige Substanzen in spezie-spezifischen Gemischen, die als Duftstoffe entweder zur Anlockung von Insekten gebildet werden oder als Abwehrstoffe gegen Pathogene dienen (Dudareva et al. 2004). Suberin ist



## Einleitung

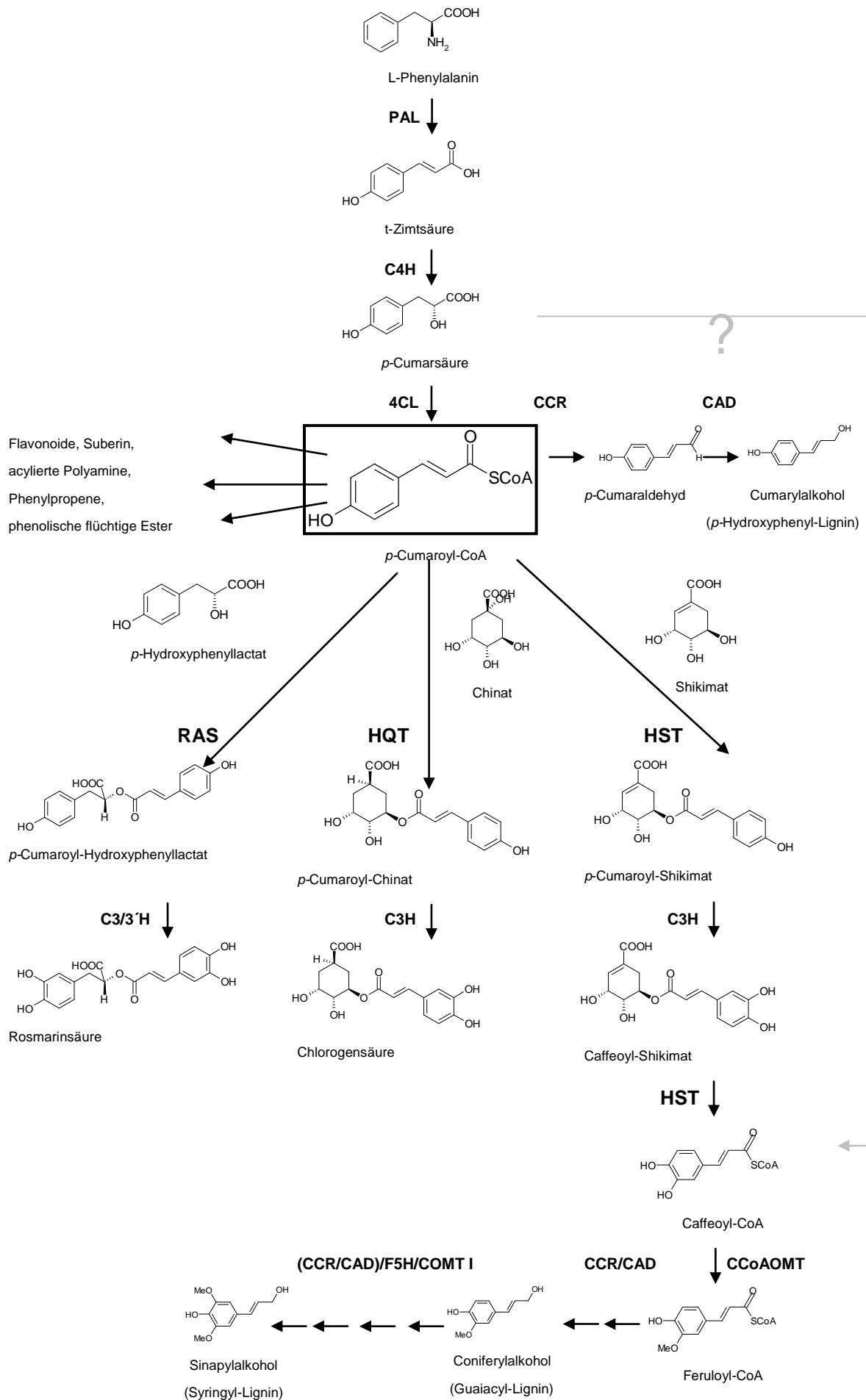
am Schutz der Pflanzen vor dem Austrocknen beteiligt. Acylierte Polyaminkonjugate (Avenanthramide, *p*-Cumaroylagmatin) können sowohl dem UV-Schutz und der Abwehr von Pathogenen dienen, aber auch zur Fertilität der Pflanze beitragen (Vogt 2010). Zusätzlich zu diesen Naturstoffen gehören auch Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Lignin zu den Phenylpropanderivaten.

### 1.3.1. Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel

Im Phenylpropanstoffwechsel wird *p*-Cumaroyl-CoA als energiereiches, zentrales Intermediat gebildet, das der Ausgangspunkt für die Synthese der verschiedenen Phenylpropan-Derivate ist (siehe Abbildung 6). Die aromatische Aminosäure Phenylalanin, die aus dem Shikimatweg stammt, wird in zwei enzymkatalysierten Schritten (PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase) zu *p*-Cumarsäure desaminiert und hydroxyliert. Es ist kein ubiquitär vorkommendes Enzym bekannt, das die *meta*-Hydroxylierung von *p*-Cumarsäure zu Kaffeesäure katalysiert (Schoch et al. 2001). Die Aktivierung der *p*-Cumarsäure mit Coenzym-A (4CL: Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase) zu *p*-Cumaroyl-CoA ist für alle darauffolgenden Biosynthesewege zwingend erforderlich. Die meisten bekannten Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligasen aus verschiedenen Pflanzenarten akzeptieren neben *p*-Cumarsäure auch Kaffeesäure und Ferulasäure mit absteigender Präferenz als Substrate, nicht aber Sinapinsäure (Hoffmann et al. 2003).

Die an der Biosynthese von *p*-Cumaroyl-CoA beteiligten Enzyme konnten aus *Coleus blumei* Zellkulturen isoliert und charakterisiert werden. Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase katalysiert die oxidative Desaminierung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure. Die Zimtsäure 4-Hydroxylase führt die *para*-Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring der *trans*-Zimtsäure in einer Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasereaktion ein. Die Enzymaktivität der C4H ist abhängig von molekularem Sauerstoff und NADPH. Die Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase katalysiert die Aktivierung der Zimtsäure durch CoA in einer ATP-abhängigen Reaktion.

# Einleitung



## Einleitung

**Abbildung 6:** Biosynthese von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Monolignolen. PAL, C4H und 4CL sind die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels. *p*-Cumaroyl-CoA ist das zentrale Intermediat zur Bildung verschiedener Phenylpropan-Derivate. PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase, 4CL: Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase, RAS: Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (Rosmarinsäuresynthase), HST: Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase, HQT: Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase, C3H: *p*-Cumaroylshikimat/chinat 3-Hydroxylase, C3/3'H: *p*-Cumaroylhydroxyphenyllactat 3/3'-Hydroxylase, CCR: Cinnamoyl-CoA Reduktase, CAD: Cinnamylalkohol Dehydrogenase, F5H: Ferulat 5-Hydroxylase, COMT I: Kaffee-/5'-Hydroxyferulasäure O-Methyltransferase.

Die Biosynthesewege zur Bildung von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Monolignolen weisen einige Gemeinsamkeiten auf: *p*-Cumaroyl-CoA aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel wird auf ein Akzeptorsubstrat (*p*-Hydroxyphenyllactat, Chinat, oder Shikimat) übertragen. Die Hydroxylierungen in *meta*-Position der aromatischen Ringe werden auf Stufe der Ester eingeführt.

### 1.3.2. Ligninbiosynthese

Lignin ist ein Polymer, das aus den Monolignolen *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol aufgebaut ist.

*p*-Cumaroyl-CoA ist die direkte Vorstufe von *p*-Cumarylalkohol, der H-Lignin-Einheit. Es wird durch zwei aufeinanderfolgende Reduktionsschritte (CCR: Cinnamoyl-CoA Reduktase, CAD: Cinnamylalkohol Dehydrogenase) zu *p*-Cumarylalkohol umgesetzt.

Für die Biosynthese der höher methoxylierten G- und S-Lignineinheiten wird *p*-Cumaroyl-CoA zunächst in Caffeoyl-CoA überführt. Der entscheidende Schritt hierfür ist die Übertragung von *p*-Cumaroyl-CoA auf Shikimat. Nur die Shikimisäure- und Chinasäureester, nicht aber die freien Phenylpropansäuren oder die CoA-Ester, sind die Substrate der Cytochrom P450 3-Hydroxylase (CYP98A3; C3H) (Schoch et al. 2001, Franke et al. 2002), die die *meta*-Hydroxylierung der *p*-Cumaroyleinheit einführt. Die Bildung des *p*-Cumaryoylshikimisäureesters wird von einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST) katalysiert. Durch Herunterregulierung der HST in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* durch RNA-Interferenz konnte eine Beteiligung dieses Enzyms an der Ligninbiosynthese nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2003, Hoffmann et al. 2004, siehe Kapitel 1.4.1). Nach heutiger Vorstellung übernimmt die HST eine zweite Funktion: sie katalysiert die Rückreaktion und setzt Caffeoyl-CoA und Shikimat in Anwesenheit von CoA aus Caffeoylshikimat frei (Hoffmann et al. 2004). Anschließend kann Caf-CoA in *meta*-Position methyliert werden (CCoAOMT: Caffeoyl-CoA

## Einleitung

O-Methyltransferase), so dass mit Feruloyl-CoA (Fer-CoA) die Vorstufe von Coniferylalkohol (G-Einheit) und Sinapylalkohol (S-Einheit) vorhanden ist.

Feruloyl-CoA wird durch zwei aufeinanderfolgende Reduktionsschritte (CCR: Cinnamoyl-CoA Reduktase, CAD: Cinnamylalkohol Dehydrogenase) zu Coniferylalkohol (G-Einheit) umgesetzt. Zur Bildung von Sinapylalkohol (S-Einheit) kann auf Stufe des Coniferylalkohols oder des Aldehyds nach 5-Hydroxylierung (F5H: Ferulat 5-Hydroxylase) die zweite Methylgruppe eingeführt werden (COMT I: Kaffee-/5-Hydroxyferulasäure O-Methyltransferase). Die drei Monolignole Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol werden von Oxidasen in Phenoxylradikale überführt und polymerisieren spontan zu einem amorphen, dreidimensionalen Netzwerk (Boudet 2000).

### 1.3.3. Chlorogensäurebiosynthese

Bei der Chlorogensäurebiosynthese wird zunächst *p*-Cumaroylchinat gebildet. Das Enzym, das diese Acylierung katalysiert, ist eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT, siehe Kapitel 1.4.2). Die Hydroxylierung zur Chlorogensäure in *meta*-Position wird, wie bei der Bildung von Caffeoylshikimat, auf der Esterstufe von einer Cytochrom P450 3-Hydroxylase (C3H) eingeführt. Während Caffeoylshikimisäure in der Regel ein kurzlebiges Intermediat bei der Biosynthese von höher substituierten Zimtsäurederivaten ist, wird Chlorogensäure in der Pflanze akkumuliert (Schoch et al. 2001).

Niggeweg et al. (2004) konnten zeigen, dass die HQT an der Chlorogensäurebiosynthese beteiligt ist. Stabil transformierte Tomaten, in denen die HQT RNAi-basiert herunterreguliert wurde, wiesen einen um 98% reduzierten Chlorogensäuregehalt auf. Die Herunterregulation der HQT hatte keinen messbaren Effekt auf den Ligningehalt der Pflanze, so dass eine Beteiligung der Ligninbiosynthese ausgeschlossen werden kann.

Zur Zeit kann nicht entschieden werden, ob die Chlorogensäurebiosynthese tatsächlich über *p*-Cumaroylchinat läuft, oder ob die HQT direkt Chlorogensäure aus Caffeoyl-CoA und Chinasäure bildet. Möglicherweise existieren auch beide Biosynthesewege nebeneinander.

In *Ipomoea batatas* wurde vor längerer Zeit Caffeoylglucose als aktiviertes Intermediat der Chlorogensäurebiosynthese diskutiert (Villegas und Kojima 1986). Da diese Pflanze jedoch ein Gen besitzt, das möglicherweise für eine HQT codiert, ist anzunehmen, dass die Biosynthese von Chlorogensäure in allen Solanaceen über die HQT läuft (Niggeweg et al. 2004).

## Einleitung

### 1.3.4. Rosmarinsäurebiosynthese

*p*-Cumaroyl-CoA wird auf Hydroxyphenyllactat übertragen und dieser Ester zur Rosmarinsäure hydroxyliert (Petersen et al. 1994).

Berger et al. (2006) und Eberle et al. (2008) klonierten die cDNAs, die für zwei spezifische Gene der Rosmarinsäuresynthese codieren: die HydroxycinnamoylCoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (RAS, siehe Kapitel 1.4.3) katalysiert die Übertragung des *p*-Cumaroyl-Rests auf *p*-Hydroxyphenyllactat. Shikimat und Chinat sind keine Substrate der RAS aus *Coleus blumei*. Auf den gebildeten Ester werden von der Cytochrom P450 3-/3'-Hydroxylase (CYP98A14,C3/3'H) die aromatischen 3- und 3'-Hydroxylgruppen eingeführt. Obwohl CYP98A14 eine hohe Sequenzähnlichkeit *p*-Cumaroylshikimat/-chinat 3-Hydroxylasen aufweist, setzt dieses Enzym spezifisch rosmarinsäureartige Ester um, nicht aber die entsprechenden Shikimisäure- und Chinasäureester. CYP98A14 unterscheidet sich dadurch von den anderen CYP98s, dass sie sowohl die 3- als auch die 3'-Hydroxylgruppe in *p*-Cumaroyl-Dihydroxyphenyllactat and Caffeoyle-Hydroxyphenyllactat einführen kann. Die Affinität zu *p*-Cumaroyl-Dihydroxyphenyllactat ist deutlich höher.

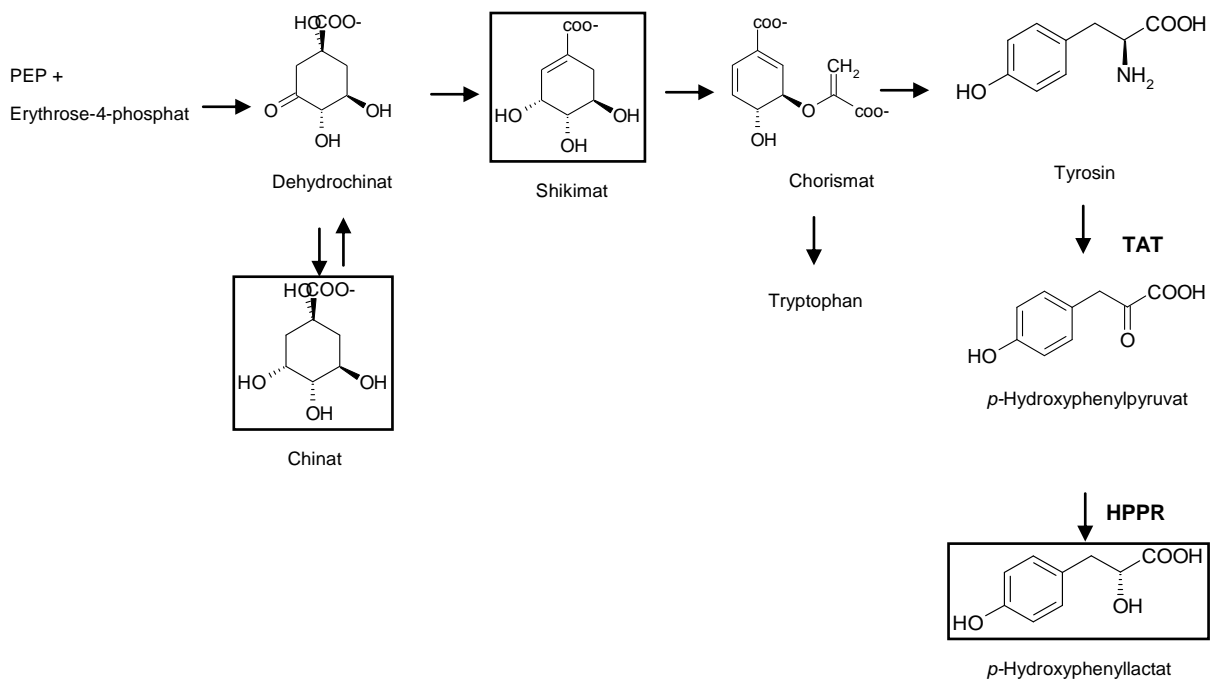
Die RAS wurde erstmals von Petersen und Alfermann (1988) aus Zellkulturen von *Coleus blumei* isoliert und charakterisiert. Als natürliche Substrate dieses Enzyms wurden *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat durch Konkurrenzexperimente ermittelt. Petersen (1993) hat zwei Cytochrom P450-abhängige Hydroxylasen aus Zellkulturen von *Coleus blumei* charakterisiert, die 3- und 3'-Hydroxylgruppen in rosmarinsäureartige Ester einführen. Substrate wie *p*-Cumarsäure, *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat werden von diesen Hydroxylasen nicht akzeptiert. Daher besteht die Möglichkeit, dass CYP98A14 nicht die einzige 3-/3'-Hydroxylase ist, die an der Rosmarinsäurebiosynthese beteiligt ist.

Sowohl die Hydroxyzimtsäuretransferasen (RAS, HST und HQT) als auch die 3-Hydroxylasen (CYP98A3, CYP98A14) haben eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander und gehören großen Proteinfamilien an. Die Hydroxycinnamoyltransferasen werden in die Familie der BAHD-Acyltransferasen eingeordnet (siehe Kap. 1.5.), und die 3-Hydroxylasen gehören zur CYP98A-Familie der Cytochrom P450 Proteine, die die Einführung von Hydroxylgruppen in *meta*-Position von Phenylpropanoid-Derivaten katalysieren (Schoch et al. 2001). Die C4H, die Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure hydroxyliert, gehört hingegen zur CYP73A-Familie und wird von einem einzigen Gen codiert (Vogt 2010).

## Einleitung

### 1.3.5. Biosynthese der Akzeptorsubstrate Shikimisäure, Chinasäure und *p*-Hydroxyphenyllactat

Die Akzeptorsubstrate der Hydroxycinnamoyltransferasen (RAS, HST, HQT) sind Derivate des Shikimatwegs. Der Shikimatweg stellt in höheren Organismen die aromatischen  $\alpha$ -Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan bereit (Haslam 1993). Höhere Pflanzen benutzen diese Aminosäuren nicht nur zur Proteinbiosynthese, sondern auch als Vorstufen für zahlreiche Sekundärmetabolite (Herrmann 1995). Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen beginnt mit der Reaktion von D-Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat (PEP). In weiteren Schritten entstehen dann Dehydrochinasäure, Chinasäure, Shikimisäure und Chorisminsäure (siehe Abbildung 7). Chinasäure kann von der Chinat Dehydrogenase in einem Schritt aus Dehydrochinasäure gebildet werden. Die Chorisminsäure stellt einen Verzweigungspunkt innerhalb des Shikimatwegs dar. Über Prephenat werden die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gebildet. Die Synthese von Tryptophan verläuft über Anthranilat.



**Abbildung 7:** Übersicht über die Biosynthese der Akzeptoren Shikimat, Chinat und *p*-Hydroxyphenyllactat. Shikimisäure und Chinasäure sind Intermediate des Shikimatwegs. *p*-Hydroxyphenyllactat wird durch Transaminierung und Reduktion der Ketogruppe aus Tyrosin gebildet. PEP: Phosphoenolpyruvat, TAT: Tyrosin Aminotransferase, HPPR: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase.

Durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnten Ellis und Towers (1970) zeigen, dass Phenylalanin und Tyrosin die Vorstufen der Rosmarinsäurebiosynthese sind und *p*-Hydroxyphenyllactat ein Intermediat dieses Stoffwechselwegs ist. Das über den

## Einleitung

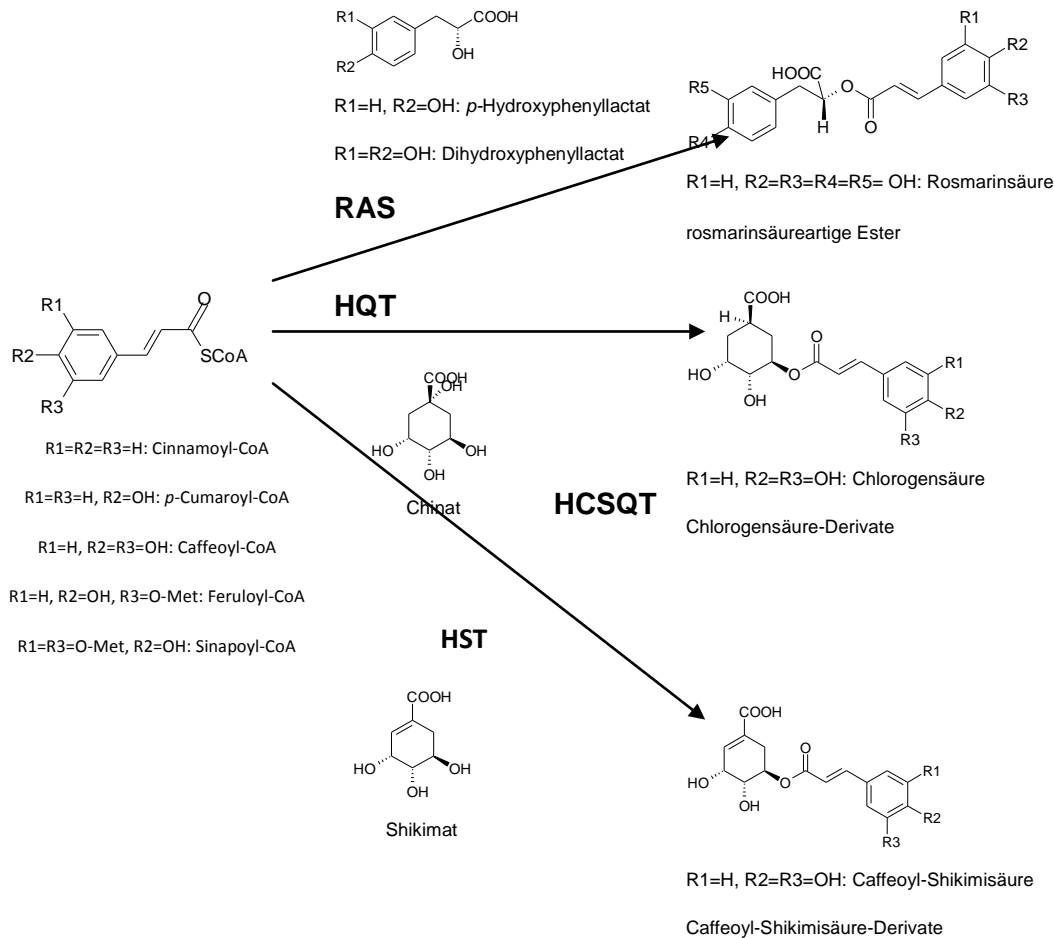
Shikimatweg gebildete Tyrosin wird zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat transaminiert (TAT: Tyrosin Aminotransferase) und danach zu *p*-Hydroxyphenyllactat reduziert (HPPR: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase).

Die an der Biosynthese von *p*-Hydroxyphenyllactat beteiligten Enzyme konnten ebenfalls aus Zellkulturen von *Coleus blumei* isoliert und charakterisiert werden. Demnach sind alle Enzyme zur Biosynthese von Rosmarinsäure aus Phenylalanin und Tyrosin aus *Coleus blumei* bekannt. Die Tyrosin Aminotransferase katalysiert die 2-Oxoglutarat-abhängige Transaminierung von Tyrosin zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat und Glutamat. Die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase reduziert *p*-Hydroxyphenylpyruvat mit Hilfe von NAD(P)H zu D- *p*-Hydroxyphenyllactat, dem natürlichen Substrat der RAS.

### 1.4. CoA-Ester abhängige BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen

Die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (Rosmarinsäuresynthase, RAS), die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyl-transferase (HST) und die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT) sind CoA-Ester abhängige BAHD-Acyltransferasen, die an der Biosynthese von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Monolignolen beteiligt sind (Abbildung 6). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Für ihre Donatoren besitzen die Enzyme eine moderate Substratspezifität. Sie übertragen *p*-Cumaroyl-CoA sowie Caffeoyl-CoA und oft auch andere (Hydroxy-)Cinnamoyl-Reste aus ihren CoA-Thioestern auf ihre Akzeptorsubstrate (Petersen et al. 2009, siehe Abbildung 8 und Tabelle 1). RAS, HST und HQT setzen unterschiedliche Akzeptorsubstrate um, für die sie in der Regel eine hohe Substratspezifität aufweisen. Die gebildeten Produkte unterscheiden sich durch das Substitutionsmuster an den Aromaten.

## Einleitung



**Abbildung 8:** Substratspezifität der Hydroxycinnamoyltransferasen RAS, HST und HQT

Die Rosmarinsäuresynthese überträgt die CoA-aktivierten Säuren auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat, so dass rosmarinsäureartige Ester gebildet werden. Bislang konnten RAS-cDNAs aus zwei verschiedenen Pflanzen isoliert werden. Die erste RAS wurde von Berger et al. (2006) aus *Coleus blumei* (CbRAS) und die zweite RAS von Weitzel (2009) aus *Melissa officinalis* (MoRAS) isoliert. Die heterolog exprimierten Enzyme besitzen eine vergleichbare Substratspezifität. *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA werden auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat übertragen. Shikimat und Chinat sind keine Akzeptorsubstrate dieser beiden RAS-Proteine.

CoA-aktivierte (Hydroxy-)Zimtsäurederivate werden von der HST auf Shikimat und von der HQT auf Chinat übertragen. Daneben existieren sogenannte HCSQTs, die sowohl Shikimat als auch Chinat als Akzeptorsubstrate verwenden, jedoch eine deutliche Präferenz für eine der beiden Substanzen aufweisen. Die Präferenzen der HCSQTs für Shikimat oder Chinat variieren unter den Enzymen aus verschiedenen Pflanzenarten. Die von Hoffmann et al. (2003) und Sullivan (2009) heterolog exprimierten Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Nicotiana tabacum* (NtHST) und *Trifolium pratense* (TpHCT1) übertragen *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA bevorzugt auf Shikimat, besitzen



## Einleitung

aber auch eine geringe Affinität zu Chinat. Im Gegensatz dazu bevorzugen die heterolog exprimierten Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Cynara cardunculus* (CcHQT, Comino et al. 2007) und *Nicotiana tabacum* (NtHQT, Niggeweg et al. 2004) Chinat vor Shikimat. Die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase CsHQT aus *Cynara scolymus* (Comino et al. 2008) ist sehr spezifisch für Chinat. Shikimat ist kein Substrat für die CsHQT.

Pflanze, HCT, Akzessionsnummer	Donorsubstrate	Akzeptorsubstrate	Literatur
<i>Coleus blumei</i> RAS (A0PDV5)	pC-CoA, Caf-CoA	pHPL/DHPL, Shikimat und Chinat werden nicht akzeptiert	Berger et al. (2006)
<i>Melissa officinalis</i> RAS (keine Akzessionsnummer vergeben)	pC-CoA, Caf-CoA	pHPL/DHPL, Shikimat und Chinat werden nicht akzeptiert	Weitzel (2009)
<i>Cynara cardunculus</i> HQT (A4U7G0)	pC-CoA, Caf-CoA	Chinat>>>Shikimat	Comino et al. (2007)
<i>Trifolium pratense</i> HCT (B6D7P1)	pC-CoA, Caf-CoA	Shikimat >>>Chinat	Sullivan (2009)
<i>Nicotiana tabacum</i> HST (Q8GSM7)	pC-CoA/Caf-CoA/ Cin-CoA >>> Fer-CoA/Sin-CoA	Shikimat >>>Chinat	Hoffmann et al. (2003)
<i>Coffea canephora</i> HCT (A4ZKE4)	nicht bestimmt	Hydrolyse von Chlorogensäure	Lepelley et al. (2006)
<i>Nicotiana tabacum</i> HQT (Q70G33)	pC-CoA, Caf-CoA	Chinat >>> Shikimat	Niggeweg et al. (2004)
<i>Cynara scolymus</i> HQT (C3PTS7)	pC-CoA, Caf-CoA	Chinat, Shikimat wird nicht akzeptiert	Comino et al. (2008)

**Tabelle 1:** Genetisch und biochemisch charakterisierte BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen aus verschiedenen Pflanzen und ihre Substratspezifität, pHPL: *p*-Hydroxyphenyllactat, DHPL: Dihydroxyphenyllactat, pC-CoA: *p*-Cumaroyl-CoA, Caf-CoA: Caffeoyl-CoA, Cin-CoA: Cinnamoyl-CoA, Fer-CoA: Feruloyl-CoA, Sin-CoA: Sinapoyl-CoA

Innerhalb der BAHD-Acyltransferasefamilie sind neben der RAS, der HST und der HQT weitere Hydroxycinnamoyltransferasen zu finden. Diese sind vorwiegend an der Biosynthese von Polyaminderivaten oder der Modifikation von Flavonoidglykosiden beteiligt und werden an dieser Stelle nicht beschrieben.

## Einleitung

### 1.4.1. Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST)

Hydroxycinnamoyltransferasen, die nur oder hauptsächlich Shikimisäureester bilden, sind für Synthese der methoxylierten Monolignole essentiell.

Es war lange Zeit ungeklärt, wie die *meta*-Hydroxylierung von Kaffeesäurederivaten u.a. bei der Guaiacyl- und Syringylligninbiosynthese eingeführt wird. Es wurde vermutet, dass freie Säuren wie *p*-Cumarsäure in Position 3 hydroxyliert werden. Es konnte jedoch nie ein Enzym charakterisiert werden, das diese Reaktion katalysiert (Schoch et al. 2006). Nach neueren Untersuchungen scheint Caffeoylshikimat und in einigen Pflanzen zu einem geringeren Anteil auch Caffeoylchinat die Vorstufe für Caffeoyl-CoA zu sein, das nach weiteren Modifikationen am aromatischen Ring in die Monolignole umgesetzt wird.

Die *p*-Cumarat 3-Hydroxylase aus *Arabidopsis thaliana* setzt sehr effizient die beiden Ester *p*-Cumaroylshikimat und *p*-Cumaroylchinat, nicht aber *p*-Cumarsäure oder *p*-Cumaroyl-CoA, um. Daher spielt die Hydroxycinnamoyltransferase, die diese Ester bildet, eine zentrale Rolle im Phenylpropanstoffwechsel (Hoffmann et al. 2004).

Hoffmann et al. (2003) isolierten die cDNA einer HST aus *Nicotiana tabacum* (NtHST). Das in *E. coli* heterolog exprimierte Enzym bildet die Shikimat- und Chinatester, die die Substrate der 3-Hydroxylase sind. *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA sind die besten Substrate der NtHST. Obwohl diese Hydroxycinnamoyltransferase die Synthese beider Ester katalysiert, werden die CoA-aktivierten Säuren effizienter auf Shikimat als auf Chinat übertragen. Zudem katalysiert die NtHST auch die Rückreaktion, z.B. die Freisetzung von Caffeoyl-CoA aus Chlorogensäure. Daher scheint die HST eine Schlüsselrolle zur Bildung von Caffeoyl-CoA zu spielen. Zunächst überträgt die HAST den *p*-Cumaroyl-Rest von CoA auf Shikimat. Dieser Ester wird durch CYP98A zu Caffeoylshikimat hydroxyliert, bevor der Kaffeesäurerest durch die HST wieder auf CoA übertragen wird.

Die Funktion der HST im Ligninstoffwechsel der Pflanze konnten Hoffmann et al. (2004) durch RNAi basierte Herunterregulation der HST in *Nicotiana benthamiana* und *Arabidopsis thaliana* beweisen. In beiden HST-defizienten Pflanzen konnte eine Beeinflussung der Ligninbiosynthese gezeigt werden. Die Beobachtung, dass das gebildete Lignin vorwiegend aus *p*-Hydroxyphenyl-Lignin besteht und der Anteil an Syringyl-Lignin im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen reduziert ist, passt zu dem postulierten Monolignolbiosyntheseweg (siehe Abbildung 6). Während die HST an der Biosynthese des höher methoxylierten Syringyl-Lignins beteiligt ist, wird *p*-Hydroxyphenyl-Lignin direkt aus *p*-Cumaroyl-CoA gebildet.

Die Beteiligung der HST an der Produktion der höher substituierten Monolignole in *Pinus radiata* konnten Wagner et al. (2007) ebenfalls zeigen. *Pinus radiata* ist eine Gymnosperme,

## Einleitung

die kein Syringyl-Lignin produziert. Wurde das putative HST-Gen durch RNA-Interferenz ausgeschaltet, kam es zu substanziellen Veränderungen in Gehalt und Zusammensetzung des Lignins. Es wurde eine Erhöhung der *p*-Hydroxyphenyl- und eine Erniedrigung der Guaiacyl-Einheiten beobachtet.

HST-defiziente *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen waren drastisch in ihrem Wachstum gehemmt (Hoffmann et al. 2004). Besseau et al. (2007) zeigten, dass die Repression der Ligninbiosynthese über die Chalkonsynthaseaktivität (CHS) zu einer Akkumulation an verschiedenen Flavonoiden, darunter Flavonole und Anthocyanine, führt. Diese Flavonoidakkumulation ist für die beobachtete Wachstumshemmung verantwortlich. Wurden transgene *Arabidopsis thaliana* mit HST- und CHS-Defizienz generiert, war nur eine Veränderung in der Ligninbiosynthese bei normalem Wachstum zu beobachten. Der *p*-Hydroxyphenyl-Ligningehalt stieg zu Lasten der methoxylierten Syringyl- und Guaiacyl-Lignineinheiten. Diese Beobachtungen zeigen, dass die HST an der Biosynthese der G- und S-Lignineinheiten beteiligt ist, nicht aber an der Biosynthese des H-Lignins.

Eine HST aus *Trifolium pratense* (Sullivan 2009) überträgt *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA bevorzugt auf Shikimisäure. Expressionsanalysen zusammen mit der hohen Substratspezifität für Shikimisäure deuten auf eine Beteiligung an der Ligninbiosynthese hin.

### 1.4.2. Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT)

Hydroxycinnamoyltransferasen, deren bevorzugtes Akzeptorsubstrat Chinat ist, sind essentiell für die Biosynthese von Chlorogensäure.

Aus *Nicotiana tabacum* konnte eine cDNA isoliert werden, die für ein Enzym mit HQT-Aktivität kodiert (Niggeweg et al. 2004). Das in *E. coli* heterolog exprimierte Enzym akzeptiert *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA als CoA-Thioester mit entweder Chinat oder, deutlich schlechter, Shikimat als Akzeptor. Obwohl die *Nicotiana tabacum* HQT (NtHQT) auch Shikimisäureester bilden kann, ist es unwahrscheinlich, dass Shikimat das natürliche Substrat des Enzyms ist. Der  $K_m$ -Wert für Shikimat ist zwanzigmal höher als der  $K_m$ -Wert für Chinat.

Die Beteiligung der HQT an der Chlorogensäurebiosynthese *in vivo* konnte durch Überexpression und Stilllegen des HQT-Gens in *Solanum lycopersicum* gezeigt werden. Tomaten, in denen das HQT-Gen stillgelegt ist, besitzen einen um 98% reduzierten Chlorogensäuregehalt, während die Ligninbiosynthese nicht beeinflusst wird. Überexpression der HQT erhöht den Chlorogensäuregehalt um das Doppelte. Ein Effekt auf die Ligninzusammensetzung oder lösliche phenolische Verbindungen konnte auch hier nicht

## Einleitung

gefunden werden. Tomaten, die in verstärktem Maß Chlorogensäure akkumulieren, zeigen eine verbesserte Toleranz gegenüber oxidativem Stress. Wurde im Gegensatz dazu die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL), das erste Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels hochreguliert, konnten um das Dreifache erhöhte Chlorogensäurespiegel gemessen werden. Allerdings kam es unter diesen Bedingungen zusätzlich zu einer verstärkten Ligninbildung (Niggeweg et al. 2004).

Die beschriebenen Ergebnisse zur Überexpression der HQT und der PAL stehen in Übereinstimmung mit den postulierten Chlorogensäure- und Ligninbiosynthesewegen. Die PAL ist als erstes Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels an der Biosynthese beider Sekundärstoffe (Chlorogensäure und Lignin) beteiligt, während die HQT ein spezifisches Enzym des Chlorogensäurebiosynthesewegs ist.

Clé et al. (2008) zeigten, dass Tomaten mit stillgelegter HQT geringere Mengen an Chlorogensäure, aber höhere Mengen an Flavonoiden als die Wildtyp-Tomaten akkumulieren. Möglicherweise kommt es durch die Suppression der HQT zu einer Akkumulation von Chlorogensäurevorstufen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels. Diese Akkumulation wird dadurch kompensiert, dass die Vorstufen in andere Biosynthesewege, wie z. B. die Flavonoidbiosynthese, eingeschleust werden.

Über die Nahrung aufgenommene Polyphenole üben einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen aus. Das Interesse an Pflanzen, die reich an bestimmten Polyphenolen ist, steigt. Chang et al. (2009) untersuchten die Regulation der Polyphenolakkumulation durch kombinierte Überexpression und Ausschalten von Schlüsselenzymen des Phenylpropanstoffwechsels. Wurde in *Nicotiana tabacum* nur die PAL überexprimiert, konnten erhöhte Chlorogensäure- und Flavonoidlevel gemessen werden. Eine Überexpression von PAL und HQT führte zu einer weiteren Steigerung der Chlorogensäureproduktion. Wurde die HQT in PAL-überexprimiertem Tabak herunterreguliert, konnten die Flavonoidgehalte erhöht werden.

Lepelley et al. (2007) konnten aus *Coffea canephora* zwei cDNAs von Hydroxycinnamoyltransferasen isolieren. Für die CcHCT, die auf Aminosäureebene die höchste Sequenzidentität zur NtHST zeigt, konnte in Enzymtests die Hydrolyse von Chlorogensäure gezeigt werden. Die Übertragung von *p*-Cumaroyl-CoA auf Shikimisäure wurde nicht untersucht. Die gewebespezifische Expression der CcHCT deutet darauf hin, dass die CcHCT an der Ligninbiosynthese beteiligt ist. Die zweite cDNA, die aus Kaffee kloniert werden konnte, besitzt 75,8% Sequenzidentität zur NtHQT. Das heterolog exprimierte Enzym war in Enzymtests nicht aktiv. Trotzdem weist die gewebespezifische Expression auf eine Beteiligung an der Chlorogensäurebiosynthese hin.

## Einleitung

Aus *Cynara cardunculus* konnte eine HCSQT kloniert und heterolog exprimiert werden, die *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA bevorzugt auf Chinasäure, aber auch auf Shikimisäure überträgt (Comino et al. 2007). Die Expression der HQT korreliert mit dem Gehalt an Chlorogensäure in Blättern, weshalb eine Beteiligung an der Biosynthese von Chlorogensäure und Chlorogensäure-ähnlichen Estern anzunehmen ist. Comino et al. (2008) isolierten aus *Cynara scolymus* eine neue CsHQT, die an der Chlorogensäurebiosynthese beteiligt ist. Dieses Enzym zeigt nach heterologer Expression eine hohe Substratspezifität für das Akzeptorsubstrat. *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA werden auf Chinasäure, nicht aber auf Shikimisäure übertragen. Die Genexpression dieser HQT korreliert mit der Synthese von phenolischen Verbindungen.

### 1.4.3. Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyl-transferase (RAS)

Das spezifische Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese ist die Rosmarinsäuresynthase (RAS).

Die RAS überträgt *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA auf die aliphatische Hydroxylgruppe von *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat, nicht aber auf Shikimat oder Chinat. Diese Enzymaktivität wurde erstmals in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* beschrieben (Petersen und Alfermann 1988, Petersen 1991). Für das native Enzym konnte in Konkurrenzexperimenten eine deutliche Präferenz für die monohydroxylierten Substrate *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat gezeigt werden.

Die erste cDNA für eine RAS konnten Berger et al. (2006) aus *Coleus blumei* isolieren (CbRAS). Das in *E. coli* als 6xHis-Fusionsprotein heterolog exprimierte Enzym zeigt in ersten Enzymtests vergleichbare Substratspezifitäten wie das native Enzym.

Die Beteiligung der CbRAS an der Rosmarinsäurebiosynthese sollte durch RNAi-basierte Herunterregulation und Überexpression der CbRAS gezeigt werden (Hücherig 2010). Mit Überexpressionskonstrukten stabil transformierte *Coleus blumei* Hairy Roots zeigten jedoch das Phänomen der Cosuppression. Die Rosmarinsäuregehalte der RAS-Überexpressionslinien, der RNAi-Linien und der untransformierten Kontrolllinien verhielten sich ähnlich. Daher steht der endgültige Beweis für Beteiligung der RAS an der Rosmarinsäurebiosynthese noch aus.

Die RAS aus *Melissa officinalis*, die von Weitzel (2009) als natives und als heterolog exprimierte Enzym (MoRAS) biochemisch charakterisiert wurde, setzt *p*-Cumaroyl-CoA und

## Einleitung

Caffeoyl-CoA mit guten Reaktionsausbeuten und ohne erkennbare Präferenz mit *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat um.

### 1.5. BAHD-Acyltransferasen

Die enzymatische Acylierung ist eine häufig zu beobachtende Modifikation von pflanzlichen Sekundärmetaboliten. Die dazu verwendeten aktivierten Säuren können Acyl-Zucker oder CoA-Ester sein. Die Proteinfamilie der Serin Carboxypeptidase-ähnlichen Acyltransferasen übertragen Acylgruppen aus Glucoseestern im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel (Milkowski und Strack 2004). Die Mitglieder der Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen übertragen Acylreste von CoA-aktivierten Säuren auf Hydroxyl- oder Aminogruppen der Akzeptormoleküle. Im *Arabidopsis*-Genom wurden 65 BAHD-Gene identifiziert. Die BAHD-Familie ist die dominierende Gruppe unter den pflanzlichen Acyltransferasen. Die Enzyme katalysieren meistens Acetyl-, Malonyl-, Tigloyl-, Benzoyl- und Hydroxycinnamoyltransferasereaktionen (St. Pierre und De Luca 2000).

Es wurde gezeigt, dass innerhalb der BAHD-Superfamilie sehr verschiedene Akzeptorsubstrate umgesetzt werden und die gebildeten Produkte unterschiedlichste Strukturen aufweisen (siehe Abbildung 9). Neben kleinen flüchtigen aliphatischen oder aromatischen Estern und Abwehrstoffen wie Rosmarinsäure oder Chlorogensäure können auch komplexere Moleküle wie Anthocyan-Derivate und Alkaloide produziert werden. Daher kann nicht direkt von der Aminosäuresequenz auf die katalytische Funktion der BAHD-Acyltransferasen geschlossen werden. Einige Vertreter besitzen eine ausgesprochen hohe Substratspezifität. Andere Transferasen akzeptieren *in vitro* eine ganze Reihe unterschiedlicher Substrate. Die Produktbildung *in vivo* ist jedoch teilweise von der Verfügbarkeit der Substrate innerhalb der Pflanze eingeschränkt (D'Auria 2006). Der Name der Superfamilie wurde von den ersten vier biochemisch charakterisierten Vertretern abgeleitet (St. Pierre und De Luca 2000): *Clarkia breweri* Benzylalkohol O-Acetyltransferase (BEAT), *Gentiana triflora* Anthocyanin O-Hydroxycinnamoyltransferase (AHCT), *Dianthus caryophyllus* Anthranilat N-Hydroxycinnamoyl-/Benzoyltransferase (HCBT) und *Catharanthus roseus* Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (DAT) (St. Pierre und De Luca 2000).

D'Auria (2006) hat die wichtigsten Merkmale der BAHD-Acyltransferasen in einem Übersichtsartikel zusammengefasst. Demnach handelt es sich um monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von 48-55 kDa, die ungefähr aus 445 Aminosäuren aufgebaut sind. Bei einer minimalen Sequenzidentität von 25-34% unterscheiden sich die Primärsequenzen innerhalb der Familie deutlich, dennoch sind funktionell äquivalente Enzyme aus

## Einleitung

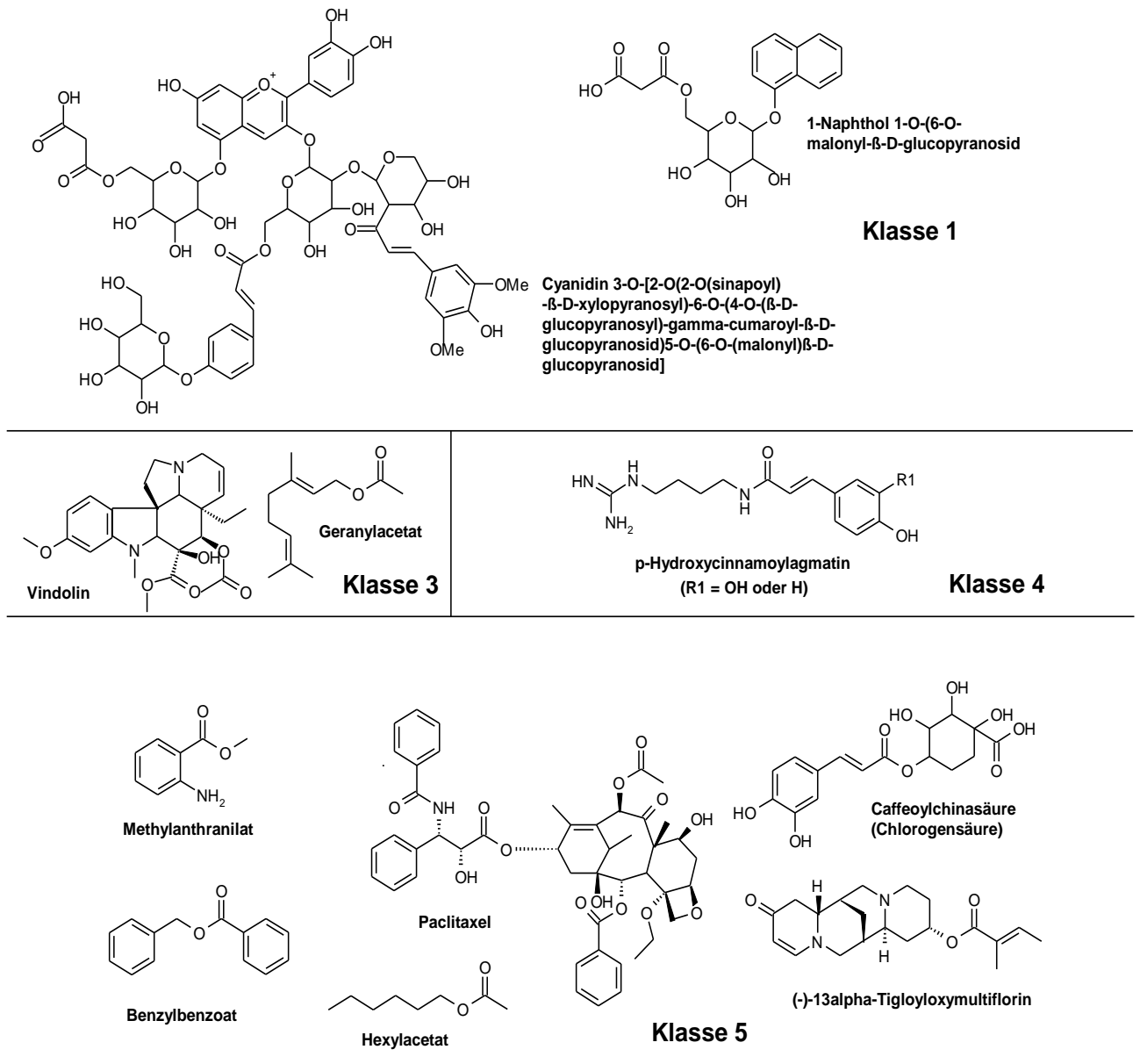
verschiedenen Pflanzenarten bekannt, die bis zu 90% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen. Fast alle bekannten BAHD-Mitglieder weisen mit dem an der Katalyse beteiligten HxxxD-Motiv in der Mitte des Proteins und dem DFGWG-Motiv, das in der Nähe des C-Terminus lokalisiert ist, zwei hoch konservierte Bereiche auf.

Nachdem Ma et al. (2004) mit der Vinorinsynthese aus *Rauwolfia serpentina* die erste Kristallstruktur einer BAHD-Acyltransferase lösen konnten, wurde der Reaktionsmechanismus und die Funktion des Histidins des HxxxD-Motivs aufgeklärt. Die Vinorinsynthese ist eine Acetyltransferase, die an der Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin beteiligt ist. Überraschenderweise befindet sich das hoch konservierte DFGWG-Motiv nicht im aktiven Zentrum, sondern weit entfernt davon auf der Oberfläche des Proteins. Daher kann das DFGWG-Motiv nicht an der Substratbindung im aktiven Zentrum beteiligt sein.

Nach phylogenetischer Untersuchung können die bekannten Vertreter der BAHD-Acyltransferasen in 5 Klassen eingeteilt werden (D'Auria 2006). Klasse 1 wird fast ausschließlich von Flavonoidglykosid-modifizierenden Malonyl- und Hydroxycinnamoyltransferasen gebildet. Anthocyane bilden die größte Unterklasse der Flavonoide und sind für die Orange- bis Blaufärbungen von Blüten und anderen Pflanzenteilen verantwortlich. Sie sind in vielen Pflanzenarten in ihrer acylierten Form zu finden, wobei entweder eine Hydroxycinnamoyl- oder eine Malonylgruppe auf die Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle übertragen wird (Nakayama et al. 2003). Die Malonyltransferase NtMAT1 aus *Nicotiana tabacum* ist an der Biosynthese von malonyliertem Naphthol und Flavonoidglykosiden beteiligt (Taguchi et al. 2005). Kein Vertreter der Klasse 2 wurde bislang biochemisch charakterisiert. Die Gene CER2 aus *Arabidopsis thaliana* und Glossy2 aus *Zea mays* scheinen jedoch an der Biosynthese von epicuticulären Wachsen beteiligt zu sein. Cer2 Mutanten können den terminalen Schritt der Biosynthese nicht katalysieren und produzieren verkürzte cuticuläre Wachse. Klasse 3 umfasst Acyltransferasen, die an der Biosynthese von Alkaloiden oder flüchtigen Estern involviert sind. Beispielsweise ist die Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (DAT) aus *Catharanthus roseus* das letzte Enzym in der Biosynthese des Alkaloids Vindolin. Die Alkohol Acetyltransferase RhAAT1 aus *Rosa hybrida* produziert Geranylacetat, eine der Komponenten des Blütenduftoffs. Es ist zu beachten, dass alle Alkohol Acyltransferasen mehrere verschiedene Alkohole umsetzen, so dass ein Gemisch flüchtiger Komponenten entsteht. Aus Klasse 4 ist nur die Agmatin Cumaroyltransferase (ACT) aus *Hordeum vulgare* bekannt, die eine N-Acylierung katalysiert. Ihr DFGWG-Motiv ist durch einen Austausch von Tryptophan zu Glycin leicht verändert (DFGGG). Die Klasse 5 der BAHD-Acyltransferasen kann in mehrere Unterklassen aufgespalten werden. Diese Unterklassen enthalten Enzyme, die flüchtige Ester wie z.B. Benzylbenzoat, Hexylacetat oder Methylantranilat, aber auch Alkaloide wie Paclitaxel bilden. Eine eigene Subklasse bilden Hydroxycinnamoyl-/Benzoyltransferasen, die vorwiegend Ester mit Shikimat und

## Einleitung

Chinat synthetisieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Lignin und Chlorogensäure (siehe Kapitel 1.3.2 und 1.3.3).



**Abbildung 9:** Ausgewählte Sekundärmetabolite, in deren Biosyntheseweg BAHD-Acyltransferasen beteiligt sind. Die Verbindungen sind je nach Klasseneinteilung der entsprechenden Acyltransferasen eingeteilt (nach D'Auria (2006)).



## Einleitung

### 1.6. Ziele dieser Arbeit

Hydroxycimtsäureester sind bedeutende sekundäre Inhaltsstoffe der Lamiaceae. Neben Hydroxycinnamoylshikimat und -chinat, die im Pflanzenreich nahezu ubiquitär verbreitet sind, ist Rosmarinsäure hauptsächlich in den Boraginaceae und der Subfamilie Nepetoideae der Lamiaceae zu finden (Petersen et al. 2009). Die Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs), die an der Biosynthese dieser Ester beteiligt sind, gehören zur Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen und übertragen die Hydroxycimtsäuren auf verschiedene Akzeptorsubstrate (Shikimat, Chinat, Hydroxyphenyllactat). Dabei sind sie in der Regel sehr spezifisch für ihre Substrate. Dies bedeutet, dass die aktiven Zentren der HCTs unterschiedlich aufgebaut sein müssen. In dieser Arbeit sollen HCTs aus Lamiaceae kloniert, heterolog exprimiert, biochemisch charakterisiert und ihre Struktur röntgendiffraktometrisch analysiert werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der aktiven Zentren aufzuzeigen.

#### 1.6.1. Projekt 1: Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Coleus blumei*

Mit der Klonierung einer cDNA aus *Coleus blumei*, die für eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (CbRAS) codiert, gelang es Berger et al. (2006) erstmals, das Gen des charakteristischen Enzyms der Rosmarinsäuresynthese zu isolieren. Ziel dieser Arbeit ist es, die CbRAS heterolog zu exprimieren und in großen Mengen aufzureinigen, um sie kristallisieren und ihre Struktur aufklären zu können. Aus *Coleus blumei* soll eine weitere Hydroxycinnamoyltransferase kloniert, heterolog exprimiert, biochemisch charakterisiert und aufgereinigt werden, die für eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (CbHST) codiert. Abschließend soll durch gezielte Mutagenese die Bedeutung wichtiger Aminosäuren herausgearbeitet werden. Es ist von Interesse, ob durch Konstruktion von CbRAS/CbHST-Chimären die Substratspezifität der Enzyme verändert werden kann.

#### 1.6.2. Projekt 2: Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Glechoma hederacea*

*Glechoma hederacea* ist eine Lamiacee, die Rosmarinsäure und Chlorogensäure nebeneinander produziert (Petersen et al. 2009). Daher ist sie für die Untersuchung aller drei Hydroxycinnamoyltransferaseaktivitäten geeignet. Es soll eine Hydroxycinnamoyl-

## *Einleitung*

CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (GhHST), eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (GhHQT) und eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (GhRAS) kloniert und heterolog exprimiert werden.

### 1.6.3. Projekt 3: Evolution von Hydroxycinnamoyltransferasen

Die treibende Kraft für die Entstehung neuer Sekundärstoffwechselwege ist die Genverdopplung mit anschließender Diversifikation (Ober 2005). Nach heutiger Vorstellung mussten für die Rosmarinsäurebiosynthese nur wenige neue Enzymaktivitäten entstehen. Dazu zählen die Hydroxycinnamoyltransferaseaktivität und die *meta*-Hydroxylaseaktivitäten, die sich möglicherweise aus den Genen für die Bildung von Chlorogensäure und Caffeoylshikimisäure entwickelt haben (Petersen et al. 2009). Von den BAHD-Acyltransferasen wird vermutet, dass sie aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind (St. Pierre und De Luca 2000). Die phylogenetische Untersuchung der isolierten RAS-, HST- und HQT-Sequenzen sowie Vergleich ihrer Genstruktur sollen zu einem besseren Verständnis der Evolution der HCTs beitragen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuche zur cDNA-Klonierung einer HST aus *Coleus blumei***

#### **2.1.1. RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi**

Die mRNA ist in der Molekularbiologie von besonderem Interesse, da sie das Transkriptionsprodukt der Gene darstellt, die untersucht werden sollen.

Die RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi (1987) ist eine Ein-Schritt-Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Zellen. Um zu verhindern, dass die RNA von ubiquitär vorhandenen RNasen abgebaut wird, muss mit Handschuhen gearbeitet werden. Sämtliche Geräte und Lösungen werden doppelt autoklaviert oder zwei Stunden lang bei 200 °C „gebacken“.

Zur Gewinnung von RNA aus Frischpflanzenmaterial werden die entsprechenden Pflanzenteile (in diesem Fall Blätter von *Coleus blumei*) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Porzellanmörser werden die Blätter fein zermahlen. 50 mg des gemörserten Pflanzenmaterials werden mit 500 µl Lösung D versetzt. Während fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird der Ansatz mehrmals gut gemischt. Anschließend werden 50 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 4) zugegeben und sanft gemischt. Danach werden 500 µl Citrat-Puffer gesättigtes Phenol zugegeben und gemischt. Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem Chloroform wird umgeschüttelt und die Probe 15 Minuten auf Eis gestellt. Jetzt folgt ein fünfzehnminütiger Zentrifugationsschritt von 12000 g bei 4 °C. Die obere, wässrige Phase wird abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 400 µl Überstand werden mit 400 µl eiskaltem Isopropanol vermischt und 15 min bei -20 °C gelagert, um eine vollständige Fällung der RNA zu erreichen. Die gefällte RNA wird durch Zentrifugation (10 Minuten, 12000 g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das RNA-Sediment zunächst mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 7500 g, 4 °C) und Entfernung des Überstandes folgt ein weiterer Waschschriff mit 100% Ethanol. Der Überstand wird nach erneuter Zentrifugation (5 min, 7500 g, 4 °C) vorsichtig abgehoben und das RNA-Sediment 5 Minuten bei 37 °C getrocknet. Die RNA wird in 20 µl sterilem Wasser bei 50 °C gelöst.

Die RNA-Konzentration kann photometrisch bestimmt werden. Die Integrität der RNA sowie Verunreinigungen mit DNA werden mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

## *Material und Methoden*

### **Lösung D:**

4 M Guanidinthiocyanat

25 mM Natriumcitrat, pH 7,0

0,5% Laurylsarcosin

### 2.1.2. cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt zur Synthese einen Primer, der an die RNA bindet. Im Fall des Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kits wird ein Oligo-dT-Primer verwendet, der komplementär zum Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA ist. Das Produkt ist ein cDNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist. Diese cDNA kann direkt als Template für die PCR eingesetzt werden. Da die ursprüngliche Matritze eine prozessierte RNA war, die das Splicen schon durchlaufen hat, befinden sich auf cDNAs im Gegensatz zu natürlichen eukaryotischen nukleären DNAs keine Introns. Diese Tatsache ist wichtig für die Klonierung der PCR-Produkte in Vektoren mit anschließender rekombinanter Proteinexpression.

Bei der cDNA-Synthese ist insbesondere bis zur Zugabe des RNase-Inhibitors auf RNase-Freiheit zu achten. Es wird mit Handschuhen und doppelt autoklavierten Gerätschaften gearbeitet. Wenn nicht anders angegeben, steht die Probe auf Eis.

Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers und lautet wie folgt:

X µl Gesamt-RNA (0,1-5 µg)

1 µl Oligo-dT-Primer

ad 12 µl steriles, demineralisiertes Wasser

Dieser Ansatz wird auf Eis gemischt. Anschließend wird 5 Minuten auf 70 °C erhitzt, danach sofort auf Eis gekühlt und kurz herunterzentrifugiert, bevor die folgenden drei Reagenzien hinzupipettiert werden.

## *Material und Methoden*

4 µl 5 x Reaktionspuffer

1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µL)

2 µl 10 mM dNTP-Mix

Ist alles sanft gemischt, wird herunterzentrifugiert und 5 min bei 37 °C inkubiert, ehe

1 µl Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

zugegeben und eine Stunde bei 42 °C inkubiert wird. Um die Reaktion abzustoppen wird alles für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt. Die fertige cDNA aus *Coleus blumei* wird in der Polymerase Kettenreaktion eingesetzt.

### 2.1.3. Polymerase Kettenreaktion zur Amplifizierung von cDNA

Die Polymerasettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um in vitro DNA zu vervielfältigen.

Aus der *Coleus blumei* cDNA soll spezifisch eine HST-Sequenz amplifiziert werden. Durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen verschiedener HCTs mit bekannter Aktivität werden degenerierte Primer abgeleitet. Degenerierte Primer sind eine Kombination aus ähnlichen aber nicht identischen Primern. Dazu ist es nötig, Sequenzbereiche zu finden, die bei HSTs, HQTs und HCSQTs stark konserviert sind, sich aber von der RAS-Sequenz aus *Coleus blumei* deutlich unterscheiden.

Die verwendeten Primer lauten:

Forward Primer:

HCT-1f mit 17 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 51,6 °C:

5'-AGR GAY GAW SAW GGW MG-3'

HCT-2f mit 21 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 63,4 °C:

5'-GTC BGA YAT VGC YCG WGG YCT-3'

## Material und Methoden

Reverse Primer:

DFGWGrev mit 14 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 45,0 °C:

5'-CCC CAN CCR AAR TC-3'

Für die PCR wird das GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase Kit von Promega verwendet.

Die einzelnen Ansätze für die PCR enthalten:

5 µl 10 x Colorless GoTaq<sup>®</sup> Flexi-Puffer

2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl cDNA aus *Coleus blumei*

0,5 µl 100 pmol/µl Primer HCT-1f

0,5 µl 100 pmol/µl Primer DFGWGrev

0,1 µl (5 U/µl) GoTaq<sup>®</sup>-Polymerase

ad 25 µl steriles Wasser

Die PCR wird durchgeführt mit einem Stratagene Robocycler mit geheiztem Deckel. Dieses Gerät kann einen Temperaturgradienten von bis zu 11 °C einrichten. Das benutzte Programm für diese PCR sieht die folgenden Schritte vor:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 min	
40 °C/42 °C/46 °C/48 °C	1 min	1
70 °C	1,5 min	
<hr/>		
94 °C	0,5 min	
40 °C/42 °C/46 °C/48 °C	1 min	38
70 °C	1,5 min	
<hr/>		
94 °C	2 min	
40 °C/42 °C/46 °C/48 °C	1 min	1
70 °C	10 min	

## *Material und Methoden*

Im Anschluss werden die Proben auf 6 °C abgekühlt. Die PCR-Proben werden direkt mittels Agarosegelelektrophorese untersucht.

### 2.1.4. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA- und RNA-Stränge ihrer Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Agarose ist ein Gelbildner und wirkt wie ein molekulares Sieb für Nukleinsäuremoleküle. Ein elektrisches Feld wird angelegt, um die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle zur Anode zu ziehen. Kleine Moleküle wandern schneller durch das Gel. So wird eine Auftrennung nach Größe erreicht.

Mit Agaroskonzentrationen von 0,7 bis 2% lassen sich DNA-Fragmente von 300 bis 10000 Basen gut trennen, wobei die optimale Konzentration von der erwarteten Fragmentlänge abhängt. Hohe Agaroskonzentrationen bieten eine gute Trennung von kleinen Fragmenten, niedrige von großen.

Ein Agarosegel wird gegossen, indem die entsprechende Menge Agarose in Elektrophoresepuffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid durch Erhitzen gelöst wird und in einen dafür vorgesehenen Schlitten mit Kamm gegossen wird. Das Gel muss bis zum völligen Erstarren abkühlen. Danach wird das Gel in die Elektrophoresammer gesetzt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Jetzt können die Proben aufgetragen werden. Dazu müssen sie vorher mit Probenpuffer gemischt werden. Der Glycerinzusatz erleichtert das Einbringen der Probe in die Geltasche durch Erhöhung der Dichte. Die enthaltenen Farbstoffe ermöglichen es, während der Elektrophorese die Laufstrecke zu verfolgen. Zusätzlich zu den Proben wird ein Größenmarker, eine sogenannte DNA-Leiter, aufgetragen. Mit Hilfe der DNA-Leiter, die DNA-Fragmente in regelmäßigem Größenabstand enthält, kann die Größe der Fragmente in den Proben bestimmt werden.

Sind die Nukleinsäuren weit genug gelaufen, wird die DNA bzw. RNA unter UV-Licht (254 nm) visualisiert und das Ergebnis mittels Fotografie dokumentiert. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzindikator, der in DNA und RNA interkaliert. Bei Anregung durch UV-Licht leuchten Stellen mit Nukleinsäuren orange auf, während Stellen ohne Nukleinsäure dunkel erscheinen.

## *Material und Methoden*

Als **Elektrophoresepuffer** wird 0,5 x TBE-Puffer verwendet:

45 mM Tris

45 mM Borsäure

1,5 mM Na-EDTA

Die Pufferbestandteile werden in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

Als Probenpuffer dient 6 x Loading Dye Solution von Fermentas. Die verwendete DNA-Leiter ist der GeneRuler™ DNA Ladder Mix von Fermentas. Sie enthält 21 diskrete Fragmente folgender Größen (in Basenpaare):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1200, **1031**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100

Kann auf dem Agarosegel ein PCR-Produkt von Interesse identifiziert werden, wird es zur genaueren Untersuchung kloniert.

### 2.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit Nucleo-Spin® Extract II

Mit Nucleo Spin® Extract II steht ein Kit zur Verfügung, bei dem PCR-Produkte aus einem Agarosegel extrahiert und gleichzeitig aufgereinigt werden können. Das vorliegende Prinzip ist die Adsorption von DNA an eine Silicamembran nach Auflösen der Agarose.

Das Protokoll sieht folgendes Vorgehen vor:

Zunächst wird die DNA-Bande von Interesse unter UV-Licht aus dem Agarosegel exakt herausgeschnitten. Dabei ist darauf zu achten, die UV-Exposition möglichst gering zu halten, da UV-Licht DNA schädigt. Das Gelstück wird in ein 2 ml Eppendorfgesäß überführt, gewogen und mit der doppelten Menge an NT-Puffer versetzt. Durch Erwärmen auf 50 °C und gelegentliches Vortexen wird die Agarosegelmatrix aufgelöst. Nun wird die Mischung auf ein Nucleo Spin-Säulchen gegeben und 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die DNA an das Säulenmaterial. Die DNA wird weiter gereinigt, indem auf das Säulchen 600 µl NT3-Puffer gegeben werden und erneut 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert



## *Material und Methoden*

wird. Der NT3-Puffer wird durch zweiminütige Zentrifugation bei 11000 g quantitativ entfernt. Um die DNA zu eluieren, wird direkt auf das Säulenmaterial destilliertes Wasser pipettiert und eine Minute inkubiert, bevor erneut 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert wird. Das Elutionsvolumen (15-50 µl) richtet sich nach der Fragmentgröße und der erwünschten Aufkonzentrierung. Je kürzer die aufzureinigende DNA ist, desto weniger Wasser wird zur quantitativen Elution benötigt.

Der Reinheitsgrad der erhaltenen DNA ermöglicht den direkten Einsatz in enzymatischen Reaktionen (z.B. Ligation). PCR-Produkte von Interesse werden in einen Klonierungsvektor ligiert, um sie anschließend in Bakterienzellen zu vervielfältigen.

### 2.1.6. Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor

Unter einer Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA-Fragmente, hier die Verknüpfung eines PCR-Produkts mit einem Vektor.

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können. Sie bestehen mindestens aus einem Replikationsstart (origin of replication, ori) einem Selektionsgen (hier Ampicillin-Resistenzgen) und einer Klonierungsstelle (cloning site), um fremde DNA aufzunehmen. Der pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor der Firma Promega eignet sich als Klonierungsvektor, weil er ein high-copy-Plasmid ist und eine multiple cloning site mit zahlreichen Restriktionsschnittstellen besitzt.

Bei der Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T handelt es sich um eine sogenannte TA-Klonierung.

Die *Taq*-Polymerase produziert keine Amplifikate mit glatten Enden, sondern sie schafft meistens einen unspezifischen Überhang von einem Nukleotid, in der Regel einem Desoxyadenosin. Durch Konstruktion des pGEM<sup>®</sup>-T-Vektors mit T-Überhang, also einem freien Thymidin, lassen sich PCR-Produkte effizient ligieren.

## *Material und Methoden*

Ein Ligationsansatz enthält folgende Bestandteile:

- 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer
- 1 µl pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor
- 3 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl T4 DNA Ligase (3 U/ µl)

Um das bestmögliche Ergebnis zu erhalten, wird der Ligationsansatz über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### 2.1.7. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation mit Roti<sup>®</sup>-Transform

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA in Bakterienzellen.

Wie oben erwähnt, soll das in den pGEM<sup>®</sup>-T ligierte PCR-Produkt in Bakterienzellen eingeschleust und auf diese Weise vermehrt werden. Dazu werden sogenannte kompetente Zellen benötigt. Kompetenz ist die Fähigkeit von Zellen, frei im umgebenden Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Eine Möglichkeit Bakterien kompetent zu machen ist, sie Chemikalien auszusetzen. Dieses Prinzip wird bei dem Kit Roti<sup>®</sup>-Transform der Firma Roth herangezogen.

Das Protokoll zur Herstellung kompetenter *E. coli* sieht folgende Schritte vor:

Es wird unter sterilen, antibiotikafreien Bedingungen eine Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stamms in LB-Medium angelegt. Hier wird der *E. coli* Stamm DH5α verwendet.

50 ml LB-Medium werden mit 500 µl frischer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,7 erreicht haben.

Jetzt werden zehnmal je 1,9 ml der Bakteriensuspension in sterile 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 3.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Bakterien in 100 µl kaltem LB-Medium resuspendiert. Es werden zu jeder Bakteriensuspension 90 µl eiskaltes Roti<sup>®</sup>-Transform 1 gegeben. Nach sanftem Mischen werden 10 µl Roti<sup>®</sup>-Transform 2 hinzupipettiert und erneut gemischt. Die Ansätze werden 5 Minuten auf Eis inkubiert.

## *Material und Methoden*

Die nun kompetenten Zellen können direkt für Transformationen verwendet werden oder für spätere Transformationen bei -80 °C eingefroren werden. Dazu werden 5 µl des Ligationsansatzes mit den kompetenten Bakterien vermischt und für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert.

Im Anschluss werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wachsen nur solche Bakterien, die mit der Aufnahme des Plasmids die Ampicillinresistenz erworben haben.

### **LB-Medium:**

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid

ad 1l destilliertes Wasser

Mit NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren.

### **LB-Ampicillin-Medium:**

Zum LB-Medium werden unter sterilen Bedingungen 100 µg/ml Ampicillin addiert.

### **Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml):**

200 mg Ampicillin-Natrium

ad 10 ml destilliertes Wasser

Die Ampicillin-Stammlösung wird sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

### **LB-Agar:**

Zum LB-Medium wird vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt.

## *Material und Methoden*

### 2.1.8. Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen

Für die Plasmidpräparation werden am Vortag Einzelkolonien von den LB-Agar-Platten gepickt, in 4 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht im 37 °C-Schüttler bei 200 UpM inkubiert (Übernachtkultur).

Die Minipräparation basiert auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silicamembran und Elution der Plasmid-DNA nach zwei Waschschritten.

1,5 ml Bakteriensuspension werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei Raumtemperatur sedimentiert (3000 g, 5 Minuten). Der Überstand wird verworfen. Zum Bakterienpellet werden weitere 1,5 ml Bakteriensuspension gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wird abermals verworfen.

Das Bakterienpellet wird in 250 µl P1 Puffer resuspendiert und zur Lyse 250 µl P2 Puffer zugegeben. Man mischt vorsichtig durch mehrmaliges Umdrehen des Eppendorfgefäßes. Der Lyseerfolg ist an der schleimigen Konsistenz erkennbar.

Mit der Zugabe von 350 µl N3 Puffer und sorgfältigem Mischen folgt ein Präzipitationsschritt. Das Präzipitat wird 10 Minuten lang bei 16000 g sedimentiert. Der Überstand wird auf das QIAprep Säulchen überführt und für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Um die am Säulenmaterial adsorbierte Plasmid-DNA zu waschen, werden 500 µl Puffer PB addiert und 1 Minute zentrifugiert. Es folgt ein zweiter Waschschrift mit 750 µl Puffer PE und einminütiger Zentrifugation. Der Durchlauf wird verworfen. Um die Pufferreste quantitativ zu entfernen, folgt eine zweiminütige Zentrifugation. Zur Elution der Plasmid-DNA werden 50 µl steriles Wasser auf das Säulenmaterial gegeben und eine Minute stehen gelassen. Dann wird das Säulchen in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und 1 Minute zentrifugiert. Im Eluat befindet sich die aufgereinigte Plasmid-DNA, die im Restriktionsverdau und für die Sequenzanalyse eingesetzt werden kann.

## *Material und Methoden*

### 2.1.9. Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA

Um herauszufinden, welche Einzelkolonien den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor mit einligiertem PCR-Produkt enthalten, wird ein Restriktionsverdau durchgeführt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an festgelegten Positionen, den Restriktionsschnittstellen, schneiden.

Werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die vorne und hinten in der multiple cloning site des pGEM<sup>®</sup>-T-Vektors schneiden, wird die einligierte DNA herausgeschnitten.

Die Zusammensetzung des Verdau für den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ist:

5 µl aufgereinigtes Plasmid  
3 µl Tango™ Puffer  
0,5 µl *NdeI* (10U/µL)  
0,5 µl *NcoI* (10U/µL)  
6 µl destilliertes Wasser

Dieser Ansatz wird für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor er über ein Agarosegel analysiert wird.

### 2.1.10. Anlegen einer Bakteriendauerkultur

Die Einzelkolonien, die den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor mit Insert enthalten, sollen dauerhaft gelagert werden. Dazu eignet sich am besten eine Bakteriendauerkultur.

Dazu werden 425 µl einer frischen Übernachtskultur mit 75 µl Glycerin vermischt. Glycerin fungiert als Gefrierschutz für die Bakterien. Diese können nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C über mehrere Jahre gelagert werden. Aus einer Bakteriendauerkultur kann jederzeit wieder eine Übernachtskultur angeimpft werden.

## *Material und Methoden*

### 2.1.11. Quantifizierung der DNA

Die DNA-Konzentration kann photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt werden. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm kann eine Aussage über die Proteinkontamination der Probe getroffen werden. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,8 bis 2,0 auf.

Da das Messergebnis von RNA-Verunreinigungen und vom verwendeten Puffer verfälscht werden kann, sollte die Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Die DNA-Leiter kann auch als Konzentrationsmarker verwendet werden.

### 2.1.12. Sequenzierung

Um die Nukleotidsequenz des Inserts zu erhalten, wird die Plasmid-DNA, die nachweislich das Insert enthält, zum Sequenzieren geschickt. Diesen Service bietet die Firma Eurofins MWG Operon an. Dazu werden 50 bis 100 ng/ $\mu$ l gereinigte Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l eingeschickt.

### 2.1.13. Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank

Liegt das Sequenzierungsergebnis vor, kann die Sequenz einer Datenbankrecherche (<http://blast.NCBI.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen werden. Dabei wird die Sequenz mit schon bekannten Sequenzen verglichen. Besteht eine hohe Ähnlichkeit zu anderen BAHD-Acyltransferasen, handelt es sich bei dem Insert wahrscheinlich um das Mittelstück einer BAHD-Acyltransferase.

## Material und Methoden

### 2.1.14. Isolierung der 5'- und 3'-Enden mit GeneRacer™ Kit

Das GeneRacer™ Kit ermöglicht die Isolierung der 5'- und 3'-Enden von kurzen Transkripten. Es basiert auf der sogenannten RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction). Dazu wird die 5'-Cap-Struktur der mRNA entfernt und ein RNA-Oligonukleotid mit Hilfe einer T4-RNA-Ligase angeheftet. An den Poly-A-Schwanz der mRNA wird über den Oligo-dT-Primer bei der Reversen Transkription ebenfalls eine DNA-Sequenz angeheftet. Die nun erhaltene RACE-fertige cDNA besitzt am 5'- und am 3'-Ende bekannte Sequenzen, die als Primerbinderegionen bei der Amplifikation der cDNA-Enden dienen.

Das Protokoll der Firma Invitrogen sieht folgendes Vorgehen vor:

1. Gesamt-RNA aus *Coleus blumei* wird mit dem Enzym CIP (calf intestinal phosphatase) behandelt. Dieses Enzym entfernt 5'-Phosphatreste von Nucleinsäuren. Intakte mRNA mit 5'-Cap-Struktur wird nicht von CIP dephosphoryliert.

In einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgeläß wird auf Eis gemischt, gevortext und herunterzentrifugiert:

X µl	Gesamt RNA (1-5 µg)
1 µl	10 CIP-Puffer
1 µl	RNaseOut™ (40 U/µl)
1 µl	CIP (10 U/µl)
ad 10 µl	DEPC Wasser

Dieser Reaktionsansatz wird für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz nach kurzer Zentrifugation auf Eis gestellt.

## *Material und Methoden*

Es folgt die **Fällung der RNA**:

90 µl DEPC Wasser

100 µl Phenol-Chloroform

werden addiert und für 30 Sekunden gut gevortext. Es schließt sich eine fünfminütige Zentrifugation mit 16.000 g bei Raumtemperatur an. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zu diesem Überstand werden

2 µl Muschelglykogen (10 mg/ml)

10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2

addiert und gut gemischt. Jetzt kommen noch

220 µl 95% Ethanol

hinzu. Es wird geschüttelt und die Mischung 10 Minuten auf Eis gestellt.

Um die RNA zu sedimentieren, zentrifugiert man 20 Minuten lang bei 4 °C und 16000 g. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette entfernt, ohne das RNA-Pellet zu entfernen. Die RNA wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach mehrmaligem Umdrehen und schütteln folgt eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 16000 g bei 4 °C. Der Ethanol wird vorsichtig abgehoben und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur 2 Minuten getrocknet. Zum Schluss wird die RNA in 7 µl DEPC Wasser rückgelöst.

2. Die dephosphorylierte RNA wird mit TAP (tabacco acid phosphatase) behandelt, um die 5'-Cap-Struktur von intakter Vollängen-mRNA zu entfernen. Durch dieses Vorgehen entstehen 5'-Phosphatenden, die für die Ligation des RNA-Oligonukleotids essentiell sind.



## *Material und Methoden*

Dazu wird dieser Reaktionsansatz in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis zusammenpipettiert:

7 µl dephosphorylierte RNA

1 µl 10 TAP-Puffer

1 µl RnaseOut™ (40 U/µl)

1 µl TAP (0,5 U/µl)

Dieser Ansatz wird gemischt und herunterzentrifugiert, und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wird wieder herunterzentrifugiert und die Reaktion auf Eis platziert.

Zur **Fällung der RNA** wird wie oben beschrieben verfahren.

3. Es folgt die Ligation des RNA-Oligonukleotids GeneRacer™-RNA-Oligo an das 5'-Ende der mRNA.

Zum lyophilisierten GeneRacer™ RNA Oligo mit 44 Basen

5'-CGA CUG GAG CAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3'

werden 7 µl der gefällten RNA zugegeben.

Es wird durch Pipettieren gut gemischt und herunterzentrifugiert.

Nach fünfminütiger Inkubation bei 65 °C, wird für 2 Minuten auf Eis abgekühlt.

Nun werden die folgenden Reagenzien mit der RNA vermischt

1 µl 10 Ligase Puffer

1 µl 10 mM ATP

1 µl RNaseOut™ (40 U/µl)

1 µl T4 RNA Ligase (5 U/µl)

und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wird herunterzentrifugiert und auf Eis abgekühlt.

## *Material und Methoden*

Zur **Fällung der RNA** wird wie oben beschrieben verfahren.

4. Nach der Transkription erhält man RACE-fertige cDNA mit bekannten Primerbereichen an den 5'- und 3'-Enden. Der GeneRacer™-Oligo-dT Primer bindet an den Poly-A-Schwanz und ist an seinem 3'-Ende um eine bekannte Sequenz von 36 Basen verlängert.

Zur gefällten RNA wird

1 µl GeneRacer™ Oligo-dT-Primer

1 µl dNTP Mix

1 µl steriles destilliertes Wasser

addiert und alles für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt. Die Reaktion wird für eine Minute auf Eis abgekühlt und herunterzentrifugiert.

Der GeneRacer™-Oligo-dT-Primer ist 60 Basen lang und hat folgende Sequenz:

5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)<sub>24</sub>-3'

Nun werden diese Reagenzien hinzugefügt:

4 µl 5 First Strand Puffer

1 µl 0,1 M DTT

1 µl RNaseOut™ (40 U/µl)

1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl)

Man mischt durch Auf- und A-Basenpaareipettieren. Es wird herunterzentrifugiert und 60 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wird durch Erhitzen auf 70 °C für 5 Minuten inaktiviert. Nach Abkühlen auf Eis für 2 Minuten wird bei 16000 g zentrifugiert.

Zum Verdauen des RNA-Stranges wird mit

1 µl RNase H (2 U)

20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die cDNA ist nun einsatzbereit für die PCR.

## Material und Methoden

- Um das 5'-Ende des gewünschten Transkripts zu erhalten, setzt man bei der PCR den GeneRacer™-5'-Primer und einen transkriptspezifischen reverse Primer ein. Der GeneRacer™-5'-Primer ist komplementär zum GeneRacer™-RNA-Oligo. Wird kein PCR-Produkt erhalten, ist eine entsprechende nested PCR durchzuführen.

Für die erste 5'-RACE-PCR und für die 5'-nested-PCR wurden folgende genspezifischen Primer verwendet:

HCT-Cb-3' mit 23 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 67,8 °C:

5'-CAT GGC TGG AGG GGG CTG GTA CT-3'

HCT-Cb-3'n mit 23 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 67,8 °C:

5'-CGT CGG CTG CGT GGT GCT GCA TT-3'

Als Ankerprimer dient der GeneRacer™ 5'-Primer mit 23 Basen und einer angegebenen Schmelztemperatur von 74 °C:

5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'

Der PCR-Ansatz für die erste 5'-RACE PCR hat folgende Zusammensetzung:

5 µl	10 High Fidelity PCR Puffer
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	Gene Racer cDNA <i>Coleus</i> 1:5 verdünnt
3 µl	10 pmol/µl Primer HCT-Cb-3'
3 µl	10 pmol/µl Gene Racer 5'Primer
0,5 µl	(5 U/µl) High Fidelity Taq-Polymerase
ad 50 µl	nukleasefreies Wasser

## Material und Methoden

Das Programm für die PCR lautet wie folgt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	
49 °C/55 °C/60 °C	45 s	1
72 °C	3 min	
<hr/>		
95 °C	30 s	
49 °C/55 °C/60 °C	45 s	38
72 °C	1,5 min	
<hr/>		
72 °C	10 min	1

Die 5'-nested PCR wird analog zur 5'-RACE-PCR durchgeführt. Als Template wird 1µl des 5'-RACE-PCR Ansatzes (49 °C) und der Primer HCT-Cb-3n' in Kombination mit dem Gene Racer-5'-Primer eingesetzt.

- Um das 3'-Ende des gewünschten Transkripts zu erhalten, setzt man bei der PCR den GeneRacer™-3'-Primer und einen transkriptspezifischen forward Primer ein. Der GeneRacer™-3'-Primer bindet an den GeneRacer™-Oligo-dT-Primer. Wird kein PCR-Produkt erhalten, wird eine entsprechende nested PCR durchgeführt.

Für die erste 3'-RACE PCR und für die 3'-nested PCR stehen diese Primer zur Verfügung:

HCT-Cb-5' mit 29 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 69,5 °C:

5'-CCA CCA GGC TAC TTC GGC AAC GTG ATC TT-3'

HCT-Cb-5'n mit 28 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 66,6 °C:

5'-CGA CTA CTT GAG GTC AGC TCT GGA TTT C-3'

Der Ankerprimer ist bei beiden PCR-Ansätzen der GeneRacer™ 3'-Primer mit 25 Basen und einer angegebenen Schmelztemperatur von 76 °C:

5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'

Die Zusammensetzung der 3'-RACE-PCR entspricht der 5'-RACE-PCR. Die verwendeten Primer sind HCT-Cb-3' und GeneRacer™-3'-Primer. Die 3'-RACE-PCR wird wie die

## *Material und Methoden*

5'-RACE-PCR, aber bei vier verschiedenen Annealingtemperaturen (45 °C/50 °C/55 °C/60 °C) durchgeführt.

Im Ansatz für die 3'-nested-PCR sind als Primer HCT-Cb-3'n in Kombination mit dem Gene-Racer-3'-nested Primer und 1 µl des 3'-RACE-PCR Ansatzes zu verwenden. Das PCR-Programm wird identisch wiederholt.

7. Die PCR-Produkte werden in einen Klonierungsvektor ligiert, um sie weiter zu untersuchen.

Dazu werden die PCR-Banden aus dem Agarosegel herausgeschnitten, mit dem Nucleo Spin-Extract® II Kit aufgereinigt und in den pGEM®-T-Vektor ligiert. Als Klonierungstamm wird *E. coli* verwendet. Mittels Plasmidpräparation wird auf positive Klone hin untersucht. Positive Klone werden als Bakteriendauerkultur gelagert. Jeweils eine Minipräparation wird zum Sequenzieren geschickt. Entspricht das 5'- bzw. das 3'-Ende der Sequenz des Mittelstücks aus *Coleus blumei*, kann die Vollängensequenz der HST aus *Coleus blumei* amplifiziert werden.

### 2.1.15. Amplifikation der HST aus *Coleus blumei* zur Vollängensequenz

Ist die Sequenz des 5'- und des 3'-Endes der HST aus *Coleus blumei* bekannt, können Anfangs- und Endprimer bestellt werden und so die Vollängensequenz amplifiziert werden. Um die erhaltene Vollängensequenz in einen Expressionsvektor ligieren zu können, werden an die Primer zusätzlich jeweils eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease angehängt. Welche Schnittstellen an die Primer angeheftet werden, hängt von den Schnittstellen in der multiple cloning site des gewünschten Expressionsvektors ab. Restriktionsschnittstellen, die sich innerhalb der Vollängensequenz befinden, scheiden für die Klonierung aus.

Mit der im Internet frei nutzbaren Software NebCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) werden die Schnittstellen der HST-Vollängensequenz erfasst.

## Material und Methoden

Über den Forward-Primer wird eine *Xho* I Schnittstelle an die HCT-Vollängensequenz angehängt:

Cb-HCT-VLf mit 31 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 65,5 °C:

5'-ATC TCG AGA TGA AAA TCC ACG TGA GAG ATT C-3'

Über den Reverse-Primer wird eine *Bam*HI Schnittstelle an das 5'-Ende der HCT addiert:

Cb-HCT-VLr mit 30 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 65,4 °C

5'-TAG GAT CCT CAA ATC TGA TAG AGC AGC TTC-3'

Der PCR-Ansatz ist wie folgt zusammengesetzt:

5 µl 10 High Fidelity PCR Puffer  
3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl 10 mM dNTP-Mix  
1 µl cDNA Coleus 19.8.08  
1 µl 100 pmol/µl Primer Cb-HCT-VLf  
1 µl 100 pmol/µl Primer Cb-HCT-VLr  
0,5 µl (5 U/µl) High Fidelity Taq-Polymerase  
ad 50 µl nukleasefreies Wasser

Das PCR Programm ist dieses:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	
50 °C/55 °C/60 °C	45 s	1
72 °C	3 min	
<hr/>		
95 °C	30 s	
50 °C/55 °C/60 °C	45 s	30
72 °C	2 min	
<hr/>		
72 °C	10 min	1

## *Material und Methoden*

Der Erfolg der PCR wird anhand eines Agarosegels überprüft. Sind auf dem Agarosegel Banden mit der errechneten Größe sichtbar, werden diese wiederum ausgeschnitten und über Nucleo-Spin® Säulchen aufgereinigt.

### 2.1.16. Einbau des PCR-Produkts in den Expressionsvektor pET-15b

Das PCR-Produkt wird für die Ligation in den Expressionsvektor vorbereitet, indem es mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut wird. So werden überhängende Enden geschaffen, über die das Insert in den Vektor integriert wird.

Es besteht die Möglichkeit, das PCR-Produkt direkt mit Restriktionsenzymen zu verdauen. Da der Erfolg des Verdauens nicht überprüft werden kann, wird der „Umweg“ über eine Zwischenklonierung in pGEM®-T gegangen: das PCR-Produkt wird in pGEM®-T ligiert und in DH5α vermehrt. Nach Plasmidpräparation und Verdauung wird auf positive Klone hin untersucht. Ist ein positiver Klon vorhanden, wird die Plasmidpräparation eines positiven Klons zum Sequenzieren geschickt. So wird der Beweis erbracht, dass es sich tatsächlich um die HST-Volllänge-Sequenz mit durchgehendem Leseraster handelt.

Die Plasmidpräparation desselben positiven Klons wird für 3 Stunden bei 37 °C

folgendermaßen verdaut:

10 µl Plasmidpräparation Coleus Volllänge-Sequenz in pGEM®-T

3 µl Tango™ Puffer

1 µl *Xho*I (10U/µL)

1 µl *Bam*HI (10U/µL)

Um das Insert in den Vektor integrieren zu können, muss der Vektor ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI verdaut werden. Nur so entstehen zueinander kompatible, überhängende Enden für die Ligation.

## Material und Methoden

Der Verdau hat diese Zusammensetzung:

- 10  $\mu$ l pET-15b
- 3  $\mu$ l Tango Puffer
- 1  $\mu$ l *Xho*I (10U/ $\mu$ L)
- 1  $\mu$ l *Bam*HI (10U/ $\mu$ L)

Beide Verdau werden auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wird das Insert und der linearisierte Vektor aus dem Gel extrahiert und über ein Nucleo-Spin<sup>®</sup> Säulchen aufgereinigt.

Nun folgt die Ligation über Nacht bei 4 °C in dem Ansatz:

- 5  $\mu$ l verdautes PCR-Produkt
- 3  $\mu$ l verdauter pET-15b-Vektor
- 2  $\mu$ l 10 Rapid Ligation Puffer
- 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase
- ad 20  $\mu$ l steriles Wasser

Am nächsten Tag werden kompetente *E. coli* vom Stamm DH5 $\alpha$  mit 5  $\mu$ l dieses Ligationsansatzes transformiert. Die Bakterien werden auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C für mindestens 16 Stunden inkubiert. Nach Plasmidpräparation und anschließendem Verdau können die positiven Bakterienkolonien selektiert werden, die das Konstrukt aus CbHST-Vollängensequenz in pET-15b enthalten. Bevor der Expressionsstamm mit der Minipräparation transformiert wird, erfolgt die Sequenzierung der Vollängensequenz im pET-15b-Vektor. So wird das Leseraster und die Vollängensequenz verifiziert.



## *Material und Methoden*

### 2.1.17. pET-Vektoren

Es sind 44 verschiedene pET-Vektoren kommerziell bei der Firma Novagen erhältlich. Diese sind Expressionsvektoren und unterscheiden sich hinsichtlich der Klonierung, der Expression, der Detektion und der Reinigung der heterolog exprimierten Proteine.

Um einen geeigneten pET-Vektor auszuwählen, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden.

1. Die Menge an Protein, die exprimiert werden soll: Reichen kleinste Mengen aus, um z.B. Aktivitätstests durchzuführen, oder sollen große Mengen an Protein beispielsweise für Strukturaufklärungen gewonnen werden?
2. Die Eigenschaften des Proteins: Wie ist die Löslichkeit und die zelluläre Lokalisierung?
3. Wie ist die Kompatibilität der Restriktionsschnittstellen und des Leserasters von pET-Vektor und Insert?

Der hier verwendete pET-15b Vektor ist mit dem T7-Promotor, drei Klonierungsstellen (*Bam*HI, *Xho*I und *Nde*I), Ampicillinresistenz und N-terminalen 6xHis-Tag gefolgt von einer Thrombin-Spaltstelle ausgestattet. Der 6xHis-Tag ermöglicht die Aufreinigung des 6xHis-Fusionsproteins über eine Affinitätschromatographie und kann durch Inkubation mit Thrombin wieder abgespalten werden.

### 2.1.18. Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Es werden chemokompetente (siehe Kapitel 2.1.7) *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit 1 µl der Plasmidpräparation transformiert.

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS wird für die Expression der rekombinanten CbHST verwendet. Dieser Stamm eignet sich als Expressionsstamm, da die OmpT- und Lon-Proteasen genetisch inaktiviert sind und das Zielprotein daher vor Abbau geschützt ist. Für den Einsatz eines pET-Vektors eignen sich Stämme, die ein λ(DE3)-Lysogen in ihrem Bakterienchromosom enthalten, das die cDNA für die T7-RNA-Polymerase trägt. Die Transkription der T7-RNA-Polymerase auf dem Bakterienchromosom wird von dem lac-UV5-Promotor kontrolliert. Dieser Promotor wird durch IPTG induziert.

## *Material und Methoden*

Zur Kontrolle der Basalexpression vor der Induktion besitzt dieser Expressionsstamm zusätzlich das pLysS-Plasmid mit Chloramphenicolresistenz, das für T7-Lysozym kodiert. T7-Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase. Die Anwesenheit von pLysS erhöht die Toleranz der Bakterien gegenüber Plasmiden mit toxischen Proteinen. Eine zweite Eigenschaft von T7-Lysozym ist die Lyse von Bakterienzellwänden. Dies ist beim Aufschluss von Vorteil.

Nachdem die Anwesenheit des Inserts kontrolliert wurde und nach Anlegen von Bakteriendauerkulturen kann die CbHST exprimiert und aufgereinigt werden.

### 2.1.19. Heterologe Expression der CbHST

Für die Expression der CbHST wird zunächst eine Übernachtskultur des Expressionsstamms mit kompletter cDNA-Sequenz in pET-15b angelegt. Von dieser Vorkultur werden 600 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft und sofort ohne Induktion in den 25 °C-Schüttler gestellt. Nach 20 Stunden werden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 g sedimentiert. Die sedimentierten Bakterien werden sorgfältig vom Überstand befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Da sich die überexprimierte CbHST noch in den Bakterienzellen befindet, müssen diese aufgeschlossen werden. Die Ultraschallbehandlung führt dazu, dass die Bakterienzellmembranen geschädigt werden. Die gefrorenen Bakterien werden nach Auftauen auf Eis in 8 ml His-Tag-Bindepuffer resuspendiert und 1 min bei 0,3 Cycles und 100% aufgeschlossen.

#### **His-Tag-Bindepuffer:**

50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ -Puffer pH 8,0

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Zur Entfernung von Zelltrümmern, nicht aufgeschlossenen Bakterien, Zellorganellen und Einschlusskörperchen wird erneut zentrifugiert.

Nach Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g für 20 min gewinnt man den Proteinrohextrakt durch Dekantieren. Das Bakterienpellet wird erneut in 8 ml His-Tag-Bindepuffer resuspendiert und der Aufschluss wiederholt, um einen zweiten Proteinrohextrakt zu

## *Material und Methoden*

erhalten, der nach Proteingehaltsbestimmung mit dem ersten Proteinrohextrakt vereinigt wird.

Die klaren Proteinrohextrakte können für erste Enzymtests verwendet werden oder dem ersten Reinigungsschritt unterzogen werden.

### 2.1.20. Reinigung des exprimierten Proteins

Bei der Aufreinigung der heterolog exprimierten CbHST wird die Anwesenheit des His-Tags ausgenutzt. Der gesamte Rohextrakt wird über 1 ml Ni-NTA Superflow der Firma Merck, Darmstadt aufgereinigt. Die optimierte Methode, die für die Aufreinigung der CbRAS in Kapitel 3.3.9 Punkt 2 beschrieben ist, wird auch hier verwendet. Das eluierte Protein wird gegen 1 l 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit einem Zusatz von 0,02%  $\text{NaN}_3$  dialysiert. Die Proteinkonzentration sämtlicher Fraktionen wird nach Bradford (1976) bestimmt.

### 2.1.21. Abspaltung des His-Tags mit Thrombin

Zur Abspaltung des His-Tags wird die über die Nickelmatrix aufgereinigte und umgepufferte Elutionsfraktion gegen SpectraGel™ (siehe Kapitel 2.2.5) auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml aufkonzentriert. 600  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung werden mit 10% DMSO und mit 50  $\mu\text{l}$  Thrombin-Agarose (Thrombin CleanCleave™ Kit, Sigma, siehe Kapitel 2.2.14) versetzt und für 73 Stunden bei 25 °C inkubiert. Danach wird die Proteinlösung erneut auf ein Ni-NTA-Säulchen gegeben und nicht gebundenes, His-Tag-freies Protein aufgesammelt.

## *Material und Methoden*

### 2.1.22. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität

Die heterolog exprimierte CbHST wird in ersten Enzymtests auf Aktivität mit verschiedenen Substraten getestet. Dazu werden der Rohextrakt als auch die Elutionsfraktion der His-Tag-Aufreinigung in Standardenzymtests zur Bestimmung der RAS-, HST- und HQT-Aktivität (siehe Kapitel 2.2.4) eingesetzt.

### 2.2. Versuche zur Herstellung von CbRAS-Proteinkristallen

Zur Herstellung von für die Röntgenstrukturaufklärung benötigten Proteinkristallen werden bevorzugt heterolog überexprimierte Proteine verwendet, da die Aufreinigung wesentlich einfacher ist und große Proteinmengen zur Verfügung stehen. Die Grundvoraussetzung für die Kristallisation sind ausreichende Mengen an hochreinen und hochkonzentrierten Proteinlösungen. Da Kristallisationsexperimente sehr empfindlich auf Schwankungen bei der Proteinreinheit reagieren, muss zunächst ein reproduzierbares Reinigungsverfahren entwickelt werden.

#### 2.2.1. Expression des CbRAS-Proteins

Mit der Klonierung der CbRAS-Vollängensequenz in den Vektor pET-15b, mit dem *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformiert worden war (Berger et al.), stand ein leistungsstarkes Expressionssystem zur Verfügung.

Das verwendete Standardverfahren zur Expression der CbRAS mittels pET-System sieht folgende Vorgehensweise vor:

Ein Kolben mit 100 ml LB-Ampicillin-Medium wird mit 1 ml Übernachtskultur versetzt. Dieser Ansatz wird bei 37 °C und Schütteln bei 200 UpM bis zu einer optischen Dichte, gemessen bei 600 nm, zwischen 0,4 und 0,8 inkubiert. Die Bakteriensuspension wird nun auf 2 Kolben mit 50 ml Volumen aufgeteilt. Zu einem der beiden Kolben wird bis zu einer Endkonzentration von 1 mM IPTG zugegeben und sofort geschwenkt. Die zweite Bakterienkultur wird nicht induziert und dient später als Vergleichsprobe. Nach Induktion wird bis zur Ernte nach 5 Stunden bei 37 °C weitergeschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Kolben sofort auf Eis gestellt und die Bakterien bei 4 °C und 5000 g sedimentiert. Die Bakterienpellets werden durch Abtropfen von restlichem Medium befreit, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80 °C über Nacht gelagert werden.

Die gefrorenen Bakteriensedimente werden langsam auf Eis aufgetaut und in der vierfachen Menge an 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0 resuspendiert. Durch Ultraschallaufschluss bei 0,3 cycles und 100% für 1 Minute werden die Bakterien zerstört. Dabei wird darauf geachtet, dass die Temperatur nicht zu stark ansteigt, indem gleichzeitig mit Eis gekühlt wird. Der durch Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g gewonnene Überstand enthält gelöstes Protein, das Sediment wird verworfen.

## *Material und Methoden*

Der so gewonnene CbRAS-Proteinrohextrakt wird durch Aktivitätstests und nach jedem Aufreinigungsschritt mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Das Bakterienpellet wird verworfen.

### 2.2.2. Optimierung der Expression

Soll ein rekombinantes Protein wie die CbRAS in großen Mengen hergestellt werden, z.B. für die Kristallisation, muss das Zielprotein überexprimiert werden. Ist dies im Standardverfahren nicht der Fall, kann die Expression durch Variation verschiedener Parameter optimiert werden.

Alle Tests zur Optimierung der CbRAS-Expression werden zweimal in zeitlichem Abstand durchgeführt. Folgende Versuche werden durchgeführt:

#### 1. Variation der Inkubationszeit nach Induktion I

Zunächst soll der optimale Erntezeitpunkt ermittelt werden. Dazu werden fünf Kolben mit CbRAS-Übernachtkultur angeimpft. Liegt die optische Dichte zwischen 0,7 bis 0,8 wird durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Eine Kultur wird direkt nach Induktion geerntet. Alle weiteren Kulturen werden bei 37 °C geschüttelt und nacheinander geerntet. Die Erntezeitpunkte sind 3 h, 4 h, 5 h und 6 h nach Induktion. Die Kontrollproben werden parallel geerntet, sind aber nicht induziert.

#### 2. Variation der Inkubationstemperatur

Erniedrigung der Temperatur führt nicht nur zu einem verlangsamten Bakterienwachstum, sondern auch zu einer verlangsamten Bildung des Zielproteins. Dies kann zu einer Erhöhung des Anteils an gelöstem Protein führen.

Drei CbRAS-Bakterienkulturen werden bis zur gewünschten optischen Dichte bei 37 °C kultiviert. Nach Induktion mit 1mM IPTG wird eine Kultur standardmäßig bei 37 °C für 5 Stunden kultiviert. Die zweite Kultur wird nach Induktion bei 25 °C geschüttelt und nach 8 Stunden geerntet. Die dritte Kultur wird nach Induktion bei 4 °C inkubiert. Die Ernte erfolgt nach 96 h. Die mitgeführten Kontrollkulturen sind nicht induziert.

## *Material und Methoden*

### 3. Variation der Inkubationszeit nach Induktion II

Es werden vier CbRAS-Hauptkulturen angeimpft. Alle Hauptkulturen wachsen bis zur optischen Dichte von 0,7 bis 0,8 im 37 °C-Schüttler. Nach Induktion durch Zugabe von 1mM IPTG wird bei 25 °C kultiviert. Es wird zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten abzentrifugiert. Der erste Kolben wird direkt nach Induktion geerntet, alle weiteren nach 6 h, 8 h und 10 h. Die nicht induzierten Kontrollproben werden parallel geerntet.

### 4. Variation der IPTG-Konzentration

Die Expressionsstärke im pET-System kann über die zugegebene Menge an IPTG beeinflusst werden. Je höher die IPTG-Konzentration, desto höher ist die Expression des heterologen Proteins. Laut Herstellerangaben können niedrige Expressionslevel z.T. die Löslichkeit der gebildeten Proteine erhöhen. Es wird empfohlen, IPTG-Konzentrationen zwischen 25 µM und 1 mM zu testen.

Vier CbRAS-Hauptkulturen werden mit unterschiedlichen Mengen an IPTG induziert. Je ein Kolben wird auf eine Endkonzentration von 0,05 mM IPTG, 0,1 mM IPTG, 0,5 mM IPTG und 1 mM IPTG eingestellt. Nach Induktion wachsen die Kulturen nicht mehr bei 37 °C, sondern schütteln für 8 h bei 25 °C.

### 5. Variation der Inkubationszeit ohne Induktion

Es ist von Interesse, ob die Handhabung der Expression vereinfacht werden kann, indem auf die Wachstumsphase bei 37 °C verzichtet werden kann. Dazu werden drei CbRAS-Hauptkulturen sofort bei 25 °C geschüttelt und ohne Induktion für 17 h, 28 h und 42 h kultiviert.

### 6. Variation des Aufschlusspuffers

Detergenzien im Aufschlusspuffer können in einigen Fällen den Anteil an gelöstem Protein im Rohextrakt erhöhen.

Drei CbRAS-Kulturen werden bis zur Induktion mit 0,1 mM IPTG im Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wachsen sie für 8 h bei 25 °C. Zur Herstellung des Proteinrohextrakts wird ein detergentienhaltiger Aufschlusspuffer verwendet. Der Aufschlusspuffer der Kontrollprobe ist 0,1 M KPi pH 7,0. Zur Herstellung eines dritten Rohextraktes wird His-Tag-Bindepuffer verwendet. Es soll untersucht werden, ob dieser

## Material und Methoden

Puffer geeignet ist. Wäre dies der Fall könnte der Herstellungsprozess der hochgereinigten CbRAS vereinfacht werden, da vor der His-Tag-Aufreinigung das Umpuffern entfallen würde.

### Aufschlusspuffer mit Detergens:

292,2 mg NaCl  
37,2 mg EDTA  
200 mg Desoxycholat  
1 ml Triton X 100  
Ad 100 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5

#### 7. Variation der Aufschlusszeit

Es wird untersucht, ob die Bakterien bei dem Aufschluss unter Standardbedingungen vollständig zerstört werden. Dazu wird insgesamt 10 min lang aufgeschlossen. Nach jeder Minute wurde eine Probe gezogen und deren Proteingehalt bestimmt. Es werden in einem Diagramm die Aufschlusszeit gegen den Proteingehalt aufgetragen.

#### 8. Variation des Expressionszellstamms

Die Kombination aus Vektor und *E. coli*-Stamm beeinflusst die Expressionsstärke des Zielproteins. Um zu sehen, ob der Wechsel des Expressionsstamms zu einer verbesserten Überexpression führt, werden zwei verschiedene Übernachtskulturen angeimpft. Die erste stellt die Kontrolle dar und besteht aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit der cDNA-Sequenz im Plasmid pET-15b. Bei der zweiten Übernachtskultur befindet sich der Vektor pET-15b inklusive CbRAS-cDNA im *E. coli*-Stamm BL21.

Von jeder Übernachtskultur werden 9 Hauptkulturen angelegt und den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Dabei wird neben der Wachstumstemperatur zusätzlich die zugegebene IPTG-Konzentration variiert.

Folgende Wachstumsbedingungen werden getestet:

- Wachstum bei 37 °C für 5 h
- Wachstum bei 25 °C für 8 h
- Wachstum bei 4 °C für 96 h



## *Material und Methoden*

Für jede Wachstumsbedingung wird eine Kultur nicht induziert, eine mit 0,1 mM IPTG und eine mit 1mM IPTG versetzt.

### 9. Variation des Expressionsvektors

Führt die Optimierung der Kulturbedingungen allein nicht zum Erfolg, besteht im Austausch des Vektors eine weitere Möglichkeit, die Überexpression der CbRAS zu erreichen. Die Wahl des Vektors richtet sich nach den Eigenschaften des Proteins. Ist die Löslichkeit des Proteins schlecht, empfiehlt sich die Verwendung eines Vektorsystems, mit dessen Hilfe die CbRAS als gut lösliches Fusionsprotein hergestellt wird.

Für die Expression der CbRAS mit GST-Tag wird der pET-41a Vektor herangezogen (Umklonierung der CbRAS siehe Kapitel 2.3). Der Expressionszellstamm ist *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Es werden 6 Hauptkulturen angeimpft. Als Kulturmedium dient LB Medium mit einem Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin. Die Bakterien wachsen im Schüttler bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,8. Zwei Kulturen wird kein IPTG zugesetzt, zwei Kulturen werden auf eine IPTG-Endkonzentration von 0,1 mM eingestellt und zwei Kulturen auf 1 mM IPTG. Anschließend werden die Bakterien bei 25 °C für 8 h oder bei 4 °C für 96 h kultiviert. Die Verteilung der Kolben ist so, dass für jede Temperatur alle Induktionsbedingungen vertreten sind.

### 2.2.3. Reinigung des Proteins über His-Tag Affinitätschromatographie

Die heterolog exprimierte CbRAS mit 6xHis-Anhang kann über einen Affinitätschromatographieschritt aufgereinigt werden. Hierfür muss das Enzym in His-Tag-Bindepuffer gelöst vorliegen. Ist der Proteinrohextrakt nicht direkt mit diesem Bindepuffer hergestellt worden, muss zunächst umgepuffert werden. Dies kann wahlweise über PD10-Säulchen erfolgen oder per Dialyse.

Das verwendete Säulenmaterial zur Aufreinigung der CbRAS ist Ni-NTA His Bind<sup>®</sup> Resin der Firma Novagen. Das Säulenmaterial besteht aus mit Agarose verbundener Nitriloessigsäure, die einen Chelatkomplex mit Nickelionen bildet. Bei der Aufreinigung von histidinreichen Proteinen wird die Affinität des His-Tags zu den immobilisierten Nickelionen ausgenutzt. Die

## *Material und Methoden*

Bindekapazität des Säulenmaterials wird mit 5-10 mg Protein pro ml Säulenmaterial angegeben.

Der Hersteller sieht folgende Reinigungsschritte vor:

Zunächst wird 1 ml des Säulenmaterials mit 4 ml Bindepuffer konditioniert, so dass unspezifische Bindungen und schwache Interaktionen zu Verunreinigungen verhindert werden. Das Säulenmaterial wird in eine leere gesäuberte PD10-Säule überführt. Der Äquilibrierungspuffer wird entfernt. Nach Zugabe des Proteinrohextraktes zur Nickelmatrix wird die Säule gut verschlossen und für 60 min auf einem Schüttler eisgekühlt geschwenkt. Jetzt bindet das 6xHis-Fusionsprotein an die Nickelmatrix. Der von der CbRAS befreite Rohextrakt wird abgelassen und als Durchlauf gesammelt. Idealerweise ist der Durchlauf frei von heterolog exprimierter RAS. Es folgen zwei Waschschrte mit jeweils 4 ml Waschpuffer. Der auf 20 mM erhöhte Imidazolgehalt sorgt für die Elution von bakteriellen Proteinen, die Histidinreste aufweisen. Nun wird die CbRAS durch 4 aufeinanderfolgende Elutionsschritte mit 0,5 ml Elutionspuffer eluiert. Der hohe Imidazolgehalt dieses Puffers verdrängt den His-Tag von der Nickelmatrix. Durchlauf, Waschfraktionen und die Elutionsfraktionen werden getrennt gesammelt. Zur Kontrolle des Reinigungseffekts werden Aktivitätstests, Proteingehaltsbestimmungen und SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

### **His-Tag-Bindepuffer:**

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

**His-Tag-Waschpuffer:** wie His-Tag-Bindepuffer, aber mit 20 mM Imidazol.

**His-Tag-Elutionspuffer:** wie His-Tag-Bindepuffer, aber mit 250 mM Imidazol.

Verschiedene Parameter der oben beschriebenen Durchführung werden variiert, um die Aufreinigung zu optimieren:

Zum einen wird die Konzentration der verwendeten Puffer variiert. Waschpuffer mit einem Imidazolgehalt von 10 mM Imidazol bis 50 mM Imidazol und Elutionspuffer von 100 bis 500 mM Imidazol werden getestet. Der Reinigungseffekt wird analysiert. Zum anderen wird untersucht, ob der Reinigungseffekt verbessert werden kann, wenn mehr heterolog

## *Material und Methoden*

exprimierte RAS aufgetragen wird. Dazu wird 8 ml Rohextrakt zum His-Tag Resin gegeben und geschwenkt. Nach Entfernen des Durchlaufs werden weitere 8 ml Rohextrakt aufgetragen. Elutions- und Waschschrirte entfallen. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt. Ist sämtlicher Rohextrakt aufgebraucht, wird gewaschen und eluiert.

### 2.2.4. Umpuffern der Elutionsfraktion über PD10-Säulen

Proteinlösungen können entsalzt und umpuffert werden, indem sie über PD10-Säulen aufgereinigt werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Größenausschlusschromatographie. Das Ausschlussvolumen des Säulenmaterials liegt bei 5 kDa. Gelöste Substanzen wie Proteine, die diese Größe überschreiten, werden zuerst eluiert. Die stationäre Phase besteht aus 8,3 ml einer Sephadex G-25 Matrix.

Die Elutionsfraktionen der His-Tag-Aufreinigung werden wie folgt umpuffert:

Zunächst wird die Säule mit 25 ml KPi-Puffer pH 7,0 äquilibriert. Dies ist der Puffer, in den das Protein umpuffert wird. Anschließend wird die Probe auf die Säule pipettiert. Das Probenvolumen darf 2,5 ml nicht übersteigen. Nun wird die CbRAS mit 3,5 ml KPi-Puffer pH 7,0 eluiert.

### 2.2.5. Umpuffern und Aufkonzentrierung durch Dialyse

Die Dialyse ist eine sehr schonende Methode, um Proteinlösungen umzupuffern und aufzukonzentrieren. Verwendet wird ein Dialysierschlauch (ZelluTrans Roth®) aus regenerierter Cellulose mit einer Porengröße von 25 Å (nominale Filterrate 12,0 kDa). Vor dem Befüllen des Schlauchs mit der Proteinlösung, die umpuffert werden soll, muss die Membran 20 min in destilliertem Wasser konditioniert werden. Danach wird der Schlauch an einer Seite mit der Klammer verschlossen und die Proteinlösung eingefüllt. Nachdem der Schlauch mit der zweiten Klammer verschlossen ist, wird er in den Dialysepuffer überführt. Salze und Puffer mit niedrigem Molekulargewicht wie Phosphatpuffer und Tris/HCl äquilibrieren unter Rühren innerhalb von 3 Stunden (Herstellerangaben). Dabei sind Permeationsprozesse über die semipermeable Membran für den Pufferaustausch

## *Material und Methoden*

verantwortlich. Moleküle mit einem Molekulargewicht von über 12 kDa passieren die Membran nicht.

Das Volumen des Dialysierpuffers soll mindestens dem 50-fachen Volumen der Probe entsprechen. Es wird mindestens für 3 Stunden im Kühlraum dialysiert. Wird die aufgereinigte heterolog exprimierte CbRAS umgepuffert und folgt kein weiterer Aufreinigungsschritt, so wird der Dialysierpuffer einmal erneuert und über Nacht bei 4 °C umgepuffert. So wird ein vollständiger Wechsel des Puffersystems erreicht.

Zur schonenden Aufkonzentrierung der Proteinlösungen verbleibt die umgepufferte Probe im Dialysierschlauch und wird in SpectraGel™ Absorbent eingebettet. Hierbei handelt es sich um ein wasserunlösliches Polyacrylgranulat, welches der Probe Flüssigkeit entzieht. So wird die Proteinlösung im Dialysierschlauch nicht beeinträchtigt oder verunreinigt. Um 5 ml Lösung auf 0,5 ml zu reduzieren braucht man ca. 60 min.

### 2.2.6. Optimierung der Aufkonzentrierung der CbRAS

Die Grundvoraussetzung zur Kristallisation der CbRAS ist die Präparation von hochreinen und hochkonzentrierten Proteinlösungen. Richtwert ist eine Proteinkonzentration zwischen 5 und 10 mg/ml.

Es wird untersucht, in welchem Puffersystem die höchste Aufkonzentrierung der CbRAS erreicht wird. Es wird bei 4 °C gearbeitet. Dazu wird die hochgereinigte CbRAS, die zuerst über His-Tag-Affinitätschromatographie und anschließend über FPLC (siehe Kapitel 2.2.12) gereinigt wurde, über Dialyse in verschiedene Puffersysteme überführt:

1. 0,1 M KPi pH 7,0
2. 50 mM Tris/HCl pH 8,0
3. 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl
4. 20 mM Tris/HCl pH 7,5

## *Material und Methoden*

Die pH-Werte der Puffer werden bei 4 °C eingestellt.

Die Löslichkeit der CbRAS wird neben dem pH-Wert auch von der Ionenstärke des umgebenden Mediums beeinflusst. Liegt der pH-Wert des Puffers nahe am isoelektrischen Punkt des Proteins, so wird dessen Löslichkeit herabgesetzt. Die Löslichkeit von vielen Proteinen ist in Anwesenheit von gelösten Salzen erhöht, ein Phänomen, das als Einsalzen bezeichnet wird.

### 2.2.7. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration sämtlicher Proteinrohextrakte und gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung wird standardmäßig bestimmt. Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) ist eine schnelle und sensitive Methode, um Proteinkonzentrationen photometrisch zu bestimmen.

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bildet in saurem Milieu unspezifische Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm. Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption der Proben gemessen. Durch Vergleich der Absorption der Proben mit derjenigen eines BSA-Standards eingestellt auf 1 mg/ml kann die Proteinkonzentration errechnet werden. Eine Referenz mit Puffer anstelle der Proteinlösung dient als Nullabgleich.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden mit 2 ml Bradford-Reagenz gemischt:

10 µl Puffer als Referenz	oder
10 µl 1 mg/ml BSA-Standard	oder
10 µl zu messende Proteinlösung	

Diese Ansätze inkubieren 15 Minuten bei Raumtemperatur bevor sie photometrisch gegen die Referenz vermessen werden.

## *Material und Methoden*

### **Das Bradford-Reagenz hat folgende Zusammensetzung:**

100 mg Coomassie Brillant Blue G 250

50 ml 96% Ethanol

850 ml destilliertes Wasser

100 ml 85% o-Phosphorsäure

Zum Entfernen von Schwebeteilchen wird der Ansatz doppelt filtriert.

### 2.2.8. Kontrolle der Überexpression und der Proteinreinigung über SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumlauroylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Tensid, das an die Proteine bindet und die Eigenladung der Proteine überdeckt. Da die Menge an gebundenem SDS mit der Masse des jeweiligen Proteins korreliert, wird eine Trennung nach Molekulargewicht erreicht. Durch Färben des Gels mit Coomassie-Lösung können die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Ein Marker, der verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthält, ermöglicht die Bestimmung der Größe der Proteine. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Größenmarker verwendet: Roti<sup>®</sup>-Mark STANDARD und Roti<sup>®</sup>-Mark 10-150 PLUS der Firma Roth.

Diese SDS-Page wurde von Ulrich Laemmli in abgewandelter Form schon 1970 beschrieben.

Analysiert man einen Proteinrohextrakt mittels SDS-PAGE, ist zu erkennen, ob ein heterolog exprimiertes Protein überexprimiert wird oder nicht. Die Güte der Aufreinigung des Proteins wird ebenso durch dieses Verfahren bestimmt. So kann die Frage beantwortet werden, ob nach der His-Tag-Aufreinigung das Protein noch verunreinigt ist oder nicht.

Vorbereitung des Gels:

Bei der Durchführung einer SDS-PAGE werden zunächst die Acrylamidgele gegossen. Dazu werden die verwendeten Glasplatten gesäubert und die Gelgießapparatur zusammengesetzt. Der Probenkamm wird kurzzeitig eingesetzt, um die Glasplatten 1 cm unter den Taschen zu markieren. Zuerst wird das Trenngel direkt nach der Zugabe von APS bis zur markierten

## Material und Methoden

Höhe zwischen die Glasplatten gegossen. Das Trenngel wird sofort mit 0,5 ml 1-Butanol überschichtet, um Grenzflächeneffekte zwischen Gel und Luft auszuschalten. Nach 20 min ist das Trenngel ausgehärtet. Das Butanol wird mit Filterpapier entfernt. Nun wird das Sammelgel gemischt und über das Trenngel geschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wird der Probenkamm blasenfrei eingesetzt.

### Trenngel:

2,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,0
3,35 ml	destilliertes Wasser
4,1 ml	30% ige Acrylamid-Stammlösung mit 2% Bisacrylamid
50 µl	20% SDS
16 µl	TEMED
70 µl	10% APS

### Sammelgel:

1,25 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
2,97 ml	destilliertes Wasser
0,75 ml	30% ige Acrylamid-Stammlösung mit 2% Bisacrylamid
25 µl	20% SDS
10 µl	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
35 µl	10% Ammoniumperoxydisulfat

Die Komponenten werden nacheinander unter Rühren vermischt.

Nach der Zugabe der Polymerisationsstarter TEMED und APS ist auf zügiges Arbeiten zu achten.

### Probenvorbereitung:

Die Proteinproben werden entweder direkt oder nach Aufkonzentrierung durch TCA-Fällung (siehe Kapitel 2.2.9) verwendet. Die mit Roti<sup>®</sup>-Load 1 vermischten Proben (3 Teile Probe, 1 Teil Roti<sup>®</sup>-Load) werden zum Denaturieren für 3 bis 5 min in kochendem Wasser erhitzt, kurz zentrifugiert und können dann auf das Gel aufgetragen werden.

## Material und Methoden

### Elektrophorese:

Die Elektrophoreseapparatur wird nach Herstellerangaben aufgebaut und mit Elektrophoresepuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Der Kamm wird vorsichtig entfernt, so dass die Taschen intakt bleiben. Mit einer Pipette können die Proben in die Taschen gefüllt werden. In eine Tasche werden 10 µl Marker pipettiert. Nach elektrophoretischer Trennung bei 200 Volt für 2 bis 3 Stunden wird das Gel vorsichtig zwischen den Glasplatten herausgenommen und gefärbt.

### Laufpuffer:

0,1% SDS  
192 mM Glycin  
25 mM Tris/HCl pH 8,3

### Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250:

Nach der Elektrophorese wird das Ergebnis durch Färbung sichtbar gemacht. Für die Coomassie-Färbung wird das Gel für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt. Durch die enthaltene Essigsäure werden die Proteine im Gel fixiert. Gleichzeitig lagert sich der Farbstoff an die Proteine an. Anschließend wird das Gel durch mehrstündiges Schwenken in Entfärbelösung entfärbt. Nur an den Stellen, an denen die Proteine fixiert sind, bleibt die blaue Farbe sichtbar. Das Ergebnis wird fotografisch dokumentiert (eingescannt).

### Färbelösung:

0,625 g Coomassie Brilliant Blue R 250  
50 ml Eisessig  
225 ml destilliertes Wasser  
225 ml Methanol

### Entfärbelösung:

50 ml Eisessig  
225 ml destilliertes Wasser  
225 ml Methanol

Die Sensitivität der Coomassie-Färbung liegt bei 100 ng bis 1 µg pro Bande. Das Probenvolumen richtet sich nach dem Reinheitsgrad und der Proteinkonzentration. Erfahrungsgemäß führt das Auftragen von 20 µl eines Rohextraktes mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml zu guten Ergebnissen. Proteinbanden mit 5 µg Protein sind gut sichtbar. Dieser Richtwert gilt für gereinigte Proteine.



## *Material und Methoden*

### 2.2.9. TCA-Fällung zur Aufkonzentrierung der Fraktionen

Einige Fraktionen aus der His-Tag-Aufreinigung der CbRAS weisen einen sehr geringen Proteingehalt auf. Dabei liegen die Konzentrationen weit unter der Nachweisgrenze mittels SDS-PAGE. Daher wird das Gesamtprotein unter denaturierenden Bedingungen mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und somit aufkonzentriert.

Für die Fällung wird zu jeder Probe ein ihr entsprechendes Volumen an 40% Trichloressigsäurelösung gegeben. Nach Umschwenken folgt die Fällung während 60 min bei +8 °C. Das gefällte Gesamtprotein wird durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 15000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und verworfen. Das Sediment wird zweimal in eiskalten 80% Aceton gewaschen. Das in der SpeedVac getrocknete Sediment wird in 20 µl 0,1 M Natriumcarbonatlösung mit 10% Saccharose resuspendiert.

### 2.2.10. Aktivitätstests zur Kontrolle des Reinigungseffekts

Die CbRAS-Rohextrakte und sämtliche aufgesammelten Fraktionen aus der Aufreinigung werden auf RAS-Aktivität hin untersucht. Dazu wird das Standardpipettierschema (siehe Kapitel 2.2.4) mit den Substraten Caf-CoA und pHPL verwendet. Die spezifischen Aktivitäten werden nach HPLC-Analyse berechnet. Um zu gewährleisten, dass die Enzymreaktion im linearen Bereich erfasst wird, werden unverdünnte, 1:10 und 1:100 verdünnte Proteinlösungen in den Enzymtests eingesetzt.

### 2.2.11. Reinigung des Proteins über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Juliane Meinhard konnte 1995 die native RAS durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung anreichern, wobei die RAS zwischen 60 und 80% Sättigung ausgefällt wurde. Es soll überprüft werden, ob die Verunreinigungen der CbRAS nach der His-Tag-Aufreinigung einfach und schnell durch diesen Fällungsschritt erzielt werden kann. Dies wäre der Fall,

## *Material und Methoden*

wenn die Verunreinigungen unter 60% Sättigung gefällt werden und nur die CbRAS über 60% Sättigung.

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ist eine einfache und wirkungsvolle Methode zur groben Reinigung und Konzentrierung von Proteinlösungen (Cooper 1981). Die Fällung der in Phosphatpuffer umgepufferten und aufkonzentrierten CbRAS-Elutionsfraktion wird auf Eis durchgeführt. Im ersten Fällungsschritt wird zu 30 µl Proteinlösung tropfenweise 45 µl eiskalte, gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 7,0 gegeben (60% Sättigung). Die Lösung wird 40 min auf Eis geschwenkt. Präzipitierte Proteine werden durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 20000 g bei 4 °C pelletiert. Zur Fällung mit 80% Sättigung wurde der Überstand (75µl) mit dem gleichen Volumen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nach wiederholtem Schwenken auf Eis und Zentrifugation wird der Überstand sorgfältig entfernt. Die Sedimente werden in 30 µl 0,1 M KPi pH 7,0 gelöst.

Alle Fraktionen werden auf RAS-Aktivität hin untersucht und der Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.2.12. Reinigung des Proteins über TSK AF-Blue Affinitätschromatographie

Ist die CbRAS nach der His-Tag-Aufreinigung immer noch mit Fremdproteinen verunreinigt, empfiehlt es sich, weitere Aufreinigungsschritte anzuschließen. Dazu wird in 0,1 M KPi-Puffer pH 7 umgepuffertes Enzym verwendet.

Meinhard hat 1995 eine FPLC-Methode beschrieben, bei der die native RAS aus Zellkulturen von *Coleus blumei* erfolgreich angereichert werden kann. Diese Methode kommt in identischer Weise zur Aufreinigung der über His-Tag vorgereinigten CbRAS zur Anwendung. Es ist zu beachten, dass der 6xHis-Tag die Affinität zum Säulenmaterial und das Elutionsverhalten beeinflussen kann. Außerdem ist die heterolog exprimierte CbRAS mit anderen bakteriellen Proteinen verunreinigt. Das verwendete Säulenmaterial Fractogel TSK AF-Blue (8 ml) besitzt eine Affinität zu CoA-bindenden Enzymen. Diese Affinität kann durch hohe KCl-Konzentrationen im Puffer B aufgehoben werden und führt zur Elution der CbRAS.

Vor Beginn der Chromatographie wird die Proteinlösung zur Entfernung von Schwebeteilchen 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Alle Schläuche sowie die Einspritzschleife werden mit Puffer A gespült und die Säule mit diesem Puffer äquilibriert. Die Aufreinigung

## *Material und Methoden*

der CbRAS erfolgt bei Raumtemperatur. Der gesamte Chromatographieverlauf wird zum einen durch photometrische Detektion der eluierten Proteine bei 280 nm verfolgt, zum anderen werden bei einer Flussrate von 1 ml/min 2 ml-Fractionen aufgesammelt. Alle Fractionen werden auf RAS-Aktivität untersucht. Nach dem Einspritzen der Proteinprobe wird die Säule zunächst für 10 min mit Puffer A gespült. Diejenigen Proteine, die keine Affinität zum Säulenmaterial besitzen, befinden sich im Durchlauf. Es folgt die Elution durch einen linearen Salzgradienten von 0 M bis 1 M KCl. Dazu wird innerhalb von 30 min der Anteil von Puffer A reduziert, während der Anteil an Puffer B erhöht wird. Während dieses Gradienten werden sukzessive Proteine je nach ihrer Bindungsstärke an das Säulenmaterial von der Säule eluiert. Zuletzt wird die Säule mit Puffer B für 10 min gespült.

### **Puffer A:**

10 mM KPi pH 7,0  
1 mM DTT

### **Puffer B:**

10 mM KPi pH 7,0  
1 mM DTT  
1 M KCl

Die Puffer werden autoklaviert und direkt vor dem Gebrauch sterilfiltriert.

Eine RAS-Aktivität enthaltende Fractionen werden vereinigt und nach Einfüllen in einen Dialysierschlauch umgepuffert und aufkonzentriert. Die Reinheit der CbRAS wird auf einem SDS-Gel analysiert.

Nach eingehender Analytik der gesammelten Fractionen wird das Programm an das Elutionsverhalten der heterolog exprimierten CbRAS und ihrer Verunreinigungen angepasst. Die Beschreibung der optimierten Methode befindet sich im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3.3.9).

### 2.2.13. Aufreinigung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies

Entstehen fehlerhaft oder unvollständig gefaltete Proteine als unlösliche Aggregate im Cytoplasma von Zellen, so spricht man von Einschlusskörperchen oder inclusion bodies. Inclusion bodies von heterolog exprimierten Proteinen werden vor allem dann gebildet, wenn das Protein schwer löslich ist und exzessiv synthetisiert wird. Es besteht die Möglichkeit, das Protein dieser Einschlusskörperchen zu lösen, zurückzufalten und die Enzyme in aktiver Form zu gewinnen. Soll ein Protein in großer Menge und mit hoher Reinheit hergestellt werden, bietet die Rückfaltung aus inclusion bodies einige Vorteile. Zum einen können sie

## *Material und Methoden*

leicht und in großer Menge hergestellt werden, zum anderen wird die Aufreinigung erleichtert, da sie sehr sauber sind. Je nach Zielprotein und Expressionsbedingung können die gewaschenen inclusion bodies einen Reinheitsgrad von über 90% aufweisen.

Das Protein Refolding Kit der Firma Novagen wird verwendet, um die CbRAS aus inclusion bodies zu gewinnen. Dabei werden die unlöslichen Einschlusskörperchen zunächst durch Zentrifugation isoliert und in einem alkalischen CAPS-Puffer in Kombination mit N-Lauroylsarcosin in Lösung gebracht, gefolgt von einer Dialyse unter milden denaturierenden Bedingungen. Hierbei wird das Protein korrekt zurückgefaltet. Zum Schluss kann in einen Puffer der Wahl umgepuffert werden. Die optimalen Bedingungen müssen für jedes Protein empirisch ermittelt werden.

Die Anleitung des Herstellers zur Gewinnung der inclusion bodies sieht folgendes Vorgehen vor:

Zunächst wird das entsprechende Enzym in einer Bakterienkultur heterolog exprimiert. In diesem Fall werden 3 l Hauptkultur (CbRAS-VL in pET-15b in *E. coli* BL21(DE3)pLysS) angeimpft und sofort in den 25 °C-Schüttler gestellt. Die Bakterien mit den CbRAS inclusion bodies werden nach 24 Stunden als 12 Bakterienpellets durch Zentrifugation geerntet.

Zur Gewinnung der CbRAS aus inclusion bodies wird ein Bakterienpellet aufgearbeitet. Die Bakterien werden in 25 ml 1x IB Wash Buffer resuspendiert und per Ultraschall (0,3 cycles, 100%, 10x 1 min) aufgeschlossen. Auf jede Minute Aufschluss folgt eine Minute Kühlen auf Eis. Nun werden die inclusion bodies durch Zentrifugation mit 10000 g für 10 Minuten isoliert. Der Überstand mit löslichen Proteinen und löslicher CbRAS wird verworfen. Um lose assoziierte Verunreinigungen zu entfernen, wird das Sediment erneut in 25 ml 1x IB Wash Buffer resuspendiert und das Nassgewicht nach wiederholter Zentrifugation bestimmt. Um bei einer Masse von 520 mg eine Endkonzentration zwischen 1 und 4 mg/ml zu erreichen, werden 35 ml 1x IB Solubilization Buffer, der mit 0,35 ml N-Laurylsarcosinlösung und 35 µl 1 M DTT versetzt ist, zugegeben. Die inclusion bodies werden vorsichtig resuspendiert und bei Raumtemperatur für 25 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt. Durch Zentrifugation mit 10000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die nun gelösten CbRAS-Proteine von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wird vorsichtig in einen Dialysierschlauch gefüllt und gegen 1750 ml 1x Dialysis Buffer mit 175 µl DTT bei 4 °C dialysiert. Nach 3 Stunden wird der Dialysis Buffer erneuert und über Nacht dialysiert. Es wird eine Probe genommen, um auf

## *Material und Methoden*

RAS-Aktivität zu testen, die Proteinkonzentration zu bestimmen und die Reinheit der inclusion bodies mittels SDS-PAGE zu analysieren.

Um aktive CbRAS mit möglichst hohem Reinheitsgrad zu gewinnen, wird das Verfahren durch Variation der Aufschlussbedingungen und der Anzahl der Waschschriffe optimiert. Zum einen wird die Anzahl der Waschschriffe von zwei auf vier erhöht. Zum anderen werden aus einem Bakterienpellet zwei oder drei Rohextrakte hergestellt: Nach zehnmütigem Aufschluss wird zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das verbleibende Bakterienpellet mit den inclusion bodies wird erneut für zehn Minuten aufgeschlossen. Es schließt sich der Zentrifugationsschritt an. Dieser Vorgang kann ein weiteres Mal wiederholt werden, bevor das Sediment in 1x IB Wash Buffer resuspendiert und wie oben beschrieben fortgefahren wird.

### **10x IB Wash Buffer:**

200 mM Tris/HCl pH 7,5  
100 mM EDTA  
10% Triton-100

### **1x IB Solubilization Buffer:**

500 mM CAPS pH 11,0

### **50x Dialysis Buffer**

1 M Tris/HCl pH 8,5

#### 2.2.14. Abspaltung des His-Tags mit dem Thrombin CleanCleave™-Kit

Können keine Kristallisationsbedingungen für ein heterolog exprimiertes Protein gefunden werden, so kann die Abspaltung der Fusions-Tags eine Möglichkeit bieten, um die Kristallisation zu erreichen. Es ist außerdem von Interesse, welchen Einfluss der His-Tag auf die enzymkinetischen Parameter sowie auf das Temperatur- sowie das pH-Optimum ausübt. Zwischen dem His-Tag und der Aminosäuresequenz der CbRAS befindet sich eine Schnittstelle für die Serinprotease Thrombin.

Es wird das Thrombin CleanCleave™-Kit der Firma Sigma verwendet. Hierbei ist das Thrombin durch eine Agarosematrix immobilisiert und kann nach der Abspaltung problemlos von der CbRAS-Proteinlösung entfernt werden.

## *Material und Methoden*

### Probenvorbereitung:

Für die Abspaltung des 6xHis-Tags wird lösliche CbRAS aus dem Proteinrohextrakt gewonnen und standardmäßig über His-Tag-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elutionsfraktion wird über Dialyse in 1x Cleavage Buffer umgepuffert und anschließend mit Hilfe von Spectra Gel™ aufkonzentriert bis eine Proteinkonzentration von 1,7 mg/ml erreicht ist.

### Vorbereitung der Thrombin-Agarose-Matrix:

100 µl der resuspendierten Thrombin-Agarose-Matrix werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Säulenmaterial wird mit 1x Cleavage Buffer äquilibriert. Dazu wird die Suspension bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 500 µl 1 Cleavage Buffer gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation entfernt. Dieser Waschschrift wird wiederholt.

### Proteolysereaktion:

Zunächst werden die 50 µl äquilibrierte Thrombin-Agarose in 100 µl 10x Cleavage Buffer resuspendiert. Es werden 600 µl der vorbereiteten Enzymlösung sowie 250 µl destilliertes Wasser addiert. In einer zweiten Proteolysereaktion wird auf die Zugabe der 100 µl 10x Cleavage Buffer verzichtet. Zur Thrombin-Agarose werden 600 µl Enzymlösung und 350 µl 1x Cleavage Buffer gegeben. Die Reaktionen schütteln bei Raumtemperatur (21 °C). Nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden werden Proben gezogen, um die Inkubationszeit zu ermitteln, die bei diesen Reaktionsbedingungen benötigt wird. Die Proben werden mittels SDS-PAGE analysiert.

Zur Optimierung der Proteolysereaktion wird ein Versuch durchgeführt, bei dem auf den 10x Cleavage Buffer verzichtet und 10% DMSO addiert wird. Die Reaktionsansätze schütteln bei 25 °C. Die Reaktion wird nach 72 Stunden beendet. Es werden Proben nach 2, 7,5 und 72 Stunden genommen.

### Gewinnung der His-Tag-freien CbRAS:

Sowohl die gespaltene als auch die ungespaltene CbRAS befindet sich im Überstand. Durch Zentrifugation für 5 min bei 500 g wird die Thrombin-Agarosematrix von der Proteinlösung entfernt.

## *Material und Methoden*

### **10x Cleavage Buffer**

500 mM Tris/HCl pH 8,0

100 mM CaCl<sub>2</sub>

Um die gespaltene CbRAS von der ungespaltenen zu reinigen, wird eine His-Tag-Affinitätschromatographie angeschlossen. Nur CbRAS mit His-Tag und der freigesetzte His-Tag binden an das Säulenmaterial. Der Durchlauf, der die gespaltene CbRAS enthält, wird gewonnen und in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,02% Natriumazid umgepuffert.

Zur Feinreinigung der CbRAS kann eine Affinitätschromatographie an TSK AF-Blue angeschlossen werden. Verwendet wird das optimierte Programm, das im Ergebnisteil (Kapitel 3.3.9) beschrieben ist.

### 2.2.15. Untersuchung Stabilität der CbRAS

Proteine verlieren ihre native Struktur und denaturieren, wenn sie beispielsweise extremen Temperaturen oder extremen pH-Werten ausgesetzt werden. Viele andere Faktoren, die für jedes Enzym empirisch überprüft werden müssen, können die Stabilität des Proteins bei der Aufreinigung beeinträchtigen. Dazu zählen auch Adsorption an Oberflächen, Einfrieren und Aussalzen.

Es ist von Interesse, wie stabil die CbRAS unter verschiedenen Lagerungsbedingungen ist. Die Lagerstabilität der CbRAS in verschiedenen Puffern bei verschiedenen Temperaturen wird untersucht. Dazu wird heterolog exprimierte CbRAS über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Elutionsfraktionen entweder in His-Tag-Bindepuffer, His-Tag-Elutionspuffer und 1 Dialysis Buffer ohne CaCl<sub>2</sub> umgepuffert. Nach dem Umpuffern wird die spezifische Aktivität der drei Proben bestimmt. Nun werden die Enzymlösungen aliquotiert und bei 4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert. Am nächsten Tag werden die Proben aufgetaut und ihre spezifische Aktivität erneut bestimmt.

In einem weiteren Versuch wird getestet, ob die Löslichkeit der aufgereinigten CbRAS mit einer Proteinkonzentration von 7,5 mg/ml, die in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 umgepuffert wurde, durch Zusatz von 10% DMSO erhöht wird ohne dass Aktivität verloren geht. Die Proben werden für 24 Stunden bei 4 °C gelagert.

### 2.2.16. Versuche zur Kristallisation der CbRAS

Die Kristallisationsbedingungen eines Proteins findet man, indem man hochkonzentrierte Proteinlösungen mit verschiedenen Pufferlösungen, die oft sehr hohe Konzentrationen an Salzen, Alkoholen oder Polyethylenglykol enthalten, in kleinen Tropfen vermischt und über Tage bis Wochen und Monate bei konstanter Temperatur stehen lässt. Die zunächst ungesättigte Proteinlösung wird durch Dampfdiffusion des Wassers aufkonzentriert und erreicht einen übersättigten, metastabilen Zustand. Nach Kristallkeimbildung beginnen Kristalle zu wachsen.

Für die Kristallstrukturaufklärung benötigt man Einkristalle. Viel häufiger entstehen allerdings amorphe Niederschläge. Sobald auch nur kleine Proteinkristalle wachsen, können die Kristallisationsbedingungen variiert und optimiert werden. Außerdem können kleine Proteinkristalle beim sogenannten „Seeden“ als Impfkristalle benutzt werden, um größere Kristalle zu züchten.

Für die Versuche zur Kristallisation der CbRAS wird das Protein frisch hergestellt und die Enzymlösung nicht eingefroren, sondern höchstens über Nacht bei 4 °C gelagert und kurz vor dem Gebrauch aufkonzentriert. Es wird hochaufgereinigtes CbRAS-Protein verwendet, das aus dem Rohextrakt aufgereinigt wurde (siehe Kapitel 3.3.9). Die Proteinlösungen sind in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,02% Natriumazid umgepuffert worden und haben eine Proteinkonzentration von 7,5 bis 8,3 mg/ml.

Es werden verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet, wobei immer das sitting-drop-Verfahren angewendet wird. Um im Hochdurchsatzverfahren eine breite Auswahl an Kristallisationsbedingungen zu testen, steht der Kristallisationsroboter CartesianMicrosys™ SQ4000 zur Verfügung. Es werden Kristallisationsplatten verwendet, in denen 96 verschiedene Bedingungen getestet werden können. Mit den Screens Wizard™ I & II von Emerald BioSystems, EasyXtal JCSG+ Suite von Qiagen, Crystal Screen Cryo von Hampton Research und Basic Crystallography Kit von Sigma-Aldrich stehen kommerziell erhältliche Kits zur Verfügung, mit denen für erste Versuche eine breite Palette an sehr verschiedenen Bedingungen untersucht werden können. Vielversprechende Bedingungen können anschließend verfeinert werden. Vom Roboter werden zu 300 nl Proteinlösung exakt 300 nl Präzipitat pipettiert.

Insgesamt vier Pufferbedingungen werden vielfältig variiert. Dazu zählen Wizard I Screen No 2, Wizard II Screen No 19, JCSG No 61 und Cryo No 37. Dazu werden von Hand 24-Well-Platten pipettiert und die Parameter pH-Wert, Pufferkonzentrationen, Salzkonzentrationen und Präzipitanzkonzentrationen, sowie die Temperatur (4 °C, 10 °C, 20 °C) variiert. Ebenso



## *Material und Methoden*

wird untersucht, ob die CbRAS ohne His-Tag oder CbRAS die aus inclusion bodies aufgereinigt wurde, unter den verfeinerten Bedingungen auskristallisiert. In einigen Versuchen wird der CbRAS-Proteinlösung in einer Konzentration von 10% DMSO zur Erhöhung der Löslichkeit des Enzyms zugegeben. Je mehr Protein in Lösung bleibt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass größere Kristalle entstehen.

### **2.3. Versuche zur Expression der CbRAS als GST-Fusionsprotein**

#### **2.3.1. pET-41a-Vektor**

Der Vektor pET-41a mit 5933 Basenpaaren unterscheidet sich neben der Kanamycinresistenz dadurch vom pET-15b-Vektor (siehe Kapitel 2.1.17), dass das Targetprotein als Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Tag (GST: Glutathion-S-Transferase) sowie N- und C-terminalem His-Tag exprimiert werden kann. Der GST-Tag wird häufig benutzt, um die Löslichkeit von Targetproteinen zu erhöhen. Aufgrund der hohen Affinität der Glutathion-S-Transferase zu reduziertem Glutathion, kann das Fusionsprotein über eine Glutathion-haltige Matrix affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Der GST-Tag kann vom Fusionsprotein mit Thrombin oder der Enterokinase H abgespalten werden. Ein Vorteil des pET-41a-Vektors ist die große Anzahl an Restriktionsschnittstellen in der multiple cloning site.

#### **2.3.2. Umklonierung der CbRAS in den Expressionsvektor pET-41a**

Die CbRAS-cDNA war von Berger et al. (2006) über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I in den Vektor pET-15b ligiert und anschließend in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS eingebracht worden. Mit Hilfe dieses Expressionssystems wird die CbRAS als 6xHis-Fusionssystem exprimiert.

Da das Enzym in dieser Arbeit zwecks Löslichkeitsverbesserung als Fusionsprotein mit einem GST-Tag exprimiert werden soll, wird die CbRAS in den pET-41a Vektor umkloniert.

##### **1. Amplifikation der CbRAS-Volllängensequenz**

Die CbRAS-cDNA kann über eine *Nco*I-Schnittstelle vorne und die *Bam*HI-Schnittstelle hinten in den pET-41a-Vektor eingebracht werden, so dass bei der Expression an die CbRAS-Aminosäuresequenz N-terminal ein GST-Tag gefolgt von einem His-Tag angehängt wird. Dazu wird das vorhandene Konstrukt aus CbRAS-cDNA in pET-15b als Template für eine PCR mit Volllängenprimern verwendet, so dass die erforderlichen Schnittstellen an die Volllängensequenz angehängt werden.

## Material und Methoden

Der verwendete Forward-Primer mit *Nco*I-Schnittstelle ist ras-*nco*I mit 33 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 65,8 °C:

5'-TAC CAT GGC AAT GAA GAT AGA AGT CAA AGA CTC-3'

Der verwendete Reverse-Primer mit *Bam*HI-Schnittstelle ist RAS-VL3rc mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 64,8 °C:

5'-TAG GAT CCT CAT CAA ATC TCA TAA AAC AAC TTC TC-3'

In einer Standard-PCR mit GoTaq<sup>®</sup>-Polymerase (siehe Kapitel 2.1.3) wird bei einer Annealingtemperatur von 55 °C amplifiziert. Nach Ligation des PCR-Produkts in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (siehe Kapitel 2.1.6) und Vermehren in *E coli* DH5α (siehe Kapitel 2.1.7) wird das Insert über die *Nco*I-Schnittstelle und die *Bam*HI-Schnittstelle in den pET-41a Vektor ligiert (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.1.16). Zur Untersuchung der CbRAS-Sequenz auf Mutationen, die durch die GoTag-Polymerase verursacht werden können, sowie des Leserasters, wird eine Sequenzanalyse durchgeführt. Als Expressionsstamm wird BL21(DE3)pLysS verwendet (siehe Kapitel 2.1.18).

### 2. Expression und Aufreinigung der CbRAS als GST-Fusionsprotein

Die Expressionsbedingungen für die CbRAS als Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag und GST-Tag sind in Kapitel 2.2.2 Punkt 9 beschrieben. Da die Aufreinigung der heterolog exprimierten CbRAS bereits optimiert worden war (siehe Kapitel 3.3.9 Punkt 3), werden die sechs vereinigten Rohextrakte zunächst über eine His-Tag-Affinitätschromatographie vorgereinigt. Die drei Elutionsfraktionen werden per Dialyse (siehe Kapitel 2.2.5) in PBS-Puffer überführt, gegen Spectra Gel™ aufkonzentriert und können direkt für die Aufreinigung über Glutathion Sepharose 4 Fast Flow verwendet werden.

### 3. Aufreinigung über Glutathion Sepharose 4 Fast Flow

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins aus CbRAS und der Glutathion-S-Transferase wird das Material Glutathion Sepharose 4 Fast Flow der Firma GE HealthCare verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Glutathion-haltige Agarosematrix. Bei dieser Affinitätschromatographie wird die Affinität des GST-Tags zum immobilisierten Glutathion ausgenutzt. Um das

## *Material und Methoden*

aufgereinigtes CbRAS-Fusionsprotein nach mehrmaligem Waschen vom Säulenmaterial zu eluieren, wird ein Elutionspuffer verwendet, dem reduziertes Glutathion zugesetzt ist. Der Hersteller sieht folgende Schritte vor:

Vorbereitung des Säulenmaterials:

1 ml Glutathion Sepharose 4 Fast Flow werden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Um das Säulenmaterial mit PBS-Puffer zu konditionieren, wird 5 min bei 500 g zentrifugiert, so dass der Lagerungspuffer abgehoben werden kann. Die Agarosematrix wird durch Umschütteln in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Der Überstand kann nach Sedimentation des Säulenmaterials vorsichtig entfernt werden. Dieser Waschvorgang nochmals wiederholt. Die gewaschene Matrix wird nun mit 1 ml PBS-Puffer versetzt und kann für die Aufreinigung verwendet werden.

Zur Aufreinigung der CbRAS wurden 400 µl der in PBS-Puffer umgepufferten Elutionsfraktion zum Säulenmaterial addiert. Während 30-minütiger Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur bindet der GST-Tag des CbRAS-Fusionsproteins an das immobilisierte Glutathion. Um nicht gebundene Verunreinigungen zu entfernen, wird 5 min bei 500 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment mit der gebundenen CbRAS wird zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Das gereinigte Fusionsprotein wird eluiert, indem die sedimentierte Agarosematrix dreimal mit 0,5 ml GST-Elutionspuffer behandelt wird. Die Elutionsfraktionen werden durch Sedimentation vom Säulenmaterial befreit und mittels RAS-Enzymtest und SDS-PAGE auf Anwesenheit von CbRAS untersucht.

### **PBS-Puffer:**

140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,3

### **GST-Elutionspuffer:**

10 mM Reduziertes Glutathion  
50 mM Tris/HCl pH 8,0

## **2.4. Versuche zur biochemischen Charakterisierung der Hydroxycinnamoyltransferasen CbRAS und CbHST aus *Coleus blumei***

Für die Versuche zur biochemischen Charakterisierung werden die über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten, in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,02% NaN<sub>3</sub> umgepufferten 6xHis-CbHCTs verwendet. In sämtlichen Enzymtests wird mit einer einzigen Enzymcharge gearbeitet. Die CbRAS-Stammlösung hat eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/ml. Die Proteinkonzentration der CbHST-Stammlösung beträgt 0,34 mg/ml. Die Enzymstammlösungen werden bei 4 °C gelagert. Von den Akzeptorsubstraten und CoA-aktivierten Säuren werden ebenfalls Stammlösungen angelegt und bei -20 °C aufbewahrt. Enzyme, Akzeptoren und CoA-aktivierte Säuren werden je nach Bedarf in verdünnter Form eingesetzt.

In einigen Versuchen wird CbRAS eingesetzt, deren Fusions-Tag nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Matrix proteolytisch abgespalten wurde: nach wiederholter His-Tag-Affinitätschromatographie wird die nicht gebundene Proteinfraction gesammelt und nach Umpuffern in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,02% NaN<sub>3</sub> bis auf eine Proteinkonzentration von 0,01 mg/ml aufkonzentriert. Diese „CbRAS ohne His-Tag“-Stammlösung wird ebenfalls bei 4 °C gelagert.

### 2.4.1. In den Enzymtests verwendete Substrate

Die in den Versuchen zur biochemischen Charakterisierung der CbHST und CbRAS verwendeten Akzeptorsubstrate sind mit Ausnahme von D-3,4-Dihydroxyphenyllactat (D-DHPL), das nach Hydrolyse aus Rosmarinsäure gewonnen wird (siehe Kapitel 2.4.3), kommerziell erhältlich. DL-*p*-Hydroxyphenyllactat (DL-pHPL), D-Phenylalanin, 2-Phenylethylamin×HCl, Phenollösung, 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol und 3-(4-Hydroxyphenyl)propanol wird von Sigma bezogen. Der Lieferant von Shikimisäure und D-Chinasäure ist Roth. Dopamin×HCl, L-Phenylalanin (Merck), Tyramin, 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3-Aminobenzoesäure (Acros), Serotonin, L-DOPA, DL-DOPA, DL-3-Phenyllactat (Alfa Aesar), Tryptamin×HCl (Chempur), L-Tyrosin (Serva Feinbiochemica GmbH), DL-Tyrosin (Schuchardt) und Anthranilsäure (TransMIT Projektbereich Flavonoidforschung, Stefan Martens) werden ebenfalls bestellt. Die CoA-Thioester *p*-Cumaroyl-CoA (pC-CoA), Caffeoyl-CoA (Caf-CoA), Cinnamoyl-CoA (Cin-CoA), Feruloyl-

## Material und Methoden

CoA (Fer-CoA) und Sinapoyl-CoA (Sin-CoA) sind kommerziell nicht erhältlich und werden nach einer Vorschrift von Stöckigt und Zenk (1975) aus den entsprechenden Succinimidestern synthetisiert (siehe Kapitel 2.4.2). Acetyl-CoA wird von AppliChem erworben, die TransMIT liefert Benzoyl-CoA, Malonyl-CoA und Anthraniloyl-CoA.

Während sämtliche CoA-aktivierten Säuren sowie D-DHPL, Shikimisäure, D-Chinasäure und die o.g. Hydrochloride in Wasser gelöst werden, müssen die Aminosäuren in 0,5 M Salzsäure aufgelöst werden. Um in den Enzymtests einen neutralen pH-Wert zu gewährleisten, wird in den Enzymtests mit Aminosäuren die Molarität des KPi-Puffers auf 1 M erhöht. DL-pHPL, Tyramin, Serotonin, DL-Phenyllactat, 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol und 3-(4-Hydroxyphenyl)propanol sind in einem Ethanol-Wasser-Gemisch mit 20% Ethanol löslich. Bei 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoessäure wird das Ethanol-Wasser-Gemisch mit 50% DMSO versetzt, bevor die Substrate darin gelöst werden. Mit 0,8% Ethanol sowie 2% DMSO im Enzymtest wird die Enzymaktivität kaum beeinflusst. Die Phenollösung wird mit 0,1 M KPi-Puffer auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt.

### 2.4.2. Synthese der CoA-aktivierten Säuren pC-CoA, Caf-CoA, Cin-CoA, Fer-CoA und Sin-CoA

Die Synthese der CoA-aktivierten Säuren beginnt mit der Herstellung der entsprechenden Succinimidester. Diese sind bereits in der Laborsammlung vorhanden, so dass direkt mit der Bildung der Thioester begonnen werden kann.

Dazu wurden zunächst 25,2 mg  $\text{NaHCO}_3$  in ein hohes Reagenzglas gefüllt, in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und 15 min mit Stickstoff begast. In diesem basischen Milieu werden 24,6 mg Coenzym A Trilithiumsalz-Dihydrat gelöst und weitere 15 min mit Stickstoff begast. Nun werden insgesamt 56 mg des entsprechenden Succinimid-Esters, gelöst in 0,5 ml Aceton p.a., langsam zur CoA-Lösung getropft. Der sich bildende Niederschlag wird durch Addition weiterer 6 ml Aceton p.a. aufgelöst. Das Reaktionsgefäß mit der nun klaren gelben Lösung wird mit Nescofilm verschlossen, mit Alufolie abgedunkelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wird das Aceton durch einen über die Lösung geleiteten Stickstoffstrom vollständig entfernt. Danach wird 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand, der das gewünschte Reaktionsprodukt enthält, wird über Nacht chromatographisch aufgereinigt. Verwendet werden dazu Celluloseplatten mit Fluoreszenzindikator (F254) und als Fließmittel eine Mischung aus

## *Material und Methoden*

n-Butanol/Essigsäure/Wasser im Verhältnis 4:2:3. Unter UV-Licht bei 254 nm können die CoA-Thioester durch Fluoreszenzlöschung als dunkle Banden identifiziert und markiert werden. Die Retentionsfaktoren sind 0,42 für pC-CoA und 0,3 für Caf-CoA. Die Trägerschicht wird im Bereich der Banden ausgekratzt. Zur Elution der CoA-Thioester wird so lange mit Wasser ausgeschüttelt und nach Herunterzentrifugieren die Überstände photometrisch (200 nm bis 500 nm) vermessen bis keine CoA-Ester mehr detektierbar sind. Die Überstände mit den gewünschten Reaktionsprodukten werden vereinigt und ihre Identität, Reinheit und Gehalt nach Einengen in der Speed Vac photometrisch bestimmt. Zur Konzentrationsberechnung werden die entsprechenden molaren Extinktionkoeffizienten  $\epsilon$  herangezogen. Der molare Extinktionskoeffizient für pC-CoA bei 334 nm beträgt  $21 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , für Caf-CoA ist  $\epsilon$  (346 nm)  $18 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , für Cin-CoA ist  $\epsilon$  (311 nm)  $21 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , für Fer-CoA ist  $\epsilon$  (340 nm)  $19 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  und für Sin-CoA ist  $\epsilon$  (351 nm)  $24 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

### 2.4.3. Gewinnung von DHPL aus Rosmarinsäure

Da DHPL schlecht kommerziell erhältlich ist, muss es nach einer Vorschrift von Petersen und Alfermann (1988) durch enzymatische Spaltung und anschließende Aufreinigung aus Rosmarinsäure hergestellt werden.

Zur Herstellung einer großen Charge D-DHPL werden 60 mg Rosmarinsäure mit 600 mg Rhozyme HP-150 in 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 6,0 mit 1 mM Natriumascorbat gelöst und nach Begasen mit Stickstoff gut verschlossen für 5 Stunden bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert. Rhozyme HP-150 ist ein Enzympräparat mit hydrolytischer Aktivität. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 3 ml 6 N HCl und Mischen abgestoppt mit 9 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nun folgt die Extraktion des D-DHPL mit 10 ml Ethylacetat. Das Ausschütteln wird dreimal wiederholt. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden zur Trockene eingedampft und in 1,3 ml Ethanol rückgelöst. Die Ethanolphasen werden gleichmäßig auf 2 Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (F254) aufgetragen und für 7 Stunden in einem n-Butanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch (63/10/27) chromatographiert. Der  $R_f$ -Wert von DHPL bei diesem Trennsystem beträgt 0,6. Die D-DHPL-Bande wird nach dem Trocknen der DC-Platten unter UV-Licht markiert und mit einem Spatel sorgfältig ausgekratzt. Um das D-DHPL vollständig vom Kieselgel zu eluieren, wird nacheinander dreimal mit 10 ml Wasser eluiert. Die Wasserphasen werden in der SpeedVac eingengt und vereinigt. Zur Bestimmung der DHPL-Konzentration wird ein Spektrum von 200-400 nm aufgenommen, wobei das Absorptionsmaximum bei 286-290 nm

## Material und Methoden

zu beobachten ist. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von D-DHPL bei 280 nm ist 2600, so dass die D-DHPL-Konzentration mit der Formel  $c(\text{mol/l}) = \epsilon/2600$  berechnet werden kann. Die D-DHPL-Stammlösung wird auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt.

### 2.4.4. Standardenzymtest zur Bestimmung der RAS-, HST- und HQT-Aktivität

Zur Überprüfung der Enzymaktivität steht ein Standardenzymtest zur Verfügung.

Alle heterolog exprimierte Enzyme aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* sowie Mutanten und Chimäre werden auf Enzymaktivität mit verschiedenen Substraten getestet. Folgendes Standardpipettierschema mit einem Gesamtvolumen von 125  $\mu\text{l}$  wird verwendet:

90,5  $\mu\text{l}$  0,1 M KPi-Puffer

5  $\mu\text{l}$  12,5 mM Ascorbat

12,5  $\mu\text{l}$  0,01 M DTT

5  $\mu\text{l}$  100 mM Akzeptorsubstrat

2  $\mu\text{l}$  1-3 mM CoA-aktivierte Säure

10  $\mu\text{l}$  Enzympräparation

Ausnahmen von diesem Standardpipettierschema: Von den Akzeptorsubstraten 10 mM D-DHPL und 20 mM D-Chinat wurden 10  $\mu\text{l}$  (D-DHPL) bzw. 25  $\mu\text{l}$  (D-Chinat) eingesetzt. Die KPi-Puffermenge wurde so variiert, dass das Gesamtvolumen 125  $\mu\text{l}$  beträgt.

KPi-Puffer:

0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,0

Die Reaktion wird durch Zugabe des Enzyms gestartet. Der Ansatz inkubiert für exakt 10 Minuten bei 30 °C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  6 N HCl, schütteln und Kühlen auf Eis. Dieses Standardpipettierschema wird in den Versuchen zur biochemischen Charakterisierung (siehe Kapitel 2.4) der CbRAS und der CbHST in abgewandelter Form verwendet.

Um auf RAS-Aktivität zu testen, werden folgende Substratkombinationen getestet:



## *Material und Methoden*

<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
1,5 mM Caf-CoA	DL-pHPL	Caf-pHPL
2,6 mM pC-CoA	DL-pHPL	pC-pHPL
1,5 mM Caf-CoA	D-DHPL	RA
2,6 mM pC-CoA	D-DHPL	pC-DHPL

Um auf HST-Aktivität zu testen, werden diese Substratkombinationen getestet:

<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
1,5 mM Caf-CoA	Shikimat	Caf-Shik
2,6 mM pC-CoA	Shikimat	pC-Shik

Um auf HQT-Aktivität zu testen, werden diese Substratkombinationen getestet:

<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
1,5 mM Caf-CoA	Chinasäure	CA
2,6 mM pC-CoA	Chinasäure	pC-Chin

Es folgt die Extraktion der Reaktionsprodukte mit Ethylacetat. Dazu wird der Enzymtest mit 500 µl Ethylacetat gut gemischt, 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und die Ethylacetatphase (oben) in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Die Ethylacetatphasen werden vereinigt und zur Trockene eingedampft.

Die Rückstände werden in 100 µl Fließmittel rückgelöst, 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und der HPLC-Analyse unterzogen. Die Reaktionsprodukte aus den RAS-, HST- und HQT-Enzymtests stehen als eingestellte HPLC-Standardsubstanzen zur Verfügung.

## Material und Methoden

### 2.4.5. HPLC-Analyse

Die Reaktionsprodukte werden per HPLC identifiziert und quantifiziert. Zur isokratischen RP-HPLC steht eine Shandon Hypersil ODS Säule (270x4.0 mm) und eine äquivalente Equisil ODS Säule zur Verfügung. Bei einer Flussrate von 1,0 ml/min wird mit einem Methanol-Wasser-Gemisch, das mit 0,01% Phosphorsäure angesäuert ist, chromatographiert. In Abhängigkeit von der Substratkombination im Enzymtest werden Methanolkonzentrationen zwischen 15 und 60% verwendet (siehe Tabelle 18). Die Reaktionsprodukte werden spektrophotometrisch detektiert bei Wellenlängen zwischen 220 und 343 nm. Mit Caf-pHPL, pC-pHPL, RA, pC-DHPL, pC-Shik, Caf-Shik, CA und pC-Chin stehen authentische Standardsubstanzen zur Verfügung.

Berechnung der spezifischen Aktivität:

Die Enzymaktivität gibt die Umsatzrate eines Enzyms an. Die SI-Einheit der Enzymaktivität ist 1 Katal (kat) und entspricht 1 mol Substratumsatz pro Sekunde. Eine weitere wichtige Messgröße bei Enzymen ist die spezifische Aktivität. Sie entspricht der Aktivität pro Gesamtproteinmasse.

Die spezifische Aktivität wird in dieser Arbeit mit der unten aufgeführten Formel berechnet.

$$\text{sp. Akt. } [\mu\text{kat/kg}] = \frac{\text{Ar P} \times \text{R} [\mu\text{l}] \times 1000 \times \text{S} [\mu\text{M}]}{\text{Ar S} [\mu\text{l}] \times \text{t} [\text{s}] \times \text{E} [\mu\text{l}] \times \text{B} [\text{mg/ml}]}$$

**sp. Akt.** Spezifische Aktivität

**Ar P** Integrierte Fläche des Produktpeaks bei der HPLC-Analyse

**R** Rücklösungsvolumen der HPLC-Probe

**S** Konzentration des HPLC-Standards

**Ar S** Integrierte Fläche des HPLC-Standards

**t** Zeit

**E** Volumen der Enzymlösung im Enzymtest

**B** Proteinkonzentration der im Enzymtest verwendeten Enzymlösung

## *Material und Methoden*

### 2.4.6. Enzymtests zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

pH- und Temperaturoptimum der CbHST:

Die Enzymtests zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der CbHST werden mit pC-CoA und Shikimisäure durchgeführt. Der Standardtest wird bei 2 min inkubiert. Die CbHST-Stammlösung wird 1:200 verdünnt eingesetzt, so dass in jeden Ansatz 10 µl Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 1,7 µg/ml pipettiert werden (Enzymkonzentration im Test 0,136 µg/ml).

Um das Temperaturoptimum zu ermitteln werden die einzelnen Enzymtests bei folgenden Temperaturen durchgeführt: 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C und 65 °C. Zum Temperieren der Ansätze werden die Proben vor Enzymzugabe 1 min vorgewärmt.

Zur Bestimmung des pH-Optimums werden Enzymtests bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Um die Pufferkapazität des KPi-Puffers zu erhöhen, wird seine Konzentration von 0,1 M im Standardtest auf 0,5 M erhöht. Folgende pH-Werte werden bei den verwendeten Puffern eingestellt: 2,5; 4,4; 5,5; 6,1; 6,6; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,6; 10,5; 12,0.

Da die resultierenden pH-Werte im Test variieren können, wird der pH-Wert direkt im Enzymtest gemessen. Der pH-Wert im Test wird für die graphische Auswertung herangezogen.

pH- und Temperaturoptimum der CbRAS:

Das pH- und Temperaturoptimum der CbRAS wird im Standardenzymtest mit Caf-CoA und pHPL bestimmt. Die Enzymstammlösung wird 1:80 verdünnt. Demnach werden zu jedem Ansatz 10 µl CbRAS mit einer Proteinkonzentration von 10,5 µg/ml addiert (Enzymkonzentration im Test 0,84 µg/ml).

Um das Temperaturoptimum zu bestimmen, werden die Einzeltests bei unterschiedlichen Temperaturen 1 min lang inkubiert: 0 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C.

Zur Bestimmung des pH-Optimums werden die Einzeltests mit 0,5 M Phosphatpuffer auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Die Inkubationszeit beträgt 5 min. Die verwendeten Puffer haben folgende pH-Werte: 4,9; 6,0; 6,6; 7,1; 7,5; 8,0; 8,8; 9,3 und 12,0. Die im Enzymtest gemessenen pH-Werte werden für die Auswertung herangezogen.

## *Material und Methoden*

Das pH- und Temperaturoptimum der CbRAS ohne His-Tag wird unter denselben Versuchsbedingungen ermittelt. Die verwendete Lösung der CbRAS ohne His-Tag besitzt eine Konzentration von 5 µg/ml (Enzymkonzentration im Test 0,4 µg/ml). Die Reaktionszeit zur Bestimmung des Temperaturoptimums beträgt 1 min und zur Bestimmung des pH-Optimums 1,5 min.

### 2.4.7. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität der CbHST und der CbRAS

In den Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität sollen auch solche Substrate gefunden werden, die nicht sehr effektiv umgesetzt werden. Daher werden im Vergleich zu den Versuchen zur Bestimmung der pH- und Temperaturoptima sehr hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt sowie die Inkubationszeit drastisch verlängert.

Bestimmung der Substratspezifität der CbHST:

Sämtliche Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität werden mit der hundertfachen Menge an üblicherweise benötigtem Enzym durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.6). In jeden Ansatz werden 10 µl CbHST-Proteinlösung der Konzentration 170 µg/ml pipettiert. Die Reaktionszeit wird auf mindestens 30 min verlängert. Zunächst werden die Enzymtests auf RAS-, HST- und HQT-Aktivität unter den veränderten Versuchsbedingungen durchgeführt. Angebotene Substrate sind die CoA-aktivierten Säuren pC-CoA und Caf-CoA in Kombination mit den Akzeptorsubstraten pHPL, DHPL, Shik und Chin. Es wird immer eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der die Reaktion nicht durch Zugabe von Enzym gestartet, sondern statt dessen 10 µl Puffer zugesetzt wird. Auf diese Weise wird verhindert, dass bei der HPLC-Analyse falsch positive Produktpeaks identifiziert werden.

Zusätzlich zu diesen Substraten für Enzymtests auf RAS-, HST- und HQT-Aktivität werden weitere Substrate angeboten. Für die entstehenden Reaktionsprodukte stehen keine Referenzsubstanzen für die HPLC-Analyse zur Verfügung. Diese Tatsache erfordert ein gesondertes Vorgehen, um richtig positive und richtig negative Ergebnisse bei der HPLC-Analyse zu erhalten. Neben dem Standardenzymtest mit den entsprechenden Substraten (s.u.) und der Negativkontrolle ohne Enzym werden zwei weitere „Weglass-Tests“ durchgeführt. In dem einen fehlt das Akzeptorsubstrat, dem anderen „Weglass-Test“

## *Material und Methoden*

fehlt die CoA-aktivierte Säure. Das fehlende Volumen wird jeweils mit dem Lösungsmittel ersetzt, in dem die fehlende Substanz gelöst ist.

Bei der HPLC-Analytik werden solche Peaks als potenziell positiv bewertet, die nur im Standardenzymtest auftreten, nicht aber in einem der „Weglass-Tests“. Um das potenziell positive Ergebnis zu verifizieren oder zu widerlegen, wird eine Zeitreihe gemessen. Wird der beobachtete Peak mit der Zeit größer und ist eine Sättigungskinetik erkennbar, wird der beobachtete Peak als wahrscheinlich positiv betrachtet. Wird der Peak mit der Zeit nicht größer, gilt er als falsch positiv. Er wird nicht als Produktpeak, sondern als Artefakt betrachtet.

Die wahrscheinlich positiven Peaks werden näher untersucht. Es besteht die Möglichkeit, die Masse (LC-MS) zu bestimmen, ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufzunehmen, oder die Produktpeaks in ihre Ausgangssubstanzen zu hydrolysieren und den Akzeptor und die (jetzt nicht mehr CoA-aktivierte) Säure per HPLC zu analysieren. Gelingt dies, ist der Peak als positiv zu bewerten: Die CbHST setzt diese Substratkombination um.

Diese CoA-aktivierten Säuren werden der CbHST als Substrat angeboten. Das Akzeptorsubstrat ist immer Shikimat.

<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
Cinnamoyl-CoA	Shikimat	Cin-Shik
Feruloyl-CoA	Shikimat	Fer-Shik
Sinapoyl-CoA	Shikimat	Sin-Shik
Benzoyl-CoA	Shikimat	Benz-Shik
Anthraniloyl-CoA	Shikimat	Anth-Shik
Malonyl-CoA	Shikimat	Mal-Shik
Acetyl-CoA	Shikimat	Acet-Shik

## Material und Methoden

Außerdem wird getestet, ob pC-CoA auf folgende Akzeptormoleküle übertragen wird.

<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
Anthranilsäure	pC-CoA	pC-Anth
3-Hydroxyanthranilsäure	pC-CoA	pC-3OH-Anth
2-Hydroxybenzoesäure	pC-CoA	pC-OHB
2,3-Dihydroxybenzoesäure	pC-CoA	pC-2,3DiOHB
3-Aminobenzoesäure	pC-CoA	pC-AB
Phenol	pC-CoA	pC-Ph
Tyramin	pC-CoA	pC-Tyra
Tryptamin	pC-CoA	pC-Trypt
Serotonin	pC-CoA	pC-Sero
Dopamin	pC-CoA	pC-Dop
L-DOPA	pC-CoA	pC-DOPA
2-Phenylethylamin	pC-CoA	pC-Pheneth

Sind Positivergebnisse vorhanden, schließen sich weitere Enzymtests an. Es wird untersucht, ob alle CoA-aktivierten Hydroxymethylsäuren (pC-CoA, Caf-CoA, Cin-CoA, Fer-CoA und Sin-CoA) auf Shikimat, 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoesäure übertragen werden.

Ist das Akzeptorsubstrat 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxybenzoesäure oder 2,3-Dihydroxybenzoesäure, beträgt die Inkubationszeit 120 min. Die RAS- und HQT-Enzymtests werden 180 min lang inkubiert. Die Ansätze mit 3-Aminobenzoesäure reagieren über Nacht (16 h).

Bestimmung der Substratspezifität der CbRAS:

In den Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität der CbRAS wird die CbRAS-Stammlösung in 1:2 verdünnter Form eingesetzt. Demnach werden in jeden Enzymtest 10 µl Enzym mit einer Proteinkonzentration von 420 µg/ml zugegeben. Die Inkubationszeit wird auf mindestens 30 min verlängert.

Zunächst werden wie bei der Bestimmung der Substratspezifität der CbHST die Enzymtests auf RAS-, HST- und HQT-Aktivität unter den oben angegebenen Bedingungen wiederholt.

## *Material und Methoden*

Es wird untersucht, ob pC-CoA und Caf-CoA auf die Akzeptoren pHPL, DHPL, Shik und Chin übertragen werden. Negativkontrollen werden ebenso durchgeführt.

Anschließend werden auch der CbRAS weitere Substrate angeboten, deren Reaktionsprodukte nicht als Standardsubstanzen zur Verfügung stehen. Daher muss auch bei diesen Versuchen gesondert vorgegangen werden.

Diese CoA-aktivierten Säuren werden der CbRAS als Substrat angeboten. Das Akzeptorsubstrat ist immer pHPL.

<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
Cinnamoyl-CoA	pHPL	Cin-pHPL
Feruloyl-CoA	pHPL	Fer-pHPL
Sinapoyl-CoA	pHPL	Sin-pHPL
Benzoyl-CoA	pHPL	Benz-pHPL
Anthraniloyl-CoA	pHPL	Anth-pHPL
Malonyl-CoA	pHPL	Mal-pHPL
Acetyl-CoA	pHPL	Acet-pHPL

## Material und Methoden

Außerdem wird getestet, ob pC-CoA auf folgende Akzeptormoleküle übertragen wird:

<b>Akzeptorsubstrat</b>	<b>CoA-aktivierte Säure</b>	<b>erwartetes Produkt</b>
Anthranilsäure	pC-CoA	pC-Anth
3-Hydroxyanthranilsäure	pC-CoA	pC-3OH-Anth
DL-Phenyllactat	pC-CoA	pC-PL
DL-Phenylalanin	pC-CoA	pC-PA
DL-Tyrosin	pC-CoA	pC-Tyr
DL-DOPA	pC-CoA	pC-DOPA
Tyramin	pC-CoA	pC-Tyra
Tryptamin	pC-CoA	pC-Trypt
Serotonin	pC-CoA	pC-Sero
Dopamin	pC-CoA	pC-Dop
L-DOPA	pC-CoA	pC-DOPA
2-Phenylethylamin	pC-CoA	pC-Pheneth
2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	pC-CoA	pC-HPE
3-(4-Hydroxyphenyl)propanol	pC-CoA	pC-HPP

In weiteren Tests wird die Übertragung von Caf-CoA, Cin-CoA und Fer-CoA auf pHPL, DHPL, Phenyllactat, Phenylalanin, Tyrosin und DOPA analysiert. L-PL, L-DOPA, L-Tyr und L-PA werden in Kombination mit pC-CoA getestet.

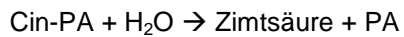
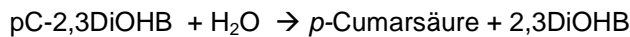
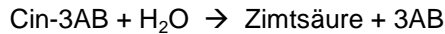
Bei einigen Enzymtests wird die Inkubationszeit noch weiter verlängert. Cin-CoA und Fer-CoA reagierten mit DL-DOPA für 120 min. Enzymtests mit Tyrosin inkubieren 360 min lang. Ist das Akzeptorsubstrat Phenylalanin, so wird über Nacht inkubiert. Ebenfalls über Nacht inkubieren die Substratkombinationen aus Sin-CoA mit pHPL, Cin-CoA / Fer-CoA mit Phenyllactat, sowie Caf-CoA mit L-DOPA.



## Material und Methoden

### 2.4.8. Hydrolyse der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte der CbHST und der CbRAS sind Ester und Amide. Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den beobachteten Produktpeaks tatsächlich um Cin-3AB, pC-2,3DiOHB, Caf-Tyr und Cin-PA handelt, werden diese enzymatisch hydrolysiert.



Zimtsäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, 3-Aminobenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, Tyrosin und Phenylalanin stehen als 25 µM HPLC-Standardsubstanzen zur Verfügung. Somit können die Hydrolyseprodukte mittels HPLC identifiziert werden.

Durchführung der Hydrolyse:

Es wird ein Enzymtest mit den entsprechenden Substraten durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wird mit Ethylacetat extrahiert und zur Trockne eingedampft. In der Ethylacetatphase befinden sich die Ester und die Amide, nicht aber die Edukte: CoA-aktivierte Säure. Anschließend wird der Ester bzw. das Amid in 100 µl frisch zubereitetem Hydrolysepuffer gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 2 mg Rhozyme HP-150 gestartet. Es wird mit Stickstoff begast und bei 30 °C unter Lichtausschluss für 20 Stunden inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl 6 N HCl gestoppt, 30 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben und die Hydrolyseprodukte mit 500 µl Ethylacetat extrahiert. Es folgt die HPLC-Analyse der Hydrolyseprodukte nach Eindampfen der Ethylacetatphase und Rücklösen in Fließmittel.

#### **Hydrolysepuffer:**

0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 6,0

1 mM Ascorbat

## Material und Methoden

### 2.4.9. Enzymtests zur Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max}/K_m$

Durch enzymkinetische Tests werden die Affinitäten der Enzyme zu ihren Substraten bestimmt. Es werden die Katalysegeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Folgt die Enzymreaktion der Michaelis-Menten-Kinetik, so können aus dem entstehenden Substratkonzentrations-Reaktionsgeschwindigkeits-Diagramm wichtige kinetische Parameter ermittelt werden. Diese Parameter sind charakteristisch für das Enzym und erlauben letztendlich eine Aussage darüber, welche Substratkombination am effektivsten umgesetzt wird.

Der  $K_m$ -Wert ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat. Ist der  $K_m$ -Wert klein, gilt das Substrat als gutes Substrat. Je größer der  $K_m$ -Wert, desto niedriger ist die Affinität des Substrats zum Enzym. Kennt man gute und schlechte Substrate, kann spekuliert werden, dass die guten Substrate zu den natürlichen Substraten zählen, während sehr schlechte Substrate in vivo nicht umgesetzt werden.

Im Gegensatz zur Kinetik chemischer Reaktionen gibt es in der Enzymkinetik das Phänomen der Sättigung: bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit nicht weiter gesteigert werden, d.h. die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  ist erreicht.

Werden in der Enzymreaktion zwei Substrate umgesetzt, so muss eine Ein-Substrat-Reaktion hergestellt werden. Während die Konzentration des einen Substrats variiert wird, muss das zweite Substrat konstant in Sättigungskonzentration gehalten werden. Nur so gilt die Michaelis-Menten-Theorie.

$K_m$  und  $V_{max}$  lassen sich aus der Sättigungskurve bestimmen. Da die Sättigung asymptotisch angenähert wird, sollten als Sättigungskonzentrationen Substratkonzentrationen, die mehr als dem zehnfachen  $K_m$ -Wert entsprechen, gemessen werden. Wird allerdings das Phänomen der Substratinhibition beobachtet, d.h.  $V_{max}$  fällt ab einer bestimmten Substratkonzentration ab, ist dieses Vorgehen zu unterlassen. Die graphische Bestimmung der kinetischen Parameter wird mit den Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk und Hanes durchgeführt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der CbRAS und der CbHST wird folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst werden Enzymtests zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit (Zeitreihen) mit den verschiedenen Substratkombinationen durchgeführt. Beide Substrate (die CoA-aktivierte

## *Material und Methoden*

Säure und das Akzeptorsubstrat) liegen dabei in Sättigungskonzentration vor. Die Tests werden bei 30 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten abgestoppt. Da in den Enzymtests zur Bestimmung der kinetischen Parameter Anfangsgeschwindigkeiten gemessen werden müssen, wird eine Reaktionszeit ausgewählt, bei der die spezifische Aktivität linear abhängig ist von der Inkubationszeit: Die Enzymreaktion befindet sich im linearen Bereich.

Nun werden Enzymtests bei der zuvor ermittelten Inkubationszeit durchgeführt, um die  $K_m$ -Werte der verschiedenen Substrate zu ermitteln. Es wird das Standardpipettierschema benutzt. Abgeändert wird neben der Substratkonzentration des variierten Substrats die Konzentration des konstant gehaltenen Substrats. Außerdem werden wie oben beschrieben die Reaktionszeit und die Enzymkonzentration entsprechend den Anforderungen an die Anfangsgeschwindigkeiten angepasst. In die Auswertung gehen nur die Messreihen ein, bei denen die errechneten  $K_m$ -Werte bei beiden Linearisierungsverfahren zu ähnlichen Ergebnissen führen. Die errechneten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte sind Mittelwerte aus beiden Linearisierungsverfahren.

## **2.5. Versuche zur Mutagenese der CbRAS**

### 2.5.1. Mutagenese der RAS aus *Coleus blumei*

Eine Mutation kann positive, negative oder keine Auswirkung auf die Enzymaktivität eines Proteins ausüben. Zur Identifizierung von funktionell oder strukturell bedeutenden Aminosäuren der CbRAS werden Punktmutationen eingeführt und die daraus resultierenden Veränderungen in der Enzymaktivität untersucht. Es ist von Interesse, ob und welche Aminosäuren direkt an der Katalyse beteiligt oder für den korrekten räumlichen Aufbau des Proteins wichtig sind.

Zur Einführung von gezielten Mutationen wird das QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Diese Methode kommt ohne die Isolation einzelsträngiger DNA aus und ist daher in kurzer Zeit mit jedem beliebigen Plasmid durchführbar. Einzige Voraussetzung ist das Vorliegen methylierter Template DNA aus den *E. coli* Stämmen.

Für die Einführung der Einzelmutationen werden laut Herstellerangaben zwei gegenläufige Primer konstruiert (<http://www.stratagene.com/qcprimerdesing>), die an exakt den gleichen Sequenzabschnitt binden, wobei sich der veränderte Bereich in der Mitte der Primer befindet. Insgesamt fünf Mutanten werden hergestellt. Die dazu verwendeten Primerpaare sind im Folgenden aufgeführt.

**1.:** RAS-H152A-s und RAS-H152A-as mit 32 Nukleotiden und einer errechneten Schmelztemperatur von 79,78 °C:

5'-GGC GTC GCA AAC GAG GCC CAC TTA TCC GAC GG-3'

5'-CCG TCG GAT AAG TGG GCC TCG TTT GCG ACG CC-3'

**2.:** RAS-D156A-s und RAS-D156A-as mit 25 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 78,38 °C:

5'-ACC ACT TAT CCG CCG GCG TCG CCG C-3'

5'-GCG GCG ACG CCG GCG GAT AAG TGG T-3'

**3.:** RAS-D377A-s und RAS-D377A-as mit 29 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 78,81 °C:

5'-GAT TTA CGA GCC GGC TTT CGG GTG GGG GA-3'

5'-TCC CCC ACC CGA AAG CCG GCT CGT AAA TC-3'

## Material und Methoden

4.: RAS-R285A-s und RAS-R285A-as mit 26 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 79,38 °C:

5'-CCC TTC GAC GGC GCC GGC AGG CTG CA-3'

5'-CGA GCC GGA TTT CGG GTT GGG GAA GGC-3'

5.: RAS-W380L-s und RAS-W380L-as mit 27 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 79,38 °C:

5'-CCC TTC GAC GGC GCC GGC AGG CTG CA-3'

5'-GCC TTC CCC AAC CCG AAA TCC GGC TCG-3'

Diese Oligonukleotide werden in einer PCR mit Proof Reading DNA Polymerase eingesetzt, bei der das gesamte Plasmid (CbRAS in pET-15b) amplifiziert wird.

### Pipettierschema:

5 µl	10 x reaction buffer
10 µl	2,5 µg/µl RAS-VL in pET-15b (= 25 µg)
1,3 µl	10 pmol/µl Primer s (= 125 ng)
1,3 µl	10 pmol/µl Primer as (= 125 ng)
1 µl	10 mM dNTP Mix
31,4 µl	Destilliertes Wasser
1 µl	PfuUltra HF DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

### PCR-Programm:

95 °C	30 s	1x
<hr/>		
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	16 x
68 °C	7 min	

Danach wird durch Zugabe von 1 µl *DpnI* (10U/µL) die methylierte template DNA während 1 h bei 37 °C verdaut, so dass nur mutierte DNA übrig bleibt. Diese kann wieder zu einem doppelsträngigen Plasmid hybridisieren und wird direkt nach dem *DpnI* Verdau zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet. Dazu werden 50 µl der mitgelieferten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 µl der mit *DpnI* (10U/µL) behandelten DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Bakteriensuspension für 45 s auf

## *Material und Methoden*

42 °C erwärmt und anschließend 2 min lang auf Eis gestellt. Nun werden 500 µl auf 42 °C vorgewärmtes NZY<sup>+</sup> broth Medium addiert und der Transformationsansatz 1 h bei 400 UpM im Thermomixer bei 37 °C geschüttelt. Der Ansatz wird auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden bis zu acht Kolonien gepickt und in 4 ml NZY<sup>+</sup> broth Medium mit Zusatz von 50 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 µl 1 M MgSO<sub>4</sub>, 80 µl 20% (m/V) Glucose und 20 µl Ampicillin (20 mg/ml) überführt. Aus den Übernachtskulturen wird die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kapitel 2.1.8) und durch Sequenzanalyse die Anwesenheit der gewünschten Mutation überprüft. Plasmid-DNA, die die mutierte CbRAS Sequenz enthält, wird zur Expression in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert.

Zur Expression der mutierten CbRAS-Proteine werden 600 ml LB-Ampicillin-Medium mit 4 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 200 UpM bei 25 °C für 20 h geschüttelt. Als Positivkontrolle wird parallel dazu eine Kultur mit nicht mutierter CbRAS in demselben Vektor und demselben Bakterienstamm mitgeführt. Nach Ernte und Herstellung von Proteinrohextrakten folgt Aufreinigung über His-Tag-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 2.2.3). Zum Vergleich der Enzymaktivitäten werden die Elutionsfraktionen aller CbRAS-Mutanten sowie der nicht mutierten CbRAS auf einen einheitlichen Proteingehalt von 0,3 mg/ml eingestellt. Es wird ein Standardenzymtest (Kapitel 2.4.4) auf RAS-Aktivität mit Caf-CoA und pHPL durchgeführt, wobei im Enzymtest ein Proteingehalt von 6 µg/ml verwendet wird und die Inkubationszeiten 2 und 10 min betragen. Daneben werden Enzymtests pipettiert in denen die Enzymlösungen unverdünnt eingesetzt werden und die Reaktionszeit auf 30 min und 60 min verlängert wird. Durch Vergleich der spezifischen Aktivitäten der CbRAS-Mutanten mit der nicht mutierten CbRAS wird die relative Aktivität der Mutanten berechnet. 3,5 ml aller Elutionsfraktionen werden gegen SpectraGel™ (siehe Kapitel 2.2.5) aufkonzentriert und komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.8).

### 2.5.2. Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären I

Sollen nicht nur einzelne Aminosäuren eines Enzyms mutiert, sondern ganze Teile von Proteinen ausgetauscht werden, besteht in der Molekularbiologie die Möglichkeit, chimäre Gene und nachfolgend Enzyme herzustellen und auf Enzymaktivität zu untersuchen. Je nach Substratspezifität der einzelnen Chimäre können Rückschlüsse auf die an der Substratbindung bzw. Katalyse beteiligten Aminosäuren gezogen werden.

## Material und Methoden

Ausgangspunkt für die Konstruktion von Chimären aus CbRAS und CbHST sind die isolierten Expressionsplasmide pET-15b-CbRAS und pET-15b-CbHST. Es werden Restriktionsschnittstellen identifiziert, die in beiden Enzymen konserviert sind. Im Alignment (siehe Abbildung 105) von RsVS, CbRAS und CbHST ist die Lage der verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Die chimären Expressionsplasmide pET-15b-RAS/HST und pET-15b-HST/RAS werden wie folgt generiert:

pET-15b-CbRAS wird mit *NdeI* und *BamHI* und pET-15b-CbHST mit *XhoI* und *BamHI* verdaut (siehe Kapitel 2.1.16). Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.4) werden die Vollängeninserts mit 1293 Basenpaare (CbRAS) und 1284 Basenpaare (CbHST) aus dem Gel extrahiert, mittels NucleoSpin® Extract (siehe Kapitel 2.1.5) aufgereinigt und anschließend ein Restriktionsverdau mit *CviQI* durchgeführt. Während die CbRAS-Sequenz innerhalb von drei Stunden vollständig geschnitten wird, muss im Fall der CbHST ein partieller Verdau von 45 Minuten erfolgen, da diese Sequenz insgesamt drei *CviQI*-Schnittstellen aufweist. Die verdauten DNAs werden durch Agarosegelelektrophorese getrennt und jeweils das kurze Fragment mit 606 Basenpaare (CbRAS und CbHST, N-terminale Enden) sowie das lange Fragment mit 687 Basenpaare (CbRAS, C-terminal) und 678 Basenpaare (CbHST, C-terminal) aus dem Gel extrahiert. Durch kreuzweise Ligation werden aus diesen vier Fragmenten zwei Chimäre gebildet. In einer Reaktion wird das N-terminale CbRAS-Fragment mit dem C-terminalen CbHST-Fragment durch die T4-DNA-Ligase (siehe Kapitel 2.1.16) verknüpft. Komplementär dazu wird ein zweiter Ligationsansatz pipettiert, der das kurze CbHST-Fragment und das lange CbRAS-Fragment enthält. Nach Ligation über Nacht bei 4 °C und Inaktivierung der Ligase durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min, werden die gewünschten Ligationsprodukte RAS/HST mit RAS-Sequenz am N-Terminus und HST/RAS mit HST-Sequenz am N-Terminus in einer HiFi-Taq®-Polymerasettenreaktion mit Vollängenprimern vervielfältigt (siehe Kapitel 2.1.15). Zur Amplifikation der RAS/HST-Chimären werden die Primer RAS-VL-f mit *NdeI*-Schnittstelle vorne und Cb-HCT-VLr (siehe Kapitel 2.1.15) mit *BamHI*-Schnittstelle hinten verwendet. Zur Vervielfältigung der HST/RAS-Sequenz werden die beiden Primer CbHCT-VLf (siehe Kapitel 2.1.15) mit *XhoI*-Schnittstelle vorne und RAS-VL-r mit *BamHI*-Schnittstelle hinten herangezogen.

Die CbRAS-spezifischen Vollängenprimer RAS-VL-f mit *NdeI*-Schnittstelle und RAS-VL-r mit *BamHI*-Schnittstelle standen zur Verfügung (Berger et al. 2006).

## *Material und Methoden*

RAS-VL-f mit 30 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 55,3 °C:

5'- ATT ACA TAT GAA GAT AGA AGT CAA AGA CTC-3'

RAS-VL-r mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 54,8 °C:

5'- TAG GAT CCT CAT CAA ATC TCA TAA AAC AAC TTC TC-3'

Die PCR-Ansätze werden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmente mit der gewünschten Größe ausgeschnitten. Das RAS/HST-Fragment mit 1284 Basenpaare sowie das 1293 Basenpaare große HST/RAS-Fragment werden nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T (siehe Kapitel 2.1.6) und Vermehren in DH5 $\alpha$  aus dem Bakterien präpariert (siehe Kapitel 2.1.8) und nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I (pGEM<sup>®</sup>-T-HST/RAS) bzw. *Nde*I (pGEM<sup>®</sup>-T-RAS/HST) in pET-15b ligiert und erneut in DH5 $\alpha$  vermehrt. Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS werden die chimären Proteine heterolog exprimiert (siehe Kapitel 2.1.19) und über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Expressionserfolg wird mittels SDS-PAGE analysiert und die Enzymaktivität in Standardenzymtests untersucht. Um auf RAS-Aktivität zu testen, werden Caf-CoA und pHPL als Substrate angeboten, pC-CoA und Shikimisäure sind die Substrate für die HST-Reaktion. Um HQT-Aktivität zu identifizieren, werden den Chimären Caf-CoA und Chinasäure angeboten.

### 2.5.3. Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären II

Vier weitere RAS/HST-Chimäre werden auf ähnliche Weise hergestellt und anschließend heterolog exprimiert: HHR, HRR, HHRH und HRHH sind CbRAS-CbHST-Chimäre, in denen der Fremdproteinanteil reduziert ist. In Tabelle 11 sind die Chimäre und die verwendeten Schnittstellen schematisch dargestellt. Ausgangspunkt für die HHR-Chimäre sind die Expressionsvektoren pET-15b-HST und pET-15b-HST/RAS. Beide Plasmide werden mit *Sac*I verdaut. Wie in Abbildung 105 zu erkennen ist, schneidet *Sac*I die CbRAS und die CbHST zweimal: einmal vor dem HxxxD-Motiv und einmal vor dem DFGWG-Motiv. Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese wird der linearisierte pET-15b-HST/RAS-Vektor und das 715 Basenpaare große Fragment, das aus dem pET-15b-HST herausgeschnitten worden ist, aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Aufreinigung erfolgt die Ligation beider Fragmente zu einer Vollängensequenz die für eine Chimäre codiert, die zu einem großen



## *Material und Methoden*

Anteil aus CbHST-Sequenz besteht. Am C-Terminus besitzt sie einen CbRAS-Anteil, der 18% der Gesamtsequenz ausmacht.

Die HRR-Chimäre wird analog zur HHR-Chimären gebildet. Als Ausgangsplasmide fungieren die Expressionsvektoren pET-15b-RAS und pET-15b-HST/RAS. Verdaut wird ebenfalls mit *SacI*. Der linearisierte Vektor pET-15b-HST/RAS wird ligiert mit dem 724 Basenpaare langen Fragment, das beim Verdau aus pET-15b-RAS freigesetzt wird. Diese Chimäre besteht vorwiegend aus RAS-Sequenz, allerdings besitzt sie an ihrem N-Terminus einen HST-Bereich, der einen Anteil von 26% an der Gesamtaminosäuresequenz ausmacht.

Bei den Chimären HHRH und HRHH ist der Anteil an Fremdprotein ebenfalls reduziert. pET-15b-HST wird durch Verdau mit *SacI* linearisiert und nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert. Zur Gewinnung des 724 Basenpaare langen zu ligierenden Inserts wird im Fall der HHRH-Chimären das Plasmid pET-15b-HST/RAS mit *SacI* verdaut, im Fall der HRHH-Chimären das Plasmid pET-15b-RAS/HST. Das 715 Basenpaare lange Fragment wird aus dem Agarosegel extrahiert. Der CbRAS-Anteil in den HHRH-Chimären beträgt 35% in der Mitte der Aminosäuresequenz, der ausgetauschte Anteil der HRHH-Mutante liegt bei 21%.

### 2.5.4. 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der Herstellung der HHR- / HRR- / HHRH- und HRHH-Chimären werden die mit *SacI* verdauten Vektorfragmente vor der Ligation dephosphoryliert.

Linearisierte Vektoren, die mit einem einzigen Restriktionsenzym verdaut worden sind, besitzen zwei kompatible Enden und neigen deshalb zur Selbstligation. Um dieses Phänomen zu unterbinden wird in der Molekularbiologie die mit Restriktionsenzymen verdaute Plasmid-DNA am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu steht CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) der Firma Fermentas zur Verfügung. Die mit *SacI* verdauten Expressionsplasmide pET-15b-RAS und pET-15b-HST werden für 30 min bei 37 °C in folgendem Ansatz modifiziert:

40 µl linearisierter Vektor

5 µl 10 X CIAP-Puffer

1 µl CIAP (1U/µl)

## *Material und Methoden*

Es ist darauf zu achten, die alkalische Phosphatase durch Erhitzen bei 85 °C für 15 min zu inaktivieren. Die CIAP ist ein stabiles Enzym, das im Ligationsansatz das zu ligierende DNA-Fragment dephosphorylieren und damit eine erfolgreiche Ligation verhindern würde.

Nach der Behandlung mit CIAP wird mit der Ligation fortgefahren.

## **2.6. Versuche zur Klonierung einer RAS, einer HST und einer HQT aus *Glechoma hederacea***

### 2.6.1. Untersuchung von *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* auf sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: Rosmarinsäure und Chlorogensäure

Frischpflanzenmaterial von *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* wird gefriergetrocknet. Zur Extraktion der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe werden 20 mg des gefriergetrockneten und fein gemörsterten Pflanzenmaterials mit 1 ml 70% Ethanol vermischt und 2 x 10 min im Ultraschallbad bei 70 °C erhitzt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 g wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieser Extrakt wird durch HPLC-Analyse auf Anwesenheit der sekundären Inhaltsstoffe Rosmarinsäure und Chlorogensäure untersucht. Dazu werden 10 µl Extrakt mit 180 µl Fließmittel verdünnt und direkt vermessen. Für die HPLC-Analyse (siehe Kapitel 2.4.5) stehen eingestellte Rosmarinsäure- und Chlorogensäurestandards zur Verfügung. Als Fließmittel wird ein Methanol-Wasser-Gemisch mit einem Methanolgehalt von 35% (V/V) verwendet, das mit 0,01% o-Phosphorsäure angesäuert ist. Die Detektionswellenlänge ist 333 nm.

### 2.6.2. Versuche zur Klonierung einer Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Glechoma hederacea*

#### 2.6.2.1. Amplifikation des 5'-Endes der GhRAS mit GeneRacer™ Kit

Die GeneRacer™ cDNA von *Glechoma* wird wie in Kapitel 2.1.14 beschrieben aus Blattmaterial von *Glechoma hederacea* synthetisiert. Zur Amplifikation des 5'-cDNA-Endes der GhRAS wird ein Ankerprimer und ein degenerierter, dem DFGWG-Motiv entsprechender, reverse Primer verwendet.

Der reverse Primer ist RAS-Rn6 mit 33 Basen und einem errechneten Schmelzpunkt von >75 °C:

5'-CAC CGC CTT CCC CCA CCC RAA RTC CGG CTC RTA-3'

Als Ankerprimer dient der GeneRacer™ 5'-Primer mit 23 Basen und einer angegebenen Schmelztemperatur von 74 °C:

5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'

Für die PCR wird das GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit von Promega verwendet.

## Material und Methoden

Die einzelnen Ansätze für die PCR enthalten:

10 µl	10 x Colorless GoTaq <sup>®</sup> Flexi-Puffer
5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	GeneRacer <sup>™</sup> cDNA <i>Glechoma</i>
1 µl	100 pmol/µl Primer RAS-Rn6
1 µl	100 pmol/µl GeneRacer <sup>™</sup> 5'-Primer
0,3 µl	(5 U/µl) GoTaq <sup>®</sup> -Polymerase
ad 50µl	steriles Wasser

Die PCR wird mit einem Stratagene Robocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	
72 °C/75 °C/78 °C	45 s	1
72 °C	3 min	
<hr/>		
95 °C	30 s	
72 °C/75 °C/78 °C	45 s	38
72 °C	2 min	
<hr/>		
95 °C	30 s	
72 °C/75 °C/78 °C	45 s	1
72 °C	10 min	

Die PCR-Proben werden direkt auf einem Agarosegel aufgetrennt, alle Fragmente mit einer Mindestlänge von 1150 Basenpaare aus dem Gel extrahiert und über ein NucleoSpin<sup>®</sup>-Säulchen aufgereinigt. In einer nested PCR mit 1 µl der aufgereinigten Banden als Template wird die Spezifität der PCR erhöht. Die Durchführung der nested PCR entspricht derjenigen der Amplifikation des 5'-cDNA-Endes.

Allerdings wird neben dem reverse Primer RAS-Rn6 der forward Primer RAS-Fn7 mit 36 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von >75 °C eingesetzt:

5'-GCA AAC GAG CAC CAC TTA TCC GAC GGC GTC GCC GCC-3'

Die DNA der PCR-Bande, die zur Amplifikation eines 700 Basenpaare langen PCR-Produkts führt, wird in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und in DH5α vermehrt.

## *Material und Methoden*

Nach Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.8) aus den Übernachtskulturen (siehe Kapitel 2.1.7) und Verdau der Plasmide mit *SpeI* und *SacII* können positive Klone identifiziert werden.

Die Zusammensetzung des Verdau für den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ist:

4 µl Plasmidpräparation  
1 µl Puffer blau  
0,5 µl *Sac II* (10U/µL)  
0,5 µl *Spe I* (10U/µL)  
4 µl destilliertes Wasser

Dieser Ansatz wird für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.6.2.2. Amplifikation des 3'-Endes der GhRAS mit GeneRacer™ Kit

Nach Sequenzierung (siehe Kapitel 2.1.12) und Sequenzvergleich des 5'-cDNA-Endes mit der NCBI-Datenbank wird ein forward Primer entworfen, der in Kombination mit dem GeneRacer™ 3'-Primer die Amplifikation des 3'-cDNA-Endes ermöglicht.

Der forward Primer ist Gh-RAS2-f mit 27 Basen und einem errechneten Schmelzpunkt von 63,4 °C:

5'-ATG AAG ATC GAC GTC AAA GAA TCG ACG-3'

Als reverse Primer dient der GeneRacer™ 3'-Primer mit 25 Basen und einer angegebenen Schmelztemperatur von 76 °C:

5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'

## Material und Methoden

Die Zusammensetzung der 3'-RACE-PCR lautet:

5 µl	10 x High Fidelity PCR Puffer
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	Gene Racer cDNA Coleus 1:5 verdünnt
1 µl	100 pmol/µl Primer Gh-RAS2-f
1 µl	100 pmol/µl Gene Racer 3'-Primer
0,5 µl	(5 U/µl) High Fidelity Taq-Polymerase
ad 50 µl	nukleasefreies Wasser

Das verwendete PCR-Programm ist:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	
55 °C/60 °C/65 °C	45 s	1
72 °C	3 min	
<hr/>		
95 °C	30 s	
55 °C/60 °C/65 °C	45 s	36
72 °C	2 min	
<hr/>		
72 °C	10 min	1

Nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T und Transformation in DH5α wird die Sequenz des PCR-Produkts (siehe Kapitel 2.1.12) ermittelt, so dass nach Untersuchung der internen Schnittstellen (siehe Kapitel 2.1.15) ein Expressionsvektor ausgewählt und dazu passende Vollängenprimer gestaltet werden können.

## Material und Methoden

### 2.6.2.3. Amplifikation der RAS aus *Glechoma hederacea* zur Vollängensequenz

Die GhRAS-Vollängensequenz soll in den pET-41a-Vektor eingebracht werden.

Über den Forward-Primer wird eine *EcoRI* Schnittstelle an die RAS-Vollängensequenz angehängt:

HCT F mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 66,0 °C:

5'-ATT GAA TTC ATG AAG ATC GAC GTC AAA GAA TCG AC-3'

Über den Reverse-Primer wird eine *SalI* Schnittstelle an das 5'-Ende der RAS addiert:

HCT R mit 34 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 62,2 °C

5'-AAT TGT CGA CTT AAA TCT CAT AAA ACA ACT TCT C-3'

Die Zusammensetzung der PCR und das verwendete PCR-Programm entspricht der Zusammensetzung bei der 3'-RACE-PCR (siehe Kap. 2.6.2.2.).

Nach Amplifikation eines 1300 Basenpaare langen Fragments wird dieses aus dem Agarosegel extrahiert und standardmäßig mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Kit aufgereinigt. Bevor die RAS-cDNA in pET-41a ligiert und in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS eingebracht wird, wird die Vollängen cDNA im Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T zwischenvermehrt (siehe Kapitel 2.1.6 bis Kapitel 2.1.12). Hierbei fällt auf, dass zwei ähnliche RAS-Sequenzen amplifiziert werden. Die kürzere Sequenz wird als GhRAS-k und die längere Sequenz als GhRAS-l bezeichnet.

Mit dem nach Umklonieren erhaltenen Konstrukt aus GhRAS-cDNA in pET-41a werden elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert.

## *Material und Methoden*

### 2.6.2.4. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Neben der Transformation von chemokompetenten Zellen können auch elektrokompetente Zellen zur Transformation herangezogen werden. Der Vorteil der Elektroporation liegt in der hohen Transformationseffizienz und bietet sich v.a. bei schwer transformierbaren Stämmen wie BL21, aber auch bei großen Plasmiden an.

Es werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,7 erreicht ist. Die Bakterien werden zunächst 30 min auf Eis stehen gelassen und dann in einer Zentrifuge bei 4°C und 3000 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet sorgfältig in kaltem destilliertem Wasser (5mL) resuspendiert. Diese Waschschrte werden insgesamt dreimal durchgeführt, um den Salzgehalt der Zellen möglichst stark zu verringern. Am Ende wird das Zellpellet in 2-5 ml eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und kann für die Transformation benutzt bzw. aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

### 2.6.2.5. Transformation von elektrokompetenten Zellen

Die Elektroporation ist eine Methode zur Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen. Durch einen elektrischen Puls werden winzige Löcher erzeugt, durch die freie DNA in die Zellen eingeschleust wird.

Die Erfolgsrate der Elektroporation hängt wesentlich von der Reinheit der elektrokompetenten Zellen und der Plasmidlösung ab. Insbesondere muss auf Salzfreiheit geachtet werden. Eine salzhaltige Lösung kann bei der Elektroporation zu einer kleinen Explosion führen, wobei die Zellen zerstört werden.

Für die Transformation werden 50 µl elektrokompetente Zellen mit 1 µl DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wird dann mit den Konstanten 2,5 kV / 25 µF / 200 Ohm durchgeführt. Direkt nach dem Puls werden 1000 µl SOC-Medium zugeführt. Dann wird alles in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nun werden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.



## Material und Methoden

### SOC-Medium:

0,5 g	Hefeextrakt
2 g	Trypton
50 mg	NaCl
2,5 ml	1 M KCl
ad 100 ml	destilliertes Wasser

Diese Lösung wird autoklaviert. Vor Gebrauch werden dem Nährmedium über einen Sterilfilter 2 ml einer 1 M Glucoselösung und 1 ml einer Lösung zugegeben, die aus 1 M  $MgCl_2$  und 1 M  $MgSO_4$  besteht. Der pH-Wert beträgt 6,8 bis 7.

### 2.6.3. Versuche zur Klonierung einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Glechoma hederacea*

#### 2.6.3.1. Amplifikation des 5'-Endes der GhHST mit GeneRacer™ Kit

Zur Amplifikation der HST aus *Glechoma hederacea* wird zuerst eine RACE-PCR mit der GeneRacer™-cDNA *Glechoma* durchgeführt. Die Vorgehensweise der gesamten Klonierung bis hin zur Ligation in den Expressionsvektor pET-41a ist mit der Klonierung der GhRAS vergleichbar. Im Folgenden werden wesentliche Unterschiede dargestellt.

Als forward Primer bei der 5'-RACE-PCR dient HCT-Cb3' in Kombination mit dem GeneRacer™ 5'-Primer. Der pipettierte PCR-Ansatz mit HiFi-Taq®-Polymerase ist in Kapitel 2.6.2.1. beschrieben.

Das verwendete PCR-Programm ist in Kapitel 2.6.2.2. beschrieben. Die Annealingtemperaturen sind 55 °C/60 °C/65 °C.

Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von mindestens 630 Basenpaaren.

## Material und Methoden

Standardmäßig wird vor der Klonierung und Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate eine nested PCR durchgeführt. 1 µl der PCR-Ansätze dienen als Template. Von der Größe des PCR-Produkts, das erwartungsgemäß 160 Basenpaare kleiner ist, kann auf die Originalbande geschlossen werden. Der hierzu herangezogene forward Primer ist HCT-Cb-3'n. Der reverse Primer ist GeneRacer™ 5'. Die Durchführung der nested PCR entspricht der 5'-RACE-PCR.

### 2.6.3.2. Amplifikation des 3'-Endes der GhHST mit dem GeneRacer™ Kit

Kann bei dem 5'-cDNA-Ende eine Sequenzähnlichkeit zu anderen in der NCBI-Datenbank publizierten HSTs gefunden werden, wird eine 3'-RACE-PCR angeschlossen, um die Gesamtsequenz der HST aus *Glechoma* zu erhalten.

Dazu wird der forward Primer HCT-27/1f mit 29 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 66,7 °C entworfen:

5'-ATG AAA ATC GAG GTG AGA GAC TCG ACG CT-3'

Der zu kombinierende Ankerprimer ist der GeneRacer™ 3'nested Primer. Pipettierschema und PCR-Programm entsprechen denen der Amplifikation des 5'-cDNA-Endes der GhHST.

Bei der nested PCR wird als Template 1 µl PCR-Ansatz eingesetzt. HCT 27/1f wird kombiniert mit den zu gleichen Teilen gemischten Ankerprimern SK5, SK6 und SK7, die an den Poly-A-Schwanz der GeneRacer™ cDNA binden.

SK5-oligodTVA mit 13 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von <30 °C:

5'-TTT TTT TTT TTV A-3'

SK6-oligoTVC mit 13 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von <30 °C:

5'-TTT TTT TTT TTV C-3'

SK7-oligoTVG mit 13 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von <30 °C:

5'-TTT TTT TTT TTV G-3'

Das Amplifikat ist erwartungsgemäß ca. 1400 Basenpaare lang.

## Material und Methoden

### 2.6.3.3. Amplifikation der HST aus *Glechoma hederacea* zur Vollängensequenz

Nach erfolgreicher 5´- und 3´-RACE-PCR können Vollängenprimer mit *EcoRI*-Schnittstelle vorne und *SaI*-Schnittstelle hinten zur Vervielfältigung der Gesamtsequenz gestaltet werden.

Forward Primer:

Gh-HCT 27/1 VLf mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 67,1 °C:

5´-ATT GAA TTC ATG AAA ATC GAG GTG AGA GAC TCG AC-5´

Reverse Primer:

Gh-HCT 27/1 VLr mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 66,0 °C:

5´-AAT TGT CGA CTC AAA TAT CAT AGA GCA GCT TCT CA-5´

In einer Standard-PCR mit HiFi-Taq<sup>®</sup>-Polymerase wird die Gesamtsequenz von zwei GhHSTs bei Variation der Annealingtemperatur (53 °C / 56 °C / 60 °C) erhalten. Die GhHST-Sequenz mit 1305 bp wird GhHST-l genannt und die 1293 bp große Sequenz GhHST-k.

### 2.6.4. Versuche zur Klonierung einer HQT

#### 2.6.4.1. Amplifikation des 5´-Endes der putativen GhHQT mit GeneRacer™ Kit

Das 5´-Ende der GhHQT wird unter denselben Bedingungen amplifiziert wie das 5´-Ende der GhRAS (Kapitel 2.6.2.1.).

## Material und Methoden

### 2.6.4.2. Amplifikation des 3'-Endes der putativen GhHQT mit GeneRacer™ Kit

Zur Amplifikation des dazugehörigen 3'-cDNA-Endes wird der genspezifische Primer HCT23/2f mit 30 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 64 °C in der 3'-RACE-PCR und 3'-nested PCR eingesetzt:

5'-ATG AAG ATG AGT GTG AAG GAG TCA ACA ATG 3'

Die Ankerprimer, die Pipettierschemata sowie die PCR-Programme entsprechen den Versuchen zur Amplifikation des 3'-Endes der GhHST (Kapitel 2.6.2.2.).

### 2.6.4.3. Amplifikation der putativen HQT aus *Glechoma hederacea* zur Volllänge-sequenz

Die Gesamtsequenz der GhHQT wird mit folgenden Vollängenprimern erhalten:

Forward Primer:

Gh-HCT23/2VLf mit 33 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 64,5 °C, über den eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt wird:

5'-ATT GAA TTC ATG AAG ATG AGT GTG AAG GAG TCA-3'

Reverse Primer:

Gh-HCT23/2VLr mit 35 Basen und einer errechneten Schmelztemperatur von 64,8 °C, über den eine *SalI*-Schnittstelle angehängt wird:

5'-AAT TGT CGA CTC AAA TAT CAT AAA GCA GCT TCT TCA-3'

Der PCR-Ansatz und das verwendete PCR-Programm entspricht Kapitel 2.6.2.2. Wie bei der GhRAS und der GhHST werden in diesem PCR-Ansatz zwei GhHQT-Volllänge-sequenzen amplifiziert. Die kürzere Sequenz heißt GhHQT-k und die längere Sequenz GhHQT-l.

## **2.7. Versuche zur Expression und Aufreinigung der GhRAS, GhHST und GhHQT sowie Bestimmung der Substratspezifitäten**

### 2.7.1. Heterologe Expression der GhHCTs

Zur Expression der GhRAS, der GhHST und der putativen GhHQT werden Übernachtskulturen der *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit den jeweiligen vollständigen offenen Leserastern im Plasmid pET-41a angeimpft. Das Selektionsantibiotikum ist Kanamycin, das in einer Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt wird. Mit jeder Übernachtskultur werden zwei Kolben mit 150 ml frischem LB-Kanamycin-Medium inokuliert und bei 37 °C bei 200 g bis zu einer optischen Dichte um 0,7 wachsen gelassen. Es folgt die Induktion mit 0,5 mM IPTG und Wachstum bei 25 °C unter Schütteln für weitere 8 Stunden. Die Bakterien jeder 150 mL Kultur werden durch Zentrifugation (3000 g, 5 min) sedimentiert und nach entfernen des Überstands in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Herstellung der GhHST-Rohextrakte wird jedes Bakterienpellet nach Auftauen auf Eis in 8 ml His-Tag-Bindepuffer resuspendiert und unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.2.1) aufgeschlossen. Zur Bestimmung des Proteingehalts sowie Durchführung von SDS-PAGE und Enzymtests wird eine Probe der Rohextrakte gezogen und bei 4 °C gelagert.

### 2.7.2. Aufreinigung der GhHCTs über His-Tag-Affinitätschromatographie

15 ml GhHCT-Rohextrakt werden über 1 ml His-Select<sup>®</sup> HF Nickel Affinity Gel der Firma Sigma aufgereinigt. Die Durchführung ist in Kapitel 2.2.3 detailliert beschrieben. 4 ml Elutionsfraktion werden über Dialyse gegen 1 l 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 umgepuffert und anschließend mit SpectraGel<sup>™</sup> bis auf 20 - 40 µl aufkonzentriert und komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen.

## *Material und Methoden*

### 2.7.3. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität der GhHCTs

Zur Bestimmung der Substratspezifität werden die Rohextrate in Enzymtests eingesetzt. Die Standardenzymtests zur Bestimmung der RAS-, HST- und HQT-Aktivität (siehe Kapitel 2.2.4) werden 30 min lang inkubiert. Die Substratspezifität der GhHQTs wird in einem zusätzlichen Enzymtest untersucht, in dem als Substrate pC-CoA bzw. Caf-CoA und Chlorogensäure angeboten werden, um die Synthese von mehrfach substituierter Chinasäure zu überprüfen.

85,5 µl 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0

5 µl 12,5 mM Ascorbat

12,5 µl 0,1 M DTT

10 µl 25 mM Chlorogensäure

2 µl 1,5 mM Caf-CoA / 2,6 mM pC-CoA

10 µl Enzym

## **2.8. Versuche zur Untersuchung der Evolution von HCTs: genomische Organisation und Phylogenie**

### 2.8.1. Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial von *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*

Das Genom ist die Gesamtheit der haploiden Erbinformation einer Zelle und ist bei Eukaryoten in Form von Chromosomen im Zellkern eingeschlossen. Dazu zählt auch Plastiden- und Mitochondrien-DNA. Die genomische DNA (gDNA) kann in Abschnitte mit kodierenden und nichtkodierenden Sequenzen eingeteilt werden. Während die nichtkodierenden Sequenzen u.a. an der Steuerung der Replikation und der Transkription beteiligt sind, werden die Protein-kodierenden Gene transkribiert. Innerhalb der Gene von Eukaryoten sind oft nichtkodierende Introns vorhanden, welche ebenfalls transkribiert werden, aber dann im Zellkern aus der prä-mRNA herausgespleißt werden, bevor die mRNA im Cytoplasma translatiert wird. Durch differentielles Spleißen kann so ein Gen für viele Proteinvarianten kodieren. Die Anzahl, Größe, Nukleotidsequenz und Position von Introns lassen Rückschlüsse auf die Evolution der betrachteten Gene zu.

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial von *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* nach Rogers und Bendich (1985) wird das tiefgefrorene Pflanzenmaterial in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. 50 mg des gemörserten Pflanzenmaterials werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, in dem sich 300 µl 2 x CTAB-Puffer befinden. Nach Mischen durch Umschütteln wird die Suspension 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Entfernung von Proteinen und Polysacchariden werden 300 µl Chloroform zugesetzt und gut durchmischt. Nach Zentrifugation (5 min, 16000 g) wird die obere wässrige Phase mit der gDNA in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die gDNA durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 g wird das Sediment mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Die Lösungsmittelrückstände werden vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Das gDNA-Sediment wird luftgetrocknet und in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die gDNA wird mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert. Sie kann als Template in Polymerasettenreaktionen eingesetzt werden.

## *Material und Methoden*

### **2 x CTAB-Puffer:**

2% (m/V) CTAB

100 mM Tris/HCl, pH 8,0

20 mM EDTA

1,4 M NaCl

1% (m/V) Polyvinylpyrrolidon

### 2.8.2. Isolierung von RAS-, HST und HQT-Genen aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*

Zur Amplifikation der gDNA-Sequenzen von CbHST, GhRAS, GhHST und GhHQT werden die optimierten PCR-Bedingungen verwendet, die zur erfolgreichen Isolierung der entsprechenden cDNA-Klone geführt hatten (siehe Kapitel 2.6.2.3, 2.6.3.3 und 2.6.4.3). In die PCR-Ansätze mit HiFi-Taq-Polymerase werden jeweils 1 µl gDNA pipettiert.

### 2.8.3. Berechnung der Intronspleißstellen mit NetPlant Gene Server

Introns können an jeder Stelle eines Gens liegen. Die Position eines Introns vor dem ersten, zweiten oder dritten Nucleotid eines Codons definiert dieses Intron als Intron der Phase 0, 1, oder 2. Häufige Introns sind sogenannte GT-AG Introns, die mit dem Donor Guanin-Thymin beginnen und mit dem Akzeptor Adenin-Guanin enden. Der NetPlantGene Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPGene/>) am Center for Biological Sequence Analysis der Technischen Universität Dänemark ist ein bioinformatisches Werkzeug, um die Übergänge zwischen Exons und Introns in pflanzlichen gDNA-Sequenzen vorherzusagen. Position und Größe der Introns in HCT-Genen aus *Glechoma hederacea* und *Coleus blumei* werden durch Sequenzvergleich der gDNAs mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen identifiziert und die Spleißstellen mit Hilfe dieser frei zugänglichen Software überprüft.



## *Material und Methoden*

### 2.8.4. Suche nach BAHD-Acyltransferasen in der UniProt Datenbank

UniProt (<http://www.uniprot.org/>) ist eine bioinformatische Datenbank, in der Proteine aller Lebewesen gesammelt werden. In der zentralen Datenbank für Proteinsequenzen, der UniProt Knowledgebase, kann nach veröffentlichten Proteinsequenzen gesucht werden, die anhand ihrer Akzessionsnummer eindeutig identifizierbar sind. Zu jedem Protein sind Informationen über die biologische Funktion sowie die katalytische Aktivität hinterlegt, und es existieren Links zu anderen Datenbanken, zum Beispiel der Genbank oder relevanten Literaturquellen.

Es wird nach Proteinsequenzen von BAHD-Acyltransferasen gesucht. Diejenigen Enzyme, deren katalytische Funktion bekannt ist, werden selektiert und sollen einer phylogenetischen Analyse unterzogen werden.

### 2.8.5. Phylogenetische Analyse von BAHD-Acyltransferasen mit MEGA 4.0

Mit MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) steht eine Software zur phylogenetischen Analyse von DNA- und Proteinsequenzen zur Verfügung (Tamura et al. 2007). Anhand der Ähnlichkeit der Sequenzen wird versucht, die Abstammungsgeschichte zu rekonstruieren. Der Verwandtschaftsgrad kann als phylogenetischer Stammbaum anschaulich dargestellt werden.

Für ausgewählte BAHD-Acyltransferasen wird nach multiplem Proteinsequenzalignment unter Verwendung des Neighbour-Joining-Verfahrens ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Die Einstellungen des MEGA-Programms werden übernommen, nur der bootstraps-Wert wird auf 1000 Wiederholungen erhöht.

### **3. Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1. Ergebnisse zur cDNA-Klonierung einer CbHST**

Aus *Coleus blumei* konnte spezifisch eine cDNA-Volllängensequenz amplifiziert werden, die für eine HST kodiert.

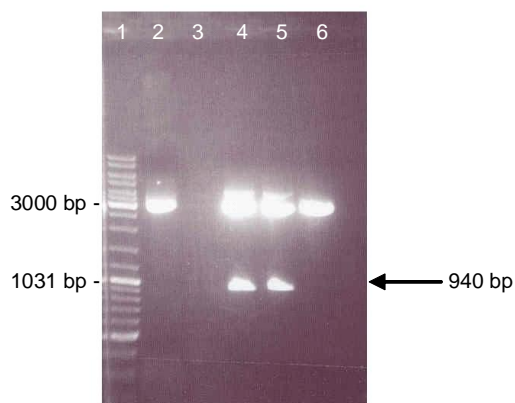
##### **3.1.1. Entwurf von Primern für eine HST**

Für die Isolierung einer HST-Sequenz aus *Coleus* cDNA wurden degenerierte Primer entworfen, die spezifisch zur Amplifikation der CbHST cDNA, nicht aber der CbRAS cDNA führten. Dazu wurden die Nukleotidsequenzen von Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* (NM\_124270), *Nicotiana tabacum* (AJ507825.1, AJ582651.1) und *Lycopersicon esculentum* (AJ582652.1) mit der CbRAS-Sequenz in MultAlign zur Identifizierung von konservierten Nukleotidsequenzbereichen übereinandergelegt. Bei den HCSQTs ließen sich konservierte Bereiche finden, die sich deutlich von der CbRAS-Sequenz unterscheiden. Aus diesen konservierten Bereichen konnten zwei degenerierte forward Primer abgeleitet werden (HCT-1f und HCT-2f). Als Reverse Primer wurde ein Primer (DFGWG-r) ausgewählt, der sich gegen das bei allen BAHD-Acyltransferasen hoch konservierte DFGWG-Motiv richtet.

##### **3.1.2. Polymerase Kettenreaktion mit Primern gegen die konservierten Regionen**

In einer PCR-Reaktion mit der GoTaq<sup>®</sup>-Polymerase (siehe Kapitel 2.1.3ff) konnte zunächst spezifisch ein CbHST-Mittelstück aus der *Coleus* cDNA (siehe Kapitel 2.1.2) amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 940 Basenpaaren entsprach (Abbildung 10). Die nested PCR mit den degenerierten Primern ergab ebenfalls eine Bande mit der erwarteten Größe von 660 Basenpaaren. Das 940 Basenpaare lange Mittelstück wurde aus dem Agarosegel extrahiert und in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 10:** Verdau CbHST 940 Basenpaare nach Ligation pGEM<sup>®</sup>-T, Transformation in DH5 $\alpha$  und Verdau der Plasmidpräparation mit *Nco*I und *Nde*I. 1: DNA-Leiter, 2: Verdaue 1-5.

Nach Transformation von *E. coli* der Linie DH5 $\alpha$  und Plasmidpräparation der Übernachtskultur konnte das Plasmid zum Sequenzieren geschickt werden. Die Sequenzanalyse des CbHST-Mittelstücks ergab eine Sequenzlänge von 908 Basenpaaren.

Bei der Suche nach ähnlichen Sequenzen in der NCBI-Datenbank ergaben sich Homologien zu vielen anderen Hydroxycimtsäuretransferasen. Die größten Übereinstimmungen auf Basis der Nukleotidsequenzen sind bei Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferasen zu finden:

81% Identität mit der Chinat/Shikimat O-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Populus trichocarpa* (ACC63882)

82% Identität mit der Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Coffea canephora* (ABO47805)

82% Identität mit der Hydroxycinnamoyltransferase aus *Coffea arabica* (CAJ40778)

Zur CbRAS ist eine Identität von 52% (CAK55166) zu finden.

Die hohe Ähnlichkeit zu den Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferasen ließ vermuten, dass es sich um eine HST handeln könnte. Es sollte das gesamte offene Leseraster gefunden werden. Daher wurde die Teilsequenz zur Vollängensequenz durch RACE-PCR verlängert.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.1.3. Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit RACE-PCR

Für die Vervollständigung der CbHST-Sequenz wurde die RACE-PCR-Methode angewendet. Die genspezifischen Primer wurden nach Anleitung des Herstellers angefertigt. Sie liegen auf der bekannten Teilsequenz der CbHST. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer nicht ebenfalls exakt komplementär zur CbRAS-Sequenz sind, um zu erreichen, dass spezifisch die CbHST-Sequenz verlängert wird. Die Lage der verwendeten Primer (fett und kursiv) ist im unten abgebildeten Alignment der Teilsequenzen von CbRAS und CbHST dargestellt (Abbildung 11). Die unter den Primern eingezeichneten Pfeile geben die Richtung an, in die amplifiziert wird. Außerdem ist die Bezeichnung der Primer in die Pfeile integriert. Diese Primer wurden auf Komplementarität zu sich selbst und zu den entsprechenden Primern des RACE-Kits überprüft und konnten in dieser Form eingesetzt werden.

```
CbRAS      ---CTGAACGGCAACCGCCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTGCTGTTGGTGGAG 57
CbHST      AGGGATGATGATGGTCGGGTTGAGATCGACTGCAACGCCGAGGGAGTGCTGTTTGGAG 60
          * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          I--- HCT-1f -->

CbRAS      GCGGAGTGCACGGCGCGTGGATGAGCTCGGGGACTTCGCCCCCGCCCGGAGCTCAAC 117
CbHST      GCGGAGTCCGACGGCACGGTTGACGATTACGGCGATTTTGCCCCCTCTTGGAGCTCCGC 120
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CbRAS      C---TCATCCCCAAAGTGGATTATTCTCGAGGAATTTCCACATACCCCTCATGGTTTTT 174
CbHST      CGCCTCATCCGGCTGTGGATTATTCTCAGGGAATATCGGCTTACCCGCTGCTCGTATTG 180
          *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CbRAS      CAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAACGAGCACCCTTA 234
CbHST      CAGGTTACATTTTCAAATGCGGAGGTGTTTCCTTAGGCGTTGGAATGCAGCACCACGCA 240
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          <-----HCT-Cb-3 'n

CbRAS      TCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCAGCCGCAGCGCC 294
CbHST      GCCGACGGATTTTCCGGCCTTCACTTCATCAATACATGTCCGATATGGCTCGTGGA--- 297
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          -----I          I-----HCT-2F-----

CbRAS      CCCGCCCTACCCCGCTGCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGCAACCCACCG 354
CbHST      CTGGACATCACCTCCCGCCTTCATAGACCGGACCCTTCTCTCTGCGCGTGATCCCCCT 357
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ->

CbRAS      CAGCCGCAGTTCAGCCACGCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAAACCTCTTCCC 414
CbHST      CAGCCGCAGTTCAGCACGTGGAGTACCAGCCCCCTCCAGC-CATGAAAACCTACGAACC 416
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          <-----HCT-Cb-3 '-----I

CbRAS      CACACCGACATCGCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACCAGCTCAACTCCCTCAAG 474
CbHST      AG--CTGAAACAGTTGTCTCCATATTCAAGCTACCAAGGATCAGCTCACAACCTTAA 474
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CbRAS      TCCAAATTCAAAACCGCCCCCGCCGACGGCGCGCCGCAAAATCTACAGCACGTTCGAG 534
CbHST      GCCAAGTCCAAG-----GAGGATGGCAACACCACCA---CTTACAGCTCCTACGAG 522
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CbRAS      GTTCTTGCCGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGCGGAGGGTCAA 594
CbHST      ATGCTCTCAGGTCACGTATGGCGTGCACCTGTTTGGCTCGTGGTCTGCCCGAAGAGCAA 582
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

## Ergebnisse und Diskussion

```

CbRAS      GAGACCAAGCTCCACATCCCCTTCGACGCCCGCCGAGGCTGCAGC-----TGCCGCCG 648
CbHST      GAGACTAAGCTGTACATAGCTACTGACGCCCGCCGAGGCTGCAGCCTCAACTCCACCA 642
          *****  *****  *  *****  *****  *  *  *  *
                                     I-----

CbRAS      GGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGGCAGATCGAG 708
CbHST      GGCTACTTCGGCAACGTGATCTTCACAGCCACGCCACTTGCCGTGGCCGGGACCTAGGA 702
          ** * *****  *****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *
          --HCT-Cb-5 'Yi----->

CbRAS      TCGAACTCGTGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGCTGGATGAG 768
CbHST      TCGAAGCCAGTGTGGTATGCTGCAAGTAAAATCCACGACGCATTAGCCCGAATGGACAAC 762
          *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                                     I

CbRAS      GACTACCTGCGATCGTCGATCGATTTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTGGCG 828
CbHST      GACTACTTGAGGTCAGCTCTGGATTCTTGGAGCTGCAGCCTGATCTCAAGGCACTCGTC 822
          *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          ---HCT-Cb-5 'n----->

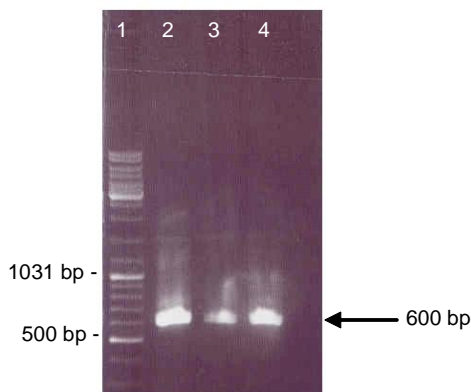
CbRAS      CAGGGAGCTCACAGTTTCAGGTGCCCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTGCCG 888
CbHST      CGAGGAGCTCACACTTTTAGGTGCCGAATCTTGGTATAACCAGTTGGGCTAGGCTTCCT 882
          *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CbRAS      ATTTACGAGCCGGATTTCCGGGTGGGG 915
CbHST      ATACATGATGCTGACTTTGGGTGGG- 908
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          <---DFGWG-----I
    
```

**Abbildung 11:** Alignment von Teilsequenzen der CbRAS und der CbHST. Die Lage und Amplifikationsrichtung der verwendeten Primer ist eingezeichnet.

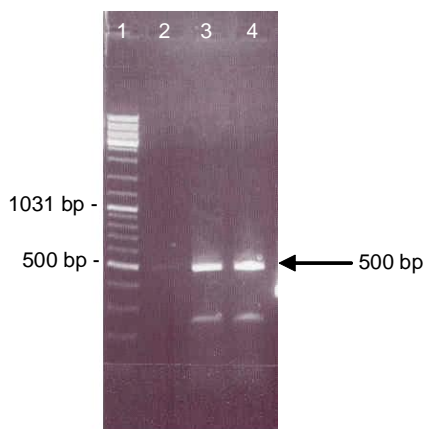
Nach den in Kapitel 2.1 beschriebenen Reaktionen wurden die PCR-Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch überprüft. Dabei wurde bei der 5'-RACE-PCR wie erwartet ein Fragment von etwa 600 Basenpaaren amplifiziert (Abbildung 12), bei der 3'-RACE-PCR war das erhaltene Stück wie erwartet ca. 500 Basenpaare lang (Abbildung 13).

Beide PCR-Fragmente wurden aus den Agarosegelen extrahiert, konnten in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert und im *E. coli* Stamm DH5α vermehrt werden.



**Abbildung 12:** Agarosegel zur Amplifikation des 5'-cDNA-Endes der CbHST. 1: DNA-Leiter, 2-4: PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen (49 °C/55°C/60°C).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 13:** Agarosegel zur Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der CbHST. 1: DNA-Leiter, 2-4: PCR-Ansätze bei verschiedenen Annealingtemperaturen (50 °C/55 °C/60 °C).

### 3.1.4. Bestimmung der Gesamtsequenz der CbHST

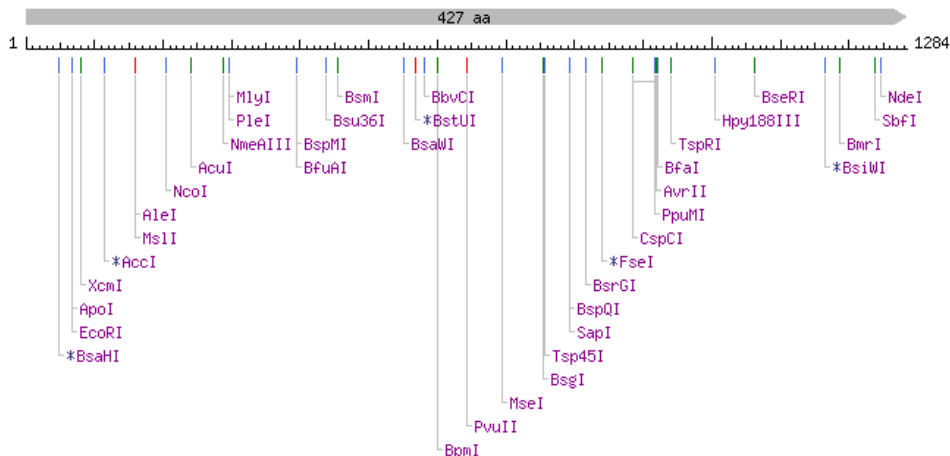
Nach der Sequenzierung der 5'- und 3'-RACE-PCR-Fragmente konnte aus den drei Teilstücken die Volllänge der CbHST zusammengesetzt werden. Es ergibt sich eine 1284 Basen lange Gesamtsequenz mit durchgehendem Leseraster (Abbildung 16). Die für BAHD-Acyltransferasen typischen konservierten Motive HxxxDG und DFGWG sind vorhanden.

Diese Volllänge der CbHST musste nun in einen geeigneten Expressionsvektor eingebracht werden, um Informationen über die Enzymaktivität erhalten zu können. Da die CbRAS von Berger et al. (2006) im pET-15b-Vektor aktiv als 6xHis-Fusionsprotein exprimiert werden konnte, sollte die CbHST ebenfalls in diesen Vektor ligiert werden.

### 3.1.5. Bestimmung der Schnittstellen in der CbHST-Sequenz

Der Vektor pET-15b besitzt in seiner MCS lediglich 3 Restriktionsschnittstellen: *NdeI* vorne, *XhoI* in der Mitte und *BamHI* am Ende. Ob die CbHST-Sequenz in diesen Vektor ligiert werden kann, hängt davon ab, ob sie diese Restriktionsschnittstellen aufweist, oder nicht. Schließlich darf die CbHST-Sequenz beim Einbau in den Vektor nicht zerschnitten werden. Mit Hilfe der Software NEB cutter V 2.0 wurde die CbHST-Sequenz auf Schnittstellen hin untersucht. In der Abbildung 14 sind die Restriktionsenzyme zu finden, die die CbHST-Sequenz einmal schneiden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 14:** Restriktionsenzyme, die die CbHST-Volllängesequenz einmal schneiden

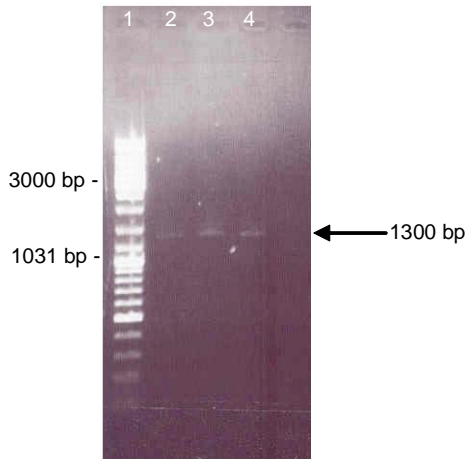
Da *NdeI* die CbHST-Sequenz in Position 1247 schneidet, fällt dieses Restriktionsenzym für die Ligation aus. *XhoI* und *BamHI* schneiden die Volllängesequenz nicht. Somit kann die CbHST über *XhoI* und *BamHI* in den pET-15b Vektor integriert werden.

### 3.1.6. Primerdesign von Vollängenprimern und Amplifikation der CbHST-Gesamtsequenz

Über die Vollängenprimer wurden die gewünschten Schnittstellen an die CbHST-Sequenz addiert. Die Sequenz für die *XhoI*-Schnittstelle wurde an den Anfangsprimer (Cb-HCT-VLf), die Sequenz für die *BamHI*-Schnittstelle an den Endprimer (Cb-HCT VLr) angehängt. Beim Primerdesign wurde darauf geachtet, dass kein Frameshift im pET-15b-Vektor verursacht wird, so dass die CbHST als 6xHis-Fusionsprotein exprimiert werden kann. Die Amplifikation der CbHST-Volllängesequenz wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Es konnte ein Fragment mit der erwarteten Größe von etwa 1300 Basenpaaren amplifiziert werden (Abbildung 15). Dieses Fragment wurde aus dem Gel extrahiert und in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert, um es anschließend in Bakterien zu vermehren. Nach der Plasmidpräparation konnte das CbHST-Insert über die neu eingeführten Schnittstellen durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI* aus dem Vektor herausgeschnitten werden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 15:** Agarosegel zur Amplifikation der CbHST-Vollängensequenz. 1: DNA-Leiter, 2-4: PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (50 °C/55 °C/60 °C).

### 3.1.7. CbHST-Vollängensequenz

Um die komplette Sequenz der CbHST zu verifizieren, wurde ein Vollängenklon zum Sequenzieren geschickt. Im Folgenden ist die komplette Nukleotidsequenz der CbHST mit einer Länge von 1284 Basen sowie die translatierte Aminosäuresequenz, bestehend aus 427 Aminosäuren (EMBL accession number FN647681), abgebildet. Ein offenes Leseraster ist zu finden, ebenfalls die konservierten Regionen HxxxDG und DFGWG, die fett hervorgehoben sind.

```
atgaaaatccacgtgagagattcaacgctggtgcgggcggcggcgacgccggccgctc   60
 M K I H V R D S T L V R P S A A T P A V
agcctttggaattccaatggtgacttggtggtgcccaatctccacaccccaagcgtctac   120
 S L W N S N V D L V V P N F H T P S V Y
ttctaccgccccctccggggcgggacaaacttcttcgacacggcggtgatgaaggcggcgctc   180
 F Y R P S G A D N F F D T A V M K A A L
ggtcggggcgttggtgtctttctaccccatggcagggaggctgaagagggatgaagatggg   240
 G R A L V S F Y P M A G R L K R D E D G
cggggttgagatcgactgcaacgccgagggagtgctggttggtggaggcggagtcggacggc   300
 R V E I D C N A E G V L F V E A E S D G
acgggttgacgattacggcgatTTTTGCCCCCTCTTTGGAGCTCCGCCGCCTCATTCCGGCT   360
 T V D D Y G D F A P S L E L R R L I P A
gtggattattctcagggaaatcgggcttaccgctgctcgtattgcaggttacatTTTTc   420
 V D Y S Q G I S A Y P L L V L Q V T F F
aatgctggagggtgtttccttaggcgttggaatgcagcaccacgcagccgacggatTTTTcc   480
 K C G G V S L G V G M Q H H A A D G F S
ggccttcacttcatcaatacatggtccgatatggctcgtggactggacatcacctccccg   540
 G L H F I N T W S D M A R G L D I T L P
cccttcatagaccggacccttctctctgctgctgatccccctcagccgcagttcaagcac   600
 P F I D R T L L S A R D P P Q P Q F K H
gtggagtaccagccccctccagccatgaaaacctacgaaccagctgaaacagttgtctcc   660
 V E Y Q P P P A M K T Y E P A E T V V S
atattcaagctcaccaaggatcagctcacaactcttaaagccaagtccaaggaggatggc   720
 I F K L T K D Q L T T L K A K S K E D G
```



## Ergebnisse und Diskussion

```
aacaccaccacttacagctcctacgagatgctctcaggccacgtatggcgctgcacttgt 780
N T T T Y S S Y E M L S G H V W R C T C
ttggctcgtgggtctgcccgaagagcaagagactaagctgtacatagctactgacggccgg 840
L A R G L P E E Q E T K L Y I A T D G R
tccaggctgcagcctcaactcccaccaggctacttccggcaacgtgatcttcacagccacg 900
S R L Q P Q L P P G Y F G N V I F T A T
ccacttgccgtggccggggacctaggatcgaagccagtggtgtatgctgcaagtaaaatc 960
P L A V A G D L G S K P V W Y A A S K I
cacgacgcattagcccgaatggacaacgactacttgaggtcagctctggatttcttgag 1020
H D A L A R M D N D Y L R S A L D F L E
ctgcagcctgatctcaaggcactcgtccgaggagctcacacttttaggtgcccgaatctt 1080
L Q P D L K A L V R G A H T F R C P N L
gggtataaccagttgggttaggcttcctatacatgatgctgactttgggtggggtaggccg 1140
G I T S W V R L P I H D A D F G W G R P
atcttcatggggccggggcggcatagcgtacgagggcctgagcttcgtgctgccagtccc 1200
I F M G P G G I A Y E G L S F V L P S P
acaaacgacgggagcttatctgtggcaatatccctgcaggcagagcatatgaaactcttt 1260
T N D G S L S V A I S L Q A E H M K L F
gagaagctgctctatcagatttga 1284
E K L L Y Q I -
```

**Abbildung 16:** Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz der CbHST.

Die physikochemischen Eigenschaften der in die Aminosäuresequenz translatierten CbHST wurden von verschiedenen Programmen, die auf der ExPASy web site (<http://expasy.org/tools/#other>) zu finden sind, berechnet. Für das CbHST-Protein wird ein Molekulargewicht von 47,1 kDa und ein isoelektrischer Punkt von pH 5,78 vorhergesagt.

### 3.1.8. Vergleich der CbHST-Aminosäuresequenz mit anderen Hydroxycinnamoyltransferasen

Die NCBI-Datenbankrecherche nach verwandten Aminosäuresequenzen auf Basis der CbHST-Nukleotidsequenz ergab die höchsten Identitäten zu Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen. Für die folgenden Nukleotidsequenzen zeigten sich die höchsten Ähnlichkeiten:

82% Identität mit einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Coffea canephora* (ABO47805.1)

82% Identität mit einer Hydroxycinnamoyl-CoA-Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Coffea arabica* (ABO40491.1)

81% Identität mit einer Hydroxycinnamoyltransferase aus *Nicotiana tabacum* (CAD47830.1)

80% Identität mit einer Hydroxycinnamoyl-CoA-Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Populus trichocarpa* (ACC63882.1)

79% Identität mit einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Cynara cardunculus* (AAZ80046.1)

## *Ergebnisse und Diskussion*

Die Ähnlichkeit zur CbRAS hingegen war mit einer Identität von 53% deutlich geringer.

Die hohen Sequenzidentitäten zu den Hydroxycinnamoyltransferasen, die als Akzeptormolekül Shikimisäure und/oder Chinasäure akzeptieren, ließen vermuten, dass es sich tatsächlich um eine HCSQT handeln könnte. Da *Coleus blumei* zwar Rosmarinsäure akkumuliert, Chlorogensäure aber nicht gefunden werden kann (Petersen et al. 2009), ist die Existenz einer HQT unwahrscheinlich.

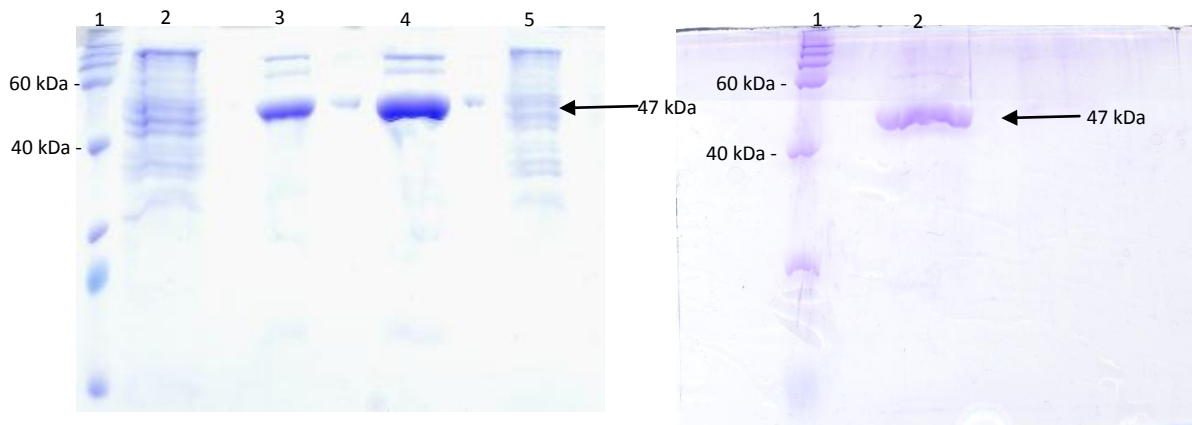
### 3.1.9. Bestimmung der Enzymaktivität

In ersten Standardenzymtests zur Untersuchung der Enzymaktivität mit heterolog exprimierter CbHST wurde HST-Aktivität nachgewiesen. Von pC-CoA und Caf-CoA wurden die Hydroxyzimtsäurereste nur auf Shikimat übertragen. Chinat, Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat wurden nicht als Substrate akzeptiert. Daher kann die CbHST als Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase bezeichnet werden.

### 3.1.10. Expression und Aufreinigung des CbHST-Proteins

Um die CbHST-Vollängensequenz als aktives Protein zu exprimieren, wurde die Nukleotidsequenz über die *Xho*I- und die *Bam*HI-Schnittstelle in den Expressionsvektor pET-15b ligiert und letztlich in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS eingebracht. Nach heterologer Expression des CbHST-Fusionsproteins mit N-terminalem 6xHis-Tag konnte das Protein in einem ersten Reinigungsschritt über eine Nickelmatrix aufgereinigt werden. Die Bakterienpellets wurden auf Anwesenheit von inclusion bodies untersucht. Zur Gewinnung der CbHST aus inclusion bodies wurden die Bakterienpellets wie in Kapitel 2.2.13 beschrieben behandelt. Das folgende SDS-Gel (Abbildung 17) zeigt die Proteinfractionen der Aufreinigung der CbHST.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 17:** SDS-Gel links: 1. Roti Mark<sup>®</sup> PLUS, 2. CbHST-Rohextrakt, 3. Elutionsfraktion nach der ersten His-Tag-Aufreinigung, 4. größere Menge Elutionsfraktion nach der ersten His-Tag-Aufreinigung, 5. inclusion bodies, SDS-Gel rechts: 1. Roti Mark<sup>®</sup> PLUS, 2. CbRAS ohne His-Tag aus der Waschfraktion nach der zweiten His-Tag-Aufreinigung.

Der durch Bakterienaufschluss gewonnene Proteinrohextrakt enthält neben dem gewünschten CbHST-Protein viele bakterielle Proteine (siehe Abbildung 17 links). Eine Überexpression der CbHST ist nicht zu erkennen. Durch Aufreinigung über His-Tag-Affinitätschromatographie kann die CbHST deutlich angereichert und aufgereinigt werden. Trotzdem sind noch Verunreinigungen durch histidinreiche Bakterienproteine vorhanden. Eine Ablagerung der CbHST als unlösliche inclusion bodies ist nicht zu erkennen.

Um die CbHST bis zur apparenten Homogenität aufzureinigen, wurde der His-Tag durch proteolytische Spaltung an der Thrombin-Schnittstelle entfernt und ein zweiter Nickelaffinitätschromatographieschritt durchgeführt. Der Durchlauf mit CbHST-Protein ohne His-Tag in sehr sauberer Qualität wurde aufgesammelt. Das Reinigungsergebnis ist in Abbildung 17 rechts ersichtlich.

### 3.2. Diskussion zur Klonierung einer CbHST

*Coleus blumei* ist bekannt für die Akkumulation von Rosmarinsäure, während Chlorogensäure in dieser Pflanze in eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.9.1). Berger et al. (2006) gelang es, die cDNA der CbRAS (Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase) zu klonieren. Die CbRAS wird als das charakteristische Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese beschrieben. Sie überträgt die CoA-aktivierten Säuren *p*-Cumar- und Kaffeesäure auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat, nicht aber auf Shikimat oder Chinat. Daher unterscheidet sich die CbRAS von anderen Hydroxycinnamoyltransferasen wie z.B. der Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Nicotiana tabacum*, die Shikimat und Chinat als Akzeptorsubstrate verwenden. Hydroxycinnamoyltransferasen, deren bevorzugter Akzeptor Shikimisäure ist (HST), sind vermutlich an der Ligninbiosynthese beteiligt (Hoffmann et al. 2003, Hoffmann et al. 2004). Hydroxycinnamoyltransferasen, die CoA-aktivierte Säuren am effektivsten auf Chinasäure übertragen, sind für die Chlorogensäurebiosynthese essentiell (Niggeweg et al. 2004). Da *Coleus blumei* keine Chlorogensäure akkumuliert, ist die Anwesenheit einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase nicht zu erwarten. Lignin ist unter den landlebenden Pflanzen ubiquitär verbreitet. Daher muss sich die Ligninbiosynthese evolutionär früh entwickelt haben. Martone et al. (2009) identifizierten Lignin sogar in Rotalgen der Art *Calliarthron cheliosporioides*. Als spezifisches Enzym der Ligninbiosynthese sollte die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST) in *Coleus blumei* vorhanden sein.

Mit der Klonierung der CbHST-cDNA (Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase) steht die zweite Hydroxycinnamoyltransferase aus *Coleus blumei* zur Verfügung, die alle Merkmale der BAHD-Acyltransferasen aufweist. Dazu zählt, dass das Protein aus 427 Aminosäuren aufgebaut ist und die konservierten Motive HxxxD und DFGWG zu finden sind. Die höchsten Aminosäuresequenzidentitäten von über 80% (siehe Kapitel 3.1.8) wurden zu Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat-/Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen aus anderen Pflanzenarten gefunden. Die Sequenzidentität der CbHST zur CbRAS ist mit 53% deutlich geringer. Identische oder ähnliche Aminosäuren sind über die gesamte Sequenzlänge von RAS und HCSQTs zu finden (Abbildung 18). Alle betrachteten Enzyme bestehen aus 427 bis 436 Aminosäuren. Interessanterweise sind die Sequenzen der Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Nicotiana tabacum* und *Lycopersicon esculentum* (Q70G33, Q70G32) am N-Terminus um 6 Aminosäuren verlängert. Die konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind von unterschiedlichen Aminosäuren umrahmt. Bei der CbRAS und der MoRAS aus *Melissa*





## *Ergebnisse und Diskussion*

Hydroxyzimtsäuren nur auf D-Hydroxyphenyllactate, während die CbHST spezifisch für Shikimat ist. Die Coexistenz der CbRAS und der CbHST in einer Pflanze und die ausgesprochen hohe Substratspezifität deuten darauf hin, dass die CbRAS ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese und die CbHST ein spezifisches Enzym der Monolignolbiosynthese ist. Die unterschiedlichen Substratspezifitäten der CbRAS und der CbHST im Vergleich zu anderen RAS und HCSQTs sind in Kapitel 3.6.1 detailliert beschrieben.

Mit der Klonierung der CbHST-cDNA und der heterologen Expression als funktionelles Enzym ist der Grundstein für die Untersuchung von biochemischen und strukturellen Unterschieden von HCTs aus Lamiaceae gelegt.

Es konnte ein schonendes Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, bei dem die CbHST über zwei Affinitätschromatographieschritte unter Abspaltung des His-Tags ohne Funktionsverlust bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden kann, was eine Voraussetzung für Kristallisationsexperimente ist.

Allerdings wurde die CbHST mit dem verwendeten Expressionssystem nicht ausreichend überexprimiert. Während die CbRAS unter denselben Bedingungen in großer Menge als unlösliche inclusion bodies abgelagert wird, befindet sich die CbHST hauptsächlich als lösliches Protein im Rohextrakt. Aus 1 l Bakterienkultur kann höchstens 1 mg Protein aufgereinigt werden; eine Menge, die für biochemische Untersuchungen ausreichend ist. Um reproduzierbar und effizient große Mengen an Protein für Kristallisationsversuche aufzureinigen zu können, müssen die Expressionsbedingungen weiter optimiert werden. Dabei könnte schon ein Wechsel des Kulturmediums, z.B. auf TB-Medium erfolgreich sein. Da die CbHST-Proteinmenge durch Standardversuche zur Expressionsoptimierung nicht wesentlich zu erhöhen ist, könnte aber auch ein Wechsel des Expressionsvektors oder des Expressionsstamms unumgänglich sein. Die Transformation des *E. coli* Stamms Rosetta 2, der tRNAs für seltene Codons bereitstellt, scheint zur Verbesserung der Proteinbiosynthese sinnvoll zu sein, da die mRNA der CbHST 38 Codons für seltene *E. coli*-tRNAs enthält, die mRNA der CbRAS hingegen nur 25.

### **3.3. Ergebnisse zur Expression und Aufreinigung der CbRAS zur Herstellung von CbRAS-Proteinkristallen**

Im Folgenden werden verschiedene Expressions- und Aufreinigungsmöglichkeiten für das CbRAS-Protein beschrieben. Versuchsbedingungen, die zum Aktivitätsverlust oder der amorphen Aggregation des heterolog exprimierten Proteins führen, werden geschildert. Am Ende des Kapitels sind zwei unterschiedliche, optimierte Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung von hochaufgereinigter CbRAS, sowie die Bedingungen, die zur Bildung von kleinen vermeintlichen CbRAS-Proteinkristallen führten, dargelegt.

#### **3.3.1. Expression der CbRAS**

Wurde die CbRAS unter Standardbedingungen exprimiert (siehe Kapitel 2.2.1), so konnte RAS-Aktivität gemessen werden. Allerdings war die synthetisierte Proteinmenge so gering, dass aus der Aufarbeitung von 100 ml Bakterienkultur nicht genügend Protein aufgereinigt werden konnte, um es nach His-Tag-Aufreinigung und Aufkonzentrierung auf einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Im Rohextrakt konnte im Vergleich der nicht-induzierten zur induzierten Kultur und zur Negativkontrolle mit leerem Vektor keine Bande mit entsprechender Größe identifiziert werden. Bei der Negativkontrolle konnte keine RAS-Aktivität nachgewiesen werden.

Da große Mengen des hochaufgereinigten Proteins für Versuche zur Strukturaufklärung benötigt werden, wurde zunächst die Expression optimiert. Nach erfolgreicher Expression ausreichender Mengen an CbRAS sollte ein reproduzierbares Reinigungsverfahren entwickelt werden.

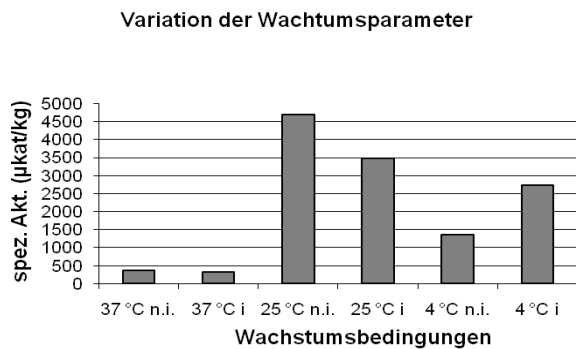
#### **3.3.2. Optimierung der Expression**

Zunächst wurden die Standardbedingungen durch Variation der Wachstumszeit nach Induktion variiert (siehe Kapitel 2.2.2). Auch nach Ernte der Bakterienkulturen sofort nach Induktion, nach 3, 4, 5 und 6 Stunden konnte trotz deutlicher Enzymaktivität keine CbRAS-Bande durch SDS-PAGE sichtbar gemacht werden.



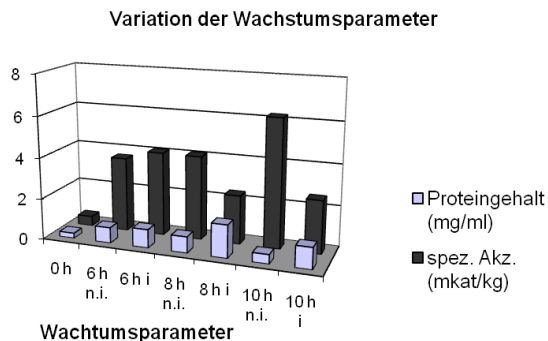
## Ergebnisse und Diskussion

Daraufhin wurde die Temperatur variiert, bei der die Bakterien nach Induktion kultiviert wurden. Es ist bekannt, dass das Wachstum bei 37 °C bei manchen Proteinen zur Bildung von inclusion bodies führt, wohingegen die Inkubation bei niedrigeren Temperaturen die Bildung löslichen Proteins fördert (pET-Manual S. 56). Die höchste spezifische Aktivität der CbRAS wurde beim Wachstum der nicht-induzierten Kultur auf dem 25 °C-Schüttler verzeichnet (Abbildung 19). Die Kultur, die nach Induktion mit IPTG bei 4 °C inkubiert wurde, wies ebenfalls eine erhöhte spezifische Aktivität im Vergleich zur Standardkultur bei 37 °C auf.



**Abbildung 19:** Vergleich der spezifischen RAS-Aktivitäten in den bakteriellen Rohextrakten. Die Bakterienkulturen wurden bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen kultiviert. 37 °C: Wachstum für 5 h bei 37 °C, 25 °C: Wachstum für 8 h bei 25 °C, 4 °C: Wachstum für 96 h. bei 4 °C, n.i.: nicht induzierte Kontrollkultur, i: mit 1 mM IPTG induzierte Kultur.

Ein weiterer Versuch zur Optimierung der Expression bei 25 °C und Ernte zu unterschiedlichen Zeiten führte zu dem Ergebnis, dass bei den induzierten Proben zwar mehr lösliches Protein gebildet wurde als bei den nicht-induzierten. Die spezifische Aktivität war in den nicht-induzierten Proben im Vergleich zu den induzierten erhöht (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Optimierung der Expression durch Variation der IPTG-Konzentration und des Erntezeitpunkts nach Induktion. In den nicht-induzierten Proben (n.i.) ist die spezifische Aktivität im Vergleich zu den induzierten Proben (i) erhöht. Bakterienwachstum für 0 h, 6 h, 8 h und 10 h nach Induktion bei 25 °C.

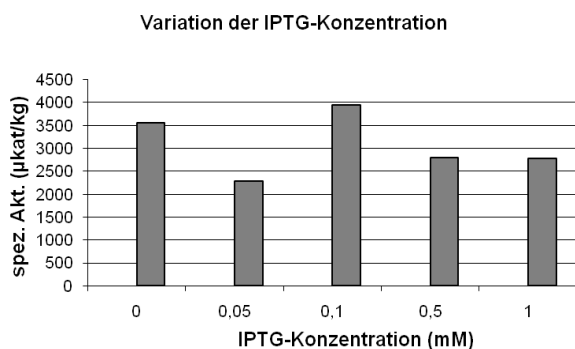
## Ergebnisse und Diskussion

Die Tatsache, dass mehr CbRAS-Protein bei niedriger Temperatur und niedrigem Expressionslevel gebildet wird, ließ die Ablagerung der CbRAS als unlösliche inclusion bodies vermuten. Daraufhin sollte der Anteil an löslicher RAS im Rohextrakt durch Zugabe eines Detergens erhöht werden. Zwar war die Proteinkonzentration in den Rohextrakten durch Detergenzienzugabe erhöht (1,6 mg/ml mit Detergens, 1,1 mg/ml ohne Detergens), jedoch war die gemessene spezifische Aktivität durch das Detergens erniedrigt worden (2670  $\mu$ kat/kg mit Detergens, 3452  $\mu$ kat/kg ohne Detergens). In Standardenzymtests (siehe Kapitel 2.4.4) mit und ohne Detergenzienzugabe (10  $\mu$ l Aufschlusspuffer mit Detergens im Enzymtest) konnte gezeigt werden, dass das Detergens die RAS-Aktivität hemmt. Die Konzentration des Zielproteins war immer noch zu gering, als dass eine Bande mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte.

Der His-Tag-Bindepuffer ist ein geeigneter Aufschlusspuffer. Die gemessenen Aktivitäten sind vergleichbar mit denen bei dem Aufschluss in 0,1 M KPi pH 7,0.

Wachstum der Hauptkultur ohne Induktion direkt nach Animpfen für 17 Stunden bei 25 °C führte zu zehnfach erhöhten spezifischen Aktivitäten im Vergleich zum Wachstum bis zur OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 37 °C und anschließender Inkubation bei 25 °C für 10 Stunden. Werden die Rohextrakte mittels SDS-PAGE analysiert, ist eine schwache, aber überexprimierte RAS-Bande identifizierbar.

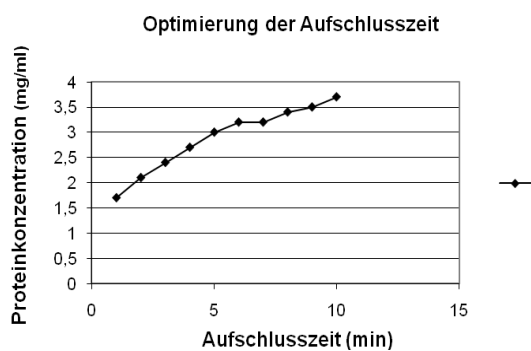
Zur Optimierung der Expression über die Steuerung des Expressionslevels wurde die IPTG-Zugabe variiert. Es wurden die bis dato optimierten Wachstumsbedingungen bei 25 °C weiter verbessert. Die Induktion mit 0,1 mM IPTG führte im Vergleich zur höchsten spezifischen Aktivität im Rohextrakt (siehe Abbildung 21). Die spezifische Aktivität im Proteinrohextrakt der nicht induzierten Probe war jedoch ähnlich hoch.



**Abbildung 21:** Vergleich der spezifischen RAS-Aktivitäten in den Rohextrakten. Die Bakterienkulturen wurden mit unterschiedlichen IPTG-Mengen induziert. Die spezifische Aktivität (spez. Akt.) im Rohextrakt ist bei einer Zugabe von 0,1 mM am größten.

## Ergebnisse und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die standardmäßig verwendete Aufschlusszeit von 1 min nicht zu einer vollständigen Zerstörung der Bakterien führt. Im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 22) ist zu erkennen, dass die Proteinkonzentration mit der Aufschlusszeit ansteigt und sich asymptotisch einem Maximalwert annähert. Da befürchtet wurde, dass das Enzym durch lange Ultraschallbehandlung Schaden nimmt, wurde nach jeder Minute Aufschluss zentrifugiert, der Überstand gewonnen und nach Resuspendieren der Bakterien mit dem entsprechenden Puffer ein weiterer Aufschluss unter Standardbedingungen angeschlossen. Dieser Aufschlusszyklus konnte bis zu zehnmal wiederholt werden.



**Abbildung 22:** Variation der Aufschlusszeit. Nach jeder Minute Aufschluss wurde eine Probe gezogen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Mit einem Wechsel des *E. coli*-Stammes von BL21(DE3)pLysS zu BL21 konnte keine ausreichende Überexpression der CbRAS erreicht werden. Daher wurde mit dem erstgenannten Stamm weitergearbeitet.

### 3.3.3. Aufreinigung des exprimierten Proteins

Obwohl der Proteinanteil der CbRAS im Rohextrakt auch nach Optimierung der Expression noch relativ gering war, konnte ein Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, mit dem ausreichende Mengen an aktiver RAS für Kristallisationsversuche hergestellt werden können. Es werden zunächst die Teilergebnisse beschrieben. Im Anschluss wird das Herstellungsprotokoll zur Gewinnung und Aufarbeitung von CbRAS aus dem Rohextrakt detailliert beschrieben.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.3.4. His-Tag-Aufreinigung

Die Aufreinigung der CbRAS aus dem Proteinrohextrakt über His-Tag Affinitätschromatographie (Kapitel 2.2.3) erwies sich als effektive Methode zur Anreicherung sowie Aufkonzentrierung des Enzyms. Auf dem SDS-Gel in Abbildung 24 Bahn 4 ist ein guter Reinigungseffekt zu erkennen. Lediglich die für *E. coli* typischen Verunreinigungen mit histidinreichen Bakterienproteinen sind zu erkennen.

Die vom Hersteller angegebenen Versuchsbedingungen brachten das beste Reinigungsergebnis.

### 3.3.5. Umpuffern der Elutionsfraktionen über PD10-Säulen

Wird die CbRAS über PD10-Säulen umpuffert (siehe Kapitel 2.2.4), so ist ein Verlust der spezifischen Aktivität von bis zu 70% zu verzeichnen. Daher kann diese schnelle Methode für die Reinigung der CbRAS nicht verwendet werden.

### 3.3.6. Umpuffern und Aufkonzentrierung über Dialyse

Da während des gesamten Aufreinigungsprozesses mehrere Pufferwechsel nötig waren, wurde auf ein schonenderes, wenn auch zeitaufwändiges Verfahren gewechselt. Der Dialysevorgang hatte keinen Effekt auf die spezifische Aktivität der CbRAS. Daher ist sie eine geeignete Methode.

Bei der Aufkonzentrierung der CbRAS fiel auf, dass sie sehr leicht als weißes amorphes Präzipitat ausfiel mit der Folge, dass die verbleibende Restlösung nur noch einen Proteingehalt von 0,5-1 mg/ml aufwies. Dies führte immer wieder zu großen Enzymverlusten während der Aufarbeitung.

Es wurde nach einem Puffer gesucht, in dem die CbRAS bis zu einer Konzentration von 5-10 mg/ml aufkonzentriert werden konnte. Vier verschiedene Puffersysteme, die sich sowohl im pH-Wert als auch in der Ionenstärke unterscheiden, wurden untersucht. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst:

## *Ergebnisse und Diskussion*

<b>Puffersystem</b>	<b>Maximale Aufkonzentrierung</b>
0,1 M KPi pH 7,0	1 mg/ml
50 mM Tris/HCl pH 8,0	3,9 mg/ml
50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl	2,9 mg/ml
20 mM Tris/HCl pH 7,5	7,3 mg/ml

In dem ohnehin für die Kristallisation ungeeigneten Phosphatpuffer präzipitierte die CbRAS schon ab einer Konzentration von 1 mg/ml. Vergleicht man die beiden 50 mM Tris/HCl-Puffer, ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Ionenstärke die Löslichkeit des Proteins herabsetzt. Mit dem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 konnte ein geeigneter Puffer zur Aufkonzentrierung der CbRAS gefunden werden.

### 3.3.7. Reinigung des Proteins über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Es war von Interesse, ob die wenigen Verunreinigungen der CbRAS nach der His-Tag-Aufreinigung durch die schnelle und kostengünstige Fällung mit Ammoniumsulfat (Kapitel 2.2.11) entfernt werden können. Dazu wurde die CbRAS unter den von Meinhard (1995) zur Aufreinigung der nativen RAS aus *Coleus*-Suspensionskulturen beschriebenen Bedingungen gefällt.

Allerdings weisen die heterolog exprimierte CbRAS und die native RAS unterschiedliche Fällungseigenschaften auf. RAS-Aktivität wurde nicht nur in der bei 80% Sättigung an Ammoniumsulfat ausgefallten Fraktion, sondern in beiden Fällungen, aber nicht im Überstand, gemessen. Da die Untersuchung der Fraktionen über SDS-PAGE in beiden Fraktionen die CbRAS-Bande und ihre Verunreinigungen nachwies, wurde diese Methode als ungeeignet betrachtet.

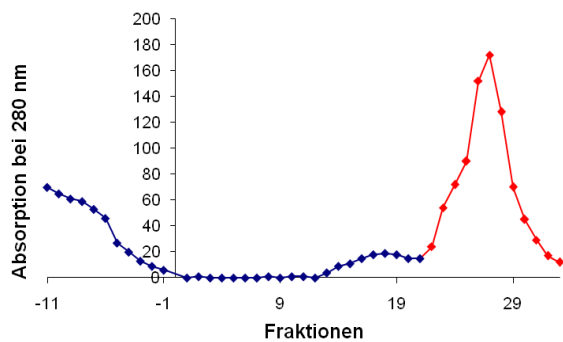
### 3.3.8. Reinigung des Proteins über TSK AF-Blue Affinitätschromatographie

Da die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung nicht den gewünschten Erfolg brachte, kam zur Feinreinigung der CbRAS ein weiterer Affinitätschromatographieschritt zur Anwendung (Kapitel 2.2.12). Diese Methode war zwar ebenfalls von Meinhard (1995) beschrieben worden, doch musste das Verfahren an die veränderten Eigenschaften der heterolog

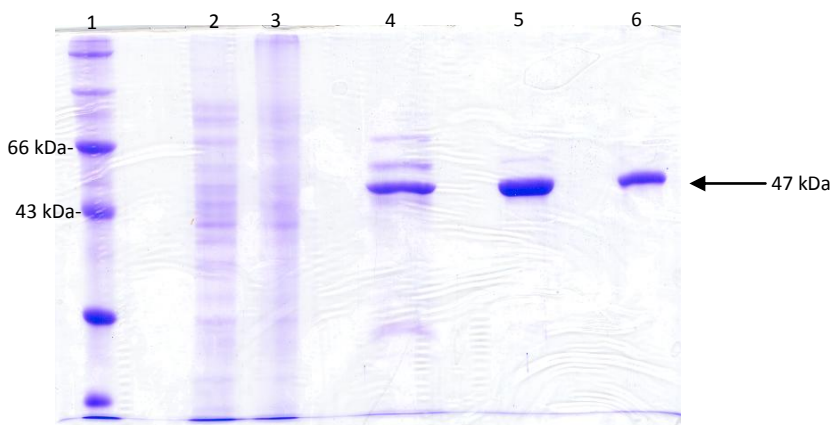
## Ergebnisse und Diskussion

exprimierten CbRAS und an deren Verunreinigungen durch bakterielle Proteine adaptiert werden. Im Falle von Meinhard waren die endogenen Verunreinigungen pflanzlicher Natur gewesen.

Die heterolog exprimierte CbRAS bindet vollständig an das Säulenmaterial. Im Durchlauf kann keine RAS-Aktivität festgestellt werden. Die RAS wird erst mit 95 bis 100% Puffer B eluiert. Da die meisten Verunreinigungen gar nicht an das Säulenmaterial binden, hat es sich als sinnvoll erwiesen, so lange mit Puffer A zu spülen, bis die Absorption wieder ihren Ausgangswert erreicht hat. Eines der bakteriellen Proteine bindet ebenfalls sehr gut an das Säulenmaterial und wird dementsprechend mit hohen KCl-Konzentrationen im Fließmittel eluiert (siehe Abbildung 23, Fraktionen 12 bis 21). Daher müssen die Fraktionen 22 und 23 (5% Puffer A/95% Puffer B) beim optimierten Programm verworfen werden. In diesen Fraktionen ist schon RAS-Aktivität messbar. In Abbildung 23 ist die Absorptionskurve, so wie sie im weiter unten beschriebenen optimierten Programm (siehe Kapitel 3.3.9) erhalten wird, zu sehen. Abbildung 24 zeigt die aufgereinigte CbRAS nach SDS-PAGE.



**Abbildung 23:** Affinitätschromatographie an Fraktogel TSK AF-Blue; Flussrate 1 ml/min, Fraktionsgröße: 2 ml, optimiertes Programm; der Proteingehalt jeder Fraktion wurde bestimmt; die Fraktionen, in denen RAS-Aktivität messbar war, sind **rot** markiert; Fraktionen -11 bis -1: Durchlauf, isokratische Elution mit Puffer A, ab Fraktion +1: Programmstart; Fraktionen 22 und 23: 5% Puffer A/95% Puffer B, Fraktionen sind noch mit bakteriellem Protein verunreinigt; Fraktionen 24 bis 33: 100% Puffer B, gesammelte Elutionsfraktion der CbRAS.



**Abbildung 24:** SDS-Gel zur Aufreinigung der CbRAS aus dem Rohextrakt. 1: Roti® Mark Standard, 2: RAS-Rohextrakt 1, 2: RAS-Rohextrakt 2, 3: Elutionsfraktion der His-Tag-Aufreinigung, 4 und 5: Elutionsfraktion nach der Affinitätschromatographie an Fraktogel TSK AF-Blue → die CbRAS ist noch von einem Bakterienprotein verunreinigt, wenn ab Fraktion 22 aufgesammelt wird.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.3.9. Optimiertes Herstellungsprotokoll zur Gewinnung der CbRAS aus dem Proteinrohextrakt

Es konnte ein Expressions- und Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, bei dem die CbRAS aus dem Rohextrakt in ausreichender Menge aufgereinigt werden kann, um Experimente zur Proteinkristallisation durchzuführen. Das optimierte Herstellungsprotokoll sieht folgende Schritte vor:

#### 1. Expression

Aus vier Übernachtskulturen des Expressionsstamms *E. coli* BL21(DE3)pLysS, der das gewünschte Konstrukt aus CbRAS-Vollängensequenz in dem Vektor pET-15b enthält, werden fünf Hauptkulturen angeimpft. Bei jeder Hauptkultur wird so verfahren, dass 600 ml LB-Ampicillin-Medium mit 2 ml Übernachtskultur versetzt werden und die 5 2-l-Kolben bei 25 °C und 220 g geschüttelt werden. Die Induktion entfällt. Nach 25 Stunden werden die Kulturen geerntet. Dabei werden acht Bakterienpellets abzentrifugiert.

#### 2. Herstellung von CbRAS-Proteinrohextrakt

Die Bakteriensedimente werden nach Einfrieren zu Rohextrakten verarbeitet: Jedes 1,5 g schwere Pellet wird in 6 ml His-Tag-Bindepuffer resuspendiert. Es folgen Aufschluss und Zentrifugation unter Standardbedingungen. 48 ml Überstand 1 werden zum Rohextrakt vereinigt. Die acht Bakterienpellets werden erneut in jeweils 5 ml His-Tag-Bindepuffer resuspendiert. Nach dem Aufschluss werden jeweils zwei Suspensionen vereinigt und danach für 20 Minuten bei 4 °C und 10000 g sedimentiert. 40 ml Überstand werden zum Rohextrakt addiert. Die verbleibenden 4 Bakteriensedimente werden ein drittes Mal aufgeschlossen. Zu jedem Pellet werden 8 ml Bindepuffer gegeben. Nach Resuspendieren, Aufschluss und Zentrifugation werden weitere 32 ml Überstand erhalten. Dieser Vorgang wird noch dreimal wiederholt, so dass die Bakterienpellets insgesamt sechsmal aufgeschlossen werden und auch sechs Überstände erhalten werden, die alle zum Rohextrakt vereinigt werden. Beim vierten Aufschluss werden die vier Pellets nur noch in 5 ml Bindepuffer resuspendiert, so dass 32 ml Überstand gewonnen werden. Beim fünften Aufschluss werden die Bakteriensedimente in 4 ml Bindepuffer resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen vereinigt und aufgeschlossen. Nach Zentrifugation werden die verbleibenden 2 Bakteriensedimente mit jeweils 4 ml Puffer versetzt und erneut aufgeschlossen. 8 ml Überstand werden gewonnen.

Der in sechs hintereinandergeschalteten Vorgängen hergestellte Rohextrakt hat ein Volumen von 164 ml. Die gemessene Proteinkonzentration liegt bei 2,6 mg/ml.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3. Reinigung des Proteins über His-Tag-Affinitätschromatographie

Dieser Rohextrakt wird über 3 His-Tag-Säulchen, die mit jeweils 2 ml His-Bind-Resin gefüllt sind, aufgereinigt. Dazu wird jedes Säulchen mit 8 ml Rohextrakt versetzt und 45 bis 60 Minuten auf Eis geschüttelt. Dann werden die Rohextrakte abtropfen gelassen und als Durchlauf vereinigt. Die 3 Säulchen werden erneut mit Rohextrakt versetzt und geschüttelt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis sämtlicher Rohextrakt aufgebraucht ist. Alle Durchläufe werden vereinigt. Erst jetzt folgen zwei Waschschrte. Zunächst wird jedes Säulchen mit 4 ml Waschpuffer gewaschen, danach mit weiteren 2 ml. Zum Schluss wird jedes der drei Säulchen mit viermal 1 ml Elutionspuffer versetzt. Alle Elutionsfraktionen werden vereinigt. Dieses Vorgehen, bei dem auf Wasch- und Elutionsschritte verzichtet wird, erhöht den Reinheitsgrad der CbRAS in der Elutionsfraktion: je mehr RAS mit dem Säulenmaterial in Kontakt kommt, desto mehr unspezifisch gebundene Proteine werden von der Matrix verdrängt.

Das Eluat mit der über His-Tag aufgereinigten CbRAS wird wegen des hohen Imidazolgehaltes sofort in eine Dialysiermembran gefüllt und über Nacht gegen 1 l 20 mM Tris/HCl pH 7,5 bei 4 °C umgepuffert.

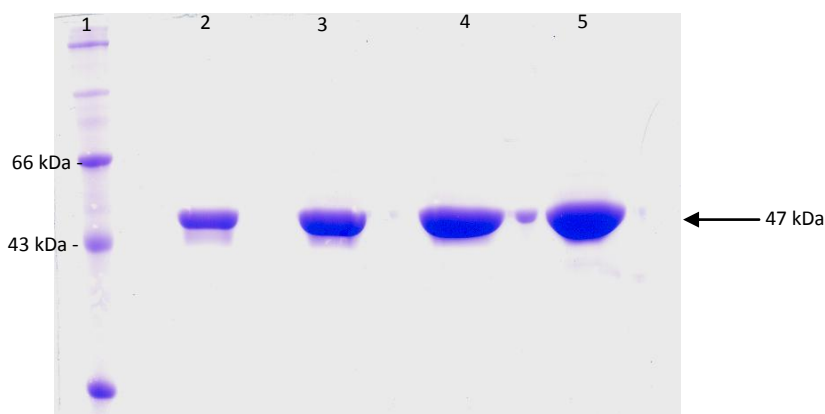
### 4. Feinreinigung des Proteins über TSK AF-Blue-Affinitätschromatographie

Am nächsten Tag wird das umgepufferte Eluat mittels FPLC bis zur apparenten Homogenität gereinigt. 12,2 ml CbRAS-Lösung werden durch Aufsaugen auf eine TSK AF-Blue-Säule gegeben. Ungebundenes Protein wird durch isokratische Elution mit Puffer A bei einer Flussrate von 1,6 ml/min entfernt. Bei Rückkehr der Absorption zur Basislinie nach 1 h und 22 min wird das Programm gestartet (siehe Kapitel 2.2.12.). Dabei wird weitere 10 min bei 100% Puffer A gespült, dann folgt der lineare Gradient (siehe Kapitel 2.2.12). Hat der Elutionspuffer einen KCl-Gehalt von 900 mM erreicht, wird das Programm gestoppt, und es werden 4 ml dieses Puffers über die Säule gespült. Danach folgen 4 ml Elutionspuffer mit 950 mM KCl. Anschließend erfolgt die Elution der CbRAS mit Elutionspuffer B. Da die vorherigen Elutionsfraktionen noch verunreinigt sind, wird mit dem Auffangen erst ab 100% B begonnen. Es werden insgesamt 30 ml Eluat gesammelt. Da die CbRAS in Puffer B wegen des hohen Salzgehalts schnell an Aktivität verliert, wird sofort gegen 1,5 l 20 mM Tris/HCl pH 8,0 mit einem Zusatz von 0,02% Natriumazid über Nacht bei 4 °C dialysiert. Der Puffer wird am nächsten Tag gewechselt. Nach dem Umpuffern kann die aufgereinigte RAS mithilfe von Spectra Gel bis zu einer gewünschten Proteinkonzentration zwischen 5 und 8 mg/ml aufkonzentriert werden. Diese CbRAS-Proteinlösung ist hochrein und kann für Kristallisationsversuche verwendet werden.



## Ergebnisse und Diskussion

Auf dem unten abgebildeten SDS-Gel (Abbildung 25) ist zu erkennen, dass die CbRAS aus dem Rohextrakt bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden kann.



**Abbildung 25:** SDS-Gel der bis zur apparenten Homogenität aufgereinigten CbRAS. 1: Roti<sup>®</sup>Mark Standard, 3-5: unterschiedliche Volumina zu apparenten Homogenität aufgereinigte CbRAS.

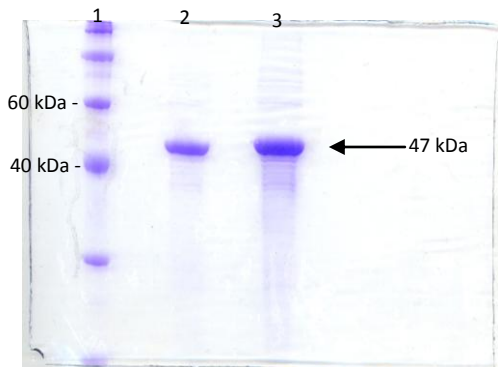
Mit diesem Herstellungsprotokoll können aus 3 l Bakterienkultur 3 mg aufgereinigte CbRAS gewonnen werden.

### 3.3.10. Gewinnung der CbRAS aus inclusion bodies

Nachdem die Versuche zur Optimierung der CbRAS-Expression Hinweise für die Ablagerung der CbRAS als inclusion bodies lieferten und die Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine aus diesen Aggregaten viele Vorteile bieten könnte, wurden Versuche zur Isolierung von CbRAS inclusion bodies (Kapitel 2.2.13) durchgeführt. Tatsächlich liegt die CbRAS in den Bakterien vorwiegend als unlöslicher Rückstand vor. Dies ist in Abbildung 26 zu erkennen. Während lösliche CbRAS im Rohextrakt nur in Spuren zu finden ist, befindet sich das überexprimierte Protein fast vollständig in unlöslicher Form in den Zellen.

Werden die CbRAS inclusion bodies nach Herstellerangaben (Protein Refolding Kit, Novagen) isoliert, so können aus 250 ml Bakterienkultur 35 mg schwach verunreinigtes, aktives CbRAS Protein isoliert werden. Dass die Reinheit der inclusion bodies recht hoch ist, ist in Abbildung 26 zu erkennen.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 26:** SDS-Gel zur Isolierung der CbRAS aus inclusion bodies. 1: RotiMark® PLUS, 2 und 3: CbRAS aus inclusion bodies.

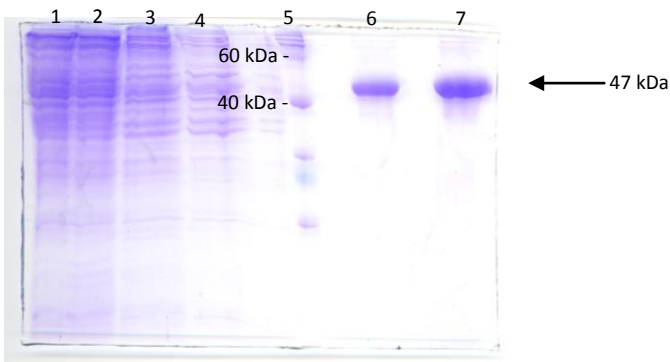
Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, die CbRAS aus inclusion bodies weiter über His-Tag Affinitätschromatographie zu reinigen und eine FPLC zur Feinreinigung anzuschließen.

Bei wiederholter Isolation der CbRAS inclusion bodies aus Pellets derselben Charge mit denselben Puffern und exakt denselben Versuchsbedingungen fiel auf, dass die CbRAS nach dem Protein Refolding nicht immer aktiv war. Es konnte kein Parameter ausfindig gemacht werden, der dafür verantwortlich sein könnte, dass das Protein Refolding manchmal in aktiver CbRAS resultiert und manchmal in inaktiver.

### 3.3.11. Optimiertes Herstellungsprotokoll zur Gewinnung der CbRAS aus inclusion bodies

Durch Optimierung des Herstellungsprozesses konnte eine Methode entwickelt werden, bei der der Reinheitsgrad der CbRAS aus inclusion bodies so hoch ist, dass weitere Aufreinigungsschritte entfallen (Abbildung 27 Bahn 6 und 7). Werden die Bakterienpellets wie im Methodenteil beschrieben zweimal aufgeschlossen und wird zweimal gewaschen, so ist der CbRAS-Anteil in der Proteinlösung nach dem Protein Refolding erhöht. Dieses Ergebnis ist anhand des SDS-Gels in Abbildung 27 ersichtlich.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 27:** SDS-Gel: verschiedene Fraktionen bei der Herstellung der CbRAS aus inclusion bodies. 1: Rohextrakt (Proteingehalt 1,6 mg/ml) nach dem ersten Aufschluss: viele bakterielle Proteine sind in Lösung, die CbRAS ist im Rohextrakt unterrepräsentiert. 2: Rohextrakt nach dem zweiten Aufschluss: zwar ist die Proteinkonzentration deutlich erniedrigt (0,6 mg/ml), doch können weitere Verunreinigungen entfernt werden 3: Waschfraktion 1 (0,4 mg/ml) 4. Waschfraktion 2 (0,1 mg/ml), 5: RotiMark® PLUS, 6 und 7: aufgereinigte CbRAS aus inclusion bodies

Wird die Anzahl der Aufschlüsse auf drei erhöht und zusätzlich vier Waschschrte durchgeführt, ist der Reinheitsgrad der rückgelösten CbRAS aus inclusion bodies hoch genug, um direkt Kristallisationsversuche mit der aufkonzentrierten Enzymlösung durchzuführen. Es wurde beobachtet, dass nach dem 3. Waschschrte ein rein weißes Sediment vorliegt.

Aus 300 ml Bakterienkultur können unter optimierten Bedingungen 132 mg reines CbRAS-Protein unter sehr geringem Zeit- und Materialaufwand gewonnen werden.

### 3.3.12. Kristallisation der CbRAS

Nachdem ausreichende Mengen an hochaufgereinigter und hochkonzentrierter CbRAS-Lösung hergestellt waren, wurden Versuche zur Kristallisation (Kapitel 2.2.16) durchgeführt. Nach 14 Monaten bei 10 °C konnten unter einer Variante des Wizard I Screens No 2 (100 mM HEPES, 1% Isopropanol, pH 7,5) kleine dreidimensionale Kristalle identifiziert werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Proteinkristalle handelt. Die verwendete CbRAS war aus dem Rohextrakt aufgereinigt worden, ohne dass der His-Tag abgespalten worden war und lag in einer Endkonzentration von 7,5 mg/ml vor. 1 µl dieser Enzymlösung wurden im sitting drop Verfahren mit 1 µl Kristallisationspuffer vermischt und die Platten bei 10 °C gelagert. Diese Kristalle wurden als Kristallisationskeime verwendet. Dabei wurde die gefundene Bedingung identisch wiederholt und zusätzlich weiter variiert. Allerdings wuchsen bislang keine weiteren Kristalle heran.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.3.13. Abspaltung des His-Tags

Es besteht die Möglichkeit, dass die CbRAS nicht als Fusionsprotein auskristallisieren kann, weil der His-Tag den Kristallisationsprozess stört. Daher wurde der His-Tag abgespalten (Kapitel 2.2.14).

Wird über His-Tag-Affinitätschromatographie vorgereinigtes Fusionsprotein wie im Protokoll vorgesehen in 1 x Cleavage Buffer umgepuffert, so fällt die CbRAS ab einer Konzentration von etwa 1 mg/ml als weißes amorphes Präzipitat aus. Die Erniedrigung der Pufferkonzentration verbessert zwar die Löslichkeit der CbRAS und vermindert auch nicht die Reaktionsgeschwindigkeit, doch fällt das Enzym spätestens bei der Zugabe zur Thrombin-Agarosematrix aus. Der Proteinverlust beträgt ca. 50%. Erst wenn zur Proteolysereaktion 10% DMSO addiert wird, kann die CbRAS in Lösung gehalten werden. Auf einem SDS-Gel konnte gezeigt werden, dass die Proteolysereaktion in Anwesenheit von DMSO nach 72 Stunden bei 25 °C unter Schütteln nahezu abgeschlossen ist. Um restliches Fusionsprotein und den abgespaltenen His-Tag zu entfernen, wird der Durchfluss aufgefangen und sofort in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 umgepuffert. In Aktivitätstests kann nachgewiesen werden, dass die Inkubation der CbRAS für mehrere Tage bei 25 °C keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Soll die CbRAS ohne His-Tag in Kristallisationsversuchen eingesetzt werden, muss sie über einen weiteren Affinitätschromatographieschritt an TSK AF-Blue gereinigt werden. Die Affinität der CbRAS ohne His-Tag hat sich im Vergleich zum Fusionsprotein nicht geändert. Daher ist das optimierte FPLC-Programm eine geeignete Methode.

### 3.3.14. Stabilität der CbRAS

Während der Aufreinigung der CbRAS entstanden regelmäßig Situationen, die zum Aktivitätsverlust der CbRAS führten. Zunächst fiel auf, dass die CbRAS beim Kontakt mit vielen Oberflächen und v.a. mit Säulenmaterialien ausfällt. Beim Umpuffern über PD10-Säulchen verliert die CbRAS 70% ihrer Aktivität. Kommt das Enzym in Kontakt mit Thrombin-Agarose, fällt es als amorphes Präzipitat aus. Bei Lagerung der Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml im Eppendorfgefäß bei 4 °C ohne DMSO-Zusatz ist nach

## *Ergebnisse und Diskussion*

mehreren Tagen ein Niederschlag zu sehen. Zusatz von 10% DMSO zur RAS-Lösung verhindert das Ausfallen des Proteins (siehe Kapitel 2.2.15).

Außerdem fiel auf, dass das Enzym an Aktivität verlor, wenn es in salzhaltigen Puffern gelöst war. Dazu zählen neben dem His-Tag-Elutionspuffer und dem Elutionspuffer bei der Affinitätschromatographie an TSK AF-Blue auch der 1 X Dialysis Buffer wie er bei dem Thrombin CleanCleave™ Kit vorgesehen ist.

Wird die CbRAS über 24 Stunden in His-Tag-Bindepuffer gelagert, so weist sie 100% Aktivität bei 4 °C und -20 °C-Lagerung auf. Wurde sie in His-Tag-Bindepuffer bei -80 °C gelagert, wurde Aktivitätsverlust beobachtet (85%). Die Lagerung in His-Tag-Elutionspuffer zeigt, dass hohe Salz- bzw. Ionenkonzentrationen die CbRAS-Aktivität negativ beeinflussen. Nach 24 h bei 4 °C hat sie nur noch 93% ihrer ursprünglichen Aktivität, Einfrieren bei -20 °C und -80 °C führt zum totalen Aktivitätsverlust. In Cleavage-Buffer ohne CaCl<sub>2</sub> gelagert, besitzt sie nach 24 h bei 4 °C noch 82% ihrer Aktivität, bei -20 °C noch 49% und bei -80 °C noch 44% ihrer Aktivität.

In 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit einem Zusatz von 10% DMSO kann das Enzym ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Auch die Lagerung für 1 h bei 30 °C hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

### 3.3.15. Expression der CbRAS als GST-Fusionsprotein

Die CbRAS konnte im pET-15b System, wie es von Berger et al. (2006) etabliert worden war, als 6xHis-Fusionsprotein heterolog exprimiert werden. Da sich in den Versuchen zur Expression und Aufreinigung der CbRAS (siehe Kapitel 3.3.1) herausstellte, dass die schlechte Löslichkeit der CbRAS ein Hindernis für die Kristallisationsversuche (siehe Kapitel 3.3.9) darstellt, sollte die CbRAS als gut lösliches GST-Fusionsprotein synthetisiert werden. Eine Überexpression als lösliche CbRAS war das Ziel. Nur so kann ein effektives und reproduzierbares Aufreinigungsverfahren etabliert werden.

An die CbRAS-Vollängensequenz konnte in einer Polymerasekettenreaktion mithilfe der Primer eine *Nco*I-Schnittstelle vorne und eine *Bam*HI-Schnittstelle hinten angehängt werden. Über diese Schnittstellen konnte die CbRAS-Vollängensequenz erfolgreich in den Vektor pET-41a ligiert und letztendlich in den *E. coli* Stamm BL 21(DE3)pLysS eingebracht werden.

Nachdem durch Sequenzanalyse sowohl die Nukleotidsequenz als auch ein durchgehendes Leseraster bestätigt werden konnten, wurde die CbRAS als Fusionsprotein mit N-terminalem

## *Ergebnisse und Diskussion*

His-Tag und GST-Tag exprimiert. In RAS-Enzymtests wurde gezeigt, dass die CbRAS trotz des 26 kDa großen GST-Tags aktiv ist. Enzymaktivität ist die Grundvoraussetzung für Kristallisation mit anschließender Strukturaufklärung. In Versuchen zur Optimierung der Expression stellte sich heraus, dass bei der Inkubation der Bakterien für 7 Tage bei 4 °C die Ausbeute an dem gewünschten Protein am größten ist. Durch SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass der Anteil an löslicher CbRAS im Rohextrakt durch den GST-Tag erhöht wird und das Zielprotein nicht als unlösliche inclusion bodies in den Bakterienzellen abgelagert werden. Die Löslichkeit der CbRAS wird durch den GST-Tag erhöht. Trotzdem ist die Überexpression nur schwach ausgeprägt. Aus 500 ml Bakterienkultur können 0,5 mg über His-Tag aufgereinigte Proteinfraction gewonnen werden, nach weiterer Aufreinigung über Glutathion-Sepharose verbleiben nur noch 0,1 mg hochaufgereinigtes Protein.

Da die CbRAS in den pET-41a Vektor umklont worden war, um sie in hoher Ausbeute mit GST-Tag aus dem Rohextrakt aufzureinigen zu können, und nun klar war, dass es zu keiner starken Überexpression an löslichem Protein kam, wurde dieses Projekt nicht weitergeführt.

### **3.4. Diskussion zur Expression und Aufreinigung der CbRAS und zur Herstellung von CbRAS-Proteinkristallen**

Noch bevor die für die CbRAS kodierende cDNA von Berger et al. (2006) isoliert werden konnte, wurde die erste Kristallstruktur einer BAHD-Acyltransferase veröffentlicht. Die Vinorinsynthase (RsVS) aus *Rauwolfia serpentina* ist eine Acetyl-CoA:16-Epivelloxin Acetyltransferase, die an der Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin beteiligt ist (Bayer et al. 2004). Kristalle der heterolog in *E. coli* überexprimierten RsVS wuchsen bei einer relativ hohen Temperatur von 32 °C und einer niedrigen Proteinkonzentrationen von 2 mg/ml mit Ammoniumsulfat und PEG 400 als Präzipitantien im hanging drop Verfahren (Ma et al. 2004). Diese einzigartigen Kristallisationsbedingungen wurden durch die eher ungewöhnliche Vorgehensweise des Kristallographen gefunden (Stöckigt und Panjikar 2007). Zwei weitere Bedingungen mussten für die erfolgreiche Kristallisation der RsVS erfüllt werden. Zum einen war das Aufreinigungsverfahren über drei aufeinander folgende Chromatographieschritte (His-Tag-Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie mit MonoQ, gefolgt von Sephacryl S-100), zum anderen die Abspaltung des His-Tags für das Kristallwachstum unerlässlich (Stöckigt und Panjikar 2007).

Durch die Strukturaufklärung der RsVS konnte ein Reaktionsmechanismus für den Acetyltransfer postulierte werden, bei dem das Histidin des HxxxD-Motivs als katalytische Base fungiert (Ma et al. 2004). Interessanterweise kann das DFGWG-Motiv nicht wie vermutet an der Substratbindung beteiligt sein (St. Pierre und De Luca 2000, Bayer et al. 2004), da es weit entfernt von aktiven Zentrum auf der Oberfläche des Proteins liegt (siehe Kapitel 3.8.1).

Die CbRAS sollte in dieser Arbeit kristallisiert und ihre Struktur röntgendiffraktometrisch aufgeklärt werden, um ihren Aufbau mit anderen BAHD-Acyltransferasen vergleichen zu können und Einblicke in die Evolution dieser Proteinsuperfamilie zu erhalten. Außerdem sollte die Kristallstruktur der CbRAS zum Verständnis des Reaktionsmechanismus und der teilweise recht hohen Substratspezifität von Hydroxycinnamoyltransferasen beitragen.

Mit der Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit dem Konstrukt aus CbRAS-cDNA in pET-15b stand ein leistungsstarkes Expressionssystem für die Synthese von CbRAS-Protein zur Verfügung (Berger et al. 2006). Allerdings waren weder die Expressionsbedingungen optimiert worden, noch war ein effizientes Aufreinigungsverfahren bekannt. Die Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens für die CbRAS wurde durch ihre ungünstigen physikalischen Eigenschaften (Aktivitätsverlust beim Einfrieren, Adsorption an Oberflächen, Bildung amorpher Niederschläge bei Kontakt mit salzhaltigen Puffern) erschwert, war aber letztlich erfolgreich.

## *Ergebnisse und Diskussion*

Wahrscheinlich wegen ihrer schlechten Löslichkeit in wässriger Umgebung wird die CbRAS bei heterologer Expression in *E. coli* kaum als lösliches Protein, sondern hauptsächlich als unlösliche inclusion bodies in den Bakterienzellen abgelagert.

Es konnten zwei unterschiedliche Verfahren erarbeitet werden, bei denen die CbRAS bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt wird. Bei dem ersten Verfahren wird die lösliche CbRAS aus dem Proteinrohextrakt durch zwei aufeinanderfolgende Affinitätschromatographieschritte (Ni-NTA, Fraktogel TSK AF-Blue) aufgereinigt. Bedingt durch den geringen CbRAS-Anteil im Rohextrakt können mit dieser Methode aus 300 ml Bakterienkultur nur 0,3 mg hochgereinigtes Protein gewonnen werden. Sollen für die Kristallisationsversuche Proteinmengen im höheren einstelligen mg-Bereich hergestellt werden, muss die Bakterienkulturmenge entsprechend erhöht werden, so dass die Gewinnung recht aufwändig und die Güte der Aufreinigung schwer reproduzierbar wird. Trotzdem bietet dieses Aufreinigungsverfahren zwei entscheidenden Vorteile: Zum einen ist Enzymaktivität garantiert, zum anderen konnten wahrscheinlich kleine CbRAS-Proteinkristalle aus Protein, das durch dieses Verfahren aufgereinigt worden war, erzielt werden. An dieser Stelle könnte in weiterführenden Kristallisationsversuchen angeknüpft werden.

Bei dem zweiten Verfahren wird die CbRAS in großen Mengen aus inclusion bodies aufgearbeitet. Aus 300 ml Bakterienkultur können reproduzierbar über 100 mg hochreine CbRAS gewonnen werden, ohne dass Affinitätschromatographieschritte durchgeführt werden müssen. Durch die hohe Proteinausbeute bei geringem Material- und Zeitaufwand scheint dies die Methode der Wahl zu sein. Da die CbRAS nicht immer in aktiver Form zurückgefaltet werden kann, ist auch hier keine Reproduzierbarkeit gewährleistet. Es kann nicht vorhergesagt werden, unter welchen Voraussetzungen die Rückfaltung zum funktionsfähigen Protein gelingt. Es scheint sich jedoch um einen eher zufälligen Prozess zu handeln, denn auch unter exakt denselben Versuchsbedingungen mit derselben Proteincharge und denselben Puffern kann die CbRAS aktiv oder inaktiv sein.

Die Gewinnung von CbRAS-Proteinkristallen, die röntgendiffraktometrisch vermessen werden können, war bislang nicht von Erfolg gekrönt. Zum einen war die Etablierung der Aufreinigungsverfahrens sehr zeitintensiv, zum anderen wuchsen erste kleine, dreidimensionale Kristalle erst nach 14 Monaten heran, so dass in Versuchen zur Variation dieser Kristallisationsbedingungen noch keine größeren Kristalle beobachtet werden konnten.



## *Ergebnisse und Diskussion*

Die optimierten Expressions- und Aufreinigungsverfahren sowie die detaillierte Beschreibung der physikalischen Eigenschaften der CbRAS sind als Grundstein für zukünftige Versuche zur Kristallisation der CbRAS anzusehen.

Dabei ist es wichtig zu beachten, dass die heterolog exprimierte CbRAS sehr empfindlich auf hohe Salzkonzentrationen reagiert und am stabilsten in niedrigmolaren Puffern mit einem pH-Wert um 7,5 ist. Möglicherweise sind die Kristallisationsbedingungen für dieses schwer lösliche Protein ebenso ungewöhnlich wie die der RsVS und niedrige Proteinkonzentrationen um 2 mg/ml reichen für die Kristallisation aus.

In Anlehnung an die Kristallisationsbedingungen, die bei der RsVS erfolgreich waren, wurde zusätzlich eine Methode zur Abspaltung des His-Tags mittels Thrombin erarbeitet. Vielleicht ist die Entfernung des His-Tags die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation der CbRAS.

Die physikalischen Eigenschaften und insbesondere die Löslichkeit der CbRAS wurden durch die Expression als GST-Fusionsprotein nicht deutlich verbessert. Selbst wenn die Löslichkeit der CbRAS durch andere Tags (z.B. Thioredoxin-Tag) verbessert werden kann, ist eine Abspaltung dieser vor den Kristallisationsversuchen wahrscheinlich essentiell. Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit des CbRAS-Proteins zu verbessern, ist die Mutation von unpolaren Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Welche Aminosäuren sich auf der Oberfläche der CbRAS befinden, kann zum heutigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Außerdem ist zu beachten, dass Mutationen die Struktur des gesamten Proteins und des aktiven Zentrums beeinflussen können, so dass biochemische Charakterisierungen zum Aktivitätsnachweis unerlässlich sind.

Führt die Kristallisation der RAS aus *Coleus blumei* auch weiterhin nicht zum Erfolg, kann die Strukturaufklärung einer heterolog exprimierten RAS aus einer anderen Pflanzenart versucht werden.

### 3.5. Ergebnisse zur biochemischen Charakterisierung der Hydroxycinnamoyltransferasen CbRAS und CbHST aus *Coleus blumei*

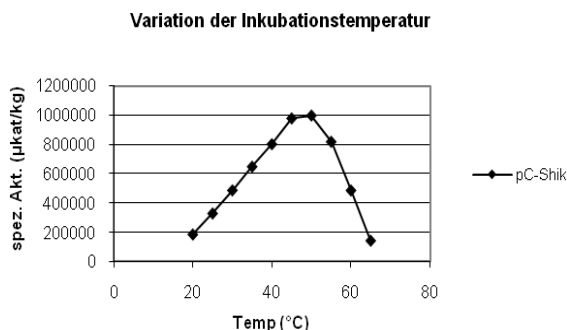
Sämtliche Enzymtests zur biochemischen Charakterisierung der CbHST und der CbRAS (Kapitel 2.4) wurden mit den über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten 6xHis-Fusionsproteinen durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die CbHST-Proteinfraction und in Abbildung 24 ist die aufgereinigte CbRAS zu sehen.

#### 3.5.1. Temperatur- und pH-Optimum

Die Substrate in den Enzymtests zur Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums der CbHST waren *p*-Cumaroyl-CoA und Shikimat. In den CbRAS-Enzymtests wurde die Substratkombination aus Caffeoyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat verwendet.

##### 3.5.1.1. Temperatur- und pH-Optimum der CbHST

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurden die Enzymaktivitäten in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 65 °C bestimmt. Obwohl das Temperaturoptimum der CbHST, wie in Abbildung 28 zu sehen ist, in einem Bereich um 45 °C liegt, wurden sämtliche Enzymtests bei 30 °C durchgeführt. Auf diese Weise sollte einer Denaturierung der Enzyme und Zersetzung von Substraten vorgebeugt werden.



**Abbildung 28:** Temperaturoptimum der CbHST

## Ergebnisse und Diskussion

In einem pH-Bereich von pH 2,8 bis pH 12 konnte in 0,5 M KPi-Puffern die höchste Enzymaktivität bei einem pH-Wert um 7,7 ermittelt werden. Da sowohl Enzyme als auch Substrate bei saurem oder basischen pH-Werten denaturieren können, wurden alle weiteren Enzymtests zur biochemischen Charakterisierung bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Abbildung 29 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der CbHST vom pH-Wert.

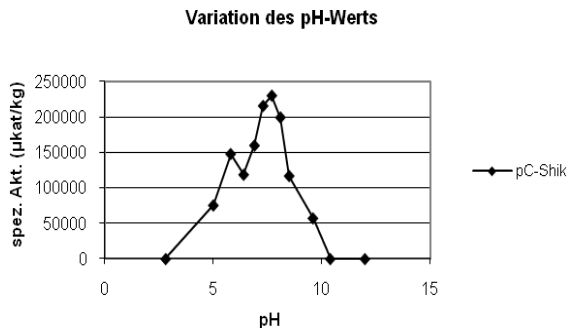


Abbildung 29: pH-Optimum der CbHST in 0,5 M KPi-Puffer

### 3.5.1.2. Temperatur- und pH-Optimum der CbRAS

Der His-Tag hat keinen Einfluss auf die optimale Reaktionstemperatur der heterolog exprimierten CbRAS. Es wurden die spezifischen Aktivitäten in einem Temperaturbereich zwischen 0° C und 70 °C gemessen. Sowohl für das 6xHis-Fusionsprotein, als auch für die CbRAS, deren His-Tag mit Hilfe von Thrombin abgespalten worden war, wurde in KPi-Puffer ein Temperaturoptimum um 40 °C bis 45 °C ermittelt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten beider Enzyme von der Inkubationstemperatur ist in Abbildung 30 und Abbildung 31 und dargestellt.

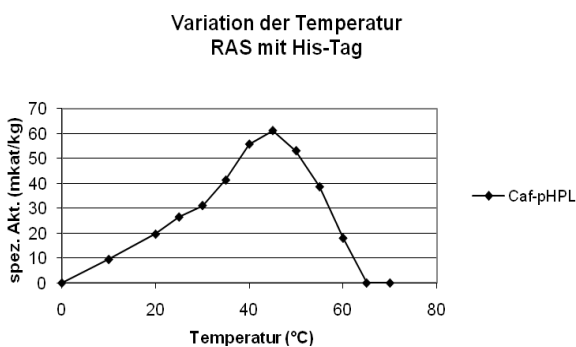
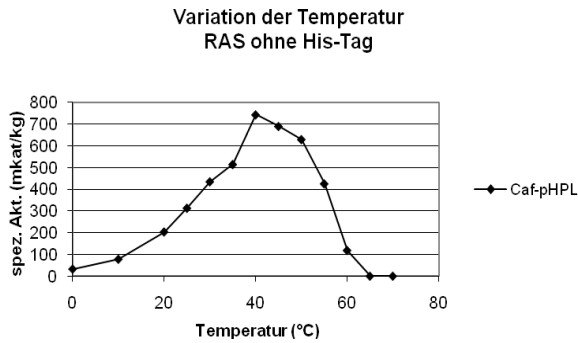


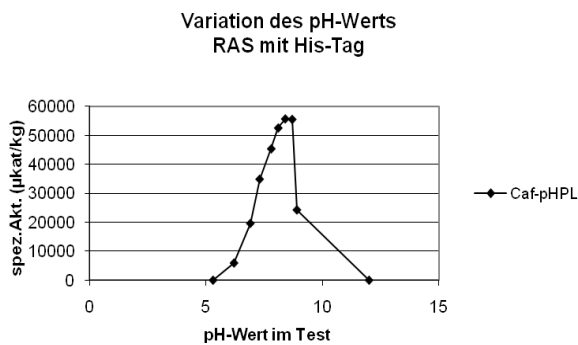
Abbildung 30: Temperaturoptimum der CbRAS mit His-Tag

## Ergebnisse und Diskussion

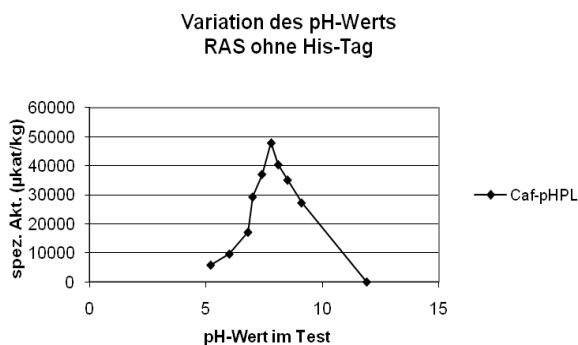


**Abbildung 31:** Temperaturoptimum der CbRAS ohne His-Tag

Zur Bestimmung des pH-Optimums der CbRAS wurden die spezifischen Aktivitäten in einem pH-Bereich von 5,2 bis 12 analysiert. Für das 6xHis-Fusionsprotein wurde ein pH-Optimum von 8,4, für die CbRAS ohne His-Tag von 7,8 ermittelt. Durch den His-Tag verschiebt sich das pH-Optimum der heterolog exprimierten CbRAS um 0,6 Einheiten ins Basische. Für das native Enzym aus Suspensionskulturen aus *Coleus blumei* wurde von Petersen (1991) ein pH-Optimum um 7,0 bis 7,5 bestimmt. Die graphischen Darstellungen der pH-Optima finden sich in Abbildung 32 und Abbildung 33.



**Abbildung 32:** pH-Optimum der CbRAS mit His-Tag in 0,5 M KPi-Puffer



**Abbildung 33:** pH-Optimum der CbRAS ohne His-Tag in 0,5 M KPi-Puffer

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.5.2. Untersuchung der Substratspezifität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen der CbHST und der CbRAS

#### 3.5.2.1. Untersuchung der Substratspezifität des Proteins CbHST I

Es wurden Enzymtests mit verschiedenen Substraten durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.7), um eine Aussage über die Substratspezifität der klonierten BAHD-Acyltransferase treffen zu können. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der CbHST (siehe Abbildung 18) zu HCSQTs wurde vermutet, dass es sich ebenfalls um eine Hydroxycinnamoyltransferase handelt. Die Akzeptorsubstrate Shikimat und Chinat erschienen dabei am wahrscheinlichsten.

Die für die RAS typischen Akzeptoren pHPL und DHPL konnten anhand der Sequenz als mögliche Substrate nicht ausgeschlossen werden. Die CbRAS-Sequenz, zu der die CbHST eine Identität von 53% aufweist, ist die einzige RAS, die in der NCBI-Datenbank erfasst ist. Zum heutigen Zeitpunkt ist es unmöglich, direkt von der Sequenz einer BAHD-Acyltransferase auf die Substratspezifität zu schließen (D'Auria 2006). Erst durch Aktivitätstests kann der Beweis erbracht werden, um welche Acyltransferase es sich handelt.

Die Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität wurden unter extremen Bedingungen durchgeführt, um auch schlechte Substrate zu detektieren. So wurde im HST-Standardenzymtest (siehe Kapitel 2.4.6) mit pC-CoA und Shikimisäure das Enzym in einer Konzentration von 1,7 µg/ml eingesetzt und 2 Minuten lang inkubiert. In den Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität wurde hundertmal mehr Enzym eingesetzt und die Inkubationszeit um den Faktor 90 verlängert: 170 µg/ml Enzym wurden bei einer Inkubationszeit von 180 Minuten eingesetzt.

Es wurden zunächst die wahrscheinlichsten Akzeptorsubstrate Shikimat, Chinat, *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat getestet. Da die meisten bekannten HCSQTs sowohl pC-CoA als auch Caf-CoA sehr effizient umsetzen, wurde die Übertragung von Caf-CoA ebenfalls getestet.

	pHPL	DHPL	Chinat	Shikimat
pC-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	pC-Shik
Caf-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	Caf-Shik

**Tabelle 2:** Substratspezifität der CbHST

## *Ergebnisse und Diskussion*

Die CbHST akzeptiert lediglich Shikimisäure als Akzeptorsubstrat. pHPL, DHPL und Chinasäure werden auch bei verlängerter Inkubationszeit und sehr hohen Enzymkonzentrationen nicht umgesetzt. Daher ist die CbHST eine „reine“ HST mit hoher Substratspezifität für den Akzeptor Shikimat.

### 3.5.2.2. Untersuchung der Substratspezifität der CbHST II

Wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben, handelt es sich bei dem durch die klonierte cDNA codierten Enzym um eine reine HST, die *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeooyl-CoA effizient auf Shikimat, nicht aber auf Chinat oder pHPL/DHPL überträgt. Es sollte nun genauer untersucht werden, ob es sich bei der CbHST um ein spezifisches Enzym der Monolignolbiosynthese handeln kann. Daher wurden weitere CoA-aktivierte Säuren und Akzeptoren angeboten. Es wurde viel (170 µg/ml) Enzym verwendet und die Ansätze jeweils lange (30 min) inkubiert.

Von BAHD-Acyltransferasen werden die CoA-aktivierten Säuren Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Anthraniloyl-CoA und die fünf Hydroxycinnamoyl-CoAs, *p*C-CoA, Caf-CoA, Cin-CoA, Fer-CoA und Sin-CoA auffallend häufig übertragen.

Es wurde untersucht, ob diese CoA-Aktivierten Säuren von der CbHST auf das schon bekannte Akzeptormolekül Shikimisäure übertragen werden. Nur die Hydroxycinnamoyl-CoAs wurden als Substrate akzeptiert. Bei keinem der anderen CoA-aktivierten Säuren konnte eine Produktbildung beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die CbHST hinsichtlich der CoA-aktivierten Säuren spezifisch für Phenylpropensäuren ist.

Innerhalb der Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen ist eine enorme Anzahl von sehr verschiedenen Akzeptoren bekannt (siehe Kapitel 1.5). Die Auswahl an putativen Akzeptorsubstraten musste eingeschränkt werden. Es wurden solche Akzeptorsubstrate getestet, die von anderen bekannten Hydroxycinnamoyltransferasen übertragen werden. Die entsprechenden Strukturformeln sind in Kapitel 3.6.2 zusammengefasst. Serotonin *N*-HCTs, Tyramin *N*-HCTs, Hydroxyanthranilat *N*-HCTs, Anthranilat *N*-Benzoyltransferasen, Anthocyanin-Hydroxycinnamoyltransferasen und die *N*-HCBTs sind bekannt (siehe Kapitel 3.6). In vielen Fällen handelt es sich um *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen bzw. *N*-Benzoyltransferasen.

Die Akzeptorsubstrate Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure, Tyramin, Tryptamin, Serotonin, Dopamin, L-DOPA und 2-Phenylethylamin wurden der CbHST in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA angeboten. Bei keinem der getesteten Akzeptoren außer 3-Hydroxyanthranilsäure konnte eine Produktbildung beobachtet werden. Es ist ungeklärt, ob die Säure

## *Ergebnisse und Diskussion*

auf die Hydroxylgruppe oder auf die Aminogruppe der 3-Hydroxyanthranilsäure übertragen wird. Der entsprechende Produktpeak wurde mittels HPLC aufgereinigt und durch Massenspektroskopie analysiert sowie ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Beide Analysen kamen zu dem Ergebnis, dass das gebildete Produkt ein Kondensat aus pC-CoA und 3-Hydroxyanthranilsäure ist. Ob es sich allerdings um den Ester oder um das Amid handelt, konnte ohne Referenz nicht gezeigt werden. Ein enzymatischer Umsatz von 3-Hydroxyanthranilsäure mit Caf-CoA, Cin-CoA, Fer-CoA und Sin-CoA konnte ebenfalls beobachtet werden.

### 3.5.2.3. Strukturelle Erfordernisse der Akzeptorsubstrate der CbHST

Weiterführende Untersuchungen zu Akzeptorsubstraten deuten an, dass es sich bei dem gebildeten Kondensat aus pC-CoA und 3-Hydroxyanthranilsäure wahrscheinlich um den Ester handelt. Die im Folgenden genannten Akzeptoren wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu 3-Hydroxyanthranilsäure ausgewählt. Sie sind keine Intermediate im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel.

Zunächst wurde getestet, ob die CbHST 2,3-Dihydroxybenzoesäure als Akzeptorsubstrat umsetzt. In diesem Molekül ist die Aminogruppe der 3-Hydroxyanthranilsäure durch eine Hydroxylgruppe ersetzt. Im CbHST-Enzymtest mit *p*-Cumaroyl-CoA und 2,3-Dihydroxybenzoesäure wurde eine Produktbildung beobachtet. Nach enzymatischer Hydrolyse des Produktpeaks (siehe Kapitel 2.4.8) konnten *p*-Cumarsäure und 2,3DiOHB gegen authentische Referenzsubstanzen mittels HPLC-Analyse identifiziert werden. Da auch in Abwesenheit einer Aminogruppe eine Reaktion stattfindet, kann in Bezug auf 3-Hydroxyanthranilsäure gefolgert werden, dass wahrscheinlich keine Amidbildung in *ortho*-Position erfolgt.

3-Hydroxybenzoesäure wurde ausgewählt, um zu untersuchen, ob die Kondensation in *meta*-Position stattfindet. Tatsächlich wird der Ester aus 3-Hydroxybenzoesäure und pC-CoA gebildet. Dieses Ergebnis unterstützt die Schlussfolgerung bezüglich der Amidierung in *ortho*-Position: Die CbHST setzt Akzeptoren um, die in *meta*-Stellung zur Carboxylgruppe eine Hydroxylgruppe besitzen. Eine Tatsache, die dieses Ergebnis untermauert, ist die Veresterung in *meta*-Position beim natürlichen Substrat Shikimisäure.

Da viele *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen bekannt sind; sollte untersucht werden, ob die CbHST auch Amidbindungen knüpfen kann. Wurden ihr 3-Aminobenzoessäure und *p*-Cumaroyl-CoA als Substrate angeboten, so konnte ein schwacher Umsatz gesehen

## *Ergebnisse und Diskussion*

werden. Die CbHST kann Amidbindungen knüpfen, allerdings sehr schlecht. Neben pC-CoA wurden von der CbHST auch Caf-CoA, Cin-CoA und Fer-CoA, nicht aber Sin-CoA mit 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoesäure kondensiert.

Um zu beweisen, dass die Carboxylgruppe essentiell für die Reaktion und damit für die Bindung im aktiven Zentrum ist, wurde der CbHST Phenol angeboten. Dieser Nachweis gelang, denn mit Phenol wurde keine Enzymreaktion beobachtet.

3-Hydroxyanthranilsäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure sind sehr gute Substrate. Unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.2.4) können Produktpeaks detektiert werden. 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoesäure werden sehr schlecht umgesetzt. Nur unter Einsatz großer Enzymmengen und drastischer Verlängerung der Inkubationszeit sind Reaktionsprodukte zu erkennen.

Eine Übersicht über die getesteten Substrate und die Substratspezifität der CbHST befindet sich in Kapitel 3.6.2. Die HPLC-Chromatogramme mit Positiv- und Negativkontrolle für Reaktionsprodukte ohne Referenzsubstanz befinden sich im Anhang.

### 3.5.2.4. Untersuchung der Substratspezifität der CbRAS I

Berger et al. (2006) hatten gezeigt, dass die heterolog exprimierte RAS aus *Coleus blumei* pC-CoA und Caf-CoA auf pHPL und DHPL überträgt. Shikimisäure und Chinasäure sind keine Substrate.

Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden. Da die Enzymtests (Kapitel 2.4.7) in dieser Arbeit unter extremen Bedingungen durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass Shikimisäure und Chinasäure auch nicht als schlechte Substrate akzeptiert werden. Die CbRAS ist eine reine CbRAS mit einer hohen Substratspezifität für die Akzeptorsubstrate *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat. Von aufgereinigter RAS aus *Coleus*-Suspensionskulturen wurde von Petersen (1991) berichtet, dass neben den natürlichen Substraten pC-CoA und Caf-CoA auch Cin-CoA und möglicherweise auch Fer-CoA und Sin-CoA umgesetzt werden. Mit der heterolog exprimierten CbRAS konnte die Übertragung von Cin-CoA und Fer-CoA auf DL-pHPL sowie D-DHPL nachgewiesen werden. Ein Reaktionsprodukt aus Sin-CoA und DL-pHPL wurde allerdings nicht beobachtet. Fer-CoA wird im Vergleich zu den anderen CoA-aktivierten Säuren schlecht auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat übertragen. Im Standardenzymtest war keine oder nur sehr geringe Produktbildung zu beobachten. Da pHPL das beste Substrat der CbRAS ist, wurde die Übertragung von Sin-CoA nur in dieser Kombination getestet. Außerdem wurde



## *Ergebnisse und Diskussion*

beschrieben, Phenyllactat wäre kein Substrat der nativen RAS. Das heterolog exprimierte Enzym jedoch setzt Cin-CoA, pC-CoA, Caf-CoA und Fer-CoA gut mit DL-Phenyllactat um.

Wie bei der CbHST wurde untersucht, ob die CbRAS neben Estern auch Amide knüpft. Daher wurden dem Enzym Phenylalanin, Tyrosin und DOPA angeboten. Diese Aminosäuren unterscheiden sich von den natürlichen Substraten nur darin, dass die OH-Gruppe, an der enzymatisch angegriffen wird, durch eine NH<sub>2</sub>-Gruppe ausgetauscht ist. Tatsächlich setzt die CbRAS Cin-CoA, pC-CoA und Caf-CoA, nicht aber Fer-CoA mit Phenylalanin, Tyrosin und DOPA um. Die Reaktionsprodukte Caf-Tyr und Cin-PA wurden hydrolysiert. Bei der Hydrolyse von Caf-Tyr konnten Kaffeesäure und Tyrosin nachgewiesen werden, bei der Hydrolyse von Cin-PA entstanden Zimtsäure und Phenylalanin. Weil Phenylalanin am aromatischen Ring keine Hydroxylgruppe besitzt, die verestert werden kann, ist die aliphatische NH<sub>2</sub>-Gruppe der einzige Angriffspunkt für die Acylierung. Die Amidbildung wird auch für Tyrosin und DOPA angenommen.

Die CbRAS überträgt die CoA-aktivierten Säuren nicht nur auf Hydroxylgruppen, sondern besitzt auch *N*-Hydroxycinnamoyltransferase-Aktivität. Diese *N*-Acyltransferase-Aktivität ist allerdings sehr schwach. In den Standardzymtests konnte keine Amidbildung gezeigt werden. Lediglich nach Inkubation über Nacht und unter Einsatz sehr großer Mengen an Enzym konnte diese Aktivität nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist die Stereoselektivität der CbRAS. Die Akzeptorsubstrate sind chirale Verbindungen. Das Chiralitätszentrum liegt am  $\alpha$ -C-Atom der genannten Akzeptorsubstrate. Es werden nur die folgenden Enantiomere umgesetzt: D-Phenyllactat, D-pHPL, D-DHPL, D-Phenylalanin, D-Tyrosin und D-DOPA. Die entsprechenden L-Enantiomere sind keine Substrate. Sie hemmen die Reaktion (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.2.5. Untersuchung der Substratspezifität der CbRAS II

Die Übertragung von weiteren aliphatischen und aromatischen, für BAHD-Acyltransferasen typischen CoA-aktivierten Säuren (Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Anthraniloyl-CoA), konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach besitzt die CbRAS eine hohe Substratspezifität für (Hydroxy-)cinnamoyl-CoA-Derivate.

Auf der Akzeptorseite wurden verschiedene Substrate angeboten, die von anderen bekannten Hydroxycinnamoyltransferasen übertragen werden. Dazu zählen Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure, Tyramin, Tryptamin, Serotonin, Dopamin, L-DOPA und 2-Phenyl-

## *Ergebnisse und Diskussion*

ethylamin. pC-CoA wurde auf keinen der aufgeführten Akzeptoren übertragen. Die CbRAS setzt sehr spezifisch (Hydroxy-)phenylpropansäure-Derivate um.

### 3.5.2.6. Strukturelle Erfordernisse der Akzeptorsubstrate der CbRAS

Es wurde untersucht, ob die Carboxylgruppe des Akzeptorsubstrates essentiell für die Katalyse ist. Daher wurde ein Molekül ausgewählt, das dem natürlichen Substrat pHPL entspricht, dem allerdings die COOH-Gruppe fehlt: 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol. Da kein enzymatischer Umsatz beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass die Carboxylgruppe ein essentielles Strukturmerkmal darstellt. 3-(4-Hydroxyphenyl)propanol fungiert ebenfalls nicht als Akzeptorsubstrat.

In Kapitel 3.6.2 wird die Substratspezifität der CbRAS zusammengefasst. Die Strukturformeln der angebotenen Substrate sind dort abgebildet. Die HPLC-Chromatogramme mit Positiv- und Negativkontrolle für Reaktionsprodukte ohne Referenzsubstanz befinden sich im Anhang.

### 3.5.3. Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max}/K_m$ der CbHST

Es wurden die  $K_m$ -Werte für die CoA-aktivierten Säuren und der Akzeptoren bestimmt (siehe Kapitel 2.4.9). Es sollte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Substrate die höchste Affinität zum Enzym haben und welche Substratkombination am effektivsten umgesetzt wird. Die am besten umgesetzten Substrate sind wahrscheinlich die natürlichen Substrate der CbHST. Die im Folgenden präsentierten  $K_m$ -Werte sind in Kapitel 3.6.3 in tabellarischer Form zusammengefasst.

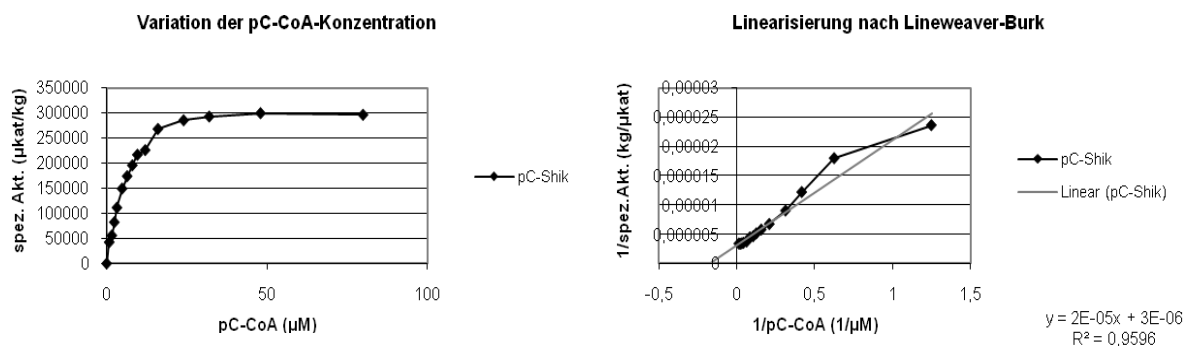
#### 3.5.3.1. Untersuchung des natürlichen Akzeptors Shikimisäure

Zur Ermittlung des apparenten  $K_m$ -Wertes für pC-CoA, Caf CoA und Cin-CoA konnten bei einer Enzymkonzentration von 0,136  $\mu\text{g/ml}$  und einer Reaktionszeit von exakt 2 min Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt werden. Shikimisäure lag in jedem Test in einer Sättigungskonzentration von 1,6 mM vor.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.5.3.1.1. pC-CoA plus Shikimisäure

pC-CoA wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,8  $\mu\text{M}$  bis 80  $\mu\text{M}$  im Test eingesetzt. Die Sättigungskurve zeigt Michaelis-Menten-Kinetik und weist einen steilen Übergang in den Sättigungsbereich bei 32  $\mu\text{M}$  auf. Durch Linearisierung nach Lineweaver-Burk lassen sich der  $K_m$ -Wert sowie  $V_{\text{max}}$  berechnen. In Abbildung 34 ist eine repräsentative Messreihe aus Einzelwerten dargestellt. Aus 4 Messreihen konnte für pC-CoA in Kombination mit Shikimisäure ein apparterer  $K_m$ -Wert von 4,3  $\mu\text{M}$  ermittelt.  $V_{\text{max}}$  liegt in der Größenordnung von 244 mkat/kg. Der daraus resultierende  $V_{\text{max}}/K_m$ -Wert ist 56744 mkat/kg mM.

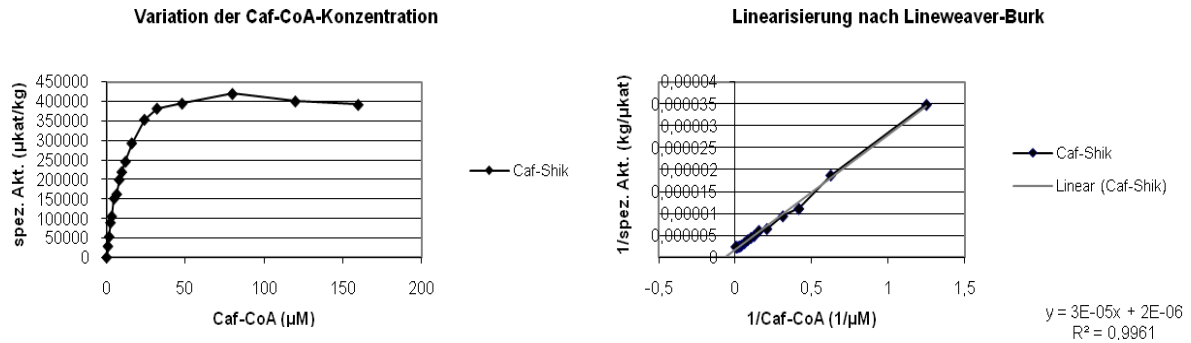


**Abbildung 34:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.2. Caf-CoA plus Shikimisäure

Zur Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Werts für Caf-CoA wurde die Konzentration dieses Substrates im Test von 0,8  $\mu\text{M}$  bis 160  $\mu\text{M}$  variiert. Es ist ein rascher Übergang in den Sättigungsbereich bei 48  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Aus 3 Messreihen kann ein app.  $K_m$ -Wert von 8,8  $\mu\text{M}$  errechnet werden. Caf-CoA und pC-CoA haben eine vergleichbare Affinität zum aktiven Zentrum der CbHST. Die Affinität von pC-CoA ist etwas höher. Die Maximalgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  beträgt 361 mkat/kg. Mit einem  $V_{\text{max}}/K_m$ -Wert von 41023 mkat/kg mM deutet sich an, dass pC-CoA im Vergleich zu Caf-CoA bevorzugt auf Shikimisäure übertragen wird. In Abbildung 35 sind repräsentative Einzelmessreihen zu sehen.

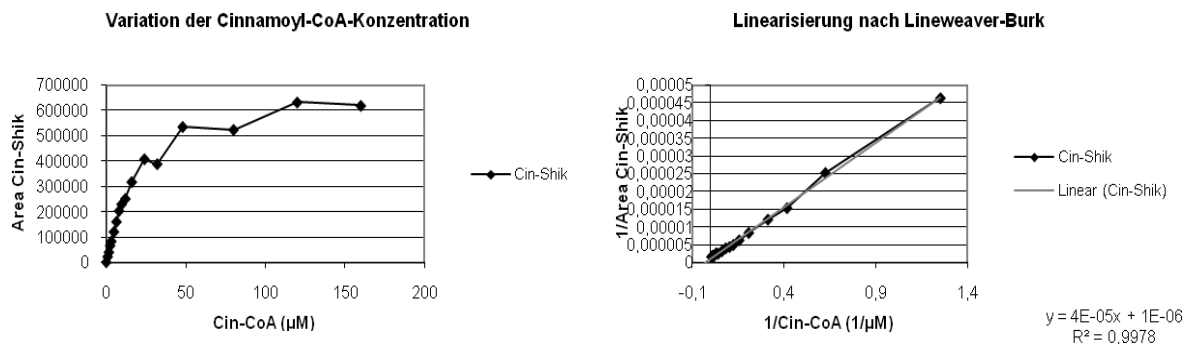
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 35:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.3. Cin-CoA plus Shikimisäure

Durch Variation der Cin-CoA Konzentration in einem Bereich von 0,8 µM bis 160 µM konnte der apparente  $K_m$ -Wert für dieses Substrat aus 3 Einzelmessungen mit 26,5 µM ermittelt werden. Die Affinität von Cin-CoA ist geringer als diejenige von pC-CoA und Caf-CoA. Dieser vergleichsweise hohe  $K_m$ -Wert deutet darauf hin, dass Cin-CoA wahrscheinlich nicht das natürliche Substrat der CbHST ist. Wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, stand das Reaktionsprodukt Cin-Shik nicht als Referenzsubstanz zur Verfügung. Daher konnte weder die spezifische Aktivität berechnet noch die Maximalgeschwindigkeit angegeben werden. Aus der Substratsättigungskurve (Abbildung 36) ist zu erkennen, dass die Substratsättigungskonzentration bei 120 µM erreicht wird.



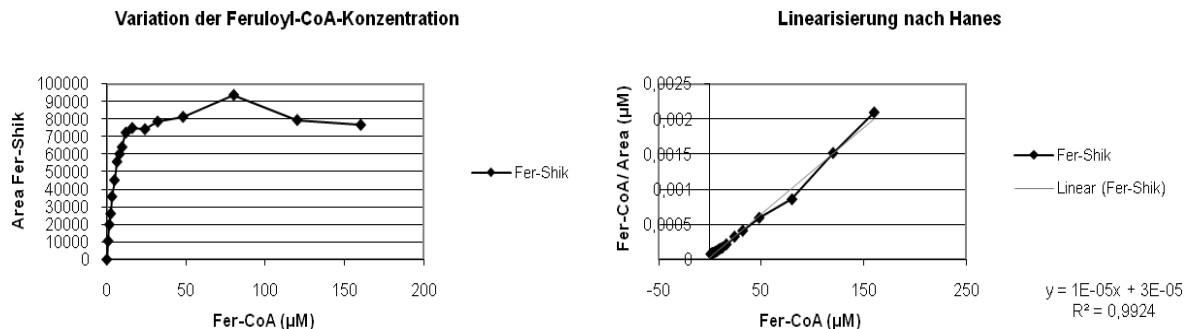
**Abbildung 36:** Substratsättigungskurve für Cin-CoA mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.4. Fer-CoA plus Shikimisäure

Die Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes für Fer-CoA in Kombination mit 1,6 mM Shikimat im Test erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,8 µM bis 160 µM Fer-CoA. In diesem Versuch musste die Proteinkonzentration auf 6,8 µg/ml erhöht werden, um nach

## Ergebnisse und Diskussion

2 min Inkubationszeit Anfangsgeschwindigkeiten messen zu können. Die Substratsättigungskonzentration für Fer-CoA liegt wie in Abbildung 37 zu sehen bei 48  $\mu\text{M}$ . Aus drei Messreihen wurde ein app.  $K_m$ -Wert von 5,1  $\mu\text{M}$  ermittelt. Die Affinität von Fer-CoA zum aktiven Zentrum ist demnach ähnlich hoch wie die Affinität von pC-CoA. Dieses Ergebnis verwundert, denn im Enzymtest zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit war zu erkennen, dass Fer-Shik deutlich langsamer gebildet wird als pC-Shik.

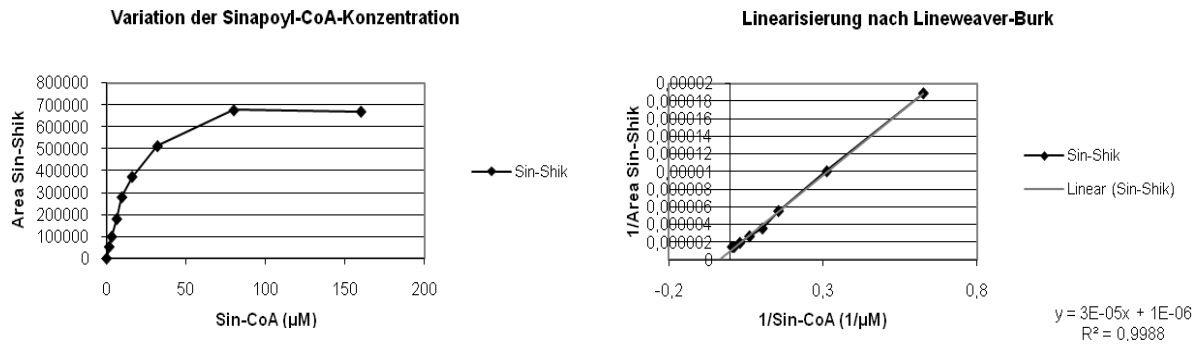


**Abbildung 37:** Substratsättigungskurve für Fer-CoA mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.5. Sin-CoA plus Shikimisäure

Zur Ermittlung des apparenten  $K_m$ -Wertes von Sin-CoA wurden ebenfalls 3 Messreihen ausgewertet. Anhand der zuvor ermittelten Zeitreihe wurde deutlich, dass Sin-CoA extrem langsam auf Shikimisäure übertragen wird. Die Umsetzung erfolgt so langsam, dass in den Standardenzymtests keine Produktbildung beobachtet werden konnte. Es war nötig, die Enzymkonzentration im Test auf 13,6  $\mu\text{g/ml}$  zu erhöhen. Das ist die 100-fache Menge im Vergleich zu den Substraten pC-CoA und Caf-CoA. Die Enzymreaktionen wurden erst nach exakt 8 min abgestoppt. Die Substratsättigung wird für Sin-CoA bei einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  erreicht. Der apparente  $K_m$ -Wert errechnet sich zu 20,0  $\mu\text{M}$ . Dabei wurde die Sin-CoA-Konzentration zwischen 1,6  $\mu\text{M}$  und 160  $\mu\text{M}$  variiert. Die Shikimisäurekonzentration wurde auf 40 mM im Test eingestellt (Abbildung 38).

## Ergebnisse und Diskussion

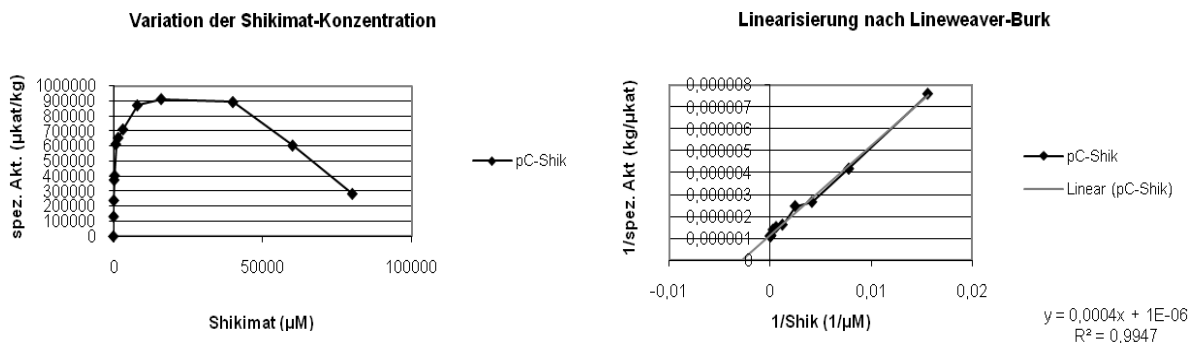


**Abbildung 38:** Substratsättigungskurve für Sin-CoA mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für Shikimisäure wurden für die entsprechenden Substratkombinationen dieselben Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten eingehalten, wie bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der CoA-Aktivierten Säuren in Kombination mit Shikimisäure.

### 3.5.3.1.6. Shikimisäure plus pC-CoA

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für Shikimisäure wurde deren Konzentration in einem Bereich von 64 µM bis 80 mM variiert, wobei die pC-CoA-Konzentration bei 42 µM konstant gehalten wurde. In der resultierenden Substratsättigungskurve (Abbildung 39) ist eine starke Substratinhibition ab 40 mM zu erkennen. Daher wurde der apparente  $K_m$ -Wert aus 5 Messreihen bei Variation der Shikimisäurekonzentration bis 40 mM gemessen und ergibt einen Wert von 332 µM. In der repräsentativen Einzelmessreihe in Abbildung 39 ist das Erreichen der Substratsättigung bei 8 mM abzulesen. Die Enzymreaktion erreicht eine Maximalgeschwindigkeit von gemittelt 448 mkat/kg.  $V_{max}/K_m$  errechnet sich zu 1349 mkat/kg mM.



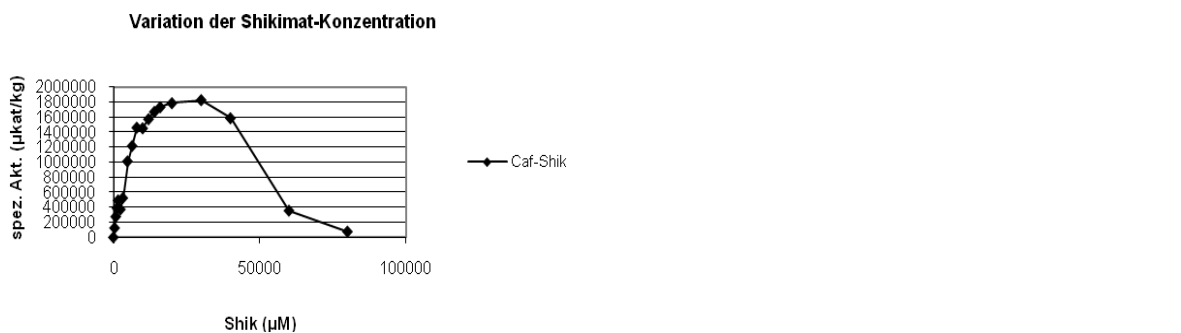
**Abbildung 39:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion

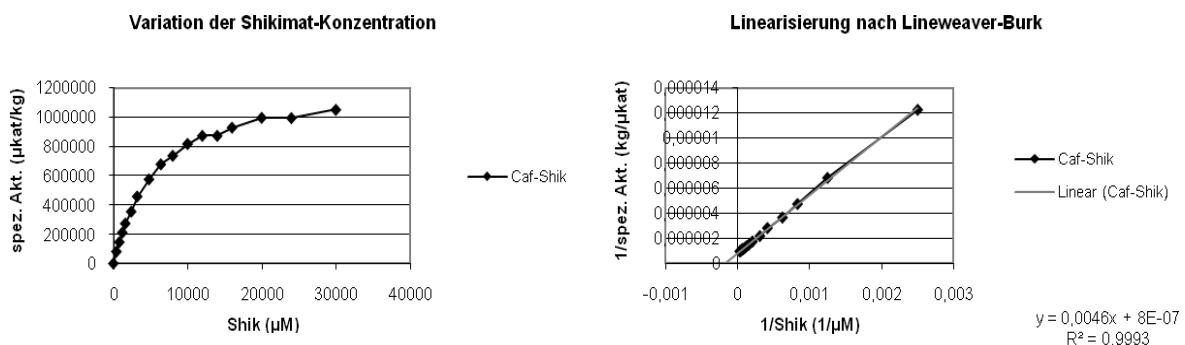
### 3.5.3.1.7. Shikimisäure plus Caf-CoA

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter des Enzyms mit Shikimisäure in Kombination mit Caf-CoA wird die Shikimisäurekonzentration zwischen 400 und 80 mM variiert. Caf-CoA liegt mit 30  $\mu\text{M}$  in Sättigungskonzentration vor. Auch mit Caf-CoA tritt eine deutliche Substratinhibition ab 40 mM Shikimisäure ein, was in Abbildung 40 ersichtlich wird. Daher wurde zur Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes im Konzentrationsbereich bis 40 mM gemessen (Abbildung 41). In 3 Messreihen konnte ein  $K_m$ -Wert von 6495  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Der  $K_m$ -Wert für Shikimisäure ist in Kombination mit Caf-CoA fast zwanzigmal größer als mit pC-CoA. Die Affinität von Shikimisäure zum Enzym hängt demnach davon ab, welches zweite Substrat vorliegt. Es ist anzunehmen, dass sich die Konformation des Enzyms je nach Substratkombination ändert, ein Phänomen, das als induced fit (induzierte Passform) bekannt ist.

Neben dem  $K_m$ -Wert ändert sich auch die Maximalgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$ . Sie wurde mit 1890 mkat/kg errechnet.  $V_{\text{max}}/K_m$  ergibt einen Wert von 291 mkat/kg mM. Obwohl die Maximalgeschwindigkeit bei der Bildung von Caf-Shik höher ist, sind pC-CoA und Shikimat die bevorzugten Substrate der CbHST.



**Abbildung 40:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat: Substratinhibition

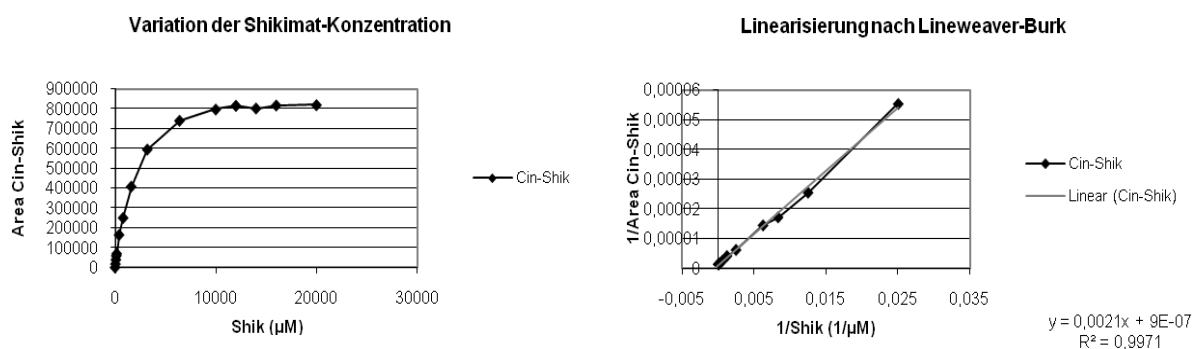


**Abbildung 41:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.5.3.1.8. Shikimisäure plus Cin-CoA

Da die Affinität von Shikimisäure zum aktiven Zentrum davon abhängt, welches zweite Substrat gebunden wird, wurden die  $K_m$ -Werte der Shikimisäure in allen möglichen Substratkombinationen analysiert. Während die Shikimatkonzentration in einem Bereich von 40  $\mu\text{M}$  bis 20 mM variiert wurde, lag Cin-CoA in einer Sättigungskonzentration von 77  $\mu\text{M}$  vor. Aus drei Messreihen wurde der apparente  $K_m$ -Wert mit 2235  $\mu\text{M}$  bestimmt. Sättigung ist ab 10 mM erreicht (Abbildung 42). Da sowohl die Affinitäten von Cin-CoA als auch die Affinität von Shikimisäure vergleichsweise niedrig sind, kann ausgeschlossen werden, dass Cin-CoA und Shikimisäure die bevorzugte Substratkombination der CbHST ist.



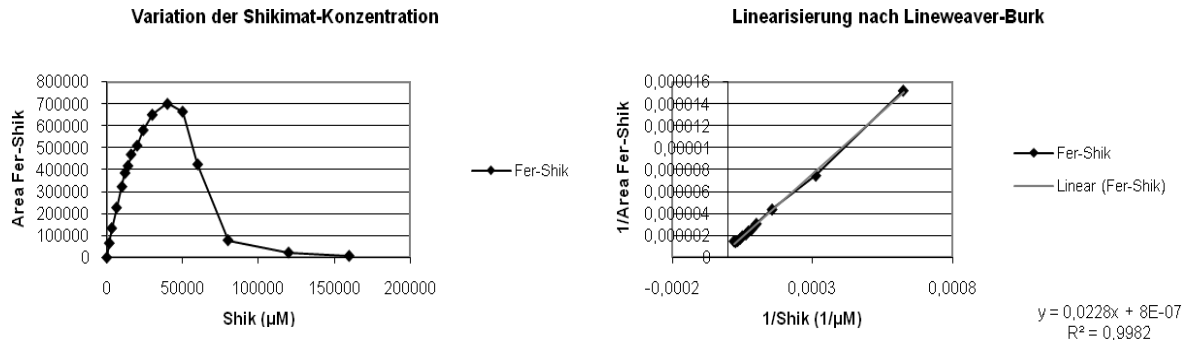
**Abbildung 42:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit Cin-CoA als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.9. Shikimisäure plus Fer-CoA

Der apparente  $K_m$ -Wert von Shikimisäure gemessen mit Fer-CoA liefert eine Erklärung, warum diese Substratkombination so schlecht umgesetzt wird (siehe Kapitel 3.6.3). Obwohl die Affinität von Fer-CoA zum aktiven Zentrum sehr hoch ist, bindet Shikimisäure extrem schlecht an das Enzym. Durch Variation der Shikimisäurekonzentration in einem Bereich von 16 mM bis 160 mM und einer konstanten Fer-CoA-Konzentration von 48  $\mu\text{M}$  konnte ein apparenter  $K_m$ -Wert von 22383  $\mu\text{M}$  bestimmt werden (Abbildung 43). In Tabelle 3 sind die verschiedenen  $K_m$ -Werte von Shikimisäure und allen CoA-aktivierten Säuren zusammengefasst. Zwischen den  $K_m$ -Werten für Shikimisäure mit pC-CoA als affinste Substratkombination und Fer-CoA ist ein Unterschied von zwei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Aus der Substratsättigungskurve ist ersichtlich, dass Shikimisäure ab einer Konzentration von 40 mM hemmend wirkt.



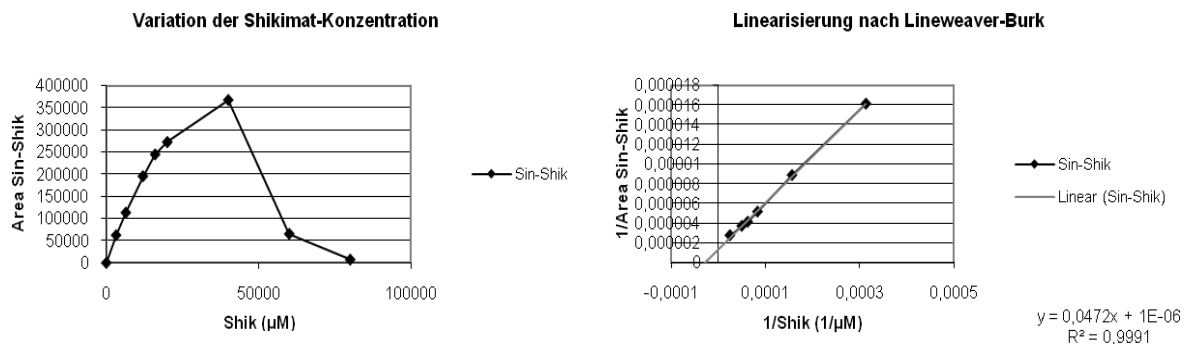
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 43:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit Fer-CoA als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.1.10. Shikimisäure plus Sin-CoA

In einem Konzentrationsbereich von 3,2 mM bis 80 mM konnte ein apparenter  $K_m$ -Wert von 26133 µM für Shikimat bestimmt werden. Sin-CoA wurde mit 38 µM eingesetzt. Die Sättigungskurve (Abbildung 44) zeigt einen vergleichsweise flachen Anstieg der Enzymaktivität und eine starke Hemmung über 40 mM. Sin-CoA und Shikimisäure stellen die ungünstigste Substratkombination für die CbHST dar. In Kombination zeigen beide Substrate nur geringe Affinität zum aktiven Zentrum.



**Abbildung 44:** Substratsättigungskurve für Shikimisäure mit Sin-CoA als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.5.3.1.11. Zusammenstellung der mit Shikimat als Akzeptor bestimmten $K_m$ -Werte

variiertes Substrat	$K_m$ -Wert ( $\mu\text{M}$ )
pC-CoA	4,3
Caf-CoA	8,8
Cin-CoA	26,5
Fer-CoA	5,1
Sin-CoA	20,0

**Tabelle 3:**  $K_m$ -Werte für CoA-aktivierte Säuren, das konstant gehaltene Substrat ist Shikimisäure

konstant gehaltenes Substrat	$K_m$ -Wert ( $\mu\text{M}$ )
pC-CoA	331,8
Caf-CoA	6494,5
Cin-CoA	2234,8
Fer-CoA	22383,3
Sin-CoA	26133,3

**Tabelle 4:**  $K_m$ -Werte für Shikimisäure mit verschiedenen CoA-aktivierten Säuren

Die apparenten  $K_m$ -Werte für alle CoA-aktivierten Phenylpropansäurederivate mit Shikimat und die  $K_m$ -Werte für Shikimisäure in Kombination mit den verschiedenen CoA-aktivierten Säuren sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 3 und Tabelle 4). Da sowohl die Affinität von pC-CoA in Kombination mit Shikimisäure als auch die Affinität von Shikimisäure in Kombination mit pC-CoA am größten ist, kann man schließen, dass pC-CoA und Shikimisäure die bevorzugten Substrate der CbHST sind. Unterstützt wird dieses Ergebnis von der Zeitreihe.

### 3.5.3.2. Weitere Akzeptoren: 3-Hydroxyanthranilsäure

Aus den Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität war bekannt, dass die CbHST in der Lage ist, 3-Hydroxyanthranilsäure umzusetzen. Die  $K_m$ -Werte sollten bestimmt werden. Aus der Zeitreihe war bekannt, dass diese Substratkombination recht gut umgesetzt wird. Es wird davon ausgegangen, dass die CbHST bevorzugt pC-CoA und Shikimisäure umsetzt. Um das zu beweisen, müssen die  $K_m$ -Werte bestimmt werden. Die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilat *N*-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Avena sativa* (Ishihara et al. 1997) kondensiert 5-Hydroxyanthranilsäure und pC-CoA über eine Amidbindung. Es sind

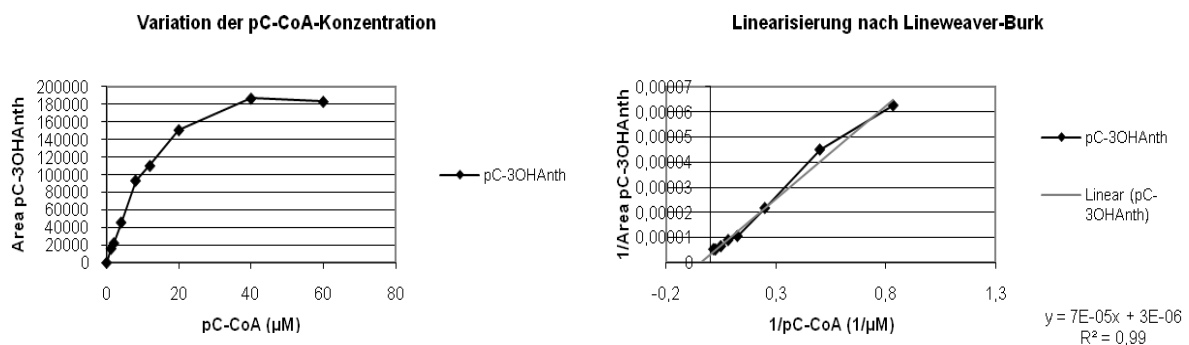
## Ergebnisse und Diskussion

allerdings in Pflanzen keine Stoffwechselwege bekannt, bei denen 3-Hydroxyanthranilsäure ein Intermediat ist. Ester oder Amide mit pC-CoA und 3-Hydroxyanthranilsäure sind in Pflanzen nicht bekannt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei 3-Hydroxyanthranilsäure um ein natürliches Substrat der CbHST handelt.

Während zur Bestimmung der kinetischen Parameter mit Shikimisäure mindestens drei Messreihen ausgewertet wurden, wurden im Folgenden nur noch zwei Versuche durchgeführt, da die  $K_m$ -Werte der Doppelproben zu vergleichbaren Ergebnissen führten.

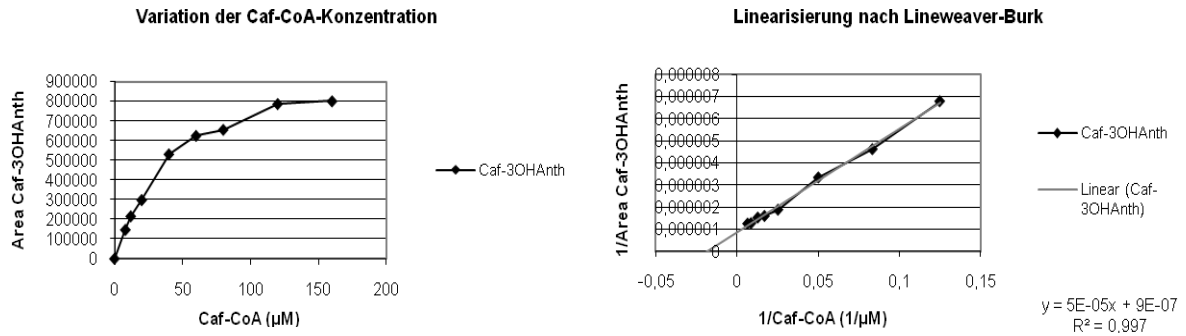
### 3.5.3.2.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 3-Hydroxyanthranilsäure

Zur Bestimmung der apparenten  $K_m$ -Werte von pC-CoA und Caf-CoA wurden die Substratkonzentrationen zwischen 0,8  $\mu\text{M}$  und 60  $\mu\text{M}$  (pC-CoA) bzw. 160  $\mu\text{M}$  (Caf-CoA) variiert. 3-Hydroxyanthranilsäure wurde in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt. Bei einer Enzymkonzentration im Test von 1,36  $\mu\text{g/ml}$  wurden die Enzymtests 10 min inkubiert. Die Substratsättigungskurven zeigen eine Sättigungskonzentration von 40  $\mu\text{M}$  für pC-CoA (Abbildung 45) und 120  $\mu\text{M}$  für Caf-CoA (Abbildung 46). Die apparenten  $K_m$ -Werte wurden mit 22  $\mu\text{M}$  (pC-CoA) und 54,8  $\mu\text{M}$  (Caf-CoA) bestimmt. Auch in Kombination mit 3-Hydroxyanthranilsäure ist die Affinität von pC-CoA höher als die von Caf-CoA. Im Vergleich zu den  $K_m$ -Werten, die für pC-CoA und Caf-CoA in Kombination mit Shikimisäure ermittelt wurden, sind die Affinitäten beider CoA-aktivierter Säuren mit 3-OHAnth geringer.



**Abbildung 45:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit 3-OHAnth als Akzeptorsubstrat

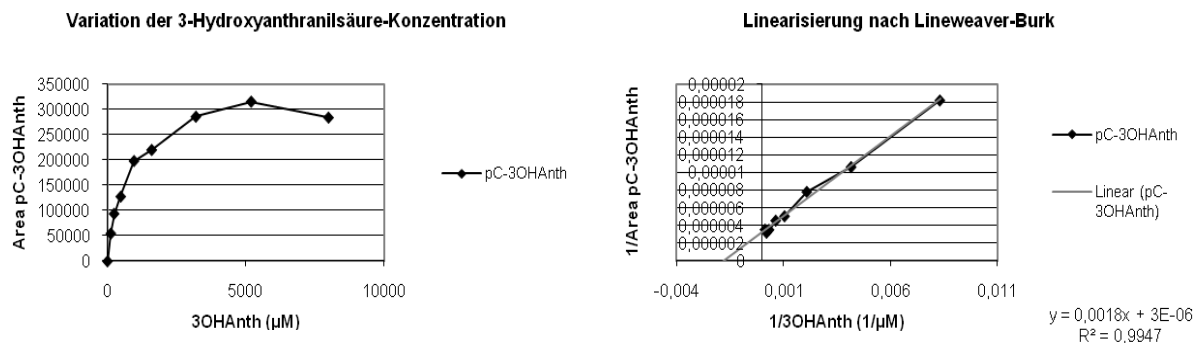
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 46:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit 3-OHAnth als Akzeptorsubstrat

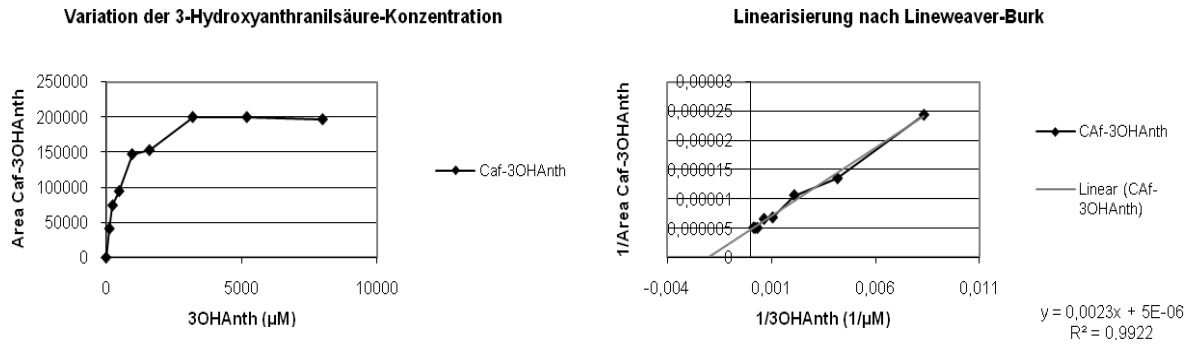
### 3.5.3.2.2. 3-Hydroxyanthranilsäure plus pC-CoA und Caf-CoA

Während die pC-CoA-Konzentration mit 42 µM im Sättigungsbereich gehalten wurde und die Caf-CoA-Konzentration 30 µM aufwies, wurde die 3-Hydroxyanthranilsäurekonzentration im Bereich von 400 µM bis 8000 µM variiert. Die Enzymtests wurden mit einer Enzymkonzentration von 1,36 µg/ml im Test für 10 min durchgeführt. Substratsättigung stellte sich ab einer 3-Hydroxyanthranilsäurekonzentration von 5 mM ein (Abbildung 47 und Abbildung 48). Die  $K_m$ -Werte für 3-OHAnth betragen 473 µM mit pC-CoA als zweitem Substrat und 449 µM mit Caf-CoA. Somit sind die Affinitäten mit der Affinität von Shikimisäure mit pC-CoA vergleichbar.



**Abbildung 47:** Substratsättigungskurve für 3-OHAnth mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion



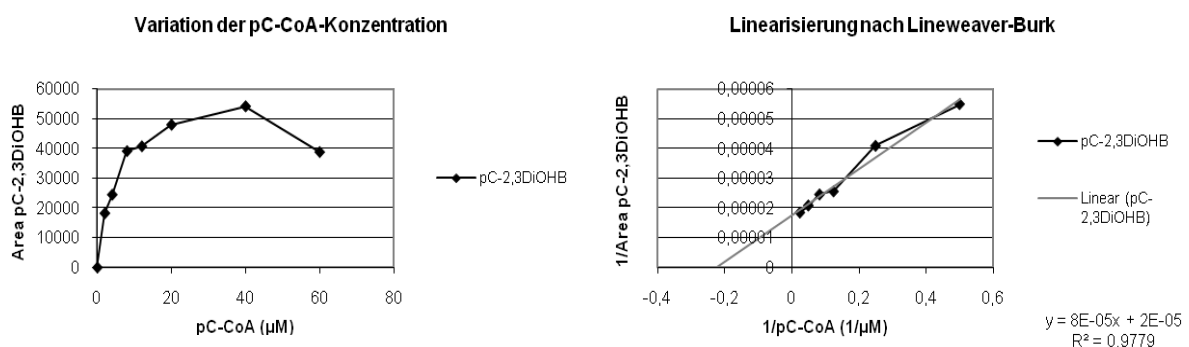
**Abbildung 48:** Substratsättigungskurve für 3-OHAnth mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.3. 2,3-Dihydroxybenzoesäure

Aus der Zeitreihe war bekannt, dass pC-CoA und 2,3-Dihydroxybenzoesäure von der CbHST sehr effektiv umgesetzt werden.

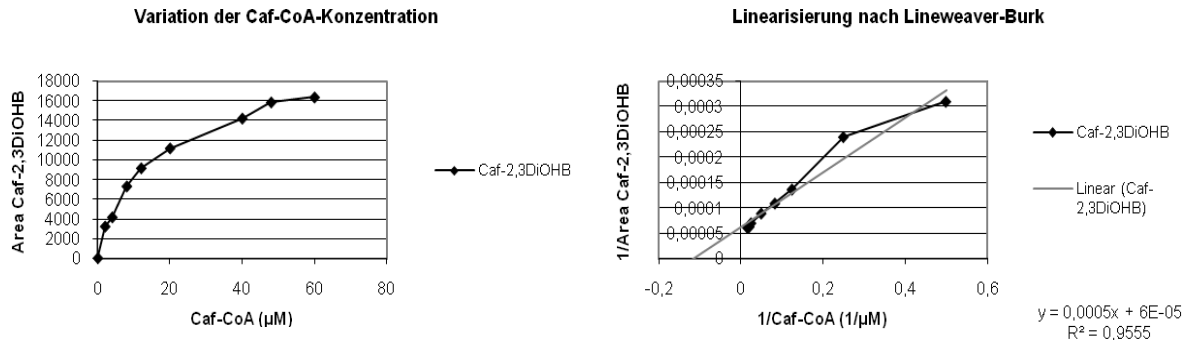
#### 3.5.3.3.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 2,3 Dihydroxybenzoesäure

Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pC-CoA und Caf-CoA mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure wurden Enzymkonzentrationen von 6,8  $\mu\text{g/ml}$  im Test eingesetzt und eine Inkubationszeit von 1,5 min eingehalten. Beide CoA-aktivierten Säuren wurden in einem Bereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 60  $\mu\text{M}$  variiert. Die Konzentration von 2,3DiOHB lag bei 4 mM im Test. Die Substratsättigungskurve für pC-CoA zeigt einen schnellen Übergang zur Sättigung bei 40  $\mu\text{M}$  (Abbildung 49). Der  $K_m$ -Wert ist mit 3,1  $\mu\text{M}$  mit dem  $K_m$ -Wert für pC-CoA in Kombination mit Shikimisäure vergleichbar. Für Caf-CoA ist die Sättigung bei 48  $\mu\text{M}$  erreicht (Abbildung 50). Der  $K_m$ -Wert liegt bei 11,8  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 49:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit 2,3DiOHB als Akzeptorsubstrat

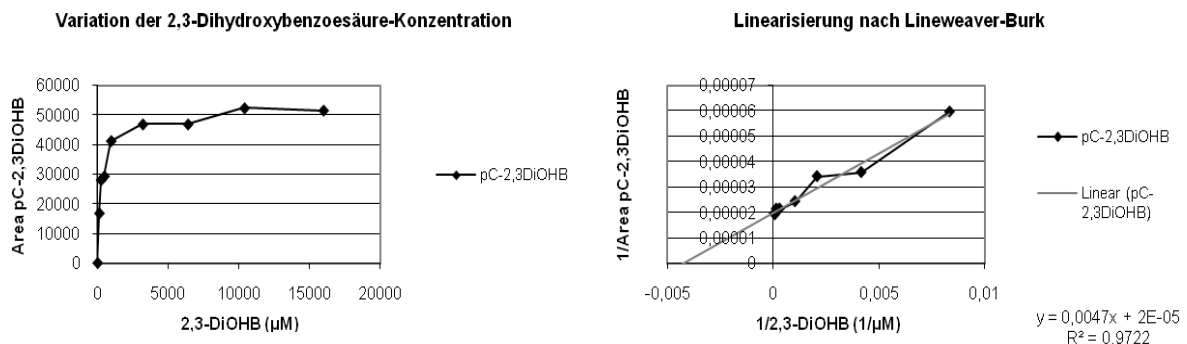
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 50:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit 2,3DiOHB als Akzeptorsubstrat

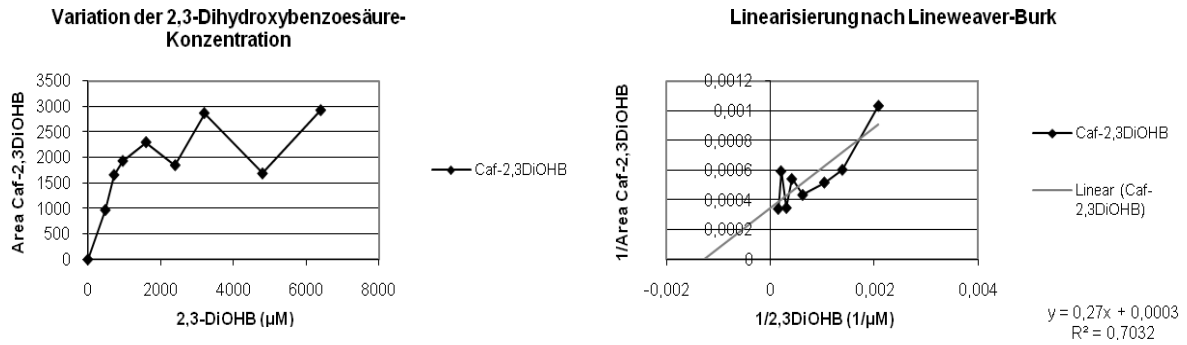
### 3.5.3.3.2. 2,3-Dihydroxybenzoesäure plus pC-CoA und Caf-CoA

Der apparente  $K_m$ -Wert für 2,3DiOHB mit pC-CoA als zweitem Substrat ist mit 188  $\mu\text{M}$  sehr niedrig. Dazu wurde die 2,3DiOHB-Konzentration im Bereich von 120  $\mu\text{M}$  bis auf 16 mM erhöht, wobei die pC-CoA-Konzentration auf 42  $\mu\text{M}$  eingestellt wurde. Die Substratsättigungskurve (Abbildung 51) zeigt einen schnellen Übergang in den Sättigungsbereich (3,2 mM). Die Affinität von 2,3DiOHB mit pC-CoA ist höher als die Affinität von Shikimisäure mit pC-CoA. Ester aus pC-CoA und 2,3DiOHB sind in Pflanzen nicht bekannt (SciFinder). Durch Erhöhung der 2,3DiOHB-Konzentration von 480  $\mu\text{M}$  bis auf 6400  $\mu\text{M}$  und einer konstanten Caf-CoA-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  konnte ein  $K_m$ -Wert für 2,3DiOHB von 699  $\mu\text{M}$  abgeschätzt werden. Substratsättigung wird ab 3,2 mM erreicht (Abbildung 52).



**Abbildung 51:** Substratsättigungskurve für 2,3DiOHB mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion

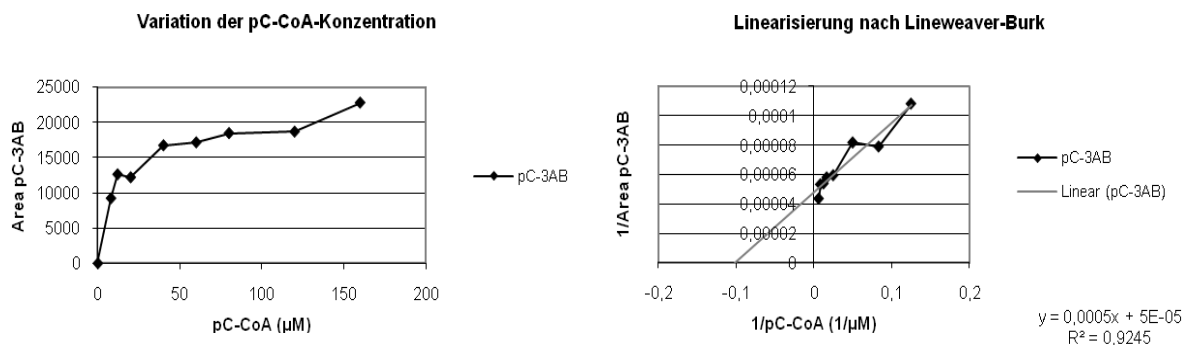


**Abbildung 52:** Substratsättigungskurve für 2,3DiOHB mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.4. 3-Aminobenzoessäure

#### 3.5.3.4.1. pC-CoA plus 3-Aminobenzoessäure

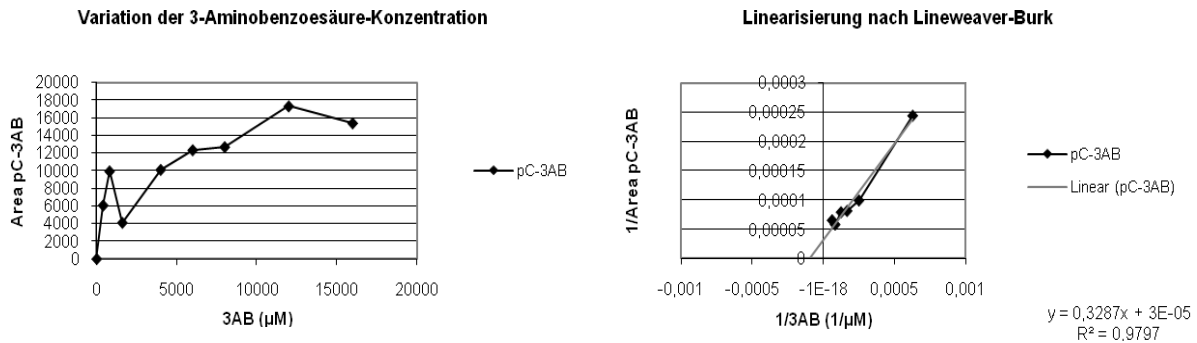
Werden der CbHST pC-CoA und 3-Aminobenzoessäure als Substrate angeboten, so entsteht wahrscheinlich das entsprechende Säureamid. Die Reaktion läuft allerdings so langsam ab, dass diese Aktivität im Standardenzymtest (Kapitel 2.2.4) nicht nachgewiesen werden kann. Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte von pC-CoA und 3-Aminobenzoessäure müssen  $13,6 \mu\text{g/ml}$  Enzym eingesetzt werden. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte der Substrate pC-CoA und Shikimisäure war 1% dieser Enzymkonzentration ( $0,136 \mu\text{g/ml}$ ) bei einer Reaktionszeit von 2 min ausreichend gewesen. pC-CoA wurde in Konzentrationen von  $8 \mu\text{M}$  bis  $160 \mu\text{M}$  in den Tests eingesetzt. Die 3-Aminobenzoessäurekonzentration betrug  $8 \text{ mM}$ . Ab  $40 \mu\text{M}$  pC-CoA im Test ist Substratsättigung erreicht (Abbildung 53). Der  $K_m$ -Werte errechnet sich zu  $18,5 \mu\text{M}$  und unterscheidet sich damit nur geringfügig von den anderen gemessenen  $K_m$ -Werten für die CoA-aktivierten Säuren.



**Abbildung 53:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit 3 AB als Akzeptorsubstrat

## Ergebnisse und Diskussion

Da der Umsatz schlecht ist, die Affinität zu pC-CoA jedoch hoch, bestand die Vermutung, dass der  $K_m$ -Wert für 3AB sehr hoch sein muss. Bei einer Variation der 3AB-Konzentration zwischen 400  $\mu\text{M}$  und 16000  $\mu\text{M}$  ergab sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 2404  $\mu\text{M}$  (Abbildung 54). Die pC-CoA-Konzentration lag bei 42  $\mu\text{M}$ . Aus der Substratsättigungskurve kann die Sättigungskonzentration nicht eindeutig abgelesen werden.



**Abbildung 54:** Substratsättigungskurve für 3 AB mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat

Die Übertragung von Caf-CoA auf 3AB verläuft so langsam, dass eine Bestimmung der  $K_m$ -Werte nicht möglich war.

### 3.5.3.5. 3-Hydroxybenzoesäure

3-Hydroxybenzoesäure unterscheidet sich von 3-Aminobenzoesäure nur durch die Hydroxylgruppe in *meta*-Position. Es ist interessant zu sehen, welchen Einfluss der Wechsel der funktionellen Gruppe auf die Affinitäten der Substrate zum Enzym ausübt. Dass diese Substratkombination sehr schlecht von der CbHST umgesetzt wird, war aus den Zeitreihen bekannt. Alle Enzymtests zur Bestimmung der kinetischen Parameter mussten bei einer hohen Enzymkonzentration von 13,6  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt werden. Die Reaktionszeit belief sich auf 15 min.

#### 3.5.3.5.1. pC-CoA und Caf-CoA plus 3OHB

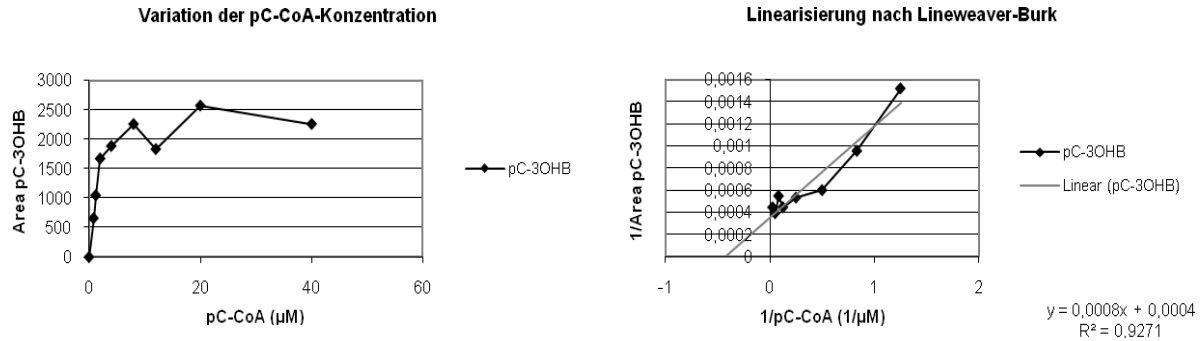
Um die  $K_m$ -Werte für pC-CoA und Caf-CoA zu ermitteln, wurden die Substratkonzentrationen in Bereichen von 1,2 mM bis 60  $\mu\text{M}$  (pC-CoA) und von 8  $\mu\text{M}$  bis 160  $\mu\text{M}$  (Caf-CoA) variiert, wobei 3OHB mit 12 mM in Sättigung vorlag. Die  $K_m$ -Werte berechneten sich zu 1,5  $\mu\text{M}$  (pC-



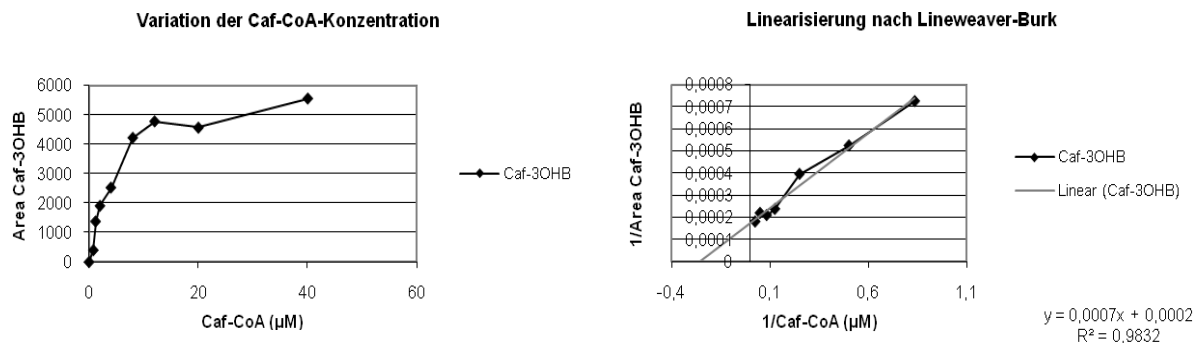
## Ergebnisse und Diskussion

CoA) und 5,1  $\mu\text{M}$  (Caf-CoA). In beiden Substratsättigungskurven (siehe Abbildung 55 für pC-CoA und

Abbildung 56 für Caf-CoA) lässt sich eine Sättigungskonzentration von 12  $\mu\text{M}$  ablesen.



**Abbildung 55:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit 3OHB als Akzeptorsubstrat

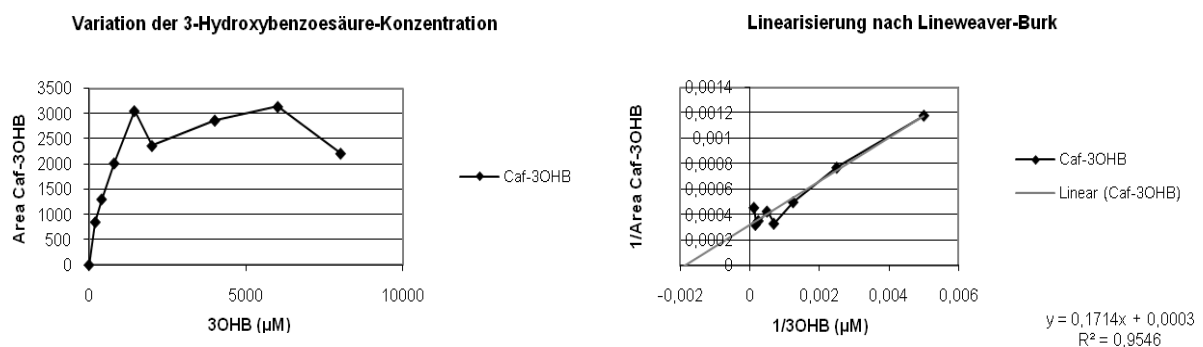
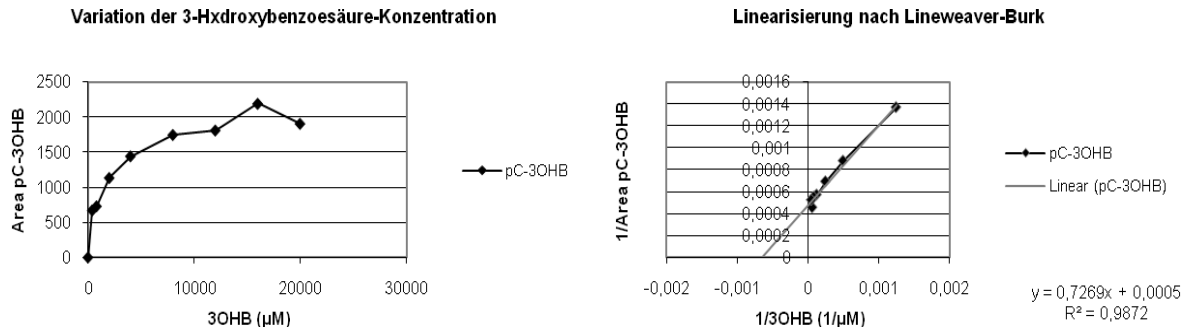


**Abbildung 56:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit 3OHB als Akzeptorsubstrat

### 3.5.3.5.2. 3OHB plus pC-CoA und Caf-CoA

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für 3OHB wurde die Substratkonzentration zwischen 120  $\mu\text{M}$  und 8000  $\mu\text{M}$  variiert, wobei die pC-CoA-Konzentration 42  $\mu\text{M}$  und die Caf-CoA-Konzentration 30  $\mu\text{M}$  betrug. Der apparente  $K_m$ -Wert für 3OHB in Kombination mit pC-CoA ist mit 1677  $\mu\text{M}$  hoch. Der Übergang in die Substratsättigung verläuft flach und ist bei 12 mM erreicht (Abbildung 57). Die Affinität von 3OHB zur CbHST ist sehr gering. Mit Caf-CoA als zweitem Substrat ist der Übergang in den Sättigungsbereich (4 mM) etwas steiler und der  $K_m$ -Wert von 733  $\mu\text{M}$  deutet auf eine höhere Affinität von 3OHB mit Caf-CoA hin (Abbildung 58).

## Ergebnisse und Diskussion



### 3.5.4. Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max}/K_m$ der CbRAS

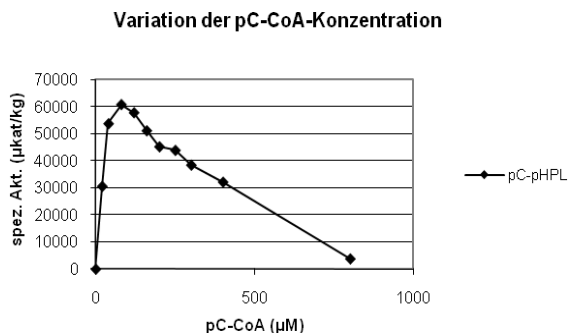
Die kinetischen Parameter der CbRAS sollten wie bei der CbHST genauer untersucht werden, um eine Aussage über die natürliche Substratkombination treffen zu können. Die Untersuchung des pH-Optimums (Kapitel 3.5.1.2) hatte gezeigt, dass der His-Tag einen Einfluss auf den optimalen pH-Wert hat. Es war von Interesse, ob der His-Tag auch die kinetischen Parameter der CbRAS beeinflusst. Dazu wurden die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für die vier Substrate pC-CoA, Caf-CoA pHPL und DHPL bestimmt. Einmal mit einer über His-Tag aufgereinigten CbRAS als 6xHis-Fusionsprotein und nochmals mit einer ebenfalls über His-Tag aufgereinigten heterolog exprimierten CbRAS, deren His-Tag abgespalten worden war. Die errechneten  $K_m$ -Werte der CbRAS mit His-Tag und der CbRAS ohne His-Tag werden im Ergebnisteil in einer Tabelle zusammengefasst.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.5.4.1. Untersuchung der Akzeptorsubstrate pHPL und DHPL

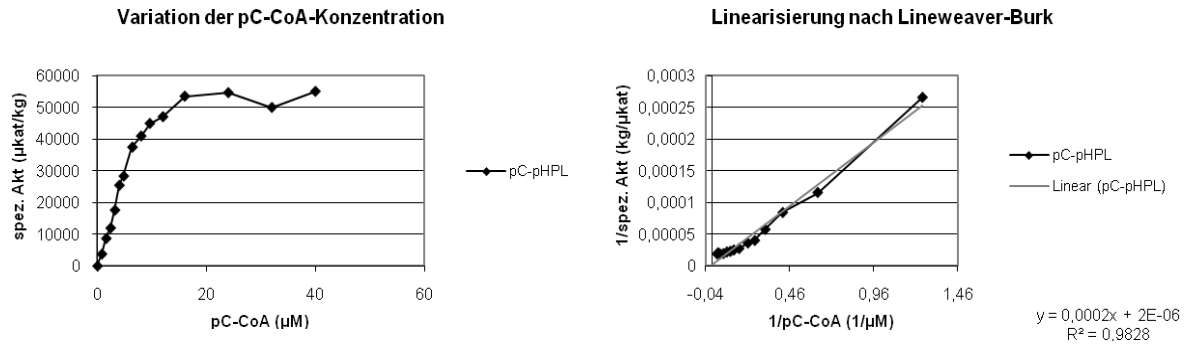
#### 3.5.4.1.1. pC-CoA plus pHPL

In einem Konzentrationsbereich von 0,8  $\mu\text{M}$  bis 40  $\mu\text{M}$  pC-CoA konnte bei einer Reaktionszeit von 1 min (RAS mit His-Tag) bzw. 1,5 min (RAS ohne His-Tag) und einer Enzymkonzentration von 1,68  $\mu\text{g/ml}$  (RAS mit His-Tag) bzw. 0,8  $\mu\text{g/ml}$  (RAS ohne His-Tag) im Test mit dem Substrat pHPL (4 mM) ein apparenter  $K_m$ -Wert von 9,2  $\mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) bzw. 4,7  $\mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag) bestimmt werden. Die Affinität von pC-CoA zum aktiven Zentrum wird in Anwesenheit des His-Tags erniedrigt. Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurde nur das Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk herangezogen, bei dem die Werte für kleine pC-CoA-Konzentrationen einen größeren Einfluss auf das Ergebnis ausüben. Bei Variation der pC-CoA-Konzentration zwischen 20 und 800  $\mu\text{M}$  pC-CoA ist eine starke Substratinhibition ab 120  $\mu\text{M}$  pC-CoA zu erkennen (Abbildung 59). Substratsättigung ist ab einer Konzentration von 16  $\mu\text{M}$  erreicht (Abbildung 60 und Abbildung 61).  $V_{\text{max}}$  errechnet sich zu 111 mkat/kg (RAS mit His-Tag) und 133 mkat/kg (RAS ohne His-Tag). Daraus resultiert ein  $V_{\text{max}}/K_m$ -Wert von 12065 mkat/kg mM (RAS mit His-Tag) und 28298 mkat/kg mM (RAS ohne His-Tag).

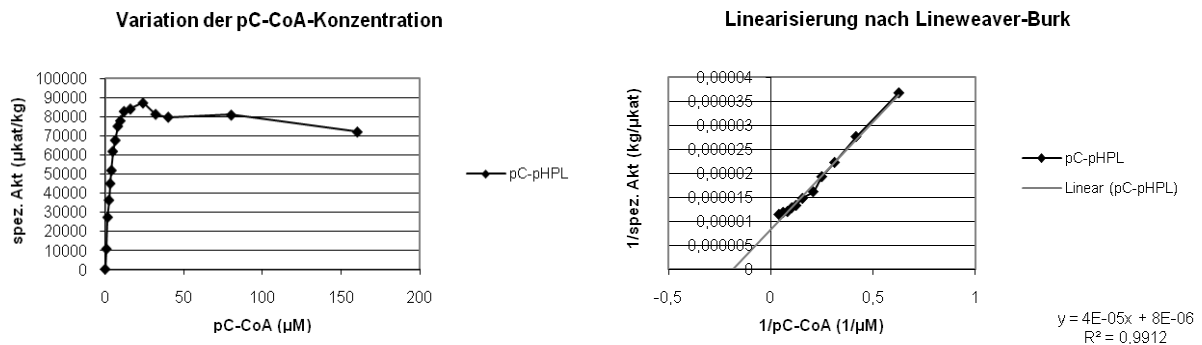


**Abbildung 59:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag: Substratinhibition

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 60:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

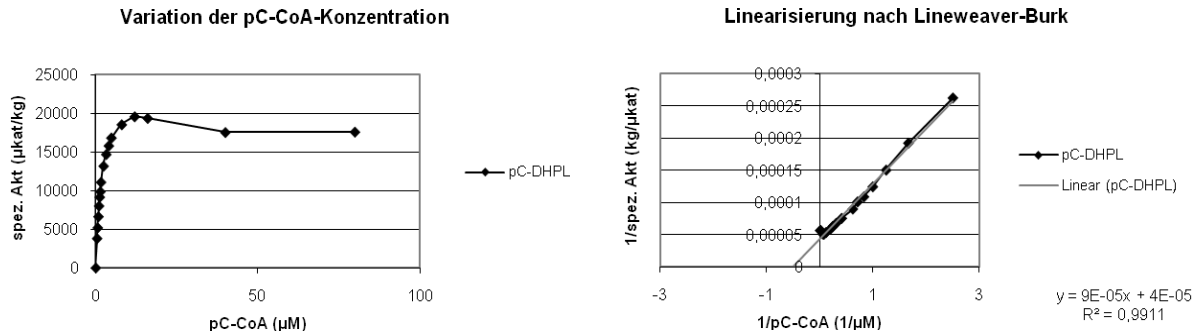


**Abbildung 61:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

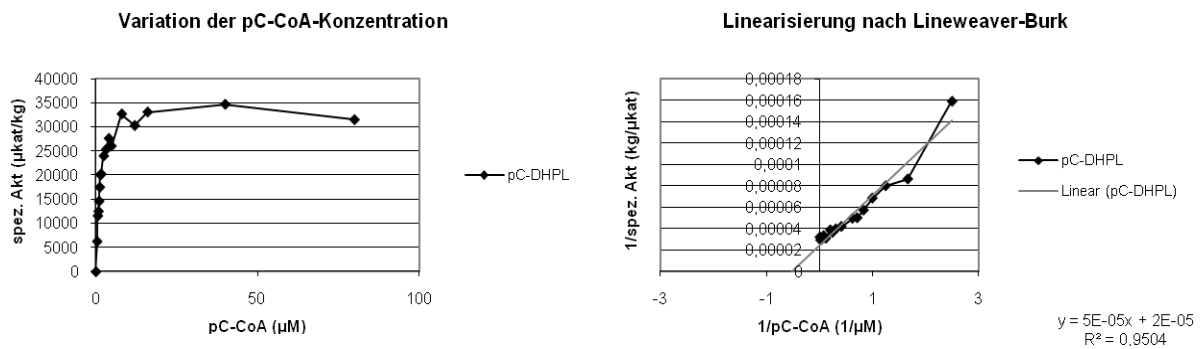
### 3.5.4.1.2. pC-CoA plus DHPL

Zur Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes für pC-CoA mit DHPL als zweitem Substrat wurde die pC-CoA-Konzentration in einem Bereich von 0,8 µM bis 40 µM (RAS mit His-Tag) bzw. 0,4 µM bis 80 µM variiert, wobei DHPL in einer Konzentration von 0,8 mM eingesetzt wurde. Mit 1,68 µg/ml CbRAS mit His-Tag wurden die Tests 1 min lang inkubiert. Die Reaktionszeit mit 0,4 µg/ml CbRAS ohne His-Tag belief sich auf 2 min. Die apparenten  $K_m$ -Werte für pC-CoA sind mit 1,8 µM (RAS mit His-Tag) und 1,3 µM (RAS ohne His-Tag) vergleichbar. Auch auf die  $V_{max}$ -Werte hat der His-Tag nur geringe Effekte. 32 mkat/kg werden mit der CbRAS mit His-Tag erreicht. Die Maximalgeschwindigkeit der CbRAS ohne His-Tag ist 33 mkat/kg. Die  $V_{max}/K_m$ -Werte errechnen sich zu 17500 mkat/kg mM für die CbRAS mit His-Tag und 25385 mkat/kg mM für die CbRAS ohne His-Tag. Die Substratsättigungskonzentration für pC-CoA mit DHPL als zweitem Substrat ist ab 12 µM erreicht (Abbildung 62 und Abbildung 63).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 62:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

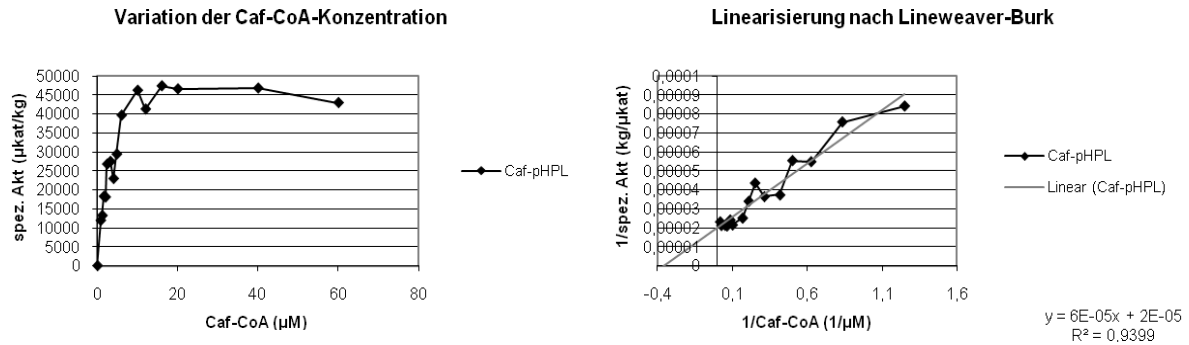


**Abbildung 63:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

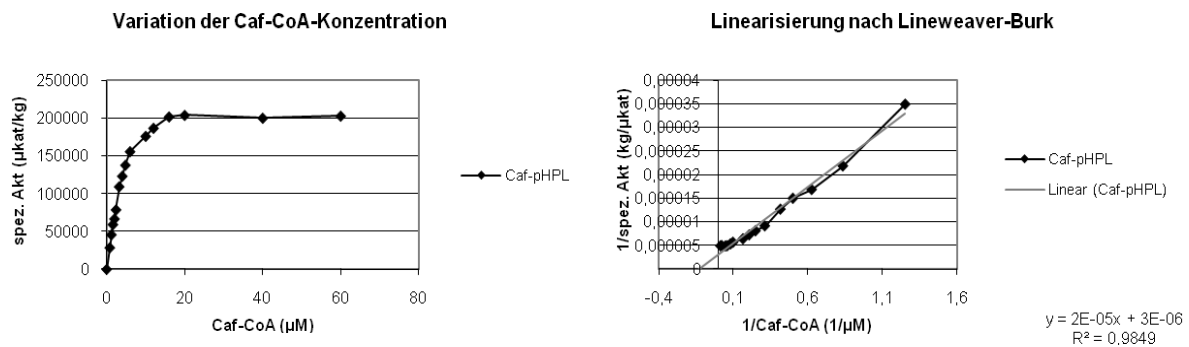
### 3.5.4.1.3. Caf-CoA plus pHPL

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für Caf-CoA mit konstanten 4 mM pHPL war bei einer Enzymkonzentration von 0,84 µg/ml (RAS mit His-Tag) bzw. 0,4 µg/ml (RAS ohne His-Tag) eine Reaktionszeit von 2 min bzw. 1,5 min ausreichend. Die apparenten  $K_m$ -Werte wurden durch Variation der Caf-CoA-Konzentration im Bereich zwischen 0,8 µM bis 60 µM zu 2,1 µM für die CbRAS mit His-Tag und 3,4 µM für die CbRAS ohne His-Tag ermittelt. Trotz ähnlicher  $K_m$ -Werte sind die  $V_{max}$ -Werte sowie die errechneten  $V_{max}/K_m$ -Werte für die CbRAS ohne His-Tag deutlich erhöht: 41 mkat/kg und 19524 mkat/kg mM für die RAS mit His-Tag versus 195 mkat/kg und 57353 mkat/kg mM für die CbRAS ohne His-Tag. Die Substratsättigungskonzentration liegt bei 16 µM Caf-CoA (Abbildung 64 und Abbildung 65).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 64:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His Tag

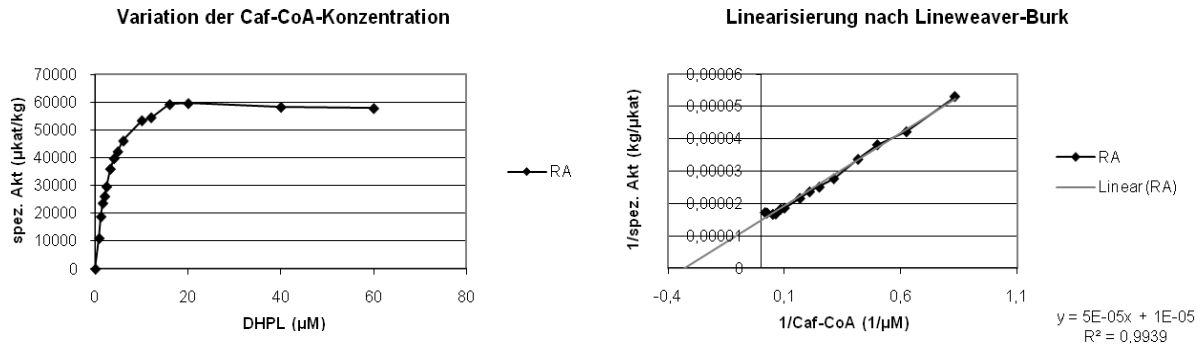


**Abbildung 65:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His Tag

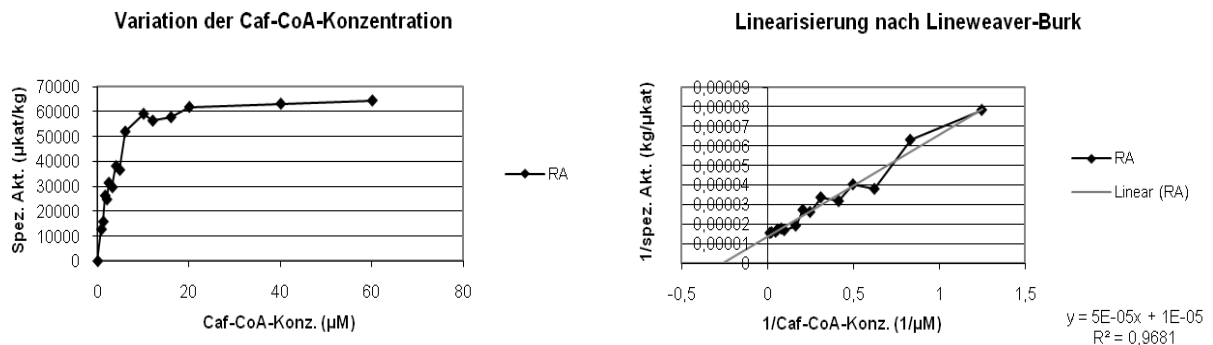
### 3.5.4.1.4. Caf-CoA plus DHPL

Die kinetischen Parameter für Caf-CoA in Kombination mit DHPL (0,8 mM) wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,8  $\mu\text{M}$  bis 40  $\mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) bzw. 60  $\mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag) bestimmt. Die apparenten  $K_m$ -Werte für Caf-CoA betragen 3,9  $\mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) und 4,0  $\mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag). Zur biochemischen Charakterisierung der CbRAS mit His-Tag wurde bei einer Reaktionszeit von 1,5 min eine Enzymkonzentration von 1,68  $\mu\text{g}/\text{ml}$  im Test eingehalten. Wurde die CbRAS ohne His-Tag in einer Proteinkonzentration von 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt, betrug die Inkubationszeit exakt 1,5 min. In den Substratsättigungskurven (Abbildung 66 und Abbildung 67) ist zu erkennen, dass Substratsättigung ab 16  $\mu\text{M}$  Caf-CoA erreicht ist.  $V_{\text{max}}$  errechnet sich für die CbRAS mit His-Tag zu 51,5 mkat/kg,  $V_{\text{max}}/K_m$  ist 13205 mkat/kg mM, für die CbRAS ohne His-Tag liegt der Wert für  $V_{\text{max}}$  deutlich höher bei 104,5,  $V_{\text{max}}/K_m$  ist 26125 mkat/kg mM.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 66:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



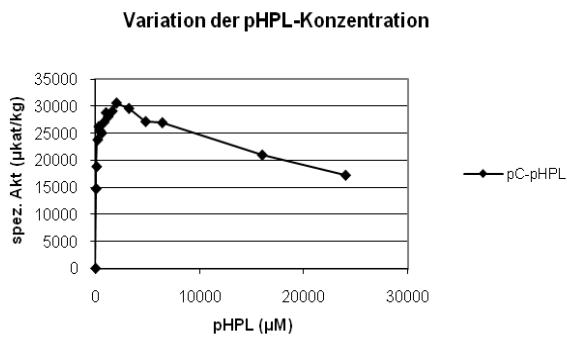
**Abbildung 67:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

### 3.5.4.1.5. pHPL plus pC-CoA

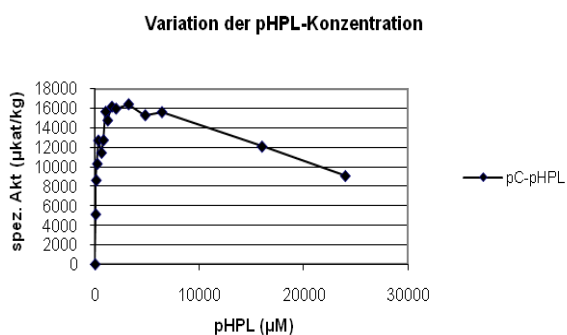
Um den  $K_m$ -Wert für pHPL in Kombination mit pC-CoA (52 µM) zu bestimmen, wurde die pHPL-Konzentration zunächst in einem großen Bereich von 50 µM bis 24000 µM variiert. Die Proteinkonzentrationen lagen bei 0,8 µg/ml (RAS mit His-Tag) bzw. 1,68 µg/ml (RAS ohne His-Tag) und die Inkubationszeit betrug 1,5 min. Die Substratsättigungskurven zeigen eine deutliche Substratinhibition ab einer pHPL-Konzentration von 3200 µM (Abbildung 68 und Abbildung 69). Daher gingen in die Berechnung der  $K_m$ -Werte lediglich die Werte bis zu einer pHPL-Konzentration von 4800 µM ein, wobei Substratsättigung ab 800 µM erreicht war. Der His-Tag beeinflusst die Affinität von pHPL zum Enzym nur wenig, wenn pC-CoA das zweite Substrat ist (Abbildung 70 und Abbildung 71). Mit 25 µM (RAS mit His-Tag) und 39 µM (RAS ohne His-Tag) wurden ähnliche Werte erhalten. Da pC-pHPL als externer Standard zur Verfügung stand, konnten die  $V_{max}$ -Werte berechnet werden. Für die CbRAS ergab sich eine

## Ergebnisse und Diskussion

Maximalgeschwindigkeit von 20,5 mkat/kg, für die CbRAS ohne His-Tag von 37,5 mkat/kg. Die berechneten Maximalgeschwindigkeiten mit pC-CoA und pHPL in den Enzymtests zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pHPL und in den Enzymtests zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pC-CoA unterscheiden sich deutlich. Die einzige plausible Erklärung für dieses Phänomen ist die starke Substratinhibition durch pHPL.



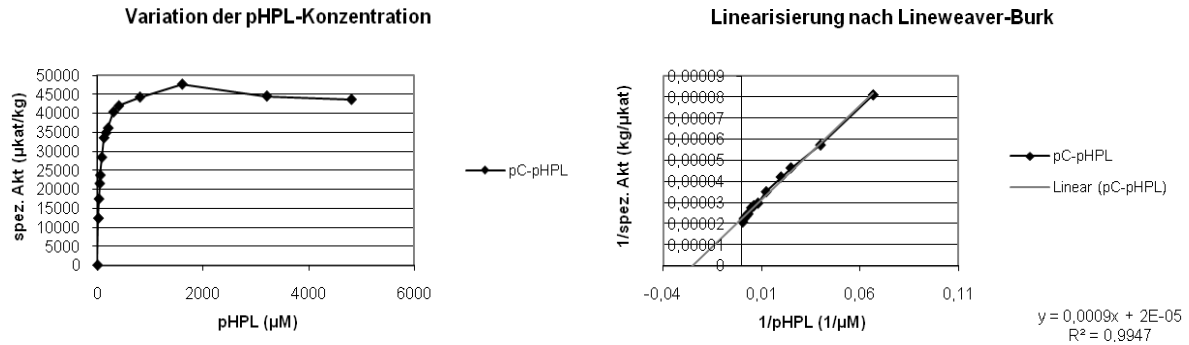
**Abbildung 68:** Substratsättigungskurve für pHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag: Substratinhibition



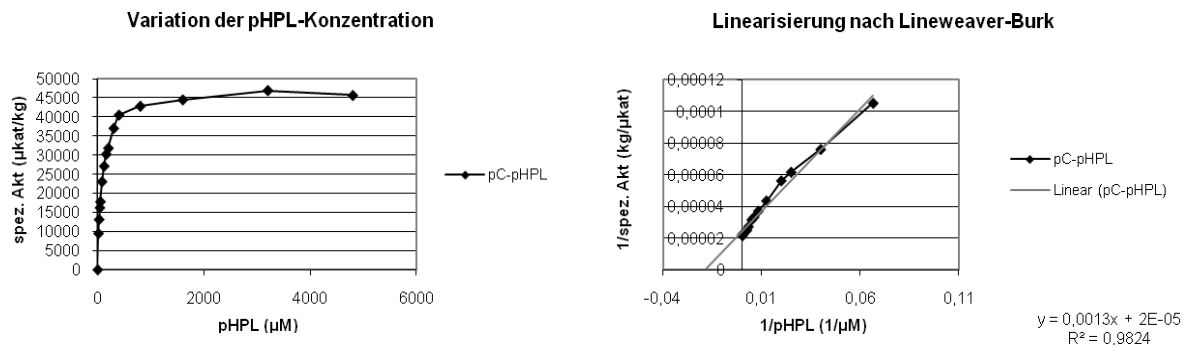
**Abbildung 69:** Substratsättigungskurve für pHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag: Substratinhibition



## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 70:** Substratsättigungskurve für pHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His Tag

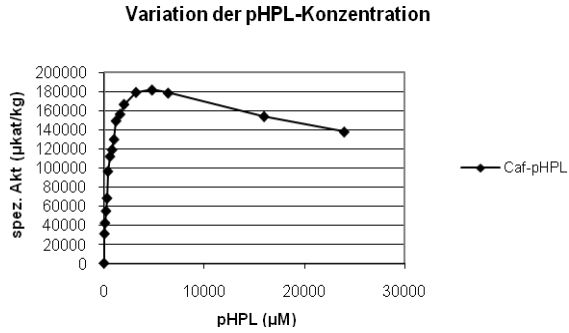


**Abbildung 71:** Substratsättigungskurve für pHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

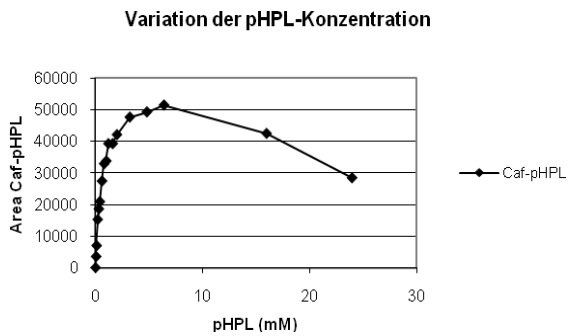
### 3.5.4.1.6. pHPL plus Caf-CoA

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pHPL in Kombination mit Caf-CoA wurden identische Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten verwendet wie in den Enzymtests zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für Caf-CoA in Kombination mit pHPL. Caf-CoA wurde in Substratsättigungskonzentration eingesetzt (18 µM). Die pHPL-Konzentration wurde zunächst im großen Konzentrationsbereich von 50 µM bis 24000 µM variiert, um in der Substratsättigungskurve erkennen zu können, dass Substratsättigung ab 3200 µM pHPL erreicht ist und ab 6400 µM eine starke Substratinhibition zu erkennen ist (Abbildung 72 und Abbildung 73). In die Berechnung der kinetischen Parameter wurden pHPL-Konzentrationen bis 4800 µM einbezogen (Abbildung 74 und Abbildung 75). Für die CbRAS mit His-Tag ergibt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 163 µM,  $V_{max}$  erreicht einen Wert von 176,5 mkat/kg und  $V_{max}/K_m$  errechnet sich zu 1083 mkat/kg mM. Die Affinität von pHPL in Anwesenheit von Caf-CoA zum aktiven Zentrum wird durch den His-Tag leicht erhöht. Für die CbRAS ohne His-Tag ergibt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 219 µM. Die erreichte Maximalgeschwindigkeit ist ohne His-Tag niedriger (102 mkat/kg).  $V_{max}/K_m$  errechnet sich zu 466 mkat/kg mM. Demnach sind pC-CoA und pHPL die bevorzugte Substratkombination der CbRAS ohne His-Tag.

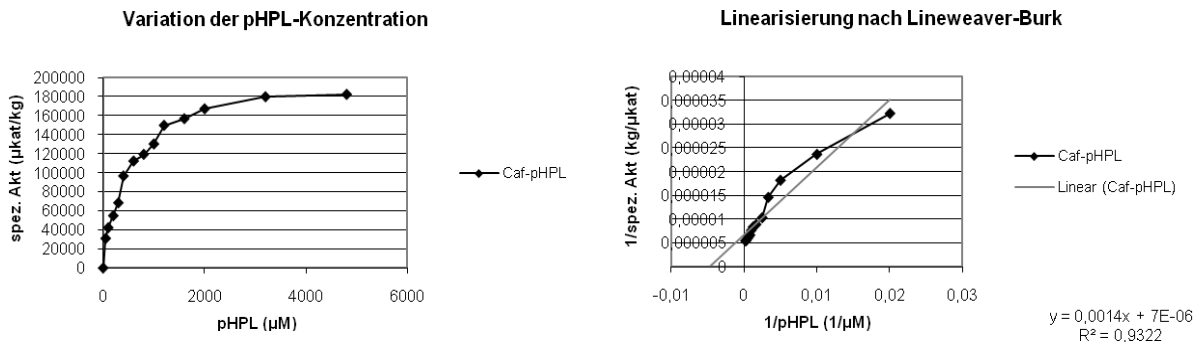
# Ergebnisse und Diskussion



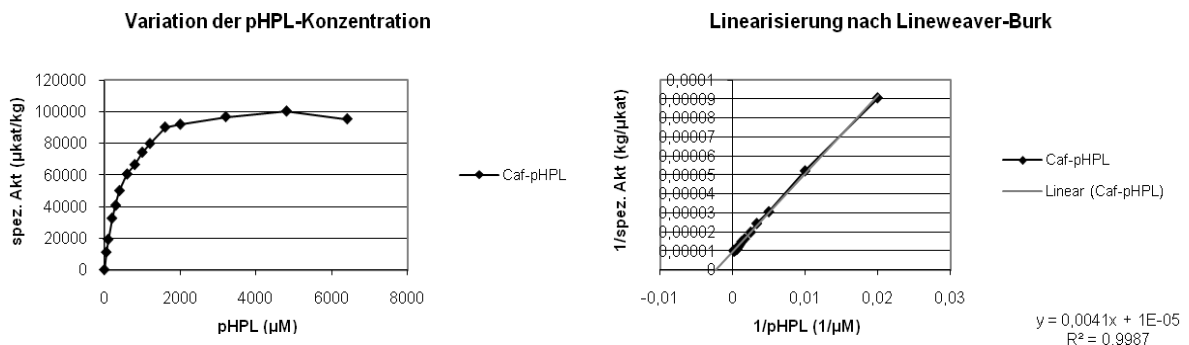
**Abbildung 72:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag: Substratinhibition



**Abbildung 73:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag: Substratinhibition



**Abbildung 74:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

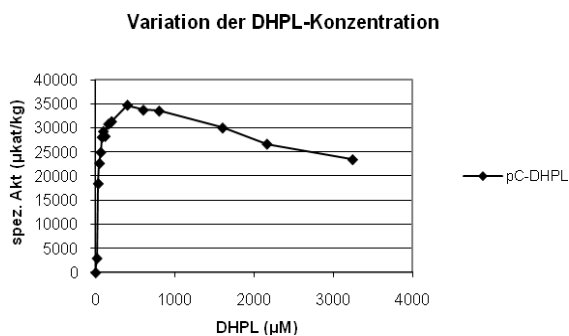


## Ergebnisse und Diskussion

**Abbildung 75:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

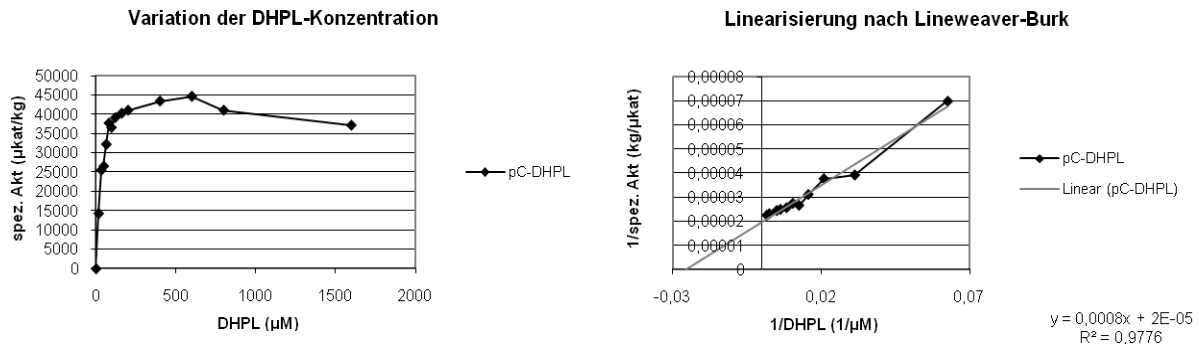
### 3.5.4.1.7. DHPL plus pC-CoA

Der apparente  $K_m$ -Wert für DHPL mit pC-CoA als zweitem Substrat ist  $35 \mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) bzw.  $53 \mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag). DHPL wurde in einem Konzentrationsbereich von  $16 \mu\text{M}$  bis  $1600 \mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) bzw.  $3240 \mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag) variiert. Der pC-CoA-Gehalt wurde mit  $16 \mu\text{M}$  in Sättigung gehalten. Die CbRAS mit His-Tag hatte in den Enzymtests, die 2 min inkubiert wurden, eine Endkonzentration von  $1,68 \mu\text{g/ml}$ , während die CbRAS ohne His-Tag 4 min lang reagierte und eine Konzentration von  $0,4 \mu\text{g/ml}$  aufwies. Die weiteren kinetischen Parameter wurden für die CbRAS mit His-Tag ( $V_{\max}$ :  $23,5 \text{ mkat/kg}$  und  $V_{\max}/K_m$ :  $671 \text{ mkat/kg mM}$ ) und die CbRAS ohne His-Tag ( $V_{\max}$ :  $33,5 \text{ mkat/kg}$  und  $V_{\max}/K_m$ :  $598 \text{ mkat/kg mM}$ ) bestimmt. Der His-Tag übt keinen großen Effekt aus. Substratsättigung ist ab  $600 \mu\text{M}$  erreicht, wie aus den Substratsättigungskurven zu erkennen ist (Abbildung 77 und Abbildung 78). Substratinhibition ist ab  $1500 \mu\text{M}$  DHPL zu erkennen (Abbildung 76).

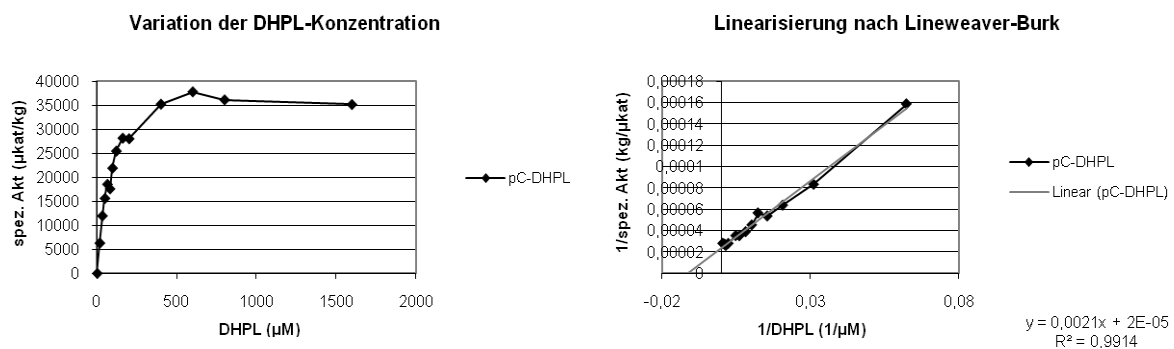


**Abbildung 76:** Substratsättigungskurve für DHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag: Substratinhibition

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 77:** Substratsättigungskurve für DHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



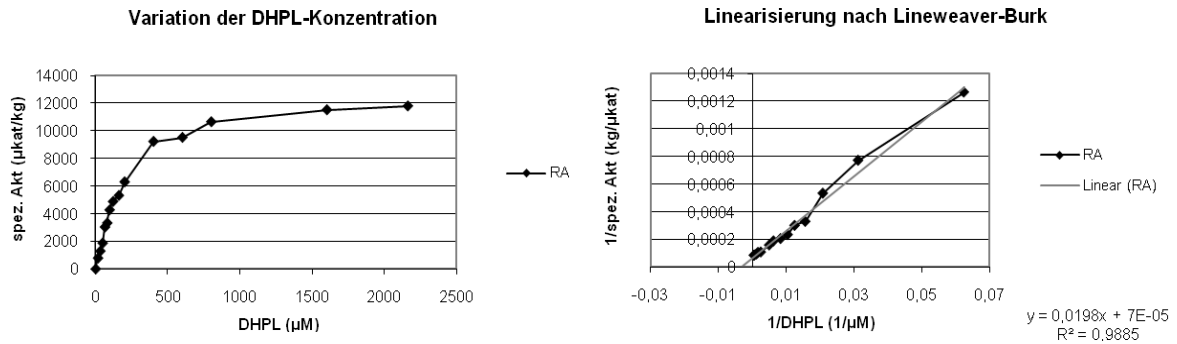
**Abbildung 78:** Substratsättigungskurve für DHPL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

### 3.5.4.1.8. DHPL plus Caf-CoA

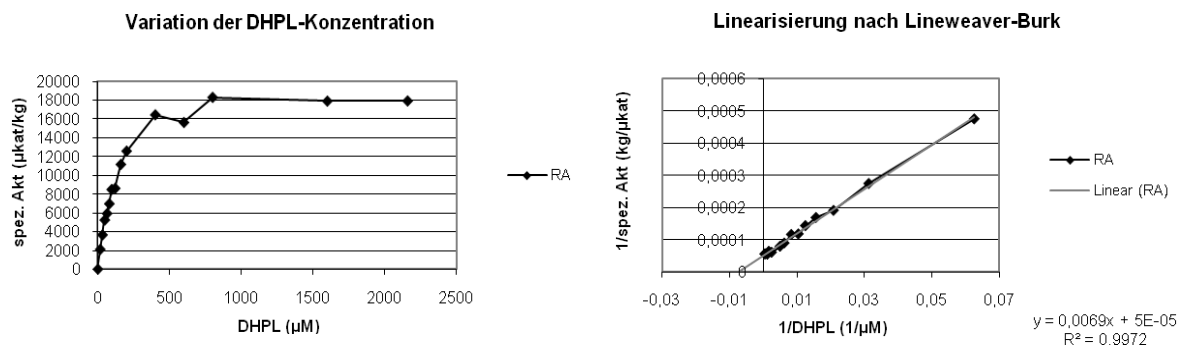
Werden Caf-CoA und DHPL verestert, so entsteht direkt Rosmarinsäure. Es ist interessant zu wissen, ob diese Reaktion von der CbRAS bevorzugt katalysiert wird. Aus den bisherigen Enzymtests war bekannt, dass sowohl pC-CoA und Caf-CoA sehr effektiv auf pHPL und DHPL übertragen werden können. Die Enzymtests wurden auf eine Proteinkonzentration von 1,68  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CbRAS mit His-Tag eingestellt und nach 2 min abgestoppt. Die Enzymtests, die mit der CbRAS ohne His-Tag durchgeführt wurden, wiesen eine Proteinkonzentration von 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf. Eine Reaktionszeit von 1,5 min war hierbei ausreichend. Caf-CoA wurde in einer Konzentration von 12  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Es resultiert ein apparenter  $K_m$ -Wert für DHPL von 193  $\mu\text{M}$  (RAS mit His-Tag) und 132  $\mu\text{M}$  (RAS ohne His-Tag). Die Affinität von DHPL zum aktiven Zentrum ist sowohl mit als auch ohne His-Tag in Kombination mit Caf-CoA geringer als mit pC-CoA. Dass in *in vivo* Caf-CoA und DHPL zu Rosmarinsäure umgesetzt werden, erscheint unwahrscheinlich und ist von der Verfügbarkeit dieser Substrate beeinflusst. Die erreichte Maximalgeschwindigkeit ist mit 13  $\text{mkat}/\text{kg}$  (RAS mit His-Tag) bzw. 20,5  $\text{mkat}/\text{kg}$  (RAS ohne His-Tag) vergleichsweise niedrig. Die niedrigen  $V_{\text{max}}/K_m$ -Werte (67  $\text{mkat}/\text{kg}$  mM

## Ergebnisse und Diskussion

für die CbRAS mit His-Tag und 155 mkat/kg mM für die CbRAS ohne His-Tag) sprechen dafür, dass es sich hierbei nicht um die bevorzugte Substratkombination der CbRAS handelt. Substratsättigung für DHPL wird in Kombination mit pC-CoA ab 800  $\mu\text{M}$  erreicht (siehe Abbildung 79 und Abbildung 80).



**Abbildung 79:** Substratsättigungskurve für DHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



**Abbildung 80:** Substratsättigungskurve für DHPL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS ohne His-Tag

### 3.5.4.1.9. Zusammenstellung der $K_m$ -Werte der CbRAS mit und ohne His-Tag

Der His-Tag übt nur einen recht geringen Effekt auf die Affinitäten der getesteten Substrate zum aktiven Zentrum aus. Unter den vier besten Substraten konnte die bevorzugte Substratkombination gefunden werden (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Mit der **RAS mit His-Tag** wurden weitere  $K_m$ -Werte für Substrate bestimmt (siehe Kapitel 3.5.4.1.10 ff.), die weniger effizient umgesetzt werden. Dies war anhand der Zeitreihen zu erkennen.

**variiertes Substrat**    **Konstant gehaltenes Substrat pHPL**    **Konstant gehaltenes Substrat DHPL**

## *Ergebnisse und Diskussion*

	<b>K<sub>m</sub> (µM)</b>	<b>K<sub>m</sub> (µM)</b>
pC-CoA	9,2 (4,7)	1,8 (1,3)
Caf-CoA	2,1 (3,4)	3,9 (4,0)

**Tabelle 5:** K<sub>m</sub>-Werte für die CoA-aktivierten Säuren mit pHPL oder DHPL als konstant gehaltenem Substrat, RAS mit His-Tag und RAS ohne His-Tag. Die K<sub>m</sub>-Werte die mit der RAS ohne His-Tag bestimmt wurden, sind eingeklammert

<b>variiertes Substrat</b>	<b>Konstant gehaltenes Substrat pC-CoA</b>	<b>Konstant gehaltenes Substrat Caf-CoA</b>
	<b>K<sub>m</sub> (µM)</b>	<b>K<sub>m</sub> (µM)</b>
pHPL	25 (39)	163 (219)
DHPL	35 (56)	193 (132)

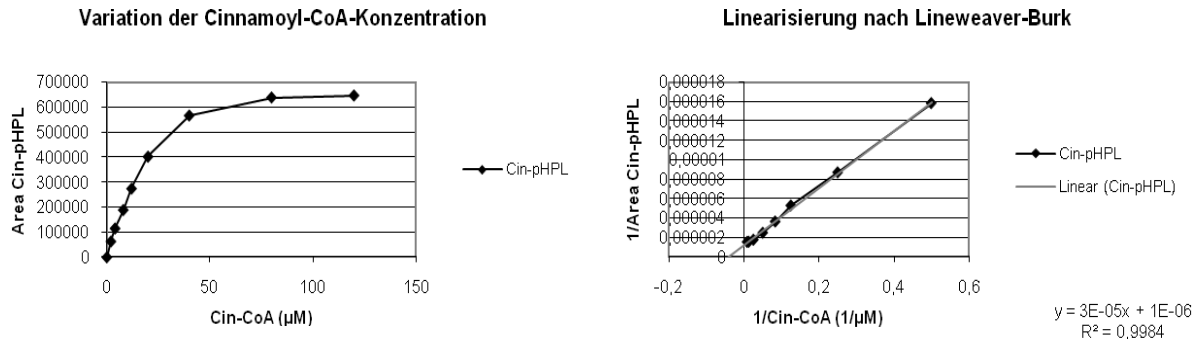
**Tabelle 6:** K<sub>m</sub>-Werte für die Akzeptorsubstrate pHPL und DHPL mit pC-CoA oder Caf-CoA als konstant gehaltenem Substrat, RAS mit His-Tag und RAS ohne His-Tag, die K<sub>m</sub>-Werte die mit der RAS ohne His-Tag bestimmt wurden, sind eingeklammert

### 3.5.4.1.10. Cin-CoA plus pHPL/DHPL

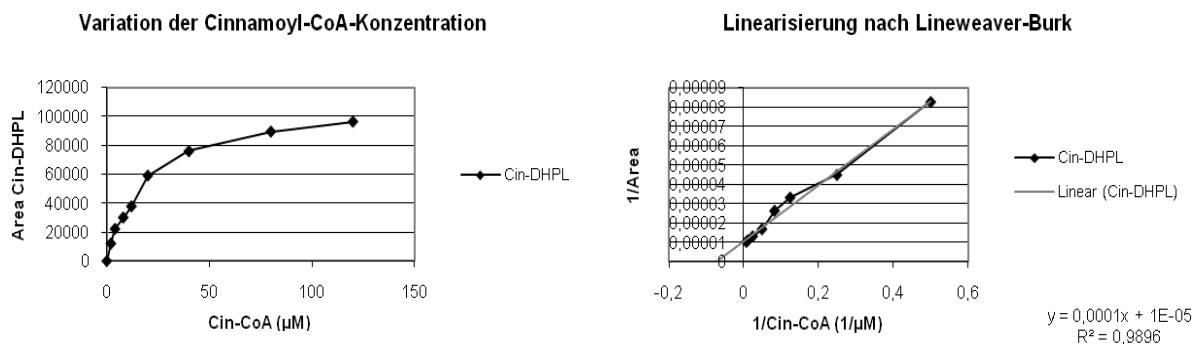
Zunächst sollte anhand der kinetischen Parameter gezeigt werden, dass Cin-CoA nicht sehr effektiv von der CbRAS umgesetzt wird. Theoretisch wäre es denkbar, dass Cin-pHPL die natürliche Substratkombination der CbRAS ist. Wäre dies der Fall, müsste ein alternativer Biosyntheseweg postuliert werden.

Anhand der Zeitreihe war bekannt, dass Cin-CoA und pHPL nicht so effektiv umgesetzt werden wie Caf-CoA oder pC-CoA mit pHPL oder DHPL. Der apparente K<sub>m</sub>-Wert für Cin-CoA ist mit 25,5 µM in Kombination mit pHPL und 15,8 µM mit DHPL deutlich größer als mit pC-CoA oder Caf-CoA. Die Affinität von Cin-CoA zum aktiven Zentrum der CbRAS ist demnach recht gering. Zur Ermittlung dieses Wertes wurde die Cin-CoA-Konzentration ab 2 µM sukzessive auf 120 µM erhöht, wobei die pHPL-Konzentration (4 mM) und die DHPL-Konzentration (320 µM) konstant gehalten wurden. Es war eine Proteinkonzentration von 3,36 µg/ml und eine Reaktionszeit von 2 min erforderlich. Die Sättigungskonzentration von Cin-CoA wird mit etwa 80 µM recht spät erreicht (Abbildung 81 und Abbildung 82).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 81:** Substratsättigungskurve für Cin-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

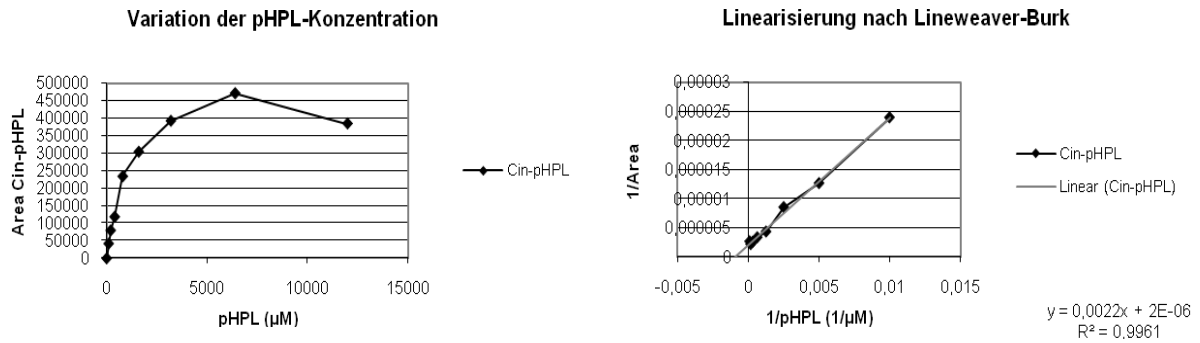


**Abbildung 82:** Substratsättigungskurve für Cin-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

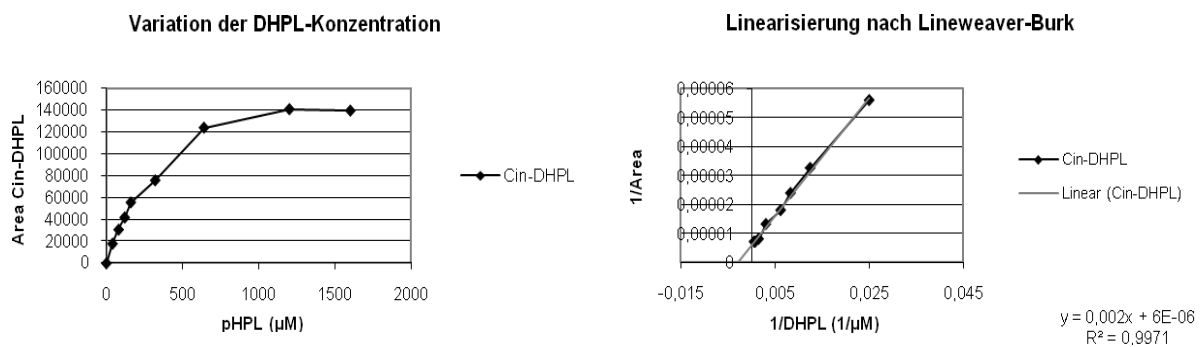
### 3.5.4.1.11. pHPL/DHPL plus Cin-CoA

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pHPL und DHPL in Kombination mit Cin-CoA wurden deren Konzentrationen in einem Bereich von 100 µM bis 12 mM (pHPL) bzw. 40 µM bis 1600 µM (DHPL) variiert. Cin-CoA wurde auf 51 µM eingestellt, Enzymkonzentration (3,36 µg/ml) und Reaktionszeit (2 min) waren identisch. Wie in der Substratsättigungskurve für pHPL zu sehen ist, tritt hier wieder eine Substrathemmung auf (Abbildung 83). Für DHPL liegt ab 1200 µM Substratsättigung vor (Abbildung 84). Die Affinität von pHPL und DHPL ist im Kombination mit Cin-CoA deutlich geringer als mit anderen CoA-aktivierten Säuren (apparenter  $K_m$ -Wert: 550 µM für pHPL; 340 µM für DHPL).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 83:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Cin-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



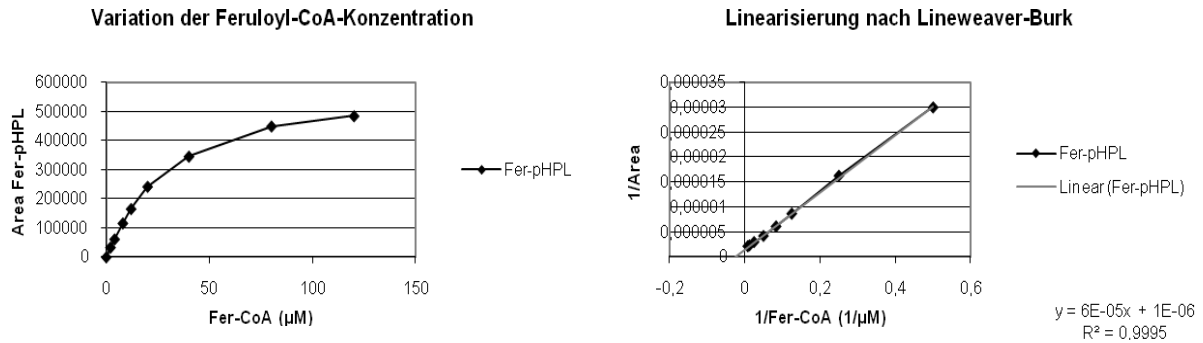
**Abbildung 84:** Substratsättigungskurve für DHPL mit Cin-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

### 3.5.4.1.12. Fer-CoA plus pHPL/DHPL

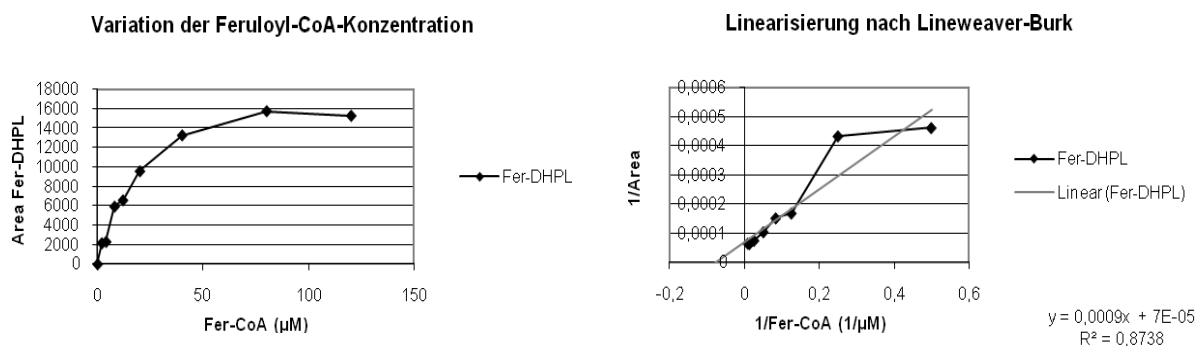
Auch wenn Fer-CoA nicht als natürliches Intermediat der Rosmarinsäurebiosynthese diskutiert wird und die Reaktion im Standardzymtest nicht nachweisbar ist, sollen die  $K_m$ -Werte für dieses Substrat bestimmt werden. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration auf 16,8 µg/ml im Test war eine Reaktionszeit von 2 min weiterhin ausreichend. Fer-CoA wurde in einem Konzentrationsbereich von 2 µM bis 120 µM variiert. pHPL wurde auf 4 mM und DHPL auf 400 µM eingestellt. Der apparente  $K_m$ -Wert für Fer-CoA ist 36,4 µM in Kombination mit pHPL. Ist DHPL das zweite Substrat, errechnet sich der apparente  $K_m$ -Wert für Fer-CoA mit 19,1 µM. Die Affinität von Fer-CoA zum aktiven Zentrum der CbRAS ist recht niedrig. Wie in den Substratsättigungskurven zu erkennen ist, wird Sättigung für Fer-CoA ab 120 µM erreicht (Abbildung 85 und Abbildung 86).



## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 85:** Substratsättigungskurve für Fer-CoA mit pHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



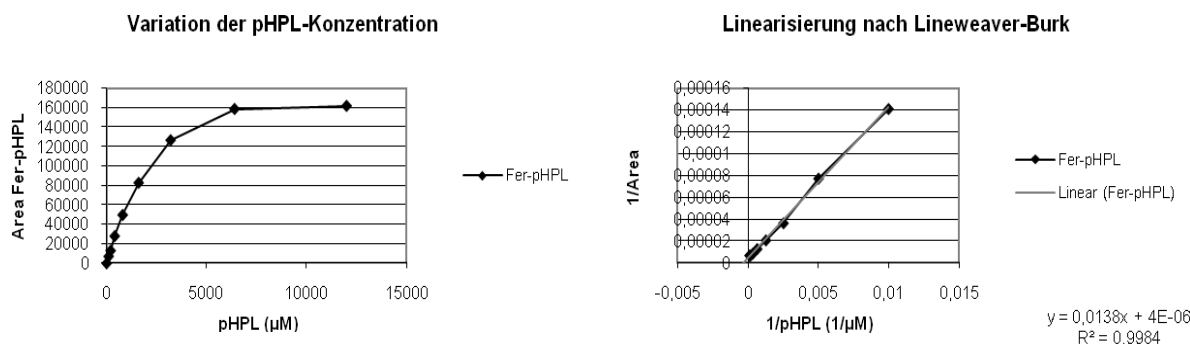
**Abbildung 86:** Substratsättigungskurve für Fer-CoA mit DHPL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

### 3.5.4.1.13. pHPL/DHPL plus Fer-CoA

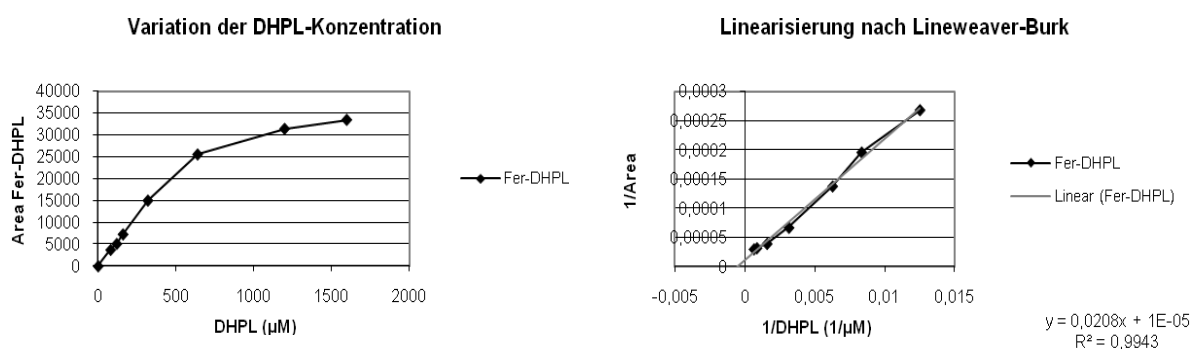
Zur Bestimmung der apparenten  $K_m$ -Werte für pHPL und DHPL in Kombination mit Fer-CoA wurde die CbRAS in einer Enzymkonzentration von 16,8 µg/ml im Test eingesetzt und eine Reaktionszeit von 2 min eingehalten. pHPL wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 µM und 12 mM und DHPL zwischen 80 µM und 16 mM variiert. Fer-CoA wurde in einer Konzentration von 48 µM eingesetzt.

Die apparenten  $K_m$ -Werte der Akzeptorsubstrate (1425 µM für pHPL; 1300 µM für DHPL) sind drastisch erhöht. In Kombination mit Fer-CoA ist die Affinität der Akzeptorsubstrate zum aktiven Zentrum so gering, dass hiermit die langsame Reaktionsgeschwindigkeit begründet werden kann. Wie aus den Substratsättigungskurven (siehe Abbildung 87 und Abbildung 88) zu erkennen ist, wird Sättigung für pHPL ab 6400 µM und für DHPL ab 1200 µM erreicht.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 87:** Substratsättigungskurve für pHPL mit Fer-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



**Abbildung 88:** Substratsättigungskurve für DHPL mit Fer-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

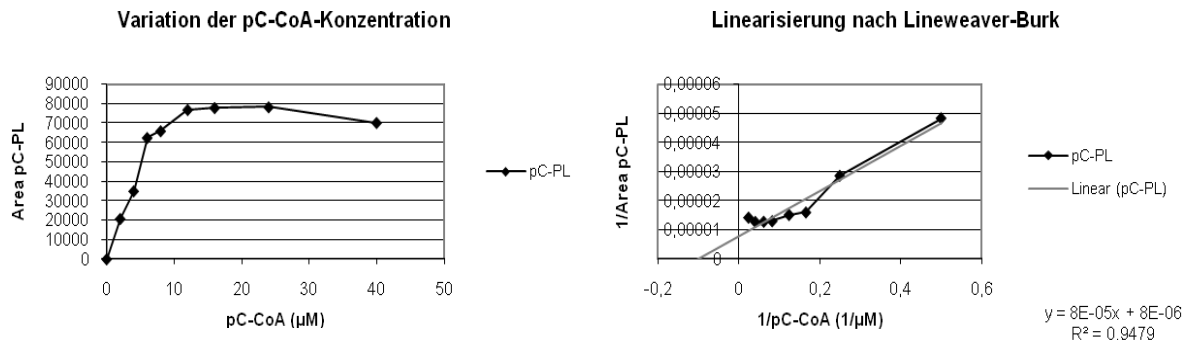
### 3.5.4.2. Weitere Akzeptoren: Phenyllactat

#### 3.5.4.2.1. pC-CoA, Caf-CoA und Cin-CoA plus Phenyllactat

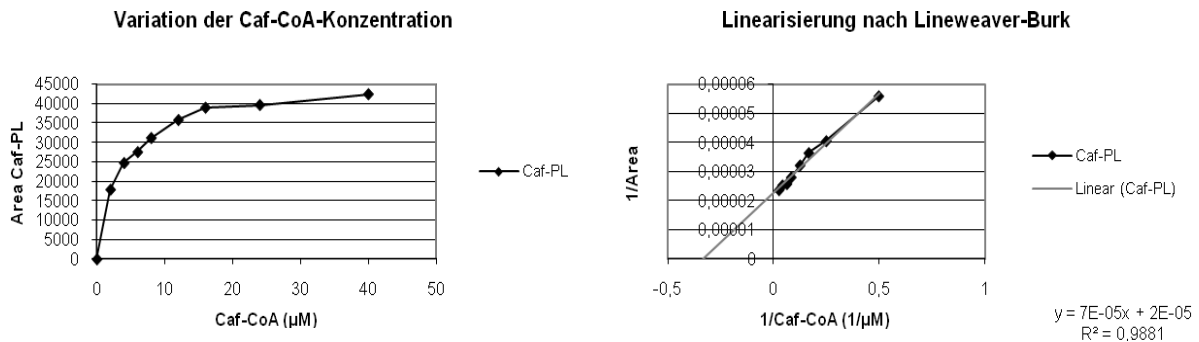
Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte für pC-CoA, Caf-CoA und Cin-CoA mit 4 mM PL als zweitem Substrat, wurden die CoA-aktivierten Säuren in einem Bereich von 2 µM bis 40 µM (pC-CoA und Caf-CoA) oder 120 µM (Cin-CoA) variiert. Während für eine Inkubationszeit von 20 min in den Enzymtests mit pC-CoA und Caf-CoA eine Proteinkonzentration von 3,36 µg/ml eingesetzt wurde, musste in den Proben mit Cin-CoA die Enzymkonzentration auf 6,72 µg/ml erhöht werden. Für pC-CoA ergibt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 10,5 µM. In Anwesenheit von PL ist die Affinität des Substrats pC-CoA vergleichsweise niedrig. Für Caf-CoA ergibt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 3,5 µM. Die Affinität von Caf-CoA ist ähnlich hoch wie mit DHPL als Reaktionspartner. Cin-CoA hat erwartungsgemäß einen hohen  $K_m$ -Wert (52,9 µM). Cin-CoA und PL werden von der CbRAS nicht sehr gut verestert. Sättigungskonzentrationen werden mit PL bei 12 µM für pC-CoA (Abbildung 89), 16 µM für Caf-CoA (Abbildung 90) und

## Ergebnisse und Diskussion

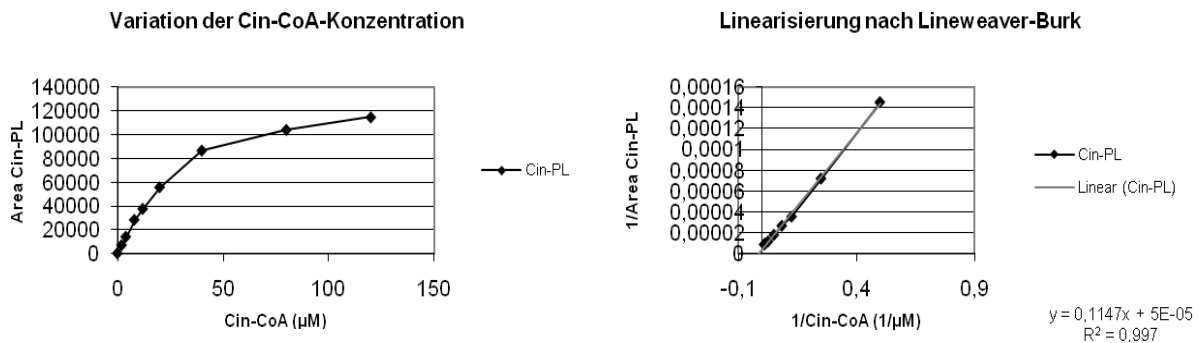
80  $\mu\text{M}$  für Cin-CoA (Abbildung 91) erreicht. Die Sättigungskonzentrationen entsprechen den Sättigungskonzentrationen, die auch mit DHPL ermittelt werden konnten.



**Abbildung 89:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit PL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



**Abbildung 90:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit PL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



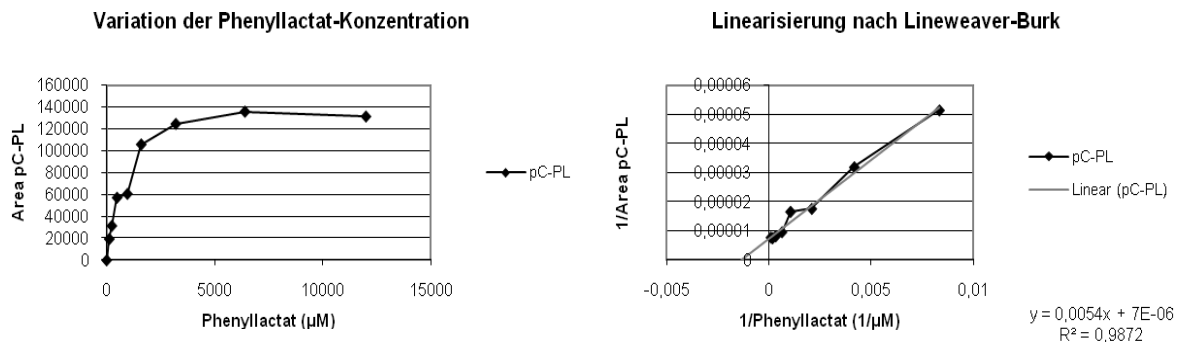
**Abbildung 91:** Substratsättigungskurve für Cin-CoA mit PL als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

### 3.5.4.2.2. Phenyllactat plus pC-CoA, Caf-CoA und Cin-CoA

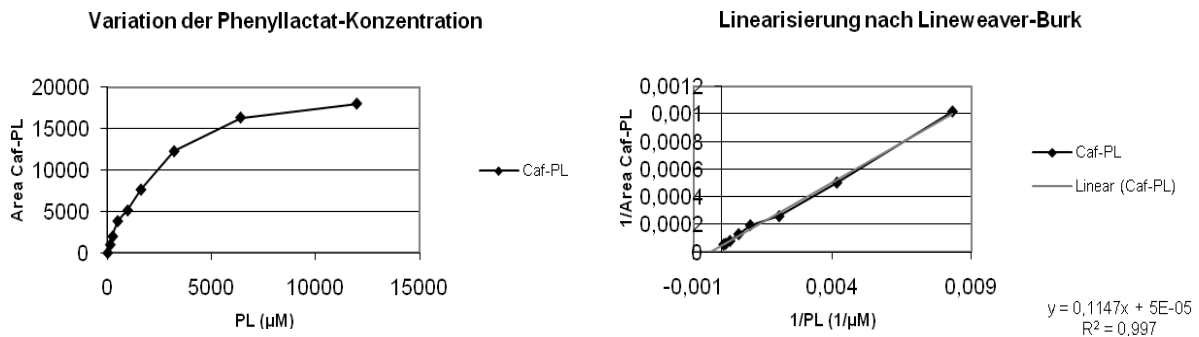
Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte für PL mit den unterschiedlichen CoA-aktivierten Säuren, wurde PL in Konzentrationen von 120  $\mu\text{M}$  bis 12 mM in die Tests pipettiert, während pC-CoA (42  $\mu\text{M}$ ) und Caf-CoA (30  $\mu\text{M}$ ) in Sättigungskonzentration vorlagen. Die CbRAS wurde in einer Endkonzentration von 3,36  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt und die Reaktion nach 20 min abgestoppt. War Cin-CoA mit 51  $\mu\text{M}$  das konstant gehaltene Substrat, wurde PL in einem

## Ergebnisse und Diskussion

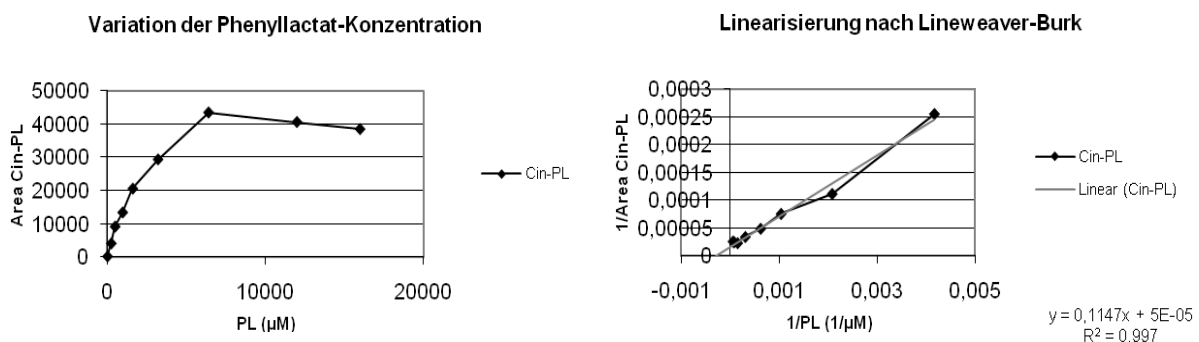
Konzentrationsbereich von 240  $\mu\text{M}$  bis 16 mM in die Tests pipettiert. Bei einer Enzymkonzentration von 8,4  $\mu\text{g/ml}$  wurde 15 min inkubiert. Die Affinität von PL zum Enzym ist extrem niedrig, dabei ist es gleichgültig, welches der Reaktionspartner ist. Die apparenten  $K_m$ -Werte für PL sind 490  $\mu\text{M}$  mit pC-CoA (Abbildung 92), 1035  $\mu\text{M}$  mit Caf-CoA (Abbildung 93) und 1346  $\mu\text{M}$  mit Cin-CoA (Abbildung 94). Die Sättigungskonzentrationen belaufen sich für PL auf 3200  $\mu\text{M}$  mit pC-CoA und 6400  $\mu\text{M}$  mit Caf-CoA und Cin-CoA.



**Abbildung 92:** Substratsättigungskurve für der PL mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



**Abbildung 93:** Substratsättigungskurve für PL mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag



**Abbildung 94:** Substratsättigungskurve für PL mit Cin-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

## Ergebnisse und Diskussion

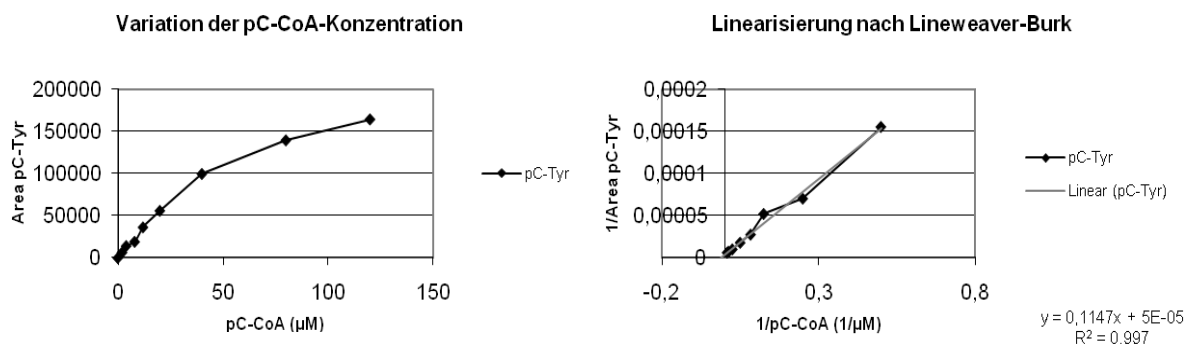
### 3.5.4.3. Weitere Akzeptoren: Tyrosin

D-Tyrosin kann nicht das natürliche Substrat der CbRAS sein. Zum einen handelt es sich um eine D-Aminosäure, die in Pflanzen üblicherweise nicht vorkommt, und zum anderen kann ein Umsatz im Enzymtest erst beobachtet werden, wenn große Mengen an Enzym über sehr lange Zeit mit den Substraten inkubiert werden.

Wie gering die Affinität von Tyrosin zum aktiven Zentrum der CbRAS ist, soll durch Bestimmung der  $K_m$ -Werte verdeutlicht werden. Dabei wird Tyrosin mit den beiden Substraten pC-CoA und Caf-CoA umgesetzt. Bei einer hohen Enzymkonzentration von 33,6  $\mu\text{g/ml}$  im Test muss 60 min lang inkubiert werden.

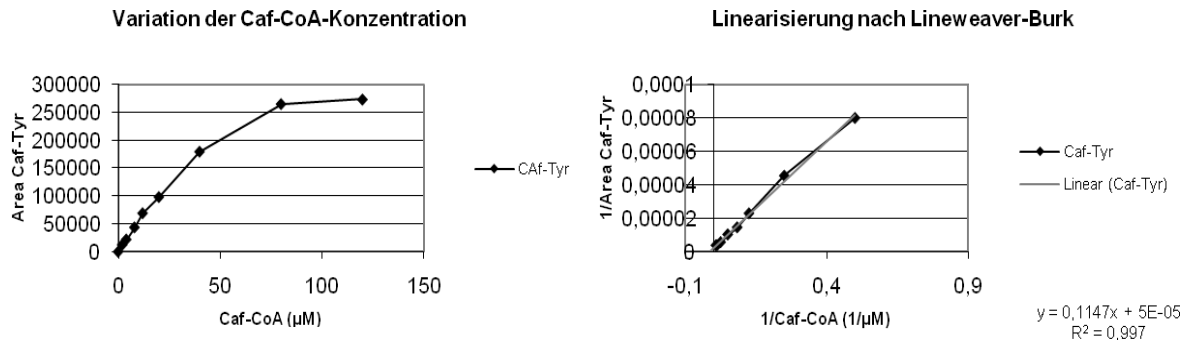
#### 3.5.4.3.1. pC-CoA und Caf-CoA plus DL-Tyrosin

Die pC-CoA- und Caf-CoA-Konzentration wurde in einem Bereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 120  $\mu\text{M}$  variiert, wobei die DL-Tyrosinkonzentration mit 4 mM konstant gehalten wurde. In den Substratsättigungskurven (Abbildung 95 und Abbildung 96) ist zu erkennen, dass die Sättigungskonzentration für die CoA-aktivierten Säuren nach einem flachen Anstieg bei etwa 120  $\mu\text{M}$  erreicht ist. Aus jeweils zwei Messreihen wurde der apparente  $K_m$ -Wert für pC-CoA mit 81,7  $\mu\text{M}$  und für Caf-CoA mit 94,5  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die Affinität der CoA-aktivierten Säuren ist in Anwesenheit von Tyrosin stark reduziert.



**Abbildung 95:** Substratsättigungskurve für pC-CoA mit Tyrosin als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

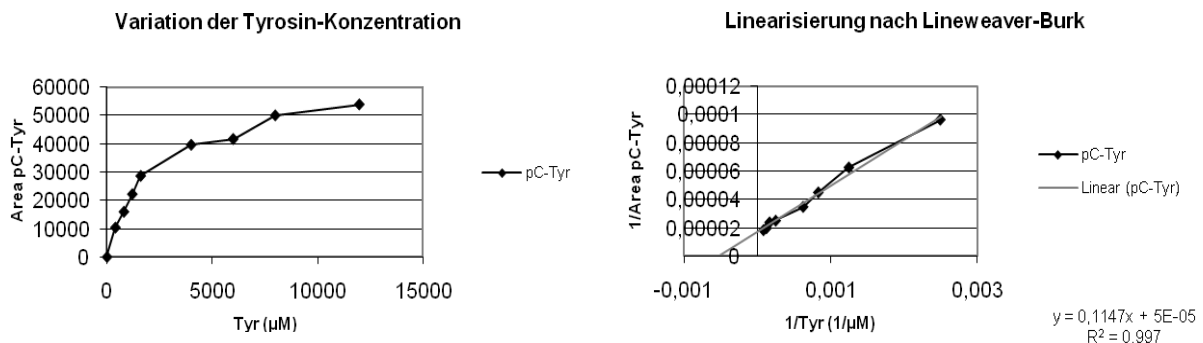
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 96:** Substratsättigungskurve für Caf-CoA mit Tyrosin als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

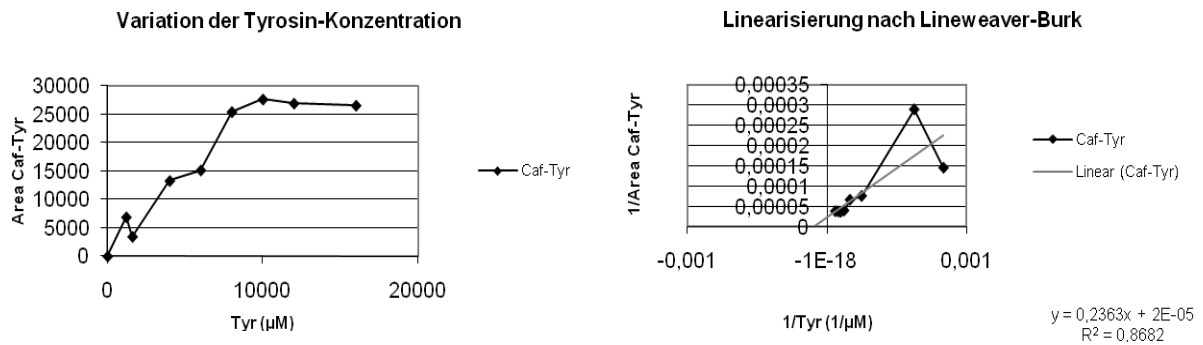
### 3.5.4.3.2. Tyrosin plus pC-CoA und Caf-CoA

Zur Bestimmung der apparenten  $K_m$ -Werte für Tyrosin in Kombination mit 42 µM pC-CoA wurde die DL-Tyrosinkonzentration zwischen 400 µM und 12 mM variiert. Der apparente  $K_m$ -Wert ist 1046 µM (berechnet für D-Tyrosin), die Substratsättigungskonzentration wird ab 8 mM DL-Tyrosin erreicht (Abbildung 97). Nur D-Tyrosin ist ein Substrat der CbRAS. L-Tyrosin wird nicht umgesetzt. Parallel zu der Messreihe, bei der DL-Tyrosin variiert wurde, wurde eine Reihe pipettiert in der nur das D-Enantiomer in halbiertem Konzentration eingesetzt wurde. Der  $K_m$ -Wert wurde bestimmt. Da der apparente  $K_m$ -Wert 1075 µM ist, kann gefolgert werden, dass es korrekt ist, beim Einsatz von Racematen den  $K_m$ -Wert zu halbieren. Für pHPL ist dies fraglich, weil das L-Enantiomer einen hemmenden Einfluss besitzt.



**Abbildung 97:** Substratsättigungskurve für DL-Tyrosin mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 98:** Substratsättigungskurve für DL-Tyrosin mit Caf-CoA als Akzeptorsubstrat, RAS mit His-Tag

Um den apparenten  $K_m$ -Wert für Tyrosin zu erhalten, wenn Caf-CoA das zweite Substrat ist, wurde die DL-Tyrosinkonzentration in einem Bereich zwischen 1200  $\mu\text{M}$  und 16 mM variiert. Caf-CoA wurde auf 24  $\mu\text{M}$  eingestellt. Der apparente  $K_m$ -Wert ist 17818  $\mu\text{M}$ . Substratsättigung wurde bei 8 mM DL-Tyrosin erreicht (Abbildung 98).

### 3.6. Diskussion zur biochemischen Charakterisierung der Hydroxycinnamoyltransferasen CbRAS und CbHST aus *Coleus blumei*

#### 3.6.1. Substratspezifitäten der BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen CbHST und CbRAS aus *Coleus blumei*

Hydroxycinnamoylshikimat, Hydroxycinnamoylchinat, Hydroxycinnamoyltyramin, Hydroxycinnamoylmalat, Hydroxycinnamoylserotonin, Hydroxycinnamoylhydroxyphenyllactat und deren Derivate sind im Pflanzenreich weit verbreitet (Petersen et al. 2009). Die meisten dieser Verbindungen sind vermutlich am Schutz der Pflanzen vor Pathogenen und Herbivoren aber auch als UV-Schutz beteiligt. Hydroxycinnamoylshikimat wird nach neueren Untersuchungen eine wichtige Rolle an der Monolignolbiosynthese zugeschrieben (Hoffmann et al. 2004, Wagner et al. 2007). An der Biosynthese dieser Verbindungen können Hydroxycinnamoyltransferasen aus unterschiedlichen Enzymfamilien beteiligt sein.

Die meisten bekannten Acylierungen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel werden von BAHD-Acyltransferasen katalysiert, die Acyl-CoA-Thioester als aktivierte Substrate verwenden. Die Akzeptorsubstrate der BAHD-Acyltransferasen sind sehr vielfältig und reichen von kurzkettigen aliphatischen oder aromatischen Alkoholen bis hin zu Alkaloiden und Anthocyanen (siehe Kapitel 1.5). BAHD-Acyltransferasen übertragen Acetyl-, Malonyl-, Benzoyl-, und Hydroxycinnamoylreste auf ihre Akzeptorsubstrate (St. Pierre und De Luca 2000). Einzelne Vertreter akzeptieren Tigloyl- oder  $\beta$ -Phenylalanoyl-CoA. Hydroxycinnamoyltransferasen sind in drei verschiedenen Klassen der BAHD-Acyltransferasen zu finden. Die meisten Acyltransferasen aus Klasse V bilden Hydroxycinnamoylshikimat, -chinat und -hydroxyphenyllactatester. Zwei Hydroxycinnamoyltransferasen aus Klasse V (siehe Kapitel 3.11.4) sind *N*-Acyltransferasen. Die Hydroxycinnamoyl-/Benzoyl-CoA:Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (HCBT) aus *Dianthus caryophyllus* (Yang et al. 1997) und die Spermidin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (Grienberger 2009) sind BAHD-Acyltransferasen, die Aminkonjugate bilden.

*N*-Hydroxycinnamoylamine wie Hydroxycinnamoyltyramin oder Hydroxycinnamoylspermidin spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der abiotischen und biotischen Umwelt der Pflanze (Kang et al. 2005). Diese Amide werden meistens von Hydroxycinnamoyltransferasen gebildet, deren Aminosäuresequenzen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu BAHD-Acyltransferasen aufweisen. Die Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (THT) und die Serotonin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (SHT) gehören zur Proteinfamilie der



## *Ergebnisse und Diskussion*

THT-ähnlichen *N*-Acyltransferasen. Wie bei den BAHD-Acyltransferasen sind die Hydroxycinnamoyl-Reste durch CoA aktiviert.

Eine dritte Enzymfamilie, die auf einem alternativen Weg Hydroxycinnamoyl-ester bildet, sind die Serin Carboxypeptidase-ähnlichen Acyltransferasen. Sie akzeptieren Hydroxycinnamoyl-glucoseester als aktivierte Säuren (Milkowski und Strack 2003). In Brassicaceen sind diese Enzyme z.B. an der Biosynthese von Sinapoylmalat beteiligt.

Die CbRAS (Berger et al. 2006) und die CbHST (siehe Kapitel 3.1) konnten aus *Coleus blumei* kloniert und als funktionelle Enzyme heterolog exprimiert werden. Die CbHST und die CbRAS sind Hydroxycinnamoyltransferasen aus der BAHD-Familie, die nach eigenen phylogenetischen Untersuchungen (siehe Kapitel 3.11.4) nah miteinander verwandt sind und Klasse V der BAHD-Acyltransferasen angehören. Die CbHST gruppiert mit HCSQTs und die CbRAS mit RAS aus anderen Pflanzen. Aus ersten biochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass sie sich anhand ihrer Substratspezifität unterscheiden. *p*-Cumaroyl-CoA und Caf-CoA werden von der CbHST auf Shikimat (siehe Kapitel 3.5.2.1) und von der CbRAS auf Hydroxyphenyllactat bzw. Dihydroxyphenyllactat übertragen (Berger et al. 2006). Daneben existieren in anderen Pflanzen HQTs, die diese beiden Hydroxycinnamoyl-CoAs mit Chinat umsetzen (siehe Kapitel 1.4.2).

### 3.6.1.1. Substratspezifität der CbHST

Nach neueren Untersuchungen sind Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferasen (HST) an der Biosynthese von Zimtsäurederivaten mit höherem Substitutionsmuster am aromatischen Ring wie Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure beteiligt (Hoffmann et al. 2003, Hoffmann et al. 2004). Nach der Reduktion zu den entsprechenden Alkoholen, können sie als Monolignole in die Ligninbiosynthese eingeschleust werden. Nach heutiger Vorstellung wird *p*-Cumaroyl-CoA auf Shikimisäure übertragen und die Hydroxylgruppe in *meta*-Position von einer CYP98A Monooxygenase auf Stufe des Esters eingeführt. In einer Rückreaktion, die ebenfalls von der HST übernommen wird, wird Caffeoyl-CoA freigesetzt und steht für weitere Biosyntheseschritte zur Verfügung (Schoch et al. 2001).

Viele der bislang klonierten und biochemisch charakterisierten CoA-Ester-abhängigen Hydroxycinnamoyltransferasen akzeptieren sowohl Shikimat als auch Chinat als Akzeptorsubstrate. Dabei ist in der Regel eine deutliche Präferenz für einen der Akzeptoren zu erkennen. Zwei Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Nicotiana tabacum* (Hoffmann et al.

## Ergebnisse und Diskussion

2003) und *Trifolium pratense* (Sullivan 2009) übertragen *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA bevorzugt auf Shikimat und viel schlechter auf Chinat. Die Beteiligung dieser Enzyme an der Ligninbiosynthese konnte durch RNAi-basierte Herunterregulation und durch Expressionsanalysen der HST bestätigt werden (Hoffmann et al. 2004, Sullivan 2009). Zwei andere Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Nicotiana tabacum* (Niggeweg et al. 2004) und *Cynara cardunculus* (Comino et al. 2007) zeigen im Gegensatz dazu eine deutliche Präferenz für Chinat vor Shikimat. Eine HQT aus *Cynara scolymus* (Comino et al. 2008) verestert nur Chinat, nicht aber Shikimat. Für diese Chinat-esterbildenden Enzyme konnte eine *in vivo*-Beteiligung an der Chlorogensäurebiosynthese durch Überexpression und Stilllegen des HQT-Gens (Niggeweg et al. 2004) sowie durch Genexpressionsanalysen (Comino et al. 2007, Comino et al. 2008) gezeigt werden. Die strenge Substratspezifität für Chinat wurde schon früher von aufgereinigten nativen Enzymen aus *Stevia rebaudiana* oder *Nicotiana glauca* (Ulbrich und Zenk 1979) und für Shikimat von einem Enzym aus *Cichorium endivia* (Ulbrich und Zenk 1980) berichtet. Die CbHST aus *Coleus blumei* besitzt eine strenge Substratspezifität für Shikimat. Die typischen Substrate der RAS (pHPL und DHPL) und der HQT (Chinat) werden auch unter Einsatz großer Proteinmengen und verlängerter Inkubationszeit nicht umgesetzt. Anhand der ausgeprägten Substratspezifität der CbHST für Shikimat kann die Beteiligung der CbHST an der Monolignolbiosynthese in *Coleus blumei* postuliert werden. Dass die CbHST ein spezifisches Enzym der Ligninbiosynthese ist, könnte in Zukunft durch Ausschalten oder Überexpression des CbHST-Gens untersucht werden. Dazu könnte die CbHST durch die Technik der RNAi herunterreguliert oder mithilfe eines überexprimierenden Promotors überexprimiert werden und die Effekte auf den Ligningehalt und die Ligninzusammensetzung untersucht werden.

Die HST katalysiert vermutlich zwei unterschiedliche Reaktionsschritte bei der Biosynthese der methoxylierten Monolignole. In der ersten Reaktion wird *p*-Cumaroylshikimat, das Substrat der CYP98A Monooxygenase, gebildet. In der zweiten Reaktion wird das Produkt der Monooxygenase enzymatisch thioklastisch gespalten, wobei Caffeoyl-CoA freigesetzt wird (Hoffmann et al. 2004). Für die NtHST aus *Nicotiana tabacum* konnten Hoffmann et al. (2003) zeigen, dass das heterolog exprimierte Enzym die Rückreaktion, z.B. die Freisetzung von Caffeoyl-CoA aus Chlorogensäure, katalysiert. Dieses Verhalten wird auch von einigen anderen HCSQTs berichtet. Die Hydroxycinnamoyltransferasen CcHQT aus *Cynara cardunculus* (Comino et al. 2007), CsHQT aus *Cynara scolymus* (Comino et al. 2008) und CcHCT aus *Coffea canophora* (Lepelley et al. 2006) katalysieren ebenfalls die oben beschriebene Rückreaktion. Keine dieser Hydroxycinnamoyltransferasen katalysiert jedoch nachweislich die Rückreaktion mit Caffeoylshikimat, dem Intermediat des Monolignolbiosynthesewegs. Während Chlorogensäure in der Pflanze akkumuliert, ist Caffeoylshikimat ein kurzlebige Intermediat der Monolignolbiosynthese, dessen Funktion

## Ergebnisse und Diskussion

darin besteht, Caffeoyl-CoA für die nachfolgenden Biosyntheseschritte bereit zu stellen. Deshalb müsste gerade die NtHST aus *Nicotiana tabacum* die Freisetzung von Caffeoyl-CoA aus Caffeoylshikimat katalysieren. Um zu untersuchen, ob die CbHST und andere bekannte HSTs eine duale Funktion in der Ligninbiosynthese haben, müsste in Zukunft untersucht werden, ob die HSTs tatsächlich Caffeoyl-CoA und Shikimat in Anwesenheit von CoA aus Caffeoylshikimat freisetzen.

Von vielen HCSQTs ist bekannt, dass sie verschiedene (Hydroxy-)zimtsäuren übertragen. Während für die meisten Hydroxycinnamoyltransferasen nur die Übertragung von *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA gezeigt wurde, ist von der NtHST aus *Nicotiana tabacum* (Hoffmann et al. 2003) bekannt, dass *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA und Cinnamol-CoA mit guter Effizienz auf Shikimat übertragen werden. Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA sind deutlich schlechtere Substrate der NtHST. Für alle angebotenen Hydroxycinnamoyl-CoAs (Cinnamoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA) konnte mit der CbHST eine Produktbildung beobachtet werden. *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA wurden am effektivsten auf Shikimat übertragen. Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA waren die schlechtesten Substrate. Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Anthraniloyl-CoA sind keine Substrate der CbHST. Demnach besitzt die CbHST eine hohe Substratspezifität für (Hydroxy-)cinnamoyl-CoA-Derivate. Die Strukturformeln der CoA-aktivierten Säuren sind in Kapitel 3.6.2) abgebildet.

Es wurden weitere potentielle Akzeptorsubstrate getestet, die von anderen Hydroxycinnamoyltransferasen aus der Familie der THT-ähnlichen Acyltransferasen umgesetzt werden. Dazu zählen Tyramin, Typtamin, Serotonin, Dopamin und 2-Phenethylamin. Mit keiner dieser Verbindungen konnte eine Produktbildung durch die CbHST beobachtet werden. Die Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl-/Benzoyltransferase (HCBT) aus *Dianthus caryophyllus* (Yang et al. 1997) gruppiert nach eigener phylogenetischer Untersuchung (siehe Kapitel 3.11.4) wie die CbHST in Klasse Va der BAHD-Acyltransferasen. Obwohl eine enge evolutionäre Beziehung beider Enzyme anzunehmen ist, wird *p*-Cumaroyl-CoA von der CbHST nicht auf Anthranilat übertragen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CbHST ein spezialisiertes Enzym der Monolignolbiosynthese ist.

Dass 3-Hydroxyanthranilsäure von der CbHST als Substrat akzeptiert wird, war ein unerwartetes Ergebnis. Alle (Hydroxy-)cinnamoyl-CoAs wurden auf 3-Hydroxyanthranilsäure übertragen. Die CbHST besitzt zu 3-Hydroxyanthranilsäure sogar eine ähnlich hohe Affinität wie zu Shikimat (siehe Kapitel 3.5.2.2). Anthranilsäure ist ein Intermediat des Shikimatwegs zur Bildung der aromatischen Aminosäure Tryptophan. Anthranilsäure und 5-Hydroxyanthranilsäure, nicht aber 3-Hydroxyanthranilsäure, sind die Substrate der Anthranilat *N*-

## Ergebnisse und Diskussion

Hydroxycinnamoyl-/Benzoyltransferase (Ishihara et al. 1997). Ob 3-Hydroxyanthranilsäure *in vivo* von der CbHST umgesetzt wird, hängt von der Verfügbarkeit dieser Substanz in der Pflanze ab und kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Die hohe Sequenzidentität der CbHST zu den HCSQTs deutet jedoch darauf hin, dass Shikimat das natürliche Substrat der CbHST ist.

Vermutlich handelt es sich bei dem Reaktionsprodukt aus *p*-Cumaroyl-CoA und 3-Hydroxyanthranilsäure um den Ester und nicht um das Amid. Es konnten essentielle Strukturmerkmale der Akzeptorsubstrate herausgearbeitet werden, die darauf hindeuten, dass es sich um den Ester handelt. Die Strukturformeln der Akzeptorsubstrate sind in Kapitel 2.6.3 zu finden. Da 3-Hydroxybenzoesäure zu einem Reaktionsprodukt mit *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Feruloyl-CoA führt, muss in *meta*-Position acyliert werden. 2,3-Dihydroxybenzoesäure wurde mit denselben CoA-aktivierten Säuren, jedoch viel effektiver als 3-Hydroxybenzoesäure, umgesetzt. *p*-Cumarsäure- und Kaffeesäureester mit 3-Hydroxybenzoesäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure sind in Pflanzen nicht bekannt (SciFinder). Interessanterweise wurde auch 3-Aminobenzoessäure mit *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA zu einem Produkt umgesetzt, wobei es sich um das Amid handeln muss. 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoessäure besitzen allerdings sehr geringe Affinitäten zum aktiven Zentrum der CbHST (siehe Kapitel 3.6.3). Nur mit extrem hohen Enzymkonzentrationen können Reaktionsprodukte nach mehreren Stunden detektiert werden. Phenol ist kein Substrat der CbHST.

Da Shikimat, 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure Substrate der CbHST darstellen, Chinat aber nicht, scheinen Sechsringsysteme mit einer oder drei Doppelbindungen im aktiven Zentrum binden zu können, nicht aber gesättigte Cyclohexanderivate. Ein essentielles Strukturmerkmal ist die Carboxylgruppe am Sechsring. Während 3-Hydroxybenzoesäure zur Produktbildung führt, ist Phenol kein Substrat der CbHST. Dass nur in *meta*-Position acyliert wird, zeigt der Vergleich der Substratspezifität zu Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure. Anthranilsäure kann nicht enzymatisch umgesetzt werden, weil ihr die OH-Gruppe in *meta*-Position fehlt. 3-Hydroxyanthranilsäure ist hingegen ein gutes Substrat der CbHST. Die CbHST besitzt *N*- und *O*-Acyl-transferaseaktivität: 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoessäure werden acyliert. Da 3-Hydroxyanthranilsäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure effizienter mit *p*-Cumaroyl-CoA umgesetzt werden als 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoessäure, erhöht eine kleine hydrophile Gruppe in *ortho*-Position wahrscheinlich die Affinität der Akzeptorsubstrate zum Enzym.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.6.1.2. Substratspezifität der CbRAS

Die Rosmarinsäuresynthase (RAS) ist das charakteristische Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese (Petersen 1991). Nach heutigem Verständnis wird *p*-Cumaroyl-CoA aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel mit Hilfe der RAS auf *p*-Hydroxyphenyllactat übertragen. Der entstehende Ester wird anschließend in 3- und 3'-Position durch Monooxygenasen zur Rosmarinsäure hydroxyliert (siehe Kapitel 1.3.4). Das native Enzym aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* akzeptiert die CoA-aktivierten Säuren Cinnamoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoil-CoA mit hoher Effizienz, während die Nutzung von Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Als Akzeptorsubstrate der nativen RAS fungieren *p*-Hydroxyphenyllactat, Dihydroxyphenyllactat und 3-Methoxy-4-hydroxyphenyllactat. Phenyllactat und 3,4-Dimethoxyphenyllactat waren keine Substrate des nativen Enzyms. Die Übertragung auf andere Akzeptorsubstrate wie Shikimat und Chinat wurde nicht untersucht. Es wurde auch nicht getestet, ob das native Enzym in der Lage ist, Amidbildungen zu katalysieren (Petersen 1991). Die CbRAS konnte erstmals von Berger et al. (2006) kloniert werden. Das heterolog exprimierte Enzym zeigte in ersten Enzymtestes eine hohe Substratspezifität für *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat, während Shikimat und Chinat keine Substrate der CbRAS waren.

Bei der genaueren Untersuchung der Substratspezifität der heterolog exprimierten RAS aus *Coleus blumei* wurde eine breitere Substratakzeptanz deutlich. Abgesehen von Sinapoyl-CoA wurden alle (Hydroxy-)zimtsäuren auf *p*-Hydroxyphenyllactat, Dihydroxyphenyllactat und Phenyllactat übertragen. *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoil-CoA wurden sind die besten Donorsubstrate. Dieses Ergebnis passt zu dem Substitutionsmuster der Rosmarinsäureartigen Naturstoffe in *Coleus blumei*. In Suspensionskulturen wurden neben Rosmarinsäure geringere Mengen an *p*-Cumaroyl-3,4-dihydroxyphenyllactat gefunden.

Andere CoA-aktivierte Säuren wie Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA und Anthraniloyl-CoA wurden nicht akzeptiert. Die CbRAS zeigt eine hohe Substratspezifität für (Hydroxy-)cinnamoyl-CoA-Derivate. Das Substitutionsmuster am Aromaten übt keinen Einfluss auf die Substratakzeptanz, wohl aber auf die Affinität zum aktiven Zentrum aus (siehe Kapitel 3.5.2.5).

Die erwarteten Akzeptorsubstrate *p*-Hydroxyphenyllactat und 3,4-Dihydroxyphenyllactat wurden mit hoher Effizienz von der heterolog exprimierten CbRAS umgesetzt. Phenyllactat, das zu keiner detektierbaren Produktbildung bei der nativen RAS führte, wurde von dem heterolog exprimierten Enzym als Substrat akzeptiert. Die ermittelten Affinitäten waren im Vergleich zu pHPL und DHPL zehnfach erniedrigt (siehe Kapitel 3.6.3). Hydroxylgruppen in

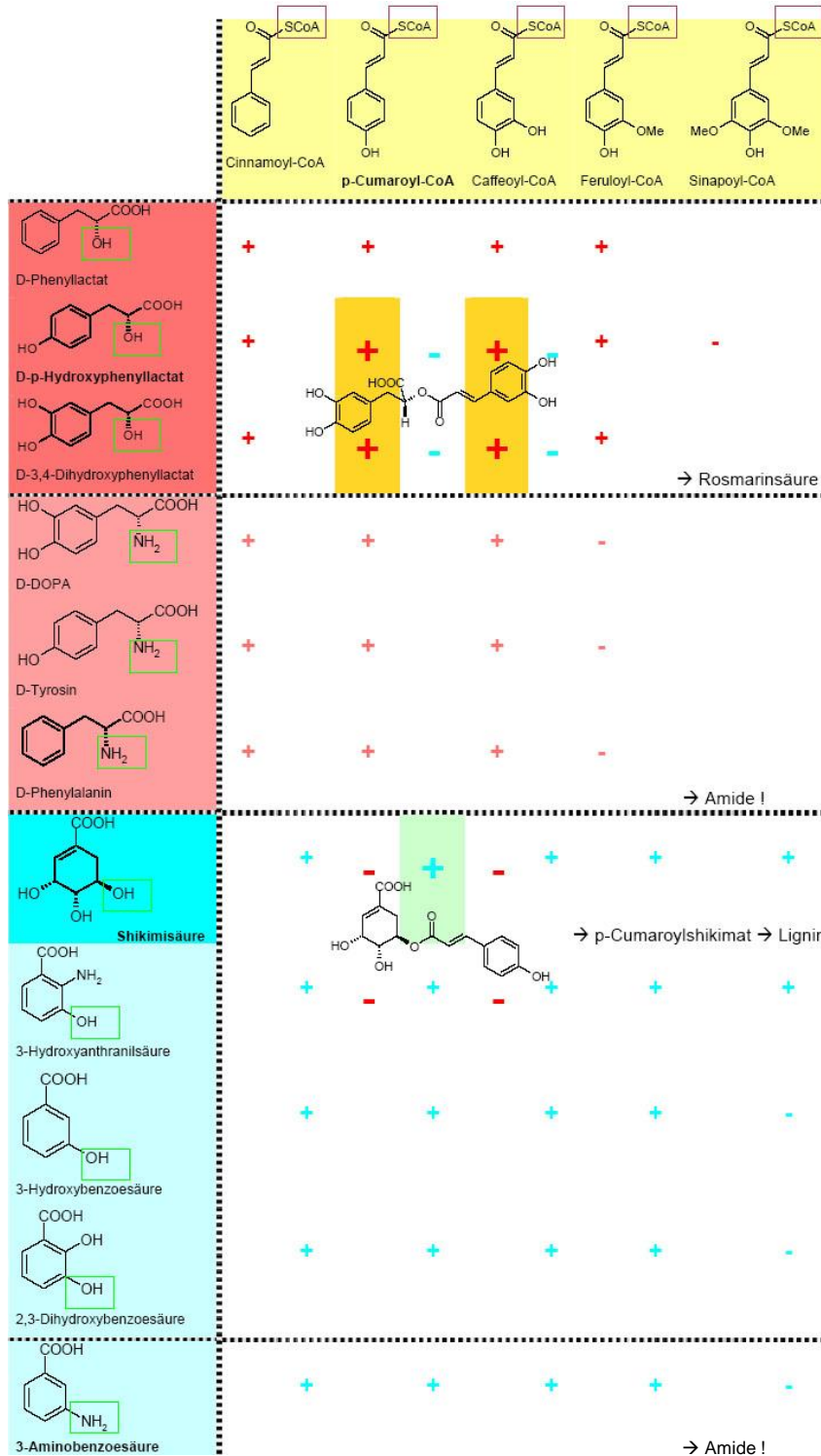
## Ergebnisse und Diskussion

*meta*- und *para*-Position am aromatischen Ring des Akzeptorsubstrats erhöhen dessen Affinität zum aktiven Zentrum. Die anderen putativen Akzeptorsubstrate, die von anderen bekannten Hydroxycinnamoyltransferasen umgesetzt werden, führen wie bei der CbHST nicht zur Produktbildung. Daher scheint das C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-Grundgerüst ein essentielles Strukturmerkmal für die Akzeptorsubstrate zu sein. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die CbRAS ein für die Rosmarinsäuresynthese spezialisiertes Enzym ist. Die Tatsache, dass 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol und Phenethylamin keine Substrate der CbRAS sind, verdeutlichen dass die aliphatische Carboxylgruppe ebenfalls ein essentielles Strukturmerkmal ist.

Interessanterweise kann die heterolog exprimierte CbRAS wie die heterolog exprimierte CbHST sowohl *O*- als auch *N*-Acylierungen katalysieren. Reaktionsprodukte wurden gefunden, wenn Cinnamoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyle-CoA der CbRAS in Kombination mit den Aminosäuren DL-Phenylalanin, DL-Tyrosin oder DL-DOPA für mehrere Stunden inkubiert wurde. Dass bei der Inkubation mit den entsprechenden L-Enantiomeren kein Substratumsatz gefunden wurde, verdeutlicht die Stereoselektivität der CbRAS. Die D-Aminosäuren werden nicht als die natürlichen Substrate diskutiert, weil die katalytische Effizienz sehr niedrig ist und es sich bei den D-Enantiomeren um nicht-proteinogene Aminosäuren handelt, die wahrscheinlich nicht in der Zelle vorkommen. Adam (1995) konnte aus Farnwedeln von *Athyrium filix-femina* neue Kaffeesäureamide, darunter *N*-Caffeoyle-Phenylalanin, isolieren. Allerdings handelt es sich hierbei um das Säureamid aus Kaffeesäure und L-Phenylalanin. Ein Konjugat mit D-Phenylalanin wurde nicht beschrieben. Die erste BAHD-Acyltransferase von der diese duale Reaktivität beschrieben wurde, ist die LaAT1 aus *Lavandula officinalis* (Landmann 2007). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von *p*-Cumaroyl- und Caffeoyle-CoA mit Shikimat, Tyramin, Phenethylamin und Anthranilat nicht aber mit Chinat, Pelargonidin-3-glucosid, Catechin oder Agmatin. Allerdings konnte keine Aussage über die bevorzugten Substrate getroffen werden. Es wurde auch nicht beschrieben, an welchem Biosyntheseweg die LaAT1 beteiligt ist. Die Aminosäuresequenzen der LaAT1 und der CbRAS besitzen eine überraschend hohe Sequenzidentität von 81%. Da *Lavandula officinalis* Rosmarinsäure produziert (Petersen et al. 2009) und die Übertragung von *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyle-CoA auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat nicht untersucht wurde, könnte es sein, dass diese LaAT1 eine RAS ist, die neben Rosmarinsäure-artigen Estern auch andere Produkte bildet. In diesem Fall wäre es sehr interessant, die Strukturen der CbRAS und der LaAT1 aufzuklären, um Unterschiede in den aktiven Zentren aufzeigen zu können. Während die CbRAS eine doch recht hohe Substratspezifität für (Hydroxy-)phenyllactat-Derivate und daneben die analogen Aminoverbindungen aufweist, ist die LaAT1 ein Enzym mit ausgesprochen breiter Substratspezifität.

## Ergebnisse und Diskussion

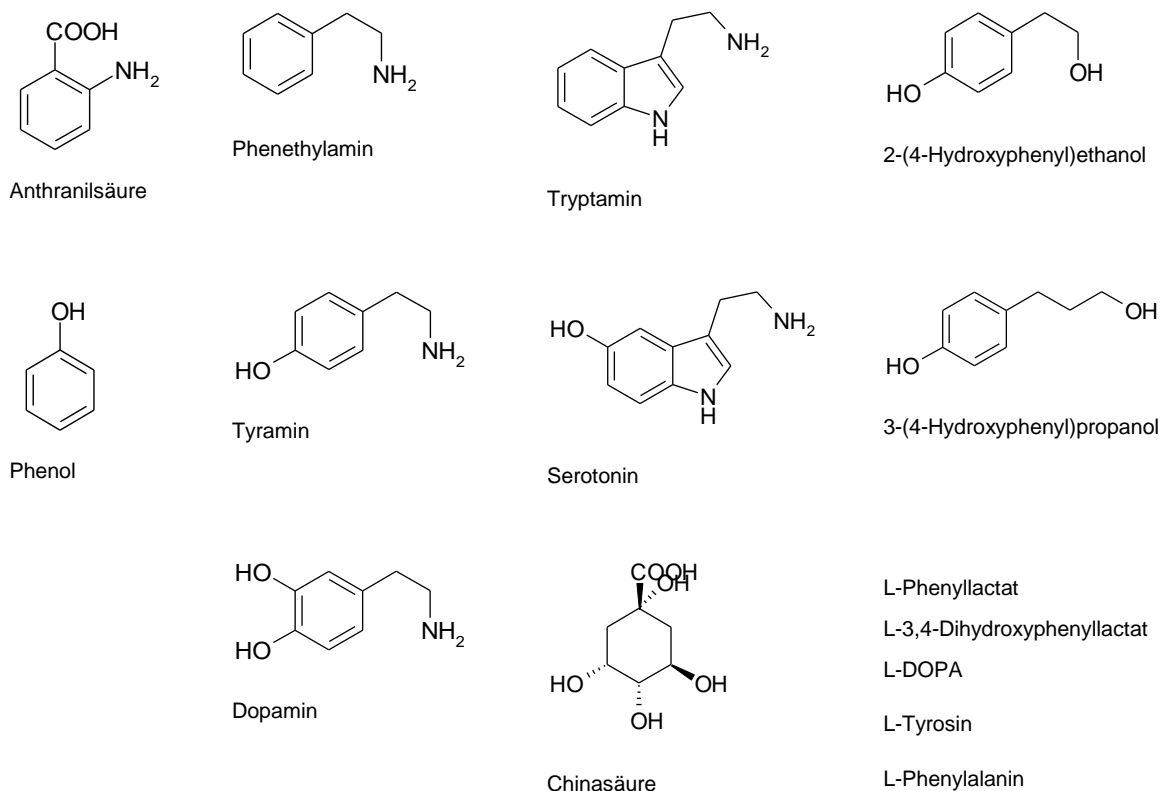
### 3.6.2. Übersicht über die Substratspezifitäten der CbHST und der CbRAS



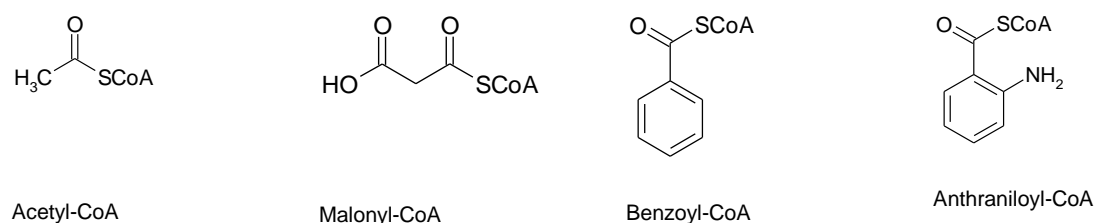
**Abbildung 99:** Substrate die von der CbHST und/oder der CbRAS umgesetzt werden. Rote Kreuze (+) zeigen, welche Substratkombinationen von der CbRAS umgesetzt werden. Ein rotes Minus (-) bedeutet, dass die CbRAS diese Substratkombination nicht umsetzt. Blaue Kreuze (+) zeigen die Substrate, die von der CbHST akzeptiert werden. Substratkombinationen, für die mit der CbHST keine Reaktionsprodukte gefunden wurden, sind mit einem blauen Minus (-) gekennzeichnet.

## Ergebnisse und Diskussion

In zukünftigen Arbeiten müssen die verschiedenen Reaktionsprodukte der CbHST und der CbRAS in größeren Mengen enzymatisch hergestellt und über präparative HPLC aufgereinigt werden, um die Strukturen über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verifizieren zu können. Es bleibt ungeklärt, ob einige dieser Produkte in *Coleus blumei* vorkommen. Um diese Frage zu beantworten, könnten *Coleus*-Pflanzenextrakte auf Anwesenheit dieser Verbindungen untersucht werden.



**Abbildung 100:** Akzeptorsubstrate, die von der CbHST und der CbHST nicht umgesetzt werden



**Abbildung 101:** CoA-aktivierte Säuren, die von der CbHST und der CbRAS nicht umgesetzt werden



## Ergebnisse und Diskussion

### 3.6.3. Kinetische Parameter der CbHST und der CbRAS

Die ausgeprägte Substratspezifität der CbHST für Shikimat und der CbRAS für pHPL/DHPL lässt darauf schließen, dass die CbHST ein spezifisches Enzym der Monolignolbiosynthese und die CbRAS ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese ist (siehe Kapitel 3.5.2). Die Säurekomponenten verschiedener (Hydroxy-)cinnamoyl-CoAs werden von beiden Enzymen auf ihre Akzeptoren übertragen. Dies wirft die Frage nach der natürlichen Substratkombination der Hydroxycinnamoyltransferasen auf. Möglicherweise überträgt die CbRAS Caffeoyl-CoA auf DHPL, so dass direkt Rosmarinsäure entsteht. Anhand der kinetischen Parameter konnte gezeigt werden, dass *p*-Cumaroyl-CoA von der CbHST am effektivsten auf Shikimat und von der CbRAS am effektivsten auf *p*-Hydroxyphenyllactat übertragen wird. Daher liefert die biochemische Charakterisierung beider Enzyme einen Hinweis für die Richtigkeit der postulierten Biosynthesewege zur Bildung von Lignin (Hoffmann et al. 2004) und Rosmarinsäure (Petersen et al. 1993) (siehe Kapitel 1.3): *p*-Cumaroyl-CoA ist vermutlich das aktivierte Intermediat im Phenylpropanstoffwechsel.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der CbHST und der CbRAS war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So konnten für viele Substratkombinationen bedingt durch eine starke Substratinhibition keine verlässlichen  $V_{\max}$ -Werte ermittelt werden. Wie in Tabelle 7 bis Tabelle 10 zu erkennen ist, sind die  $K_m$ -Werte für ein spezifisches Substrat immer abhängig von dem zweiten, konstant gehaltenen Substrat. Dieses Verhalten wurde schon von anderen Hydroxycinnamoyltransferasen berichtet. Bei der biochemischen Charakterisierung der Transferase NtHST aus *Nicotiana tabacum* wurde für *p*-Cumaroyl-CoA ein  $K_m$ -Wert von 150  $\mu\text{M}$  in Kombination mit Chinat und von 600  $\mu\text{M}$  in Kombination mit Shikimat ermittelt (Hoffmann et al. 2003). Die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat/Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase aus *Cynara cardunculus* zeigt für *p*-Cumaroyl-CoA mit Chinat einen  $K_m$ -Wert von 53  $\mu\text{M}$  und für *p*-Cumaroyl-CoA mit Shikimat ist der  $K_m$ -Wert 702  $\mu\text{M}$  (Comino et al. 2007). Diese Beobachtungen können auf einen sogenannten induced fit (induzierte Passform) der Hydroxycinnamoyltransferasen hindeuten. Die Substratbindung eines spezifischen Substrats führt zu einer bestimmten Konformationsänderung des Enzyms. Dies wiederum beeinflusst die Affinität zum zweiten Substrat. Die strukturellen Untersuchungen der Anthocyanin Malonyltransferase aus *Dendranthema morifolium* (Unno et al. 2007) und der Trichotecen 3-O-Acetyltransferase aus *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium graminearum* (Garvey et al. 2007) beweisen die Plastizität der aktiven Zentren dieser BAHD-Acyltransferasen. Der Vergleich der Strukturen der Apoenzyme mit den komplexierten Strukturen zeigen, dass es bei Substratbindung in einigen Enzymbereichen zu Veränderungen des Rückgrats und

## Ergebnisse und Diskussion

einiger Seitenketten kommt. Möglicherweise ist dies ein typisches Merkmal vieler BAHD-Acyltransferasen.

In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die ermittelten  $K_m$ -Werte für die CbHST zusammengefasst:

K <sub>m</sub> -Wert für	K <sub>m</sub> -Wert (μM)				
	(+ zweites Substrat)				
<b>p-Cumaroyl-CoA</b>	4,3 (+Shik)	22 (+ 3OHAnth)	1,5 (+ 3OHB)	3,1 (+ 2,3DiOHB)	18,5 (+ 3AB)
<b>Caffeoyl-CoA</b>	8,8 (+Shik)	53,8 (+ 3OHAnth)	5,1 (+ 3OHB)	11,8 (+ 2,3DiOHB)	
<b>Cinnamoyl-CoA</b>	26,5 (+Shik)				
<b>Feruloyl-CoA</b>	5,1 (+Shik)				
<b>Sinapoyl-CoA</b>	20 (+Shik)				

**Tabelle 7:** Biochemische Charakterisierung der CbHST. Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die CoA-aktivierten Säuren in Kombination mit verschiedenen Akzeptorsubstraten. Shik: Shikimat, 3OHAnth: 3-Hydroxyanthranilsäure, 3OHB: 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3DiOHB: 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3AB: 3-Aminobenzoessäure. Die  $K_m$ -Werte, die mit Shikimat als Akzeptorsubstrat ermittelt wurden, sind mit Umrahmung dargestellt.

K <sub>m</sub> -Wert für	K <sub>m</sub> -Wert (μM)				
	(+ zweites Substrat)				
<b>Shikimat</b>	<b>332</b>	6495	2235	22383	26133
	<b>(+ pC-CoA)</b>	(+ Caf-CoA)	(+ Cin-CoA)	(+ Fer-CoA)	(+ Sin-CoA)
<b>3-Hydroxy-anthranilsäure</b>	473 (+ pC-CoA)	449 (+ Caf-CoA)			
<b>3-Hydroxybenzoesäure</b>	1677 (+ pC-CoA)	733 (+ Caf-CoA)			
<b>2,3-Dihydroxybenzoesäure</b>	188 (+ pC-CoA)	699 (+ Caf-CoA)			
<b>3-Aminobenzoessäure</b>	2404 (+ pC-CoA)				

**Tabelle 8:** Biochemische Charakterisierung der CbHST. Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die Akzeptorsubstrate in Kombination mit verschiedenen CoA-aktivierten Säuren. pC-CoA: p-Cumaroyl-CoA, Caf-CoA: Caffeoyl-CoA, Cin-CoA: Cinnamoyl-CoA, Fer-CoA: Feruloyl-CoA, Sin-CoA: Sinapoyl-CoA. Die  $K_m$ -Werte für Shikimat sind mit Umrahmung dargestellt. Der niedrigste  $K_m$ -Wert für Shikimat wird in Kombination mit p-Cumaroyl-CoA (grau) erhalten.

## Ergebnisse und Diskussion

K <sub>m</sub> -Wert für	K <sub>m</sub> -Wert (μM) (+ zweites Substrat)			
<b>p-Cumaroyl-CoA</b>	9,2 (+ D-pHPL)	1,8 (+ D-DHPL)	10,7 (+ D-PL)	81,7 (+ D-Tyr)
<b>Caffeoyl-CoA</b>	2,1 (+ D-pHPL)	3,9 (+ D-DHPL)	3,5 (+ D-PL)	94,5 (+ D-Tyr)
<b>Cinnamoyl-CoA</b>	25,5 (+ D-pHPL)	15,8 (+ D-DHPL)	52,9 (+ D-PL)	
<b>Feruloyl-CoA</b>	36,4 (+ D-pHPL)	19,1 (+ D-DHPL)		

**Tabelle 9:** Biochemische Charakterisierung der CbRAS mit His-Tag. Bestimmung der K<sub>m</sub>-Werte für die CoA-aktivierten Säuren mit verschiedenen Akzeptorsubstraten. D-pHPL: D-*p*-Hydroxyphenyllactat, D-DHPL: D-Dihydroxyphenyllactat, D-PL: D-Phenyllactat, D-Tyr: D-Tyrosin. Die K<sub>m</sub>-Werte mit D-pHPL als zweites Substrat sind umrahmt.

K <sub>m</sub> -Wert für	K <sub>m</sub> -Wert (μM) (+ zweites Substrat)			
<b>p-Hydroxyphenyllactat</b>	<b>25 (+ pC-CoA)</b>	163 (+ Caf-CoA)	550 (+ Cin-CoA)	1425 (+ Fer-CoA)
<b>3,4-Dihydroxyphenyllactat</b>	35 (+ pC-CoA)	193 (+ Caf-CoA)	340 (+ Cin-CoA)	1300 (+ Fer-CoA)
<b>Phenyllactat</b>	490 (+ pC-CoA)	1035 (+ Caf-CoA)	1346 (+ Cin-CoA)	
<b>Tyrosin</b>	1046 (+ pC-CoA)	17818 (+ Caf-CoA)		

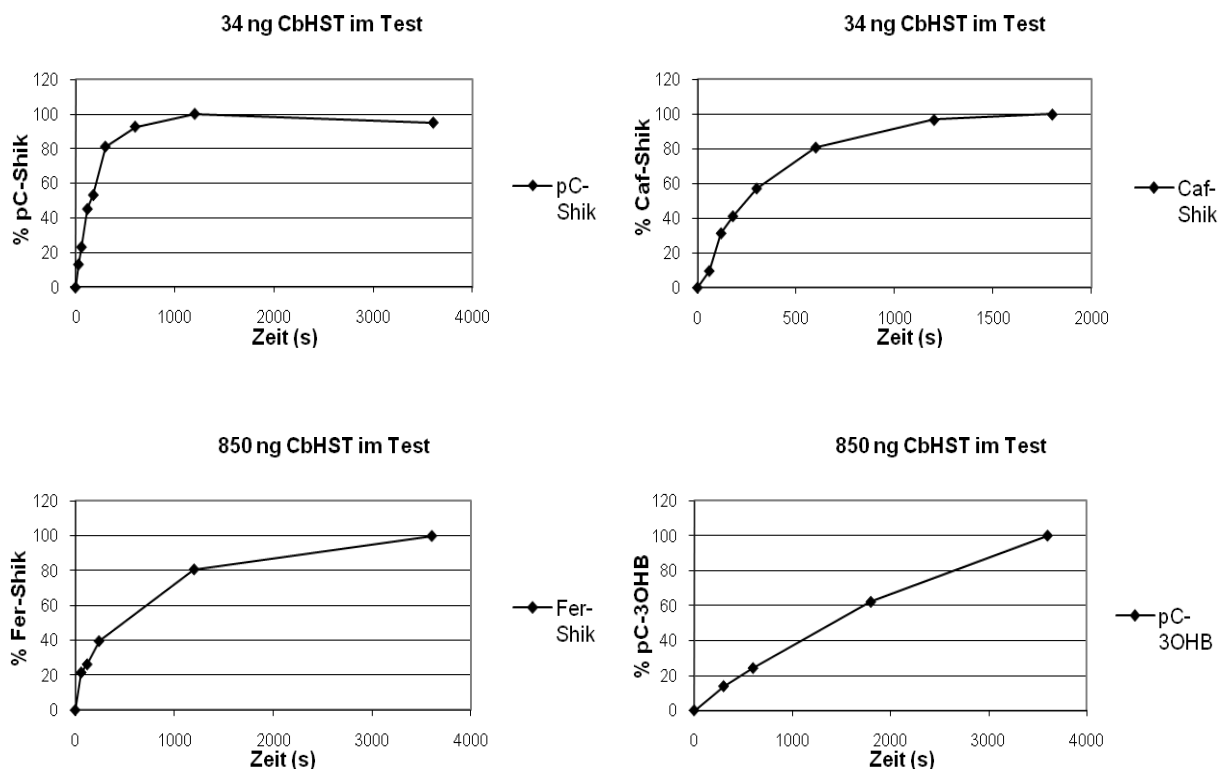
**Tabelle 10:** Biochemische Charakterisierung der CbRAS mit His-Tag. Bestimmung der K<sub>m</sub>-Werte für die Akzeptorsubstrate mit verschiedenen CoA-aktivierten Säuren. pC-CoA: *p*-Cumaroyl-CoA, Caf-CoA: Caffeoyl-CoA, Cin-CoA: Cinnamoyl-CoA, Fer-CoA: Feruloyl-CoA. Die K<sub>m</sub>-Werte für pHPL sind umrahmt. Der niedrigste K<sub>m</sub>-Wert für pHPL wurde in Kombination mit pC-CoA (grau) bestimmt.

Wie effektiv eine Substratkombination von der CbHST und der CbRAS umgesetzt wird, ist anhand der Zeitreihen zu erkennen. Die K<sub>m</sub>-Werte der Akzeptoren in Kombination mit den verschiedenen CoA-aktivierten Säuren besitzen eine gute Aussagekraft über die Effizienz der Übertragung einer Substratkombination. Anhand der K<sub>m</sub>-Werte der CoA-aktivierten Säuren hingegen kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche die bevorzugte Substratkombination ist. Dies wird im Folgenden anhand von Beispielen erläutert.

*p*-Cumaroyl-CoA und Shikimat sind die bevorzugten Substrate der CbHST. Wie in Tabelle 7 abzulesen ist, ist die Affinität von *p*-Cumaroyl-CoA zur CbHST in Kombination mit Shikimat am größten. Tabelle 8 zeigt die K<sub>m</sub>-Werte für Shikimat in Kombination mit verschiedenen CoA-Thioestern. Der kleinste K<sub>m</sub>-Wert für Shikimat wird in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA erhalten. Also ist die Affinität zu Shikimat am größten. Wie aus den verschiedenen Zeitreihen (siehe Abbildung 102) abzulesen ist, wird *p*-Cumaroyl-CoA etwas effizienter auf Shikimat übertragen als Caffeoyl-CoA. Feruloyl-CoA wird im Vergleich zu *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA deutlich schlechter übertragen. Trotz 25-fach erhöhter Enzymkonzentration wird Feruloylshikimat langsamer gebildet als *p*-Cumaroyl- und Caffeoylshikimat. Die Veresterung von 3-Hydroxybenzoesäure verläuft noch langsamer. Die in den Zeitreihen beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten korrelieren sehr gut mit den K<sub>m</sub>-Werten für die

## Ergebnisse und Diskussion

Akzeptorsubstrate (siehe Tabelle 8). Rückschlüsse von den  $K_m$ -Werten für die CoA-aktivierten Säuren auf die Reaktionsgeschwindigkeit führen zu falschen Ergebnissen: der  $K_m$ -Wert für Feruloyl-CoA ist fast so klein wie der von *p*-Cumaroyl-CoA, obwohl die Veresterung vergleichsweise langsam abläuft. Die CbHST überträgt *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA/Cinnamoyl-CoA, Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA mit abnehmender Reaktionsgeschwindigkeit auf Shikimat.



**Abbildung 102:** Zeitreihen der CbHST mit verschiedenen Substraten im Vergleich; oben links: Bildung von *p*-Cumaroylshikimat, maximaler Substratumsatz ist bei 34 ng CbHST im Enzymtest nach 20 min erreicht, *p*-Cumaroyl-CoA und Shikimat sind die bevorzugten Substrate der CbHST; oben rechts: Bildung von Caffeoylshikimat, maximaler Substratumsatz ist bei 34 ng CbHST im Test nach 30 min erreicht, Caffeoyl-CoA wird effektiv, aber etwas langsamer als *p*-Cumaroyl-CoA auf Shikimat übertragen; unten links: Bildung von Feruloylshikimat, maximaler Substratumsatz bei 850 ng CbHST im Enzymtest ist erst nach 60 min erreicht, Feruloyl-CoA ist ein schlechtes Substrat; unten rechts: Bildung von *p*-Cumaroyl-3-Hydroxybenzoat, maximaler Substratumsatz ist bei 850 ng CbHST im Test nach 60 min Inkubationszeit noch nicht erreicht, 3-Hydroxybenzoesäure ist neben 3-Aminobenzoessäure das schlechteste Akzeptorsubstrat der CbHST.

Die Affinitäten der CbHST zu 3-Hydroxybenzoesäure ( $K_m$ : 1677  $\mu$ M) und 3-Aminobenzoessäure ( $K_m$ : 2404  $\mu$ M) in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA stehen in Übereinstimmung mit der beobachteten langsamen Reaktionsgeschwindigkeit. Die niedrigen  $K_m$ -Werte für *p*-Cumaroyl-CoA mit 3-Hydroxybenzoesäure ( $K_m$ : 1,5  $\mu$ M) und 3-Aminobenzoessäure ( $K_m$ : 18,5  $\mu$ M) deuten nicht darauf hin. Die Affinität von *p*-Cumaroyl-CoA in Kombination mit dem schlechten Substrat 3-Hydroxybenzoesäure (1,5  $\mu$ M) ist sogar noch höher als mit dem natürlichen Substrat Shikimat (4,3  $\mu$ M). Im Gegensatz dazu geben die niedrigen  $K_m$ -Werte

## Ergebnisse und Diskussion

für 3-Hydroxyanthranilsäure ( $K_m$ : 437  $\mu\text{M}$ ) und 2,3-Dihydroxybenzoesäure ( $K_m$ : 188  $\mu\text{M}$ ) einen Hinweis für die effiziente Katalyse dieser Substratkombinationen.

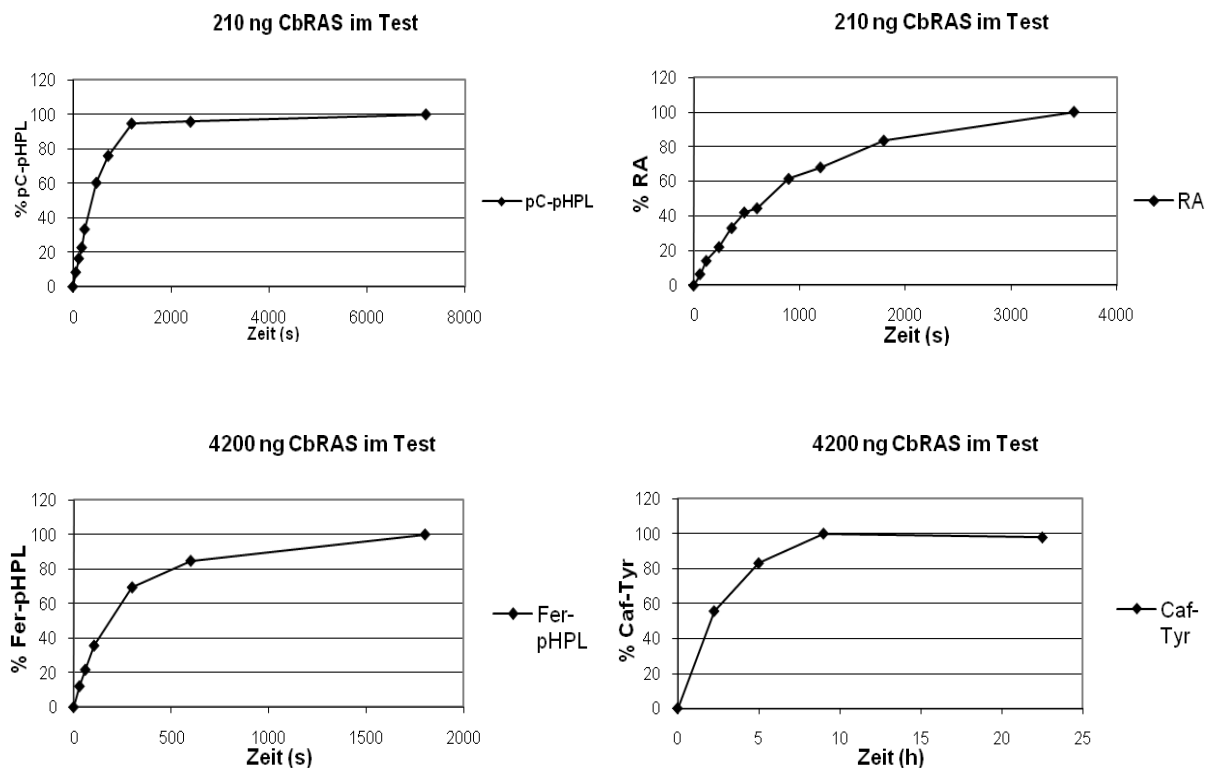
Die NtHST aus *Nicotiana tabacum* (Hoffmann et al. 2003) ist eine HAST, für die ebenfalls einige kinetische Parameter bestimmt wurden. Es wurden die  $K_m$ -Werte für *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA und Feruloyl-CoA mit Shikimat und mit Chinat (nur *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA) als zweitem Substrat bestimmt. Außerdem sind die  $K_m$ -Werte für Shikimat und Chinat in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA ermittelt worden. Zusätzlich wurden die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_{\max}$  und die  $V_{\max}/K_m$ -Werte errechnet. Weitere kinetische Parameter, z.B. mit Cinnamyol-CoA wurden nicht analysiert. Für Shikimat wurde ein  $K_m$ -Wert von 750  $\mu\text{M}$  in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA ermittelt. Die Affinität der NtHST und der CbHST zu Shikimat mit *p*-Cumaroyl-CoA als konstant gehaltenem Substrat sind vergleichbar (CbHST  $K_m$ : 332  $\mu\text{M}$ , NtHST  $K_m$ : 750  $\mu\text{M}$ ). Die ermittelten  $K_m$ -Werte für *p*-Cumaroyl-CoA (CbHST: 4,3  $\mu\text{M}$ , NtHST: 600  $\mu\text{M}$ ), Caffeoyl-CoA (CbHST: 8,8  $\mu\text{M}$ , NtHST: 50  $\mu\text{M}$ ) und Feruloyl-CoA (CbHST: 5,1  $\mu\text{M}$ , NtHST: 350  $\mu\text{M}$ ) in Kombination mit Shikimat unterscheiden sich bis zu 100-fach. Es ist zu erkennen, dass die Katalysegeschwindigkeiten nicht mit den  $K_m$ -Werten für die CoA-aktivierten Säuren korrelieren. Die NtHST überträgt *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA zehnmal effizienter als Feruloyl-CoA auf Shikimat (Hoffmann et al. 2003). Die  $K_m$ -Werte für Shikimat und für Chinat hingegen korrelieren gut mit der katalytischen Effizienz. Der *p*-Cumaroyl-Rest wird 600-mal effizienter auf Shikimat übertragen als auf Chinat ( $V_{\max}/K_m$ : 0,19 pkatal/mg/ $\mu\text{M}$  für Shikimat, 0,0003 pkatal/mg/ $\mu\text{M}$  für Chinat). Die Affinität der NtHST zu Shikimat ist 100-mal höher als zu Chinat ( $K_m$ : 750  $\mu\text{M}$  für Shikimat, 70 mM für Chinat).

Anhand der Zeitreihen für die CbRAS (Abbildung 103) ist zu erkennen, dass *p*-Cumaroyl-CoA schneller auf *p*-Hydroxyphenyllactat übertragen wird als Caffeoyl-CoA auf Dihydroxyphenyllactat. Die Übertragung von Feruloyl-CoA verläuft langsamer als die Übertragung der beiden zuvor genannten Substrate. Zur Bildung von Caffeoyltyrosin, einer *N*-Acylierung, vergehen trotz hoher Enzymkonzentrationen Stunden, bis eine Produktbildung detektiert werden kann. In der Annahme, dass die  $K_m$ -Werte der Akzeptorsubstrate hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit aussagekräftiger sind als die  $K_m$ -Werte der CoA-aktivierten Säuren, werden *p*-Cumaroyl-CoA und pHPL als die bevorzugten Substrate der CbRAS ermittelt (siehe Tabelle 10). Die Übertragung von Caffeoyl-CoA auf *p*-Hydroxyphenyllactat ist ebenfalls ein effektiver, aber etwas langsamerer Prozess.

Die bevorzugten Substrate der nativen RAS aus *Coleus blumei* Suspensionskulturen sind die monohydroxylierten Substrate *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat (Petersen 1991).

## Ergebnisse und Diskussion

In Kombination mit *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat besitzen die CoA-aktivierten Säuren *p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Feruloyl-CoA eine abnehmende Affinität zur heterolog exprimierten CbRAS (siehe Tabelle 10). Die höchste Affinität wurde für *p*-Hydroxyphenyllactat in Kombination mit *p*-Cumaroyl-CoA ermittelt. Möglicherweise ist dies die natürliche Substratkombination der CbRAS und *p*-Cumaroyl-Hydroxyphenyllactat ist ein Intermediat der Rosmarinsäurebiosynthese, wie es von Petersen et al. (2003) postuliert worden war. Trotzdem ist die CbRAS in Abhängigkeit von der *in vivo*-Verfügbarkeit der Substrate in der Lage, auch andere rosmarinsäureartige Ester zu produzieren.



**Abbildung 103:** Zeitreihen der CbRAS mit His-Tag für verschiedene Substratkombinationen im Vergleich; oben links: Bildung von *p*-Cumaroyl-*p*-Hydroxyphenyllactat, maximaler Substratumsatz ist bei 210 ng CbRAS im Test nach 20 min erreicht, *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat sind die bevorzugten Substrate der CbRAS; oben rechts: Bildung von Rosmarinsäure, maximaler Substratumsatz ist bei 210 ng CbRAS im Test nach 60 min erreicht, unten links: Bildung von Feruloyl-*p*-Hydroxyphenyllactat, maximaler Substratumsatz ist bei 4200 ng CbRAS erst nach 30 min erreicht, Feruloyl-CoA ist ein schlechtes Substrat der CbRAS; unten rechts: Bildung von Caffeoyl-Tyrosin, maximaler Substratumsatz ist bei 4200 ng CbRAS im Test nach 540 min erreicht, *N*-Acylierungen werden von der CbRAS nur sehr langsam katalysiert.

Anhand der  $K_m$ -Werte für *p*-Hydroxyphenyllactat in Kombination mit den (Hydroxy-) cinnamoyl-CoA-Derivaten ist zu erkennen, dass *p*-Cumaroyl-CoA, Caf-CoA, Cinnamoyl-CoA und Feruloyl-CoA mit abnehmender Effizienz übertragen werden ( $K_m$ -Werte: 25  $\mu$ M, 163  $\mu$ M, 550  $\mu$ M, 1425  $\mu$ M). Dasselbe gilt für die  $K_m$ -Werte, die für Dihydroxyphenyllactat ermittelt wurden ( $K_m$ -Werte: 35  $\mu$ M, 193  $\mu$ M, 340  $\mu$ M, 1300  $\mu$ M). Es fällt auf, dass die Affinitäten für

## Ergebnisse und Diskussion

Phenyllactat deutlich geringer als zu den oben genannten Akzeptorsubstraten sind ( $K_m$ -Werte: 490  $\mu\text{M}$  mit *p*-Cumaroyl-CoA, 1035  $\mu\text{M}$  mit Caffeoyl-CoA, 1346  $\mu\text{M}$  mit Cinnamoyl-CoA). Dass Tyrosin im Vergleich zu *p*-Hydroxyphenyllactat extrem schlecht umgesetzt wird, spiegeln ebenfalls die  $K_m$ -Werte wieder (1046  $\mu\text{M}$  mit *p*-Cumaroyl-CoA und 17818  $\mu\text{M}$  mit Caffeoyl-CoA).

Für die heterolog exprimierte MoRAS aus *Melissa officinalis* (Weitzel 2009) wurden einige kinetische Parameter bestimmt. Diese korrelieren sehr gut mit den Werten, die für die heterolog exprimierte CbRAS ermittelt wurden. Für *p*-Cumaroyl-CoA wurden  $K_m$ -Werte von 6  $\mu\text{M}$  (mit *p*-Hydroxyphenyllactat, CbRAS: 9,2  $\mu\text{M}$ ) und 2  $\mu\text{M}$  (mit Dihydroxyphenyllactat, CbRAS: 1,8  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Für Caffeoyl-CoA lag der  $K_m$ -Wert bei 3  $\mu\text{M}$  in Kombination mit beiden Akzeptorsubstraten (CbRAS: 2,1  $\mu\text{M}$  mit *p*-Hydroxyphenyllactat, 3,9  $\mu\text{M}$  mit Dihydroxyphenyllactat). Die  $K_m$ -Werte der Akzeptorsubstrate geben auch bei der MoRAS einen Hinweis, dass *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenyllactat die bevorzugten Substrate sind, da die Affinität zur MoRAS in dieser Substratkombination am höchsten ist ( $K_m$ -Werte für *p*-Hydroxyphenyllactat: 14  $\mu\text{M}$  (+ *p*-Cumaroyl-CoA), 70  $\mu\text{M}$  (+ Caffeoyl-CoA,  $K_m$ -Werte für DHPL: 120  $\mu\text{M}$  mit beiden CoA-aktivierten Säuren).

Die kinetischen Untersuchungen der CbHST, der NtHST, der CbRAS und der MoRAS zeigen, dass die  $K_m$ -Werte zum Teil sehr stark vom zweiten Substrat abhängig sind. Außerdem können aus den Affinitäten der CoA-aktivierten Säuren in Kombination mit verschiedenen Akzeptoren keine Aussagen über die Reaktionsgeschwindigkeit getroffen werden. Die  $K_m$ -Werte der Akzeptoren mit unterschiedlichen CoA-Thioestern liefern hingegen einen guten Hinweis für die katalytische Effizienz. Die  $V_{\text{max}}/K_m$ -Werte sind wegen starker Substratinhibition oft nicht eindeutig bestimmbar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die CbRAS eine breitere Substratspezifität besitzt als erwartet worden war. Daher steht dieses heterolog exprimierte Enzym in Zukunft als potentiell katalytisches Werkzeug für die biotechnologische Gewinnung von Rosmarinsäureanaloga zur Verfügung. Rosmarinsäure besitzt verschiedene pharmakologische Eigenschaften. Neben den antibakteriellen, antiinflammatorischen und antiviralen Wirkungen (Petersen und Simmonds 2003) wurden in anderen Arbeiten weitere pharmakologische Eigenschaften beschrieben. Interessant sind die inhibitorischen Effekte auf die HIV-1-induzierte Cytopathogenität, die möglicherweise auf eine Hemmung der Reversen Transkriptase oder der HIV-1-Integrase zurückzuführen ist (Dubois et al. 2008). Möglicherweise besitzen die Rosmarinsäureanaloga, die mithilfe der CbRAS synthetisiert werden können, eine größere hemmende Potenz auf die viralen Enzyme. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten mit HIV-infizierten Zellkulturen, z.B. mit für das AIDS-Virus

## *Ergebnisse und Diskussion*

hochempfindlichen MT4-Zellen, untersucht werden. Die Rosmarinsäureanaloga könnten sich zudem durch günstigere pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnen. Der Rosmarinsäuremetabolismus wurde von Baba et al. (2003) in Ratten untersucht. Nach oraler Applikation können im Blutplasma Rosmarinsäure, methylierte Rosmarinsäure und *m*-Cumarsäure nachgewiesen werden. Dieser Verbindungen liegen hauptsächlich in konjugierter Form als Glucuronide oder Sulfate vor und werden über die Nieren ausgeschieden. Möglicherweise besitzen die (Hydroxy-)zimtsäureamide mit D-Phenylalanin, D-Tyrosin und D-DOPA eine erhöhte Stabilität gegenüber Hydrolasen der Phase-I-Metabolisierung. Dies könnte zukünftig in weiteren Experimenten an Ratten untersucht werden.



### **3.7. Ergebnisse zur Mutagenese der CbRAS und zu CbRAS-CbHST-Chimären**

#### **3.7.1. Ergebnisse zur Mutagenese der CbRAS**

Die Mutationsversuche (siehe Kapitel 2.5.1) zur Identifizierung von funktionell oder strukturell wichtigen Aminosäuren gingen vom aktiven pET-15b Klon der CbRAS aus. Mit dem QuickChange™ II Site Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene wurden verschiedene Einzelmutationen eingeführt. Die Klone wurden in *E. coli* BL21(DE3)pLysS funktionell exprimiert. Die Bestimmung der RAS-Aktivität von über His-Tag aufgereinigtem Enzym (siehe Kapitel 2.4.4) erfolgte qualitativ und quantitativ durch Nachweis der Produkte per HPLC-Analytik (siehe Kapitel 2.4.5).

Zunächst wurden drei Primerpaare konstruiert, um die konservierten Motive <sup>152</sup>HxxxD<sup>156</sup> und <sup>377</sup>DFGWG<sup>381</sup> der CbRAS zu verändern. His<sup>152</sup>, Asp<sup>156</sup> und Asp<sup>377</sup> wurden jeweils durch ein Ala ersetzt. Erwartungsgemäß hatte der Austausch dieser hoch konservierten Aminosäuren zur Folge, dass die CbRAS-Mutanten im Standardzymtest keine RAS-Aktivität mehr besaßen. Die entsprechenden Veränderungen des HxxxD-Motivs der Vinorinsynthase führten zu Mutanten ohne Transferaseaktivität. Bei der Vinorinsynthase mit der entsprechenden Mutation im DFGWG-Motiv wurde im Vergleich zum Wildtyp eine Restaktivität von 35% beobachtet (Bayer et al. 2004). Demnach sind die Ergebnisse der Mutationsstudien von Vinorinsynthase und CbRAS vergleichbar. Es ist möglich, dass His<sup>152</sup> die an der Katalyse beteiligte Base in der Mitte des aktiven Zentrums ist.

Im Anschluss wurde eine Mutante generiert, bei der das konservierte Arg<sup>285</sup> gegen Ala ausgetauscht ist. In der Kristallstruktur der Vinorinsynthase (Ma et al. 2004) ist zu erkennen, dass das analoge konservierte Arg<sup>279</sup> eine Salzbrücke zum Asp des DFGWG-Motivs ausbildet und für die Geometrie des aktiven Zentrums essentiell ist. Die Mutation führte im Falle der CbRAS zum totalen Aktivitätsverlust, so dass dieser Aminosäure große Bedeutung zugesprochen werden kann.

Da BAHD-Acyltransferasen aus Pilzen charakterisiert und kristallisiert worden waren, deren DFGxG-Motiv nicht hoch konserviert ist, wurde das DFGWG-Motiv der CbRAS in Position 4 mutiert. Trp<sup>380</sup> wurde gegen ein Leu<sup>380</sup> ersetzt. Auch bei dieser CbRAS-Mutante konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden. Das Trp des DFGWG-Motivs ist bei der CbRAS nicht austauschbar gegen eine andere hydrophobe Aminosäure.

Durch einen GoTaq®-Polymerasefehler wurde eine zusätzliche Mutante der CbRAS erhalten. Das Codon für Leu<sup>136</sup> wurde durch Austausch einer Base zum Codon für Pro.

## *Ergebnisse und Diskussion*

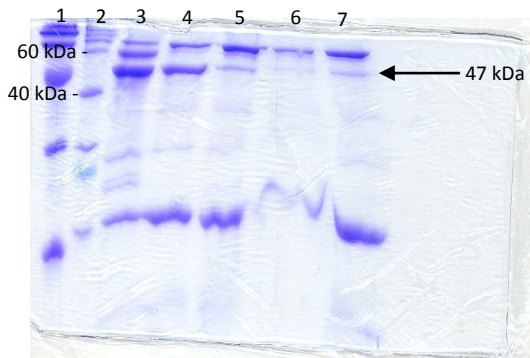
Sequenzvergleich mit anderen BAHD-Acyltransferasen (RsVS, CbRAS, CbHST, SAAT, PsSalAT, DAT, CbBEAT, DBAT, DBNTBT, HCBT, BAPT und NtHST) (Abkürzungen siehe Tabelle 16) zeigte, dass an dieser Position die aliphatischen, hydrophoben Aminosäuren Leu, Ile und Val konserviert sind. CbRAS-Mutanten, deren Leu<sup>136</sup> gegen die heterocyclische, hydrophobe Aminosäure Prolin ausgetauscht ist, waren nicht mehr aktiv.

Nachdem in den Standardenzymtests mit den über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten Mutanten keine RAS-Aktivität messbar war, wurde die Enzymkonzentration in den Tests sowie die Inkubationszeit erhöht, um die Restaktivität der Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-RAS (100% Aktivität) zu ermitteln. Die Restaktivität aller Mutanten lag unter 1% und war nur unter unphysiologischen Bedingungen messbar. Die höchste Restaktivität war bei der CbRAS Mutante D377A vorhanden.

<b>Enzym</b>	<b>Relative Aktivität (%)</b>
Wildtyp CbRAS	100
D377A	0,4
W380L	0,08
H152A	0,03
R285A	0,01
L136P	0
D156A	0

Der Nachweis für die Expression der CbRAS-Mutanten wurde durch SDS-PAGE geführt. In den Elutionfraktionen der His-Tag-Aufreinigung sind die Proteinbanden der Wildtyp-CbRAS und der CbRAS-Mutanten H152A, D156A, D377A und R285A deutlich zu erkennen. Die Mutanten W380L und L136P wurden ebenfalls über die Nickelmatrix aufgereinigt und über SDS-PAGE analysiert. Proteinbanden entsprechender Größe waren zu erkennen.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 104:** SDS-Gel: über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigte CbRAS-Mutanten. 1: RotiMark<sup>®</sup>, 2: RotiMark<sup>®</sup> PLUS, 3-7: Wildtyp-RAS, Mutante H152A, Mutante D156A, Mutante D377A, Mutante R285A.

### 3.7.2. Ergebnisse zur Konstruktion von CbRAS-CbHST-Chimären

Beim Sequenzvergleich der Vinorinsynthase mit der CbRAS und der CbHST (Abbildung 105) fiel auf, dass sich in den Sundärstrukturbereichen der Vinorinsynthase ähnliche oder identische Aminosäuren häufen. Die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter der Vinorinsynthase werden zudem oft von diesen Aminosäuren umrahmt. Im Bereich der Schlaufe, die die beiden gleich großen Domänen der Vinorinsynthase verbindet (Ma et al. 2004), sind im Alignment deutliche Sequenzunterschiede zu erkennen. Um zu untersuchen, ob die Sekundär- und Tertiärstrukturen von CbRAS und CbHST mit derjenigen der Vinorinsynthase vergleichbar sind, wurden CbRAS-CbHST-Chimäre hergestellt.



## Ergebnisse und Diskussion

Durch kreuzweise Ligation der N-terminalen und C-terminalen Fragmente entstanden die chimären Sequenzen RAS/HST und HST/RAS.

Um den Anteil an Fremdprotein zu verringern und Chimäre zu generieren, bei denen sowohl das HxxxD-Motiv als auch das DFGWG-Motiv auf dieselbe Sequenz zurückzuführen ist, wurden vier weitere Chimäre HHR, HRR, HHRH und HRHH gebildet (Kapitel 2.5.3). Dazu wurden die gemeinsamen *SacI*-Schnittstellen von CbRAS und CbHST herangezogen. Im Folgenden werden die Sequenzen der Chimäre im Vergleich zur CbRAS und zur CbHST schematisch dargestellt.

<b>CbRAS</b>	MKIEV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----FYEI
<b>CbHST</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----LYQI
<b>HST/RAS</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----FYEI
<b>RAS/HST</b>	MKIEV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----LYQI
<b>HHR</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----FYEI
<b>HRR</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----FYEI
<b>HHRH</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----LYQI
<b>HRHH</b>	MKIHV----- <i>SacI</i> -----HxxxD----- <i>CviQI</i> ----- <i>SacI</i> -----DFGWG----LYQI

**Tabelle 11:** Schematische Darstellung der CbRAS- und der CbHST-Aminosäuresequenz mit den 6 Chimären zum Vergleich. Proteinanteile, die auf die CbRAS-Sequenz zurückgehen, sind in rosa dargestellt. CbHST-Anteile sind in blau gekennzeichnet. Die Lage der verwendeten Restriktionsschnittstellen *CviQI* und *SacI* sowie der konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind eingezeichnet. *CviQI* schneidet genau in der Mitte der Sequenzen im vermuteten connecting loop. *SacI* schneidet einmal vor dem HxxxD-Motiv und ein zweites mal vor dem DFGWG-Motiv am C-terminalen Ende.

Der Erfolg der Ligation und die Integrität des Leserahmens wurden durch Sequenzanalyse bestätigt. Nach Ligation in den Expressionsvektor pET-15b und Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS konnten die Chimäre heterolog exprimiert werden. Proteinexpression konnte nach SDS-PAGE-Analyse der über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten Chimären nicht eindeutig gezeigt werden. Weder in RAS-, HST- oder HQT-Enzymtests wurde Enzymaktivität gefunden.

### **3.8. Diskussion zur Mutagenese der CbRAS und CbRAS-CbHST-Chimären**

#### **3.8.1. Diskussion zur Mutagenese der CbRAS**

Obwohl pflanzliche BAHD-Acyltransferasen nur eine minimale Sequenzidentität von 25% bis 34% aufweisen, ist das HxxxD Motiv in der Mitte der Sequenz und das DFGWG-Motiv in der Nähe des C-Terminus bei bei nahezu allen bislang charakterisierten Vertretern dieser Familie hoch konserviert. In Mutagenesestudien wurde gezeigt, dass Veränderungen in diesen Motiven zu starken Aktivitätseinbußen bis hin zum völligen Aktivitätsverlust führen (D'Auria 2006).

Ein Durchbruch gelang Ma et al. (2005) mit der Kristallstruktur der Vinorinsynthase (pdb: 2bgh), einer Acetyltransferase aus *Rauwolfia serpentina*, die an der Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin beteiligt ist. Es ist die erste Kristallstruktur einer BAHD-Acyltransferase. Die Vinorinsynthase ist ein kugelförmiges Protein, das aus zwei annähernd gleich großen Domänen aufgebaut ist, die durch eine lange Schleife miteinander verbunden sind. Alle konservierten Aminosäuren mit <sup>160</sup>HxxxD<sup>164</sup> und <sup>362</sup>DFGWG<sup>366</sup> sind in Domäne 1 lokalisiert. Das Enzym besteht aus 14  $\beta$ -Faltblättern und 13  $\alpha$ -Helices. Das aktive Zentrum wird von der Kontaktfläche beider Untereinheiten gebildet und zieht sich wie ein Kanal durch das gesamte Protein. Das katalytische His<sup>160</sup> ist in der Mitte des Kanals lokalisiert und von beiden Seiten zugänglich. Asp<sup>164</sup> zeigt vom aktiven Zentrum weg und bildet eine Salzbrücke mit dem bei BAHD-Acyltransferasen konservierten Arg<sup>279</sup>. Somit scheint es für die Geometrie des aktiven Zentrums wichtig zu sein.

Interessanterweise liegt das DFGWG-Motiv weit entfernt von aktiven Zentrum auf der Oberfläche des Proteins und scheint nicht am katalytischen Mechanismus beteiligt zu sein. Es muss von struktureller Bedeutung sein.

Basierend auf biochemischen und strukturellen Analysen wird ein Reaktionsmechanismus für den Acyltransfer der Vinorinsynthase vorgeschlagen: His<sup>160</sup> deprotoniert die Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrats, so dass es zum nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-C-Atom des CoA-Thioesters kommt. Es bildet sich ein tetrahedrisches Intermediat zwischen CoA-Thioester und dem Akzeptorsubstrat. Dieses Intermediat wird protoniert und es entsteht ein freies CoA und das acylierte Produkt.

Mit der Kristallstruktur der Anthocyanin Malonyltransferase aus *Dendranthema X morifolium* (pdb: 2e1u, 2e1v) und Cokristallisation mit Malonyl-CoA (pdb: 2e1t) konnten detaillierte Interaktionen zwischen Enzym und Acyl-CoA gezeichnet werden, sowie die Acylakzeptor-

## Ergebnisse und Diskussion

bindetasche identifiziert werden. Die räumliche Struktur der Anthoyanin Malonyltransferase weist trotz geringer Sequenzübereinstimmung von nur 20% einen sehr ähnlichen Aufbau auf wie die Vinorinsynthase. Bei Überlagerung beider Kristallstrukturen liegen die konservierten Motive HxxxD und DFGWG übereinander. Die größten Unterschiede zwischen Vinorinsynthase und Anthocyanin Malonyltransferase sind im Bereich der Acylakzeptorbindetaschen zu finden. Für die Anthocyanin Malonyltransferase wird basierend auf biochemischen und strukturellen Untersuchungen derselbe Reaktionsmechanismus angenommen wie für die Vinorinsynthase (Unno et al. 2007).

Die orthologen Trichothecen 3-O-Acetyltransferasen aus *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium graminearum* sind an der Biosynthese von Trichothecen Mykotoxinen beteiligt. Kristallstrukturen der Apoenzyme (pdb: 3fot, 3fp0) und der binären Komplexe mit Ethyl-CoA (pdb: 3b30), sowie ternäre Komplexe aus Enzym mit CoA und Akzeptorsubstraten (pdb: 2rkv, 2zba, 3b2s) deuten auf wieder denselben Reaktionsmechanismus hin. Die Suche nach homologen Proteinstrukturen ergab bei einer Sequenzidentität von 18% die höchste Ähnlichkeit zur Vinorinsynthase (Garvey et al. 2007). Die konservierten Motive befinden sich in strukturell äquivalenten Positionen. Interessanterweise ist das DFGWG-Motiv bei den Vertretern der Gattung *Fusarium*, die zur Klasse der Schlauchpilze gehört, nicht hoch konserviert. Das Tryptophan des DFGWG-Motivs ist bei den Pilzen ersetzt durch Phenylalanin oder Leucin. An der variablen vierten Position des Motivs könnte eine große hydrophobe Gruppe des DFGxG-Motivs für strukturelle Effekte wichtig sein.

Es ist denkbar, dass alle BAHD-Acyltransferasen und demnach auch die CbRAS und die CbHST einen ähnlichen Aufbau und Reaktionsmechanismus aufweisen. Bevor die CbRAS Kristallstruktur gelöst ist, sollen Mutationen von wichtigen Aminosäuren Hinweise dafür liefern. Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene zwischen Vinorinsynthase und CbRAS ist mit 56% vergleichsweise hoch.

Da in den CbRAS-Mutanten H152A, D156A, D377A, R285A und L136P hoch konservierte Aminosäuren mutiert wurden, von denen vermutet wird, dass sie am Reaktionsmechanismus, an der Substratbindung oder für die Struktur der CbRAS von großer Bedeutung sind, besitzen alle CbRAS-Mutanten erwartungsgemäß eine deutlich herabgesetzte Enzymaktivität oder sind inaktiv. Die höchsteste Restaktivität von 0,4% im Vergleich zur Wildtyp-CbRAS weist die Mutante D377A auf. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Vermutung, dass das DFGWG-Motiv nicht im aktiven Zentrum lokalisiert ist, sondern eine strukturelle Bedeutung besitzt. Die Mutanten L136P und D156A waren inaktiv. Das Asp<sup>156</sup> übt vermutlich wie das Asp<sup>164</sup> bei der Vinorinsynthase einen Einfluss auf die Geometrie des aktiven Zentrums aus. Ähnliche Funktionen könnte Leu<sup>136</sup> übernehmen. Überraschenderweise konnte für die CbRAS-Mutante H152A eine geringe

## *Ergebnisse und Diskussion*

Restaktivität von 0,01% ermittelt werden. Da anzunehmen ist, dass das H<sup>152</sup> die katalytische Base im aktiven Zentrum der CbRAS ist, wäre ein totaler Aktivitätsverlust zu erwarten gewesen. In zukünftigen Mutationsstudien könnte untersucht werden, welchen Einfluss der Austausch der konservierten Aminosäuren gegen Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften auf die Enzymaktivität ausüben. So könnte das H152 gegen eine andere basische Aminosäure wie z.B. Arginin ausgetauscht werden. Ebenso könnte untersucht werden, welche Effekte ein Austausch der Asparaginsäuren (Asp377 und Asp156) gegen Glutaminsäure hat. Die Ergebnisse aus den Mutagenesestudien der CbRAS deuten darauf hin, dass die mutierten Aminosäuren ähnliche Funktionen wie bei den bisher kristallisierten BAHD-Acyltransferasen übernehmen.

### 3.8.2. Diskussion zur Mutagenese der CbRAS-CbHST-Chimären

Da die Ergebnisse aus den Mutagenesestudien einen Hinweis dafür liefern, dass die mutierten konservierten Aminosäuren der CbRAS vergleichbare Funktionen übernehmen wie die entsprechenden Aminosäuren bei der Vinorinsynthase aus *Rauwolfia serpentina* (Ma et al. 2004), der Anthocyanin Malonyltransferase aus *Dendranthema x morifolium* (Unno et al. 2007) und den Trichothecen 3-O-Acetyltransferasen aus *Fusarium*-Arten (Garvey et al. 2007), sollten weitere Versuche zeigen, ob die CbRAS auch strukturell mit den anderen BAHD-Acyltransferasen korreliert.

Bei diesen BAHD-Acyltransferasen, deren Strukturaufklärung gelang, sind trotz geringer Sequenzidentität die Tertiärstrukturen sehr ähnlich. Ein einheitlicher Reaktionsmechanismus liegt der Katalyse zugrunde. Möglicherweise sind dies generelle Eigenschaften aller BAHD-Acyltransferasen. Die Beobachtungen aus dem Sequenzvergleich der Vinorinsynthase mit der CbRAS und der CbHST (siehe Kapitel 3.7.2), die die Annahme einer ähnlichen Sekundärstruktur zuließen, führten zur Annahme einer gemeinsamen dreidimensionalen Struktur der drei Proteine. Phylogenetische Betrachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei den Vertretern der BAHD-Acyltransferasen um homologe Proteine handelt (Yu et al. 2009). Homologe Proteine haben am allgemeinen ähnliche Tertiärstrukturen.

CbRAS und CbHST haben mit 56% Sequenzidentität auf Aminosäureebene eine vergleichsweise hohe Sequenzübereinstimmung und katalysieren zudem ähnliche Reaktionen. Während beide Enzyme dieselben CoA-aktivierten Säuren (pC-CoA und Caf-CoA) übertragen, variiert nur das Akzeptorsubstrat. Möglicherweise ähneln sich die CoA-Bindetaschen von CbRAS und CbHST sehr stark, während die Akzeptorbindetaschen sich



## *Ergebnisse und Diskussion*

unterscheiden. Um die Substratspezifität zu ändern und Einblicke in die an der Substratbindung beteiligten Bereiche zu erhalten, wurden insgesamt 6 Chimäre aus CbRAS und CbHST hergestellt. In der Annahme, dass CbRAS und CbHST wie die Vinorinsynthase aus zwei gleich großen Domänen aufgebaut sind, die durch eine Schlaufe miteinander verbunden werden, wurden zunächst die HST/RAS- und die RAS/HST-Chimären mit jeweils 50% Fremdproteinanteil hergestellt. Der Übergang von Original- zu Fremdprotein befindet sich innerhalb der postulierten Schleife von CbRAS und CbHST. Um den Anteil an Fremdprotein zu verringern und Chimäre zu generieren, bei denen sowohl das HxxxD-Motiv als auch das DFGWG-Motiv auf dieselbe Sequenz zurückzuführen (siehe Kapitel 3.5.2) sind, wurden vier weitere Chimäre HHR, HRR, HHRH und HRHH gebildet. Nach Ligation in den Expressionsvektor pET-15b und Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS konnten die Chimäre heterolog exprimiert werden. In RAS-, HST- und HQT-Enzymtests war keine der Chimären aktiv. Da die Proteinexpression der Chimäre nicht eindeutig gezeigt wurde, könnte der Enzymgehalt in den Enzymtests für eine detektierbare Produktbildung zu gering gewesen sein. In zukünftigen Versuchen müssen größere Proteinmengen aufgereinigt werden und die Enzymtests wiederholt werden. Zur Zeit können aus diesen Versuchen keine Schlussfolgerungen zu den aktiven Zentren der CbRAS und der CbHST gezogen werden.

Dieses Ergebnis kann nicht als Hinweis gedeutet werden, dass CbRAS und CbHST eine unterschiedliche dreidimensionale Struktur besitzen. Möglicherweise können die chimären Proteine nicht richtig gefaltet werden, oder die Bindetaschen verändern sich auf eine Weise, dass gar keine Substratbindung mehr möglich ist. So bleibt zur Bewertung der Unterschiede in den aktiven Zentren von CbRAS und CbHST nur ihre Kristallisation mit anschließender Strukturaufklärung.

### **3.9. Ergebnisse: Versuche zur Klonierung einer RAS, einer HST und einer HQT aus *Glechoma hederacea***

#### **3.9.1. Untersuchung von *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* auf sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: Rosmarinsäure und Chlorogensäure**

Einer Arbeit von Abdullah et al. aus 2008 kann entnommen werden, dass *Coleus blumei* zwar RA bildet, nicht aber CA. Aus *Glechoma hederacea* und *Dracophalum spec.* konnten beide Sundärstoffe isoliert werden.

In eigenen Untersuchungen von Pflanzenextrakten konnte in *Coleus blumei* nur Rosmarinsäure und in *Glechoma hederacea* Rosmarinsäure und Chlorogensäure nebeneinander nachgewiesen werden.

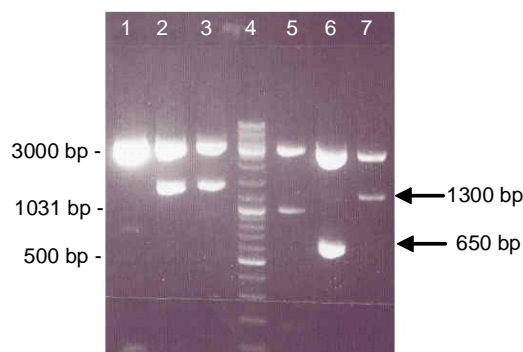
Die BAHD-Acyltransferasen, die an der Biosynthese von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und des in Landpflanzen ubiquitär verbreiteten Lignins sollen aus *Glechoma hederacea* kloniert und nach heterologer Expression biochemisch charakterisiert werden.

#### **3.9.2. Versuche zur cDNA-Klonierung einer GhRAS**

##### **3.9.2.1. Amplifikation des 5´-cDNA-Endes mit einem RAS-spezifischen Primer**

Es standen zwei RAS-spezifische degenerierte Primer mit hoher Schmelztemperatur (RAS-Rn6 und RAS-Fn7) zur Verfügung, die sich gegen die konservierten Motive HxxxD und DFGWG der RAS richten. Nach einer RACE-PCR mit dem degenerierten reverse Primer RAS-Rn6 in Kombination mit dem GeneRacer™ 5´-Primer (siehe Kapitel 2.6.2.1), konnten auf dem Agarosegel unterschiedlich große Banden gesehen werden. Zwei Banden mit der erwarteten Mindestlänge von 1150 Basenpaare wurden aus dem Gel aufgereinigt und in nested-PCR-Ansätzen mit den Primern RAS-Rn6 und RAS-Fn7 näher untersucht (siehe Kapitel 2.6.2.1). Die Bande, die in der nested-PCR zur Amplifikation eines 700 Basenpaare großen Fragments führte, wurde nach Ligation in pGEM®-T und Transformation von *E. coli* DH5α sequenziert.

## Ergebnisse und Diskussion



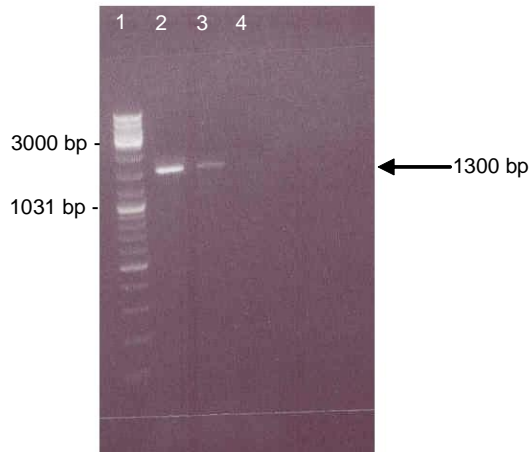
**Abbildung 106:** Agarosegel der RACE-PCR Amplifikate für das 5'-Ende der GhRAS-Sequenz nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T, Vermehrung in *E. coli* DH5 $\alpha$ , Plasmidpräparation und Verdau mit *Sac*II und *Spe*I. Die ausgeschnittene PCR-Bande besteht offensichtlich aus verschiedenen Sequenzen. Das markierte Fragment aus Bahn 7 mit 1300 Basenpaaren wurde zum Sequenzieren geschickt. 4: DNA-Leiter, 1-3 und 5-7: Plasmidpräparationen.

Bei einem Datenbankvergleich auf Basis der Nukleotidsequenz wurde die höchste Ähnlichkeit zur CbRAS gefunden. Auf Aminosäureebene haben CbRAS und das 5'-cDNA-Ende aus *Glechoma hederacea* eine Identität von 78%.

### 3.9.2.2. Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der GhRAS

Zur Verlängerung der bekannten GhRAS-Teilsequenz zur Gesamtlänge wurde der genspezifische Primer Gh-RAS2-f entworfen und in Kombination mit dem GeneRacer<sup>™</sup> 3'-Primer in einer RACE-PCR eingesetzt. Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese konnte ein 1300 Basenpaare großes PCR-Produkt ausgeschnitten werden (Abbildung 107). Nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T und Vermehren in DH5 $\alpha$  konnte nach Sequenzierung das gesamte durchgehende Leseraster, das 1299 Basenpaare umfasst und für ein Protein mit 432 Aminosäuren kodiert, zusammengesetzt werden. Die für BAHD-Acyltransferasen typischen konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind vorhanden. Das errechnete Molekulargewicht liegt bei 47,7 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt bei pH 5,8.

## Ergebnisse und Diskussion

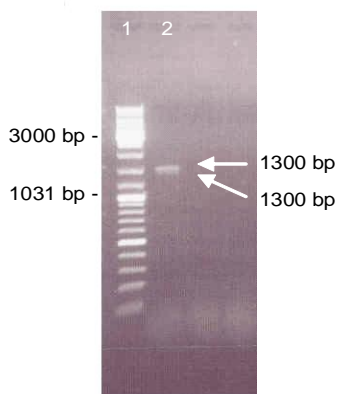


**Abbildung 107:** Agarosegel der 3'-RACE-PCR zur Amplifikation der GhRAS-Gesamtlänge. 1: DNA-Leiter, 2-4: PCR-Ansätze bei verschiedenen Annealingtemperaturen (55 °C/60 °C/65 °C). Das PCR-Produkt mit 1300 Basenpaaren wird in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert und in DH5a vermehrt.

### 3.9.2.3. Amplifikation der Volllänge-sequenz der GhRAS

Zur Auswahl eines geeigneten Expressionsvektors wurden die Restriktionsschnittstellen, die sich innerhalb der GhRAS-Gesamtequenz befinden, mit Hilfe der Software NEB cutter V 2.0 ermittelt. Die GhRAS-Sequenz kann über die *EcoRI*-Schnittstelle vorne und die *SalI*-Schnittstelle hinten in den pET-41a Vektor ligiert werden. Daher wurden mit HCT F und HCT R Vollängenprimer gestaltet, die die o.g. Schnittstellen an die GhRAS-Sequenz anhängen. In der in Kapitel 2.6.2.3 beschriebenen PCR mit HiFi-Taq<sup>®</sup>-Polymerase konnten zwei Fragmente vervielfältigt werden. Abbildung 108 zeigt das entsprechende Agarosegel. Es sind eindeutig zwei Banden zu sehen, die sich in ihrer Größe nur wenig unterscheiden.

Das längere Fragment liegt in größerer Kopienzahl vor.



**Abbildung 108:** Agarosegel der PCR zur Amplifikation der GhRAS-Volllänge-sequenz; 1: Marker, 2: PCR-Ansatz. Es wurden zwei Fragmente mit einer Größe von ca. 1300 bp amplifiziert.

## Ergebnisse und Diskussion

Beide PCR-Produkte wurden in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt. Nach Präparation von Plasmid-DNA und Verdau mit *Eco*RI und *Sa*I konnten beide Vollängensequenzen in pET-41a ligiert und in BL21(DE3)pLysS exprimiert werden.

Die Sequenz des kleineren Fragmentes wurde ebenfalls ermittelt. Es handelt sich um ein durchgehendes Leseraster mit 1197 Basenpaaren. Die Aminosäuresequenz umfasst 398 Aminosäuren mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 5,9 und einem Molekulargewicht von 44,1 kDa.

Zur Überprüfung der Ähnlichkeit der beiden Fragmente zueinander wurden sie mit Hilfe der Software ClustalW übereinander gelegt (siehe Abbildung 109). Das größere PCR-Produkt heißt GhRAS-l, das kurze Fragment ist mit GhRAS-k bezeichnet. Trotz hoher Sequenzidentität fällt die Deletion von 102 Basenpaaren ab Base Nummer 920 auf. Darüberhinaus sind in den Sequenzen einzelne Basen ausgetauscht. Im Alignment ist die Lage sämtlicher genspezifischer Primer, die zur erfolgreichen Klonierung der GhRAS-Sequenzen führten, unterstrichen und grau unterlegt. Die Pfeile geben die Verlängerungsrichtung an. Im Bereich der Vollängenprimer HCT F und HCT R unterscheiden sich die beiden Sequenzen nicht.

```
GhRAS-l      ATGAAGATCGACGCTCAAAGAATCGACGATGGTGAGGCCGGCGGCGGAGACGCCGAGCGGC 60
GhRAS-k      ATGAAGATCGACGCTCAAAGAATCGACGATGGTGAGGCCGGCGGCGGAGACGCCGAGCGGC 60
*****
                Gh-RAS2-f / HCT F →
GhRAS-l      AGCGTATGGCTGTCGAATTTGGACTTGCTATCGCCGGCAAACCTACCACACACTGAGCGTG 120
GhRAS-k      AGCGTATGGCTGTCGAATTTGGACTTGCTATCGCCGGCAAACCTACCACACACTGAGCGTG 120
*****
GhRAS-l      CACTTCTACAGCCACGACGGCTCGGCCGATTTCTTCGAGGCGGCGGCGTTGAAGGAGGCG 180
GhRAS-k      CACTTCTACAGCCACGACGGCTCGGCCGATTTCTTCGAGGCGGCGGCGTTGAAGGAGGCG 180
*****
GhRAS-l      CTCAGCCGCGCCCTGGTCGAGTTCTACCCGTACGCGGGGCGGCTGAAGATGAACGATAAT 240
GhRAS-k      CTCAGCCGCGCCCTGGTCGAGTTCTACCCGTACGCGGGGCGGCTGAAGATGAACGATAAT 240
*****
GhRAS-l      AATCGCCTCGAGATCGACTGCAACGGCGAGGGGCTGCTGTTAGTGGAGGCGGAGTGCGAC 300
GhRAS-k      AATCGCCTCGAGATCGACTGCAACGGCGAGGGGCTGCTGTTAGTGGAGGCGGAGTGCGAT 300
*****
GhRAS-l      GGTGAGATGGCGGAGCTCGGGGACTTCGCGCCCCGCCCGACCTCAGCCTTATCCCCAAA 360
GhRAS-k      GGCGCGATGGCGGAGCTCGGGGACTTCGCGCCCCGCCCGACCTAAGCCTTATCCCCAAA 360
** * *****
GhRAS-l      GTTGATTATGCTAAAGGAATTTCCACGTACCCGCTCATGCTCTTTCAGCTAACTCGTTTC 420
GhRAS-k      GTTGATTATGCTAAAGGAATTTCCACGTACCCGCTCATGCTCTTTCAGCTAACTCGTTTC 420
*****
GhRAS-l      AAATGCGGCGGCGTCTGCTTAGGCGTTGCGAACGAGCACCACTTATCCGACGGCGTCTCC 480
GhRAS-k      AAATGCGGCGGCGTCTGCTTAGGCGTTGCGAACGAGCACCACTTATCCGACGGCGTCTCC 480
*****
                RAS-Fn7 →
GhRAS-l      GCCCTCCACTTCATCAACACGTGGTGCAACCTCGCCCAGGGCGTCCCGGCCCGGCCCG 540
GhRAS-k      GCCCTCCACTTCATCAACACGTGGTGCAACCTCGCCCAGGGCGTCCCGGCCCGGCCCG 540
*****
GhRAS-l      GCCCCCGTGTTCGACCGCAGCGCCCTCTCGGCCCGTAACCCCCCGCAGCCGCAAGTTCAGC 600
GhRAS-k      GCCCCCGTGTTCGACCGCAGCGCCCTCTCGGCCCGTAACCCCCCGCAGCCGCAAGTTCAGC 600
*****
```

## Ergebnisse und Diskussion

GhRAS-1	CATGCCGAGTACCAGCCCCCTCCCACCCTCCCACCCCTCTCGAAAACACCGAGATCGCC	660
GhRAS-k	CACGCCGAGTACCAGCCCCCTCCCACCCTCCCACCCCTCTCGAAAACACCGAGATCGCC	660
	** *****	
GhRAS-1	TACTCCAAGTTCAAGCTCACCCGCGATCAGCTCGCCGCCCTCAAGTCCACGTGCAAAGCC	720
GhRAS-k	TACTCCAAGTTCAAGCTCACCCGCGATCAGCTCGCCGCCCTCAAGTCCACGTGCAAAGCC	720
	*****	
GhRAS-1	ACGCCACGGCCCGCCGACGGATCCGCCCGGCCCTACAGCACGTTTCGAGGTCCTCGCGGGC	780
GhRAS-k	ACGCCACGGCCCGCCCGACGGATCCGCCCGGCCCTACAGCACGTTTCGAGGTCCTCGCGGGC	780
	** *****	
GhRAS-1	CACATCTGGCGCTGCGTCTGCGTCGCCCGCGCCCTCCCGGGGAGCAGGAGACGAAGCTC	840
GhRAS-k	CACATCTGGCGCTGCGTATGCGTCGCCCGCGCCCTCCCGGGGAGCAGGAGACGAAGCTC	840
	*****	
GhRAS-1	CACATCCCCTTTGACGGGCGGGCGAAGCTTAGGCTGCCGCGGGTTTTTTCGGCAACGCC	900
GhRAS-k	CACATCCCCTTTGACGGGCGGGCGAAGCTTAGGCTGCCGCGGGTTTTTTCGGCAACGCC	900
	*****	
GhRAS-1	ATATTCTTCGCCACGCCGTCGCCACGTGCGGCGAGATCGAGGCGAACTCGATCTCGCAC	960
GhRAS-k	ATATTCTTCGCCACGCCGTC-----	920
	*****	
GhRAS-1	GCCGTGCGGAGGGTCGGGGACGCCATAGGGCGCCTTGACGAGGACTACCTAAAGTCGTCA	1020
GhRAS-k	-----	
GhRAS-1	GTGATTTCTTGAAATGCGGCCGAATATAAGTAAGCTCGCGCAGGGGCCCCACAGCTTT	1080
GhRAS-k	--TGATTTCTTGAAATGCGGCCGAATATAAGTAAGCTCGCGCAGGGGACCCACAGCTTT	978
	*****	
GhRAS-1	AGGTGCCCTAATCTATGGGTGATAAGCTGGGTGCGGCTGCCGATT	1140
GhRAS-k	AGGTGCCCTAATCTATGGGTGATAAGCTGGGTGCGGCTGCCGATT	1038
	*****	
	← RAS-Rn6	
GhRAS-1	GGGTGGGAAAGCGCGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCGCCGTTGAAGGGAAGAGCTAT	1200
GhRAS-k	GGGTGGGAAAGCGCGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCGCCGTTGAAGGGAAGAGCTAT	1098
	*****	
GhRAS-1	TTGCTGCCGAATCCAGATAACGACGGCAGCTTATTTGTCGCCATTACGCTGCATACGCAG	1260
GhRAS-k	TTGCTGCCAAATCCGGATAACGACGGCAGCTTATTTGTCGCCATTACGCTGCATACGCAG	1158
	*****	
GhRAS-1	CATATGGAGCGCTTTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTTAA	1299
GhRAS-k	CATATGGAGCGCTTTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTTAA	1197
	*****	
	← HCT R	

**Abbildung 109:** Alignment der Nukleotidsequenzen der GhRAS-l und GhRAS-k. Die Lage der verwendeten Primer ist eingezeichnet.

Mit beiden Nukleotidsequenzstücken wurde eine NCBI-Datenbankrecherche nach ähnlichen Proteinen durchgeführt. Die größten Ähnlichkeiten wurden zu der bislang publizierten RAS-Sequenz gefunden. Für die längere Sequenz GhRAS-l ergeben sich folgende Übereinstimmungen:

81% Identität mit der CbRAS und

77% Identität zu der Alkoholacyltransferase (LaAT1) aus *Lavandula angustifolia* (ABI48360).

## Ergebnisse und Diskussion

Zu den HCSQTs wurden geringere Ähnlichkeiten gefunden:

53% Identität zu der HCSQT aus *Coffea canephora* (EF 137954.1) ist die größte Übereinstimmung zu einer HCSQT. Für die kürzere Sequenz GhRAS-k ist das Ergebnis ähnlich:

Die höchste Identität wurde gefunden zur CbRAS (76%), gefolgt von der LaAT1 aus *Lavandula angustifolia* (72%) und der HCSQT aus *Coffea canephora* (51%).

Werden GhRAS-I und GhRAS-k auf Aminosäureebene miteinander verglichen, so fällt auf, dass GhRAS-k durch eine Deletion nach Position 306 um 36 Aminosäuren verkürzt ist. Die weiteren Unterschiede beschränken sich auf 5 Aminosäuren, von denen 4 ähnlich sind.

```

GhRAS-1      MKIDVKESTMVRPAAETPSGSVWLSNLDLLSPANYHTLSVHFYSHDGSADFFEEAALKEA 60
GhRAS-k      MKIDVKESTMVRPAAETPSGSVWLSNLDLLSPANYHTLSVHFYSHDGSADFFEEAALKEA 60
              *****

GhRAS-1      LSRALVEFYYPYAGRLKMNDNNRLEIDCNGEGLLLVEAECDEMAELGDFAPRPDLSLIPK 120
GhRAS-k      LSRALVEFYYPYAGRLKMNDNNRLEIDCNGEGLLLVEAECDEMAELGDFAPRPDLSLIPK 120
              *****

GhRAS-1      VDYAKGISTYPLMLFQLTRFKCGGVCLGVANEHHLSDGVSALHFINTWCNLARGVPAPAP 180
GhRAS-k      VDYAKGISTYPLMLFQLTRFKCGGVCLGVANEHHLSDGVSALHFINTWCNLARGVPAPAP 180
              *****

GhRAS-1      APVFDRSALSARNPPQPQFSHAIEYQPPPTLPTPLENTEIAYSKFKLTRDQLAALKSTCKA 240
GhRAS-k      APVFDRSALSARNPPQPQFSHAIEYQPPPTLPTPLENTEIAYSKFKLTRDQLAALKSTCKA 240
              *****

GhRAS-1      TATAADGSARPYSTFEVLGHIWRCVCVARALPGEQETKLHIPFDGRAKLRLPPGFFGNA 300
GhRAS-k      TATAADGSARPYSTFEVLGHIWRCVCVARALPGEQETKLHIPFDGRAKLRLPPGFFGNA 300
              *****

GhRAS-1      IFFATPVATCGEIEANSISHAVRRVGDAGRLDEDEYLKSSVDFLEMRPNISKLAQGPHSF 360
GhRAS-k      IFFATP-----VDFLEMQPDISKLAQGHHSF 326
              *****

GhRAS-1      RCPNLWVISWVRLPIYEPDFGWGKAVYMGPWAAFFEGKSYLLPNPDNDGSLFVAITLHTQ 420
GhRAS-k      RCPNLWVISWVRLPIYEPDFGWGKAVYMGPWAAFFEGKSYLLPNPDNDGSLFVAITLHTQ 386
              *****

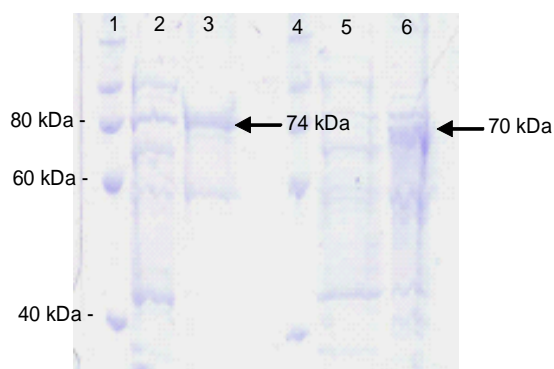
GhRAS-1      HMERFEKLFYEI 432
GhRAS-k      HMERFEKLFYEI 398
              *****
    
```

**Abbildung 110:** Alignment der Aminosäuresequenzen von GhRAS-I und GhRAS-k. Die konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind fett dargestellt. Bereiche, in denen sich die kurze und die lange GhRAS voneinander unterscheiden, sind grau unterlegt.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.9.2.4. Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der GhRAS

GhRAS-k und Gh-RAS-l werden mit Hilfe des pET-41a Vektors als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Tag und N-terminalem His-Tag exprimiert und die Rohextrakte über His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Kapitel 2.7). Das unten dargestellte SDS-Gel zeigt das Ergebnis der Expression und der Aufreinigung. Beide heterolog exprimierten Enzyme werden nicht stark überexprimiert. Erst nach der Aufreinigung können zwei RAS-GST-Banden identifiziert werden, die deutlich aufkonzentriert wurden und eine Größe von ca. 74 kDa aufweisen.



**Abbildung 111:** SDS-Gel zur Aufreinigung der heterolog exprimierten GhRAS-I (links) und GhRAS-k (rechts). 1 und 4: RotiMark® PLUS, 2: GhRAS-I im Proteinrohextrakt, 3: GhRAS-I nach der His-Tag-Aufreinigung, 5: GhRAS-k im Proteinrohextrakt, 6: GhRAS-k nach der His-Tag-Aufreinigung.

Standardenzymtests zur Untersuchung auf RAS-, HST- und HQT-Aktivität führten zu dem Ergebnis, dass die lange GhRAS-I die typischen Substrate einer RAS umsetzt, nicht aber die Substrate, die von HSTs oder HQTs akzeptiert werden. Das Protein GhRAS-k mit der Deletion in der Mitte der Sequenz setzt keine der angebotenen Substratkombinationen um.

Gh-RAS-I	pHPL	DHPL	Shikimisäure	Chinasäure
pC-CoA	pC-pHPL	pC-DHPL	n.d.	n.d.
Caf-CoA	Caf-pHPL	RA	n.d.	n.d.

**Tabelle 12:** Tabelle zur Substratspezifität der GhRAS-I; pC-CoA und Caf-CoA werden auf die typischen RAS-Akzeptoren pHPL und DHPL übertragen; mit Shikimisäure und Chinasäure ist eine Produktbildung nicht zu beobachten, (n.d. = nicht detektierbar)



## Ergebnisse und Diskussion

Gh-RAS-k	pHPL	DHPL	Shikimat	Chinasäure
pC-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caf-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 13:** Tabelle zur Substratspezifität der verkürzten GhRAS-k; es konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden, (n.d.= nicht detektierbar)

### 3.9.3. Versuche zur cDNA-Klonierung einer GhHST

#### 3.9.3.1. Amplifikation des 5'-cDNA-Endes mit einem HST-spezifischen Primer

In einer 5'-RACE-PCR mit dem genspezifischen Primer HCT-Cb3', der bei der Klonierung der CbHST erfolgreich war, mit GeneRacer™ 5'-Primer als Ankerprimer und anschließender 5'-nested PCR mit Primer HCT-Cb3'n gelang die Isolierung einer Teilsequenz einer GhHST (Kapitel 2.6.3.1). Im Folgenden ist der Ausschnitt eines Alignments der schon bekannten GhRAS-Sequenzen mit der CbHST-Sequenz zu sehen, das zur Entscheidung für die HCT-Cb-Primer führten. Die Lage der Primer ist durch graue Unterlegung und die Verlängerungsrichtung durch Pfeile eingezeichnet. Da die Primer nicht exakt komplementär zu den GhRAS-Sequenzen sind, wurde erwartet, dass sie spezifisch an eine HST binden.

```

Gh-RASk      TTCAAATGCGGGCGGCTCTGCTTAGGGCGTTGCGAATGAGCACCACCTTATCCGACGGCGTC 477
GhRAS-1     TTCAAATGCGGGCGGCTCTGCTTAGGGCGTTGCGAACGAGCACCACCTTATCCGACGGCGTC 477
CbHST       TTCAAATGCGGGAGGTGTTTCTTAGGGCGTTGGAAATGCAGCACCACGCAGCCGACGGATT 477
            ***** ** * * ***** * ***** * ***** *
                                     ← HCT-Cb3'n
Gh-RASk      TCGGCCCTCCACTTCATCAACAGTGGTGCAACCTCGCCCGAGGCGTCCCGGCCCGGCC 537
GhRAS-1     TCGGCCCTCCACTTCATCAACAGTGGTGCAACCTCGCCCGAGGCGTCCCGGCCCGGCC 537
CbHST       TCGGCCCTCCACTTCATCAATACATGGTCCGATATGGCTCGTGGAA---CTGGACATCACC 534
            **** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     ← HCT-Cb3'n
Gh-RASk      CCGGCCCGCGTGTTCGACCCGACGCGCCCTCTCGGCCCGCAACCCCGCAGCCGAGTTC 597
GhRAS-1     CCGGCCCGCGTGTTCGACCCGACGCGCCCTCTCGGCCCGTAACCCCGCAGCCGAGTTC 597
CbHST       CTCCCGCCCTTCATAGACCCGACCCCTTCTCTCGCGGTGATCCCCCTCAGCCGAGTTC 594
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     ← HCT-Cb3'n
Gh-RASk      AGCCACGCCGAGTACCAGCCCCCTCCCACCCCTCCCACCCCTCTCGAAAACACCGAGATC 657
GhRAS-1     AGCCATGCCGAGTACCAGCCCCCTCCCACCCCTCCCACCCCTCTCGAAAACACCGAGATC 657
CbHST       AAGCAGTGGAGTACCAGCCCCCTCCAGCCATGAAAACCTA---CGAACCAGCTGAAACA 651
            * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     ← HCT-Cb3'

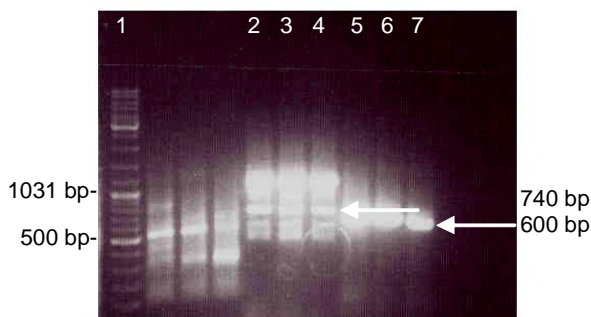
```

**Abbildung 112:** Alignment der Nukleotidsequenzen von GhRAS-k, GhRAS-l und CbHST. Die Lage der verwendeten 5'-RACE-Primer ist eingezeichnet.

Bei der 5'-RACE-PCR wurde ein Fragment aus 740 Basenpaaren amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde ausgeschnitten und in pGEM®-T ligiert, um es nach Vermehren in *E. coli* DH5α und Plasmidpräparation mit anschließendem Verdau mit *NcoI* und *NdeI* sequenzieren

## Ergebnisse und Diskussion

zu lassen. Wie in Abbildung 113 zu erkennen ist, wurden bei der 5'-RACE-PCR mehrere Banden amplifiziert. Die nested PCR lieferte den entscheidenden Hinweis, welche der Banden die erwünschte HST-Bande ist.



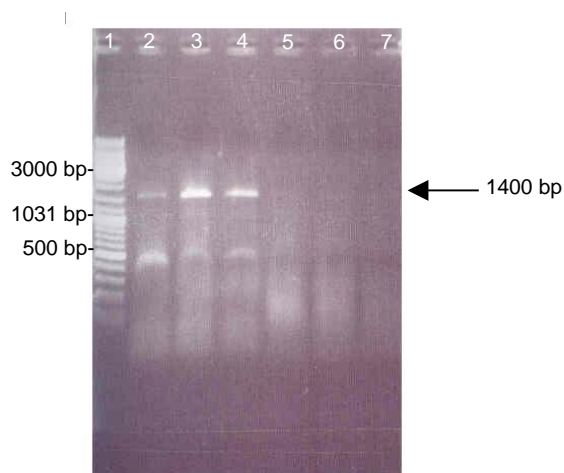
**Abbildung 113:** Agarosegel der RACE-PCR für das 5'-Ende der GhHST. Die PCR-Ansätze der 5'-RACE und der 5'-nested PCR wurden aufgetragen; 1: DNA-Leiter, 5-7: 5'-RACE-PCR, 8-10: nested PCR. Die markierten Banden mit einer Größe von 740 Basenpaare wurden ausgeschnitten und in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert. Im nested PCR-Ansatz wurde eine Bande amplifiziert, die 140 Basenpaare kleiner ist.

Für die Teilsequenz wurde eine hohe Übereinstimmung zu anderen HSTs gefunden. Die größte Identität auf Aminosäureebene mit 80% wurde zu der HCSQT aus *Coffea arabica* (s.o.) gefunden.

### 3.9.3.2. Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der GhHST

Zur Amplifikation des dazugehörigen 3'-cDNA-Endes wurde der genspezifische forward Primer HCT-27/1f entwickelt und in einer RACE-PCR mit dem GeneRacer<sup>™</sup> 3'-nested Primer eingesetzt (Kapitel 2.6.3.2). Auf dem Agarosegel konnte eine Bande identifiziert werden, die der erwarteten Größe von 1400 Basenpaaren entspricht. Diese Bande wurde ausgeschnitten und kloniert, da die nested-PCR mit HCT-27/1f und Primern, die sich gegen den PolyA-Schwanz richten, auch zu einem Amplifikat mit der erwarteten Größe von 1400 Basenpaaren führte.

## Ergebnisse und Diskussion



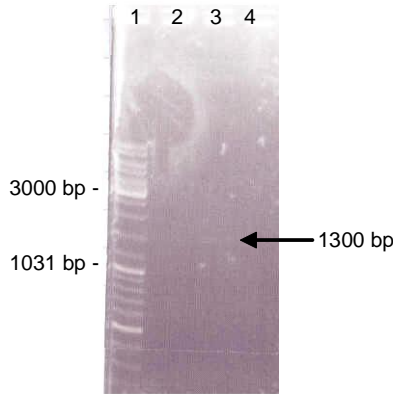
**Abbildung 114:** Agarosegel der RACE-PCR für das 3'-cDNA-Ende der GhHST und der GhHQT; 1. DNA-Leiter, 2-4: PCR GhHST, 5-7: PCR GhHQT. Die 1400 Basenpaare großen PCR-Produkte aus Bahn 2-4 und Bahn 5-7 wurden aus dem Gel extrahiert und in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert.

Das sequenzierte 3'-RACE-Fragment entsprach im überlappenden Bereich dem 5'-cDNA-Ende. Es konnte ein durchgehendes Leseraster sowie die konservierten Motive HxxxD und DFGWG gefunden werden.

### 3.9.3.3. Amplifikation der Vollängensequenz der GhHST

Nach Überprüfung der internen Schnittstellen wurden die Vollängenprimer Gh-HCT-VLf und Gh-HCT-VLr generiert, über die die Schnittstellen *EcoRI* vorne und *SaI* hinten an die Gesamtsequenz angehängt werden konnten. Mit der in Kapitel 2.6.3.3 beschriebenen PCR mit HiFi-Taq<sup>®</sup>-Polymerase konnten die Gesamtsequenzen von zwei GhHSTs amplifiziert werden. Auf dem Agarosegel in Abbildung 115 sind 2 schwache Bande auf Höhe von 1300 Basenpaaren zu erkennen.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 115:** Agarosegel zur Amplifizierung der GhHST mit Vollängenprimern. 1: DNA-Leiter, 2-4: PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (53 °C/56 °C/60 °C). Das 1300 Basenpaare große Fragment, das in Bahn 3 schwach zu erkennen ist, wurde ausgeschnitten und kloniert.

Mehrere Klone der GhHST in pGEM<sup>®</sup>-T wurden sequenziert, wobei zwei verschiedene Vollängensequenzen identifiziert wurden, die sich im Bereich der Vollängenprimer nicht unterscheiden. Auf Nukleotidebene haben sie eine Identität von 98% zueinander. Es ist eine Deletion von 12 Nukleotiden ab Position 646 vorhanden. 15 unterschiedliche Nukleotide sind über die gesamte Sequenz verstreut zu finden (siehe Abbildung 116).

```

Gh-HST-1      ATGAAAATCGAGGTGAGAGACTCGACGCTGGTGCGGCCGTCGGCGGCGACGCCGGCGGTG  60
GhHST-k      ATGAAAATCGAGGTGAGAGACTCGACGCTGGTGCGGCCGTCGGCGGCGACGCCGGCGGTG  60
*****
                HCT-27/1f → / Gh-HCT 27/1 VLf →
Gh-HST-1      AGCCTGTGGAACCTCGAACGTTGACTTGGTGGTCCCAACTTCCACACCCCCAGCGTCTAC  120
GhHST-k      AGCCTGTGGAACCTCGAACGTTGACTTGGTGGTCCCAACTTCCACACCCCCAGCGTCTAC  120
*****

Gh-HST-1      TTCTACCGCCCCGACGGCGGCGCCGCGCGGCCGATTCTTCGACACGGCGGTGATGAAG  180
GhHST-k      TTCTACCGCCCCGACGGCGGCGCCGCGCGGCCGATTCTTCGACACGGCGGTGATGAAG  180
*****

Gh-HST-1      GCGGCGCTCGGCCCTCGCGCTGGTGCCGTTCTACCCCATGGCGGGGAGGCTGAAGAGAGAC  240
GhHST-k      GCGGCGCTCGGCCGCGCGCTGGTGCCGTTCTACCCCATGGCGGGGAGGCTGAAGAGAGAC  240
*****

Gh-HST-1      GAGGACGGTAGGGTTGAGATCGATTGCAACGCCGAGGGAGTGTCTTTGTGGAGGCGGAA  300
GhHST-k      GAGGACGGTAGGGTTGAGATCGATTGCAACGCCGAGGGAGTGTCTTTGTGGAGGCGGAA  300
*****

Gh-HST-1      TCCGACGGATCGGTGGATGATTACGGCGATTTCGCCCAATTGGAGCTGCGCCGCCCTC  360
GhHST-k      TCCGACGGATCGGTGGATGATTACGGCGATTTCGCCCAATTGGAGCTGCGCCGCCCTC  360
*****

Gh-HST-1      ATTCGGCGGTGGATTACTCGCAGGGGATTCGACCTACGCGCTCCTCGTGTGCAGGTC  420
GhHST-k      ATTCGGCGGTGGATTACTCGCAGGGGATTCGACCTACGCGCTCCTCGTGTGCAGGTC  420
*****

Gh-HST-1      ACAAATTCAAATGCGGCGGAGTTTCCTTAGGCGTCGGAAATGCAGCACCACGTTGCCGAC  480
GhHST-k      ACAAATTCAAATGCGGCGGAGTTTCCTTAGGCGTCGGAAATGCAGCACCACGTTGCCGAC  480
*****
                ← HCT-Cb3'n
Gh-HST-1      CGATTTTCCGGGCTTCACTTCATCAATACATGGTCGGATATGGCTCGGGGGCTCGACATC  540
GhHST-k      GGATTTTCCGGGCTTCACTTCATCAATACATGGTCGGATATGGCTCGGGGGCTCGACATC  540
*****

Gh-HST-1      ACCCTCCCACCATTCATCGACCGGACCCTTCTCCGAGCACGCGATCCCCCTCAGCCACAA  600
GhHST-k      ACCCTCCCACCATTCATCGACCGGACCCTTCTCCGAGCACGCGATCCCCCTCAGCCACAA  600

```

## Ergebnisse und Diskussion

```

***** **
Gh-HST-1      TTC AAGCACATCGAGTACCAGCCCGCGCCAGCCATGAAAACCTATGGCGCCGGCCACTAT 660
GhHST-k      TTC AAGCACATCGAGTACCAGCCCGCGCCAGCCATGAAAACCTACG-----AT 648
***** **
                ← HCT-Cb3'
Gh-HST-1      GCAACCGAGACTGTAGTCTCTATATTTCAAGCTAACTCGCGAGCAACTCACTACTCTTAAA 720
GhHST-k      GCAACCGAGACTGTAGTCTCTATATTTCAAGCTAACTCGCGAGCAACTCACTACTCTTAAA 708
***** **

Gh-HST-1      GCCAAGTCGAAAGAGGATGGCAATACGGTCACCTACAGCTCGTACGAGATGCTAGCAGGG 780
GhHST-k      GCCAAGTCGAAAGAGGATGGCAATACGGTCACCTACAGCTCGTACGAGATGCTAGCAGGG 768
***** **

Gh-HST-1      CACGTATGGCGCTGCGCCTGCTTGGCCCGTAGCCTACCTGAAGATCAAGATACGAAGCTA 840
GhHST-k      CATGTATGGCGCTGCGCCTGCTTGGCCCGTAGCCTACCTGAAGATCAAGATACGAAGCTA 828
***** **

Gh-HST-1      TACATTGCAACAGACGGGCGAGCCAGGCTCCAGCCCCGCTCCCACAGGGCTATTTTGGC 900
GhHST-k      TACATTGCAACAGACGGGCGAGCTAGGCTCCAGCCCCGCTCCCACAGGGCTACTTTGGC 888
***** **

Gh-HST-1      AACGTGATCTTACAGCCACGCCCTGGCTGTGGCAGGGACCTGGAGTCCAAGCCCGTC 960
GhHST-k      AACGTGATCTTACAACCACGCCCGAGGCTGTGGCAGGGACCTGGATTCCAAGCCCGTC 948
***** **

Gh-HST-1      TGGTATGCTGCTAGTAAGATCCACGATGCATTAGCCCGGATGGACAACGAGTACTTGAGA 1020
GhHST-k      TGGTATGCTGCTAGTAAGATCCACGATGCATTAGCCCAAATGGACAACGAGTACTTGAGA 1008
***** **

Gh-HST-1      TCCGCTCTCGACTACTTGGAGTGCAGCCTGATCTCAAGGCGCTCGTTTCGCGGCGCCAC 1080
GhHST-k      TCCGCTCTCGACTACTTGGAGTGCAGCCTGATCTCAAGGCGCTCGTTTCGCGGCGCCAC 1068
***** **

Gh-HST-1      ACGTTTAGGTGCCCTAATCTCGGGATAACGAGTTGGGTGAGGCTTCCAATCCATGATGCT 1140
GhHST-k      ACGTTTAGGTGCCCTAATCTCGGGATAACGAGTTGGGTGAGGCTTCCAATCCATGATGCT 1128
***** **

Gh-HST-1      GATTTTGGGTGGGGAGGCCGATCTTTATGGGCGGGGTGGCATAGCGTACGAGGGCCTC 1200
GhHST-k      GATTTTGGGTGGGGAGGCCGATCTTTATGGGACGGGTGGCATAGCGTACGAGGGCCTC 1188
***** **

Gh-HST-1      AGCTTTGTGCTGCCCTAGCCAGCCAACGACGGGAGCCTATCGGTTGCGATTTCCCTGCAG 1260
GhHST-k      AGCTTTGTGCTGCCCTAGCCAGCCAACGACGGGAGCCTATCGGTTGCGATTTCCCTGCAG 1248
***** **

Gh-HST-1      GCAGAGCATATGAAGCTTTTGTGAGAAGCTGCTCTATGATATTTGA 1305
GhHST-k      GCAGAGCATATGAAGCTTTTGTGAGAAGCTGCTCTATGATATTTGA 1293
***** **
                ← Gh-HCT 27/1 Vlr

```

**Abbildung 116:** Alignment der Nukleotidsequenzen von GhHST-l und GhHST-k. Die Lage der verwendeten Primer ist eingezeichnet.

Die längere HST-Sequenz (GhHST-l) ist 1305 Basenpaare lang und kodiert für ein Protein mit 434 Aminosäuren, das bei einem Molekulargewicht von 47,8 kDa und einem errechneten isoelektrischen Punkt von pH 5,6 eine große Übereinstimmung zu anderen HCSQTs aufweist. Die höchsten Sequenzübereinstimmungen auf Aminosäureebene sind:

82% Identität zur HCSQT aus *Coffea canephora* (AB047805.1)

82% Identität zur HCSQT aus *Coffea arabica* (CAJ40778.1)

79% Identität zur HQT aus *Cynara cardunculus* (AAZ80046.1)

79% Identität zur HCT aus *Nicotiana tabacum* (CAD47830.1)

## Ergebnisse und Diskussion

77% Identität zur HCSQT aus *Populus trichocarpa* (ACC63882.1)

76% Identität zur HST auf *Trifolium pratense* (ACI28534.1).

Die translatierbare Sequenz der kurzen GhHST (GhHST-k) ist 1293 Basenpaare lang, das daraus resultierende Protein besteht aus 430 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 47,4 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 5,3. Es wurden hohe Sequenzidentitäten zu anderen BAHD-Acyltransferasen gefunden. GhHST-k hat 81% Identität zur HCSQT aus *Coffea canephora* und *Coffea arabica*, sowie 79% Identität zur HQT aus *Cynara cardunculus* und der HST aus *Nicotiana tabacum* (AB047805.1, CAJ40778.1, AAZ80046.1, CAD47830.1.).

Im Vergleich von GhHST-l und GhHST-k auf Aminosäureebene (Abbildung 117) ist nach Position 217 genau in der Mitte der Sequenz eine Deletion von 4 Aminosäuren zu finden. Desweiteren finden sich an 3 Stellen unterschiedliche und an 4 Positionen ähnliche Aminosäuren. Im unten abgebildeten Alignment beider GhHST-Aminosäuresequenzen sind die Unterschiede grau markiert. Das HxxxD- und das DFGWG-Motiv sind fett hervorgehoben.

```

Gh-HST-l      MKIEVRDSTLVRPSAATPAVSLWNSNVDLVVNFHTPSVYFYRDPGGAAAADFFDTAVMK 60
GhHST-k      MKIEVRDSTLVRPSAATPAVSLWNSNVDLVVNFHTPSVYFYRDPGGAAAADFFDTAVMK 60
*****

Gh-HST-l      AALGLALVPFYPMAGRLKRDEIDGRVEIDCNAEGVLFVEAESDGSVDDYGDFAPNLELRL 120
GhHST-k      AALGRALVPFYPMAGRLKRDEIDGRVEIDCNAEGVLFVEAESDGSVDDYGDFAPNLELRL 120
****

Gh-HST-l      IPAVDYSQGISTYALLVLQVTKFKCGVSLGVGMQHVVADGFSGLHFINTWSDMARGLDI 180
GhHST-k      IPAVDYSQGISTYALLVLQVTKFKCGVSLGVGMQHVVADGFSGLHFINTWSDMARGLDI 180
*****

Gh-HST-l      TLPPFIDRTLLRARDPPQPQFKHIEYQPAPAMKTYGAGHYATETVVSIFKLTREQLTTLK 240
GhHST-k      TLPPFIDRTLLRARDPPQPQFKHIEYQPAPAMKTYDA---TETVVSIFKLTREQLTTLK 236
*****

Gh-HST-l      AKSKEDGNTVTYSSYEMLAGHVWRCACLARSLPEDQDTKLYIATDGRARLQPPLPQGYFG 300
GhHST-k      AKSKEDGNTVTYSSYEMLAGHVWRCACLARSLPEDQDTKLYIATDGRARLQPPLPQGYFG 296
*****

Gh-HST-l      NVIFTATPLAVAGDLESKPVVYAASKIHDAALAMDNEYLRSAIDYLELQPDALKALVRGAH 360
GhHST-k      NVIFTTTPQAVAGDLESKPVVYAASKIHDAALAMDNEYLRSAIDYLELQPDALKALVRGAH 356
*****

Gh-HST-l      TFRCPNLGITSWVRLPIHDADFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFVLPSPANDGSLVSAISLQ 420
GhHST-k      TFRCPNLGITSWVRLPIHDADFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFVLPSPANDGSLVSAISLQ 416
*****

Gh-HST-l      AEHMKLFEKLLYDI- 434
GhHST-k      AEHMKLFEKLLYDI- 430
*****

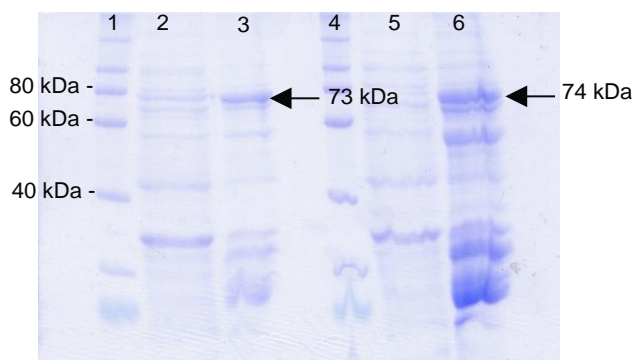
```

**Abbildung 117:** Alignment der Aminosäuresequenzen von GhHST-l und GhHST-k. Die konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind fett markiert. Sequenzunterschiede werden durch graue Unterlegung der Aminosäuren gekennzeichnet.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.9.3.4. Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der GhHST

Beide GhHSTs wurden nach Ligation in pET-41a und Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS wie in Kapitel 2.7 beschrieben exprimiert. Nach Aufreinigung über His-Tag-Affinitätschromatographie konnte für jedes der beiden Proteine eine Bande auf dem SDS-Gel zugeordnet werden (Abbildung 118). Die Fusionsproteine werden nicht stark überexprimiert.



**Abbildung 118:** SDS-Gel zur Aufreinigung der GhHSTs. 1 und 4: Roti Mark<sup>®</sup> PLUS; 2: Rohextrakt GhHST-k, 3: über His-Tag aufgereinigte GhHST-k, 5: Rohextrakt GhHST-l, 6: über His-Tag aufgereinigte GhHST-l.

In Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität konnte HST-Aktivität bei beiden GhHSTs nachgewiesen werden. Die typischen Substrate von RAS oder HQT wurden nicht umgesetzt (Tabelle 14).

GhHST-I / -k	pHPL	DHPL	Shikimat	Chinasäure
pC-CoA	n.d.	n.d.	pC-Shik	n.d.
Caf-CoA	n.d.	n.d.	Caf-Shik	n.d.

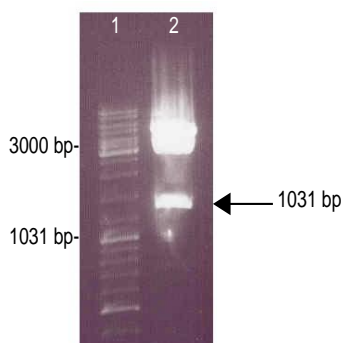
**Tabelle 14:** Tabelle zur Substratspezifität der GhHST-l und GhHST-k. pC-CoA und Caf-CoA werden in Standardenzymtests auf Shikimisäure übertragen. pHPL und DHPL sowie Chinasäure sind keine Akzeptoren für die GhRAS-l. GhHST-katalysiert im Standardenzymtest HST-Reaktionen, nicht aber RAS- oder HQT-Reaktionen.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.9.4. Versuche zur cDNA-Klonierung einer putativen GhHQT

#### 3.9.4.1. Amplifikation des 5'-cDNA-Endes mit einem RAS-spezifischen Primer

Das 5'-cDNA-Ende der GhHQT wurde unter denselben Bedingungen in demselben PCR-Ansatz wie das 5'-cDNA-Ende der GhRAS vervielfältigt (Kapitel 2.6.4.1). Die Lage des dazu verwendeten Primers RAS-Rn6 ist im Alignment in Abbildung 120 grau hervorgehoben. Auf dem Agarosegel (Abbildung 106) ist zu erkennen, dass verschiedene PCR-Produkte gleicher Größe entstanden sind und in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert werden konnten. Bei Verdau der Plasmidpräparation von Bahn 6 mit *Sac*II und *Spe*I resultiert ein 650 Basenpaare großes Fragment (Abbildung 119). Es ist eine interne Schnittstelle vorhanden. Wird dieses PCR-Produkt mit *Nco*I und *Nde*I aus dem pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor geschnitten, so erhält man das Gesamtfragment mit ca. 1300 Basenpaaren.



**Abbildung 119:** Agarosegel zur Amplifikation des 5'-cDNA-Endes der GhHQT. Das PCR-Produkt wurde mit *Nco*I und *Nde*I aus pGEM<sup>®</sup>-T herausgeschnitten.

Nach Sequenzierung wurde für die ersten 450 Nukleotide die höchste Übereinstimmung zur CbRAS gefunden. Auf Aminosäureebene hat die Teilsequenz eine Identität zur CbRAS von 65%. Die Übereinstimmung zur HCSQT aus *Coffea canephora* (AB047805.1) ist mit einer Identität von 62% vergleichbar hoch. Zur HQT aus *Cynara cardunculus* (AAZ80046.1) wurde eine Identität von 58% gefunden.

#### 3.9.4.2. Amplifikation des 3'-cDNA-Endes der putativen GhHQT

Zur Isolierung des GhHQT-3'-Endes mittels 3'-RACE-PCR wurde der genspezifische Primer HCT-23/2f entworfen. Wie in Abbildung 114 zu erkennen ist, konnte ein 1400 Basenpaare



## Ergebnisse und Diskussion

großes Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt und konnte erfolgreich in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und in DH5 $\alpha$  vermehrt werden.

### 3.9.4.3. Amplifikation der Vollängensequenz der putativen GhHQT

Mit der Amplifikation des 3'-cDNA-Endes lag die gesamte Sequenz der GhHQT vor, so dass mit Gh-HCT23/2VLf und Gh-HCT-VLr Vollängenprimer entwickelt werden konnten, über die die Schnittstellen *EcoRI* vorne und *SacI* hinten an die Sequenz angehängt werden konnten. Somit wurde die Ligation in pET-41a ermöglicht. Mit diesen Vollängenprimern wurden ebenfalls zwei Gesamtsequenzen erhalten (Kapitel 2.6.4.3), die zum direkten Vergleich übereinandergelegt wurden (Abbildung 120).

```
GhHQT-1      ATGAAGATGAGTGTGAAGGAGTCAACAATGGTGAAGCCAATGGAAGAAACGGCGGGTGGA 60
GhHQT-k      ATGAAGATGAGTGTGAAGGAGTCAACAATGGTGAAGCCAATGGAAGAAACGCCGGTGGA 60
*****
HCT23/2f → / Gh-HCT23/2-VLf →
GhHQT-1      AGTCTGTGGTTGTCGAACGTGGACTTACTAATGCCAGACAGTACCATAACCCAGCGTC 120
GhHQT-k      AGTCTGTGGCTGTCGAACGTGGACTTTTCTAATGCCAGACAGTTACCATAACCCAGCGTC 120
*****

GhHQT-1      TACTTCTTCGCCACGACGGCTCCGCCAACTTCTTCGACGGCGGGAGCTCAAGGCGGCG 180
GhHQT-k      TACTTCTTCGCCACGACGGCTCCGCCAACTTCTTCGACGGCGGGAGCTCAAGGCGGCG 180
*****

GhHQT-1      CTCAGCGTGCACCTGGTTCACCTTCTACCCCTTTGCGGGGAGGCTGAACAAGGACGATAGC 240
GhHQT-k      CTCAGCGTGCACCTGGTTCACCTTCTACCCCTTTGCGGGGAGGCTGAACAAGGACGATAGC 240
*****

GhHQT-1      GGCCGCCTCGAGATCAACTGCAGCGGCGAAGGGGTGTTGTTGTCGTCGAGCGGAGTGCAC 300
GhHQT-k      GGCCGCCTCAAGATCAACTGCAGCGGCGAAGGGGTGTTGTTGTCGTCGAGCGGAGTGCAC 300
*****

GhHQT-1      GGCGCGTTGGCCGACTTAGCTGATTTACGCCCTACCCCTCATATCAGCCTCGCCGACAAA 360
GhHQT-k      GGCGCGTTGGCCGACTTAGCTGATTTACGCCCTAGCCCTCATATCAGCCTCGCCGACAAA 360
*****

GhHQT-1      GTCGATTATTCTCAAGGAATTCGACCTACCCCTCTTTGTTGATGGAGTTAACTCGCTTC 420
GhHQT-k      GTCGATTATTCTCAAGGAATTCGACCTACCCCTCTTTGTTGATGGAGTTAACTCGCTTC 420
*****

GhHQT-1      AAGTGTGGCGGAGTAAGCTTAGGTGTTACAAACGAGCATCACGTGCGCGACGGCACC GCC 480
GhHQT-k      AAGTGTGGCGGAGTAAGCTTAGGTGTTACAAACGAGCATCACGTGCGCGACGGCACC GCC 480
*****

GhHQT-1      CCGCGCTCCACTACATAAACACGTGGTCCGACATCGCCCGCGGCCTCACCGTCTCCGCC 540
GhHQT-k      CCGCGCTCCACTACATAAACACGTGGTCCGACATCGCCCGCGGCCTCACCGTCTCCGCC 539
*****

GhHQT-1      TCCACTCCTCGACCGCCGCTCATCGCCGCGCCGAGCCACCGCAATTTCTCCCA 600
GhHQT-k      TCCATTCTCGACCGCCGCTCATCGCCGCGCCGAGCCACCGCAATTTCTCCCA 599
****

GhHQT-1      CGTCGAGTACCAACCCTATCCATCGCTCAAAAACCCCTCTAAACATCACAATGAGGCAGC 660
GhHQT-k      CGTCGAGTACCAACCCTATCCATCGCTCAAAAACCCCTCTAAACATCACAATGAGGCAGC 659
*****

GhHQT-1      ATTCAAAACATTACAAATGAGCGCTCGATCACCTCAACGCCATCAAGGAAAAATGCAACAG 720
GhHQT-k      ATTCAAAACATTACAAATGAGCGCGATCACCTCAACGCCATCAAGGAAAAATGCAACAG 719
*****

GhHQT-1      CGGCGGCGGCGACGACGTGAAAAAGACGAGTTTACAACTACGAGGCGGTTGCCGGCCA 780
GhHQT-k      CGGCGA-----GAAAAAGACGAGTTTACAACTACGAGGCGGTTGCCGGCCA 767
*****
```

## Ergebnisse und Diskussion

GhHQT-1	CGTGTGGCGCTGCATCTGCATGGCCCGCCGGCTGCCCCCGATCAGGAGAGCAAGTTGCA	840
GhHQT-k	CGTGTGGCGCTGCATCTGCATGGCCCGCCGGCTGCCCCCGATCAGGAGAGCAAGTTGCA	827
	*****	
GhHQT-1	AATTATGGTGGACTCGCGGCAACGGCTGCGGGCCCGCTGCGGGAGCGTTACTTCGGCAA	900
GhHQT-k	AATTTCCGGTGGACTCGCGGCAACGGCTGCGGGCCCGCTGCGGGAGCGTTACTTCGGCAA	887
	**** *	
GhHQT-1	CGCGATCTTCTACGCCACGCCGGTGGCGCTGTGCGGCAGCTGGAGTCGAATCCGTTGGG	960
GhHQT-k	CGCGATCTTCTTCGCCACGCCGGTGGCGCTGTGCGGCAGCTGGAGTCGAAGCCGTTGAG	947
	***** *	
GhHQT-1	GTTCGCCGTGGTAAAAATCCACGACGCGTTGGCCGAATGGACGACGAGTACATGAAGTC	1020
GhHQT-k	GTTCGCCGTGGCGAAAAATCCACGACGCGTTGGCCGAATGGACGACGAGTACATGAAGTC	1007
	*****	
GhHQT-1	GGCGCTCGATTATTTGGAGGTTGAACAGCAGAATATCGCTGCCATCATGCGCAACGAGGA	1080
GhHQT-k	GGCGCTCGATTATTTGGAGGTTGAACAGCAGAATATCGCTGCCATCATGCGCAACGAGGA	1067
	*****	
GhHQT-1	GGAGACGGTGGGATGCCCTAATGCGAAGATAACGAGCTGGGTTTCGGCTGCCGTTTACGA	1140
GhHQT-k	GGAGACGGTGGGATGCCCTAATGCGAAGATAACGAGCTGGGTTTCGGCTGCCGTTTACGA	1127
	*****	
GhHQT-1	<u>GGCGGATTTCCGGTGGGGGAAGCCGGTT</u> TTTTCGGGGGCTGGCGCGCGCTCAATAGAAGG	1200
GhHQT-k	GGCGGATTTCCGGTGGGGGAAGCCGGTTTTCGGGGGCTGGCGCGCGCTCGTTAGAAGG	1187
	*****	
	← <b>RAS-Rn6</b>	
GhHQT-1	AAAATGCCATTTGCAGGTTGATCCGGAAAATGAAGCCAAACATAAAGCTTTCAATCGCGCT	1260
GhHQT-k	AAAATGCCATTTGCAGGTTGATCCGGAAAATGAAGCCAAACATAAAGCTTTCAATCTCGCT	1247
	*****	
GhHQT-1	GCTTAAACCACATTTGGAGCTATTTGAGAAGCTGCTTTATGATATTTGA	1309
GhHQT-k	GCTTAAACCACATTTGGACCTATTTGAGAAGCTGCTTTATGATATTTGA	1296
	*****	
	← <b>Gh-HCT23/2-VLr</b>	

**Abbildung 120:** Alignment der Nukleotidsequenzen von GhHQT-I und GhHQT-k. Die Lage der verwendeten Primer ist eingezeichnet. Ebenso die Restriktionsschnittstellen von *KspAI* und *SacII*.

Die Nukleotidsequenzen der 1309 Basenpaare langen GhHQT-I und der 1296 Basenpaare langen GhHQT-k haben eine Übereinstimmung von 97%. Während Unterschiede in einzelnen Nukleotiden über die gesamte Sequenzlänge zu finden sind, fällt besonders die Deletion von 12 Nucleotiden nach Position 725 auf. Es ist zu beachten, dass in der Sequenz der GhHQT-I in Position 481, die im Alignment grau unterlegt wurde, eine Base mehr vorhanden ist. Dies wird als Fehler der Reversen Transkriptase bei der cDNA-Synthese angesehen. Wird die GhHQT-I-Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt, so entsteht kein durchgehendes Leseraster. Durch Herausschneiden dieses Bereichs aus GhHQT-I mit den Restriktionseendonukleasen *SacII* und *KspAI* und Ligation des entsprechenden Fragments aus GhHQT-k wurde diese Mutation beseitigt.

Nach der Entfernung der Mutation in Position 481 aus der längeren GhHQT-Nukleotidsequenz Gh-HQT-I kodiert eine 1308 Basenpaare lange cDNA für ein Protein mit 435 Aminosäuren. Beide konservierte Motive HxxxD und DFGWG sind vorhanden. Das Molekulargewicht liegt bei 48,2 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt bei pH 5,5. Im Gegensatz dazu umfasst die cDNA der GhHQT-k 1296 Basenpaare, die für 431 Aminosäuren kodieren. Das GhHQT-k-Protein besitzt eine Masse von 48,0 kDa einen errechneten isoelektrischen Punkt von pH 6,0.

## Ergebnisse und Diskussion

Bei der Datenbankrecherche nach ähnlichen Aminosäuresequenzen auf Basis der Nukleotidsequenzen wurden folgende Proteine gefunden:

52% (GhHQT-l) bzw. 55% (GhHQT-k) Identität zu einem hypothetischen Protein aus *Vitis vinifera* (CAN82918.1),

52% (GhHQT-l) bzw. 53% (GhHQT-k) Identität zur HCSQT aus *Populus trichocarpa* (ACC63883.1),

50% (GhHQT-l) bzw. 52% (GhHQT-k) Identität zu einer putativen Acyltransferase aus *Clitoria ternatea* (BAF49305.1),

48% (GhHQT-l) Identität zur HST aus *Trifolium pratense* (AC116630.1) und

45% (GhHQT-l) bzw. 50% (Gh-HQT-k) Identität zur HQT aus *Cynara cardunculus* (AAZ80046.1).

Im direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen ist zu erkennen, dass nach 242 Aminosäuren in der GhHQT-k-Abfolge eine Deletion auftritt (Abbildung 121). Ansonsten unterscheiden sich beide GhHQTs in 24 Aminosäuren, von denen 18 ähnlich sind. Unterschiede sind grau unterlegt.

```
GhHQT-l      MKMSVKESTMVKPMEETAGGSLWLSNVDLMLPDSHHTPSVYFFRHDGSANFFDAAELKAA 60
GhHQT-k      MKMSVKESTMVKPMEETAGGSLWLSNVDLMLPDSYHTPSVYFFRHDGSANFFDAAELKAA 60
*****.*****:*****:*****

GhHQT-l      LSRALVHFYPPFAGRLNKDDSGRLKINCSEGVLFVEAECGDALADLADFSPSPHISLADK 120
GhHQT-k      LSRALVHFYPPFAGRLNKDDSGRLKINCSEGVLFVEAECGDALADLADFSPSPHISLAAK 120
*****.*****:*****:*****

GhHQT-l      VDYSQGIISTYPLSLMELTRFKCGGVSLGVTNEHHVADGTAALHYINTWSDIARGLTVSAP 180
GhHQT-k      VDYSQGIISTYPLSLMQLTRFKCGGVSLGVTNEHHVADGTAALHYINTWSDIARGLTVSAP 180
*****.*****:*****:*****

GhHQT-l      PFLDRRLAARSPPQPNFHVYQYPYPSLKTPLNITNEAAFKTFTMSLDHLNAIKEKCNS 240
GhHQT-k      PFLDRRLAARSPPQPNFHVYQYPYPSLKTPLNITNEAAFKTFTMSLDHLNAIKEKCNS 240
*.*.*.*.*.*****:*****:*****

GhHQT-l      GGGDDVHKTSFTTYEAVAGHVWRCICMARRLPPDQESKIQIMVDSRQRLRPPLRERYFGN 300
GhHQT-k      GE----KKTSTYTYEAVAGHVWRCICMARRLPPDQESKQISVDSRQRLRPPLRERYFGN 296
*      *.*.*.*.*.*****:*****:*****

GhHQT-l      AIFYATPVALCGELESNPLGFVAVVKIHDALARMDEYMKALSALDYLEVEQQNIAAIMRNEE 360
GhHQT-k      AIFATPVALCGELESKPLRFVAVAKIHDALARMDEYMKALSALDYLEVEQQNIAAIVRNEE 356
**.*.*.*.*.*****:*****:*****

GhHQT-l      ETVGCNPAKITSWRLPFYEADDFGWGKPVFAGLAAASLEGKCHLQVDPENEANMKSLSIAL 420
GhHQT-k      ETVGCNPAKITSWRLPFYEADDFGWGKPVFAGLAAASLEGKCHLQVDPENEANMKSLSISL 416
*****.*****:*****:*****

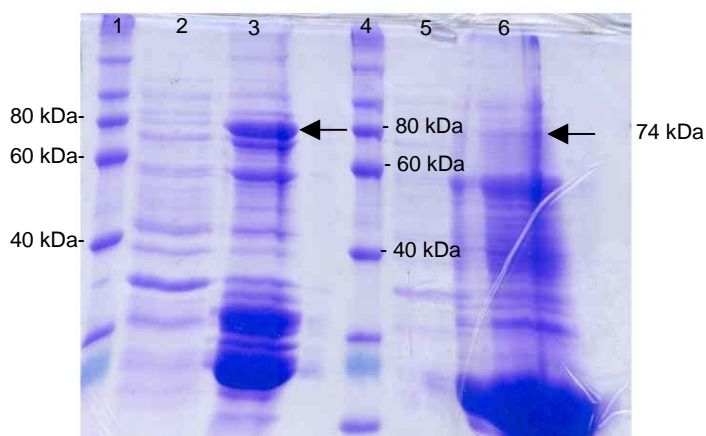
GhHQT-l      LKPHLELFEKLLYDI 435
GhHQT-k      LKPHLDLFEKLLYDI 431
*****.*****
```

**Abbildung 121:** Alignment der Aminosäuresequenzen von GhHQT-l und GhHQT-k. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt und die konservierten Motive HxxxD und DFGWG fett hervorgehoben.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.9.4.4. Heterologe Expression und Untersuchung der Substratspezifität der putativen GhHQT

Die putative GhHQTs wurde als Fusionsproteine mit N-terminalem GST- und His-Tag exprimiert. Aus den Rohextrakten wurden sie über eine Nickelmatrix aufgereinigt (Kapitel 2.7).



**Abbildung 122:** SDS-Gel zur Aufreinigung der heterolog exprimierten GhHQT-I (links) und Gh-HQT-k (rechts). 1 und 4: RotiMark® PLUS, 2:GhHQT-I im Proteinrohextrakt, 3: GhHQT-I nach der His-Tag-Aufreinigung, 5: GhHQT-k im Proteinrohextrakt,6. GhHQT-k nach der His-Tag-Aufreinigung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde untersucht, ob pC-CoA oder Caf-CoA auf folgende Akzeptoren übertragen wird: pHPL, DHPL, Shikimisäure, Chinasäure, Chlorogensäure. Weder RAS-, HST- und HQT-Aktivität noch Bildung von DicaFFEoylchinasäure wurde unter den gegebenen Bedingungen beobachtet (Tabelle 15).

GhHQT-I/-k	pHPL	DHPL	Shikimat	Chinasäure	Chlorogensäure
pC-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caf-CoA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 15:** Tabelle zur Substratspezifität der GhHQT-I und GhHQT-k; mit keiner der Substratkombinationen kann unter Standardbedingungen Produktbildung beobachtet werden (n.d. = Produkt nicht detektierbar)

### **3.10. Diskussion zur Klonierung und biochemische Charakterisierung einer RAS, einer HST und einer putativen HQT aus *Glechoma hederacea***

#### 3.10.1. Klonierung einer GhRAS, GhHST und putativen GhHQT

Die an der Biosynthese von RA, CA und Monolignanen beteiligten Hydroxymethylsäuretransferasen katalysieren sehr ähnliche Reaktionen und scheinen in enger evolutionärer Beziehung zu stehen (Petersen et al. 2009). *Glechoma hederacea* ist eine Pflanzenart, in der neben Lignin RA und CA gleichzeitig zu finden sind; sie eignet sich daher zur Untersuchung aller drei Biosynthesewege. Durch Nukleotidsequenzvergleich von bekannten RAS, HSTs und HQTs wurden degenerierte Primer abgeleitet, die unter Verwendung der RACE-PCR-Technik zur selektiven Amplifikation von 6 cDNA-Klonen führten, deren translatierte Proteinsequenzen das HxxxD- und das DFGWG-Motiv aufweisen und nach phylogenetischer Analyse in Klasse 5a der BAHD-Acyltransferasen einzuordnen sind.

Interessanterweise wurden mit einer Primerkombination jeweils zwei sehr ähnliche Vollängensequenzen amplifiziert.

Unter Verwendung von RAS-spezifischen Primern gelang die Isolierung der GhRAS-I und der GhRAS-k, die mit 90% (GhRAS-I) bzw. 84% (GhRAS-k) auf Basis der Aminosäuresequenz die höchste Sequenzähnlichkeit zur CbRAS aufweisen (Berger 2006). Beide GhRAS-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich durch eine Deletion von 36 Aminosäuren im letzten Drittel der Primärsequenzen voneinander. In den HST-spezifischen PCR-Reaktionen konnten ebenfalls zwei cDNA-Klone, GhHST-I und GhHST-k, vervielfältigt werden, die untereinander auf Nukleotidebene eine Sequenzidentität von 98% besitzen. Neben einer Deletion von 4 Aminosäuren unterscheiden sich die beiden GhHSTs nur in 7 über die gesamte Sequenz verteilten Aminosäuren. GhHST-I und GhHST-k sind am nächsten mit den HCSQTs verwandt und gruppieren im phylogenetischen Stammbaum (siehe Kapitel 3.11.4) mit diesen. Die GhHSTs besitzen mit 89% Aminosäuresequenzähnlichkeit die höchste Übereinstimmung zur HCSQT aus *Coffea canephora* (Lepelley et al. 2007). Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation einer putativen GhHQT resultierten ebenfalls in zwei Vollängensequenzen. Die Unterschiede zwischen GhHQT-k und GhHQT-I sind mit einer Deletion von 4 Aminosäuren und 24 Einzelmutationen im Vergleich zu den GhRAS und den GhHSTs am stärksten ausgeprägt. Zwar weisen die GhHQTs die höchsten Sequenzähnlichkeiten zur CcHQT aus *Cynara cardunculus* auf (Comino et al. 2007), dennoch sind 45% (GhHQT-I) und 50% (GhHQT-k) Sequenzähnlichkeit

## *Ergebnisse und Diskussion*

auf Aminosäurebasis vergleichsweise wenig. Es bleibt fraglich, ob es sich um cDNA-Klone handelt, die für Enzyme mit HQT-Aktivität oder bislang unbekannter Aktivität kodieren. Eine Punktmutation in der GhHQT-I-Vollängensequenz, die eine Leserasterverschiebung zur Folge hatte, wurde beseitigt. Vermutlich handelte es sich dabei nicht um eine natürliche Mutation, sondern um einen Fehler der Reversen Transkriptase. Diese Mutation war nicht im 5'-cDNA-Ende vorhanden, sondern trat erst nach der Synthese von neuer cDNA auf. Zu beweisen wäre diese Vermutung durch Klonierung der entsprechenden gDNA-Sequenz.

Ob es sich bei diesen Genen um Allele oder Genduplikationen handelt, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Nach neueren Untersuchungen (Widén und Widén 2000) ist *Glechoma hederacea* eine diploidisierte Autotetraploide, so dass mit 4 möglicherweise verschiedenen Genkopien zu rechnen ist. Auf der anderen Seite wird innerhalb der BAHD-Acyltransferasefamilie von reger Genduplikation mit nachfolgender Diversifikation berichtet (St.Pierre und De Luca 2000, Yu et al. 2009).

### 3.10.2. Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung von RAS, HST und putativer HQT

Alle cDNA-Sequenzen der verschiedenen GhHCTs wurden in den pET-41a-Vektor ligiert und nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS als Fusionsproteine mit löslichkeitsverbesserndem GST-Tag und 6xHis-Tag heterolog exprimiert. Die Proteinrohextrakte wurden in Enzymtests zur Untersuchung auf RAS- HST- und HQT-Aktivität eingesetzt.

Die GhRAS-I überträgt die Substrate pC-CoA und Caf-CoA auf pHPL und DHPL, aber nicht auf Shikimat oder Chinat. Daher kann sie als Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat/Dihydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (RAS) bezeichnet werden und ist vermutlich ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese. Ihre biochemischen Eigenschaften sind mit denen der CbRAS (Berger et al. 2006) und der MoRAS (Weitzel 2009) vergleichbar, die auch spezifisch für ihre Substrate sind. Die Existenz einer RAS als das charakteristische Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese deutet darauf hin, dass der Sundärmetabolismus in Bezug auf RA in *Glechoma hederacea* und den anderen Lamiaceen vergleichbar ist. Trotz der hohen Sequenzidentität beider GhRAS untereinander und identischen Expressionsbedingungen konnte für die GhRAS-k keine Enzymaktivität beobachtet werden. Es könnte sich bei der GhRAS-k um ein Pseudogen handeln, das durch Mutationen außer Kraft gesetzt wurde.

## *Ergebnisse und Diskussion*

Alternativ könnte die Funktionslosigkeit ein Indiz für die Diversifikation nach Duplikation sein, wobei nach Ansammlung weiterer Mutationen ein funktionell neues Gen entsteht. Nach Widén (2000) wird der diploide Zustand von einst polyploiden Organismen durch Stilllegen eines Gens oder Veränderung der Genfunktion wiederhergestellt. Im Zuge der Diploidisierung wird sowohl die Vitalität als auch die Fertilität der Pflanze im Vergleich zur polyploiden Form erhöht (Friedt 1978).

Hoffmann et al. (2004) konnten zeigen, dass HSTs eine wichtige Rolle bei der Bildung von Lignin spielen. Wurde die HST in *Nicotiana benthamiana* und *Arabidopsis thaliana* herunterreguliert, konnte eine Beeinflussung des Ligningehalts und der Ligninzusammensetzung beobachtet werden. In den Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität zeigten beide GhHSTs tatsächlich HST-Aktivität und sind somit wahrscheinlich an der Biosynthese von Monolignanen in *Glechoma hederacea* beteiligt. Die typischen Substrate der RAS und der HQT wurden nicht umgesetzt. Da GhHST-k und GhHST-l pC-CoA und Caf-CoA selektiv auf Shikimat übertragen, sind sie als Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferasen zu bezeichnen. Neben der CbHST sind sie die einzigen bislang bekannten HCTs, die nur Shikimisäureester bilden. Die meisten in der Literatur beschriebenen Enzyme übertragen CoA-aktivierte Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase NtHST aus *Nicotiana tabacum* pC-CoA und Caf-CoA effizienter auf Shikimat als auf Chinat (Hoffmann et al. 2003), und die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase NtHQT aus *Nicotiana tabacum* bevorzugt Chinat vor Shikimat (Niggeweg et al. 2004). Bei einer Sequenzidentität von 98% auf Basis der Aminosäuresequenzen sind die GhHSTs als Isoformen zu bezeichnen, die sich möglicherweise in ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden. Variationen in der Enzymkinetik müssen in Zukunft durch detaillierte biochemische Untersuchungen herausgearbeitet werden, könnten aber dann als Hinweis für die Neofunktionalisierung einer der Genkopien gedeutet werden.

Da mit der GhRAS-l und den GhHSTs spezifische Enzyme der RA- und Ligninbiosynthese kloniert werden konnten, ist die Existenz einer spezifischen Transferase für die CA-Biosynthese zu erwarten. Niggeweg et al. (2004) konnten beweisen, dass eine HQT an der CA-Biosynthese in Solanaceen beteiligt ist, während die Ligninbiosynthese von der HQT nicht beeinflusst wird. GhHQT-l und GhHQT-k sind sich in ihren Primärsequenzen ebenfalls sehr ähnlich. In den RAS-, HST- und HQT-Enzymtests konnte für keines der beiden Enzyme Aktivität nachgewiesen werden. Dies ist allerdings kein Beweis für ihre Funktionslosigkeit, da

## *Ergebnisse und Diskussion*

möglicherweise die Enzyme unter den getesteten Pufferbedingungen nicht aktiv sind oder der GST-Tag die Enzymreaktion behindert.

Trotzdem ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die GhHQTs eine bislang unbekannte Reaktion katalysieren. Nach phylogenetischer Untersuchung (siehe Kapitel 3.11.4) bilden sie eine eigene Gruppe neben den HCSQTs und den RAS innerhalb der Klasse 5a der BAHD-Acyltransferasen. Da innerhalb dieser Unterklasse exklusiv Hydroxycinnamoyltransferasen vorzufinden sind, scheinen die GhHQTs ebenfalls HCTs zu sein.

Obwohl ein Beweis noch aussteht, entstehen DicaFFEoylchinasäuren wahrscheinlich durch Übertragung einer Hydroxymimtsäure auf Chlorogensäure (Comino et al. 2008). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die GhHQTs möglicherweise DicaFFEoylchinasäuren durch Übertragung von pC-CoA oder Caf-CoA auf Chlorogensäure bilden, aber auch in diesen Enzymtests konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

Mit der Spermidindisinapoyltransferase AtSDT und der Spermidindicumaroyltransferase AtSCT aus *Arabidopsis thaliana* (Luo et al. 2009) wurden BAHD-Acyltransferasen charakterisiert, die direkt zwei Hydroxycinnamoyl-CoAs auf ihren Akzeptor übertragen. Diese Eigenschaft könnten auch andere BAHD-Acyltransferasen aufweisen. Vor diesem Hintergrund kann zum heutigen Zeitpunkt die Bildung von DicaFFEoylchinasäuren durch Übertragung von zwei Hydroxycinnamoyl-CoAs auf Chinasäure durch ein Enzym nicht ausgeschlossen werden. Allerdings konnte in den HQT-Enzymtests keine fraglichen Produktpeaks beobachtet werden.

Wie im phylogenetischen Stammbaum (vgl. Abbildung 129) zu erkennen ist, sind die GhHQTs näher mit den RAS als mit den HCSQTs verwandt. Daher wäre es denkbar, dass sie eine RAS-ähnliche Reaktion katalysieren. In höheren Pflanzen wurden zahlreiche Rosmarinsäurederivate mit weiteren aromatischen Substitutionen gefunden. Dazu zählen auch die Lithospermsäure, ein Konjugat aus Rosmarinsäure und Kaffesäure, und die Lithospermsäure B, ein Rosmarinsäuredimer (Petersen und Simmonds 2003). Obwohl die Biosynthese dieser Neolignane nicht bekannt ist, kann ausgeschlossen werden, dass sie wie andere Lignane durch eine oxidative Dimerisierung von Phenylpropanoiden gebildet werden (Cotelle und Hervé 2003). Da Lithospermsäure B ein Kaffeesäureester der Lithospermsäure ist, könnte eine BAHD-Acyltransferase für die Veresterung verantwortlich sein.

Zur Beschreibung der Substratspezifität der GhHQTs müssten weitere Substratkombinationen getestet werden. Um die Substratauswahl einzuschränken, müsste *Glechoma hederacea* auf Hydroxymimtsäure- oder Rosmarinsäurederivate hin untersucht werden.



## *Ergebnisse und Diskussion*

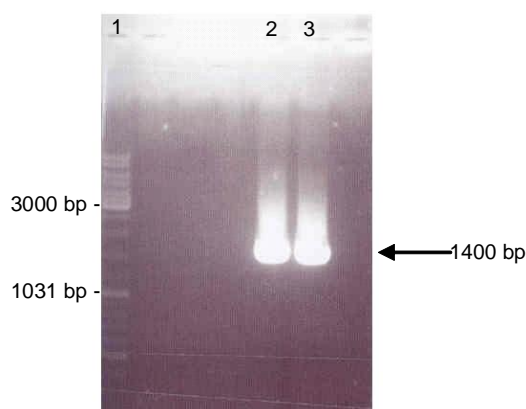
Mit der GhRAS-I und den GhHSTs stehen nun drei weitere HCTs zur Verfügung, die nach Aufreinigung größerer Proteinmengen in Kristallisationsversuchen eingesetzt werden können, um nach Strukturaufklärung und Cokristallisation die Unterschiede in den aktiven Zentren von RAS und HST herausarbeiten zu können. Möglicherweise kristallisiert die RAS aus *Glechoma hederacea* leichter aus als die RAS aus *Coleus blumei*.

### **3.11. Ergebnisse zur genomischen Organisation und der Phylogenie der HCTs aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea***

#### **3.11.1. Isolierung des HST-Gens aus *Coleus blumei***

Für die Amplifikation des genomischen Klon der CbHST (siehe Kapitel 2.8.2) wurden genspezifische Vollängenprimer verwendet.

Dazu wurden 1 µl gDNA aus Blättern in Standard-PCR-Ansätzen bei 55 °C und 60 °C Annealingtemperatur amplifiziert. Die Trennung der PCR-Produkte auf einem 1% igen Agarosegel zeigt für beide Ansätze saubere Einzelbanden (siehe Abbildung 123). Die Größe des PCR-Produkts lässt auf Anwesenheit eines kleinen Introns schließen. Nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T, Vermehren in *E. coli* und anschließender Plasmidpräparation mit Insertkontrolle konnte die gesamte 1439 bp lange Sequenz des CbHST-Gens ermittelt werden.



**Abbildung 123:** Agarosegel zur Amplifikation der genomischen CbHST-Sequenz. 1: DNA-Leiter, 2 und 3: PCR-Ansatz auf zwei Bahnen verteilt.

Das Alignment mit der CbHST-cDNA ergibt ein GT-AG-Intron der Phase 0 nach 408 bp, das aus 155 bp besteht. Die ermittelten Spleißstellen konnten durch den NetPlantGene Server bestätigt werden.

In der CbHST-gDNA-Sequenz mit der dazugehörigen Aminosäuresequenz der translatierten CbHST-cDNA (Abbildung 124) sind die konservierten Motive HxxxD und DFGWG fett hervorheben. Das kursiv gedruckte Intron ist 17 Aminosäuren vor dem konservierten HxxxD-Motiv eingeschoben und beginnt direkt nach dem konservierten Glutamin <sup>136</sup>Q.

## Ergebnisse und Diskussion

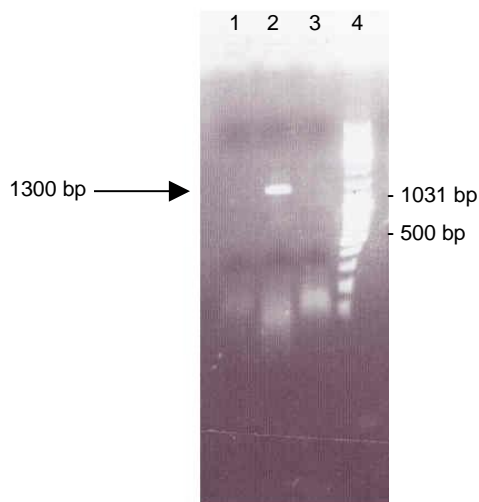
atgaaaatccacgtgagagattcaacgctgggtgcccgtcgggcggcagccggccgctc 60  
 M K I H V R D S T L V R P S A A T P A V  
 agcctttggaattccaatggtgacttggtggtgcccaatccacaccccaagcgtctac 120  
 S L W N S N V D L V V P N F H T P S V Y  
 ttctaccgcccctccggggcgggacaacttcttcgacagggcggtgatgaaggcggcgtc 180  
 F Y R P S G A D N F F D R A V M K A A L  
 ggtcgggctgttggtgtctttctaccccatggcagggaggctgaagagggatgaagatggg 240  
 G R A L V S F Y P M A G R L K R D E D G  
 cgggttgagatcgactgcaacgccgagggagtgctggttggaggcggagtcggacggc 300  
 R V E I D C N A E G V L F V E A E S D G  
 acggttgacgattacggcgatctttgccccctctttggagctccgcccctcattccggct 360  
 T V D D Y G D F A P S L E L R R L I P A  
 gtggattattctcagggaaatcggttaccgctgctcgattgcag**gtgtgttattgg** 420  
 V D Y S Q G I S A Y P L L V L **Q**  
  
 tgatggcatgcccttttattttgacaatatctttttgcatataaaatgaatacactgt 480  
  
 ttcacacaacaatcttttaccagattcaaattcaaattcaaatttctatctgaactaat 540  
  
 ttctgattccgagttattttg**agg**ttacatcttttcaaatgcccggaggtgtttccttaggcgtt 602  
 V T F F K C G G V S L G V  
  
 ggaatgcagcaccacgcagccgacggatctttccggccttcacttcatcaatacatggctc 662  
 G M **Q** **H** H A A **D** **G** F S G L H F I N T W S  
 gatatggctcgtggactggacatcaccctcccgccttcacatagaccggacccttctctc 722  
 D M A R G L D I T L P P F I D R T L L S  
 gcgctgatccccctcagccgcagttcaagcagtgaggtagtaccagccccctccagccatg 782  
 A R D P P **Q** P **Q** F K H V E Y **Q** P P P A M  
 aaaacctacgaaccagctgaaacagttgtctccatattcaagctcaccaaggatcagctc 842  
 K T Y E P A E T V V S I F K L T K D **Q** L  
 acaactcttaaagccaagtccaaggaggatggcaacaccaccacttacagctcctacgag 902  
 T T L K A K S K E D G N T T T Y S S Y E  
 atgctctcaggccacgtatggcgctgcaactgtttggctcgtggtctgcccgaagagcaa 962  
 M L S G H V W R C T C L A R G L P E E **Q**  
 gagactaagctgtacatagctactgacggccgggtccaggctgcagcctcaactcccacca 1022  
 E T K L Y I A T D G R S R L **Q** P **Q** L P P  
 ggctacttcggcaacgtgatcttcacagccacgccacttgccgtggccggggacctagga 1082  
 G Y F G N V I F T A T P L A V A G D L G  
 tcgaagccagtggtatgctgcaagtaaaatccacgacgcattagcccgaatggacaac 1142  
 S K P V W Y A A S K I H D A L A R M D N  
 gactacttgaggtcagctctggatcttctggagctgcagcctgatctcaaggcactcgtc 1202  
 D Y L R S A L D F L E L **Q** P D L K A L V  
 cgaggactcacacttttaggtgccgaatcttgggtataaccagttgggttaggcttctc 1262  
 R G A H T F R C P N L G I T S W V R L P  
 atacatgatgctgactttgggtgggttagggccgatcttcatggggccggggcggcatagcg 1322  
 I H D A **D** **F** **G** **W** **G** R P I F M G P G G I A  
 tacgagggcctgagcttcgtgctgcccagtcocacaaacgacgggagcttatctgtggca 1382  
 Y E G L S F V L P S P T N D G S L S V A  
 atatccctgcaggcagagcatatgaaactctttgagaagctgctctatcagatttga 1439  
 I S L **Q** A E H M K L F E K L L Y **Q** I -

**Abbildung 124:** Genomische Sequenz der CbHST mit eingeschobenem Intron (kursiv) und translaterter Aminosäuresequenz. Das konservierte Q, das HxxxD- und das DFGWG-Motiv sind fett hervorgehoben.

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.11.2. Isolierung der RAS-, HST- und HQT-Gene aus *Glechoma hederacea*

Zur Isolierung der Gene der GhHCTs (siehe Kapitel 2.8.2) aus *Glechoma hederacea* wurden Standard-PCR-Ansätze mit Vollängenprimern und 1 µl genomischer DNA durchgeführt. Bei einer Annealingtemperatur von 56 °C konnte auf dem Agarosegel ein 1300 bp großes PCR-Fragment der genomischen GhHST identifiziert werden (Abbildung 125), das darauf schließen lässt, dass entweder kein oder nur ein sehr kleines Intron vorhanden ist. Die 1293 Basenpaare lange genomische Sequenz der GhHST-k, die kein Intron enthält, konnte sequenziert werden. Der NetPlantGene Server berechnet keine Intronspleißstellen für diese Sequenz.



**Abbildung 125:** Agarosegel zur Amplifikation der genomischen GhHST-Sequenz. 1-3: PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (53 °C/56 °C/60 °C), 4: DNA-Leiter.

In der unten abgebildeten genomischen Sequenz der GhHST-k ist die translatierte cDNA-Sequenz eingefügt (Abbildung 126). Die konservierten Motive HxxxD und DFGWG, sowie das 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv liegende konservierte Glutamin <sup>139</sup>Q sind fett hervorgehoben.

## Ergebnisse und Diskussion

```

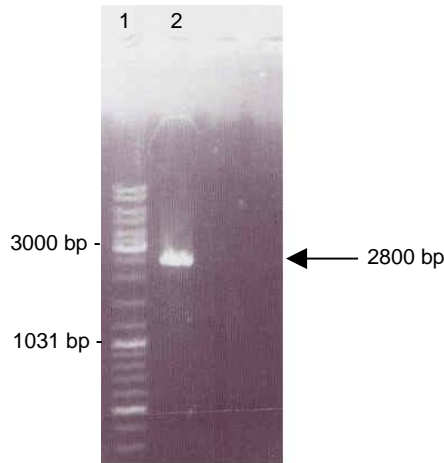
atgaaaatcgaggtgagagactcgacgctggtgcccgcgctcggcggcgacgccggcggtg      60
M K I E V R D S T L V R P S A A T P A V
agcctgtggaactcgaacgcttgacttggtggtccccaacttccacacccccagcgtctac      120
S L W N S N V D L V V P N F H T P S V Y
ttctaccgccccgacggcggcgccgcccggcgccgatttcttcgacacggcgggtgatgaag      180
F Y R P D G G A A A A D F F D T A V M K
gcgccgctcggccgcgcgctggtgcccgttctaccccatggcggggaggctgaagagagac      240
A A L G R A L V P F Y P M A G R L K R D
gaggcggtaggggttgagatcgattgcaacgccgaggagtgctctttgtggaggcggaa      300
E D G R V E I D C N A E G V L F V E A E
tccgacggatcgggtggatgattacggcgatttccgcccccaatttggagctgcccgcctc      360
S D G S V D D Y G D F A P N L E L R R L
attccggcgggtggattactcgcaggggatttccgacctacgcgctcctcgtggttcaggtc      420
I P A V D Y S Q G I S T Y A L L V L Q V
acaaaattcfaatgcccgggagtttcccttaggcgctcgggaatgcagcaccacggttcccgc      480
T K F K C G G V S L G V G M Q H H V A D
ggattttccgggcttcaacttcatcaatacatggctcggatattggctcgggggctcgacatc      540
G F S G L H F I N T W S D M A R G L D I
accctcccaccattcatcgaccggacccttctcctagcgcgcgatccccctcagccacaa      600
T L P P F I D R T L L L A R D P P Q P Q
ttcaagcacatcgagtaccagcccgcgcggccatgaaaacttacgatgcaaccgagact      660
F K H I E Y Q P A P A M K T Y D A T E T
gtagtctctatattcaagctaactcgcgagcaactcactactcttaaagccaagtgcgaaa      720
V V S I F K L T R E Q L T T L K A K S K
gaggatggcaatacggtcacctacagctcgtacgagatgctagcagggcatgtatggcgc      780
E D G N T V T Y S S Y E M L A G H V W R
tgcgcctgcttgcccgcctacctaagatcaagatacgaagctatacattgcaaca      840
C A C L A R S L P E D Q D T K L Y I A T
gacggcgagctaggctccagccccgcctcccacagggctactttggcaacgtgatcttc      900
D G R A R L Q P P L P Q G Y F G N V I F
acaaccacgccccaggtggtggcaggggacctggattccaagcccgtctggtatgctgct      960
T T T P Q A V A G D L D S K P V W Y A A
agtaagatccacgatgcattagcccaaatggacaacgagtacttgagatccgctctcgac      1020
S K I H D A L A Q M D N E Y L R S A L D
tacttggagctgcagcctgatctcaaggcgcctcgttcgcccgcgccacacgtttaggtgc      1080
Y L E L Q P D L K A L V R G A H T F R C
cctaattctcgggataacgagttgggtgaggctccaatccatgatgctgattttgggtgg      1140
P N L G I T S W V R L P I H D A D F G W
gggaggccgatctttatgggaccgggtggcatagcgtacgagggcctcagctttgtgctg      1200
G R P I F M G P G G I A Y E G L S F V L
cctagccccggccaacgacgggagcctatcggttgcgatttccctgcaggcagagcatatg      1260
P S P A N D G S L S V A I S L Q A E H M
Aagctttttgagaagctgctctatgatatttga      1293
K L F E K L L Y D I -

```

**Abbildung 126:** Genomische Nukleotidsequenz der GhHST-k mit translaterter Aminosäuresequenz. Es ist kein Intron vorhanden.

Durch Verlängerung der Elongationszeit auf 2,5 min konnte die genomische Sequenz der putativen GhHQT-k bei einer Annealingtemperatur von 54 °C amplifiziert (Abbildung 127) und schließlich in mehreren Schritten sequenziert werden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 127:** Agarosegel zur Amplifikation einer genomischen putativen GhHQT-Sequenz. 1: DNA-Leiter, 2: PCR-Ansatz.

Die GhHQT-gDNA-Sequenz umfasst 3384 bp, wobei ein 2088 bp großes GT-AG-Intron der Phase 0 nach 408 bp eingeschoben ist. Im Vergleich der genomischen Sequenz der GhHQT mit der translatierten cDNA-Sequenz ist zu erkennen, dass das Intron exakt 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv integriert ist und nach dem konservierten Glutamin <sup>136</sup>Q beginnt (Abbildung 128). Die Intronspleißstellen konnten mit der NetPlantGene Software bestätigt werden.

```

atgaagatgagtgatgaaggagtcaacaatggatgaagccaatggaagaaacgccgggtgga      60
 M K M S V K E S T M V K P M E E T P G G
agtctgtggctgtcgaacgtggacttttctaattgccagacagttaccataccccccagcgtc    120
 S L W L S N V D F L M P D S Y H T P S V
tacttcttccgccacgacggctccgccaaacttcttcgacgcggcgaggctcaaggcggcg    180
 Y F F R H D G S A N F F D A A E L K A A
ctcagccgtgcactggttcacttctacccttttgcggggaggctgaacaaggacgatagc    240
 L S R A L V H F Y P F A G R L N K D D S
ggccgcctcaagatcaactgcagcggcggaaggggtgttgttcgctcgaggcggagtgcgac    300
 G R L K I N C S G E G V L F V E A E C D
ggcgcggtggccgacttagctgatttcagccctagccctcatatcagcctcgccgcaaaa    360
 G A L A D L A D F S P S P H I S L A A K
gtcgattattctcaaggaatttcgacctaccctctttcgttgatgcagggtgcatgtctca    420
 V D Y S Q G I S T Y P L S L M Q
ttattattcaattttatttttattaatcatggatggatgtttggtagatgaatagaat    480
 actgaatgacaattctgtaaaagtggctagttattagtagtatgtttttagagggtgtgacga
gtataattttattttctttgtatataccttgaaagaagtaggatcctcttaaaatagtggt
aggacaaaattgagaatcaaagttagaaaactttgatcaagattagtaacaaaaacatat
agtagtatgggtaagagtcactgctacaaaacgctcatacactacgaattttaccgcta
gtctatgtgaattctgtgagacacgtgtactgtagtctatgctcatcggtatagactacgg
ttttgaaaccgtatttctaaaactgacaaaaggtagttataccaactgcagagaaatgat
agtgaattcctttatagactaggatgaaaataagggttgatcgacaattttttttgtc
cagaatgaaggcttcttttatagtggtatatacattaataaacacaaatacaatattcttt
attagacaaaatgcattttgtgagagtcaagggtgagttagagtcctgcttccagacagtga
caatactttttcaactttattttccaacaaaattattcacaagaactacattttcttgtaa
cccatagtcctatggtagtgagtaaacatatacaatggataagaaattttccaagagattat
aaataaaaaatcattgaatatcccaaggtaaaaatattcactatcagaacgagaattacaaa

```

## Ergebnisse und Diskussion

```

accatatccaatctttcactttataaaaatattactccctccgtttcactcaatctgtctat
attcccttaaatggatgttccattcaatctgtctactttcaaataaggaaagatttaacc
attcaaaccttttaaaagtggtaggacctaccactttctatctttttactcttattct
taatctacgtcccgaacacagtaagtagactaattgagtggaacggatgaaatatctttc
tattgtgtttgtgactctgtgtataatcatggtaggtatgtttgttagatgaatagaat
actgaatgacaattctgtaaaagtggctagttatttagtataatgttttagaggtgtgacga
gtataatctttttctttgtatataccttgaaagaagtaggatcctcttaaaatatgtgt
aggacaaaattgagaatcaaagttagaaaactttgatcaagattagtaacaaaaacatat
agtagtatgggtaagagtcactgctacaaatacgcctcatacactacgaatcttaccgta
gtctatgtgaattctgtagacacgtgtagtctatgctcatcggtatagactacgg
tttgaaaccgtaattctaaactgcaccaaaggttagttataccaactgcagagaaatgtata
gtgaattcctttatagactaggatgaaaaataaggttgtgaatcgacaatctttttgtcc
agaatgaaggcttcttttatagtgggatatcattaataaacacaaaatacaatattcttta
ttagacaaaatgcattttgtgagagtcaaggtgagttagagtcctgcttccagacagtac
aatactttttcaactttatctccaacaaaattattcacaagactacattttctgtaac
ccatagtctatggtagtgagtaaacatacaatggataagaaatcttccaagagattata
aataaaaatcattgaatatcccaaggtaaaatattcactatcagaacgagaattacaaaa
ccatatccaatctttcactttataaaaatattactccctccgtttcactcaatctgtctata
ttcccttaaatggatgttccattcaatctgtctactttcaaataaggaaagatttaacca
ttcaaaccttttaaaagtggtaggacctaccactttctatctttttactcttattctt
aatctacgtcccgaacacagtaagtagactaattgagtggaacggatgaaatatctttct
attgtgtttgtgactctgtgtatgtttgtttttgcagtaactcgcttcaagtggtggcgga
                L T R F K C G G
gtaagcttaggtgttacaaaacgagcatcacgtcgccgacggcaccgcccgcgctccactac
V S L G V T N E H H V A D G T A A L H Y
ataaacacgtggtccgacatcgcccgcggcctcaccgtctccgccccctccattcctcgac
I N T W S D I A R G L T V S A P P F L D
cgccgcctcctcgccgcccgcagcccaccgcagcccatttctcccacgtcgagtaccaa
R R L L A A R S P P Q P N F S H V E Y Q
ccctatccatcgctcaaaacccctctaacaatcacaaatgaggcagcattcaaaacattc
P Y P S L K T P L N I T N E A A F K T F
acaatgagccgcatcacctcaacgccatcaaggaaaaatgcaacagcggcgagaaaaag
T M S R D H L N A I K E K C N S G E K K
acgagttatacaacctacgagggcggttgccggccacgtgtggcgctgcatctgcatggcc
T S Y T T Y E A V A G H V W R C I C M A
cgccggctgcccccgatcaggagagcaaggtgcaaatttcgggtggactcgccggcaacgg
R R L P P D Q E S K V Q I S V D S R Q R
ctgccggccgctgcccggagcgttacttcggcaacgcgatcttcttcgccacgcccgtg
L R P P L P E R Y F G N A I F F A T P V
gcgctgtgcccgcgagctggagtcgaagccggttgaggttcgccgtggcgaaaaatccacgac
A L C G E L E S K P L R F A V A K I H D
gcggttgcccgaatggacgacgagtagatgaagtcggcgctcgattatttgaggttgaa
A L A R M D D E Y M K S A L D Y L E V E
cagcagaatatcgctgccatcgctgcgcaacgaggaggagacgggtgggatgccctaatgcg
Q Q N I A A I V R N E E E T V G C P N A
aagataacgagctgggttcggctgcccgttttacgagggcggatttcgggtgggggaagccg
K I T S W V R L P F Y E A D F G W G K P
gtttttgccccgctggcggcgccgctgctttagaaggaaaaatgccatttgaggttgatccg
V F A G L A A A S L E G K C H L Q V D P
gaaaatgaagccaacatgaagctttcaatctcgctgcttaaacacatttgacctatctt
E N E A N M K L S I S L L K P H L D L F
gagaagctgctttatgatatttga
E K L L Y D I -

```

**Abbildung 128:** Genomische Sequenz der putativen GhHQ-T-k mit Intron (kursiv). Die translatierte Aminosäuresequenz mit den konservierten Aminosäuren Q, HxxxD und DFGWG (fett) ist unter der Nukleotidsequenz angegeben.

## *Ergebnisse und Diskussion*

Die genomische Sequenz der GhRAS konnte auch bei Variation der Annealingtemperatur zwischen 50 °C bis 60 °C unter Variation der gDNA-Menge zwischen 1 µl und 30 µl bei Elongationszeiten von 2 min, 2,5 min und 3 min nicht isoliert werden.

### 3.11.3. Datenbankrecherche nach cDNA- und gDNA-Sequenzen von biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen

Neben den Acyltransferasen mit bekannter Funktion existieren in den Proteindatenbanken zahlreiche Sequenzen von BAHD-Mitgliedern, deren katalytische Aktivität nicht bekannt ist. Zunächst wurden aus der UniProt-Datenbank sämtliche Proteinsequenzen von BAHD-Acyltransferasen herausgesucht und nur die biochemisch und genetisch charakterisierten Transferasen selektiert, um sie phylogenetisch zu untersuchen.

Anschließend wurden die zugehörigen gDNA-Sequenzen der phylogenetisch untersuchten BAHD-Acyltransferasen (siehe Tabelle 17) identifiziert. Von den 71 Vertretern mit *in vitro* nachgewiesener Enzymaktivität sind nur 19 zugehörige gDNA-Sequenzen bekannt. Davon fallen 11 auf *Arabidopsis*-Gene, dessen Genom vollständig sequenziert ist.

In folgender Tabelle 16 sind die BAHD-Acyltransferasen aufgeführt, die in die phylogenetische Analyse einbezogen wurden. Die CoA-aktivierten Donorsubstrate sowie die Produkte, die gebildet werden, sind der Tabelle zu entnehmen.

Name und UniProt-Akzessionsnummer der Acyltransferase	bedeutendstes Acyl-CoA Donorsubstrat	Reaktionsprodukt	Art	Referenz
<b>Klasse I</b>				
<i>At3AT1 (Q9ZWB4)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Anthocyane	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luo et al. (2007)
<i>At3AT2 (Q9LR73)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Anthocyane	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luo et al. (2007)
<i>MtMAT3 (B4Y0U1)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Medicago truncatula</i>	Yu et al. (2008)
<i>MtMAT1 (B4Y0U0)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Medicago truncatula</i>	Yu et al. (2008)
<i>At5MaT (Q9LJB4)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D'Auria et al. (2007)



## Ergebnisse und Diskussion

<i>Dm3MAT2 (Q6WB12)</i>	Malonyl	Anthocyane	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Suzuki et al. (2003)
<i>Dm3MAT1 (Q6WB13)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Suzuki et al. (2003)
<i>Sc3MaT (Q84LA6)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Pericallis cuneata</i>	Suzuki et al. (2003)
<i>Dv3MAT (Q8GSN8)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Dahlia variabilis</i>	Suzuki et al. (2002)
<i>Dv3MAT2 (Q8GZM6)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Dahlia variabilis</i>	Suzuki et al. (2002)
<i>Dm3MAT3 (A4PHY4)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Unno et al. (2007)
<i>Pf3AT (Q9MBC1)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Anthocyane	<i>Perilla frutescens</i>	Fujiwara et al. (1998), Yonekura-Sakakibara et al. (2000)
<i>Ss3MAT(Q6TKR5)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Anthocyane	<i>Salvia splendens</i>	Suzuki et al. (2003)
<i>Pf5MaT (Q8W1X0)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Perilla frutescens</i>	Suzuki et al. (2001)
<i>Ss5MaT (Q8W1W9)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Salvia splendens</i>	Suzuki et al. (2002)
<i>Gt5AT (Q9ZWR8)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Anthocyane	<i>Gentiana triflora</i>	Fujiwara et al. (1998)
<i>NtMAT1 (Q589Y0)</i>	Malonyl-	Flavonoid- und Naphtholglucoside	<i>Nicotiana tabacum</i>	Taguchi et al. (2005)
<i>Vh3MAT2(Q6RFS6)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Verbena hybrida</i>	Suzuki et al. (2003)
<i>Vh3MAT1 (Q6RFS7)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Verbena hybrida</i>	Suzuki et al. (2004)
<i>Lp3MAT1 (Q6RFS5)</i>	Malonyl-	Anthocyane	<i>Lamium purpureum</i>	Suzuki et al. (2004)
<b>Klasse II</b>				
-				
<b>Klasse III</b>				
<i>CbBEAT (O64988)</i>	Acetyl-	Benzylacetat	<i>Clarkia breweri</i>	Dudareva et al. (1998)
<i>CcBEAT3(Q9SQ00)</i>	Acetyl-	Benzylacetat	<i>Clarkia concinna</i>	Nam et al. (1999)
<i>CcBEAT2(Q9SQ01)</i>	Acetyl-	Benzylacetat	<i>Clarkia concinna</i>	Nam et al. (1999)
<i>CcBEAT1(Q9SQ02)</i>	Acetyl-	Benzylacetat	<i>Clarkia concinna</i>	Nam et al. (1999)
<i>PsSalAT (Q94FT4)</i>	Acetyl-	Thebain	<i>Papaver somniferum</i>	Grothe et al. (2001)
<i>CmAAT4 (Q5I2Q4)</i>	Acetyl-	Zimtsäureacetat	<i>Cucumis melo</i>	El-Sharkawy et al. (2005)

## *Ergebnisse und Diskussion*

<i>RhAAT1 (Q5I6B5)</i>	Acetyl-	Geranylacetat und andere flüchtige Ester	<i>Rosa hybridi</i> cultivar	Shalit et al. (2003)
<i>SAAT (Q9FVF1)</i>	Acetyl-	Flüchtige Ester mittelkettiger aliphatischer Alkohole	<i>Fragaria ananassa</i>	Aharoni et al. (2000)
<i>VAAT (Q8GTM5)</i>	Acetyl-	Flüchtige Ester kurz- und mittelkettiger Alkohole	<i>Fragaria vesca</i>	Beekwilder et al. (2004)
<i>DAT (Q9ZTK5)</i>	Acetyl-	Vindolin	<i>Catharanthus roseus</i>	De Luca (2001)
<i>MAT (Q8GZU0)</i>	Acetyl-	Minovicidin	<i>Catharanthus roseus</i>	Laflamme et al. (2001)
<i>RsVS (Q70PR7)</i>	Acetyl-	Vinorin	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Bayer et al. (2004)
<i>Ss5MaT2 (Q6TXD2)</i>	Malonyl-	Anthocyanine	<i>Salvia splendens</i>	Suzuki et al. (2004)

## Ergebnisse und Diskussion

<b>Klasse IV</b>				
ACT (Q84QG6)	Hydroxycinnamoyl-	Hydroxycinnamoyl-Agmatinderivate	<i>Hordeum vulgare</i>	Burhenne et al. (2003)
<b>Klasse Va</b>				
AtHHT1 (Q94CD1)	Hydroxycinnamoyl-	Suberin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gou et al. (2009)
DBBT (Q9FPW3)	Benzoyl-	7,13-Diacetylbaccatin III	<i>Taxus cuspidata</i>	Walker und Croteau (2000)
TAT (Q9M6F0)	Acetyl-	Taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl-acetat	<i>Taxus cuspidata</i>	Walker et al. (2000)
DBAT (Q9M6E2)	Acetyl-	Baccatin III	<i>Taxus cuspidata</i>	Walker und Croteau (2000)
BAPT (Q8H2B5)	$\beta$ -Phenylalanyl-	N-Debenzoyl-2'-deoxytaxol	<i>Taxus cuspidata</i>	Walker et al. (2002)
DBNTBT (Q8LL69)	Benzoyl-	2'-Deoxytaxol	<i>Taxus canadensis</i>	Walker et al. (2002)
AtSDT(O80467)	Hydroxycinnamoyl-	Disinapoylspermidin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luo et al. (2009)
AtSCT (Q8GYW8)	Hydroxycinnamoyl-	Dicumaroylspermidin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luo et al. (2009)
BanAAT (AX025506)	Acetyl-	Zimtsäureacetat und andere Ester mittelkettiger aliphatischer Alkohole	<i>Musa sapientum</i>	Beekwilder et al. (2004)
CmAAT1 (P93094)	Acetyl-, Propanoyl-, Butanoyl-, Hexanoyl-	Ester mittelkettiger aliphatischer und aromatischer Alkohole	<i>Cucumis melo</i>	El-Sharkawy et al. (2005)
HMT/HLT (Q5H873)	Tigloyl-	Chinolizidinalkaloide	<i>Lupinus albus</i>	Okada et al. (2005)
CHAT (Q9SRQ2)	Acetyl-	(Z)-3-Hexen-1-yl-acetat	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D'Auria et al. (2002)
MpAAT1 (Q64FJ6)	Acetyl-	Ester mittelkettiger aliphatischer Alkohole	<i>Malus domestica</i>	Souleyre et al. (2005)
MdAAT2 (Q6R311)	Pentyl-, Hexyl-, 2-Hexenyl-	Ester mittelkettiger alliphatischer Alkohole	<i>Malus domestica</i>	Li et al. (2005)
AMAT (Q3ZPN4)	Anthraniloyl-	Methylantranilat	<i>Vitis labrusca</i>	Wang und De Luca (2005)
CbBEBT (Q8GT21)	Benzoyl-	Benzylbenzoat	<i>Clarkia breweri</i>	D'Auria et al. (2002)
CmAAT3 (Q5I2Q5)	Acetyl-	Cinnamoylacetat	<i>Cucumis melo</i>	El-Sharkawy et al. (2005)

## Ergebnisse und Diskussion

<i>NtBEBT (Q8GT20)</i>	Benzoyl-	Benzylbenzoat	<i>Nicotina tabacum</i>	D'Auria et al. (2002)
<i>BPBT (Q6E593)</i>	Benzoyl-	Benzylbenzoat/ Phenethylbenzoat	<i>Petunia hybrida</i>	Boatright et al. (2004)
<b>Klasse Vb</b>				
<i>CcHQT(A4U7G0)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl-Chinasäureester  <<< Shikimisäureester	<i>Cynara cardunculus</i>	Comino et al. (2007)
<i>AtHCT (Q9FI78)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl-Shikimisäure-/ Chinasäureester	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Besseau et al. (2007)
<i>TpHCT1 (B6D7P1)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl- Shikimisäureester  <<< Chinasäureester	<i>Trifolium pratense</i>	Sullivan (2009)
<i>NtHST (Q8GSM7)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl- Shikimisäureester  << Chinasäureester	<i>Nicotina tabacum</i>	Hoffmann et al. (2003)
<i>CcHCT (A4ZKE4)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Hydrolyse von Chlorogensäure; Hydrolyse von <i>p</i> C-Shik nicht getestet	<i>Coffea canephora</i>	Lepelley et al. (2007)
<i>CbHST</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl- Shikimisäureester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Coleus blumei</i>	diese Arbeit
<i>GhHST-k</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl- Shikimisäureester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>GhHST-l</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl- Shikimisäureester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>AsHHT1 (Q7XXP3)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Avenanthramide  ( <i>N</i> -Cinnamoylanthranilate)	<i>Avena sativa</i>	Yang et al. (2004)
<i>NtHQT (Q70G33)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl-Chinasäureester  <<< Shikimisäureester	<i>Nicotiana tabacum</i>	Niggeweg et al. (2004)

## Ergebnisse und Diskussion

<i>CsHQT1(C3PTS7)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl-Chinasäureester keine Shikimisäureester	<i>Cynara scolymus</i>	Comino et al. (2008)
<i>LjHQT (D1L8A9)</i>	Hydroxycinnamoyl-	<i>p</i> -Cumaroyl-Chinasäureester	<i>Lonicera japonica</i>	Peng, submitted (2009)
<i>GhHQT-k</i>	Hydroxycinnamoyl-?	?	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>GhHQT-l</i>	Hydroxycinnamoyl-?	?	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>CbRAS (A0PDV5)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Rosmarinsäure-artige Ester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Coleus blumei</i>	Berger et al. (2006)
<i>LaRAS(Q0GA14)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Rosmarinsäure-artige Ester?  Shikimisäureester	<i>Lavandula angustifolia</i>	Landmann (2007)
<i>MoRAS</i>	Hydroxycinnamoyl-	Rosmarinsäure-artige Ester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Melissa officinalis</i>	Weitzel (2009)
<i>GhRAS</i>	Hydroxycinnamoyl-	Rosmarinsäure-artige Ester  (keine Shikimisäure- und Chinasäureester)	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>GhRAS-k</i>	-	-	<i>Glechoma hederacea</i>	diese Arbeit
<i>HCBT (O23917)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Dianthramide	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Yang et al. (1997)
<i>TpHCT2 (B6D7P2)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Hydroxycinnamoyl- Maleinsäureester  (phasic acid)	<i>Trifolium pratense</i>	Sullivan (2009)
<i>AtSHT (O64470)</i>	Hydroxycinnamoyl-	Hydroxycinnamoyl- spermidine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Grienberger et al. (2009)
<b>Klasse VI</b>				
<i>CFAT (A1XWY7)</i>	Acetyl-	Coniferylacetat	<i>Petunia hybrida</i>	Dexter et al. (2007)
<b>Klasse VII</b>				
<i>FsTRI101(O94197)</i>	Acetyl-	Trichothecen-Mykotoxine	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Garvey et al. (2007)
<i>FgTRI101(O42692)</i>	Acetyl-	Trichothecen-Mykotoxine	<i>Fusarium graminearum</i>	Garvey et al. (2007)

## Ergebnisse und Diskussion

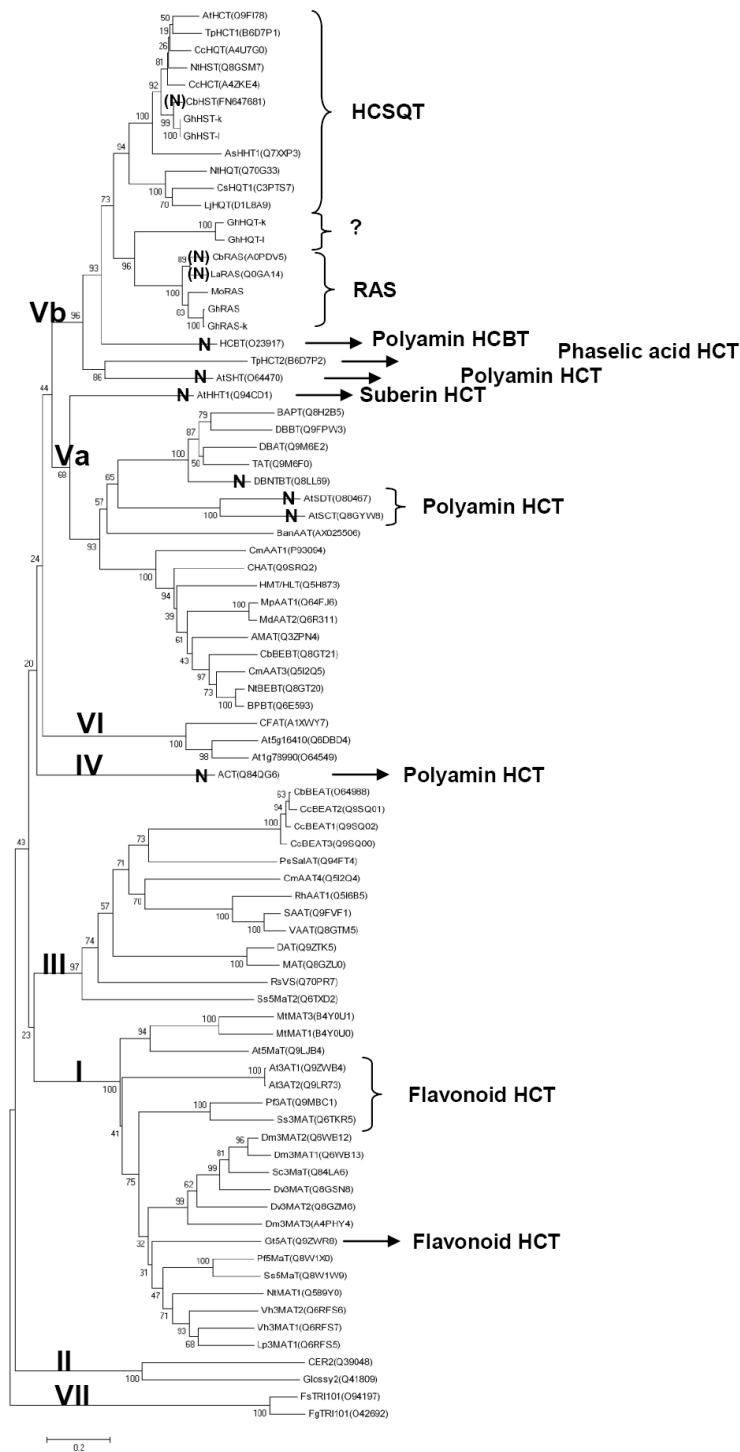
**Abkürzungen Klasse I:** At3AT1 *Arabidopsis thaliana* Cumaroyl-CoA:Cyanidin-3-O-glucose Hydroxycinnamoyltransferase; At3AT2 *Arabidopsis thaliana* Cumaroyl-CoA:Cyanidin-3-O-glucose Hydroxycinnamoyltransferase; MtMAT3 *Medicago truncatula* Isoflavon-7-O-glykosid Malonyltransferase; MtMAT1 *Medicago truncatula* Isoflavon-7-O-glykosid Malonyltransferase; At5MaT *Arabidopsis thaliana* Malonyl-CoA:Anthocyan-5-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Dm3MAT2 *Dendranthema x morifolium* Anthocyanidin-3-O-glucosid 3'',6''-O-Dimalonyltransferase; Dm3MAT1 *Dendranthema x morifolium* Anthocyanidin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Sc3MaT *Senecia carentus* Malonyl-CoA:Anthocyanidin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Dv3MAT *Dahlia variabilis* Malonyl-CoA:Anthocyanidin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Dv3MAT2 *Dahlia variabilis* Malonyl-CoA:Anthocyanidin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Dm3MAT3 *Dendranthemum x morifolium* Anthocyanidin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Pf3AT *Perilla frutescens* Hydroxycinnamoyl-CoA:Anthocyanin-3-O-glucosid 6''-O-Hydroxycinnamoyl-transferase; Ss3MAT *Salvia splendens* Anthocyanin-3-O-glucosid 6''-O-Hydroxycinnamoyltransferase; Pf5MaT *Perilla frutescens* Anthocyanin-5-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Ss5MaT *Salvia splendens* Malonyl-CoA:Anthocyanin-5-O-Glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Gt5AT *Gentiana triflora* Hydroxycinnamoyl-CoA:Anthocyanin-5-O-glucosid 6''-O-Acyl-transferase; NtMAT1 *Nicotiana tabacum* Malonyl-CoA:Flavonoid/Naphtholglucosid Acyltransferase; Vh3MAT2 *Verbena hybrida* Quercetin-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Vh3MAT1 *Verbena hybrida* Flavonol-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; Lp3MAT1 *Lamium purpureum* Flavonol-3-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; **Klasse II:** - **Klasse III:** CbBEAT *Clarkia breweri* Acetyl-CoA:Benzyllalkohol Acetyltransferase; CcBEAT1-3 *Clarkia concinna* Acetyl-CoA:Benzyllalkohol Acetyltransferasen; PsSalAT *Papaver somniferum* Salutaridinol 7-O-Acetyltransferase; CmAAT4 *Cucumis melo* Alkohol Acyltransferase; RhAAT1 *Rosa hybrida* Acetyl-CoA:Geraniol Acetyltransferase; SAAT Strawberry Alkohol Acyltransferase; VAAT *Fragaria vesca* Alkohol Acyltransferase; DAT Deacetylindolin 4-O-Acetyltransferase; MAT Minovincinin 19-O-Acetyltransferase; RsVS *Rauwolfia serpentina* Vinorin-synthase; Ss5MaT2 *Salvia splendens* Malonyl-CoA:Anthocyanin-5-O-glucosid 6''-O-Malonyltransferase; **Klasse IV:** ACT Agmatin Cumaroyltransferase; **Klasse Va:** AtHHT1 *Arabidopsis thaliana* Hydroxycinnamoyl-CoA:ω-Hydroxysäure Hydroxycinnamoyl-transferase; DBBT Benzoyl-CoA:Taxan 2α-O-Benzoyltransferase; TAT Taxa-4(20),11(12)-dien-5α-ol O-Acetyltransferase; DBAT 10-Deacetylbaaccatin-III 10-O-Acetyltransferase; BAPT Baccatin III O-Phenylpropanoyltransferase; DBNTBT *N*-Debenzoyl-2'-deoxy-paclitaxel:*N*-Benzoyltransferase; AtSDT *Arabidopsis thaliana* Spermidin Disinapoyltransferase; AtSCT *Arabidopsis thaliana* Spermidin Dicumaroyltransferase; BANAAT Banana Alkohol Acyltransferase; CmAAT1 *Cucumis melo* Alkohol Acyltransferase; HMT/HLT Tigloyl-CoA:(-)-13α-hydroxymultiflorin/(+)-13α-hydroxylupanin O-Tigloyltransferase; CHAT (Z)-3-Hexen-1ol- O-Acetyltransferase; MpaAAT1 *Malus pumila* Alkohol Acyltransferase; MdAAT2 *Malus domestica* Alkohol Acyltransferase; AMAT Anthraniloyl-CoA:Methanol Anthraniloyltransferase; CbBEAT *Clarkia breweri* Benzoyl-CoA:Benzyllalkohol Benzoyltransferase; CmAAT3 *Cucumis melo* Alkohol Acyltransferase; NtBEAT *Nicotiana tabacum* Benzoyl-CoA:Benzyllalkohol Benzoyltransferase; BPBT Benzoyl-CoA:benzyllalkohol/phenylethanol Benzoyltransferase; **Klasse Vb:** CcHQT *Cynara cardunculus* Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; AtHCT *Arabidopsis thaliana* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxy-cinnamoyltransferase; TpHCT1 *Trifolium pratense* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; TpHCT2 *Trifolium pratense* HydroxycinnamoylCoA:Maleinsäure Hydroxycinnamoyltransferase; NtHST *Nicotiana tabacum* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase; CcHCT *Coffea canephora* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/ Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; CbHST *Coleus blumei* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase; GhHST-k *Glechoma hederacea* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase; GhHST-l *Glechoma hederacea* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase; AsHHT1 *Avena sativa* Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxy-anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyltransferase; NtHQT *Nicotiana tabacum* Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; CsHQT1 *Cynara scolymus* Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; LjHQT *Lonicera japonica* Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; GhHQT-k *Glechoma hederacea* Hydroxycinnamoyltransferase?; GhHQT-l *Glechoma hederacea* Hydroxycinnamoyltransferase?; CbRAS *Coleus blumei* Rosmarinsäuresynthase (Hydroxycinnamoyl-CoA-Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase); LaRAS *Lavandula angustifolia* Rosmarinsäuresynthase; MoRAS *Melissa officinalis* Rosmarinsäuresynthase; GhRAS-l *Glechoma hederacea* Rosmarinsäuresynthase; GhRAS-k *Glechoma hederacea* Rosmarin-säuresynthase Pseudogen?; HCBT Hydroxycinnamoyl/Benzoyl-CoA:Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyltransferase; AtSHT *Arabidopsis thaliana* Feruloyl-CoA:Spermidin Hydroxycinnamoyltransferase; **Klasse VI:** CFAT Coniferylalkohol Acetyltransferase **Klasse VII:** FsTRI10 *Fusarium sporotrichioides* Trichothecen 3-O-Acetyltransferase; FgTRI101 *Fusarium graminearum* Trichothecen 3-O-Acetyltransferase;

**Tabelle 16:** Auflistung der biochemisch und genetisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen inklusive der Akzessionsnummern. Die Klasseneinteilung entspricht den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse (siehe Kapitel 3.11.4)

### 3.11.4. Phylogenie

Unter Verwendung eines multiplen Proteinsequenzalignments wurde mit der MEGA-Software (Kapitel 2.8.5) ein phylogenetischer Stammbaum (Abbildung 129) für BAHD-Acyltransferasen erstellt. Die gefundenen Verwandtschaftsverhältnisse sind mit den von D'Auria (2006) beschriebenen Ergebnissen vergleichbar. Daher wurde die damals eingeführte Nummerierung der Klassen beibehalten. Als Basis für den Stammbaum dienten Proteinsequenzen aus der UniProt-Datenbank, deren Substratspezifität bekannt ist.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 129:** Phylogenetischer Stammbaum von biochemisch und genetisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen inklusive CbHST, Gh-RAS-k, GhRAS-l, GhHST-k, GhHST-l, GhHQT-k und GhHQT-l erstellt nach der Neighbour-Joining-Methode. Die Erläuterungen zu den Abkürzungen sind aus Tabelle 16 zu entnehmen. Die Klasseneinteilung ist in römischen Zahlen wiedergegeben. Herausgehoben sind nur die Hydroxyzimtsäuretransferasen (HCT). *N*-Acyltransferasen mit Amidbildung als Hauptreaktion sind mit „N“ gekennzeichnet, *O*-Acyltransferasen, die zusätzlich *N*-Acylierungen katalysieren mit „(N)“.



## Ergebnisse und Diskussion

Da bislang kein Vertreter aus Klasse II biochemisch charakterisiert wurde, wurden die translatierten Proteinsequenzen der Gene CER2 aus *A. thaliana* und Glossy2 aus *Zea mays*, die an der Synthese von cuticulärem Wachs beteiligt sind, zusätzlich aufgenommen. Im Kladogramm ist zu erkennen, dass sie eine eigene Klasse bilden. Außerdem wurden die beiden Trichotecen 3-O-Acetyltransferasen TRI101 aus *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium graminearum* in die Analyse aufgenommen, da sie vermutlich pflanzlichen Ursprungs sind und durch horizontalen Gentransfer in das Pilz-Genom aufgenommen wurden (St. Pierre und De Luca 2000). Tatsächlich gruppieren die pilzlichen BAHD-Acyltransferasen zusammen mit der Agmatin Cumaroyltransferase (ACT) aus *Hordeum vulgare*, die eine der N-Hydroxymizsäuretransferasen ist, in Klasse IV.

Die von Dexter et al. (2007) beschriebene Coniferylalkohol Acetyltransferase (CFAT) aus *Petunia hybrida*, die den vorletzten Schritt der Isoeugenolbiosynthese katalysiert, hat die höchste Sequenzidentität zu den bislang nicht charakterisierten BAHD-Genen At5g16410 und At1g78990 aus *Arabidopsis thaliana* und bilden eine eigene neue Klasse VI innerhalb der BAHD-Superfamilie, die in enger Beziehung zu Mitgliedern der Klasse III steht.

13 charakterisierte Enzyme, die in der Regel Acetylgruppen übertragen und vorwiegend an der Synthese von Alkaloiden und flüchtigen Estern beteiligt sind, bilden die seit 2006 wenig veränderte Klasse III.

Klasse I bildet mit 20 charakterisierten flavonoidmodifizierenden Malonyl- oder Hydroxycinnamoyltransferasen die zweitgrößte Klasse im Stammbaum. Seit 2006 sind 9 neue Vertreter identifiziert und charakterisiert worden (siehe Tabelle 16).

Mit 40 charakterisierten Enzymen dominiert Klasse V das Kladogramm, die wiederum in zwei Unterklassen zerfällt. Unterklasse Va enthält mehrere Subgruppen, deren Vertreter verschiedene Co-aktivierte Säuren übertragen und vorwiegend an der Synthese von flüchtigen Estern und Alkaloiden beteiligt sind. Die  $\omega$ -Hydroxypalmitat-O-Feruloyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHHT1, Gou 2009) ist eine an der Suberinsynthese beteiligte Hydroxymizsäuretransferase. Luo et al. beschreiben 2009 zwei N-Hydroxymizsäuretransferasen aus *Arabidopsis thaliana*, die Spermidinkonjugate bilden. AtSDT ist eine Spermidindisinapoyltransferase, AtSCT eine Spermidindicumaroyltransferase.

Wie aus dem phylogenetischen Stammbaum ersichtlich ist, sind die Enzyme CbHST, Gh-RAS-k, Gh-RAS-l, Gh-HST-k, GhHST-l, GhHQT-k und GhHQT-l in Unterklasse Vb einzuordnen. Fast alle Mitglieder dieser Gruppe sind O-Hydroxymizsäuretransferasen, haben RAS-, HST- und/oder HQT-Aktivität und sind nachweislich an der Synthese von Rosmarinsäure (Berger et al. 2006), Lignin (Hoffmann et al. 2003) und Chlorogensäure (Comino et al. 2007) beteiligt. Alle Enzyme mit RAS-Aktivität bilden eine eigene Subgruppe.

## Ergebnisse und Diskussion

GhHQT-k und GhHQT-l, deren Substratspezifität unbekannt ist, bilden einen eigenen Seitenast und sind am nächsten mit der RAS verwandt.

Die Gruppe, die im phylogenetischen Stammbaum mit „HCSQTs“ bezeichnet ist, ist keine homogene Gruppe aus HCTs mit Shikimat und/oder Chinat als Akzeptoren. In der Subgruppe, die HSTs, HQTs und HCSQTs enthält, befindet sich auch eine *N*-Hydroxycinnamoyltransferase AsHHT1, die an der Synthese von Avenanthramiden in *Avena sativa* beteiligt ist und als Akzeptorsubstrat 5-Hydroxyanthranilsäure umsetzt. Zudem ist eine klare Abgrenzung zwischen HSTs und HQTs nicht möglich. So ist die NtHST aus *Nicotiana tabacum* näher mit der CcHQT aus *Cynara cardunculus* verwandt, als mit der CbHST. Zwei weitere *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen finden sich in Unterklasse Vb: die Anthranilat-*N*-Hydroxycinnamoyl-/benzoyltransferase aus *Dianthus caryophyllus* (HCBT; Yang et al. 1997) und die Spermidin-*N*-Feruloyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (Grienberger et al. 2009).

Die meisten charakterisierten Transferasen der BAHD-Familie sind *O*-Acyltransferasen. Bisher sind erst sechs *N*-Acyltransferasen genetisch und biochemisch charakterisiert worden, die für die Amidbindung mit Hydroxylimtsäuren verantwortlich sind. Polyamine wie Spermidin sind kleine basische Moleküle, die vermutlich als Wachstumsfaktoren dienen. In Pflanzen sind Polyamine oft mit Hydroxylimtsäuren konjugiert (Luo et al. 2009). Charakterisierte *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen sind ausschließlich in den Klassen IV und V zu finden. Die *N*-Acylierung von Anthranilsäure durch die HCBT aus *Dianthus caryophyllus* wurde erstmals von Yang et al. (1997) beschrieben, als die Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen noch nicht definiert worden war. In Unterklasse Va gehören mit der AsHHT1 und der AtSHT zwei weitere Enzyme zu den *N*-Hydroxycinnamoyltransferasen. Mit AtSDT und AtSCT (Luo et al. 2009) sind in Unterklasse Va zwei Enzyme lokalisiert, die Amidbindungen katalysieren. Die ACT (Burhenne et al. 2003) ist das erste charakterisierte Enzym aus Klasse IV und besitzt *N*-Acyltransferaseaktivität. Während AtSHT, AtSDT und AtSCT Spermidinkonjugate bilden, sind die Substrate der AsHHT1 5-Hydroxyanthranilsäure und der ACT Agmatin.

Neben der Bildung von Hydroxylimtsäureamiden ist auch eine an der Taxolbiosynthese beteiligte *N*-Acyltransferase DBNTBT aus *Taxus cuspidata* bekannt, die Benzoyl-CoA überträgt.

Die von Landmann (2007) heterolog exprimierte und charakterisierte LaAT1 (Akzessionsnummer Q0GA14) aus *Lavandula officinalis* ist die erste BAHD-Acyltransferase, bei der sowohl die Bildung von Ester- als auch Amidbindungen beschrieben wurde. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei der CbRAS und der CbHST beobachtet (siehe Kapitel 3.5.2), wengleich die *O*-Acylierung um ein Vielfaches effektiver abläuft als die *N*-Acylierung. Die LaAT1 akzeptiert pC-CoA und Caf-CoA und überträgt die Säurereste auf Shikimisäure,

## *Ergebnisse und Diskussion*

Anthranilsäure, Tyramin und Phenethylamin. Allerdings wurden von Landmann (2007) keine kinetischen Parameter bestimmt, so dass nicht abgeschätzt werden kann, ob die Substrate gut oder schlecht umgesetzt werden. Die Übertragung der CoA-aktivierten Säuren auf pHPL und DHPL wurde nicht untersucht. Die Suche nach verwandten Proteinen in der NCBI-Datenbank ergab, dass die LaAT1 mit 81% die höchste Sequenzidentität zur CbRAS besitzt und sich bei einer Sequenzidentität von maximal 53% zur CcHCT und der NtHST deutlich von den HCSQTs abgrenzt. Dabei ist die Identität der CbRAS zur LaAT1 vergleichbar mit der Identität der CbRAS zur MoRAS oder der GhRAS-I (82% und 81%). Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung der LaAT1 zur CbRAS und der Tatsache, dass *Lavandula angustifolia* Rosmarinsäure produziert, kann vermutet werden, dass die LaAT1 RAS-Aktivität besitzt und die von Landmann (2007) beschriebenen Enzymaktivitäten möglicherweise nur Nebenreaktionen sind. Da die LaAT1 auch anhand der phylogenetischen Analyse eindeutig den RAS zuzuordnen ist, wird sie in dieser Arbeit als LaRAS bezeichnet.

### 3.11.5. Konservierte Bereiche der BAHD-Acyltransferasen

Obwohl die minimale Sequenzidentität der BAHD-Acyltransferasen mit etwa 25-34% recht gering ist, teilen sie sich die konservierten Motive HxxxD und DFGWG (D'Auria 2006). Eine weitere hoch konservierte Aminosäure ist das Glutamin (Q), das 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv auftritt. Dieses konservierte Q ist tatsächlich bei nahezu allen charakterisierten Vertretern zu finden. Lediglich die Vinorinsynthase aus *Rauwolfia serpentina* (Bayer et al. 2004) und die GhHQT-I sind an dieser Position mutiert (siehe Tabelle 17). In 7 Fällen (CmAAT1, CmAAT3, RhAAT1, SAAT, VAAT, FsTRI101 und FgTRI101) liegt das Q nur 16 und in einem Fall (TpHCT2) sogar 18 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv. Das am Reaktionsmechanismus der BAHD-Acyltransferasen beteiligte Histidin des HxxxD-Motivs ist besonders hoch konserviert. St. Pierre und De Luca (2000) fanden im *Arabidopsis*-Genom ein BAHD-Gen, dessen HxxxD-Motiv verändert ist und vermuteten ein Pseudogen. Die BAPT-Sequenz ist die Einzige eines biochemisch charakterisierten Enzyms, die ein <sup>163</sup>GxxxD<sup>167</sup>-Motiv anstelle des typischen HxxxD-Motivs besitzt. Walker et al. (2002) vermuten, dass die freie  $\beta$ -Aminogruppe des  $\beta$ -Phenylalanoyl-CoAs als intramolekulare katalytische Base fungiert und das H<sup>163</sup> demnach für den Reaktionsmechanismus nicht mehr essentiell ist.

Bei der Suche nach potentiellen BAHD-Acyltransferasen im Genom von *Arabidopsis thaliana* und *Populus trichocarpa* entdeckten Yu et al. (2009) überraschenderweise, dass das

## *Ergebnisse und Diskussion*

DFGWG-Motiv in *Populus*-Genen regelmäßig wechselt zu DFGFG, DFGWA, DFGWK, NFGWG, DLGFG, DYGWG und NLGWG. Das HxxxD-Motiv fehlt in zwei *Arabidopsis*-Genen und das DFGWG-Motiv variiert hier noch stärker als in *Populus*-Genen. Von den enzymatisch aktiven BAHD-Acyltransferasen ist das DFGWG-Motiv in 14 Fällen zu DFGLG, DFGFG, DFGYG, DFGGG, NFGWG DFGPG, DFGWD, DFGWN oder DYGWG verändert (siehe Tabelle 17). In CER2 und seinen homologen Genen At3g23840 und At4g13840 ist das DFGWG-Motiv kaum konserviert (Yu et al. 2009). Dasselbe gilt für Glossy2.

Nakayama et al. (2003) fanden, dass die Flavonoid-modifizierenden Vertreter der Klasse I in der Regel ein weiteres konserviertes YFGNC-Motiv aufweisen, das zwischen dem HxxxD- und dem DFGWG-Motiv lokalisiert ist. Alle charakterisierten RASs weisen an dieser Position ein YFGNA oder ein FFGNA-Motiv auf, das ebenfalls bei der StHCT, der GhHQT-k, der Gh-HQT-l und der AtSHT aus der Klasse Vb zu finden ist (siehe Tabelle 17). Bei den HSTs, HQTs und HCSQTs tritt an dieser Stelle das YFGNV oder YLGNV-Motiv auf, das ebenfalls bei den Vertretern der Klasse VI konserviert ist. In Klasse Va ist das YYGNA-Motiv auffallend häufig vertreten, während in den verbleibenden Klassen keine typischen Motive gefunden wurden.

Die Aminosäuren, die die konservierten Motive HxxxD und DFGWG umrahmen, scheinen bei den Hydroxycinnamoyltransferasen der Klasse Vb stark konserviert zu sein. Alle bislang bekannten RAS-Enzyme besitzen das VANEHHLSDGVA oder VANEHHLSDGVS sowie das YEPDFGWGKAV-Motiv, während bei den HSTs, HQTs oder HCSQTs häufig VGMQHHA/VADGA/FS und HDADFGWGRPI vorkommen (Tabelle 16).

Die Untersuchung der Genstruktur von BAHD-Acyltransferasen zeigte, dass viele Vertreter ein typisches Q-Intron aufweisen. Dabei ist das Intron nach dem konservierten Glutamin (Q) 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv eingefügt (St. Pierre und De Luca 2000). Von den Hydroxycinnamoyltransferasen, die nach phylogenetischer Analyse in Klasse Vb (siehe Kapitel 3.11.4) eingruppiert sind, sind bislang nur fünf gDNA Sequenzen in der Datenbank hinterlegt (siehe Tabelle 17). Das AtHCT-Gen enthält ein 137 bp langes, das CbRAS-Gen ein 419 bp langes und das CcHQT-Gen ein 2037 bp langes Q-Intron. Im HCBT-Gen ist kein Intron vorhanden. Das AtSHT-Gen enthält ein 418 bp langes GT-AG-Intron, das zwischen dem HxxxD-Motiv und dem DFGWG-Motiv lokalisiert ist und demnach kein typisches Q-Intron ist.

## Ergebnisse und Diskussion

Name und UniProt-Akzessionsnummer der Acyltransferase	Q(17)	HxxxD	Motiv 2	DFGWG	Intron
<b>Klasse 1</b>					
<i>At3AT1 (Q9ZWB4)</i>	Q	NSATHV	VADGVT YFGNC	YGSD <b>DFGWG</b> KPV	kein Intron
<i>At3AT2 (Q9LR73)</i>	Q	NSATHV	VADGVT YFGNC	YDM <b>DFGLG</b> KPC	kein Intron
<i>MtMAT3 (B4Y0U1)</i>	Q	ISTHH	AVLDGKS YCGNC	YEID <b>DFGFR</b> PA	-
<i>MtMAT1 (B4Y0U0)</i>	Q	ISTHH	AVLDGKS YLGNC	YEID <b>DFGWR</b> PE	-
<i>At5MaT (Q9LJB4)</i>	Q	VTAAH	HAVLDGKT FFGNC	YGSD <b>DFGWG</b> KPV	kein Intron
<i>Dm3MAT2 (Q6WB12)</i>	Q	MTNHH	TVADAST YLGNC	YDID <b>DFGWG</b> KPQ	-
<i>Dm3MAT1 (Q6WB13)</i>	Q	MTNHH	S LGDAST YFGNC	YDID <b>DFGWG</b> KPQ	-
<i>Sc3MaT (Q84LA6)</i>	Q	MTNHH	S LGDAST YFGNC	YDF <b>DFGWG</b> KPI	-
<i>Dv3MAT (Q8GSN8)</i>	Q	LTNHH	S LSDANT YFGNC	YDID <b>DFGWG</b> KAM	-
<i>Dv3MAT2 (Q8GZM6)</i>	Q	LTNHH	S LCLDART YFGNC	YDID <b>DFGWG</b> KPE	-
<i>Dm3MAT3 (A4PHY4)</i>	Q	ITNHH	CLGDAST YFGNC	YDM <b>DFGWG</b> KPK	-
<i>Pf3AT (Q9MBC1)</i>	Q	IATHH	TVSDAPS YFGNC	YGAD <b>DFGWG</b> KAR	-
<i>Ss3MAT (Q6TKR5)</i>	Q	ITTHH	CVSDAPS YFGNC	YGAD <b>DFGWG</b> KAR	-
<i>Pf5MaT (Q8W1X0)</i>	Q	LSNHH	CLGDARS YFGNC	SNAD <b>DFGWG</b> KAR	-
<i>Ss5MaT (Q8W1W9)</i>	Q	FSNHH	CLGDARS YFGNC	LKAD <b>DFGWG</b> KAR	-
<i>Gt5AT (Q9ZWR8)</i>	Q	LTAHH	SIADAKS YFGNC	YGV <b>DFGWG</b> KPA	-
<i>NtMAT1 (Q589Y0)</i>	Q	FTNHH	VAGDGAT YFGNA	YAAD <b>DFGWR</b> PE	-
<i>Vh3MAT2 (Q6RFS6)</i>	Q	FNNNH	I VGDASS YFGNC	YDAD <b>DFGWN</b> PN	-
<i>Vh3MAT1 (Q6RFS7)</i>	Q	FTNHH	AVGDASS YFGNC	YDT <b>DFGWN</b> PN	-
<i>Lp3MAT1 (Q6RFS5)</i>	Q	FTNNH	VAGDASS YFGNC	YDT <b>DFGWN</b> PN	-
<b>Klasse 2</b>					
<i>CER2</i>	Q	LSWAH	I L G DVFS	-	1 Intron

## Ergebnisse und Diskussion

<i>Glossy2</i>	Q	FSWAHLIGDIPS	-	kein Intron
<b>Klasse 3</b>				
<i>CbBEAT (O64988)</i>	Q	AQFNHIIGDMFT	YEVDFGWGIPS	-
<i>CcBEAT3(Q9SQ00)</i>	Q	AQFNHMIGDMFT	YEVDFGWGIPS	1 Intron, aber kein Q-Intron
<i>CcBEAT2(Q9SQ01)</i>	Q	AQFNHIIGDMFT	YEVDFGWGIPS	1 Intron, aber kein Q-Intron
<i>CcBEAT1(Q9SQ02)</i>	Q	AQFNHIIGDMFT	YEVDFGWGIPS	1 Intron, aber kein Q-Intron
<i>PcSalAT (Q94FT4)</i>	Q	SSVSHKIADAAT	YEIDFGWGKPI	-
<i>CmAAT4 (Q5I2Q4)</i>	Q	LCLLHKLIDAAT	NEVDFGWGKPL	-
<i>RhAAT1 (Q5I6B5)</i>	Q(16)	VFSHSHKINDGQT	DQVDFGWGRPS	-
<i>SAAT (Q9FVF1)</i>	Q(16)	VSVSHKLIDGGT	NPLDFGWGRTS	-
<i>VAAT (Q8GTM5)</i>	Q(16)	VSVSHKLIDGRT	NQLDFGWGRTS	-
<i>DAT (Q9ZTK5)</i>	Q	FGISHKVADGGT	YDVDFGWGKPI	kein Intron
<i>MAT (Q8GZU0)</i>	Q	FGISHKVADAAT	YDIDFGLGKPI	kein Intron
<i>RsVS (Q70PR7)</i>	<b>K</b>	LCLLHKLIDAAT	NEVDFGWGKPL	-
<i>Ss5MaT2 (Q6TXD2)</i>	Q	FSNHHCGLDARS	LKADFGWGKAR	-

## Ergebnisse und Diskussion

<b>Klasse 4</b>				
ACT (Q84QG6)	Q	FTTQHIVSDGRS YTGNV	YDMDFGGGRPF	-
<b>Klasse 5a</b>				
AtHHT1 (Q94CD1)	Q	LCMNHCMFDGIG YFGNG	HTTDFGWGEPI	2 Introns
DBBT (Q9FPW3)	Q	TRFHHSVSDGKG YYGNA	YEADFGWGNVAV	-
TAT (Q9M6F0)	Q	VSFHGGVCDGRG YYGNS	DEVDFGWGNVAV	-
DBAT (Q9M6E2)	Q	VSFCHGICDGLG YYGNF	DEVDFGWGHAD	-
BAPT (Q8H2B5)	Q	ANVYGSACDAKG YYGNA	YEVDFGWGDAM	-
DBNTBT (Q8LL69)	Q	VTLPHSVCDGRG YYGNA	YEADFGWGGPL	-
AtSDT(O80467)	Q	MAMSHAMCDGYG YYGNA	GSMDFGWDEPV	2 Introns
AtSCT (Q8GYW8)	Q	TALTHAVCDGYG YYGNA	GSMDFGWNEPV	2 Introns
BanAAT (AX025506)	Q	LISVHTIADGLG YYGNC	LDVDYGWGKPL	-
CmAAT1 (P93094)	Q(16)	ITFRHYEYDQVV YYGNA	ENVDFGWGKAI	-
HMT/HLT (Q5H873)	Q	VRLNHAMCDAIG FYGNA	RDVDFGWGKAV	-
CHAT (Q9SRQ2)	Q	LRFNHTMTDGAG YYGNV	GKIDFGPWGKPV	1 Intron
MpAAT1 (Q64FJ6)	Q	LRLNHTMCDAAG YYGNA	GDVNFGWGQPV	-
MdAAT2 (Q6R311)	Q	LRVNHTMCDAPG YYGNA	GDVNFGWGQPV	-
AMAT (Q3ZPN4)	Q	LRLNHTMSDAAG YYGNA	GEVDFGWGKPV	-
CbBEBT (Q8GT21)	Q	LRLNHTMADAAG YYGNA	GEVDFGWGEAV	-
CmAAT3 (Q5I2Q5)	Q(16)	VTCHHREYDEVV YYGNA	EDVDFGWGKAM	-
NtBEBT (Q8GT20)	Q	LRLNHTMSDAPG YYGNA	GEVDFGWGKAV	-
BPBT (Q6E593)	Q	LRLNHTMSDAPG YYGNA	GEVDFGWGKAV	-
<b>Klasse 5b</b>				
CcHQT(A4U7G0)	Q	VGMQHHAADGAS YFGNV	HDADFGWGRPI	Q-Intron

## Ergebnisse und Diskussion

<i>AtHCT (Q9FI78)</i>	Q	VGMQHHAADGFS	YFGNV	YDADFGWRPI	Q-Intron
<i>TpHCT1 (B6D7P1)</i>	Q	VGMQHHVADGAS	YFGNV	HDADFGWRPI	-
<i>NtHST (Q8GSM7)</i>	Q	VGMQHHAADGAS	YFGNV	HDADFGWRPI	-
<i>CcHCT (A4ZKE4)</i>	Q	VGMRHHAADGFS	YFGNV	HDADFGWRPI	-
<i>CbHST</i>	Q	VGMQHHAADGFS	YFGNV	HDADFGWRPI	Q-Intron
<i>GhHST-k</i>	Q	VGMQHHVADGFS	YFGNV	HDADFGWRPI	kein Intron
<i>GhHST-I</i>	Q	VGMQHHVADGFS	YFGNV	HDADFGWRPI	-
<i>AsHHT1 (Q7XXP3)</i>	Q	IAMQHHVADGFS	YFGNV	HDADFGWRPV	-
<i>NtHQT (Q70G33)</i>	Q	GGVFHTLSDGLS	YLGNV	HDSDFGWRPI	-
<i>CsHQT1(C3PTS7)</i>	Q	CGLHHTLSDGLS	YLGNV	YESDFGWRPI	-
<i>LjHQT (D1L8A9)</i>	Q	VGVHHTLSDGVS	YLGNV	HDADFGWRPI	-
<i>GhHQT-k</i>	Q	VTNEHHVADGTA	YFGNA	YEADFGWKPV	Q-Intron
<i>GhHQT-I</i>	<b>E</b>	VTNEHHVADGTA	YFGNA	YEADFGWKPV	-
<i>CbRAS (A0PDV5)</i>	Q	VANEHHLSDGVA	FFGNA	YEPDFGWKAV	Q-Intron
<i>LaRAS(Q0GA14)</i>	Q	VANEHHLSDGVA	YFGNA	YEPDFGWKAV	-
<i>MoRAS</i>	Q	VANEHHLSDGVA	YFGNA	YEPDFGWKAV	-
<i>GhRAS</i>	Q	VANEHHLSDGVS	FFGNA	YEPDFGWKAV	-
<i>GhRAS-k</i>	Q	VANEHHLSDGVS	FFGNA	YEPDFGWKAV	-
<i>HCBT (O23917)</i>	Q	FAQHHHACDGMS	YCGNV	QAMDFGWSPT	kein Intron
<i>TpHCT2 (B6D7P2)</i>	Q(18)	VAFSHSLSDGTG		YEADFGYKPI	-
<i>AtSHT (O64470)</i>	Q	VNVSHAIVDGQS	YFGNA	YGLDFGWKKEF	Intron
<b>Klasse 6</b>					
<i>CFAT (A1XWY7)</i>	Q	CTFDHRVADAYS	YFGNV	SQVNFNFCWGPCD	-
<i>At5g16410</i>	Q	CTFDHRIADAYS	YFGNV	ARIDFCWGSVP	1 Intron



## *Ergebnisse und Diskussion*

<i>At1g78990</i>	Q	CTFD <b>HRVAD</b> AYS YFGNV	NQV <b>DFGWG</b> SPV	1 Intron
<b>Klasse 7</b>				
<i>FsTRI101(O94197)</i>	Q(16)	VNGQ <b>HGAM</b> DMTG GPGLL	WEY <b>DFGF</b> GLGK	kein Intron
<i>FgTRI101(O42692)</i>	Q(16)	VNGQ <b>HGAM</b> DMVG	WDY <b>DFGF</b> GLGK	kein Intron

**Tabelle 17:** Tabelle der konservierten Bereiche der in die phylogeneitsche Analyse (siehe Kapitel 3.11.4) einbezogenen BAHD-Acyltransferasen. Es ist zu erkennen, ob das konservierte Glutamin (Q), das in der Regel 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv zu finden ist, in den Aminosäuresequenzen auftritt, oder welche andere Aminosäure an entsprechender Stelle zu finden ist. Die konservierten Bereiche um HxxxD und DFGWG sind aufgeführt, sowie ein zusätzliches konserviertes Motiv 2, das in einigen der Klassen identifiziert wurde. HxxxD und DFGWG sind fett hervorgehoben, Mutationen grau unterlegt. Aus der Tabelle geht ebenfalls hervor, ob die entsprechenden BAHD-Acyltransferase-Gene Introns enthalten. Unbekannte Gene sind durch ein Minus (-) gekennzeichnet.

### **3.12. Diskussion: Evolution von HCTs: genomische Organisation und Phylogenie der HCTs aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea***

#### 3.12.1. Grundlagen zur Evolution von Sundärstoffwechselwegen

Pflanzen bilden zahlreiche chemische Substanzen, um mit ihrer Umwelt zu interagieren. Viele toxische oder bittere Sundärstoffe dienen der Pflanze als Abwehr gegen Fraßfeinde oder Pathogene, andererseits locken farbige oder duftende Inhaltsstoffe ihre Bestäuber an, wobei das Muster an sekundären Inhaltsstoffen von Pflanzenart zu Pflanzenart meist deutlich variiert. Jede Pflanzenart besitzt nur spezifische Sundärstoffwechselgene.

Trotz der großen Anzahl an sekundären Inhaltsstoffen im Pflanzenreich gibt es nur wenige Stoffwechselwege, die zur Synthese der Grundgerüste dieser Verbindungen führen. Die enorme Vielfalt wird durch Modifikation der chemischen Grundgerüste erreicht. Die unzähligen Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, bedienen sich weniger biochemischer Grundreaktionen wie Decarboxylierungen, Oxidationen, Reduktionen, Hydroxylierungen, Zyklisierungen, Methylierungen und Acylierungen. Diese werden oft von Vertretern großer Enzymfamilien katalysiert, die ihrerseits meist spezifisch für ihr Substrat sind und nur ein bestimmtes Produkt bilden (Pichersky und Gang 2000).

Die Evolution von Genen zur Bildung neuer Pflanzeninhaltsstoffe im Zuge der Anpassung an Standortbedingungen ist ein fortwährender Prozess. Nach heutiger Vorstellung ist die Genduplikation mit anschließender Divergenz die treibende Kraft für die Erschaffung neuer Sundärstoffwechselgene (Pichersky und Gang 2000). Nach Genduplikation besitzt der Organismus ein Gen, das die ursprüngliche Funktion übernimmt und ein weiteres Gen, auf das kein natürlicher Selektionsdruck ausgeübt wird. Da die Genkopien keine essentiellen Funktionen übernehmen, akkumulieren Mutationen und viele von ihnen werden nach Pseudogenisierung wieder aus dem Genom eliminiert, während andere Gene mit veränderter Enzymaktivität im Genom fixiert werden. In der Literatur sind einige Beispiele beschrieben, die darauf hinweisen, dass Gene des pflanzlichen Sundärstoffwechsels von Vorfahren aus dem Primärstoffwechsel abstammen. Trotzdem können Gene, die schon eine Funktion im Sundärstoffwechsel übernommen haben, ihrerseits als Basis für die Gewinnung neuer Funktionen sein. In vielen Fällen gehören diese Gene zu großen Genfamilien, wie den *N*- und *O*-Methyltransferasen, den Acyltransferasen oder den Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen. Solche duplizierten Gene werden oft in Tandem Repeats innerhalb des Genoms gefunden (Pichersky und Gang 2000).

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.12.2. Evolution von BAHD-Acyltransferasen

Pflanzliche BAHD-Acyltransferasen stellen eine wichtige Genfamilie dar, die zur Mannigfaltigkeit des Sündärstoffwechsels höherer Pflanzen beiträgt. Eine der häufigsten „Verzierungen“ im pflanzlichen Sündärstoffwechsel ist die Acylierung von sauerstoff- oder stickstoffhaltigen Substraten. Viele dieser Acyltransferasen gehören der BAHD-Superfamilie (siehe Einleitung) an, die zahlreiche funktionell verschiedene Enzyme mit den konservierten Motiven HxxxD und DFGWG in der Aminosäuresequenz umfasst. St. Pierre und De Luca (2000) beschreiben die pflanzlichen BAHD-Acyltransferasen nach phylogenetischer Analyse als monophyletische Gruppe, die aus nicht-pflanzlichen Genen hervorgegangen ist. Der evolutionäre Ursprung wird möglicherweise bei den Typ I, II und III Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT) vermutet, die ebenfalls das HxxxDG-Motiv aufweisen, das am Reaktionsmechanismus beteiligt ist. Identitäten zwischen 10 und 86% auf Aminosäurebasis deuten auf eine rege Diversifikation nach Duplikation innerhalb dieser Proteinfamilie hin. In die monophyletische Gruppe der pflanzlichen BAHD-Acyltransferasen sind auch die Trichothecen 3-O-Acetyltransferasen TRI101 aus *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium graminearum* einzuordnen, die vermutlich durch horizontalen Gentransfer aus einer unbekanntem Spezies in das Pilzgenom integriert wurde. Es wird spekuliert, dass TRI101 die Schimmelpilze vor ihren eigenen Giften schützt.

Mitglieder großer Proteinfamilien, die durch Genduplikation und Diversifikation entstanden sind, weisen trotz deutlicher Sequenzunterschiede einige Gemeinsamkeiten auf. So kann innerhalb der BAHD-Acyltransferasen eine minimale Sequenzidentität von 10 bis 30% auf Aminosäureebene und die Existenz der konservierten Motive HxxxD und DFGWG beobachtet werden (Yu et al. 2009). Neben den Übereinstimmungen in der Genstruktur wird für die BAHD-Acyltransferasen ein einheitlicher Reaktionsmechanismus postuliert. Auch die einheitliche dreidimensionale Struktur von Vertretern einer Proteinfamilie ist ein Indiz für gemeinsamen evolutionären Ursprung. Bislang war die Strukturaufklärung von BAHD-Acyltransferasen aus drei verschiedenen Klassen erfolgreich. Die Kristallstrukturen der Anthocyanin-Malonyltransferase aus *Dendranthema morifolium* (Dm3MAT3, pdb 2e1u, 2e1v), die nach phylogenetischer Analyse in Klasse I einzuordnen ist, der Klasse III Vinorinsynthase (RsVS, pdb 2bgh) aus *Rauwolfia serpentina* und der Klasse VII Trichothecen-Acetyltransferasen aus *Fusarium*-Arten (FsTRI101/FgTRI101, pdb 3fot, 3fp0) haben eine ähnliche Tertiärstruktur (siehe Kapitel 3.8.1).

Die BAHD-Acyltransferasen akzeptieren sehr verschiedene Substrate, und man vermutet, dass Enzyme mit neuen Funktionen schnell entstehen (Luo et al. 2007). Bei der Suche nach BAHD-Genen in den Genomen von *Arabidopsis thaliana* und *Populus trichocarpa* fanden Yu

## *Ergebnisse und Diskussion*

et al. (2009) eine enorme Anzahl an BAHD-Mitgliedern: 61 BAHD-Gene liegen über das *Arabidopsis*-Genom verteilt und sogar 94 verstreut im *Populus*-Genom. Mehrere paraloge Gene wurden sowohl in Tandem Repeats als auch auf verschiedenen Chromosomen entdeckt, was ein Indiz für Genverdopplung ist. Das *Arabidopsis*-Genom hat mehrere Runden von Genom-weiten Duplikationen und Umorganisationen durchgemacht, die auch zur Amplifikation der BAHD-Gene und - nach zahlreichen Mutationen - zu Enzymen mit verschiedensten Substratspezifitäten geführt haben. Bei der vergleichenden phylogenetischen Untersuchung fiel außerdem auf, dass es zu einigen BAHD-Genen im *Arabidopsis*-Genom keine homologen Gene im *Populus*-Genom gibt und umgekehrt. Dieses Spezies-spezifische Vorkommen von BAHD-Genen suggeriert, dass die Evolution der BAHD-Enzyme nach Aufspaltung der Arten in großem Stil abläuft.

### 3.12.3. Evolution von HCTs

Während die Grundzüge der Lignin-, Chlorogensäure- und Rosmarinsäurebiosynthesewege aufgrund eingehender molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen weitgehend verstanden sind, existieren kaum Informationen über die Evolution der beteiligten Enzyme. Die Biosynthesewege weisen große Gemeinsamkeiten auf, und die beteiligten Enzyme scheinen sehr nahe miteinander verwandt zu sein. Bei der Biosynthese von Caffeoyleshikimat, Chlorogensäure und Rosmarinsäure wird pC-CoA aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel als Hydroxyzimtsäuredonor verwendet. Die Akzeptoren sind Derivate des Shikimatwegs: Shikimisäure, Chinasäure und *p*-Hydroxyphenyllactat gehen aus L-Tyrosin hervor. Die Enzyme, die die Veresterungen katalysieren, sind alle drei Hydroxyzimtsäuretransferasen aus der Klasse Va der BAHD-Acyltransferasen. Es folgt eine *meta*-Hydroxylierung der *p*-Cumaroyleinheit, die von einer Cytochrom-P450-Monooxygenase eingeführt wird. Sowohl die Hydroxyzimtsäuretransferasen als auch die *meta*-Hydroxylasen zeigen hohe Sequenzähnlichkeiten und scheinen eine enge evolutionäre Beziehung zu haben. Trotzdem sind sie sehr spezifisch für die Substrate ihres Biosynthesewegs. Nach heutiger Vorstellung mussten für die Biosynthese von Rosmarinsäure nur wenige neue Enzymaktivitäten entwickelt werden, die möglicherweise aus Genen des Lignin- oder Chlorogensäuremetabolismus hervorgegangen sind (Petersen et al. 2009).

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.12.4. Datenbankrecherche nach cDNA-Sequenzen von biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen

In der UniProt-Datenbank sind zahlreiche BAHD-Acyltransferasesequenzen zu finden. Die Anzahl der Einträge steigt ständig. Innerhalb der vollständig sequenzierten Genome von *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* und *Oryza sativa* wurden allein 61, 94 und 119 BAHD-Gene identifiziert (Yu et al. 2009, D'Auria 2006), deren translatierte Sequenzen in den Proteindatenbanken hinterlegt sind. Hinzu kommen zahlreiche Proteinsequenzen aus unterschiedlichen Pflanzenarten. Leider sind die wenigsten von ihnen biochemisch charakterisiert. Die meisten der putativen BAHD-Acyltransferasen wurden unter virtuellen Enzymnamen in die Datenbanken aufgenommen, die sich auf Sequenzähnlichkeit zu Enzymen mit bekannter Funktion stützen. Allerdings hat schon D'Auria (2006) darauf hingewiesen, dass anhand der Sequenz nicht auf die Enzymaktivität geschlossen werden kann. So ist eine vermeintliche RAS aus *Lavandula officinalis* als putative Alkohol Acyltransferase hinterlegt und die Spermidin Disinapoyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (AtSDT) als putative Anthranilat-*N*-Hydroxycinnamoyl-/benzoyltransferase eingetragen, so dass die Suche nach aktiven BAHD-Mitgliedern erschwert ist.

Allein die enorme Anzahl von Genen innerhalb der Pflanzengenome spricht dafür, dass es sich bei den BAHD-Acyltransferasen um eine Proteinsuperfamilie handelt. Waren 2006 noch keine 50 Vertreter mit Sequenz und Funktion bekannt, ist die Anzahl 2009 schon auf über 70 gewachsen. Immer neue, bis dato unbekannte Enzymaktivitäten werden beschrieben. So katalysiert die Hydroxycinnamoyltransferase T<sub>p</sub>HCT2 aus *Trifolium pratense* die Veresterung der Maleinsäure (Sullivan 2009), eine weitere Hydroxycinnamoyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* ist an der Biosynthese von Suberin beteiligt (Gou et al. 2009) und die Coniferylalkohol Acetyltransferase CFAT aus *Petunia hybrida* ist an der Biosynthese des Blütenduftstoffs Isoeugenol beteiligt (Dexter et al. 2007). Sie alle tragen zum Verständnis der Evolution der BAHD-Acyltransferasen bei.

### 3.12.5. Konservierte Bereiche der BAHD-Acyltransferasen

Von den 61 BAHD-Genen im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten 2006 nur einem und können mittlerweile erst 9 eine katalytische Funktion zugeordnet werden. Bei der Definition der BAHD-Acyltransferasen (D'Auria 2006) wurden das HxxxD- und das DFGWG-Motiv als hochkonserviert beschrieben. Alle biochemischen Untersuchungen, darunter

## *Ergebnisse und Diskussion*

Inhibitionsstudien und Mutagenesestudien deuteten darauf hin, dass diese konservierten Bereiche essentiell für die Enzymaktivität sind. Veränderungen einzelner Aminosäuren dieser Motive führten zu drastischen Aktivitätsverlusten bis hin zur Funktionslosigkeit (Bayer et al. 2004, Suzuki et al. 2003), so dass fraglich war, ob es sich bei den *Arabidopsis*-Genen mit Mutationen im HxxxD- oder DFGWG-Motiv nicht um Pseudogene handelt. Mittlerweile sind 14 aktive Acyltransferasen mit Variationen im HxxxD- oder DFGWG-Motiv bekannt (Tabelle 17) so dass die Bedeutung dieser Bereiche neu definiert werden muss.

Bis heute ist es unmöglich anhand der Sequenz auf die Substratspezifität zu schließen. Dies ist zum einen für den Molekularbiologen, der ein spezifisches Enzym eines Biosynthesewegs mittels PCR und RACE-PCR-Techniken amplifizieren möchte, problematisch. Mit Primern, die sich lediglich gegen die konservierten Bereiche HxxxD und DFGWG richten, wird er eine große Anzahl an verschiedenen BAHD-Acyltransferasen amplifizieren. Zum anderen steht der Biochemiker, der einen neuen cDNA-Klon auf Enzymaktivität untersuchen möchte, vor der Schwierigkeit, die richtige Substratkombination vorherzusehen.

Beim multiplen Sequenzalignment der genetisch und biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen fällt auf, dass die Aminosäuren, die auf der Primärsequenz in der Nähe der konservierten Bereiche HxxxD und DFGWG liegen, bei einigen Gruppen des phylogenetischen Stammbaums gehäuft auftreten. Bei allen bislang beschriebenen RAS sind die drei Aminosäuren vor und hinter dem DFGWG-Motiv hoch konserviert. In allen RAS-Sequenzen, aber bei keinen Vertretern anderer Klassen, ist **YEPDFGWGKAV** zu finden. Im Gegensatz dazu häuft sich im HCSQT-Seitenast **HDADFGWGRPI**. Um das HxxxD-Motiv herum ist einzig bei den RAS-Sequenzen **VANEHHLSDGVA/S** und bei den HCSQTs- und darunter auch AsHHT1, dessen Akzeptorsubstrat weder Shikimat noch Chinat ist, **VGMQHHA/VADGA/FS** vorhanden. Ein dritter Bereich scheint für die Abgrenzung von RAS und HCSQTs zu anderen BAHD-Acyltransferasen essentiell zu sein. Zwischen dem HxxxD- und dem DFGWG-Motiv liegt ein Bereich aus 5 Aminosäuren, der RAS und HCSQTs unterscheidet (Tabelle 17). Während bei RAS **Y/FFGNV** zu finden ist, herrscht bei den HCSQTs **YF/LGNV** vor. Diese Motive in einem neuen cDNA-Klon können möglicherweise als Hinweis für den Biochemiker dienen, dass er ein Enzym mit RAS-, HST- oder HQT-Aktivität vorliegen hat. Der Molekularbiologe könnte aus diesen Aminosäuresequenzen kurze degenerierte Primer ableiten, um spezifisch eine RAS oder eine HCSQT zu amplifizieren.

Alle bislang charakterisierten RAS-Enzyme wurden aus Lamiaceen isoliert. Das Vorkommen von Rosmarinsäure im Pflanzenreich tritt zwar nur in vereinzelt Familien auf, erstreckt sich aber von den Dicotylen über die Monocotylen bis hin zu den Farnen und Hornmoosen (Petersen et al. 2009). Daher bleibt fraglich, ob diese konservierten Bereiche auch in RAS-Sequenzen aus weiter entfernten Pflanzenfamilien zu finden sind. Die Untersuchung

## *Ergebnisse und Diskussion*

verschiedener Spezies auf Anwesenheit von RAS-Sequenzen wird in Zukunft Aufschluss über diese Fragestellung geben.

HSTs, HQTs und HCSQTs bilden einen gemeinsamen Seitenast im phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 129) und können auch nicht anhand der oben beschriebenen konservierten Bereiche auseinander dividiert werden. Es kommt erschwerend hinzu, dass im HCSQT-Seitenast mit AsHHT1 eine Hydroxycimtsäuretransferase, die weder HST- noch HQT-Aktivität besitzt, eingruppiert ist. Somit ist die selektive Amplifikation einer HST oder einer HQT ebenso wie die Vorhersage der Substratspezifität (D'Auria 2006) bis heute nicht möglich.

Wie im phylogenetischen Stammbaum zu erkennen ist, sind die Enzyme mit HST- oder HQT-Aktivität sehr nah miteinander verwandt. Es wurden sogar HCSQTs beschrieben, die sowohl HST- als auch HQT-Aktivität besitzen, wobei meistens eine Präferenz für eine der Reaktionen vorliegt. Wahrscheinlich reicht in einigen Fällen der Austausch weniger Aminosäuren aus, um die Substratspezifität zu verändern. Die Strukturaufklärung einer HCSQT müsste Aufschluss über die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren geben. Durch Sequenzvergleich von HSTs und HQTs müssten dann die unterschiedlichen Aminosäuren im aktiven Zentrum identifiziert werden. Diese würden anschließend in Mutagenesestudien ausgetauscht, um die Substratspezifität umzukehren.

Die Existenz von bifunktionalen HCSQTs ihrerseits ist ein Hinweis für Genduplikation innerhalb des Seitenasts der HCSQTs. Interessant wäre auch die Fragestellung nach Rosmarinsäuresynthasen mit geringer HST- oder HQT-Aktivität bzw. HCSQTs, die zusätzlich Hydroxyphenyllactat als Akzeptor umsetzen. Dies wäre ein weiterer Hinweis für einen gemeinsamen Vorfahren von RAS und HCSQTs. In diesem Zusammenhang ist die LaRAS zu nennen, die neben ihrer vermuteten RAS-Aktivität auch Shikimisäure umsetzt. Denkbar wäre auch die Existenz von multifunktionalen HCTs, die RAS-, HAST- und HQT-Aktivität besitzen. Die Bildung von rosmarinsäureartigen Estern wurde allerdings bei keiner der HCSQTs untersucht.

Durch die ausführliche genetische, biochemische und strukturelle Beschreibung zahlreicher weiterer BAHD-Acyltransferasen aus verschiedenen Spezies wird das Verständnis um die Evolution dieser Superfamilie verbessert werden. Auch könnte die Vorhersage der Substratspezifität anhand der Aminosäuresequenz in Zukunft ermöglicht werden, obwohl der schlussendliche Beweis einer Enzymaktivität immer durch Enzymtests zu erbringen ist.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.12.6. Verwandtschaftsbeziehungen von Hydroxycinnamoyltransferasen

Die Verwandtschaftsbeziehungen der in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme CbHST, GhHST-k, GhHST-l, GhRAS-k, GhRAS-l, GhHQT-k und GhHQT-l zu den bislang bekannten BAHD-Acyltransferasen wurden anhand eines phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 129) untersucht.

Anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Substratspezifität können die BAHD-Acyltransferasen in 6 Klassen eingeteilt werden. Alle in dieser Arbeit klonierten BAHD-Acyltransferasen sind in Klasse Va einzuordnen, in der Hydroxizimtsäuretransferasen zusammengefasst werden, die vor allem an der Synthese von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Lignin beteiligt sind.

Die GhRAS-l, die nachgewiesene RAS-Aktivität besitzt, sowie die homologe, bislang inaktive GhRAS-k bilden einen gemeinsamen Seitenast mit den anderen RAS und scheinen einen gemeinsamen Vorfahren zu haben.

Wie erwartet, fügen sich die CbHST, die GhHST-k und die GhHST-l, für die in Enzymtests selektive HST-Aktivität nachgewiesen werden konnte, in die HCSQT-Gruppe ein. Bei näherer Betrachtung des HCSQT-Seitenasts ist zu erkennen, dass Enzyme mit vorwiegender HQT-Aktivität nicht streng separiert wurden von Enzymen mit vorwiegender HST-Aktivität. So ist die NtHST aus *Nicotiana tabacum* näher verwandt mit der CcHQT aus

*Cynara cardunculus* als mit der CbHST, GhHST-k oder GhHST-l. Diese Beobachtung ergibt den Anschein, dass die Evolution der HSTs und HQTs auch nach Aufspaltung der Arten noch mit hoher Geschwindigkeit abläuft. Wahrscheinlich haben sich die verschiedenen Substratspezifitäten innerhalb der HCSQT-Gene unabhängig voneinander durch Genduplikation mit anschließender Neofunktionalisierung gebildet. Für die Neofunktionalisierung müssen recht geringe Veränderungen in den Acylakzeptorbindetaschen verantwortlich sein.

Die GhHQT-k und GhHQT-l bilden innerhalb der Klasse Va einen separaten Seitenast, der in enger Beziehung zu den RAS aber auch den HCSQTs steht. Bei der biochemischen Untersuchung der beiden heterolog exprimierten Enzyme konnte weder RAS-, HST-, noch HQT-Aktivität gefunden werden. Da sich beide Enzyme im Stammbaum von allen anderen bislang charakterisierten Vertretern abgrenzen, könnte es sein, dass sie eine neue, bislang unbekannte Enzymaktivität besitzen. Da in der gesamten Klasse Va nur Hydroxizimtsäuretransferasen zu finden sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die GhHQTs ebenfalls Hydroxycinnamoyl-CoA übertragen. Die Frage nach einem möglichen



## Ergebnisse und Diskussion

Akzeptorsubstrat bleibt bestehen. Um die Enzymaktivität zu bestimmen, müssten zahlreiche Substratkombinationen ausgetestet werden. Die Untersuchung von transgener *Glechoma hederacea* auf Hydroxyzimtsäurederivate nach Überexpression der GhHQTs könnte die Substratauswahl einschränken. Vielleicht wird irgendwann eine BAHD-Acyltransferase biochemisch charakterisiert werden, die bei phylogenetischer Analyse in denselben Seitenast eingruppiert wird, so dass es einen deutlicheren Hinweis auf die mögliche Substratspezifität gibt.

Für tiefgreifende evolutionäre Untersuchungen der HCSQTs untereinander wäre es wünschenswert, dass alle Enzyme auf RAS-, HST- und HQT-Aktivität getestet werden. Dies ist bis heute nicht der Fall. So wurde beispielsweise für die CcHCT aus *Coffea canephora* lediglich die Hydrolyse von Chlorogensäure nachgewiesen und auf HQT-Aktivität geschlossen (Lepelley et al. 2007). RAS- oder HST-Enzymtests wurden nicht durchgeführt. Dabei sind vor allem die Nebenreaktionen interessant, die Rückschlüsse auf mehr oder weniger entfernte Vorfahren zulassen.

Innerhalb des phylogenetischen Baums mit über 70 BAHD-Acyltransferasen (Abbildung 129) sind fast 30 Hydroxyzimtsäuretransferasen vertreten. Einen Großteil der Hydroxyzimtsäuretransferasen beherbergt Klasse Va, aber auch in anderen Klassen sind sie zu finden. In Klasse I treten Hydroxycinnamoyltransferasen auf, die Flavonoidglycoside verestern. Desweiteren sind die *N*-Hydroxyzimtsäuretransferasen der Klassen IV und Va zu nennen, die (Poly)-Aminderivate bilden, sowie die an der Suberinsynthese beteiligte *O*-Hydroxyzimtsäuretransferase AtHHT1 aus *Arabidopsis thaliana*.

Da *N*-Acyltransferasen im phylogenetischen Stammbaum sehr verstreut auftreten, sieht es so aus, als hätte sich diese Fähigkeit unabhängig voneinander aus *O*-Acyltransferasen entwickelt. So ist die Hydroxyanthranilat-*N*-Hydroxycinnamoyltransferase AsHHT1 aus *Avena sativa* beispielsweise näher verwandt mit *O*-Hydroxyzimtsäuretransferasen der Klasse Va als mit den übrigen *N*-Acyltransferasen. Es sind Enzyme bekannt, die als Hauptreaktion mit großer Effizienz die Bildung von Hydroxyzimtsäureestern katalysieren und in einer Nebenreaktion, viel langsamer, analoge Amidbindungen knüpfen können. Das Auftreten einer solchen Bifunktionalität von *N*- und *O*-Acylierung bei LaRAS, CbRAS und CbHST deutet darauf hin, dass wenige Mutationen ausreichen müssten, um effiziente *N*-Acyltransferaseaktivität zu generieren. Allerdings wurde die Fähigkeit zur Amidbildung bei den meisten biochemisch charakterisierten *O*-Acyltransferasen nicht getestet.

## *Ergebnisse und Diskussion*

### 3.12.7. Struktur der genomischen HCT-Sequenzen aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*

Der Vergleich der Intron-Exon-Struktur von BAHD-Acyltransferase-Genen lässt ebenfalls Rückschlüsse auf die Evolution der betrachteten Gene zu. Bei den Vertretern dieser Superfamilie existiert ein hoch konserviertes Q-Intron (St. Pierre und De Luca 2000), welches 17 Aminosäuren vor dem HxxxD-Motiv hinter einem konservierten Glutamin liegt. Dass trotz enormer Sequenzunterschiede innerhalb der BAHD-Acyltransferasen das Q-Intron in 75% aller Intron-haltigen Gene auftritt, gilt als Zeichen für einen gemeinsamen Vorfahren aller pflanzlicher BAHD-Acyltransferasen. Bislang sind allerdings erst die genomischen Sequenzen von 20 der biochemisch charakterisierten BAHD-Acyltransferasen aus verschiedenen Spezies bekannt, die auch in die phylogenetische Analyse eingegangen sind (siehe Abbildung 129).

Bei einer Untersuchung der Phylogenie und der Genstruktur von putativen BAHD-Acyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Populus trichocarpa* im Vergleich zu den bis dato charakterisierten BAHD-Acyltransferasen konnten Yu et al. (2009) zeigen, dass BAHD-Mitglieder einer Klasse oder einer Subgruppe sehr ähnliche Intron-Exon-Strukturen aufweisen, was die Anzahl der Introns und die Länge der Exons betrifft. Nach phylogenetischer Analyse konnten die BAHD-Acyltransferasen in 6 Klassen unterteilt werden, die mit denen von D'Auria (2006) vergleichbar sind. Dabei fallen vor allem zwei große Klassen auf. In der einen Klasse, zu der auch die HCTs gehören, wurden ein oder zwei Introns mit stark variierender Länge gefunden. In der zweiten großen Klasse sind Flavonoidglycoside-modifizierende Malonyl- und Hydroxycinnamoyltransferasen zusammengefasst, deren Gene meistens keine Introns enthalten.

Von den HCTs mit bekannter Substratspezifität aus Klasse Vb sind die Gene von nur 4 Enzymen bekannt (siehe Abbildung 129). Dazu zählt die an der Ligninbiosynthese beteiligte AtHCT (Hoffmann et al. 2005) und die CbRAS (Berger et al. 2006), bei denen ein typisches Q-Intron gefunden wurde. Ausnahmen von der von Yu et al. (2009) aufgestellten Regel bilden die Gene der *N*-Hydroxymalonyltransferasen HCBT ohne Intron (Yang et al. 1997) und AtSHT mit einem Intron ohne typische Q-Position (Grienberger et al. 2009).

In dieser Arbeit konnten die Genstrukturen von drei weiteren HCTs aufgeklärt werden, die ihren Beitrag zum Verständnis der Evolution der Hydroxymalonyltransferasen leisten können.

Die genomische Sequenz der CbHST konnte durch PCR mit Vollängenprimern aus *Coleus*-gDNA isoliert und anschließend sequenziert werden. Das CbHST-Gen enthält ein 155 bp

## *Ergebnisse und Diskussion*

langes Q-Intron, das nach 408 bp eingefügt ist. Im Vergleich dazu enthält die genomische Sequenz der CbRAS ebenfalls ein Q-Intron, das nach 405 bp beginnt. Das Intron der CbRAS ist mit 914 bp länger als das der CbHST und die Sequenzen variieren deutlich. Geringer Selektionsdruck auf Introns ist eine Erklärungsmöglichkeit für deren Variation in Sequenz und Länge. Die Exons sind mit 1284 bp (CbHST) und 1293 bp (CbRAS) nahezu gleich lang. Insgesamt betrachtet sind die Genstrukturen von CbRAS und CbHST sehr ähnlich, so dass ihre enge evolutionäre Beziehung angenommen werden kann. Möglicherweise stimmt die Theorie von Petersen et al. (2009), nach der RAS und die HST einen gemeinsamen Vorfahren haben und sich v.a. in Hinsicht auf ihre Substratspezifität auseinanderentwickelt haben.

Die genomische Sequenz der GhHST-k aus *Glechoma hederacea* konnte ebenfalls amplifiziert werden. Das GhHST-k-Gen enthält im Gegensatz zum CbHST-Gen kein Intron. Obwohl für die phylogenetischen Gruppe, in der HCTs lokalisiert sind, Gene mit einem Q-Intron typisch sind, wurden von St. Pierre und De Luca (2000) nur in 56% aller untersuchten *Arabidopsis*-Gene nicht-kodierende Sequenzabschnitte gefunden. Drei Gene aus *Populus trichocarpa*, die nach phylogenetischer Analyse von Yu et al. (2009) in dieselbe Subgruppe wie HCTs eingeordnet wurden, sind ebenfalls Intron-frei. Die cDNAs der CbHST und GhHST, deren translatierte Proteine dieselben Enzymreaktionen katalysieren, haben auf Nukleotidsequenzebene eine Identität von 85%, auf Aminosäureebene von 91% und sind in dieselbe phylogenetische Gruppe einzuordnen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch Anwesenheit von Q-Introns evolutionäre Gemeinsamkeiten erkannt werden können, ihre Abwesenheit aber nicht konvergente Evolution bedeutet.

Da die zur Amplifikation des GhHST-Gens verwendeten Vollängenprimer komplementär zur GhHST-k und zur GhHST-l sind, ist die Vervielfältigung beider Gene in einem PCR-Ansatz zu erwarten. Die diskrete Einzelbande auf dem Agarosegel (siehe Abbildung 125) deutet darauf hin, dass das GhHST-l-Gen eine ähnliche Größe besitzt und ebenfalls kein oder ein sehr kurzes Intron aufweisen könnte. Die Sequenzierung weiterer GhHST-Klone müsste hierzu Belege liefern. Eine weitere denkbare Möglichkeit für die Einzelbande ist eine zu kurze Elongationszeit von 2 min bei Vorhandensein eines extrem großen Introns.

Die genomische Sequenz der GhHQT-k konnte erst durch PCR mit Vollängenprimern und verlängerter Elongationszeit erhalten werden. Mit einer Gesamtlänge von 3384 bp enthält sie ein typisches Q-Intron mit 2088 bp, das fast zwei Drittel der Gengröße ausmacht. Die GhHCT-k hat demnach denselben Vorfahren wie die biochemisch charakterisierten HCTs. Zur näheren Beschreibung der evolutionären Beziehung von GhHQT-k und GhHQT-l müsste die Intron-Exon-Struktur beider Gene in weiteren Versuchen miteinander verglichen werden.

## *Ergebnisse und Diskussion*

Anhand des Agarosegels in Abbildung 127 kann vermutet werden, dass beide Gene eine ähnliche Länge besitzen.

Um tiefere Einblicke in die Genstruktur der BAHD-Acyltransferasen aus den verschiedenen Spezies zu erhalten, müssten in Zukunft weitere Gene der Enzyme mit bekannter Funktion analysiert werden.

### 4. Zusammenfassung

Hydroxyzimtsäureester sind bedeutende sekundäre Inhaltsstoffe der Lamiaceae. Neben Hydroxycinnamoylshikimat und -chinat, die im Pflanzenreich nahezu ubiquitär verbreitet sind, ist Rosmarinsäure hauptsächlich in den Boraginaceae und der Unterfamilie Nepetoideae der Lamiaceae zu finden (Petersen et al. 2009). Die Biosynthesewege, die zur Bildung dieser Phenylpropanderivate führen, sind aufgrund eingehender molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen weitgehend verstanden (Petersen et al. 1993, Hoffmann et al. 2004, Niggeweg et al. 2004). Die Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs), die an der Biosynthese dieser Ester beteiligt sind, gehören zur Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen und übertragen Hydroxyzimtsäurereste von Hydroxycinnamoyl-CoA-Derivaten auf verschiedene Akzeptoren (HST: Shikimat, HQT: Chinat, RAS: Hydroxyphenyllactat). Dabei sind sie in der Regel sehr spezifisch für ihre Substrate.

Mit der Klonierung einer cDNA aus *Coleus blumei*, die für eine Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyl-transferase (CbRAS) codiert, gelang es Berger et al. (2006) erstmals, das Gen des charakteristischen Enzyms der Rosmarinsäurebiosynthese zu isolieren. Aus derselben Pflanzenart konnte in dieser Dissertation die cDNA, die für eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (CbHST) codiert, isoliert werden. Beide Proteine wurden in *E. coli* heterolog exprimiert und die Substratspezifitäten untersucht. Beide HCTs besitzen eine breitere Substratspezifität als erwartet und können interessanterweise neben Estern auch Amide bilden. Die CbHST überträgt CoA-aktivierte Zimtsäuren (*p*-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA, Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA) mit abnehmender Effizienz auf Shikimat, nicht aber auf Chinat oder die Akzeptorsubstrate der CbRAS. Mit 3-Hydroxyanthranilsäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Aminobenzoesäure wurde ebenfalls eine Produktbildung beobachtet. Die CbRAS überträgt dieselben CoA-aktivierten Zimtsäuren (außer Sinapoyl-CoA) auf D-(Hydroxy-)phenyllactat-Derivate (D-*p*-Hydroxyphenyllactat, D-Dihydroxyphenyllactat, D-Phenyllactat), nicht aber auf Chinat oder Shikimat. Die D-Aminosäuren D-Phenylalanin, D-Tyrosin und D-DOPA sind ebenfalls Substrate der CbRAS. Die  $K_m$ -Werte für ein spezifisches Substrat waren immer abhängig von dem zweiten, konstant gehaltenen Substrat. Dies ist ein Hinweis für die Plastizität der aktiven Zentren (induced fit). Die Koexistenz beider Enzyme in einer Pflanzenart, die ausgeprägte Substratspezifität und der Vergleich der enzymkinetischen Parameter führt zu dem Ergebnis, dass es sich bei der CbHST und der CbRAS um spezifische Enzyme der Monolignolbiosynthese (CbHST) und der Rosmarinsäuresynthese (CbRAS) handelt, deren bevorzugtes Donorsubstrat das aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel stammende *p*-Cumaroyl-CoA ist.

## Zusammenfassung

Zur Identifizierung von funktionell und/oder strukturell wichtigen Aminosäuren wurden gezielt die CbRAS-Mutanten H152A, D156A, D377A, R285A, W380L und L136P generiert. Die Einzelmutationen in diesen konservierten Bereichen führten zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität (Restaktivität unter 1%). Vermutlich ist das Histidin<sup>152</sup> des <sup>152</sup>HxxxD<sup>156</sup>-Motivs die katalytische Base. Es wurden zwei verschiedene Aufreinigungsverfahren entwickelt, mit deren Hilfe die CbRAS im zweistelligen mg-Bereich bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden konnte. In ersten Kristallisationsversuchen wuchsen erste kleine Kristalle, bei denen es sich wahrscheinlich um CbRAS-Proteinkristalle handelt.

*Glechoma hederacea* produziert Rosmarinsäure und Chlorogensäure nebeneinander (Petersen et al. 2009). Daher ist sie für die Untersuchung aller drei Biosynthesewege geeignet. Durch Nukleotidsequenzvergleich von bekannten RAS, HST und HQT wurden degenerierte Primer abgeleitet, die unter Verwendung der RACE-PCR-Technik zur selektiven Amplifikation von sechs cDNA-Klonen führten. Die translatierten Proteinsequenzen weisen die für BAHD-Acyltransferasen typischen konservierten Motive HxxxD und DFGWG auf. Drei Enzyme konnten funktionell in *E. coli* exprimiert werden: GhRAS-I ist eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase, die spezifisch *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA auf *p*-Hydroxyphenyllactat und Dihydroxyphenyllactat, nicht aber auf Shikimat oder Chinat überträgt. Die GhHST-k und die GhHST-I übertragen die beiden CoA-aktivierten Säuren selektiv auf Shikimat, nicht aber auf pHPL, DHPL oder Chinat. Die GhRAS-k mit 91% Sequenzidentität zur aktiven GhRAS-I war in Enzymtests nicht aktiv. Ein Pseudogen wird vermutet. Die putative GhHQT-k und die putative GhHQT-I weisen die höchste Aminosequenzähnlichkeit (50 % und 45 %) zur HQT aus *Cynara cardunculus* (Comino et al. 2007) auf. Sie waren in Enzymtests jedoch nicht aktiv. Daher bleibt fraglich, ob es sich um Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen oder um Enzyme mit bislang unbekannter Enzymaktivität handelt.

Die treibende Kraft für die Entstehung neuer Sekundärstoffwechselgene ist die Genverdopplung mit anschließender Diversifikation (Ober 2005). Von den BAHD-Acyltransferasen wird vermutet, dass sie aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind (St. Pierre und De Luca 2000). Nach heutiger Vorstellung mussten für die Rosmarinsäurebiosynthese nur wenige neue Enzymaktivitäten entstehen. Dazu zählen die Hydroxycinnamoyltransferaseaktivität und die *meta*-Hydroxylaseaktivitäten, die sich möglicherweise aus den Genen für die Bildung von Chlorogensäure und Caffeoylshikimisäure entwickelt haben (Petersen et al. 2009). Die Verwandtschaftsverhältnisse der isolierten RAS-, HST- und putativen HQT-Sequenzen aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea* zu bekannten BAHD-Acyltransferasen zeigt die enge evolutionäre Beziehung der HCTs zueinander und gibt einen Hinweis, dass RAS, HST und HQT möglicherweise durch Genverdopplung und Diversifikation auseinander hervorgegangen sind.

## 5. Anhang

### 5.1. Abkürzungen

<b>% (v/v)</b>	Volumenprozent
<b>% (m/v)</b>	Gewichtsprozent
<b>A</b>	Absorption
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumperoxydisulfat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA (complementary DNA)
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>Da</b>	Dalton
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP</b>	desoxy-Nukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunden (hours)
<b>HPLC</b>	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
<b>kat</b>	Katal
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis-Menten-Konstante
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	molar (g/mol)

## Anhang

<b>MCS</b>	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
<b>min</b>	Minute
<b>M<sub>r</sub></b>	relative Molekülmasse
<b>mRNA</b>	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
<b>NMR</b>	Kernresonanzspektroskopie
<b>OD<sub>600</sub></b>	optische Dichte bei 600 nm
<b>ORF</b>	offenes Leseraster (open reading frame)
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>RACE</b>	Verlängerung von cDNA-Enden (rapid amplification of cDNA ends)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecylsulfate)
<b>TBE</b>	Tris Borat EDTA-Puffer
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Cb</b>	<i>Coleus blumei</i>
<b>Gh</b>	<i>Glechoma hederacea</i>
<b>DC</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>FPLC</b>	Schnelle Protein Flüssigkeits Chromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography)
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>LB</b>	engl. lysogeny broth
<b>ml</b>	Milliliter
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>mM, µM</b>	Millimolar, mikromolar



## Anhang

<b>n. d.</b>	(Reaktionsprodukt) nicht detektierbar
<b>nmol</b>	nanomol
<b>KP<sub>i</sub></b>	Kaliumphosphatpuffer
<b>s</b>	Sekunde(n)
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>V</b>	Volt
<b>U</b>	Enzymaktivität (Unit), $\mu\text{mol}$ Substratumsatz/min
<b>Kana</b>	Kanamycin
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (Phosphat)

### 5.2. Aminosäuren

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F

## Anhang

Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

### 5.3. Nukleobasen

Nukleobase	Abkürzung
Adenin	A
Guanin	G
Cytosin	C
Thymin	T
Uracil	U

### 5.4. IUPAC-standardisierte Symbole für unspezifische Nukleobasen (zwei oder mehr Nukleobasen können alternativ eingesetzt werden)

Alternative Nukleobasen	Symbol
A oder G	R
C oder T	Y
A oder T	W
G oder C	S
A oder C	M
G oder T	K
A,C, oder T (U)	H

## Anhang

G, C, oder T (U)	B
G, A, oder C	V
G,A, oder T (U)	D
G,A, C, oder T (U)	N

### 5.5. Verwendete Substrate in den HCT-Enzymtests

Abkürzung	Substrat
Cin-CoA	Cinnamoyl-CoA
pC-CoA	<i>p</i> -Cumaroyl-CoA
Caf-CoA	Caffeoyl-CoA
Fer-CoA	Feruloyl-CoA
Sin-CoA	Sinapoyl-CoA
Acet-CoA	Acetyl-CoA
Mal-CoA	Malonyl-CoA
Benz-CoA	Benzoyl-CoA
Anth-CoA	Anthraniloyl-CoA
pHPL	<i>p</i> -Hydroxyphenyllactat/ <i>p</i> -Hydroxyphenylmilchsäure
DHPL	3,4-Dihydroxyphenyllactat/3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure
Shik	Shikimat/Shikimisäure
Chin	Chinat/Chinasäure
3-OHAnth	3-Hydroxyanthranilsäure
3OHB	3-Hydroxybenzoesäure
2,3DiOHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
3AB	3-Aminobenzoesäure
PL	Phenyllactat/Phenylmilchsäure
PA	Phenylalanin

## Anhang

Tyr	Tyrosin
DOPA	DOPA
Anth	Anthranilat/Anthranilsäure
Tyra	Tyramin
Trypt	Tryptamin
Sero	Serotonin
Dop	Dopamin
2-Pheneth	2-Phenylethylamin
OHPE	2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol
OHPP	3-(4-Hydroxyphenyl)propanol
Ph	Phenol

Zur Bezeichnung der erwarteten Produkte aus den HCT-Enzymtests wurden die Abkürzungen der CoA-aktivierten Säuren und der Akzeptoren kombiniert.

### 5.6. Abkürzungen von Enzymen und Intermediaten in Stoffwechselwegen

<b>HCTs</b>	Hydroxycinnamoyltransferasen
<b>RAS</b>	Rosmarinsäuresynthase, Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase
<b>HQT</b>	Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase
<b>HST</b>	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase
<b>HCSQT</b>	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase

## **5.7. Verbrauchsmaterialien und Geräte**

### 5.7.1. Chemikalien

(N)-Lauroyl-Sarcosin, Na-Salz	Sigma
1,4-Dithiothreitol	Serva
Zimtsäure	Duchefa
Aceton	Roth
Acrylamid: rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose NEEO, Ultra Qualität	Roth
Ammoniak 25%	Riedel-de-Haen
Ampicillin, Na-Salz	Roth
APS	Merck
L-(+)-Ascorbinsäure	Roth
Chloroform	Roth
Chlorogensäure (Hemihydrat)	Fluka
Coenzym A, Trilithium-Salz	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka
Ethidiumbromid-Lösung 1%	AppliChem
Methanol	Fisher Scientific
Natriumdihydrogenphosphat	Duchefa
Coomassie® Brillant Blue R250	Fluka
Rosmarinsäure	Sammlung des Instituts
(Hydroxy-)zimtsäure Succinimidester	Sammlung des Instituts

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Roth, Sigma und Merck in in den Qualitäten p.a. oder reinst bezogen. Für sämtliche Arbeiten wurde das demineralisierte Wasser der hauseigenen Herstellung verwendet. Für molekularbiologische Arbeiten wurde das Wasser zusätzlich autoklaviert.

## Anhang

### 5.7.2. Enzyme

Restriktionsendonukleasen:	Fermentas
RNaseA	Fermentas
Rhozyme HP 150	Pollok and Pool Limited
Thrombin (from bovine plasma)	Merck
CIAP	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas

### 5.7.3. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

GeneRacer™ Core Cit	Invitrogen
GeneRacer™ SuperScript III RT Module	Invitrogen
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel
pET-15b	Novagen
pET-41a	Novagen
pGEM®-T-Vector System I	Promega
pGEM®-4Z	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
Roti®-Transform	Roth
Thrombin CleanCleave™ Kit	Sigma
QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
dNTP-Mix	Fermentas
Roti®-Mark	Roth
Roti®-Mark 10-150 PLUS	Roth

## Anhang

### 5.7.4. Geräte

Autoklav	Systec VX-150 Advantage –Lab AL02-02-100	Systec GmbH Labor-Systemtechnik
Bakterienschüttler	-	Gallenkamp
Gefriertrockner	Christ L1	B.Braun Biotech.
Geldokumentationssystem	Quick Store „plus“	RS-Laborgeräte
HPLC	SpectroMonitor® 3200	LDC Analytical
	L-6000 Pump	Merck-Hitachi
	D-2500 Chromato-Integrator	Merck-Hitachi
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instr.
PCR-Cycler	RoboCycler® Gradient 96	Stratagene
pH-Meter	Accumed Basic	Fisher Scientific
Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf
	UVIKON Spectrophotometer 930	Kontron Instruments
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 120	Büchi
Speed Vac	UNIVAPO 100 H	UniEquip
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin
Ultraschallprozessor	UP200s	Dr. Hielscher GmbH
UV-Handlampe	HL-6-KM	Bachofer GmbH
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	PT 310	Sartorius
	Analysenwaage EG 300-3M	Kern
	Analysenwaage H64	Mettler
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Sigma 3K30	B.Braun Biotech. International
	Biofuge 17RS	Heraeus Sepatech

## Anhang

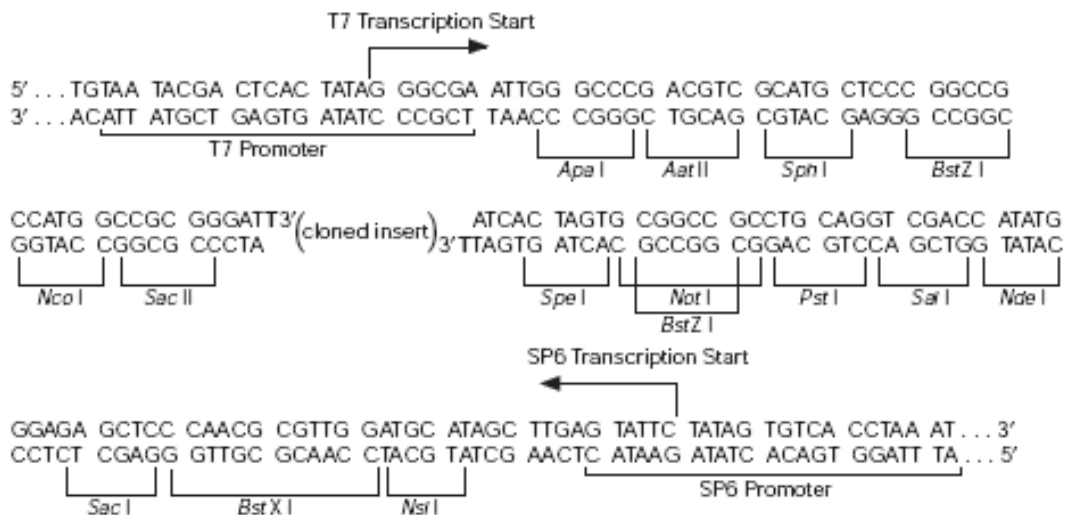
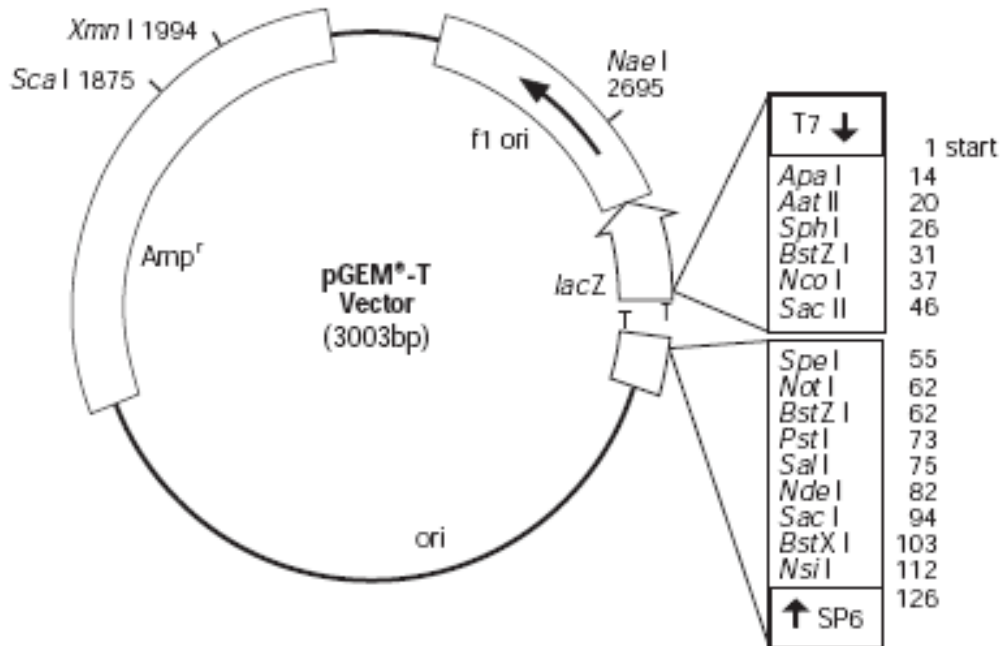
Proteinreinigung	Waters 650 Advanced Protein Purification System	Millipore
	Waters 600 Multisolvent Delivery System	
	Waters 484 Tunable Absorbance Detector	
Wasseraufbereitung	Milli-RX 20	Millipore
Sterilbank	Gelaire Laminar Air Flow Class 100	Gelman Instrument
Brutschrank		Jonau
Dialysierschlauch	ZelluTrans	Roth
Elektroporator	MicroPulser™	Bio-Rad
Elektroporationsküvette	Electroporation Cuvettes 1 mm	Eppendorf
Elektrophoresesystem für SDS-PAGE	PerfectBlue™ Twin	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Sterilfiltration	Rotilabo® Spritzenfilter steril	Roth
PD10 Säulen	PD10 colums	GE Healthcare
DC-Platten	TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub>	Merck
	TLC Cellulose F	
Säulenmaterial	His-Select® HF Nickel Affinity Gel	Sigma
	Fractogel® TSK AF-Blue	Merck
	Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare
Gefriertrockner	Christ L1	B. Braun Biotech

Die Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße oder Petrischalen wurden von der Firma Greiner verwendet.



## 5.8. Vektorkarten

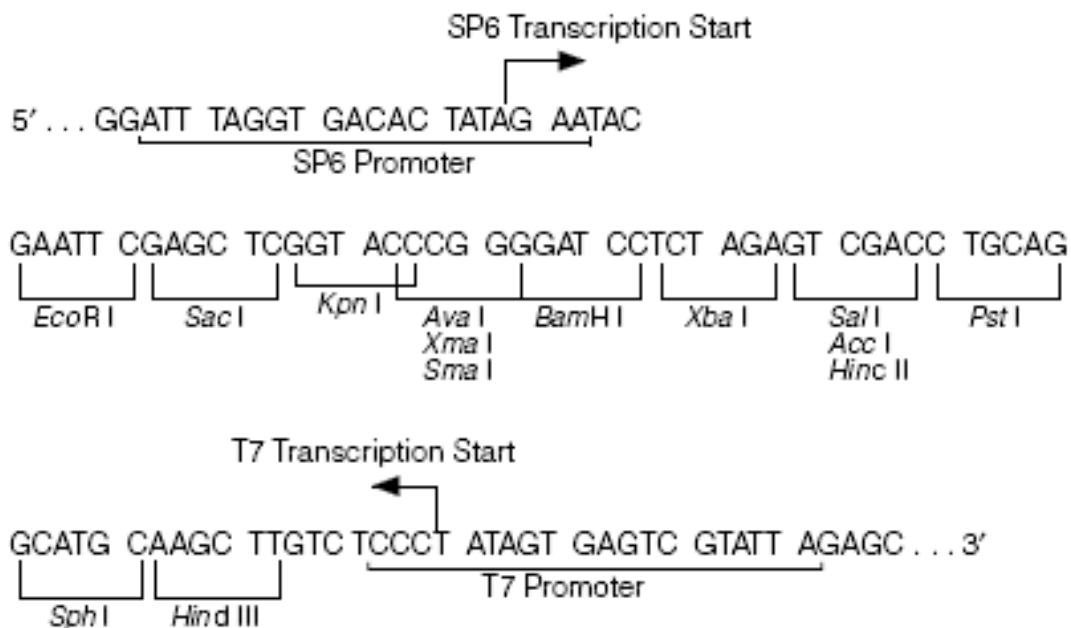
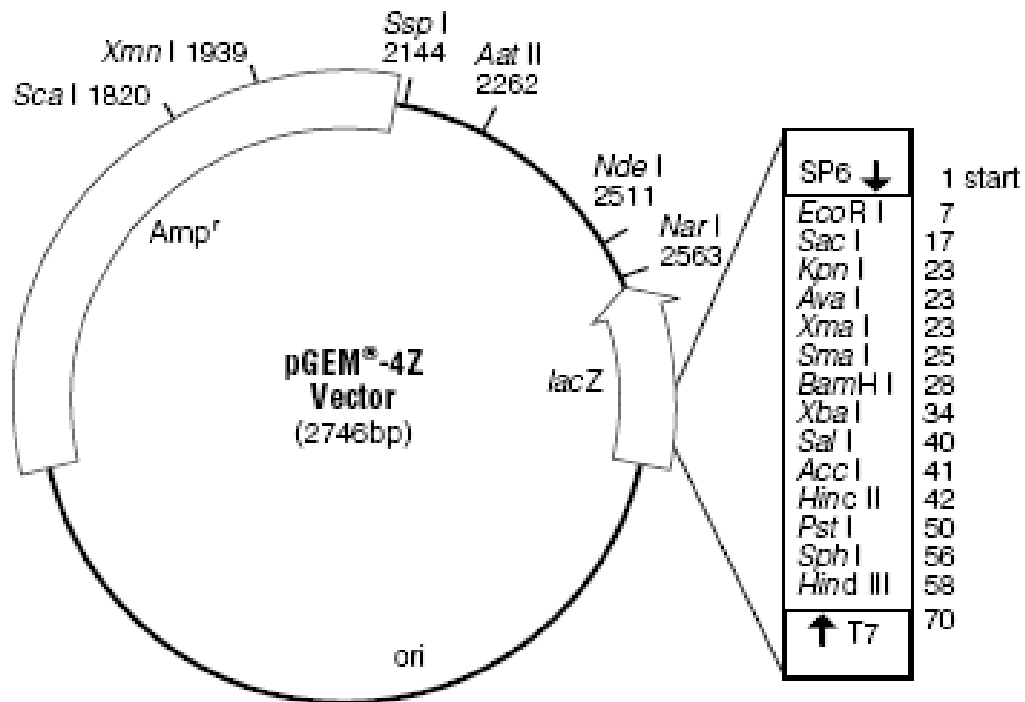
### 5.8.1. pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor



**Abbildung 130:** Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T und seine Multiple Cloning Site

# Anhang

## 5.8.2. pGEM<sup>®</sup>-4Z-Vektor



**Abbildung 131:** Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-4Z und seine Multiple Cloning Site

5.8.3. pET-15b-Vektor

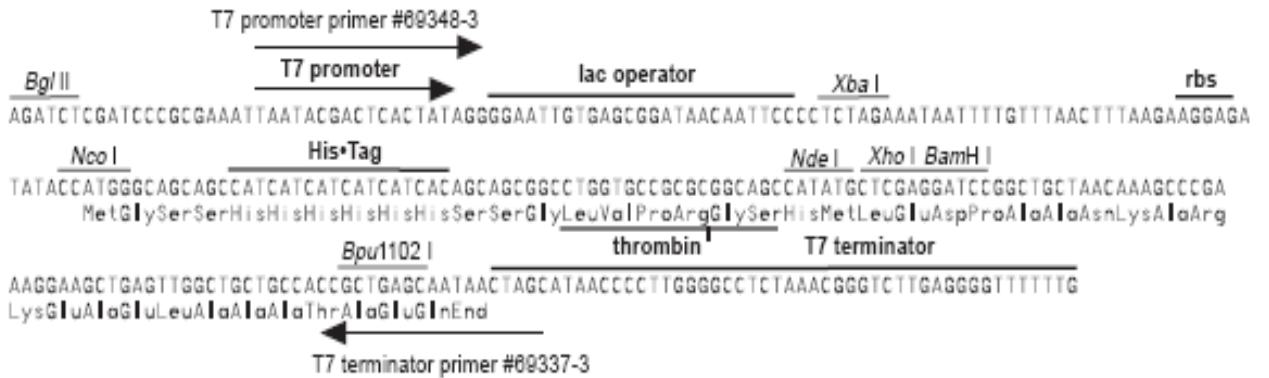
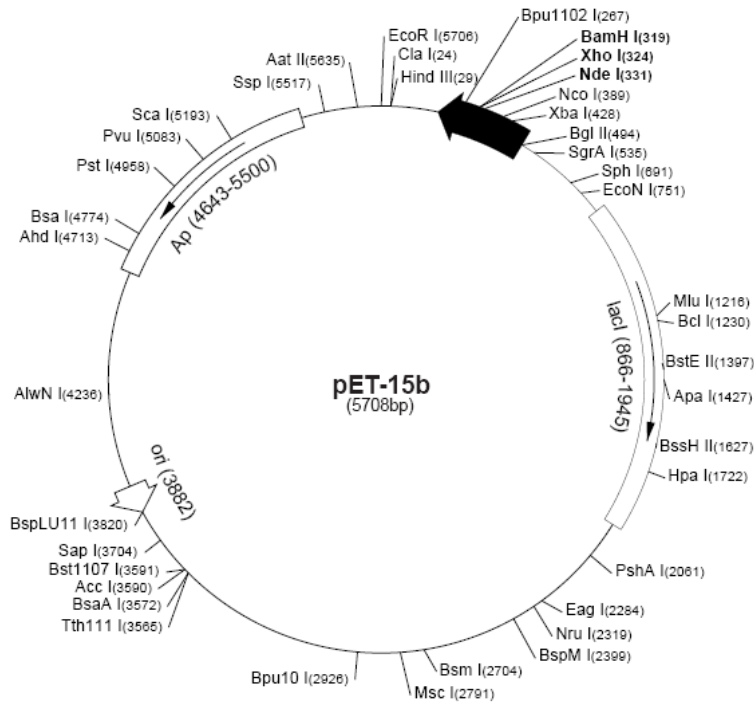


Abbildung 132: Expressionsvektor pET-15b und seine Multiple Cloning Site

5.8.4. pET-41a-Vektor

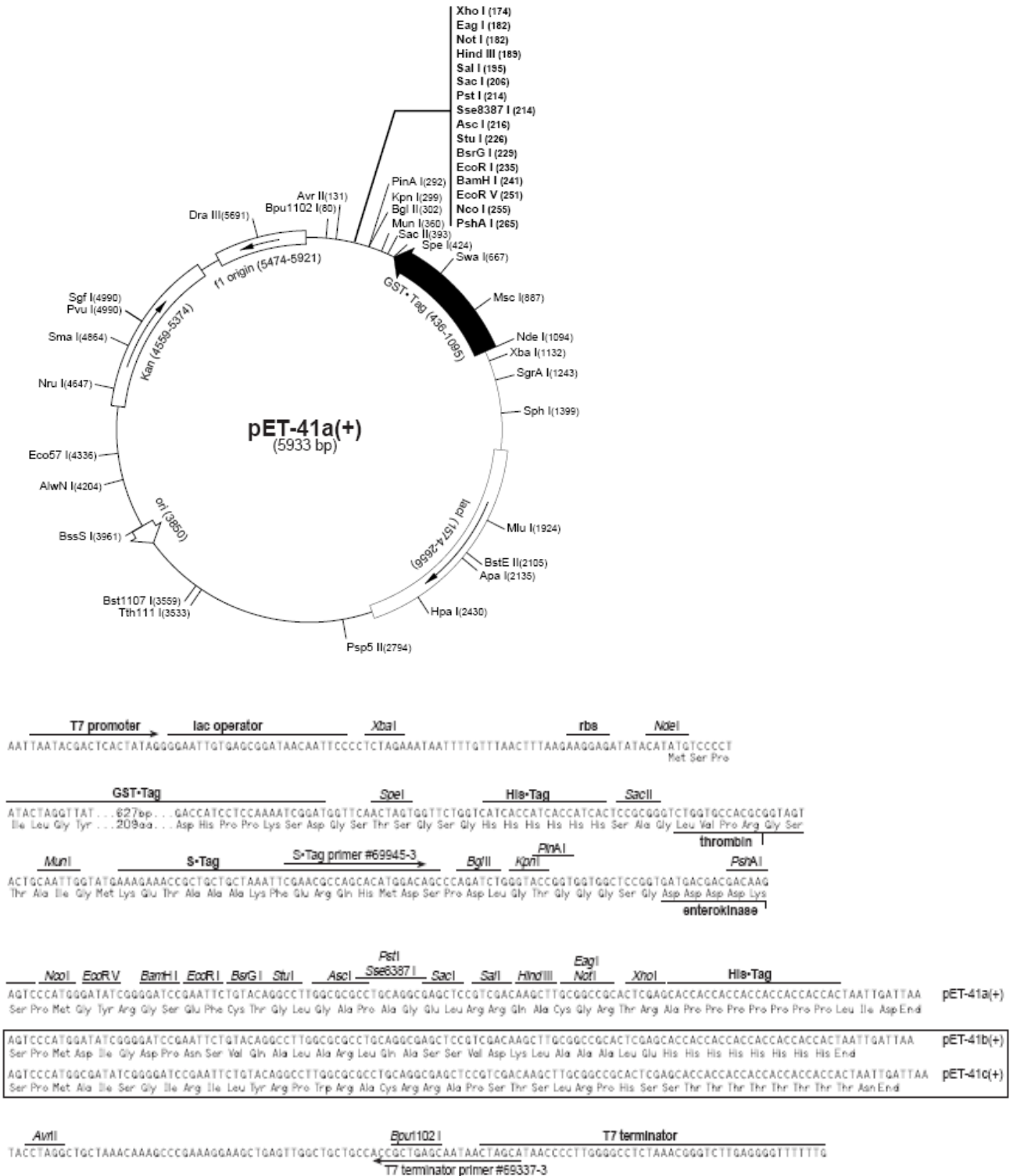
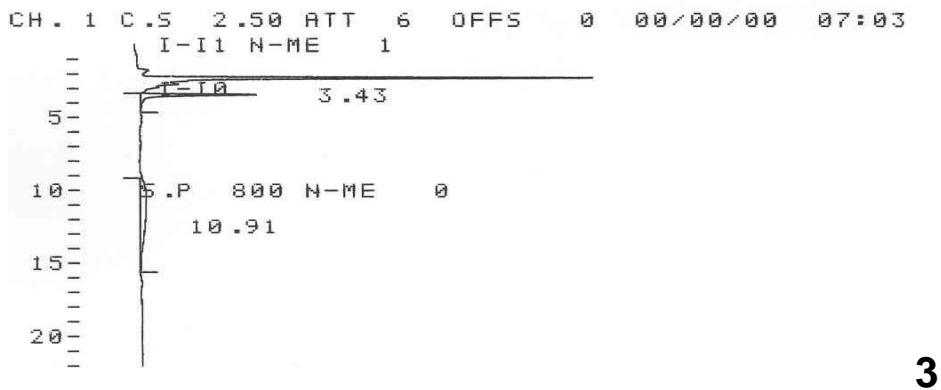
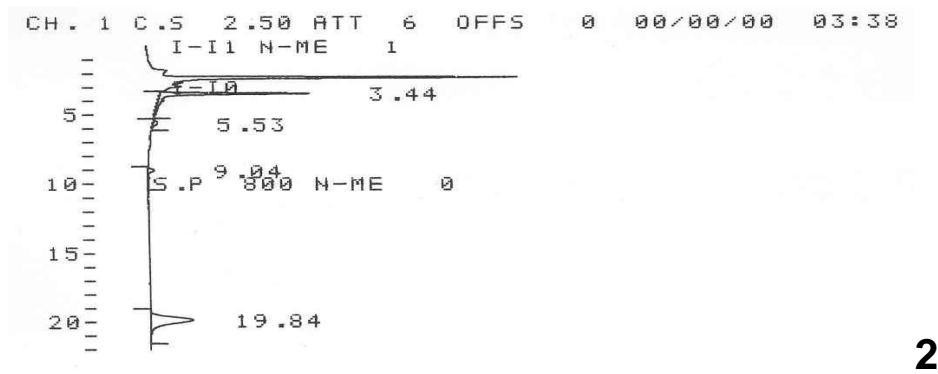
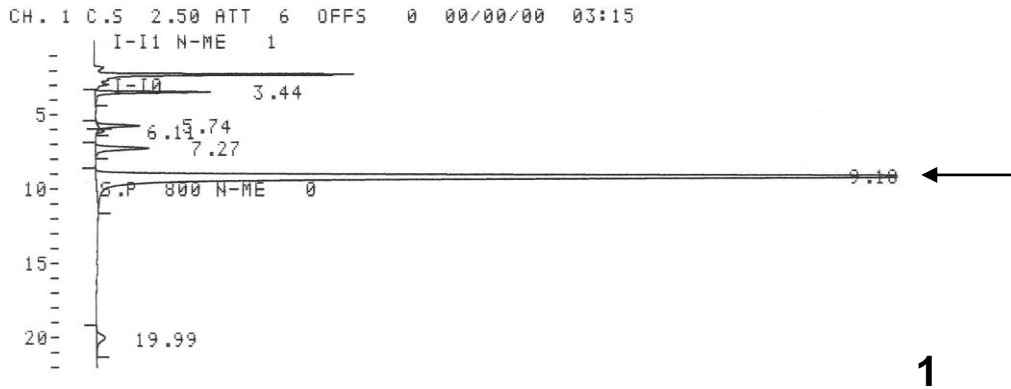


Abbildung 133: Expressionsvektor pET-41a und seine Multiple Cloning Site

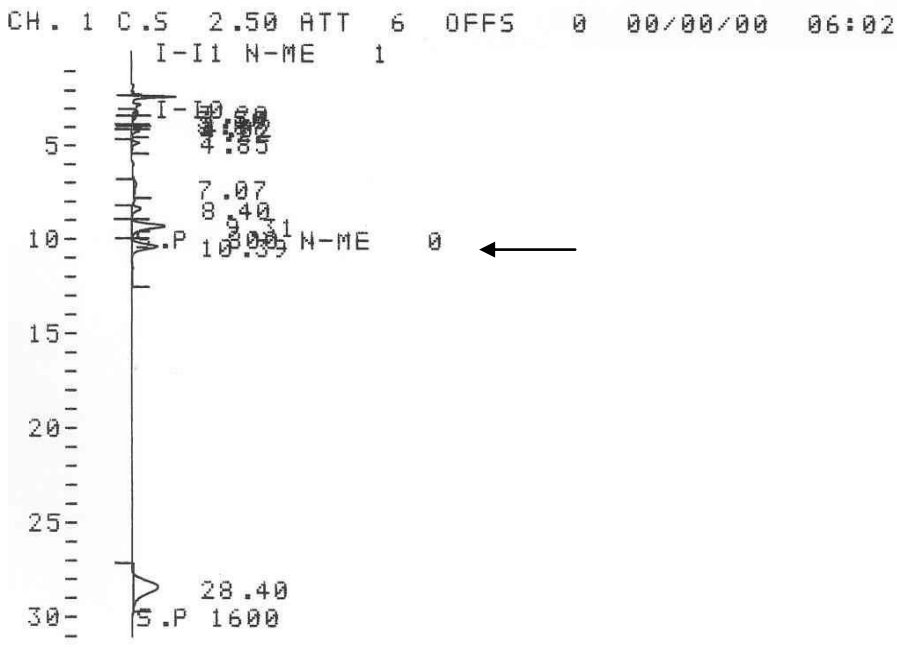
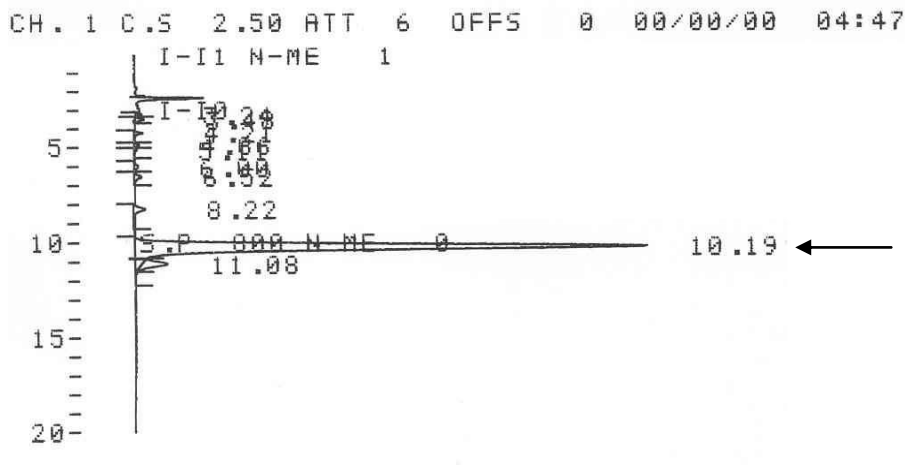
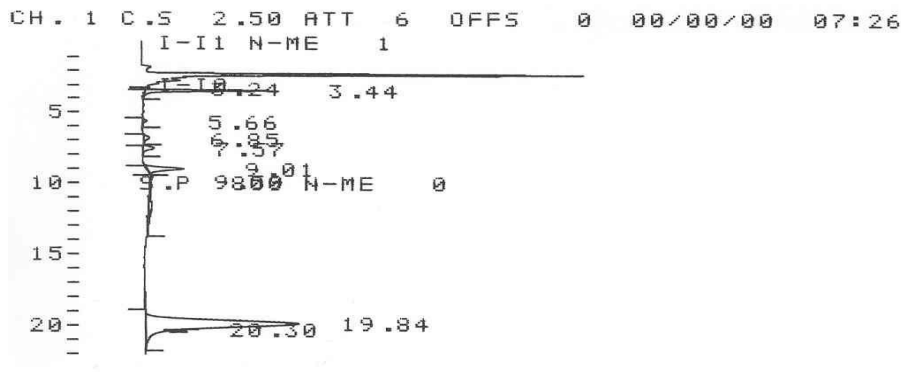
# Anhang

## 5.9. HPLC-Analyse

Die Analysebedingungen der nachfolgenden Chromatogramme sind Tabelle 18 zu entnehmen.



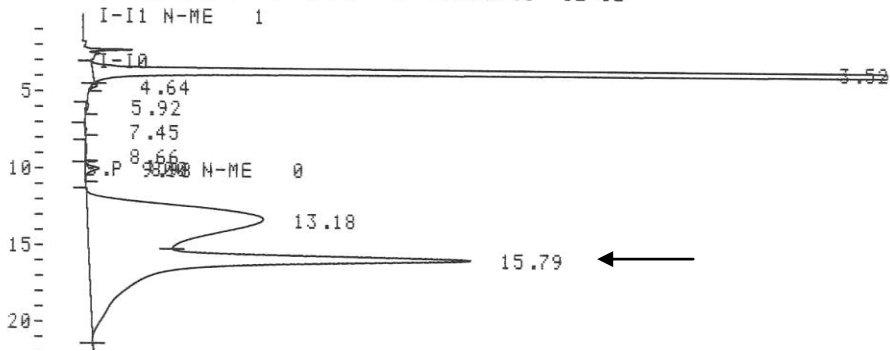
# Anhang



**Abbildung 134:** HPLC-Chromatogramme der CbHST-Enzymtests „Cin-CoA/Fer-CoA/Sin-CoA plus Shikimat“. 1: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und Shikimat, 2/3/4: Enzymtests ohne Enzym/ohne CoA-aktivierte Säure/ohne Shikimat, 5: Standardpipettierschema mit Fer-CoA und Shikimat, 6: Standardpipettierschema mit Sinapoyl-CoA und und Shikimat. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

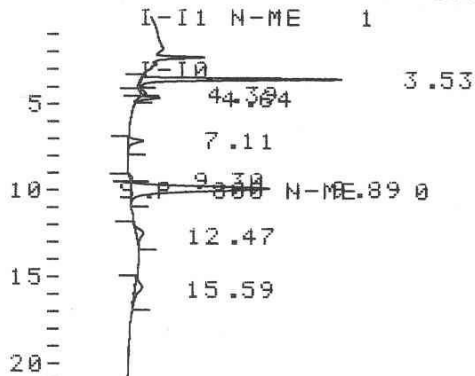
# Anhang

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:12



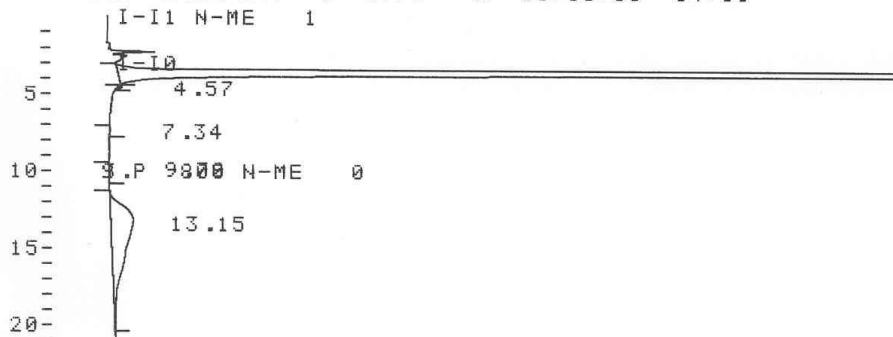
7

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:38



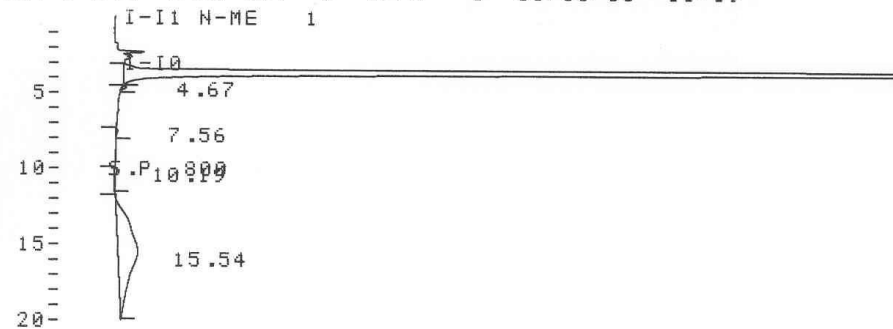
8

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 04:05



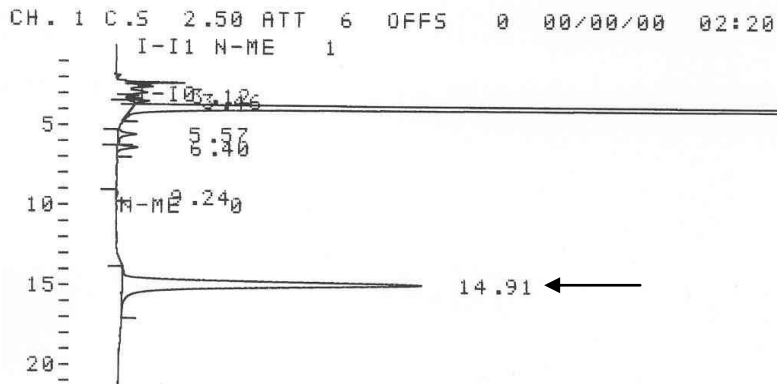
9

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 11:59

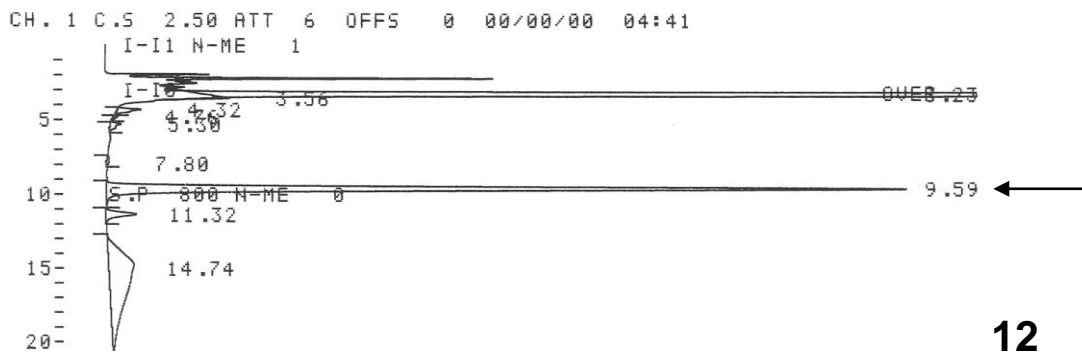


10

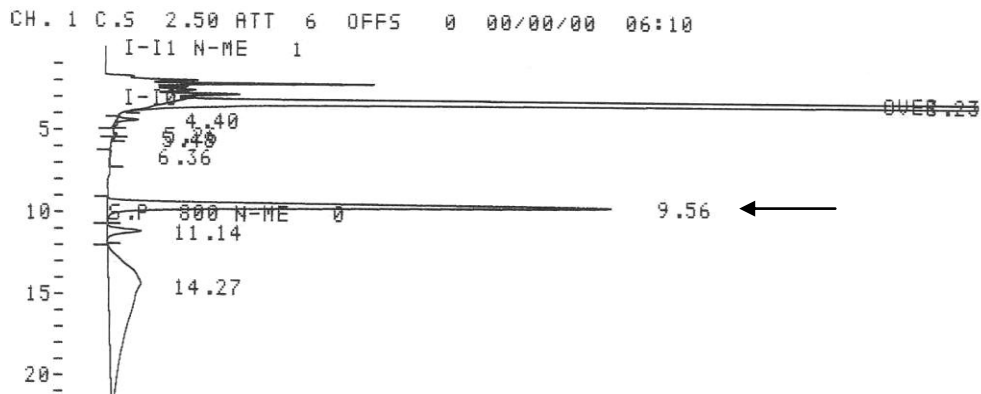
## Anhang



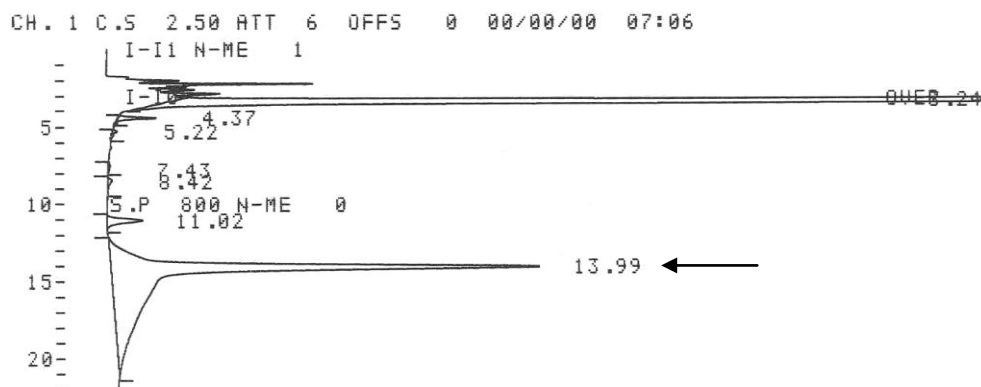
11



12



13

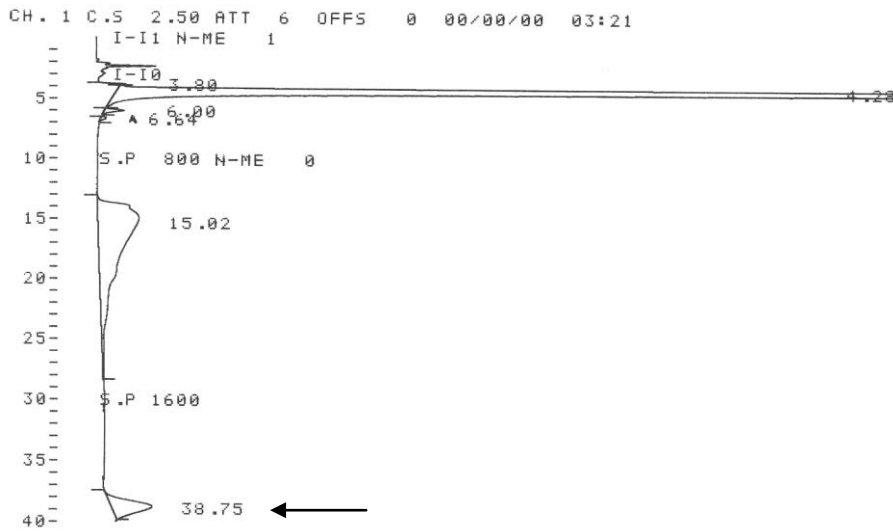


14

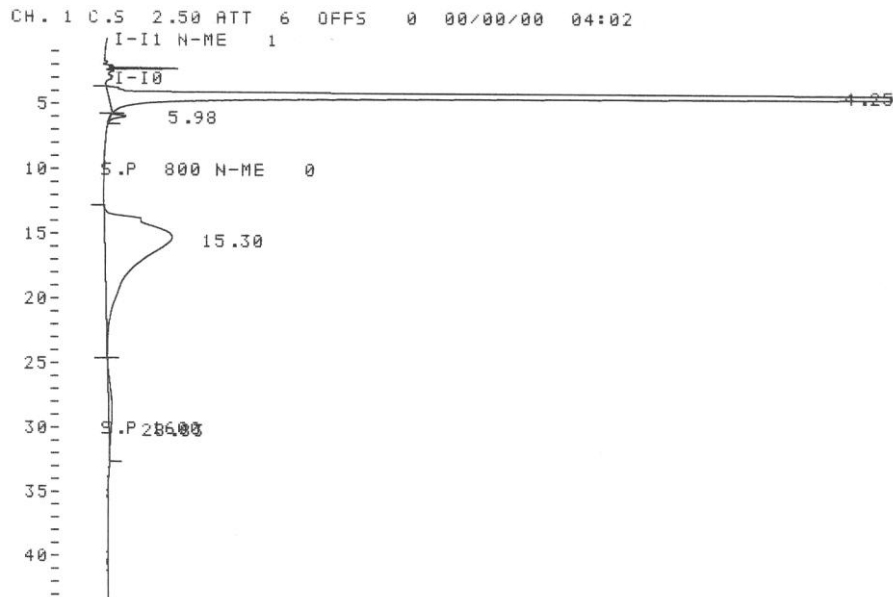
**Abbildung 135:** HPLC-Chromatogramme der CbHST-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA/Fer-CoA/Sin-CoA plus 3-Hydroxyanthranilsäure“. 7: Standardpipettierschema mit pC-CoA und 3OHAnth, 8/9/10: Enzymtests ohne 3OHAnth/ohne CoA-aktivierte Säure/ohne Enzym, 11: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und 3OHAnth, 12: Standardpipettierschema mit Feruloyl-CoA und 3OHAnth, 13: Standardpipettierschema mit Sinapoyl-CoA und 3OHAnth, 14: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und 3OHAnth. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



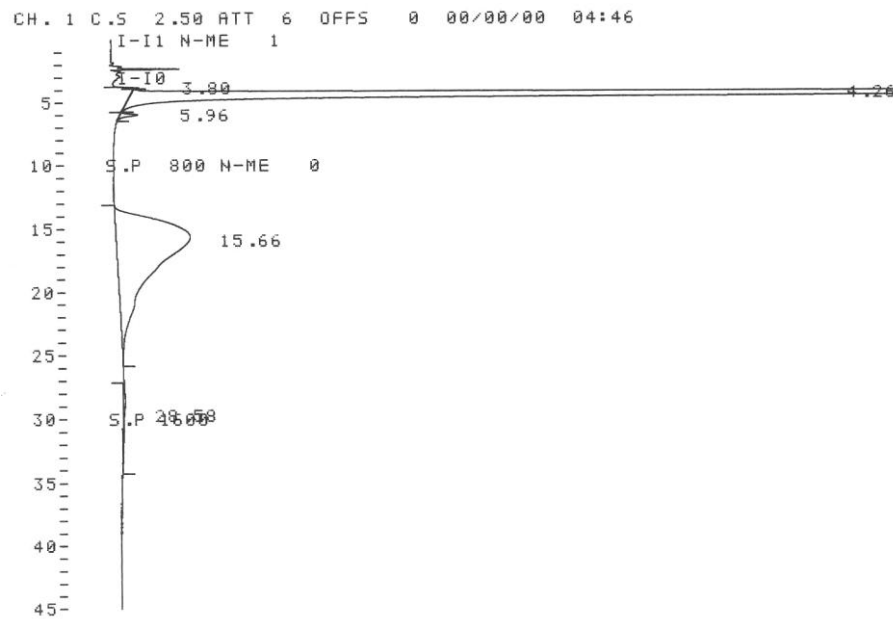
# Anhang



15

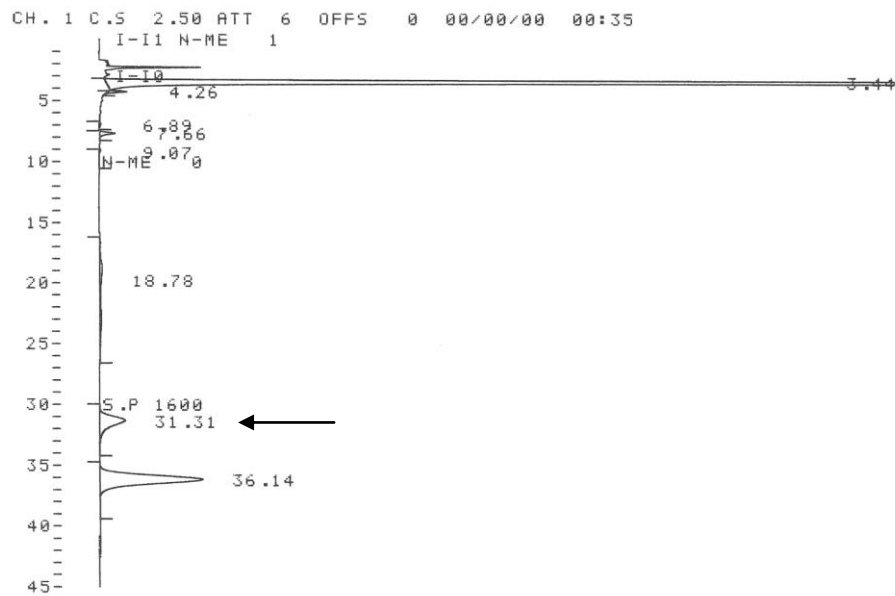
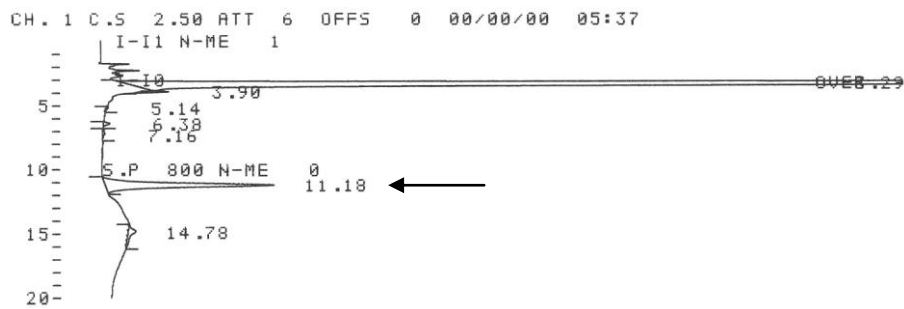
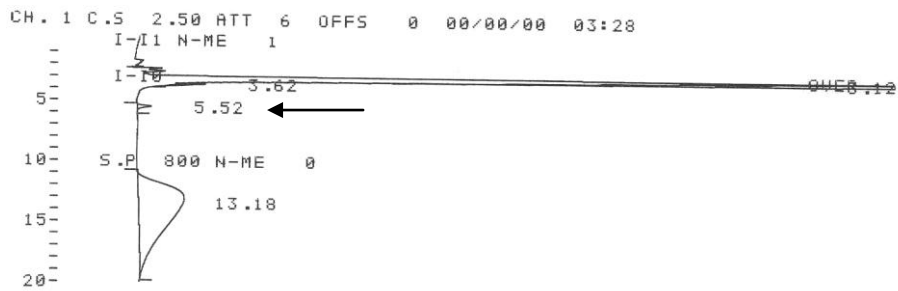


16



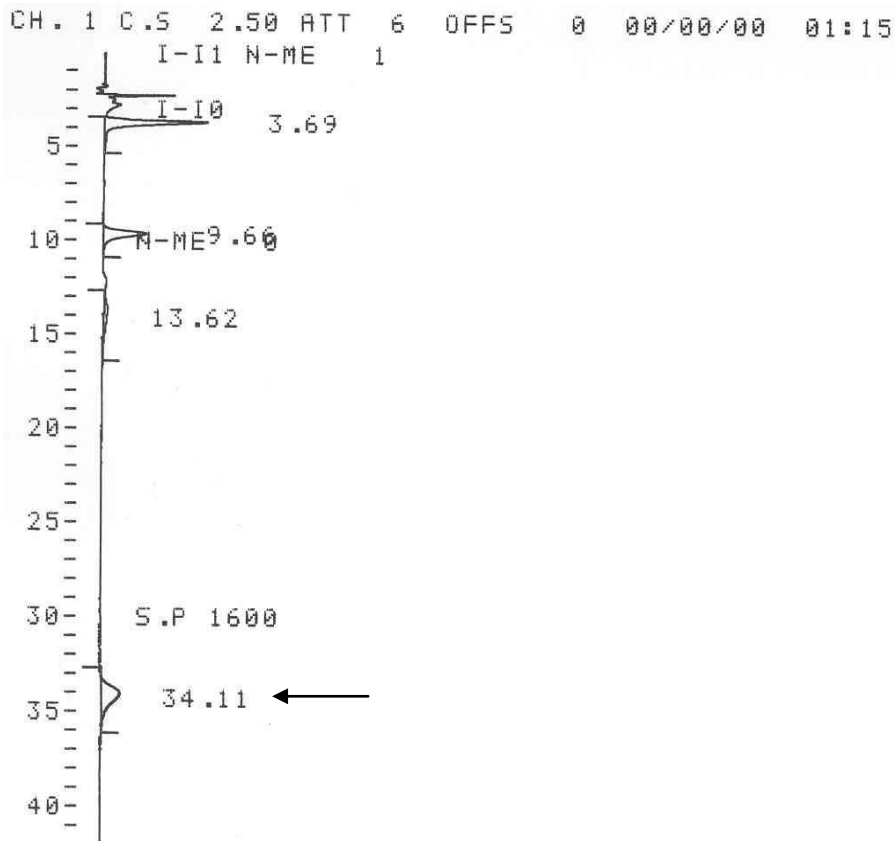
17

## Anhang

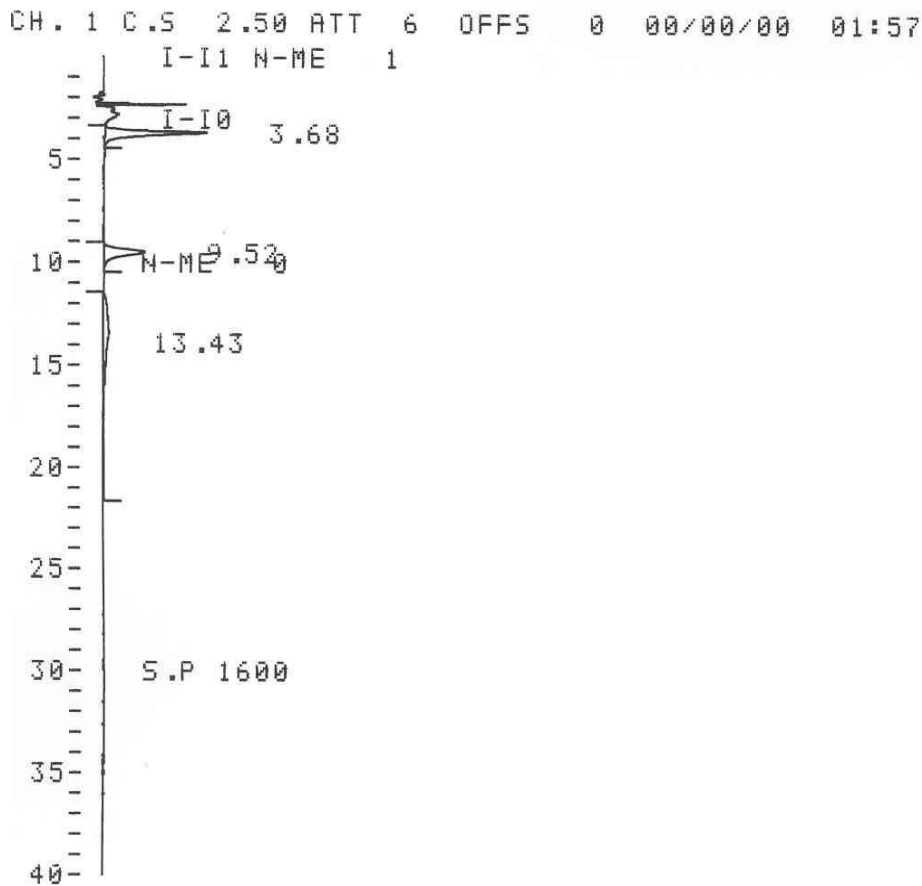


**Abbildung 136:** HPLC-Chromatogramme der CbHST-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA/Fer-CoA plus 2,3-Dihydroxybenzoesäure“. 15: Standardpipettierschema mit pC-CoA und 2,3DiOHB, 16/17: Enzymtests ohne Enzym/ohne pC-CoA, 18: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und 2,3DiOHB, 19: Standardpipettierschema mit Feruloyl-CoA und 2,3DiOHB, 20: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und 2,3DiOHB. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

Anhang

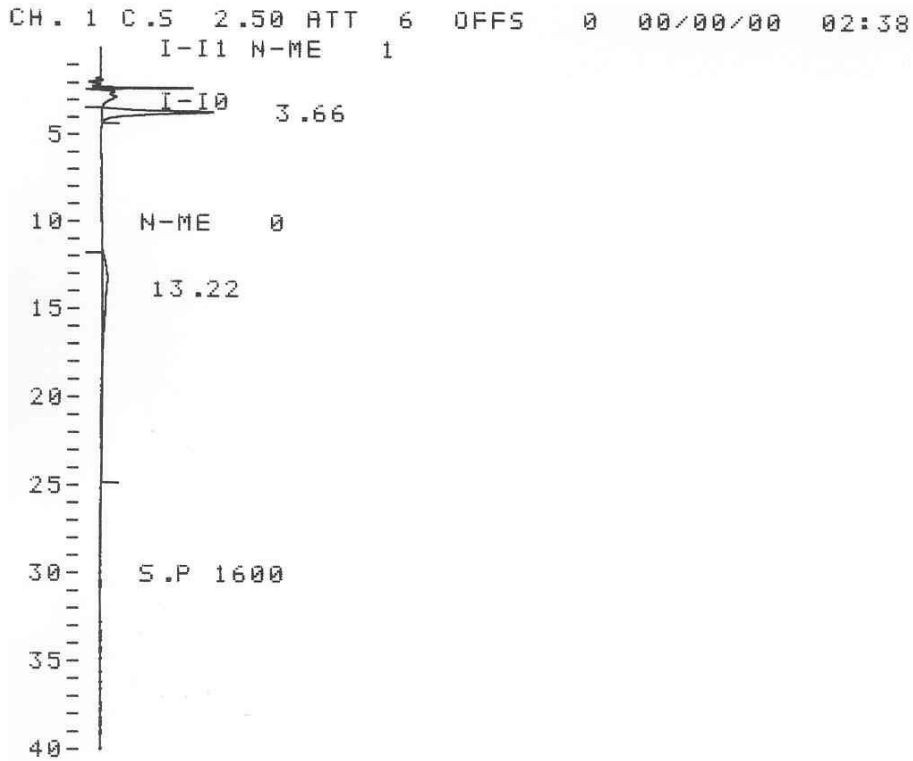


21

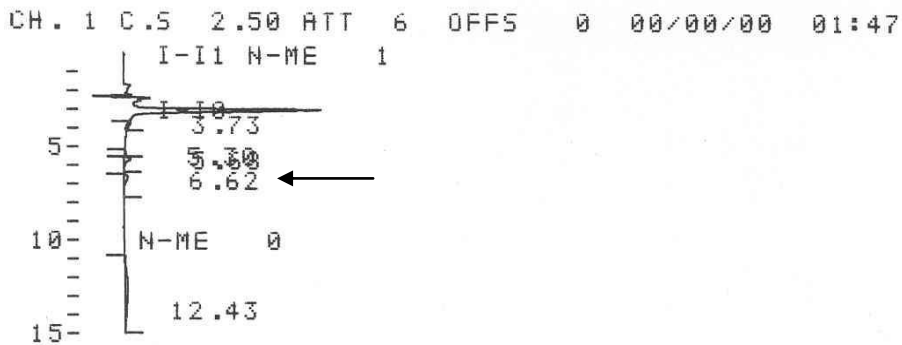


22

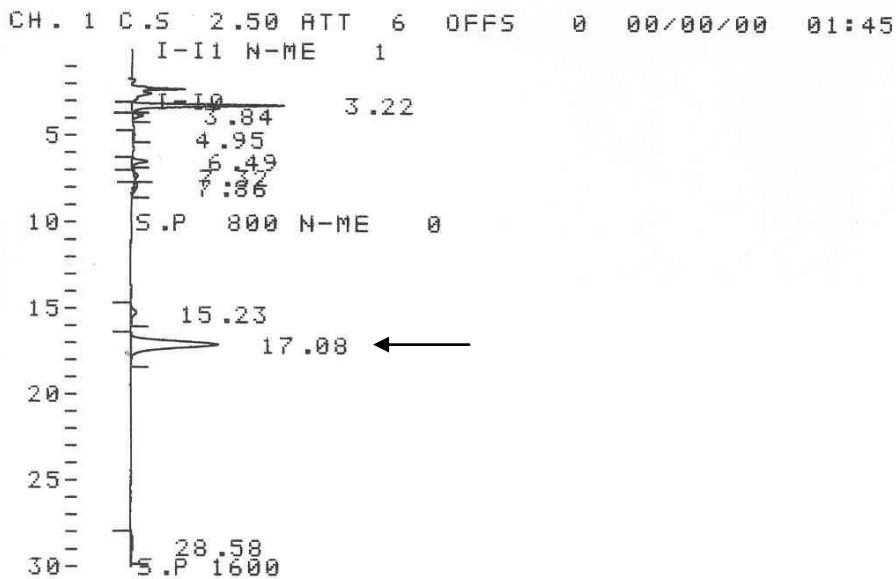
# Anhang



23

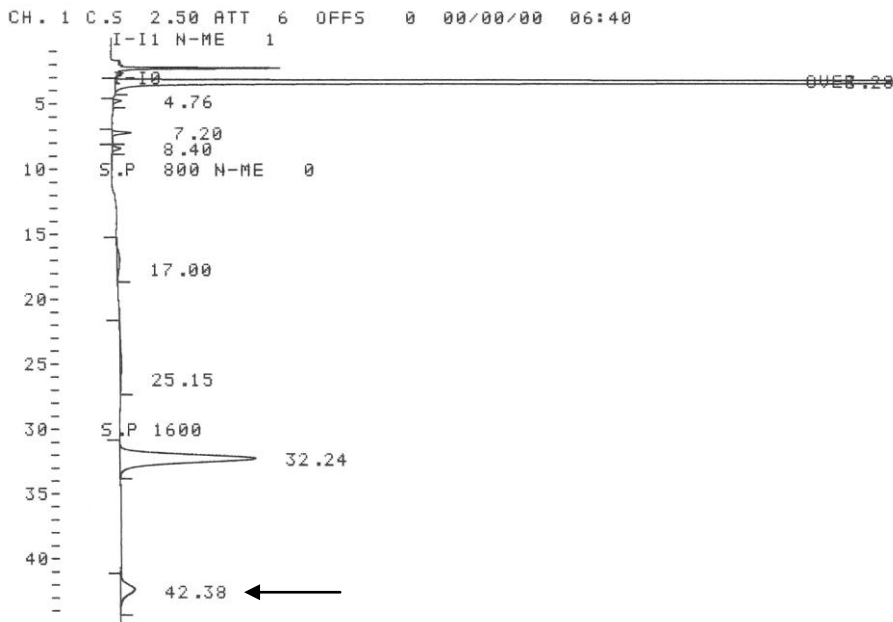


24



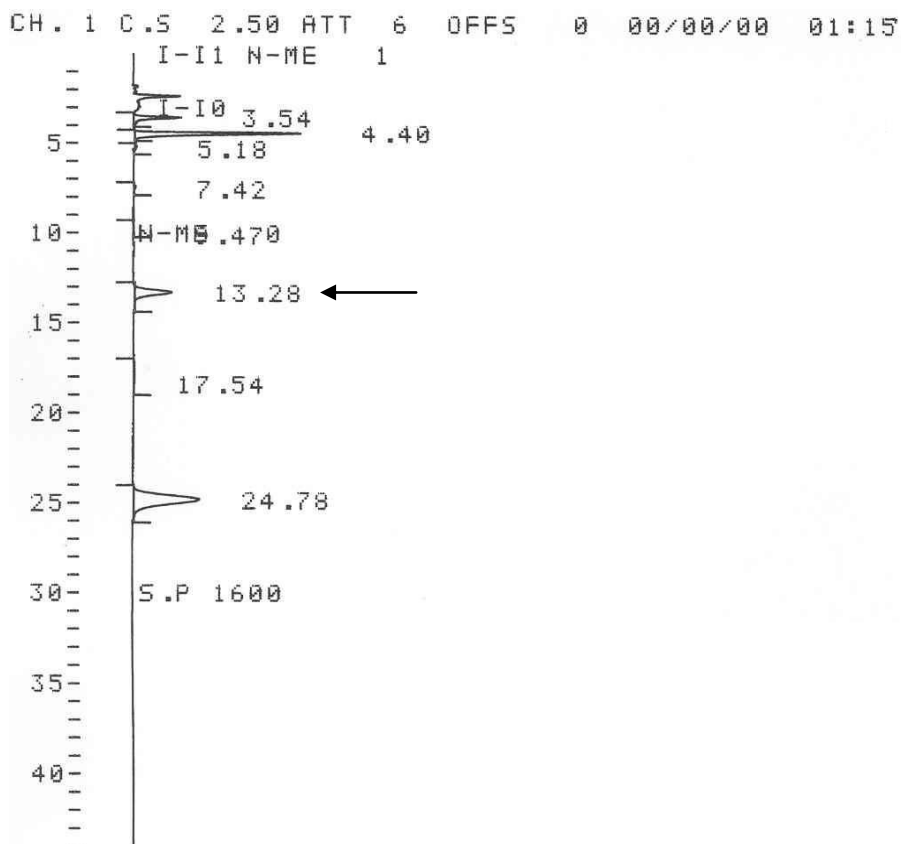
25

# Anhang



26

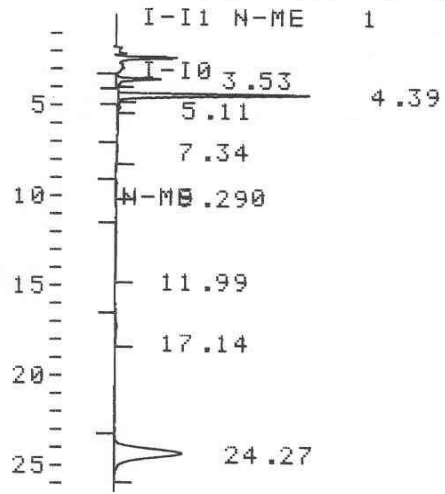
**Abbildung 137:** HPLC-Chromatogramme der CbHST-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA/Fer-CoA plus 3-Hydroxybenzoesäure“. 21: Standardpipettierschema mit pC-CoA und 3OHB, 22/23: Enzymtests ohne Enzym/ohne CoA-aktivierte Säure, 24: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und 3OHB, 25: Standardpipettierschema mit Feruloyl-CoA und 3OHB, 26: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und 3OHB. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



27

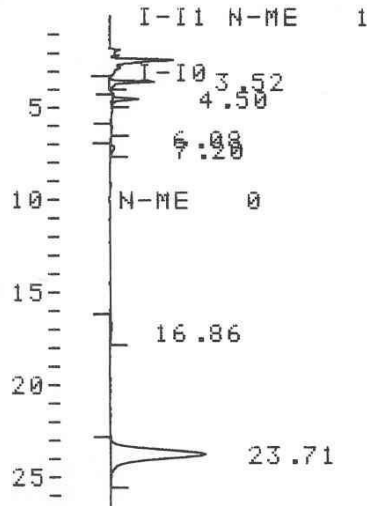
Anhang

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:00



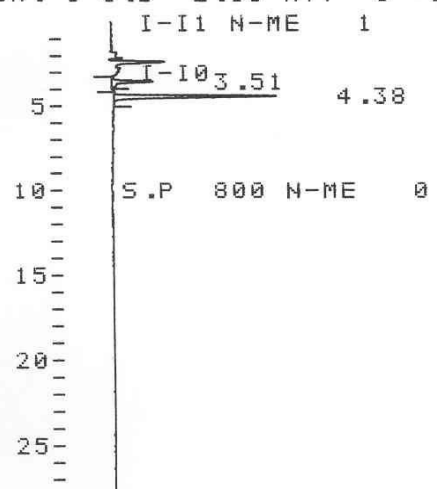
28

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 03:29



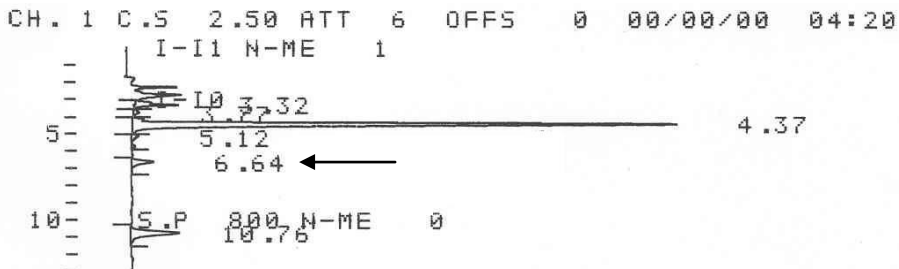
29

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 04:44

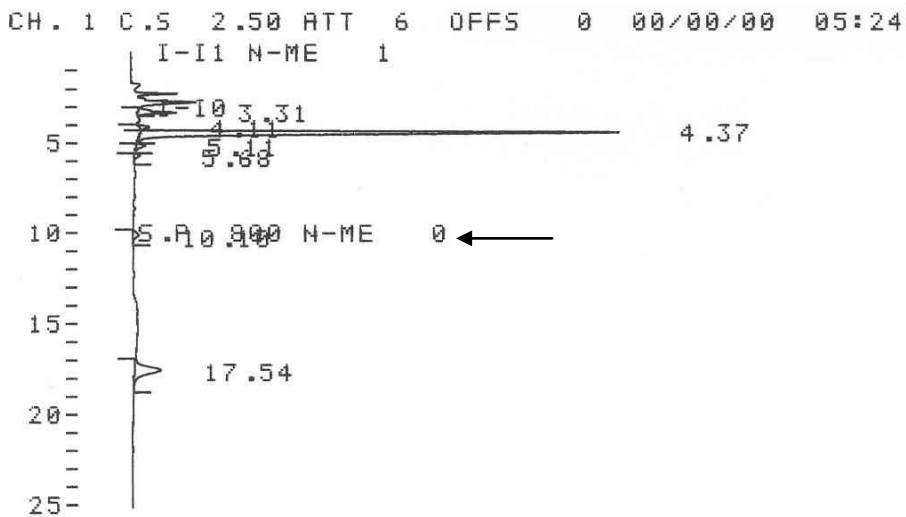


30

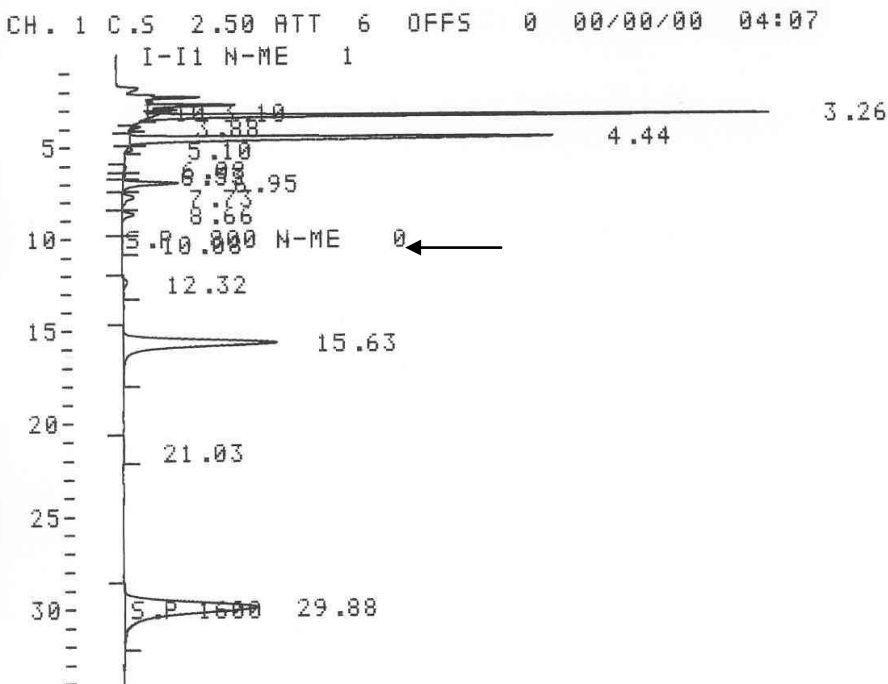
# Anhang



31



32

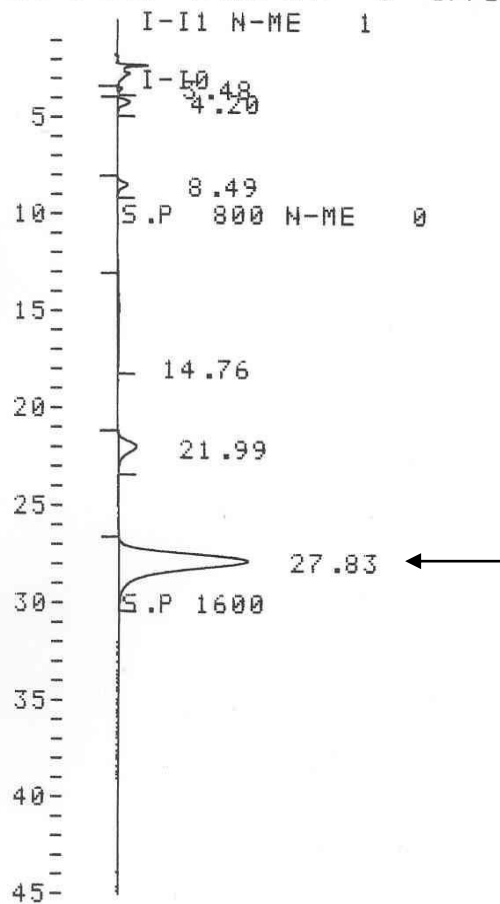


33

**Abbildung 138:** HPLC-Chromatogramme der CbHST-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA/Fer-CoA plus 3-Aminobenzoensäure“. 27: Standardpipettierschema mit pC-CoA und 3AB, 28/29/30: Enzymtests ohne Enzym/ohne 3-AB/ohne CoA-aktivierte Säure, 31: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und 3AB, 32: Standardpipettierschema mit Feruloyl-CoA und 3AB, 33: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und 3AB. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

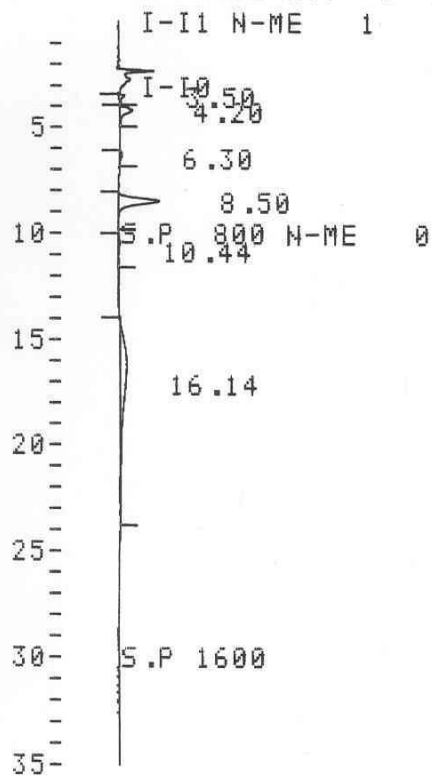
# Anhang

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 03:57



34

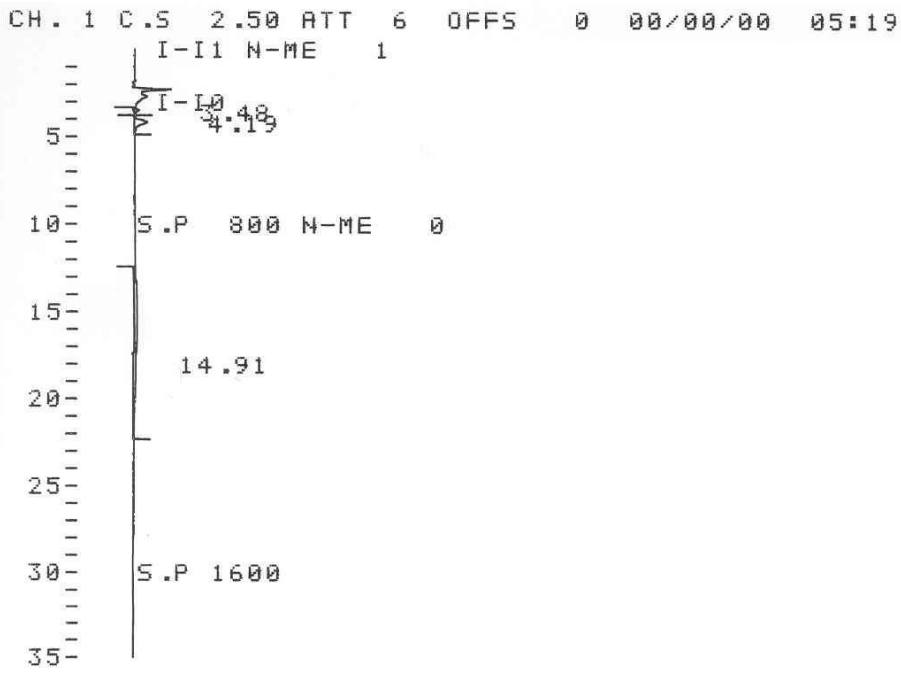
CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 04:43



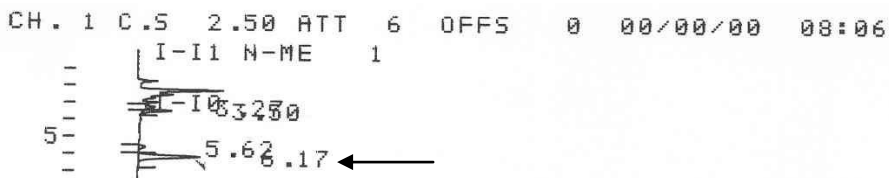
35



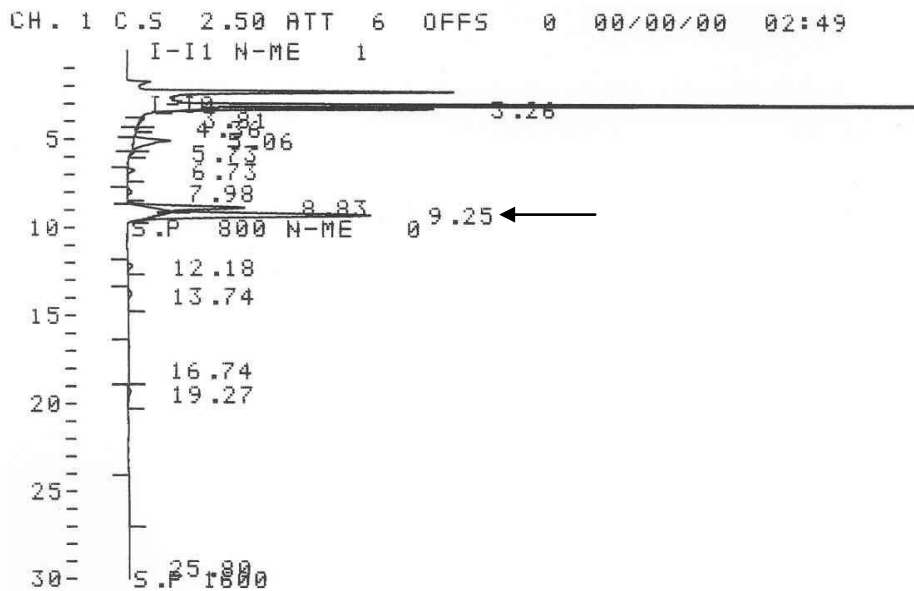
# Anhang



36

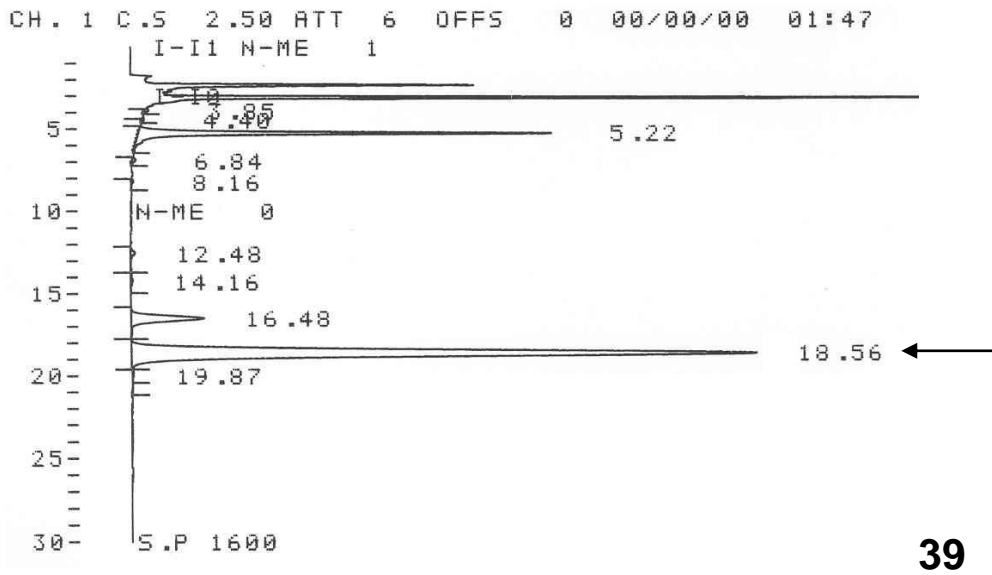


37

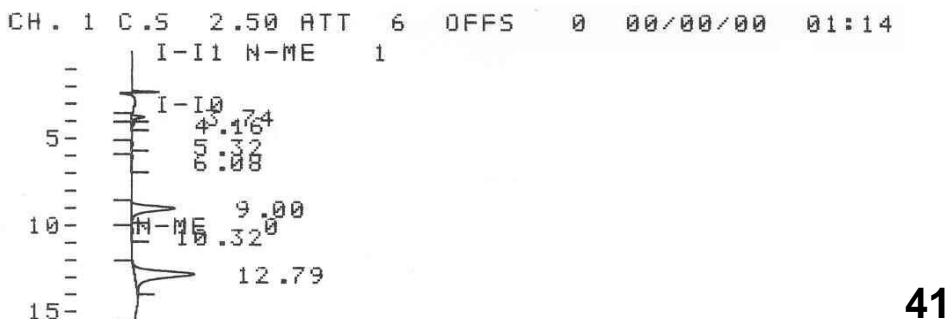
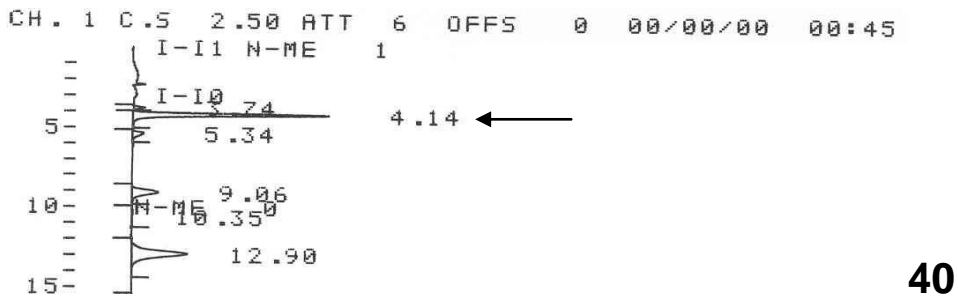


38

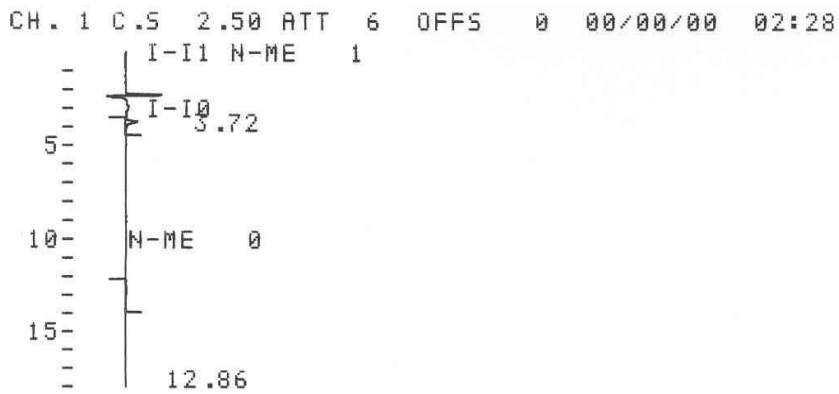
# Anhang



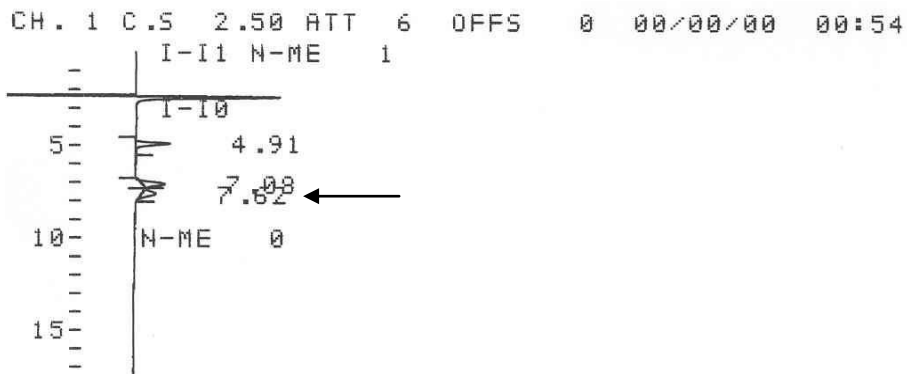
**Abbildung 139:** HPLC-Chromatogramme der CbRAS-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA/Fer-CoA plus Phenyllactat“. 34: Standardpipettierschema mit pC-CoA und PL, 35/36: Enzymtests ohne Enzym/ohne CoA-aktivierte Säure, 37: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und PL, 38: Standardpipettierschema mit Feruloyl-CoA und PL, 39: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und PL. Die Produkt-peaks sind mit einem Pfeil markiert.



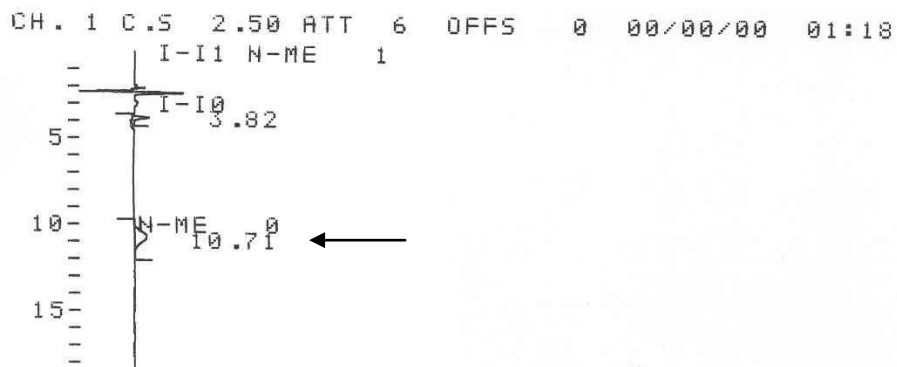
## Anhang



42



43

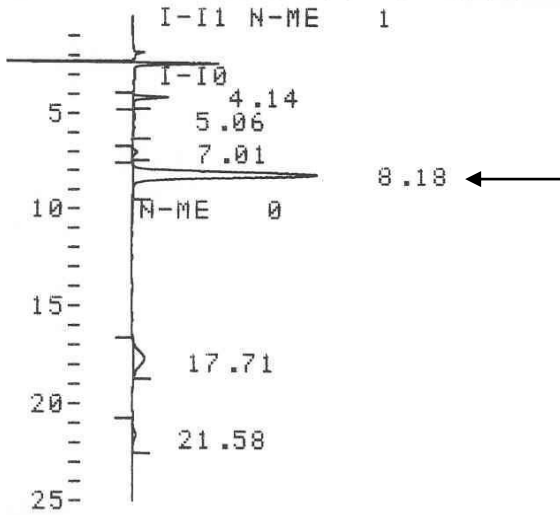


44

**Abbildung 140:** HPLC-Chromatogramme der CbRAS-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA plus DOPA“. 40: Standardpipettierschema mit pC-CoA und DOPA, 41/42: Enzymtests ohne Enzym/ohne CoA-aktivierte Säure, 43: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und DOPA, 44: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und DOPA. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

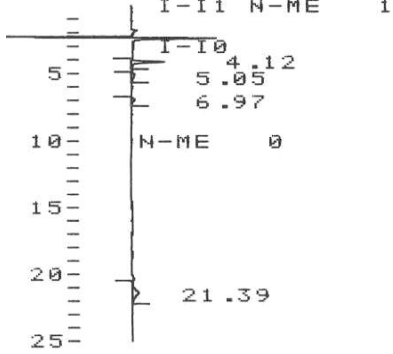
Anhang

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:03



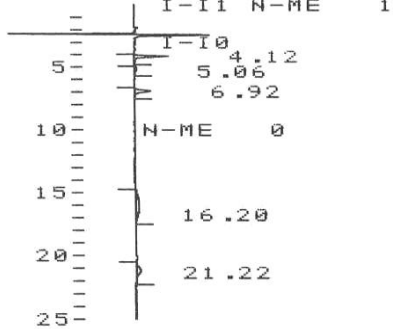
45

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:30



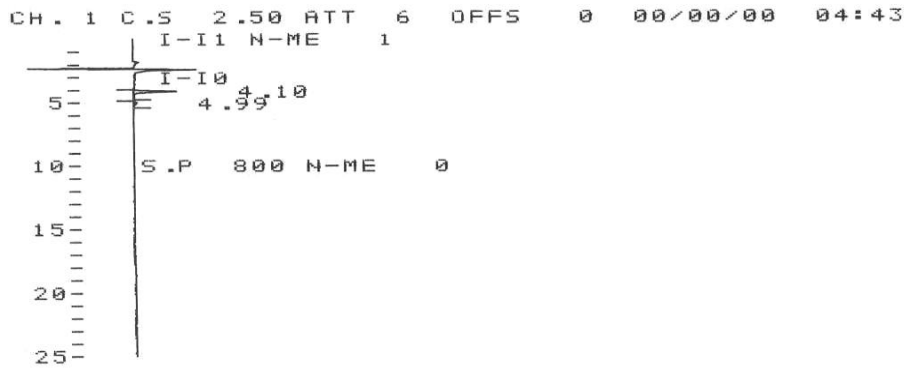
46

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:56

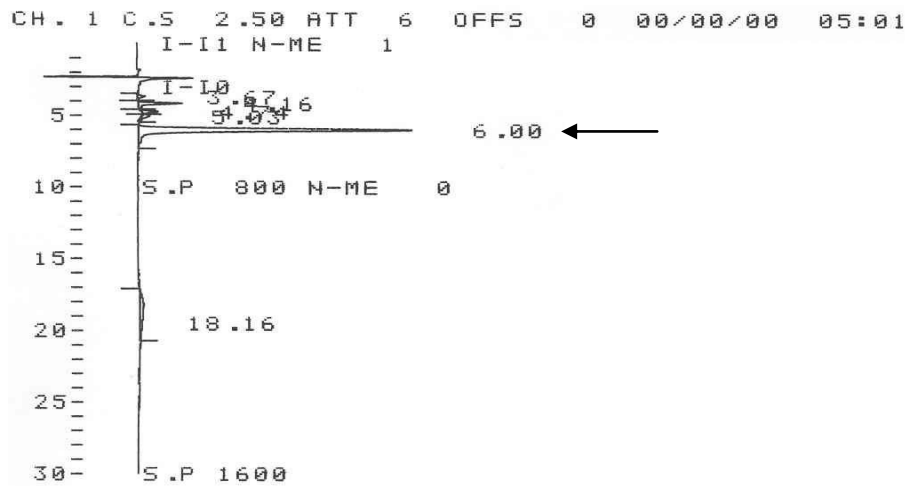


47

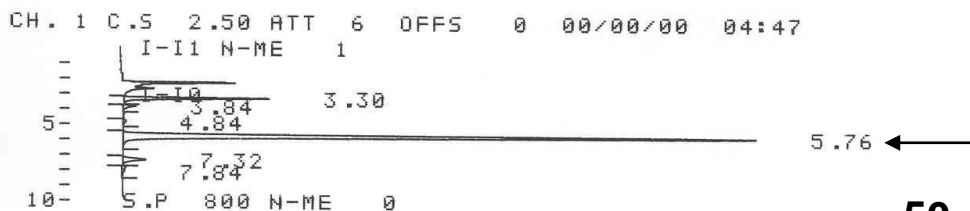
## Anhang



**48**



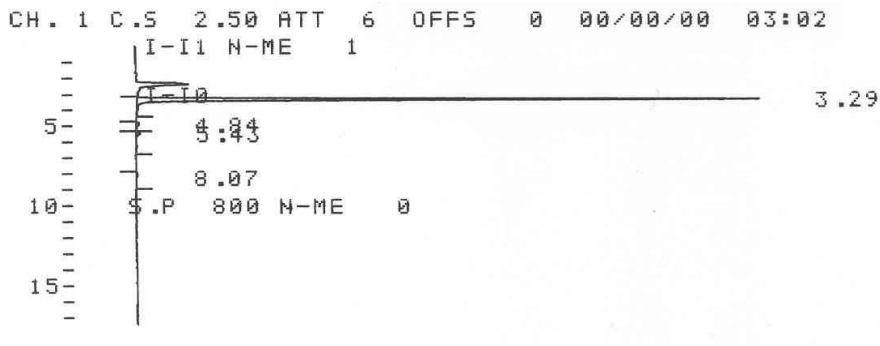
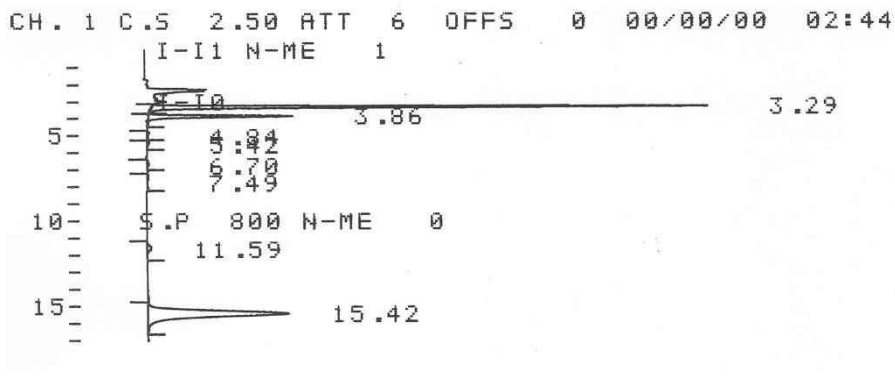
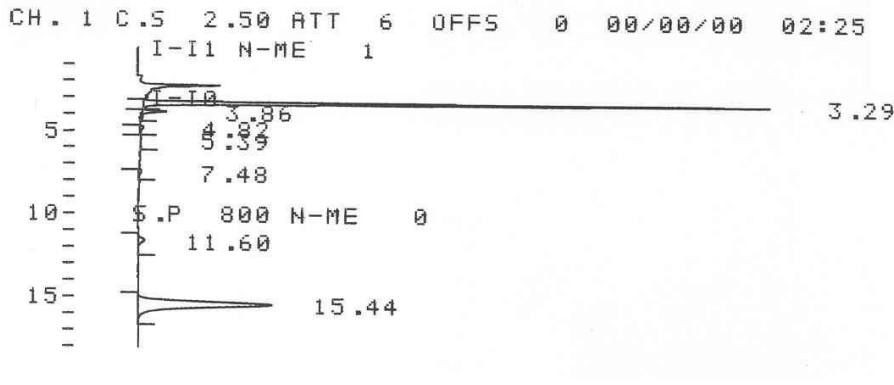
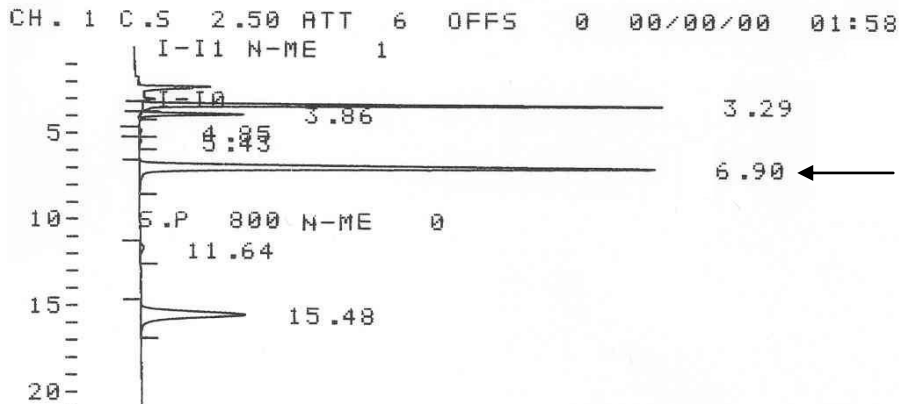
**49**



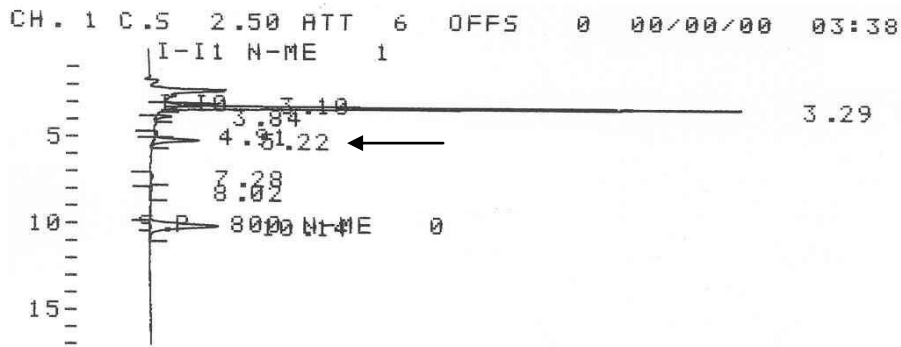
**50**

**Abbildung 141:** HPLC-Chromatogramme der CbRAS-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA plus Tyrosin“. 45: Standardpipettierschema mit pC-CoA und Tyrosin, 46/47/48: Enzymtests ohne Enzym/ohne Tyrosin/ohne CoA-aktivierte Säure, 49: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und Tyrosin, 50: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und Tyrosin. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

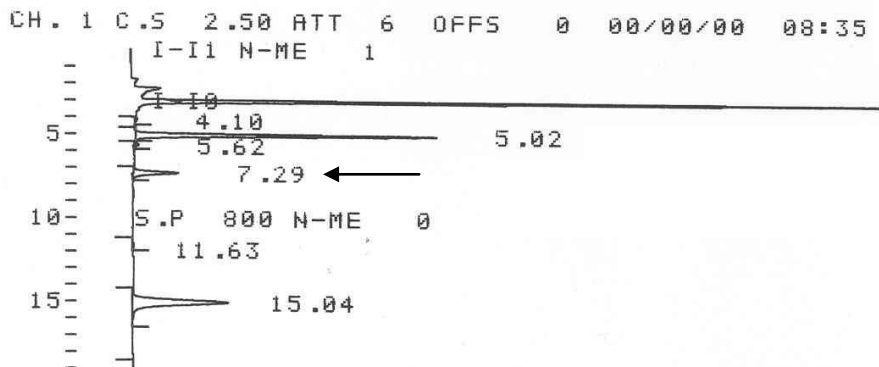
Anhang



# Anhang

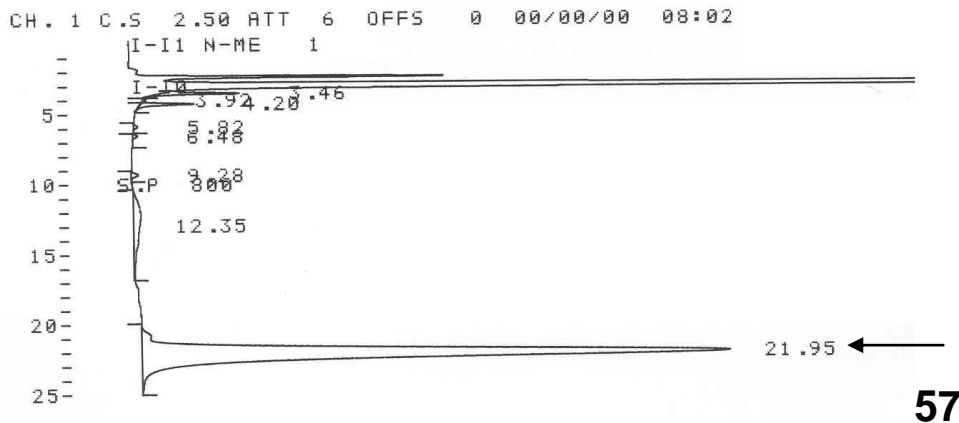


55

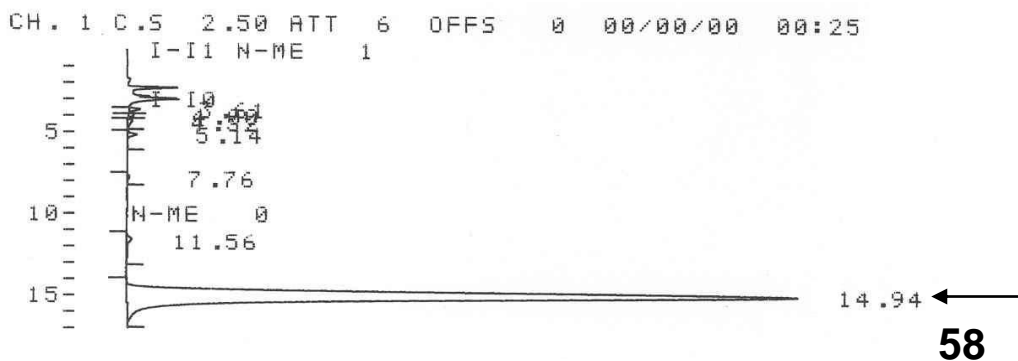


56

**Abbildung 142:** HPLC-Chromatogramme der CbRAS-Enzymtests „pC-CoA/Caf-CoA/Cin-CoA plus Phenylalanin“. 51: Standardpipettierschema mit pC-CoA und Phenylalanin, 52/53/54: Enzymtests ohne Enzym/ohne Phenylalanin/ohne CoA-aktivierte Säure, 55: Standardpipettierschema mit Caf-CoA und PA, 56: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und PA. Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

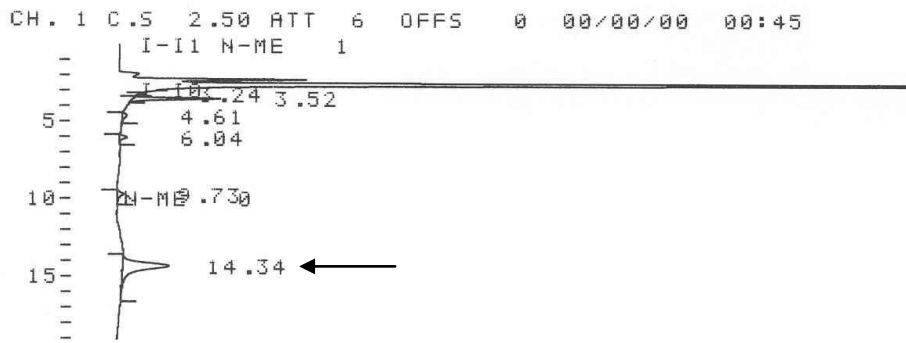


57

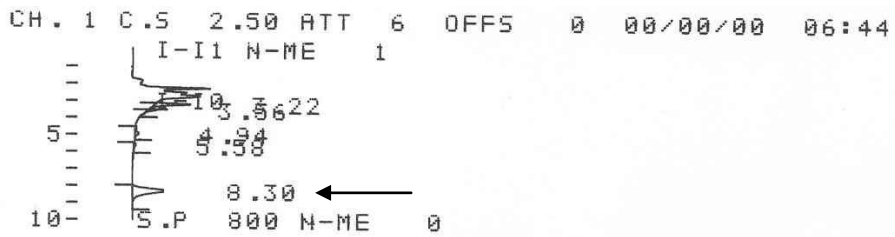


58

## Anhang



59



60

**Abbildung 143:** HPLC-Chromatogramme der CbRAS-Enzymtests „Cin-CoA/Fer-CoA plus pHPL/DHPL“.  
57: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und pHPL, 58: Standardpipettierschema mit Fer-CoA und pHPL,  
59: Standardpipettierschema mit Cin-CoA und DHPL, 60: Standardpipettierschema mit Fer-CoA und DHPL.  
Die Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



## Anhang

Substratkombination	Methanol [%]	Wasser [%]	Detektions- wellenlänge [nm]
<b>Enzymtests mit CbHST</b>			
Cinnamoyl-CoA + Shikimat	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>280</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-, Feruloyl-, Sinapoyl-CoA + Shikimat	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>333</b>
Caffeoyl-CoA + Shikimat	35	65	333
Acetyl-, Malonyl-, Anthraniloyl-CoA + Shikimat	40	60	220
Benzoyl-CoA + Shikimat	35 / 50	65 / 50	280 / 333
<i>p</i> -Cumaroyl-, Caffeoyl-CoA + Chinat	40	60	333
<i>p</i> -Cumaroyl-, Caffeoyl-CoA + pHPL/DHPL	40 / 50	60 / 50	333
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + Anthranilat	35 / 40	65 / 60	333
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + 3-Hydroxyanthranilat	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>333</b>
Caffeoyl-CoA + 3-Hydroxyanthranilat	<b>45</b>	<b>55</b>	<b>333</b>
Cinnamoyl-, Feruloyl-, Sinapoyl-CoA + 3-Hydroxyanthranilat	<b>55</b>	<b>45</b>	<b>333</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + 3-Hydroxybenzoat	45 / <b>50</b>	55 / <b>50</b>	<b>333</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + 2,3-Dihydroxybenzoat	<b>45</b> / 50	<b>55</b> / 50	<b>333</b>
Cinnamoyl-, Feruloyl-, Sinapoyl-CoA + 3-Hydroxybenzoat / 2,3-Dihydroxybenzoat	<b>55</b>	<b>45</b>	<b>333</b>
Caffeoyl-CoA + 3-Hydroxybenzoat / 2,3-Dihydroxybenzoat	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>333</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + 3-Aminobenzoat	<b>50</b> / 55	<b>50</b> / 45	<b>333</b>
Caffeoyl-, Feruloyl-, Sinapoyl-CoA + 3-Aminobenzoat	<b>50</b> / 55	<b>50</b> / 45	<b>333</b>
Cinnamoyl-CoA + 3-Aminobenzoat	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>280</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + Tyramin, Dopamin, DOPA, Serotonin, Tryptamin, Phenol, Phenethylamin	40 / 45 / 50	60 / 55 / 50	333
<b>Enzymtests mit CbRAS</b>			
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + pHPL/DHPL	50 / 45	50 / 55	312
Caffeoyl-, Feruloyl-, Sinapoyl-CoA + pHPL/DHPL	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>333</b>
Cinnamoyl-CoA + pHPL/DHPL	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>280</b>

## Anhang

Acetyl-, Malonyl-, Anthraniloyl-CoA + pHPL	40	60	280
Benzoyl-CoA + pHPL	50 / 35	50 / 65	280
Cinnamoyl-CoA + PL	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>280</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + PL	<b>50</b> / 55	50 / 45	<b>333</b>
Caffeoyl-, Feruloyl-CoA + PL	55 / <b>60</b>	45 / <b>40</b>	<b>280</b>
Feruloyl-CoA + PL	55 / <b>60</b>	45 / <b>40</b>	<b>333</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-, Caffeoyl-, Feruloyl-CoA + Phenylalanin	<b>55</b>	<b>45</b>	<b>280</b>
Cinnamoyl-CoA + Phenylalanin	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>280</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-, Caffeoyl-CoA + Tyrosin	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>333</b>
Cinnamoyl-CoA + Tyrosin	<b>55</b>	<b>45</b>	<b>280</b>
Cinnamoyl-CoA + DOPA	<b>45</b>	<b>55</b>	280 / <b>333</b>
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + DOPA	<b>45</b>	<b>55</b>	<b>333</b>
Caffeoyl-CoA + DOPA	<b>27,5</b> / 32.5	<b>72,5</b> / 67.5	<b>280</b>
Feruloyl-CoA + DOPA	45	55	333
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + Tyramin, Tryptamin, Serotonin, Phenethylamin, 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	50	50	333
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + Dopamin	45 / 50	55 / 50	280
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + Anthranilat	35 / 40	65 / 60	333
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA + 3-Hydroxyanthranilat	45	55	333

**Tabelle 18:** Fließmittelzusammensetzung und Detektionswellenlängen bei der HPLC-Analyse der Enzymtests zur biochemischen Untersuchung der CbHST und der CbRAS (siehe Kapitel 2.4, 3.5 und 3.6). Die Werte, die fett abgebildet sind, gelten für die Chromatogramme in diesem Kapitel.

## 6. Literatur

- Adam KP (1995) Caffeic acid derivatives in fronds of the lady fern (*Athyrium filix-femina*). *Phytochemistry* **40**:1577-1578
- Aharoni A, Keizer LPC, Bouwmeester HJ, Sun ZK, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen A, De Vos RCH, Van der Voet H et al. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **12**:647-661
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J (2004) Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and *m*-coumaric acid. *Life Sci* **75**:165-178
- Bayer A, Ma XY, Stockigt J (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis—functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg Med Chem* **12**:2787-2795
- Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FW, Bouwmeester HJ, Aharoni A (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from *strawberry* and *banana*. *Plant Physiol* **135**:1865-1878
- Berger A, Meinhard J, Petersen M (2006) Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* **224**:1503-1510
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2007) Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *Plant Cell* **19**:148-163
- Boatright J, Negre F, Chen XL, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N (2004) Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. *Plant Physiol* **135**:1993-2011
- Bolanos-Garcia VM, Davies OR (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1760**:1304-1313
- Boudet AM (2000) Lignins and lignifications: Selected issues. *Plant Physiol Biochem* **38**:81-96
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK (2003) A new class of *N*-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *J Biol Chem* **278**:13919-13927

- Chang J, Lou J, He G (2009) Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression/silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway. *Acta Biochim Biophys Sin* **41**:123-130
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicon*: consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* **69**:2149-2156
- Clifford MN, Knight S (2004) The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chem* **87**:457-463
- Comino C, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Romani A, Hehn A, Larbat R, Bourgaud F (2007) Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L.. *BMC Plant Biol* **7**:14
- Comino C, Hehn A, Moglia A, Menin B, Bourgaud F, Lanteri S, Portis E (2009) The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biol* **9**:30
- Cooper TG (1981). *Biochemische Arbeitsmethoden*. Verlag de Gruyter, Berlin
- Cotelle P, Hervé V (2003) The reaction of methyl isoferulate with FeCl<sub>3</sub> or Ag<sub>2</sub>O-hypothesis on the biosynthesis of lithospermic acids and related nor an neolignans. *Tetrahedron Lett* **44**:3289-3292
- DAC (2009) *Deutscher Arzneimittel-Codex, Deutscher Apothekerverlag* Stuttgart
- D'Auria JC (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* **9**:331-340
- D'Auria JC, Chen F, Pichersky E (2002) Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol* **130**:466-476
- D'Auria JC, Gershenzon J (2005) The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Curr Opin Plant Biol* **8**:308-316
- D'Auria JC, Reichelt M, Luch K, Svatos A, Gershenzon J (2007) Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl-CoA: Anthocyanidin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **581**:872-878
- De Luca V, Laflamme P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **4**:225-233
- Dexter R, Qualley A, Kish CM, Je Ma C, Koeduka T, Nagegowda DA, Dudareva N, Pichersky E, Clark D (2007) Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. *Plant J* **49**:265-275

- Dubois M, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet JF, Debyser Z, Witvrouw M, Cotelle P (2008) Reaction of Rosmarinic Acid with Nitrile Ions in Acidic Conditions: Discovery of Nitro- and Dinitrorosmarinic Acids as New Anti-HIV-1 Agents. *J Med Chem* **51**:2575-2579
- Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E (1998) Acetyl-CoA: benzylalcohol acyltransferase—an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* **14**:297-304
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**:1893-1902
- Eberle D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Petersen M (2009) cDNA cloning and functional characterization of CYP98A14 and NADPH cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. *Plant Mol Biol* **69**:239-253
- Ellis BE, Towers GHN (1970) Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J* **118**:291
- El-Sharkawi I, Manriquez D, Flores FB, Regad F, Bouzayen M, Latche A, Pech JC (2005) Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of the threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol Biol* **59**:354-362
- Facchini PJ, Hagel J, Zulak K. (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: Physiology and biochemistry. *Can J Bot* **80**:577-589
- Fellenberg C, Boettcher C, Vogt T (2009) Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds. *Phytochemistry* **70**:1392-1400
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC, Chapple C, (2002) The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* **30**:33-45
- Fridman E, Pichersky E (2005) Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Curr Opin Plant Biol* **8**:242-248
- Friedt W (1978) Untersuchungen an autotetraploiden Gersten unter besonderer Berücksichtigung der Diploidisierung I Fertilität, Vitalität und Kornertrag. *Z Pflanzenzüchtung* **81**:118-139
- Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Ashikari T, Yamaguchi M, Kusumi T (1998) Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferases from *Perilla frutescens*. *Plant Sci* **137**:87-94
- Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Nakao M, Ashikari T, Kusumi T (1997) Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *Eur J Biochem* **249**:45-51

- Fujiwara H, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Fukui Y, Yamaguchi M, Ashikari T, Kusumi T (1998) cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferases from *Gentiana triflora*. *Plant J* **16**:421-431
- Garvey GS, McCormick SP, Rayment I (2008) Structural and functional characterization of the TRI101 trichothecene 3-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*: kinetic insights to combating *Fusarium* head blight. *J Biol Chem* **283**:1660-1669
- Gebhardt Y (2007) Molekularbiologische und Biochemische Untersuchungen zur Evolution der Flavonsynthese I in Apiaceae. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J* **58**:246-259
- Grothe T, Lenz R, Kutchan TM (2001) Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J Biol Chem* **276**:30717-30723
- Haslam E (1993) Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. (Chichester: John Wiley and Sons)
- Herrmann KM (1995) The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* **7**:907-919
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**:1446-1465
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2005) Acyltransferase-catalysed *p*-coumarate ester formation is a committed step of lignin biosynthesis. *Plant Biosyst* **139**:50-53
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinic ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**:95-103
- Hücherig S (2010) RNAi-Untersuchungen und Überexpression von Genen der Rosmarinbiosynthese. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Ishihara A, Miyagawa H, Matsukawa T, Ueno T, Mayama S, Iwamura H (1997) Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase activity by oligo-*N*-acetylchitooligosaccharides in oats. *Phytochemistry* **47**:969-974

- Kang S, Kang K, Chung GC, Choi D, Ishihara A, Lee DS, Back K. (2006) Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol* **140**:704-715
- Kaufmann M, Wink, M (1994). Molecular systematics of the Nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from *rbcl* gene sequences. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **49**(9-10):635-645
- Laflamme P, St Pierre B, De Luca V (2001) Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root-specific minovicinine-19-hydroxy-*O*-acetyltransferase. *Plant Physiol* **125**:189-198
- Landmann C (2007). Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels in Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und Erdbeere (*Fragaria x ananassa*). Dissertation Technische-Universität München
- Lepepelley M, Cheminade G, Tremillon N, Simkin A, Caillet V, McCarthy J (2007) Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Sci.* **172**:978-996
- hol acyltransferase (MdAAT2) from Apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry* **67**:658-667
- Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ (2009) A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed. *Plant Cell* **21**:318-333
- Ma X, Koepke J, Panjikar S, Fritsch G, Stöckigt J (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J Biol Chem* **280**:13576-13583
- Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, Ralph J (2009) Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr Biol* **19**:169-175
- Meinhard E J (1995). Identifizierung und Reinigung der Rosmarinsäure-Synthase aus Zellkulturen von *Coleus blumei*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Milkowski C, Strack D (2004) Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **65**:517-524
- Murata T, Sasaki K, Sato K, Yoshizaki F, Yamada H, Mutoh H, Umehara K, Miyase T, Warashina T, Aoshima H, Tabata H, Matsubara K (2009) Matrix metalloproteinase-2 inhibitors from *Clinopodium chinense* var. *parviflorum*. *J Nat Prod* **72**:1379-1384
- Nam KH, Dudareva N, Pichersky E (1999) Characterization of benzylalcohol acetyltransferases in scented and non-scented *Clarkia* species. *Plant Cell Physiol* **40**:916-923
- Nakayama T, Suzuki H, Nishino T (2003) Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics and applications. *J Mol Catal B Enzym* **23**:117-132

- Nevarez DM, Mengistu YA, Nawarathne IN, Walker K (2009) An *N*-Aroyltransferase of the BAHD Superfamily Has Broad Aroyl CoA Specificity *in vitro* with Analogues of *N*-Dearoylpaclitaxel. *J. Am. Chem. Soc.* **131**:5994-6002
- Niggeweg R, Michael A, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnol* **22**:746-754
- Ober D (2005) Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trend Plant Sci* **10**:444-449
- Okada T, Hirai MY, Suzuki H, Yamazaki M, Saito K (2005) Molecular characterization of a novel quinolizidine alkaloid *O*-tigloyltransferase: cDNA cloning, catalytic activity of recombinant protein and expression analysis in *Lupinus* plants. *Plant Cell Physiol* **46**:233-244
- Okada T, Hirai MY, Suzuki H, Yamazaki M, Saito K (2005) Molecular cloning and characterization of tigloyl-CoA:13  $\alpha$ -hydroxymultiflorine/13  $\alpha$ -hydroxylupanine *O*-tigloyltransferase from *Lupinus albus*: the first gene identification involved in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **46**:55
- Peng XX, Bai GB, Li WD (submitted 2009). Cloning and characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyl transferase involved in chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica*.
- Petersen M (1991) Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry* **30**:2877-2881
- Petersen M (1997) Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* **45**:1165-1172
- Petersen M (2007) Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry* **68**:2847-2860
- Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, Meinhard J (1994). The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **38**: 171-179
- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **70**:1663-1679
- Petersen M, Alfermann AW (1988) Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: Hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z Naturforsch* **43c**:501-504
- Petersen M, Metzger JW (1993) Identification of the reaction products of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei* by ion spray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* **4**:131-134
- Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Molecules of interest: Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62**:121-125



- Ph. Eur. (2009) 6. Ausgabe, 4. Nachtrag, amtliche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag  
Stuttgart
- Pichersky E, Gang DR (2006) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Science* **311**:808-811
- Rogers R (2008) *Coleus*: rainbow foliage for containers and gardens. Timber Press, Inc.
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified tissues. *Plant Mol Biol* **5**:69-76
- Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M, Takizawa T, Gomi S, Osawa T (1998) Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *J Agric Food Chem* **46**:454-457
- Scarpati ML, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric Sci* **28**:2329-2333
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P, Werck-Reichhart D (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem* **276**:36566-36574
- Schoch GA, Morant M, Abdulrazzak N, Asnaghi C, Goepfert S, Petersen M, Ullmann P, Werck-Reichardt D (2006) The *meta*-hydroxylation step in the phenylpropanoid pathway. A new level of complexity in the pathway and its regulation. *Environ Chem Lett* **4**:127-136
- Shadle G, Chen F, Reddy MSS, Jackson L, Nakashima J, Dixon RA (2007) Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. *Phytochemistry* **68**:1521-1529
- Shalit M, Guterman I, Volpin H, Bar E, Tamari T, Menda N, Adam Z, Zamir D, Vainstein A, Weiss D et al. (2003) Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyltransferase in developing roses petals. *Plant Physiol* **131**:1868-1876
- Shaw WV (1992) Chemical anatomy of antibiotic resistance: chloramphenicol acetyltransferase. *Sci Prog* **76**:565-580
- Sondheimer E (1964) Chlorogenic acid and related depsides. *Bot Rev* **30**:667-712
- Souleyre EJ, Greenwood DR, Friel EN, Karunaitnam S, Newcomb RD (2005) An alcohol acyl transferase from apple (cv Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS J* **272**:3132-3144
- Stark T, Hofmann T (2005) Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of *N*-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*). *J Agric Food Chem* **53**:5419-5428
- Stöckigt J, Santosh P (2007) Structural biology in plant natural product biosynthesis-architecture of enzymes from monoterpene indole and tropane alkaloid biosynthesis. *Nat Prot Rep* **24**:1382-1400

- St Pierre B, De Luca V (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involves in secondary metabolism. *Recent Advances in Phytochemistry* **34**:285-315
- St. Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A - dependent acyl transfer. *Plant J* **14**:703-713
- Stehle F, Brandt W, Schmidt J, Milkowski C, Strack D (2008) Activities of *Arabidopsis* sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **69**:1826-1831
- Stehle F, Stubbs MT, Strack D, Milkowski C (2008) Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. *FEBS J* **275**:775-787
- Stöckigt J, Zenk MH (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Z Naturforsch* **30c**:352-358
- Sullivan ML (2009) A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phaselic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol* **150**:1866-1879
- Suzuki H, Nakayama T, Nishino T, Nagae S, Yamaguchi MA, Iwashita T, Fukui Y, Nishino T (2004) cDNA cloning and functional characterization of flavonol 3-O-glucoside –6''-O-malonyltransferase from flowers of *Verbena hybrida* an *Lamium purpureum*. *J Mol Catal B Enzym* **28**:87-93.
- Suzuki H, Nakayama T, Nishino T (2003) Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside –6''-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry* **42**:1764-1771
- Suzuki H, Nakayama T, Yamaguchi M, Nishido T (2004) cDNA cloning and characterization of two *Dentranthema x Morifillium* anthocyanin malonyltransferases with different functional activities. *Plant Sci* **166**:89-96
- Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura N, Nakao M, Tanaka Y, Yamaguchi M, Kusumi T, Nishino T (2001) Malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6'''-O-malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers—enzyme purification, gene cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem* **276**:49013-49019
- Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura T, Nishino T (2002) cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-CoA:anthocyanidin 3-O-glucoside –6''-O-malonyltransferase from *Dahlia* flowers. *Plant Physiol* **130**:2142-2151

- Suzuki H, Sawada S, Watanabe K, Nagae S, Yamaguchi M, Nakayama T, Nishido T (2004) Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *Plant J* **38**:994-1003
- Suzuki H, Sawada S, Yonekura-Sakakibara K, Nakayama T, Yamaguchi M, Nishido T (2003) Identification of a cDNA encoding malonyl-CoenzymeA:anthocyanidin 3-O-glucoside 6''-O-malonyltransferase from cineraria (*Senescia carentus*) flowers. *Plant Biotechnol* **20**:229234
- Taguchi G, Shitchi Y, Shirasawa S, Yamamoto H, Hayashida N (2005) Molecular cloning, characterization and downregulation of an acyltransferase that catalyses the malonylation of flavonoid and naohthol glucosides in tobacco cells. *Plant J* **42**:481-491
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molicular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599
- Tebayashi S, Ishihara A, Tsuda M, Iwamura H (2000) Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover. *Phytochemistry* **54**:387-392
- Ulbrich B, Zenk MH (1979) Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA:quinat hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **18**:929-933
- Ulbrich B, Zenk MH (1980) Partial purification and properties of *p*-hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate-*p*-hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **19**:1625-1629
- Unno H, Ichimaida F, Suzuki H, Takahashi S, Tanaka Y, Saito A, Nishino T, Kusunoki M, Nakayama T (2007) Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *J Biol Chem* **282**:15812-15822
- Villegas RJA, Kojima M. (1986) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose quinate hydroxycinnamoyltransferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* LAM. *J Biol Chem* **261**:8729-8733
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol Plant* **3**:2-20
- Wagner A, Ralph J, Akiyama T, Flint H, Phillips L, Torr K, Nanayakkara B, Te Kiri L (2007) Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:11856-11861
- Walker K, Croteau R (2000) Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:583-587
- Walker K, Croteau R (2000) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2-alpha-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:13591-13596

- Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R (2002) Molecular cloning and heterologous expression of the C13 pheynylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:12715-12720
- Walker K, Ketchum REB, Hezari M, Gatfield D, Goleniowski M, Barhol A, Contreau R (1999) Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20), 11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase that catalyses the first acylation step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **364**:273-279
- Walker K, Long R, Croteau R (2002) The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain *N*-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:9166-9171
- Walker K, Schoendorf a, Croteau R (2000) Molecular cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* an functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **374**:371-380
- Wang J, De Luca V (2005) The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including foxy methyl anthranilate. *Plant J* **44**:606-619
- Waters ER (2003) Molecular adaptation and the origin of land plants. *Mol Phylogen Evol* **29**:456-463
- Weitzel C (2009) Rosmarinsäure-Biosynthese in Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L.. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Widén B, Widén M (2000) Enzyme variation and inheritance in *Glechoma hederacea* (Lamiaceae), a diploidized tetraploid. *Hereditas* **132**:229-241
- Xia Y, Nikolau BJ, Schnable PS (1996) Cloning and characterization of *CER2*, an *Arabidopsis* gene that affects cuticular wax accumulation **8**:1291-1304
- Xia Y, Nikolau BJ, Schnable PS (1997) Developmental and hormonal regulation of the *Arabidopsis CER2* gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiol* **115**:925-937
- Yang Q, Reinhard K, Schiltz E, Matern U (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Mol Biol* **35**:777-789
- Yang Q, Trinh HX, Imai S, Ishihara A, Zhang L, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004) Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Mol Plant Microbe Interact* **17**:81-89

- Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Fukuchi-Mizutani M, Fujiwara H, Fukui Y, Ashikari T, Murakami Y, Yamaguchi M, Kusumi T, Nishino T (2000) Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA:anthocyanin 3-O-glucoside-6''-O-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol* **41**:495-502
- Yu XH, Gou JY, Liu CJ (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression. *Plant Mol Biol* **70**:421-442

## Danksagung

Ich möchte nun die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen Menschen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Maïke Petersen (mit allem Lametta) für die Möglichkeit zur Erarbeitung dieser Dissertation bedanken. Vielen Dank für die vielen anregenden Gespräche, die Freiheit bei der Planung meiner Versuche und dafür, dass ich jederzeit zu dir kommen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe und seinem Arbeitskreis bedanke ich mich für die kompetente Unterstützung bei meinen Kristallisationsversuchen und für die Möglichkeit, an der Studienfahrt nach Hirschegg teilzunehmen. Das wird ein unvergessliches Erlebnis bleiben.

Herrn Prof. Dr. Shu-Ming Li danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich mich bei Miriam Bredebach bedanken, mit der ich schon im ersten Semester des Pharmaziestudiums Freundschaft geschlossen habe und die mich auch hier während meiner Promotion begleitet und durch viele nette Gespräche zu einer schönen Promotionszeit beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund, die immer an mich geglaubt haben und ohne deren Unterstützung ich das alles nicht geschafft hätte.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen**  
**von Hydroxycinnamoyltransferasen**  
**aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea***

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Hesborn, den 14. April 2010

(Marion Sander)

## Lebenslauf

Marion Sander  
geb. am 02. April 1982  
in Frankenberg (Eder)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1998-2001 Geschwister-Scholl-Gymnasium Winterberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1992-1998 Gymnasium der Stadt Medebach

1988-1992 Städt. Kath. Grundschule Hallenberg

### **Studium:**

01 / 2007 bis 05 / 2010 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg

12 / 2006 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

05 / 2006 bis 10 / 2006 Pharmaziepraktikum bei der Bayer HealthCare AG im Bereich Product Supply in Wuppertal

11 / 2005 bis 04 / 2006 Pharmaziepraktikum in der Ahorn-Apotheke in Korbach

10 / 2001 bis 09 / 2005 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg

### **Fortbildung:**

08 / 2007 bis 03 / 2009 Zusatzqualifikation im Pharmarecht am Fachbereich Rechtswissenschaften der Philipps-Universität Marburg

Seit 01 / 2007 Teilnahme an Fortbildungsveranstaltungen der Landesapothekerkammer Hessen

### **Berufspraxis:**

Seit 12 / 2009 Nebentätigkeit in der Forum-Apotheke in Erndtebrück und der easy-Apotheke in Siegen

04 / 2008 bis 10 / 2009 Nebentätigkeit in der Brunnen-Apotheke in Hallenberg und der Marien-Apotheke in Medebach

03 / 2007 bis 03 / 2008 Nebentätigkeit in der Lahn-Apotheke in Gießen und der Ohm-Apotheke in Kirchhain



