

Die Hydroxynitril-Lyasen
aus
***Linum usitatissimum* (Lein) und *Sorghum bicolor* (Hirse)**
Untersuchungen zur rekombinanten Expression
und phylogenetischen Verwandtschaft

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Petra Heim
aus Trier

Jülich, 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula
Korreferenten: Herr Priv.-Doz. Dr. Werner Hummel
Frau Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1997 bis Januar 2002 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Kula angefertigt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 380 „Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden“ gefördert.

Diese Dissertation wird u.a. in elektronischer Form auf dem WWW-Server der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf veröffentlicht:

<http://www.ulb.uni-düsseldorf.de/diss/mathnat/2002/heim.html>

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen der HNLn und Cyanhydrine.....	1
1.2	Cyanogenese bei höheren Pflanzen.....	2
1.3	Struktur, Funktion und Metabolismus der Cyanglykoside.....	6
1.3.1	Anabolismus der Cyanglykoside.....	8
1.3.2	Katabolismus der Cyanglykoside.....	10
1.4	Biochemische Eigenschaften der HNLn.....	13
1.4.1	Flavoprotein HNLn.....	15
1.4.2	FAD-freie HNLn.....	16
1.5	Phylogenie der HNLn.....	17
1.6	Katalysemechanismus.....	19
1.7	Technische Anwendung der Hydroxynitril-Lyasen zur stereoselektiven Synthese von Cyanhydrinen.....	21
2	Motivation und Aufgabenstellung	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte und Chemikalien.....	27
3.1.2	Verwendete Organismen.....	29
3.1.2.1	Pflanzen.....	29
3.1.2.2	Hefestämme.....	29
3.1.2.3	Bakterienstämme.....	29
3.1.3	Verwendete Vektoren.....	30
3.1.3.1	Hefevektoren.....	30
3.1.3.2	Bakterielle Vektoren.....	30
3.2	Pflanzenanzucht und Ernte	30
3.3	Kultivierung und Stammhaltung der Mikroorganismen	31
3.3.1	<i>E. coli</i>	31
3.3.2	<i>P. pastoris</i>	31

3.4	Molekularbiologische Methoden	33
3.4.1	Präparation von Nukleinsäuren	33
3.4.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i>	33
3.4.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Sorghum bicolor</i>	34
3.4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Sorghum bicolor</i>	35
3.4.1.4	Isolierung von poly (A) ⁺ mRNA aus <i>Sorghum bicolor</i>	36
3.4.1.5	Präparation von Plasmid-DNA	37
3.4.1.5.1	Plasmid-Präparation mittels Plasmid Purification Kit [Qiagen]	37
3.4.1.5.2	Schnellpräparation nach der Alkali Methode	38
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.4.4	DNA-Klonierung	40
3.4.4.1	DNA-Restriktion	40
3.4.4.2	Enzymatische Modifizierung von DNA-Enden	41
3.4.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.4.5	Transformation von <i>E. coli</i>	42
3.4.5.1	„Hitzeschock“-Transformation	42
3.4.5.2	Elektroporation [<i>E. coli</i>]	43
3.4.6	Transformation von <i>P. pastoris</i>	44
3.4.6.1	“Lithiumchlorid“-Methode	44
3.4.6.2	Elektroporation [<i>P. pastoris</i>]	45
3.4.7.	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	45
3.4.7.1	Alkalische Agarosegelelektrophorese von DNA	45
3.4.7.2	Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese von RNA	46
3.4.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.4.9	5`-Rapid amplification of cDNA ends (5`-RACE)	47
3.4.9.1	Synthese der Erststrang-cDNA mittels Reverser Transkriptase	48
3.4.9.2	Anhängen des polyA-Schwanzes mittels Terminaler Transferase	49
3.4.9.3	Amplifizierung der 5`-SbHNL-cDNA	50
3.4.9.3.1	Erste PCR zur Synthese des cDNA-Doppelstranges	50
3.4.9.3.2	Zweite (Nested) PCR zur Synthese des cDNA-Doppelstranges	51
3.4.10	Ortsspezifische Mutagenese	51

3.5	Proteinchemische Methoden	53
3.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> zur heterologen Genexpression	53
3.5.1.1	Optimierung der Expression in <i>E. coli</i>	53
3.5.1.2	Optimierung der Expression in <i>P. pastoris</i>	53
3.5.2	Zellaufschlussverfahren	54
3.5.2.1	Zellaufschluss durch Sonifikation [<i>E. coli</i>]	54
3.5.2.2	Enzymatischer Zellaufschluss [<i>E. coli</i>]	54
3.5.2.3	Mechanischer Zellaufschluss mittels Nassmahlverfahren [<i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>]	55
3.5.2.4	Aufschluss von pflanzlichen Blattmaterial	55
3.5.3	Quantitative Proteinbestimmung	56
3.5.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten	57
3.5.4.1	Test auf <i>Lu</i> HNL - Aktivität	57
3.5.4.2	Test auf <i>Sb</i> HNL- Aktivität	58
3.5.4.3	Test auf Alkoholdehydrogenase-Aktivität	58
3.5.4.4	Test auf Formaldehyddehydrogenase-Aktivität	59
3.5.4.5	Test auf Carboxypeptidase-Aktivität	59
3.5.5	Chromatographische Reinigungsverfahren	60
3.5.5.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butylsepharose	60
3.5.5.2	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)	60
3.5.5.2.1	IMAC an Ni-NTA-Agarose	61
3.5.5.2.2	IMAC an Cu ²⁺ -Chelating-Sepharose	61
3.5.5.2.3	IMAC an Zn ²⁺ -Chelating-Sepharose	62
3.5.5.3	Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose	62
3.5.5.4	Gelfiltrationschromatographie	63
3.5.6	Weitere Reinigungsverfahren	63
3.5.6.1	Ammoniumsulfatfällung	63
3.5.6.2	Ultrafiltration	64
3.5.7	Elektrophoretische Verfahren	64
3.5.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
3.5.7.2	Elektroblotting nach Kyhse-Andersen	65
3.5.8	Färbung von Proteinen	66
3.5.8.1	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250	66
3.5.8.2	Färbung mit Silbernitrat	66
3.5.8.3	Amidoschwarzfärbung	67
3.5.9	N-terminale Sequenzierung	67
3.5.10	Immunfärbung von Western Blots	68
3.5.11	Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur NAD(P)H-Bindung	69
3.5.12	Test auf Enzymstabilität	69
3.5.12.1	Stabilitätstest in Gegenwart von NAD(P) ⁺ und Zn ²⁺	70
3.5.12.2	Stabilitätstest in Gegenwart von EDTA und 1,10-Phenanthrolin	70
3.5.13	Homologes Protein-Modelling	70

4	Ergebnisse und Diskussion	71
4.1	Die Hydroxynitril-Lyase aus <i>Linum usitatissimum</i>	71
4.1.1	Expressionsoptimierung der recLuHNL in <i>E. coli</i>	71
4.1.1.1	Optimierung des Vektor-Wirt-Systems.....	73
4.1.1.2	Optimierung der Induktionsparameter	74
4.1.2	Reinigung der recLuHNL(His) ₆ aus <i>E. coli</i>	77
4.1.3	Reinigung der recLuHNL aus <i>P. pastoris</i>	78
4.1.3.1	Reinigung der recLuHNL aus <i>P. pastoris</i> GS115.....	79
4.1.3.2	Reinigung der recLuHNL(His) ₆ aus <i>P. pastoris</i> SMD1168	80
4.1.4	Charakterisierung des Begleitproteins aus <i>P. pastoris</i>	83
4.1.4.1	Reinigung der ADH aus <i>P. pastoris</i>	84
4.1.4.2	Aktivität der ADH aus <i>P. pastoris</i>	86
4.1.5	Phylogenetische Verwandtschaft der LuHNL zu den Alkoholdehydrogenasen	87
4.1.5.1	Homologie der Primärsequenzen	87
4.1.5.2	Homologie-Modell der LuHNL	90
4.1.5.3	Ortsgerichtete Mutagenese zur Untersuchung des katalytischen Zentrums.....	94
4.1.5.4	Untersuchung der LuHNL auf ADH-Aktivität.....	97
4.1.5.4.1	Test auf ADH-Aktivität mit recLuHNL.....	97
4.1.5.4.2	Ortsgerichtete Mutagenese zur Generierung einer ADH-Aktivität.....	99
4.1.5.5	Untersuchung auf Bindung von Nucleotidcofaktoren	101
4.1.5.5.1	Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart von NAD(P) ⁺ und NAD(P)H.....	102
4.1.5.5.2	Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur NAD(P)H-Bindung	104
4.1.5.6	Untersuchung auf Zink-Bindung	112
4.1.5.6.1	Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart von Zn ²⁺ -Ionen.....	113
4.1.5.6.2	Test auf Disulfidbrücken.....	115
4.2	Die Hydroxynitril-Lyase aus <i>Sorghum bicolor</i>	120
4.2.1	Identifizierung der SbHNL-cDNA.....	121
4.2.1.1	5'-RACE [Rapid Amplification of cDNA-Ends].....	121
4.2.1.2	Touch Down PCR mit degenerierten Primern.....	122
4.2.1.3	Herstellung einer partiellen genomischen Bank.....	123
4.2.1.4	Sequenz der SbHNL-cDNA.....	124
4.2.2	Klonierung und Expression der SbHNL in <i>P. pastoris</i>	129
4.2.2.1	Klonierung der SbHNL-cDNA in <i>Pichia</i> -Expressionsvektoren.....	130
4.2.2.2	Transformation von <i>P. pastoris</i> mit SbHNL-cDNA	132
4.2.2.3	Screening auf heterologe Expression der SbHNL-cDNA	132
4.2.2.4	Analyse des sekretorischen Expressionssystems der recSbHNL ohne Leaderpeptid	135
4.2.3	Homologieuntersuchungen der SbHNL zu den Serin-Carboxypeptidasen.....	139
4.2.3.1	Homologie der Primärsequenzen	139
4.2.3.2	Test der SbHNL auf Carboxypeptidase-Aktivität.....	142
4.2.3.3	Homologie-Modell der SbHNL	145

5	Zusammenfassung.....	149
6	Literaturverzeichnis.....	152
7	Anhang.....	164
7.1	Verwendete Primer für die Arbeiten zur <i>LuHNL</i>.....	164
7.1.1	Klonierungsprimer.....	164
7.1.2	Mutageneseprimer.....	164
7.2	Verwendete Primer für die Arbeiten zur <i>SbHNL</i>.....	165
7.2.1	Primer für die 5'-RACE.....	165
7.2.2	Primer für die TD-PCR.....	165
7.2.3	Primer für DNA-Sonde.....	165
7.2.4	Klonierungsprimer.....	165
7.2.5	Primer für Integrationsnachweis.....	165

Abkürzungsverzeichnis

A.bidest	Aqua bidest
abs.	absolut
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Anion-Exchange-Chromatography
Amp	Ampicillin
AOX	Alkohol-Oxidase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMG	Buffered Minimal Glycerol
BMM	Buffered Minimal Methanol
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. maltosa</i>	<i>Candida maltosa</i>
cDNA	copy DNA
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
CIP	Calf intestine phosphatase
CPII-W	Carboxypeptidase II aus Weizen
CP-Y	Carboxypeptidase aus Hefe
CTAB	Cethyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIFP	Diisopropyl-fluorophosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enzyme enhanced Chemoluminescence assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
ExpASy	Expert Protein Analysis System
FAD	Flavinadenindinukleotid
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
gDNA	genomische DNA
GMCO	Glucose-Methanol-Choline-Oxidoreduktase
h	Stunde
H χ χ ADH	Human chi-chi Alkoholdehydrogenase
H σ σ ADH	Human sigma-sigma Alkoholdehydrogenase
HbHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Hevea brasiliensis</i>
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HNL	Hydroxynitril-Lyase
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallchelat- Affinitätschromatographie
IPTG	β -D-Isopropylthiogalaktosid
<i>K. marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
kb	kilobasen
kDa	kilodalton
Kpi	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LB	Luria-Bertani

LuHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Linum usitatissimum</i>
MeHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Manihot esculenta</i>
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triacetic acid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PaHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Prunus amygdalus</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdb	protein data bank
pH	potentia hydrogenium
PhaHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Phlebodium aureum</i>
POD	Peroxidase
PsHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Prunus serotina</i>
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
rec	rekombinant
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SbHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Sorghum bicolor</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	Sulfhydrylgruppe
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TD	Touch Down
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
wt	Wildtyp
XaHNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Ximenia americana</i>
X-Gal	Brom-chlor-indolylgalactosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose
Zeo	Zeocin

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: allgemeine Reaktionsgleichung der Hydroxynitril-Lyasen
- Abbildung 2: Cyanogenese in *Sorghum bicolor* (Hirse) und *Linum usitatissimum* (Lein)
- Abbildung 3: Strukturen der bekannten und natürlich vorkommenden cyanogenen Glykoside
- Abbildung 4: Biosyntheseweg für das cyanogene Glykosid Dhurrin aus *Sorghum bicolor*
- Abbildung 5: Allgemeiner Abbauweg für cyanogene Glykoside (Hickel et al., 1996)
- Abbildung 6: Mögliche Phylogenie der bislang sequenzierten HNLn
- Abbildung 7: Katalysemechanismus der HNL aus *Hevea brasiliensis*
- Abbildung 8: Stereoselektive Folgereaktionen ausgehend von optisch aktiven Cyanhydrinen
- Abbildung 9: Schema der 5'-RACE zur Amplifizierung des 5'-Endes des *SbHNL*-Gens
- Abbildung 10: Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese
- Abbildung 11: Spezifische Aktivitäten der *recLuHNL*(His)₆ im Expressionsvektor pQE9 in verschiedenen *E. coli*-Wirtsstämmen
- Abbildung 12: Spezifische Aktivitäten der *recLuHNL*(His)₆ nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen
- Abbildung 13: *LuHNL*-Expression in *E. coli* AD494
- Abbildung 14: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der *recLuHNL*(His)₆ aus *E. coli* nach IMAC an Ni-NTA-Agarose.
- Abbildung 15: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der *recLuHNL* aus *P. pastoris* GS115 nach IMAC an Ni-NTA-Agarose.
- Abbildung 16: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der *recLuHNL* aus *P. pastoris* SMD1168 nach IMAC an Ni-NTA-Agarose.
- Abbildung 17: N-terminale Aminosäuresequenz des Begleitproteins und dessen Vergleich mittels BLAST
- Abbildung 18: Reinigung verschiedener *Pichia*-Rohextrakte mittels IMAC über Ni-NTA-Agarose
- Abbildung 19: Vergleich der *LuHNL* zur Konsensus-Sequenz bestimmt aus 177 ZnADHn
- Abbildung 20: Sequenzvergleich zwischen *LuHNL* und den ADHn als Basismoleküle des Homologie-Modells
- Abbildung 21: Homologie-Modell des *LuHNL*-Monomers.

- Abbildung 22: Homologie-Modell des generierten *LuHNL*-Muteins T98V
- Abbildung 23: Lage und Orientierung eines potentiell gebundenen NAD-Moleküls im Homologiemodell der *LuHNL*
- Abbildung 24: Langzeitstabilität der *recLuHNL* bei 50°C nach Inkubation mit 10 mM NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H
- Abbildung 25: Jablonski-Diagramm
- Abbildung 26: NAD(P)H-Fluoreszenzspektren [$\lambda_{\text{EXC}} = 365 \text{ nm}$]
- Abbildung 27: Protein-Fluoreszenzspektren [$\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ nm}$]
- Abbildung 28: Potentielle Koordination und Position der Zinkionen im Homologiemodell der *LuHNL*
- Abbildung 29: Stabilität der *recLuHNL* bei 50°C nach Inkubation mit verschiedenen ZnSO₄ - Konzentrationen
- Abbildung 30: Position ausgewählter Cysteinreste im Homologiemodell der *LuHNL*
- Abbildung 31: Vergleichende SDS-PAGE von mit und ohne β -Mercaptoethanol reduzierter *LuHNL*
- Abbildung 32: Schematischer Aufbau der *SbHNL* [Enzym und cDNA]
- Abbildung 33: Touch-down PCR mit Southern Blot-Nachweis
- Abbildung 34: Southern Blot zur Herstellung einer partiellen genomischen Bank aus *Sorghum bicolor*
- Abbildung 35: Sequenz der *SbHNL*
- Abbildung 36: Schema zur Klonierung der *SbHNL*-cDNA in die *Pichia*-Expressionsvektoren pPICZ α (sekretorisch) und pPICZB (intrazellulär)
- Abbildung 37: Western Blot der Kulturüberstände verschiedener *Pichia*-Transformanten
- Abbildung 38: Nachweis der Integration der *SbHNL* in das *Pichia*-Genom mittels PCR unter Verwendung zweier verschiedener DNA-Polymerasen
- Abbildung 39: Volumenaktivität der *recSbHNL* aus *P. pastoris* GS115 nach Langzeitinduktion
- Abbildung 40: Western Blot des Kulturüberstands der Transformante *SbHNL* ohne Leadersequenz in *P. pastoris* GS115
- Abbildung 41: Homologie der *SbHNL* zur Serin-Carboxypeptidase aus Weizen (CPII-W)
- Abbildung 42: Substrate der *SbHNL* [p-Hydroxymandelonitril] und der CPII-W [Tyr-Arg]
- Abbildung 43: SDS-PAGE homogener wt*SbHNL*
- Abbildung 44: Homologiemodell des *SbHNL*- Dimers
- Abbildung 45: Katalytisches Zentrum der *SbHNL* mit einem potentiellen cyanhydrinbindenden Threoninrest

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Einteilung der cyanogenen Glykoside nach ihrer biogenetischen Herkunft
- Tabelle 2: Eigenschaften der HNLn aus höheren Pflanzen
- Tabelle 3: Die in der organische Synthese verwendeten Hydroxynitril-Lyasen
- Tabelle 4: Zusammenfassung der Reinigung der *recLuHNL* aus *P. pastoris* GS115
- Tabelle 5: Reinigung der *recLuHNL*(His)₆ aus *P. pastoris* SMD1168 mittels IMAC an Ni-NTA-Agarose
- Tabelle 6: Spezifische Aktivitäten nach *LuHNL*-Präparationen
- Tabelle 7: Funktion ausgewählter und in ADHn konservierter Aminosäurereste im Vergleich zu den korrespondierenden Resten der *LuHNL*.
- Tabelle 8: Restaktivitäten der verschiedenen *LuHNL*-Muteine
- Tabelle 9: Bestimmung der Carboxypeptidase-Aktivität der *SbHNL* im Vergleich zur C_{PII}-W. Die Spaltung verschiedener Dipeptide und Aminosäureester als Substrate
- Tabelle 10: Mutageneseprimer für die ortsgerichtete Mutagenese der *recLuHNL*

1 Einleitung

Der Einsatz von Enzymen aus biologischen Systemen zur organischen Synthese hat sich zu einem Gebiet mit weitreichender und lukrativer Bedeutung entwickelt (Jones, 1986). Als Biokatalysatoren mit hoher Spezifität und Selektivität bezüglich der Struktur und Stereochemie ihrer Substrate und Produkte beschleunigen sie chemische Reaktionen durch Herabsetzung der Aktivierungsenergie. Insbesondere in der asymmetrischen Synthese durch C-C-Verknüpfung finden ausgewählte Enzyme ihre Nutzung. Neben Aldolasen, Transketolasen und Pyruvatdecarboxylasen katalysieren die in dieser Arbeit beschriebenen Hydroxynitril-Lyasen, kurz Oxynitrilasen, *in vitro* die stereoselektive Bildung von C-C-Bindungen zum Aufbau aliphatischer und carbocyclischer Verbindungen (Theil, 1997; Schmidt & Griengl, 1999; Johnson et al., 2000).

Hydroxynitril-Lyasen (HNLn) katalysieren die reversible Addition von Blausäure an Carbonylverbindungen unter Bildung von α -Hydroxynitrilen bzw. Cyanhydrinen (Abbildung 1).

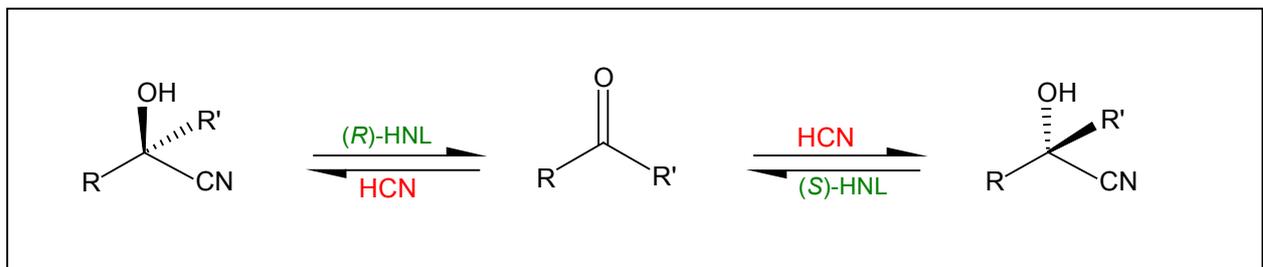


Abbildung 1: allgemeine Reaktionsgleichung der Hydroxynitril-Lyasen

R: Aryl-, Alkylrest; R': H, CH₃

1.1 Vorkommen der HNLn und Cyanhydrine

Cyanhydrine als Substrate der Hydroxynitril-Lyasen konnten in bisher über 3000 Pflanzenarten (Seigler, 1991) sowie vereinzelt auch in Arthropoden - insbesondere Insekten - (Duffey, 1981; Nahrstedt, 1988) und Bakterien (Knowles & Bunch, 1986) bestimmt werden. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Freisetzung von Blausäure bezeichnet man diese Organismen als cyanogen und den Mechanismus selbst als Cyanogenese.

Innerhalb des Pflanzenreiches lassen sich cyanogene Spezies ubiquitär in mehr als 550 Gattungen und 130 Familien nachweisen. Diese Arten findet man sowohl innerhalb der Farne und Gymnospermen als auch bei monokotyledonen und dikotyledonen Angiospermen (Poulton, 1990). Darunter befinden sich auch landwirtschaftlich bedeutsame Futterpflanzen wie Hirse (*Sorghum bicolor*), Leinsamen (*Linum usitatissimum*) und Maniok (*Manihot esculenta*). Die als menschliche Nahrungsquelle in Indien und Afrika dienenden getrockneten Hirsesamen sind glücklicherweise nicht cyanogen, während die jungen Hirsekeimlinge einen ausserordentlich hohen Anteil an cyanogenen Verbindungen beinhalten. Da diese als tierische Futtermittel genutzt werden können, führten sie nicht selten zu Vergiftungserscheinungen ganzer Viehbestände (Gibb et al., 1974; Poulton, 1989; Soto-Blanco et al., 2001). Bis dato wurden HNLn aus einem Dutzend cyanogener Pflanzen aus sechs verschiedenen Familien gereinigt und charakterisiert. In Tabelle 2 sind die am intensivsten untersuchten Vertreter aufgelistet.

Freie Cyanhydrine sind nur in saurem Milieu ($\text{pH} < 5$) stabil (Poulton, 1990). Da die beim Zerfall im neutralen und basischen Milieu freiwerdende Blausäure (HCN) hochtoxisch ist, liegen diese in der Zelle in der Regel fixiert an Glykosiden, seltener Lipiden, vor. Diese Speicherformen werden als cyanogene Glykoside (Cyanglykoside) bzw. cyanogene Lipide (Cyanlipide) bezeichnet. Bislang sind ca. 70 verschiedene Formen cyanogener Glykoside vorwiegend innerhalb von 300 Familien der *Fabaceen*, *Rosaceen*, *Linaceen* und *Compositae* u.a. beschrieben worden (Vetter, 2000). Cyanlipide beschränken sich weitestgehend auf die Familie der *Sapindaceen* (Poulton, 1990).

1.2 Cyanogenese bei höheren Pflanzen

Pflanzen besitzen einen ausgeprägten Sekundärmetabolismus zur Synthese von Verbindungen, die nicht unmittelbar an der Energiegewinnung oder anderen lebenswichtigen biosynthetischen Prozessen der Zelle beteiligt sind. Zahlreiche dieser Sekundärmetabolite dienen - wie die cyanogenen Glykoside oder auch mikrobielle Antibiotika - ihrem Produzenten zur Abwehr konkurrierender oder potentiell schädigender Organismen.

So wird das Phänomen der Cyanogenese, sprich die Freisetzung toxischer Blausäure, im wesentlichen als Abwehrstrategie („Repellent“) gegen potentielle Fressfeinde (Herbivore) interpretiert (Proksch, 1991).

Die durch Dissoziation gebildeten Cyanidionen sind in der Lage, Eisenionen zu komplexieren und wirken somit als starke Inhibitoren der Cytochrom c-Oxidase, einem Schlüsselenzym der mitochondrialen Elektronentransportkette, indem sie die funktionelle Häm-Gruppe im sauerstofftransportierenden Hämoglobin blockieren. Man bezeichnet die Blausäure deshalb als Atmungsgift (Alberts et al., 1989). Neben der Blausäure als wichtigstem Effektor, haben auch die koordinativ gebildeten Carbonylverbindungen oft einen cytotoxischen Effekt (Nahrstedt, 1985). Darüberhinaus haben auch die Cyanglykoside selbst einen meist bitteren Geschmack, welcher ebenso eine Fraßschutzfunktion ausüben kann (Proksch, 1991). Die Summe aller cyanogenen Verbindungen in einer Pflanze oder einem Gewebe wird als cyanogenes Potenzial bezeichnet (Nahrstedt, 1988). In manchen Pflanzengeweben, wie z.B. im Samen von *Prunus amygdalus* (bitteren Mandeln), liegen bis zu 300 mg HCN je 100 g Frischgewicht gebunden vor. Dies entspricht theoretisch einer *dosis letalis* (DL) für 4-5 erwachsene Menschen (DL: 1mg HCN/kg Körpergewicht). Bei der Aufnahme cyanogener Pflanzenteile wird die fixierte Blausäure jedoch nicht schlagartig frei, sondern je nach Zerkleinerungsrate, β -Glykosidase- und HNL-Aktivität, pH-Bedingungen und Wassergehalt erfolgt eine verzögerte HCN-Freisetzung. Effektive Entgiftungsmechanismen können bei den meisten Organismen für eine Metabolisierung des Cyanids sorgen. Eine in Säugern realisierte Detoxifizierung ist die Umsetzung mit Hilfe von Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) durch das Enzym Rhodanase. Das dabei entstehende Thiocyanat (SCN^-) wird nur sehr langsam abgebaut und ist für einige chronische Effekte bei Blausäurevergiftungen verantwortlich (Nahrstedt, 1988). Viele Pflanzen, Insekten und Bakterien metabolisieren HCN jedoch durch Reaktion mit Cystein oder Serin mittels der β -Cyanoalanin-Synthase zu β -Cyanoalanin. Letzteres ist eine Asparaginvorstufe und wird in den Aminosäurestoffwechsel eingeschleust. In diesem Falle wird von einer Refixierung des Stickstoffs der cyanogenen Verbindungen gesprochen. Deshalb kann neben ihrer ökologischen Bedeutung eine Funktion der Cyanhydrine als Stickstoffspeicher bzw. Transportmetabolite nicht ausgeschlossen werden (Poulton, 1990).

Das HCN-Potenzial von zum Verzehr geeigneten Leinsamen beträgt ca. 50 mg / 100 g, die jedoch wegen ihres geringen Wassergehaltes und zu saurer pH-Werte des Magens zu einer Intoxikation beim Menschen nicht ausreichen. In den Keimlingsspitzen von *Linum usitatissimum* hingegen befindet sich eine glykosidisch fixierte HCN-Menge von 910 mg / 100 g (Nahrstedt, 1988). *Sorghum bicolor* besitzt in seinen Sprossspitzen ein cyanogenes Potenzial von 240 mg / 100 g Pflanzenmaterial, wohingegen in grünem Blattmaterial nur noch 60 mg / 100 g nachweisbar sind (Nahrstedt, 1985). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die höchsten Konzentrationen an enzymatisch freisetzbarem HCN meist in den für eine Reproduktion wichtigen Pflanzenteilen (Samen, Früchten, Blüten) lokalisiert bzw. in jungen Entwicklungsstadien zu finden sind (Nahrstedt, 1985). Somit bietet der „Cyanogenese-Apparat“ einen entscheidenden Selektionsvorteil. Die Menge an gebildeten cyanogenen Glykosiden und ihr Turnover sind neben dem Entwicklungsstadium der jeweiligen Pflanze auch von tages- und jahreszeitlichen Bedingungen, der Nährstoffversorgung und genetischen Faktoren abhängig (Poulton, 1989; Adewusi, 1990).

Ausgehend vom Cyanglykosid ist die Cyanogenese ein zweistufiger Spaltprozess und in Abbildung 2 exemplarisch für die beiden im Rahmen dieser Arbeit gegenständlichen Pflanzenarten *Linum usitatissimum* (Lein) und *Sorghum bicolor* (Hirse) dargestellt.

Zunächst wird das cyanogene Glykosid durch eine β -Glykosidase in einen Zuckerrest (Glykon) und ein Cyanhydrin (Aglykon) gespalten. Anschließend zerfällt das Cyanhydrin spontan in neutralem oder basischem Medium in HCN und das korrespondierende Aldehyd oder Keton. Eine Beschleunigung dieser Reaktion bis um das Zwanzigfache kann enzymatisch, insbesondere im leicht saurem Milieu mazerierter Pflanzenteile, durch spezifische HNLn ermöglicht werden. Das HCN-produzierende System, bestehend aus diesen beiden Enzymen und ihren Substraten, liegt auf zellulärer oder subzellulärer Ebene räumlich getrennt vor, weshalb aus intakten bzw. gesunden cyanogenen Pflanzen in der Regel keine Freisetzung der Blausäure erfolgt. Erst nach Aufhebung dieser Kompartimentierung durch Verletzung des Pflanzengewebes werden signifikante Mengen an HCN abgegeben (Nahrstedt, 1988). Dies unterstreicht die Rolle der Cyanogenese als Fraßschutzmechanismus, da der Befall durch Fressfeinde im allgemeinen mit einer mechanischen Schädigung der Gewebebestandteile einhergeht.

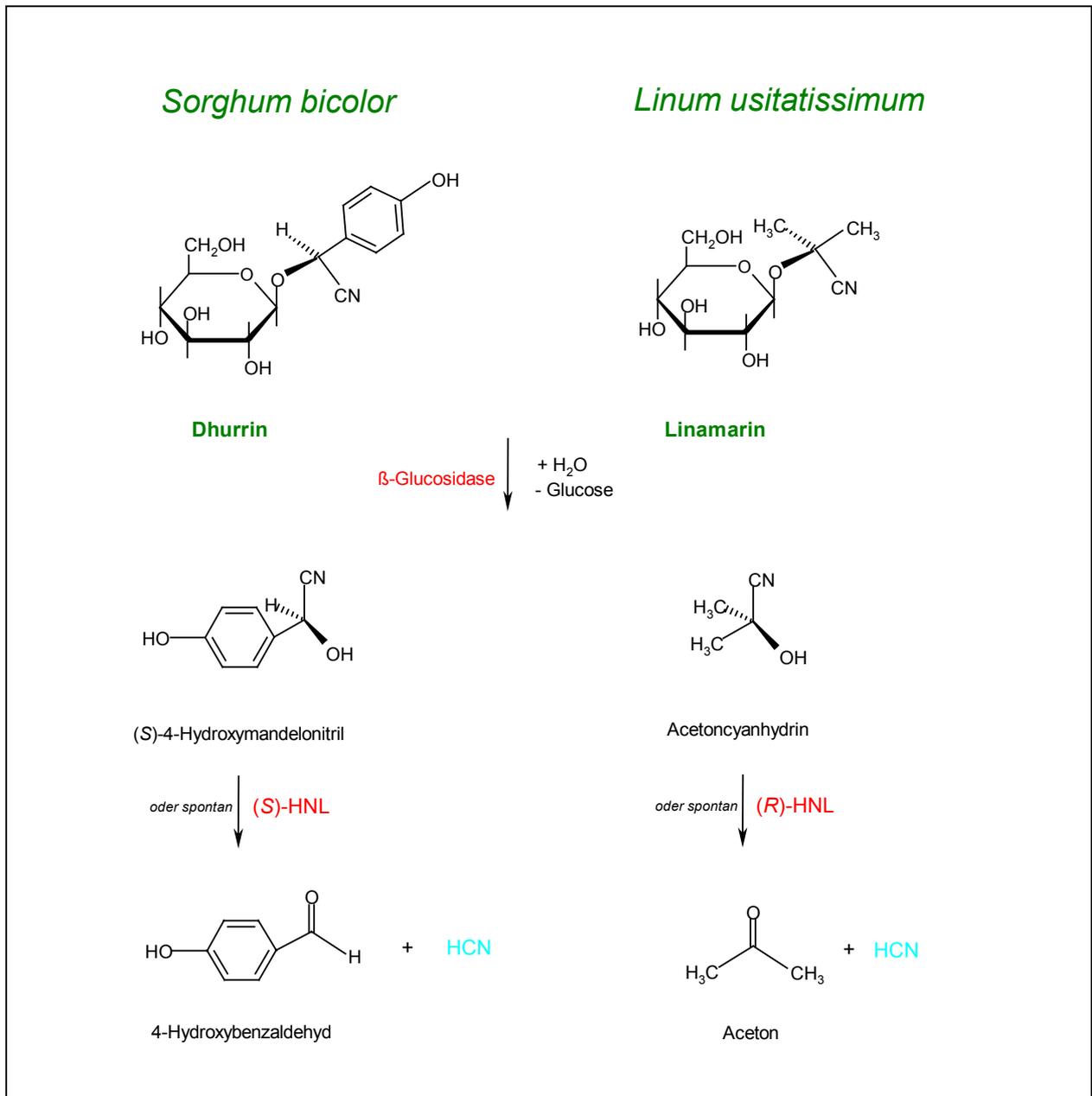


Abbildung 2: Cyanogenese in *Sorghum bicolor* (Hirse) und *Linum usitatissimum* (Lein)

1. Schritt: β -Glucosidase spaltet das cyanogene Glykosids in glykolytischen Rest und Cyanhydrin
2. Schritt: HNL spaltet das Cyanhydrin in HCN und die korrspondierende Carbonylverbindung

1.3 Struktur, Funktion und Metabolismus der Cyanglykoside

Die bisher fast 75 dokumentierten cyanogenen Glykoside sind alle O- β -glykosidische Derivate von α -Hydroxynitrilen. Die Strukturen dieser Aglyka sind abhängig von ihren Aminosäurevorstufen und können aliphatischer, aromatischer oder pentacyclischer Natur sein. Der die α -Hydroxynitrile stabilisierende Zuckerrest ist meist ein Monosaccharid, seltener ein Di- oder Trisaccharid.

Die natürlich vorkommenden cyanogenen Glykoside der höheren Pflanzen lassen sich nach ihrer chemischen Struktur (Nahrstedt, 1973; North, 1993; Vetter, 2000) oder der biogenetischen Herkunft ihres Aglykons (Seigler, 1977; Conn, 1980; Seigler, 1991) einteilen. Zum einen kann die Einteilung in 4 verschiedene Typen, benannt nach dem Repräsentanten einer Gruppe, erfolgen (Abbildung 3). Die erste Gruppe umfasst den Amygdalintyp mit Benzaldehydcyanhydrin als aromatischer Grundstruktur. Dieser Typ ist vor allem bei den *Rosaceen* und *Gramineen* - wie z.B. *Sorghum bicolor* - zu finden. Der Linamarintyp, welcher insbesondere bei den *Linaceen* - wie z.B. *Linum usitatissimum* - vertreten ist, zeichnet sich durch gesättigte, aliphatische Ketoncyanhydrine aus (Cutler & Conn, 1981). Beim Gynocardintyp finden sich Cyclopentanoncyanhydrine als Aglyka und beim Acacipetalintyp α/β -ungesättigte Aldehydcyanhydrine. Ersteren Vertreter findet man insbesondere bei *Passifloraceen* und letzteren Typ bei *Mimosaceen*.

Bei biogenetischer Betrachtungsweise kann man die cyanogenen Verbindungen nach ihren Ausgangssubstanzen - meist proteinogene Aminosäuren (AS) - klassifizieren (Hegnauer, 1986). In Tabelle 1 sind die bekanntesten Beispiele aufgeführt.

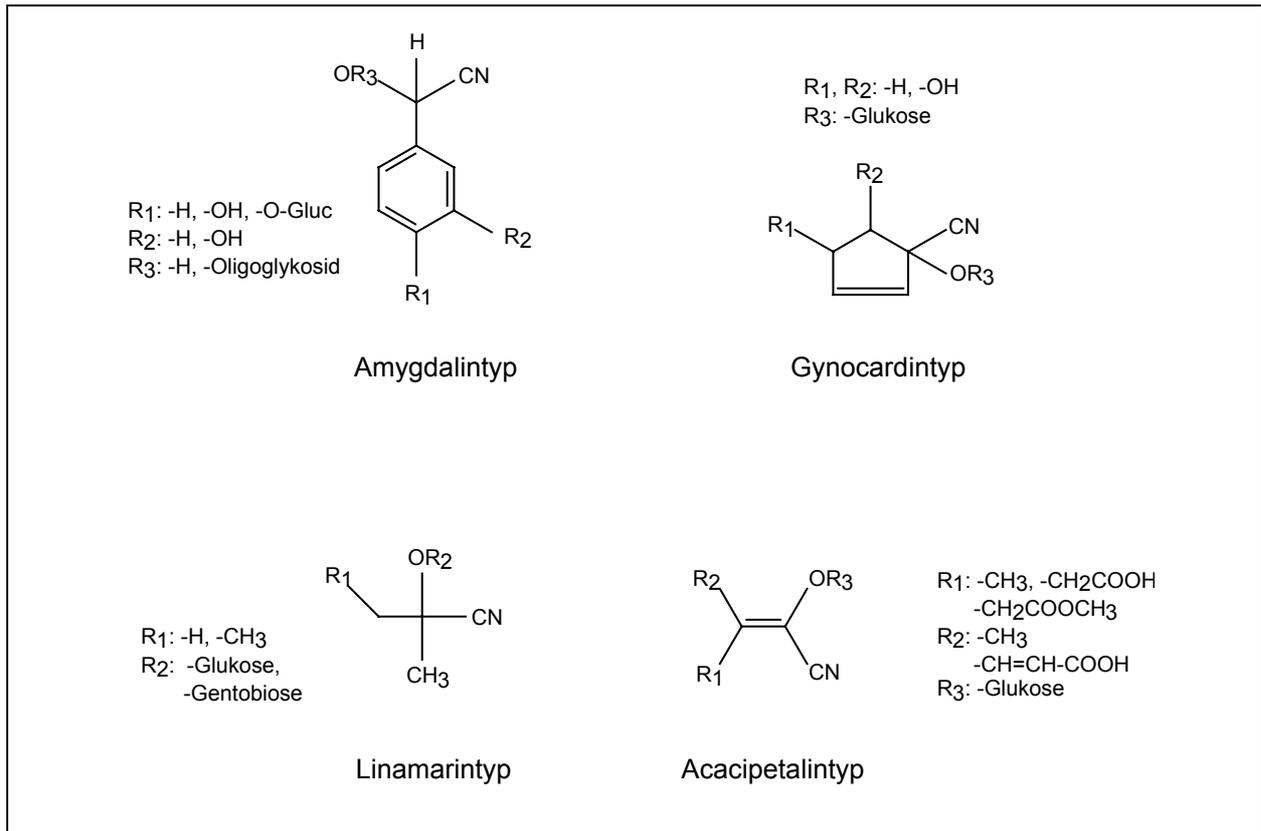


Abbildung 3: Strukturen der bekannten und natürlich vorkommenden cyanogenen Glykoside (North, 1993)

Tabelle 1: Einteilung der cyanogenen Glykoside nach ihrer biogenetischen Herkunft

Biogenetische Gruppe	Beispiel	Zuckerkomponente	Vorkommen
L-Phenylalanin	Amygdalin	Gentobiose	<i>Prunus</i> spp.
L-Tyrosin	Dhurrin	D-Glukose	<i>Sorghum</i> spp.
L-Valin / L-Isoleucin	Linamarin	D-Glukose	<i>Linum</i> spp.
L-Leucin	Cardiospermin	D-Glukose	<i>Sorbaria</i> spp.
2-Cyclopentenylglycin	Gynocardin	D-Glukose	<i>Gynocardia</i> spp.
Nikotinsäure	Acalyphin	D-Glukose	<i>Euphorbia</i> spp.

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, besitzen alle cyanogenen Glykoside β -glykosidisch gebundene D-Glukose als Zuckerkomponente. Die meisten Ausnahmen verteilen sich auf zwei biogenetische Gruppen (Valin/Isoleucin- und Phenylalanin-Gruppe) und enthalten ein Disaccharid als Zuckeranteil (Conn, 1981). Ein bekanntes Beispiel ist das Amygdalin der Schwarzkirsche (*Prunus serotina*) und bitteren Mandeln (*Prunus amygdalus*). Dieses cyanogene Glykosid besteht aus Mandelsäurenitril und Gentobiose [β -1,6-Glucosylglucose]. Die Zuckerreste dienen in erster Linie der Fixierung des Cyanhydrins, um es vor spontanem Zerfall zu schützen. Interessant war die Entdeckung des cyanogenen Diglukosids Dhurrin-6'-Glucosid in *Sorghum bicolor* (Selmar et al., 1996). Dessen Nachweis in Guttations-Tröpfchen der Pflanze unterstreicht eine Hypothese, welche für Diglykoside eine Rolle als vor Abbau geschützten Transportmetaboliten postuliert. Im „Linustatin-pathway“ fand diese Hypothese ihre Formulierung (Selmar et al., 1988). Die im Endosperm von *Hevea* gebildeten und gespeicherten Mengen an dem cyanogenen Monoglucosid Linamarin werden in die Organe des wachsenden Sämlings geschleust. Zum Schutz vor apoplastischer Hydrolyse während des Transportes wird das Linamarin mit einem weiteren Glukoserest versehen. Das entstandene cyanogene Diglukosid Linustatin dient in dieser Form *in vivo* als Transportmetabolit. Für die Familie der *Asteraceen* sind in den letzten Jahren auch Tri- und Tetrasaccharide als Zuckerreste ihrer cyanogenen Glykoside nachgewiesen worden (Seigler, 1991).

1.3.1 Anabolismus der Cyanglykoside

Als Ausgangssubstanzen für die Biosynthese des Cyanhydrinrestes cyanogener Glykoside dienen die fünf hydrophoben, proteinogenen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin, die nicht proteinogene Aminosäuren 2-Cyclopentenylglycin, sowie Nikotinsäure (Hegnauer, 1986; Seigler, 1991). Eine Umsetzung dieser Säuren in die korrespondierenden α -Hydroxynitrile erfolgt über N-Hydroxysäuren, Aldoxime und Nitrile als Intermediate des Synthesewegs. Die erste und bisher am besten untersuchte Aufklärung eines Biosynthesewegs für ein Cyanglykosid gelang bei der Hirse mit Dhurrin [β -D-glucopyranosyloxy-(S)-p-hydroxymandelonitril] bzw. dessen aglykonischem Rest p-Hydroxymandelsäurenitril (Abbildung 4).

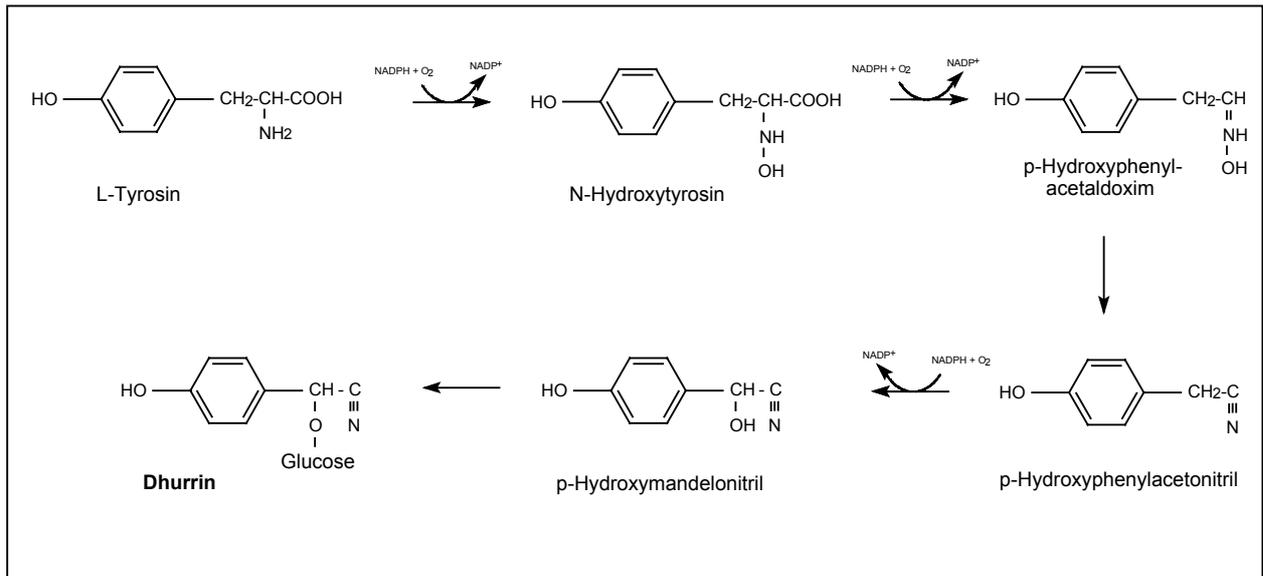


Abbildung 4: Biosyntheseweg für das cyanogene Glykosid Dhurrin aus *Sorghum bicolor*

Tyrosin wird zunächst NADPH- und O_2 -abhängig in N-Hydroxytyrosin umgewandelt. Dieses wird dann über die Intermediate p-Hydroxyphenylacetaldoxim und p-Hydroxyphenylacetonitril, wiederum NADPH- und O_2 -abhängig, zum p-Hydroxymandelsäurenitril umgesetzt. Ein membrangebundenes Enzymsystem ist an diesen Reaktionen beteiligt. Das p-Hydroxymandelsäurenitril wird dann durch eine im Cytosol befindliche Glykosyltransferase β -glykosidisch an Glukose gebunden.

An biosynthetisch aktiven Mikrosomen-Präparationen aus etiolierten Hirsekeimlingen konnte die *in vitro* Umwandlung von Tyrosin in p-Hydroxymandelsäurenitril gezeigt werden (Møller & Conn, 1980). Reay und Conn beschrieben bereits 1974 *in vivo* den finalen Schritt der Biosynthese, die Umwandlung des p-Hydroxymandelsäurenitril in Dhurrin durch eine O-Glykosyltransferase (E.C. 2.4.1) mit einem UDP-aktiviertem Zuckerrest. Durch den Einsatz von ^{18}O -markierten potentiellen Zwischenprodukten gelang es, den größten Teil der ablaufenden Reaktionen zur Biosynthese des Dhurrins aufzuklären (Møller & Conn, 1980; Halkier & Møller, 1989; Halkier & Møller, 1990). Es wurde erklärt, dass die Synthese sowohl O_2 - als auch NADPH-abhängig ist (Conn, 1981; Halkier et al., 1988). Die beiden Reaktionen die zur Bildung des N-Hydroxytyrosins und des p-Hydroxymandelonitrils führen, werden von Enzymen des Cytochrome P450-Systems katalysiert (Sibbesen et al., 1994; Kahn et al., 1999). Erst kürzlich wurde *Arabidopsis thaliana* mit den diese beiden Enzyme kodierenden Genen transformiert, um eine Herbivor-Resistenz gegen den Erdfloh *Phyllotreta nemorum* zu erzeugen (Tattersall et al., 2001).

Eine weitgehende Aufklärung der Biosynthesewege mit Hilfe biosynthetisch aktiver, mikrosomaler Enzympräparationen gelang dann auch für *Linum usitatissimum* (Cutler & Conn, 1981; Cutler et al., 1985). Abgesehen von der abschließenden Glykosylierung der Cyanhydrine erfolgen alle Biosyntheseschritte an membrangebundenen Enzymkomplexen (McFarlane et al., 1975; Halkier & Møller, 1989). Im Gegensatz zur sehr gut untersuchten Chemie des Cyanhydrinabolismus ist über dessen Regulation nur sehr wenig bekannt.

1.3.2 Katabolismus der Cyanglykoside

Für die *in vivo* Freisetzung von HCN aus Cyanglykosiden in cyanogenen Pflanzen sind zwei Abbauschritte notwendig. Zunächst wird mittels einer Glykosidase der Zuckerrest vom Cyanhydrin gespalten (Poulton, 1990). Diese Reaktion hat die Schlüsselfunktion in der Cyanogenese, da das freie Cyanhydrin bei physiologischen pH-Werten spontan in Blausäure und die korrespondierende Carbonylverbindung zerfällt. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion nimmt mit sinkenden pH-Werten ab und wird durch einen zweiten enzymatischen Schritt der HNL, mit Aktivitätsoptimum im sauren Bereich (pH 5-6), katalysiert. Insbesondere in Zellorganellen mit schwach saurem pH-Wert - Vakuole, Chloroplasten, Lysosomen – kann eine Beschleunigung der HCN-Freisetzung mittels HNL sinnvoll sein.

Die eine Cyanogenese einleitenden Glykosidasen zeichnen sich durch eine hohe Substratspezifität für die in der jeweilige Pflanze vorkommenden cyanogenen Glykoside aus (Hösel et al., 1987). Die pH-Optima aller bisher untersuchten Glykosidasen liegen im sauren Bereich (pH 4-6) und bis auf wenige Ausnahmen besitzen sie alle einen isoelektrischen Punkt (IP) zwischen 4 und 6 (Poulton, 1988). Während das native Molekulargewicht der in die HCN-Freisetzung involvierten Glykosidasen sehr variiert (40-600 kDa), ist ihnen meist der Aufbau aus 55-65 kDa schweren Untereinheiten gemeinsam (Hösel et al., 1987). Für die Abspaltung von Cyanhydrinen aus cyanogenen Disacchariden sind zwei Abbauwege möglich:

Zum einen kann die Aglykon-Disaccharid-Bindung -simultane Diglucosidase- gespalten werden, wie im Farn *Davallia trichomanoides* durch eine Vicianin-Hydrolase beschrieben (Lizotte & Poulton, 1988), oder die beiden Zuckerreste werden sukzessive abgespalten -sequentielle Diglucosidase- (Poulton, 1990).

Diese schrittweise Deglykosylierung mit zwei verschiedenen β -Glukosidasen findet man in Leinsamen, welche entgegen der Aussage mancher Lehrbücher die Diglucoside Linustatin und Neolinustatin und seltener die entsprechenden Monosacharide Linamarin und Lotaustralin enthalten (Fan & Conn, 1985). Die beiden β -Glukosidasen Linustatinase und Linamarase katalysieren die sequenzielle Hydrolyse der Gentobioseeinheit und generieren Acetoncyanhydrin bzw. Methylethylketoncyanhydrin. Die cyanogenen Monoglykoside Linamarin und Lotaustralin kommen dagegen ausschließlich in den vegetativen Teilen der Flachspflanze vor (Nahrstedt, 1988).

Auf die Eigenschaften der **HNLn** als Cyanhydrin-spaltende Enzyme wird in Kapitel 1.4 ausführlich eingegangen.

Signifikante Mengen an HCN werden von cyanogenen Pflanzen nur im Falle von Gewebeverletzungen freigesetzt, wie sie bei Schädlings- bzw. Pilzbefall oder bei mechanischen Verletzungen auftreten. Es wurde daher schon früh spekuliert, dass gesunde, intakte Pflanzen den Abbau cyanogener Glykoside durch Kompartimentierung von Substrat und katabolen Enzymen verhindern (Wu & Poulton, 1991). Untersuchungen über die Lokalisation der Cyanglykoside und der katabolischen Enzyme auf zellulärer und histologischer Ebene wurden hauptsächlich an *Sorghum bicolor*, *Linum usitatissimum*, *Hevea brasiliensis* und *Prunus serotina* durchgeführt (Conn, 1991). In diesen wenigen bisher untersuchten Fällen konnte sowohl eine zelluläre Kompartimentierung als auch eine räumlich Trennung in verschiedenen Gewebearten bestätigt werden. Der am besten untersuchte Modellorganismus in Hinblick darauf sind junge Hirsekeimlinge. Ihr Substrat Dhurrin findet man in den Vakuolen epidermaler Zellen (Saunders & Conn, 1978), die abbauenden Enzyme Dhurrinase - Dhurrin- β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) - und HNL hingegen sind im Cytosol der Mesophyllzellen lokalisiert (Kojima et al., 1979; Thayer & Conn, 1981). Geringere Mengen an HNL wurden auch in Epidermis- und Bündelscheidenzellen gefunden. Auf subzellulärer Ebene wurde immunocytologisch die höchste HNL-Konzentration im Cytoplasma detektiert, jedoch konnten auch geringe Mengen einer Lokalisation in nicht genauer definierten Zellorganellen zugeordnet werden. In den Vakuolen und Zellwänden konnte keine HNL nachgewiesen werden (Kojima et al., 1979). Dies gilt ebenso für die HNL aus *Linum usitatissimum* (Wajant et al., 1994b). Die höchste β -Glukosidaseaktivität hingegen ist chloroplastenassoziiert (Thayer & Conn, 1981).

Sogar auf organischer Ebene konnte eine Kompartimentierung der HNLn in *Sorghum* und *Linum* nachgewiesen werden. Nur in den Kotyledonen und bei *Sorghum* wurde zusätzlich in den Blättern eine HNL-Aktivität beobachtet. Wurzeln, Stengel und Blüten scheinen HNL-frei zu sein (Wajant et al., 1994a). Die meisten cyanogenen Glykoside werden in den Vakuolen gefunden, da diese ein oft saures Medium enthalten, welches freie Cyanhydrine vor Hydrolyse schützen. Bisher jedoch konnte das Linamarin, als Cyanglykosid aus *Linum usitatissimum*, noch nicht genau lokalisiert werden. Ihre β -Glucosidase scheint zellwandassoziiert vorzuliegen (Nahrstedt, 1985). In *Hevea* findet sich die Linamarase im apoplastischen Raum und die HNL im Cytoplasma (Hickel et al., 1996). Bei *Prunus* findet man das Amygdalin im Parenchym der Kotyledonen (Poulton & Li, 1994), wohingegen die beiden Glykosidasen [Amygdalin-Hydrolase und Prunasin-Hydrolase] in den Leitbündelzellen lokalisiert sind (Swain et al., 1992). Ihre HNL befindet sich in der Zellwand von Kotyledonzellen und des Endosperms (Wu & Poulton, 1991).

Die im Zuge des Katabolismus cyanogener Glykoside entstandene Blausäure, kann nun auf 2 Arten ihren Einsatz finden. Zum einen in ihrer Hauptfunktion als gasförmig freigesetzte Abwehrsubstanz gegen Fressfeinde oder Pilzbefall, zum anderen nach Refixierung als N-Quelle zur Aminosäuresynthese. Dabei wird das HCN zunächst durch die β -Cyanoalanin Synthetase an Cystein gebunden und anschließend durch die β -Cyanoalanin Hydrolase in L-Asparaginsäure und H_2S gespalten.

Einen Überblick über den Abbau cyanogener Glykoside und die Metabolisierung der gebildeten Blausäure ist in Abbildung 5 dargestellt.

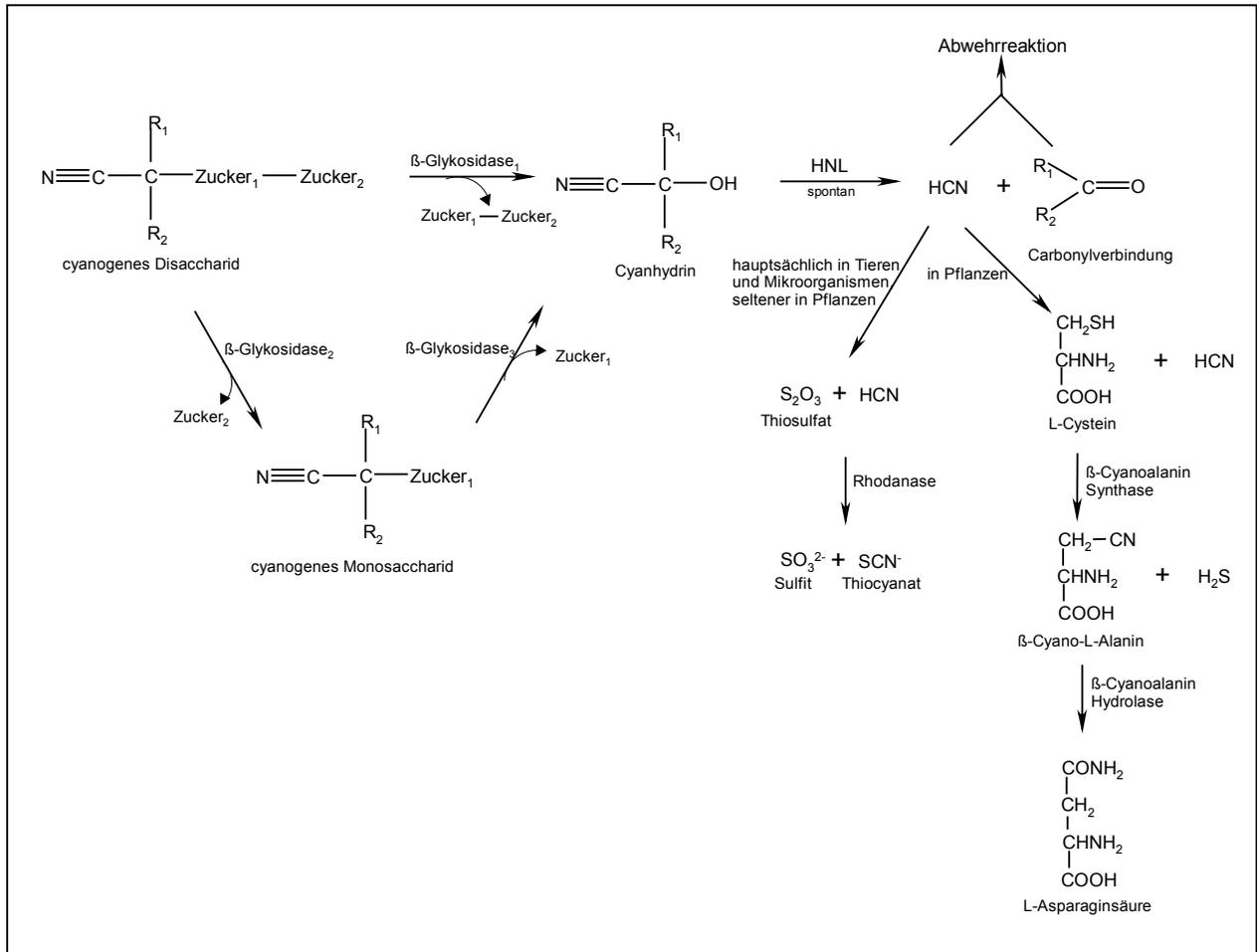


Abbildung 5: Allgemeiner Abbauweg für cyanogene Glykoside (Hickel et al., 1996)
Erläuterungen im Text

1.4 Biochemische Eigenschaften der HNLn

Insgesamt sind bisher 14 pflanzliche HNLn aus sechs verschiedenen Familien beschrieben worden. Es handelt sich dabei um eine Gruppe sehr heterogener Enzyme, die sich hinsichtlich Primärstruktur, Molekulargewicht, Anzahl der Untereinheiten, Cofaktorabhängigkeit und Glykosylierungsmuster stark unterscheiden. Eine Einteilung der HNLn erfolgt in zwei Gruppen, klassifiziert entweder nach ihrer Stereospezifität - (*R*)-HNL oder (*S*)-HNL - oder nach ihrem Flavin-Adenin-Dinukleotid [FAD]-Gehalt (Hickel et al., 1996). Die folgende Beschreibung der HNLn folgt der Klassifizierung nach dem FAD-Gehalt.

Tabelle 2: Eigenschaften der HNLN aus höheren Pflanzen

Art	Familie	Stereo-selektivität	Molekulargewicht [kDa]	natürliches Substrat (cyanog. Glykosid)	Glykosylierung	pH-Optimum/ pl	strukturelle Verwandtschaft	3D-Struktur	Referenz
FAD-haltige HNLN									
<i>Prunus amygdalus</i>	Rosaceae	R	nativ: 72±2 SDS-PAGE: 72±2 Monomer	(R)-Mandelsäurenitril (Amygdalin/Prunasin)	+	5,5-6,0/ 4,4-4,5	Glukose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen	Kristallstruktur	Becker & Pfeil, 1966; Smitzkamp et al., 1991; Jansen et al., 1992; Dreveny, 2001
<i>Prunus serotina</i>	Rosaceae	R	nativ: 56 SDS-PAGE: 58±1 Monomer	(R)-Mandelsäurenitril (Amygdalin/Prunasin)	+	6,0-7,0/ 4,6	Glukose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen	Homologie-modell	Yemm & Poulton, 1986; Wu & Poulton, 1991; Cheng & Poulton, 1993; Hu & Poulton, 1999
FAD-freie HNLN									
<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	R	nativ: 82-87 SDS-PAGE: 42-43 Homodimer	Acetonycyanhydrin (Linamarin/Lotaustralin)	-	5,5/ 4,5-4,8	zinkabhängige Alkohol-/Aldehyd-dehydrogenasen	Homologie-modell *	Xu et al., 1988; Albrecht et al., 1993; Wajant et al., 1994b; Breitaupt et al., 1999
<i>Phlebotidium aureum</i>	Filiataceae	R	nativ: 168±35 SDS-PAGE: 20 Multimer	(R)-Mandelsäurenitril ((R)-Vicianin)	-	6,5	?	-	Wajant et al., 1995b
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	S	nativ: 92-123 SDS-PAGE: 29±1 Homotrimer/ Homotetramer	Acetonycyanhydrin (Linamarin/Lotaustralin)	-	5,4/ 4,1-4,6	?	Kristallstruktur	Wajant & Pfitzenmeier, 1996; Hughes et al., 1994; Cheng et al., 2000
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	S	nativ: 58 SDS-PAGE: 30±1 Homodimer	Acetonycyanhydrin (Linamarin)	-	5,5-6,0/ 4,1	?	Kristallstruktur	Selmar et al., 1989; Wajant & Effenberger, 1996; Hasslacher et al., 1996; Hasslacher et al., 1997a&b
<i>Sorghum bicolor</i>	Gramineae	S	nativ: 103±3 SDS-PAGE: 33 & 23 Heterotetramer	(S)-p-Hydroxy-mandelsäurenitril (Dhurrin)	+	5,5-6,0/ 4,5	Serincarboxypeptidasen	Homologie-modell *	Bové & Conn, 1961; Niedermeyer & Kula, 1990; Wöker et al., 1992; Jansen et al., 1992; Wajant et al., 1994a&b;
<i>Ximenia americana</i>	Oleaceae	S	nativ: 110 SDS-PAGE: 40±1 Monomer/ Homooligomer	(S)-Mandelsäurenitril (Sambunigrin)	+	5,5/3,9	?	-	Kuroki & Conn, 1989

*: eigene Daten

1.4.1 Flavoprotein HNLn

FAD-haltige HNLn wurden exklusiv in der Familie der *Rosaceen* bzw. ihren Subfamilien der *Prunoideae* und *Maloideae* gefunden. Bekannteste Vertreter sind die *PaHNL* aus *Prunus amygdalus* [Mandeln] und der *PsHNL* aus *Prunus serotina* [Schwarzkirsche]. Beide Enzyme sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 92% identisch (Cheng & Poulton, 1993). Außerdem wurden weitere HNLn aus Kernen von Äpfeln (*Mammea americana*), Kirschen (*Prunus capuli*) und Aprikosen isoliert (Kiljunen & Kanerva, 1997; Solis et al., 1998).

Bei den Flavoprotein-HNLn handelt sich um monomere Glykoproteine mit einem nativen Molekulargewicht von 58-66 kDa [HNLn der *Punoideae*] respektive 75-82 kDa [HNLn der *Maloideae*] und einem Kohlehydratanteil von bis zu 30% (Poulton, 1988). Als natürliches Substrat dient allen FAD-haltigen HNLn das (*R*)-Mandelsäurenitril, das chirale Aglykon der in *Rosaceen* vorkommenden cyanogenen Glykoside Amygdalin und Prunasin (Seigler, 1991). Die meist in Form verschiedener Isoenzyme vorkommenden HNLn benötigen nur eine geringe Anreicherung (5-10 fach) bis zu ihrer Homogenität (Poulton, 1988; Jansen et al., 1992; Woker et al., 1994). Aufgrund ihrer kaum zu unterscheidenden biochemischen Eigenschaften und ihres Vorkommens in einer systematisch definierten Pflanzengruppe scheinen sie einer gemeinsamen phylogenetischen Entwicklungslinie zu entstammen. Diese Vermutung wird durch ihre starke serologische Verwandtschaft unterstützt (Gerstner & Pfeil, 1972). Die nicht kovalent gebundene prosthetische Gruppe ist als Redoxfaktor an der nicht Redox-katalysierten Lyasereaktion der Cyanhydrinspaltung unbeteiligt, scheint jedoch für die Katalysefähigkeit aufgrund einer strukturerhaltenden Eigenschaft des Enzyms von Bedeutung zu sein. Das FAD ist in einer hydrophoben Region nahe des aktiven Zentrums lokalisiert (Pfeil & Gerstner, 1972; Jorns, 1979). Die von Dreveny et al. (2001) aktuell veröffentlichte Kristallstruktur der *PaHNL* zeigt eine starke Ähnlichkeit zu der Familie der Glucose-Methanol-Cholin (GMC)-Oxidoreduktasen. Diese strukturelle Verwandtschaft legt die Vermutung nahe, dass der Cofaktor ein evolutionäres Relikt des Oxidoreduktase-Vorläufers ist.

1.4.2 FAD-freie HNLn

Die Gruppe der FAD-freien HNLn sind im Gegensatz zu den Flavoprotein-HNLn heterogener in ihrer Struktur und wurden aus verschiedenen Familien dikotyledoner – *Linaceen*, *Euphorbiaceen* und *Olaceen* – sowie monokotyledoner – *Gramineen*, *Polypodiaceen* – Arten isoliert. Sie unterscheiden sich zum Teil stark in Bezug auf Kohlenhydratgehalt, Molekulargewicht, Primärstruktur, und dem Aufbau ihrer Untereinheiten. Es existieren sowohl (*R*)- als auch (*S*)-stereospezifische HNLn, die in ihrer natürlichen Substratwahl variieren. Außerdem ist eine weitaus stärkere Anreicherung der Enzyme nötig, um sie in ihrer reinsten Form zu erhalten (100-1500 fach) (Hickel et al., 1996). Die als Enzymquellen dienenden Arten der bisher eingehend untersuchten HNLn stammen alle aus unterschiedlichen Pflanzenfamilien. Einzige Ausnahme sind die aus den *Euphorbiaceen* isolierten HNLn *Manihot esculenta* (*MeHNL*) und *Hevea brasiliensis* (*HbHNL*), welche auch hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz die größten Übereinstimmungen (75%) zeigen. Dies impliziert offensichtlich auch eine ausgeprägte Strukturähnlichkeit -nichtglykosylierte Homooligomere mit einem MG von 30 kDa pro Untereinheit- und den Umsatz von (*S*)-Acetoncyanhydrin als gemeinsamem Substrat (Wajant et al., 1995a, Förster et al., 1996). Auf spezifische Antisera zeigen beide Enzyme untereinander Kreuzreaktionen (Wajant & Effenberger, 1996). Andere ausführlich beschriebene und in Tabelle 2 vorgestellte Vertreter sind jene HNLn aus *Sorghum bicolor* (*SbHNL*), *Linum usitatissimum* (*LuHNL*), *Ximenia americana* (*XaHNL*) und dem Farngewächs *Phlebodium aureum* (*PhaHNL*).

Die (**S**)-spezifische **SbHNL** aus *Gramineen* ist ein heterotetrameres Enzym mit einem nativen MG von 112 kDa und einem N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratanteil von ca. 7% (Smitskamp-Wilms et al., 1991; Wajant & Mundry, 1993). Die dimere Untereinheit, bestehend aus einer 33 kDa schweren Kette und einer 23 kDa leichten Kette, erhält essentielle posttranslationale Modifikationen. Neben der proteolytischen Spaltung und Glykosylierung beider Ketten, erfolgt die Dimerisierung über essentielle Disulfidbrücken. Verschiedenste Aufreinigungsstrategien und Enzymcharakterisierungen wurden vorgestellt (Jansen et al., 1992; Woker et al., 1992; Wajant et al., 1993). Neben ihrem natürlichen chiralen Substrat (*S*)-*p*-Hydroxymandelsäurenitril akzeptiert die *SbHNL* weitere aromatische Aldehyde (Wajant, 1993). Ihr pH-Optimum liegt bei 4,5 und sie besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,0.

Die (**R**)-spezifische **LuHNL** aus *Linaceen* besteht aus zwei identischen, nicht glykosylierten Untereinheiten und besitzt ein natives MG von 84 kDa (Xu et al., 1988; Wajant et al., 1993). Sie wurde 1988 erstmals von Xu et al. gereinigt und charakterisiert. Albrecht et al. stellten später ein verbessertes Reinigungsverfahren für die *LuHNL* vor (1993). Die N-terminale Sequenzierung von aufgereinigtem Enzym zeigte eine vorhandene Mikroheterogenität, welches auf die Existenz von Isoenzymen in Leinsamen hindeutet (Albrecht et al., 1993). Außer den natürlichen achiralen Substraten (*R*)-Acetoncyanhydrin und (*R*)-2-Butanoncyanhydrin setzt die *LuHNL* noch eine Reihe anderer aliphatischer Aldehyde und Ketone um (Albrecht et al., 1993) Ihr pH-Optimum liegt bei 5,5 und ihr pI bei ca. 4,6.

1.5 Phylogenie der HNLn

Die Aminosäuresequenzen der bislang klonierten HNLn lassen bis auf die unter Kapitel 1.4 beschriebenen Ausnahmen - *PsHNL* und *PaHNL* bzw. *MeHNL* und *HbHNL* – keine phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse untereinander erkennen. Allerdings bestehen bei einzelnen HNLn zum Teil recht deutliche Homologien zu anderen Proteinen. Dies deutet darauf hin, dass die HNLn aus Pflanzen unterschiedlicher Familien sich von Vorläuferproteinen ursprünglich andersartiger Funktion im Zuge einer konvergenten Evolution unabhängig voneinander entwickelt haben. Die verschiedenen Vorläuferproteine ihrerseits lassen sich in zwei Gruppen mit weitverbreiteten, gemeinsamen Strukturmerkmalen einteilen. Eine Gruppe zeigt das Muster der α/β -Hydrolase-fold, welches eine katalytische Triade stabilisiert, die andere das ADP-bindende $\beta\alpha\beta$ -Motiv mit einer Consensus-Sequenz zur Bindung eines Nucleotids bzw. Nucleotid-Cofaktors. Sowohl die *SbHNL* als auch die *MeHNL/HbHNL* zeigen die α/β -Hydrolase-fold als ein Strukturelement, das durch divergente Evolution Enzyme für unterschiedlichste Hydrolysen hervorgebracht hat und vielfältiges funktionelles Potential besitzt (Ollis et al., 1992). Sequenzvergleiche ergaben, dass insbesondere die *SbHNL*-Primärstruktur eine starke Ähnlichkeit zu den Serin-Carboxypeptidasen aufweist (Wajant et al., 1994a). Die Aminosäuresequenzen der *MeHNL* bzw. *HbHNL* zeigen eine Verwandtschaft zu zwei Proteinen mit bisher unbekannter Funktion aus Reis (Hickel et al., 1996).

Die Beibehaltung der katalytischen Triade scheint für den Mechanismus der entsprechenden HNLn von Bedeutung zu sein. Die konservierte Nukleotidbindedomäne als gemeinsames Strukturmerkmal der *LuHNL* und der *PaHNL/PsHNL* sind im Gegensatz zur ersten Gruppe nicht am Mechanismus der Hydroxynitrillyse beteiligt, sondern übernimmt als "molekulares Fossil" lediglich strukturelle Aufgaben. Innerhalb dieser Gruppe kann wiederum zwischen zwei Entwicklungslinien unterschieden werden. Zum einen zeigt die *LuHNL* eine ausgeprägte Homologie zu den zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen (ZnADHn), zum anderen zeigen die *PaHNL* bzw. *PsHNL* große Ähnlichkeiten zu FAD-abhängigen Oxidoreduktasen (Trummler & Wajant, 1997; Breithaupt et al., 1999; Dreveny et al., 2001). In Abbildung 6 sind die phylogenetischen Beziehungen schematisch dargestellt.

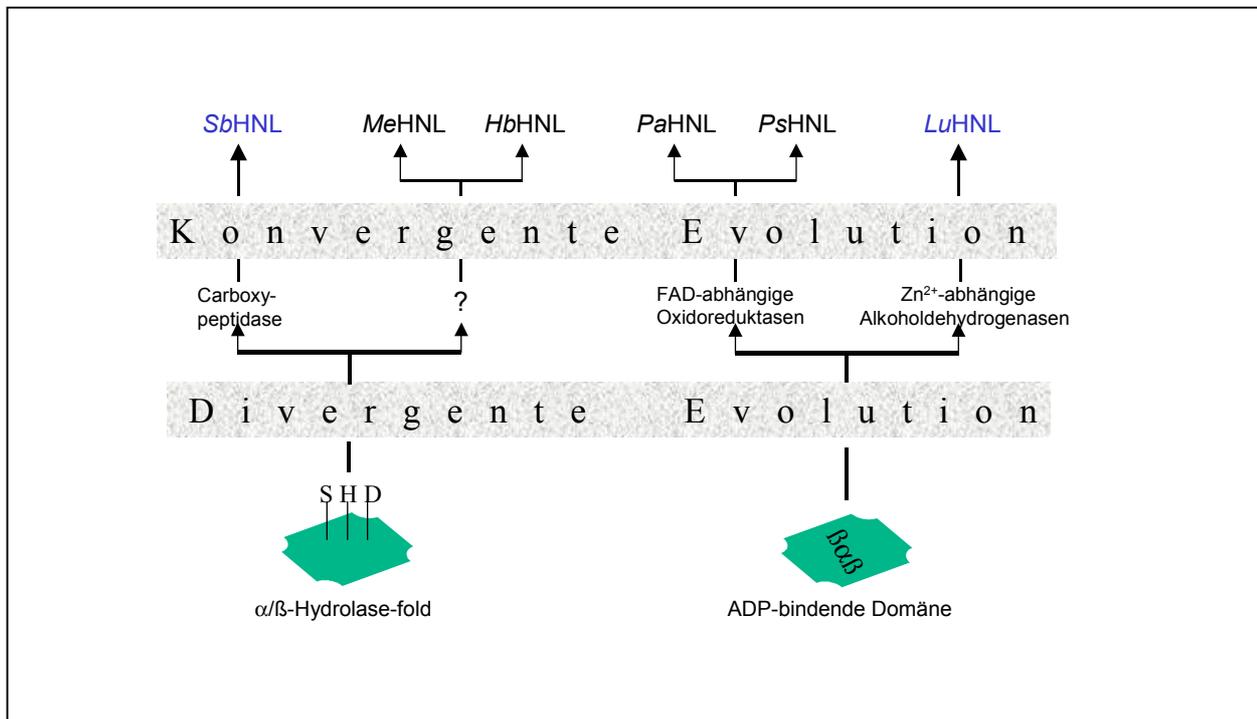


Abbildung 6: Mögliche Phylogenie der bislang sequenzierten HNLn
 (modifiziert nach Trummler & Wajant, 1997)

1.6 Katalysemechanismus

Das bisher am besten untersuchte Modell zum Mechanismus der HNL-Katalyse existiert für das dem α/β -Hydrolase-Faltungsmuster folgenden Enzym aus *Hevea brasiliensis* und ist in Abbildung 7 dargestellt. Auf der Basis von Kristallstrukturen und der daraus resultierenden Analogie zum prototypischen Mechanismus der Hydrolasen, sowie nach der Ermittlung von kinetischen Daten, Inhibitorstudien durch seitenkettenmodifizierende Reagenzien und gerichteter Mutagenese der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren, wurde diese Reaktionsabfolge postuliert (Hickel et al., 1996; Wagner et al., 1996; Hasslacher et al., 1996, 1997a; Zuegg et al., 1999; Gruber 2001).

Die Lyasereaktion wird in Analogie zu den α/β -Hydrolasen durch eine essentielle Triade bestehend aus einem Nucleophil [Serin], einer Säure [Asparaginsäure] und einem Histidinrest in drei aufeinanderfolgenden Schritten katalysiert. Zuerst wird die unter physiologischen Bedingungen reaktionsträge Hydroxylgruppe des Ser80 durch dessen triadische Anordnung mit His235 und Asp207 aktiviert. Dabei wird das Ser80 durch das His235 deprotoniert und die negativ geladene Carboxylgruppe des Asp207 durch das positivierte Histidin stabilisiert. Der nukleophile Serinrest greift nun das Carbonyl-C-Atom des Substrates an und bildet ein kovalent an das Enzym gebundenes, tetraedrisches Hemiacetal als Intermediat. Die negative Ladung des Hemiacetal-Sauerstoffs wird durch Wasserstoffbrücken des Cys81 und Thr11 stabilisiert und als „oxyanion hole“ bezeichnet. Im zweiten Schritt wird zuerst die unter neutralen pH-Bedingungen in wässriger Lösung als HCN vorliegende Blausäure mit Hilfe der SH-Gruppe des Cys81 deprotoniert, um anschließend als Cyanidanion mit dem Hemiacetal zu reagieren. Das dabei entstehende Cyanhydrin bewirkt die Freisetzung des Ser80-Restes unter Reprotonierung durch den Imidazolring des His235. Es ist zu erwarten, dass auch weitere HNLn mit einem α/β -Hydrolase-Faltungsmuster einem analogen Katalysemechanismus folgen. Die Sequenzähnlichkeiten der HNL aus *Hevea brasiliensis* zur jener aus *Manihot esculenta* impliziert ein vergleichbares mechanistisches Modell. Wajant und Pfizenmaier (1996) postulierten die katalytische Triade für die MeHNL bestehend aus Ser80, Asp208 und His236 durch gerichtete Mutagenesestudien.

Die Kristallstruktur der MeHNL im Komplex mit ihrem natürlichen Substrat Acetoncyanhydrin lässt einen weiteren möglichen Mechanismus vermuten, der die Bildung eines intermediären Hemiacetal bzw. Hemiketals ausschließt. Eine basenkatalysierte Reaktion des HCN mit der Carbonylverbindung unter Mitwirkung eines Lysinrestes (Lys236 bei *Hevea*; Lys237 bei *Manihot*) zur Deprotonierung der Blausäure bei insbesondere niedrigen pH-Werten und eines Wassermoleküls kann ebenso als Reaktionsmechanismus für beide HNLn in Frage kommen (Zuegg et al., 1999; Gruber, 2001; Lauble et al., 2001 a und b).

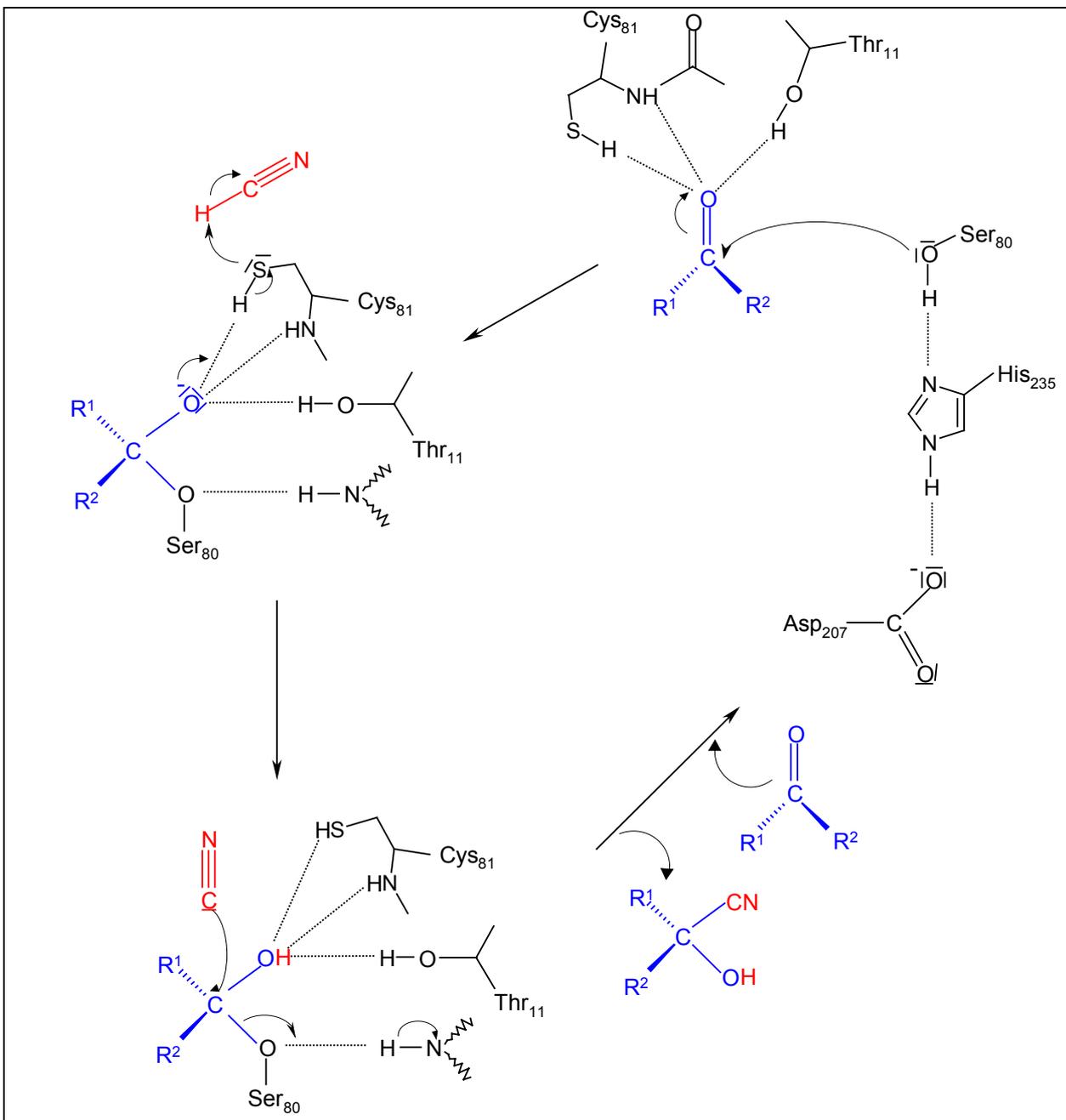


Abbildung 7: Katalysemechanismus der HNL aus *Hevea brasiliensis*
(nach Wagner et al., 1996)

Ebenso wird für die enzymatische Reaktion der HNL aus *Sorghum bicolor* die Beteiligung einer katalytischen Triade Ser/Asp/His vorgeschlagen. Dies beruht neben den Ergebnissen aus Inhibitionsstudien mit Seringruppen-modifizierenden Reagenzien insbesondere auf der Tatsache, dass die *SbHNL* starke Homologien zu den Serin-Carboxypeptidasen II aus Weizen und Gerste aufweist, welche die Hydrolyse der Peptidbindungen über eine ebensolche Triade katalysieren (Wajant et al., 1994b; Liao & Remington, 1990; Liao et al., 1992). Die aus den Untersuchungen zu den Enzymen aus *Hevea*, *Manihot* und *Sorghum* gewonnenen Erkenntnisse lassen auch für die zweite Entwicklungslinie der HNLn mit ADP-bindendem Motiv einen ähnlichen Katalysemechanismus erwarten. Trotz der erst kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der *PaHNL* blieb die Aufklärung des Ablaufs der Lyasereaktion jedoch offen (Dreveny et al., 2001). Ihre phylogenetische Entwicklung im Sinne einer konvergenten Evolution aus mechanistisch und strukturell unterschiedlichen Vorläuferproteinen - Oxidoreduktasen, Carboxypeptidasen - lassen vermuten, dass allein die Schaffung einer geeigneten „Mikroumgebung“ bestehend aus einem geeigneten pH-Milieu unterstützt durch eine katalytische Triade eine HNL-Aktivität generieren kann (Hickel et al., 1996; Wajant & Effenberger, 1996; Dreveny et al., 2001). Diese Theorie steht im Einklang mit einer Hypothese von Hempel et al. (1991), nach welcher zwischen Thiolreduktasen mit katalytischer Ser/Asp/His-Triade und Aldehyd-Dehydrogenasen (cofaktorabhängige Oxidoreduktasen) eine nahe evolutive Verwandtschaft besteht. In dieses Schema wiederum würden sowohl die FAD-abhängigen HNLn der *Rosaccae* als auch die zu Aldehyd-Dehydrogenasen homologe HNL aus *Linum* passen.

1.7 Technische Anwendung der Hydroxynitril-Lyasen zur stereoselektiven Synthese von Cyanhydrinen

Bereits Anfang dieses Jahrhunderts wurde die erste enzymkatalysierte asymmetrische Synthese von (*R*)-Mandelsäurenitril aus Benzaldehyd und HCN mit aus Bittermandeln erhaltenem Emulsin beschrieben (Rosenthaler, 1908). Pfeil et al. (1966) reinigten und charakterisierten die erste HNL aus *Prunus amygdalus* und beschrieben ihre Fähigkeit zur Synthese optisch aktiver Cyanhydrine (Becker & Pfeil, 1966).

Neben der Umsetzung weiterer Aldehyde verbesserten sie die Enzymreaktion in einem Wasser/Ethanol-Gemisch bei schwach saurem pH-Wert von 5-6 hinsichtlich ihrer Enantioselektivität und Ausbeute (Butenuth & Pfeil, 1972). Bis 1987 war die (*R*)-HNL aus *Prunus* der einzig genutzte Biokatalysator zur Herstellung optisch aktiver Cyanhydrine (Effenberger et al., 2000). Seitdem wurden vier weitere HNLn in der organischen Synthese eingesetzt. Sie unterscheiden sich neben ihrer Stereospezifität auch hinsichtlich ihrer Substratspektren und sind in Tabelle 3 gegenübergestellt (Johnson & Griengl, 1999; Schmidt & Griengl, 1999; Griengl et al., 2000). Darüberhinaus ist auch ihre rekombinante Verfügbarkeit aufgeführt.

Tabelle 3: Die in der organische Synthese verwendeten Hydroxynitril-Lyasen

natürliche Enzymquelle	Stereo-spezifität	Substratspektrum	rekombinante Enzymquelle	Referenz
<i>Prunus sp.</i>	<i>R</i>	aromatische, aliphatische, ungesättigte und heterozyklische Aldehyde	-	Effenberger, 1997 Effenberger et al., 2000
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>S</i>	aromatische und heterozyklische Aldehyde	-	Niedermeyer & Kula, 1990 Effenberger et al., 1991
<i>Manihot esculenta</i>	<i>S</i>	aliphatische, aromatische und heterozyklische Aldehyde und Ketone	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Förster et al., 1996 Hughes et al., 1994 Hughes et al., 1996 Cheng et al., 2000
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>S</i>	aliphatische, aromatische und heterozyklische Aldehyde	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Hasslacher et al., 1996, 1997b
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>R</i>	aliphatische Aldehyde und Ketone	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i>	Trummler et al., 1998; Breithaupt et al., 1999

Optisch aktive Cyanhydrine sind wichtige Intermediate bei der Synthese von Pharmazeutika und Feinchemikalien (Niedermeyer & Kula, 1990; Gregory, 1999; Schulze & Wubbolts, 1999; Brusse & van der Gen, 2000). Durch Reaktion der Hydroxy- und/oder der Cyanidgruppe am chiralen Zentrum - dem asymmetrischen C-Atom - können α -Hydroxyaldehyde bzw. -ketone, α -Hydroxycarbonsäuren sowie α -Aminoalkohole generiert werden (Abbildung 8).

Diese dienen als Grundbausteine für eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen, wie beispielsweise β -Blocker, Antibiotika, Acetylcholinesteraseinhibitoren, Pyrethroide oder Pheromone (Kruse, 1992; North, 1993; Effenberger, 1994). Neben diesem vielfältigen

Synthesepotential ist auch die optische Reinheit dieser Substanzen ein entscheidendes Qualitätskriterium, denn zwei optische Isomere können biochemisch unterschiedlich wirken. Aus diesen Gründen existiert ein großes Interesse an der Darstellung optisch aktiver und enantiomerenreiner Cyanhydrine mittels HNLn (Schulze & Wubbolts, 1999).

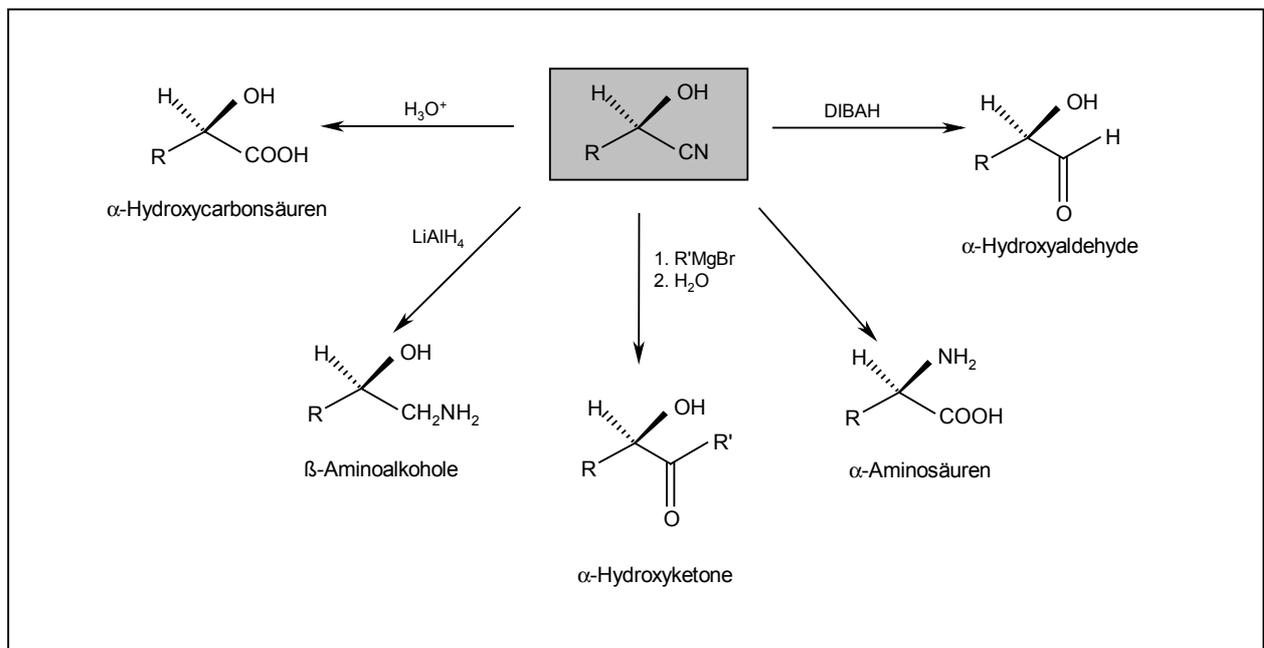


Abbildung 8: Stereoselektive Folgereaktionen ausgehend von optisch aktiven Cyanhydrinen

Da die Spezifität der HNL nicht auf ihr natürliches Substrat beschränkt ist, sondern jeweils auch andere Carbonylverbindungen mit signifikanten Raten umgesetzt werden, ist das zugängliche Produktspektrum sehr breit (Tabelle 3). Allerdings werden bei der Synthesereaktion von Carbonylverbindung und Blausäure in wässrigen Systemen keine reinen Enantiomeren erhalten, weil parallel zur enzymkatalysierten Reaktion auch die chemische unselektive Addition abläuft. Durch pH-Erniedrigung des Reaktionsmediums unterhalb von pH 4 lässt sich die spontane basenkatalysierte Addition unterdrücken (Niedermeyer & Kula, 1990; Kragl et al., 1990).

Ein weiterer Nachteil wässriger Reaktionsbedingungen ist die schlechte Wasserlöslichkeit vieler interessanter Substrate. Die Verwendung hydrophober organischer Lösungsmittel ermöglicht neben der Verwendung höherer Konzentrationen an schlecht wasserlöslichen Carbonylsubstraten auch einen erhöhten Enantiomerenüberschuss durch eine Verhinderung der Konkurrenzreaktion. Lösungsmittel der Wahl sind Diisopropylether und Ethylacetat (Effenberger, 1994;). Zahlreiche Cyanhydrinsynthesen in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen wurden insbesondere mit der *PaHNL* und *MeHNL* durchgeführt und untersucht (Kiljunen & Kanerva, 1997; Hickel et al., 1999; Bauer et al., 1999; Hickel et al., 2000).

Die enzymatische Synthese von Cyanhydrinen bietet charakteristische Vorteile gegenüber den klassischen nicht-enzymatischen bzw. chemischen Methoden. Neben dem oben vorgestellten hohen Synthesepotential in enantiomerenreiner Form wird das Enzym meist in immobilisierter Form eingesetzt und kann somit leicht vom Produkt abgetrennt und mehrfach eingesetzt werden. Die enzymatische Umsetzung ermöglicht einen schnellen Umsatz unter milden Reaktionsbedingungen, die auch den Einsatz von temperatur- und/oder drucklabilen Substraten erlauben.

Eine enzymkatalysierte Alternative zur Gewinnung chiraler Cyanhydrine ist die Lipasenkatalysierte kinetische Racematspaltung (Effenberger et al., 1991). Zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Methoden zur Synthese nichtracemischer Cyanhydrine gehören die Addition von Blausäure in Gegenwart enantiomerenreiner metallorganischer Katalysatoren - meist Titankomplexe - oder cyclischer Dipeptide (North, 1993).

2 Motivation und Aufgabenstellung

Mit der (*R*)-HNL aus *Linum usitatissimum* und der (*S*)-HNL aus *Sorghum bicolor* existieren zwei in ihrer Stereospezifität konträre Enzyme mit unterschiedlichen Substratspektren zur Cyanhydrinsynthese (Tabelle 3). In erster Linie besteht sowohl aufgrund aufwendiger Reinigungsprozeduren als auch wegen unzureichender Bioverfügbarkeit ein großes Interesse an rekombinanten Enzymquellen. Hierzu ist es erforderlich, die kodierenden Gene zu klonieren und in geeigneten Wirtsorganismen zu exprimieren. Darüberhinaus bietet sich damit die Grundlage für ein Proteindesign mittels gerichteter Mutagenese oder evolutiver Strategien. Mit beiden Methoden lassen sich Aktivität und Stabilität ausgewählter Enzyme an definierte Bedingungen anpassen und verbessern (Bornscheuer & Pohl, 2001). Desweiteren stammen beide Enzyme aus verschiedenen phylogenetischen Entwicklungslinien: die *LuHNL* ist homolog zu den ADHn, die *SbHNL* ist homolog zu den Serincarboxypeptidasen, welches in zweiter Linie eine Aufklärung der möglichen Verwandtschaftsverhältnisse interessant macht.

Aus diesen Gründen war es das Ziel dieser Arbeit, für die *LuHNL* und *SbHNL* geeignete und produktive rekombinante Enzymquellen zu gewinnen und mittels homogen aufgereinigtem Enzym phylogenetische Untersuchungen hinsichtlich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse durchzuführen. Da von beiden Enzymen keine 3D-Struktur vorliegt, sollte ein Homologiemodelling auf Basis der homologen Strukturen Aussagen über deren potentielle Enzymstruktur und -katalyse ermöglichen.

Aufgrund vorangegangener Arbeiten lagen für die beiden Enzyme folgende unterschiedliche Ausgangsuntersuchungen vor:

LuHNL

In Weiterführung der Arbeiten von Breithaupt et al. (1999), war eine Aufgabenstellung der Arbeit, das vorhandene bakterielle Expressionssystem für die *LuHNL* zu optimieren und eine effiziente homogene Aufreinigung des rekombinanten Enzyms (*recLuHNL*) zu erzielen. Reine *LuHNL* war Voraussetzung, um auf mögliche Cofaktorabhängigkeiten - NAD(P)H und Zn^{2+} - und ADH-Aktivität hin zu untersuchen. Mittels eines Homologiemodellings sollten Aussagen über das potentielle katalytische Zentrum getroffen und durch gerichtete Mutagenesen verifiziert werden.

SbHNL

Ausgehend von einer bis dato bekannten Teilsequenz der *SbHNL* (Wajant et al., 1994a; eigene proteinchemische Sequenzanalysen) war dringlichstes Ziel der Arbeit die vollständigen genetischen Sequenzdaten zu ermitteln. Trotz denkbarer Schwierigkeiten bezüglich der Etablierung eines rekombinanten Expressionssystems aufgrund bekannter posttranslationaler Prozessierungen – Glykosylierung, proteolytische Spaltung des Präproteins in seine Untereinheiten, Bildung von Disulfidbrücken – (Förster et al., 1996, Schmidt & Griengl, 1999) sollte sich im Rahmen der Arbeit dieser Herausforderung gestellt werden. Die *SbHNL* ist neben der *PaHNL*, welche jedoch leicht und in großen Mengen aus ihrem natürlichen Wirt zu isolieren ist, die einzige nicht rekombinant verfügbare HNL von technischem Interesse (Tabelle 3). Ebenso sollte ein Homologiemodelling eine Vorstellung über die Enzymstruktur und den molekularen Wirkungsmechanismus liefern und Untersuchungen zu Carboxypeptidase-Nebenaktivitäten der *SbHNL* Hinweise auf ihre phylogenetische Entwicklung geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Chemikalien

Analytik	Hersteller
Protein-Sequencer 477 A	Amersham Pharmacia Biotech
Thermocycler	Biometra
UV-Transilluminator	Stratagene
UV-Crosslinker 2400	Stratagene
<i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad
Hybridisierungsschrank Hybaid	MWG Biotech
Bildverarbeitung	
Eagle Eye II	Stratagene
Luminograph	Berthold
Spiegelreflexkamera OM-2	Olympus
Chromatographie	
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
HiLoad	Amersham Pharmacia Biotech
Fraktionssammler Frac-300	Amersham Pharmacia Biotech
Disintegration	
Disintegrator S	IMA
Schwingkugelmühle MM 2000	Retsch
Ultraschallgerät UW60	Branson
Elektrophorese	
DNA-Elektrophorese Mini Sub Cell GT	Bio-Rad
Protein-Elektrophorese Protean II	Bio-Rad
Pre Cast Gels	Novex
Novablot 2117	LKB

Spektroskopie

UV / Vis-Spektralphotometer DU-650	Beckmann
Luminescence Spectrometer LS50B	Percin Elmer

Ultrafiltration

Rührzelle 8010, 8050	Amicon
Centricon-15, -30	Amicon

Zentrifugation

Sorvall RC5B	DuPont
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Vakuumzentrifuge Univapo 150	Uniequip

Alle verwendeten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von p.A.-Qualität und wurden in der Regel von Fluka, Roth, Sigma, Serva oder Merck bezogen. Nährmedienbestandteile waren von Merck, Difco, Bio101 oder Invitrogen.

Die Enzyme für die Molekularbiologie wurden von Roche, Stratagene, Promega, NEB oder Invitrogen bezogen.

Es wurden folgende Kits der entsprechenden Firmen verwendet:

Kit	Hersteller
5'/3'-RACE Kit	Roche
EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen
Spektroquant 14800 Cyanid	Merck
QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rneasy Plant Kit	Qiagen
Oligotex™ mRNA Kit	Qiagen
Plasmid Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
High Pure PCR Purification Kit	Roche
Rapid Ligation Kit	Roche
ECL Plus™ Kit	Amersham Pharmacia Biotech

Die Chemikalien für molekularbiologische und fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen waren von höchster Qualität. Die dafür verwendeten Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert.

Die für die Arbeiten mit RNA benötigten Lösungen und Materialien wurden mit DEPC-haltigem MilliQ-Wasser (0,1% (v/v)) angesetzt bzw. behandelt, über Nacht bei RT gerührt und mindestens 20 min autoklaviert, um die RNAsen vollständig zu eliminieren und das DEPC abzubauen. Instabile Lösungen wurden in DEPC-behandelten Gefäßen und RNAsen-freiem Wasser angesetzt.

3.1.2 Verwendete Organismen

3.1.2.1 Pflanzen

Für die Gewinnung der Wildtyp-(R)-HNL aus *Linum usitatissimum* wurde Futterleinsamen aus einem Landwarenhandel [Landhandel Irnich, Frechen-Königsdorf, Deutschland] verwendet.

Für die Arbeiten mit der Wildtyp-(S)-HNL aus *Sorghum bicolor* wurden Samen der Sorte Sordan 79 aus einem Grosswarenhandel [Northrup King and Co., Minneapolis, USA] erworben.

3.1.2.2 Hefestämme

<i>Pichia pastoris</i> X33	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> KM71	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Invitrogen

3.1.2.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> Top 10 F'	Invitrogen
<i>E. coli</i> SG13009prep4	Roche
<i>E. coli</i> JM105	Amersham Pharmacia Biotech
<i>E. coli</i> JM109	Amersham Pharmacia Biotech
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	Novagen

3.1.3 Verwendete Vektoren

3.1.3.1 Hefevektoren

pPICZ α C	Invitrogen
pPICZB	Invitrogen

3.1.3.2 Bakterielle Vektoren

pBTac2	Roche
pKK223-2	Amersham Pharmacia Biotech
pQE9	Qiagen
pREP4	Invitrogen
pUC18	Amersham Pharmacia Biotech
pcDNA1.1	Invitrogen

3.2 Pflanzenanzucht und Ernte

Zur Anzucht von *Linum usitatissimum* wurden 130 g Leinsamen für 2 h in Wasser eingeweicht und auf angefeuchtetem sterilem Zellstoff in desinfizierten Kunststoffboxen verteilt. Die Beleuchtung erfolgte nach einem 14 h Hell:10 h Dunkel-Zyklus mit einer 60 W Pflanzenlampe. Der Zellstoff wurde permanent feucht gehalten. Ca. 2 Wochen nach der Auskeimung wurden die Keim- und Primärblätter sowie oberirdische Sprosssteile geerntet, wobei zuvor die braunen Spelzen von den Samen entfernt wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert.

Zur Anzucht von *Sorghum bicolor* wurden 40 g Hirsesamen der Sorte Sordan 79 ü. N. in ca. 100 ml Leitungswasser gequollen und in analoger Weise auf Zellstoff ausgesät. Die Samen keimten dann bei 30°C in einem abgedunkelten Raum bei ausreichender Feuchtigkeit. Nach ca. 1 Woche wurden die Hirsekeimlinge durch Abschneiden der Sprosssteile geerntet und bei -20°C gelagert.

3.3 Kultivierung und Stammhaltung der Mikroorganismen

Alle im folgenden aufgeführten Medien wurden in zweifach destilliertem Wasser (A. bidest.) angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Thermolabile Komponenten wurden sterilfiltriert.

3.3.1 *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C in LB-Medium

LB (Luria-Bertani)- Medium:	1% (w/v) Trypton	
	1% (w/v) Yeast-Extract	
	0,5% (w/v) NaCl	pH 7,5

Zu Selektion antibiotikaresistenter Transformanten wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes Antibiotikum [Ampicillin bzw. Zeocin 100 mg/l und/oder Kanamycin 20 mg/l] dazugegeben. Zur Herstellung der entsprechenden Nährböden wurde den Flüssigmedien 2% (w/v) Bactoagar [Difco] zugefügt. Für die sogenannte Blau-Weiss-Selektion durch Insertionsinaktivierung des lacZ'-Gens in z.B. pUC18 wurde jeder antibiotikahaltigen LB-Agarplatte je 40 µl IPTG- und X-Gal-Stammlösung zugegeben.

IPTG-Stammlösung: 100 mM IPTG in A.dest (sterilfiltriert)

X-Gal-Stammlösung: 2 % X-Gal in Dimethylformamid

3.3.2 *P. pastoris*

Die Anzucht von *P. pastoris* erfolgte bei 30°C.

Zur Produktion von Biomasse wurde in Komplexmedium kultiviert.

YEPG-Medium:	1% (w/v) <u>Y</u> east <u>E</u> xtract
	2% (w/v) <u>P</u> epton
	2% (w/v) <u>G</u> lucose

Zur Selektion zeocinresistenter Transformanten wurde nach dem Autoklavieren 100 mg/l Zeocin zugegeben. Zwecks osmotischer Stabilisierung wurden die *Pichia*-Zellen direkt nach einer Transformation auf selektiven YEPGS-Platten (YEPG-Medium mit 1 M Sorbitol) kultiviert. Zur Lagerung auf Festmedium wurde dem Flüssigmedium 2% Agar vor dem Autoklavieren beigefügt. Die Expression der rekombinanten Stämme erfolgte nach Methanolinduktion sowohl in gepuffertem Komplexmedium (Buffered-Methanol-YP) als auch in gepuffertem und ungepuffertem Minimalmedium (Buffered-Methanol-Minimalmedium und Methanol-Minimalmedium).

BMYP-Medium:	1%	Yeast Extract	
	2%	Pepton	
	100 mM	Kpi	pH 6,0
	1,34%	Yeast Nitrogen Base (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne Aminosäuren)	
	$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin	
	0,5%	Methanol	

BMM-Medium:	100 mM	Kpi	pH 6,0
	1,34%	Yeast Nitrogen Base (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne Aminosäuren)	
	$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin	
	0,5%	Methanol	
	0,004%	Histidin (histidinauxotrophe Stämme)	

MM-Medium:	1,34%	Yeast Nitrogen Base (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ohne Aminosäuren)	
	$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin	
	0,5%	Methanol	
	0,004%	Histidin (histidinauxotrophe Stämme)	

Die reprimierte Anzucht vor Methanolinduktion erfolgte in den entsprechenden glycerolhaltigen Medien BGYP (Buffered-Glycerol-YP) und BGM (Buffered-Glycerol-Minimalmedium), welchen anstelle von 0,5% (v/v) Methanol 1% (v/v) Glycerin beigefügt war. Die Stammhaltung erfolgte auf den entsprechenden und oben angegebenen Festmedien. Falls erforderlich, wurden auch die jeweiligen Selektionsmedien benutzt, um einen Plasmidverlust unter Selektionsdruck zu verhindern. Alle 4 Wochen wurden Einzelkolonien auf frische Nährböden überimpft und bei 4°C gelagert. Zur Anlage von Dauerkulturen wurde eine Einzelkolonie ü.N. im entsprechenden Flüssigmedium angezogen. Zwecks Gefrierschutz wurden Bakterienkulturen mit 15%igem (v/v) und Hefekulturen mit 30%igem (v/v) sterilem Glycerin versehen und bei -80°C gelagert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *P. pastoris*

Die Präparation genomischer DNA (gDNA) aus *P. pastoris* diente zur Überprüfung der Rekombination und Integration des *SbHNL*-Gens mittels PCR (Higgins & Cregg, 1998). Dazu wurden *Pichia*-Zellen in 20 ml YEPG/Zeo-Medium bis zu einer $OD_{600} = 7$ kultiviert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, RT, 3000 rpm, SS34-Rotor) geerntet und mit A. bidest. gewaschen. Danach wurden die Zellen in 4 ml Lysis (SCED)-Puffer, pH 7,5, resuspendiert und nach Zugabe von 6 U Zymolyase für 1 h spheroplastiert. Die Suspension wurde zuerst mit 4 ml 1%igem SDS und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis mit 3 ml 5 M Natriumacetat, pH 8,9, versehen. Die präzipitierten Proteine und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 13000 rpm) abgetrennt und die DNA im Überstand nach Zugabe von 2 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) innerhalb von 15 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert (20 min, 4°C, 13000 rpm, SS34-Rotor) und in 1 ml TE-Puffer pH, 7,4, gelöst. Eventuell noch vorhandene Zellbestandteile wurden mittels eines gleichen Volumens Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1) extrahiert. Um phenolische Rückstände zu entfernen, wurde die wässrige Phase nochmals mit einem Vol. CI (24:1) behandelt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von ½ Vol. 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,5, und 2 Vol. Ethanol (abs.) für 1 h bei -20°C ein zweites Mal gefällt. Nach erneutem Pelletieren der DNA und einem Waschschritt mit 70%igem Ethanol (abs.) zur Entfernung der Salze, wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer, pH 7,4, gelöst. Die hochmolekularen Eigenschaften der gDNA konnten auf einem 0,7%igem Agarosegel überprüft werden. Deren Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.4.2).

Mit dieser Methode konnte hochmolekulare und für die meisten molekularbiologischen Anwendungen ausreichend reine gDNA in guter Ausbeute (500 µg / g Zellfeuchtmasse) gewonnen werden.

SCED-Puffer: 1 M Sorbitol
10 mM Natriumcitrat pH 7,5
10 mM EDTA
10 mM DTT

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCL pH 7,4
1 mM EDTA

3.4.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Sorghum bicolor*

Während der DNA-Präparation aus Pflanzen treten häufig große Mengen an Polysacchariden auf, die mit der DNA kopräzipitieren und anschließende Restriktionen mit der DNA inhibieren können (Rogers & Bendich, 1988). Bei der von Do et al. (1991) beschriebenen Methode bilden Polysaccharide und Cethyl-Trimethyl-Ammoniumbromid (CTAB) bei hohen Salzkonzentrationen einen Komplex, der anschließend effizient aus der DNA-Lösung entfernt werden kann.

2 g Sorghum-Sprossen wurden in einem vorgekühltem Mörser mit flüssigem Stickstoff zerrieben. Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde danach in 10 ml CTAB-Puffer für 30 min bei 60°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml PCI (25:24:1) und vorsichtigem Schütteln erfolgte ein 10-minütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm im SS34-Rotor. Die Nukleinsäuren wurden anschließend aus der wässrigen Phase nach Zugabe von 2 Vol. Ethanol (abs.) ü.N. bei -20°C präzipitiert. Die Pelletierung der Nukleinsäuren erfolgte dann durch Zentrifugation bei 13000 rpm im SS34-Rotor bei 4°C für 45 min. Das Nukleinsäuren-Pellet wurde innerhalb 1 h im Abzug getrocknet und in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0, gelöst. Um noch vorhandene RNA zu degradieren, wurde die Lösung nach Zugabe von 40 µg RNase 30 min bei 37° inkubiert. Um die RNAsen von einer eventuellen DNAsen-Kontamination zu befreien, wurde die RNase-Lösung 10 min aufgeköcht. Eine letzte Präzipitation der DNA erfolgte dann nach Zugabe vom ¼ Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. Ethanol (abs.). Die DNA wurde pelletiert (13000 rpm, 4°C, RT), getrocknet und in 250 µl TE-Puffer, pH 8,0, gelöst und bis zu weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Mit dieser Methode konnte eine Ausbeute von 300 µg gDNA / g Pflanze erzielt werden.

CTAB-Puffer:	2%	(v/v)	CTAB	
	1,4	M	NaCl	
	20	mM	EDTA	
	0,2%	(v/v)	β-Mercaptoethanol	
	100	mM	Tris-HCl	pH 8,0

3.4.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Sorghum bicolor*

Alle für die RNA-Präparation verwendeten Glasgeräte wurden durch 4-stündiges Backen bei 180°C RNAsen-frei gemacht. Die dazu verwendeten Lösungen und nicht hitzebeständigen Materialien wurden ü.N. mit 0,1% (v/v) DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. Außerdem wurden soweit möglich RNA-grade Chemikalien verwendet. Es wurden sowohl eine modifizierte Methode nach Logemann et al. (1987) als auch die Isolierung mittels Rneasy Plant Mini Kit [Qiagen, Hilden] angewendet. Beide Methoden beruhen auf dem Gebrauch von Guanidiniumhydrochlorid (GdHCl)-haltigem Extraktionspuffer, welcher eine Verfestigung des pflanzlichen Lysates aufgrund der Anwesenheit bestimmter Metaboliten (Polysaccharide, Polyphenole etc.) verhindert und RNAsen inaktiviert.

Die mechanische Zerkleinerung des Pflanzenmaterial (500 mg – 3 g) erfolgte in einem vorgekühlten Mörser unter Anwesenheit von flüssigem Stickstoff. Nach Aufnahme des Pflanzenpulvers in GdHCl-haltigem Extraktionspuffer wurde entweder 10 min weiter gemörsert oder im Falle der RNA-Isolierung mit Rneasy Plant Kit das Lysat nach Zentrifugation (12000 rpm, RT, 2 min, Eppendorfzentrifuge) auf eine sog. „QIAshredder“ aufgetragen und wie vorher zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit 500 µl Ethanol (abs.) versehen und zur Reinigung der RNA auf eine Silica-Gel-Membran gegeben. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschschritten (1 X RW1-Puffer, 2 X RPE-Puffer) zur Entfernung von Kontaminanten wurde RNA (>200 Nukleotide) mit 50 µl H₂O_{DEPC} von der Säule eluiert. Die Isolierung ohne Kitkomponenten erfolgte nach weiterem Mörsern in 10 ml Extraktions-(GdHCl)-Puffer durch Aufnahme des Homogenisates in 0,7 Vol. PCI und 30-minütigem Schütteln (Überkopfschüttler, Eigenbau der Institutswerkstatt). Nach der Phasentrennung (10 min, 7000 rpm, RT, SS34-Rotor) wurde die wässrige Oberphase abermals mit 1 Vol. CI von phenolischen Rückständen befreit. Die Fällung der Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol

eingeleitet. Nach Lagerung bei -20°C ü.N. und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 45 min, RT) wurde das unter der Sterilbank getrocknete Pellet in 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ unter leichtem Erwärmen (bis 60°C) resuspendiert. Die selektive Präzipitation der Gesamt-RNA erfolgte dann mittels 1 Vol. eisgekühltem 4 M Lithiumchlorid und 60-minütiger Inkubation auf Eis. Die RNA wurde wie zuvor pelletiert, getrocknet und in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ erneut gelöst. Um eventuell noch vorhandene restliche Verunreinigungen (z.B. Polysaccharide) vollständig zu entfernen, wurde die RNA erneut durch Zugabe von 1/10 Vol. Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol (abs.) gefällt, pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 250 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ resuspendiert. Eine kurzzeitige Lagerung bei -20°C war möglich.

GdHCl-Extraktionspuffer: 8 M Guanidiniumhydrochlorid
 20 mM MES pH 7,2
 20 mM EDTA
 50 mM DTT

RW1-Puffer : keine Herstellerangaben

RPE-Puffer : keine Herstellerangaben

$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$: 0,1% (v/v) DEPC in A.dest autoklaviert

3.4.1.4 Isolierung von poly (A)⁺mRNA aus *Sorghum bicolor*

Ca. 1-5% der Gesamt-RNA ist messenger-RNA (mRNA) und diese ist bei eukaryotischen Organismen am 3'-Ende polyadenyliert. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um die mRNA durch eine spezifische Bindung an immobilisierte Oligo-dT-Nukleotide von den restlichen RNA-Formen (rRNA, tRNA, degradierte mRNA) abzutrennen. Verwendet wurde dazu das OligotexTM mRNA Kit [Qiagen, Hilden]. Ca. 500 μg Gesamt-RNA wurden in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst und mit äquivalentem Vol. 2x Bindungspuffer und 30 μl Oligotex-Suspension gemischt. Um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen, wurde 3 min bei 65°C inkubiert. Die anschließende Hybridisierung der polyadenylierten mRNA mit den oligo dT₃₀-Partikeln erfolgte für 10 min bei RT. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, RT, Eppendorfzentrifuge) wurde der Überstand

verworfen während das Oligotex-mRNA-Pellet in 650 µl Waschpuffer gelöst und auf eine „spin“-Säule gegeben wurde. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die mRNA mit vorgewärmten (70°C) Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die mRNA konnte kurzfristig bei –20°C gelagert werden.

2x Bindungspuffer:	20 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	1 M	NaCl	
	2 mM	EDTA	
	0,2% (w/v)	SDS	

Waschpuffer:	10 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	150 mM	NaCl	
	1 mM	EDTA	

Elutionspuffer:	5 mM	Tris-HCl	pH 7,5
-----------------	------	----------	--------

3.4.1.5 Präparation von Plasmid-DNA

Je nach Verwendungszweck kamen unterschiedliche Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA zum Einsatz. Plasmid-DNA zur Klonierung bzw. Transformation, PCR oder Sequenzierung wurde mittels eines Plasmid Purification Kit [Qiagen, Hilden] isoliert, während die schnelle Restriktionscharakterisierung von Klonen transformierter Bakterienzellen mit der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979) erfolgte.

3.4.1.5.1 Plasmid-Präparation mittels Plasmid Purification Kit [Qiagen]

Die Methode beruht in modifizierter Form auf der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979) und einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie. Somit erhält man Plasmid-DNA in reinster Form. Je nach erwünschter Ausbeute wurde das QIAprep Spin Mini Kit bzw. die QIAGEN Plasmid Mini, Midi oder Maxi Kits verwendet. Anzucht volumina und Zellaufschluss der Bakterienkulturen sowie die Reinigungsschritte mittels Säulenmaterial erfolgten analog den Herstellerangaben des Qiagen Plasmid Handbooks (1997).

3.4.1.5.2 Schnellpräparation nach der Alkali Methode

Ein einzelner Klon wurde von der Selektionsplatte in 5 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und ü. N. kultiviert. Der Selektionsdruck sollte den Erhalt und die Vermehrung der Plasmid-DNA gewährleisten. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (5 min, 5000 rpm, RT) wurde das Bakterienpellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 300 µl des alkalischen Puffers P2 wurden die Zellen 5 min auf Eis lysiert. Zelltrümmer, denaturierte Proteine und gDNA wurden mittels 300 µl P3-Puffer ausgefällt und durch Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, 4°C, Eppendorfzentrifuge) pelletiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und wie zuvor zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol (abs.) gewaschen und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

P1-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A

P2-Puffer: 200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS

P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat pH 5,5

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten Nukleinsäuren wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Darüberhinaus ergibt eine zusätzliche Messung bei 280 nm ein Maß für die Reinheit der nukleinsäurehaltigen Lösungen. Das Verhältnis der Absorptionswerte OD₂₆₀ / OD₂₈₀ sollte zwischen 1,5 und 2 liegen, um störende Proteinkontaminationen, überschüssige Salze und Lösungsmittelrückstände zu minimieren. Alternativ zu dieser Methode wurden geringe Konzentrationen auch mittels Agarosegel bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Nukleinsäurelösung gemeinsam mit einem DNA-Größenmarker bekannter Konzentration auf das Gel aufgetragen und nach dem Lauf durch Vergleich der Bandenintensität die DNA-Konzentration bestimmt.

3.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Dieses Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen bestimmter Länge wurde bei der 5'-RACE und zur Amplifizierung und Überprüfung des *SbHNL*-Gens, sowie bei der ortsspezifischen Mutagenese des *LuHNL*-Gens verwendet.

Der Standard-PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

20-500	ng	DNA als PCR-Templat
1/10	Vol.	Polymerase-Puffer (10x)
200	µM	je dNTP
0,5	µM	je Primer
2-5	U	DNA-Polymerase
je 100 µl Reaktionsansatz		

Die Pufferbedingungen entsprachen den Angaben des Herstellers. Bei der i.d.R. selbst bestimmten Primersequenz wurde auf entscheidende Kriterien geachtet: Länge von 18-30 Basen mit einem GC-Gehalt von ca. 50 % und weitestgehend gleichen und hohen Annealingtemperaturen der beiden Primer. Die spezifischen Sequenzen sollten keine internen Sekundärstrukturen ausbilden und von möglichst geringer Komplementarität sein, um Primerdimerbildung zu unterbinden. Als amplifizierende Enzyme wurden neben der *Taq*-Polymerase auch die durch Korrekturaktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) ausgezeichneten *Pfu*- und *Vent*-Polymerasen verwendet. Die PCR wurde in einem Biometra-Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	1 min	94°C	Plasmid-DNA
	3 min	94°C	gDNA
Zyklen (25-35x):	1 min	94°C	Denaturierung
	1,5 min	$T_m - 5^\circ\text{C}$	Primer-Annealing
	1-2min (je kb)	72°C	Elongation
Terminale Elongation:	10 min	72°C	

T_m : Schmelztemperatur der Primer

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch auf einem Agarosegel.

Einige **Variationen** der Standard-PCR waren z.T. erforderlich. Insbesondere im Falle der 5'-RACE und bei einer PCR mit degenerierten Primern wurde der sogenannte Hot Start bzw. die Touchdown-PCR gewählt (Thermocycler-Handbook, Biometra). Diese Methoden sollen PCR-Artefakte in Form zusätzlicher Banden unterbinden. Die Bildung unspezifischer Produkte bei den anfänglich niedrigen Temperaturen treten aufgrund unerwünschter Fehlhybridisierungen [insbesondere bei degenerierten oder mutagenisierten Primern] oder Primeroligomerbildung auf. Um das Zusammentreffen der Reaktionspartner erst bei ausreichend hohen Temperaturen zu gewährleisten, gibt man die DNA-Polymerase nach der initialen Denaturierung der Matrize dazu (Hot Start). Bei degenerierten Primern ist eine exakte Schmelztemperatur (T_m) nicht zu bestimmen und deshalb wird die Annealing-Temperatur kontinuierlich von einem Wert oberhalb der zu erwarteten T_m auf einen Wert unter T_m abgesenkt (Touchdown). Dies erleichtert eine optimale Hybridisierung des Primers mit dem Template-Molekül. Darüberhinaus wurde bei der 5'-RACE die Methode der Nested-PCR angewandt (5'/3'-RACE-Handbook, Roche). Mit dieser Variante ist es möglich geringste Mengen an Template-Molekül zu vervielfältigen und dessen Spezifität und Empfindlichkeit zu erhöhen. Dabei hybridisieren die Primer einer verschachtelten (nested) PCR innerhalb des Abschnitts, der von dem ersten Primerpaar vorgegeben wurde.

3.4.4 DNA-Klonierung

3.4.4.1 DNA-Restriktion

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonucleasen erzeugt DNA-Fragmente, die sowohl für die Klonierung von DNA in geeignete Vektoren als auch zur Verifizierung der Klonierungsstrategie eingesetzt wurden. Zu analytischen Zwecken wurden 0,5-1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym in einem den Herstellerangaben entsprechenden Ansatz von 10-20 µl für 2-4 h bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert. Für präparative Ansätze oder bei der Restriktion gDNA für eine Southern Hybridisierung wurde der Ansatz entsprechend vergrößert und die Inkubationszeit u.U. verlängert. Wurden die Fragmente für weitere Reaktionen eingesetzt, wurde die Endonuclease entweder hitzeinaktiviert (20 min bei 65°C) oder mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt.

3.4.4.2 Enzymatische Modifizierung von DNA-Enden

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal alkaline phosphatase = CIP) [Roche] trennt Phosphatgruppen vom 5`-Ende der DNA und verhindert somit z.B. die Religation von Vektor-DNA. Zur Dephosphorylierung wurde ein präparativer Restriktionsansatz des Vektors mit 1/10 Endvol. CIP-Puffer (10x) und 1-3 U CIP für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase wurde mittels PCI aus dem Ansatz extrahiert und die dephosphorylierte Vektor-DNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol (abs.) gefällt.

Das Klenow-Enzym [Roche] ist eine Untereinheit der *E. coli* DNA-Polymerase I mit fehlender 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und wird zur Umwandlung von 3'-verkürzten Enden von DNA-Restriktions-Fragmenten durch Auffüllen („fill-in“-Reaktion) zu glatten Enden genutzt. Nach der Restriktion wurden 1-2 µg DNA mit jeweils 1 mM dNTP-Lösung und 1 U Klenow-Fragment 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75°C konnte die aufgefüllte DNA direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu können mittels der Exonuklease aus Mungbohne [Roche] überstehende 5`-Enden zu glatten Enden abgebaut werden. Im Ansatz wurden 1/10 Endvol. Reaktionspuffer mit 3 U Nuklease für 1 h bei 37°C eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym in analoger Weise zur CIP extrahiert.

Die Terminale Transferase [Roche] katalysiert die wiederholte Anlagerung von Nucleotiden an freie 3`-OH-Enden. Dieses Enzym wurde bei der 5'-RACE (siehe 3.4.9) zum dA-Tailing eingesetzt.

3.4.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase verknüpft komplementäre Einzelstrang- (sticky) oder glatte (blunt) DNA-Enden über Reparatur aufgebrochener Phosphodiesterbindungen. Der Ligationsansatz enthielt neben dem dephosphorylierten Vektor (100-200 ng) und dem zu klonierenden DNA-Fragment (3-5 facher molarer Überschuss gegenüber der Vektor-DNA), 1 x Ligationspuffer und 3-10 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die entsprechenden höheren Mengenangaben beziehen sich auf die diffizilere Ligation glatter Enden. Um bei dieser „blunt-end“-Ligation die Diffusion der zu ligierenden Enden zu reduzieren, wurde der Ansatz mit 10% PEG 8000 versehen und bei 10°C ü.N. inkubiert. Die „sticky end“-Ligation erfolgte ü.N. bei 16°C.

Alternativ konnte mit dem Rapid Ligation Kit [Roche] eine DNA-Ligation nach Herstellerangaben in 15 min erfolgen.

3.4.5 Transformation von *E. coli*

3.4.5.1 „Hitzeschock“-Transformation

Die Herstellung von zur DNA-Aufnahme kompetenter Bakterienzellen (XL1Blue, AD494(DE3), JM 105, JM 109, SG13009) für eine „Hitzeschock“-Transformation erfolgte nach der RbCl-Methode modifiziert nach Hanahan (1983).

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 (ca. 2h) geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden unter mehrmaligem Schwenken für 10 min auf Eis abgekühlt und in einem gekühlten sterilen Zentrifugenbecher (GSA-Rotor, 4°C, 4000 rpm, 10 min) pelletiert. Die Zellen wurden dann in 30 ml kaltem Tfb 1 suspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 4 ml kaltem Tfb 2 resuspendiert und die Zellen à 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Die Standardtransformation folgte weitgehend nach dem Protokoll von Hanahan (1983). Hierzu wurden 200 µl kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis gekühlt. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch ein Erhitzen der DNA-Zellsuspension für 1 min auf 42°C („Hitzeschock“). Der Transformationsansatz wurde anschließend sofort 2 min auf Eis gekühlt, danach mit 800 µl LB versetzt und für 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln regeneriert. Aliquots (100-200 µl) wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Tfb 1:	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂
	15% (v/v)	Glycerin (86%)
	mit HCl auf pH 5,8 (nicht rücktitrieren) und sterilfiltrieren	

TfB 2:	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
	15% (v/v)	Glycerin (86%)
	mit NaOH auf pH 6,8 (nicht rücktitrieren) und sterilfiltrieren	

3.4.5.2 Elektroporation [*E. coli*]

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* wurden 4 ml einer ÜN-Kultur in 400 ml LB-Medium überimpft. Die Zellen wurden dann 2-3 h bei 37°C geschüttelt und in der frühlogarithmischen Phase (OD₆₀₀= 0,5-0,7) geerntet. Nach dessen Abzentrifugieren (4°C, 10 min, 4000 rpm, Sorvall GS3-Rotor) wurde das Bakterienpellet in 400 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Es war darauf zu achten, dass alle Medienbestandteile entfernt wurden. Es folgten 2 weitere Zentrifugationsschritte nach denen die Zellen in jeweils 200 ml bzw. 100 ml 10%igen eiskaltem Glycerin suspendiert wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Bakterien in 3 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die elektrokompenten Zellen konnten bei – 70°C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

Die Elektrotransformation der Bakterienzellen wurde mit dem *E. coli* Pulser [Bio-Rad] durchgeführt. Durch kurze Hochspannungspulse wird die Zellmembran für exogene DNA durchlässig gemacht. Die Fremd-DNA muss sich zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlages in einer Lösung mit sehr geringer Ionenstärke befinden. Diese Methode zeigt im Vergleich zur „Hitzeschock“-Transformation eine 10-100 fach höhere Transformationsrate und eignet sich insbesondere zur Transfektion mit großen Plasmiden oder zur Handhabung schwer transformierbarer Bakterienstämmen. Zur Elektroporation wurden 50 µl elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl DNA-Lösung (10ng-1µg) 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zell-DNA-Suspension in einer gekühlten Küvette gemischt und im *E. coli* Pulser mit folgender Parametereinstellung transformiert: Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF, Spannung 2,5 kV bei einem Küvettendurchmesser von 0,2 cm. Nach dem Puls wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben und mit dem Transformationsansatz gemischt. Dieser regenerierte dann unter leichtem Schütteln für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die transformierten *E. coli*-Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:	2% (w/v)	Trypton	
	0,5% (w/v)	Yeast Extract	
	10 mM	NaCl	
	10 mM	MgCl ₂	
	2,5 mM	KCl	
	10 mM	Glucose	pH 7,0

3.4.6 Transformation von *P. pastoris*

3.4.6.1 "Lithiumchlorid"-Methode

Diese chemische Transformationsmethode ist eine modifizierte Version der Transformation von *S. cerevisiae* (Gietz & Schiestl, 1995). Durch Behandlung der Hefezellen mit LiCl werden diese für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht. Dazu wurde *P. pastoris* in einer 50 ml YEPD-Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30°C kultiviert und zentrifugiert (3000 rpm, RT, 10 min, GSA-Rotor). Das Zellpellet wurde in 20 ml A. bidest. gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml einer 100 mM LiCl-Lösung resuspendiert und nochmals pelletiert (10000 rpm, RT, 15 sec, Eppendorf-Zentrifuge). Schliesslich wurden die Hefezellen in 400 µl der 100 mM LiCl-Lösung aufgenommen und à 50 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen mussten unmittelbar für die Transformation eingesetzt werden. Nach dem Entfernen der LiCl-Lösung wurden als Transformationsansatz folgende Komponenten in angegebener Reihenfolge pipettiert:

240	µl	PEG-3350 (50% (w/v))
36	µl	LiCl-Lösung (1M)
25	µl	gekochte Lachssperma-DNA (2 mg/ml)
10	µg	linearisierter DNA
ad 50 µl A. bidest.		

Der Ansatz wurde bis zur völligen Suspension der Zellen gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Zur Transformation der *Pichia*-Zellen wurde eine 25-minütige Hitzeinkubation bei 42°C durchgeführt und anschließend zentrifugiert (7000 rpm, RT, 1 min, Eppendorf-Zentrifuge). Die Lösung wurde abgenommen und die transformierten Zellen wurden in 1 ml YEPD-Medium bei 30°C für 1 h unter leichtem Schütteln regeneriert. Jeweils nach 1 bzw. 4 h wurden die Zellen auf YEPGS-Platten mit Zeocin (100 µg/ml) ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

3.4.6.2 Elektroporation [*P. pastoris*]

Zur Herstellung elektrokompetenter *Pichia*-Zellen wurden 500 ml YEPD-Medium mit 500 µl einer ÜN-Kultur inokuliert und ebenso ü.N. bei 30°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5 wurden die Zellen geerntet (3000 rpm, 4°C, 10 min, Sorvall GS3-Rotor) und in 500 ml eiskalten A. bidest. gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 250 ml A. bidest., um die an den Zellen anhaftenden Medienbestandteile vollständig zu entfernen. Danach wurde das Zellpellet in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und erneut wie vorher zentrifugiert. Endgültig wurden die *Pichia*-Zellen in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gelöst und unmittelbar zur Transformation eingesetzt. Pro Transformationsansatz wurden 80 µl elektrokompetente Zellen mit 10 µg linearisierter DNA (100 µg circulärer DNA) in einem Volumen von 90 µl in eine Elektroporationsküvette (Ø 0,2 cm) überführt und 5 min auf Eis gehalten. In dem *E. coli* Pulser [Bio-Rad] wurde unter folgender Einstellung transformiert: Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF, Spannung 1,5 kV. Unmittelbar nach dem Puls wurde der Ansatz mit 1 ml eiskaltem 1M Sorbitol versehen und 2 h bei 30°C stehend inkubiert. Anschließend wurden die Transformanten auf zeocinhaltigem YEPDS-Medium ausplattiert und 3-4 Tage bei 30°C kultiviert.

3.4.7. Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

3.4.7.1 Alkalische Agarosegelelektrophorese von DNA

Die mit Restriktionsenzymen behandelte DNA wurde zur Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß Sambrook et al. (1989). Die Agarosekonzentration betrug in Abhängigkeit von den zu trennenden Fragmentgrößen 0,6 – 1,6 % (w/v) in 1 x TAE Puffer. Ethidiumbromid, das in die DNA zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und dadurch eine Visualisierung unter UV-Licht (312 nm) ermöglicht, wurde den Gelen 0,01%ig (v/v) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Vol. Probenpuffer versehen. Parallel diente ein DNA-Marker [1 KB Leiter von Gibco BRL] dem Größenvergleich. Der Elektrophoreselauf erfolgte in 1 TAE-Puffer bei 7 V/cm Gellänge.

Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II® [Stratagene] dokumentiert.

1xTAE-Puffer:	40 mM	Tris-Acetat	
	1 mM	EDTA	pH 8,0

6xDNA-Auftragungspuffer:	10%	(v/v)	10xTAE-Puffer
	30%	(v/v)	Glycerin
	0,25%	(w/v)	Bromphenolblau

3.4.7.2 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Größentrennung von RNA wurden Agarosegele mit Formaldehyd zur Denaturierung der Sekundärstrukturen verwendet (modifiziert nach Lehrach et al., 1977). 1,2 g Agarose wurde mit 10 ml 10xMOPS-Gelpuffer und 90 ml H₂O_{DEPC} aufgekocht und anschließend auf 65°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1,8 ml 37%igem Formaldehyd und 2 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurde das RNA-Gel in die Gelapparatur gegossen und 30 min in 1xFA-Laufpuffer äquilibriert. Bis zu 30 µg RNA-Probe wurde mit dem 5xRNA-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 gemischt, 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte in 1xFA-Laufpuffer bei 7 V/cm Gellänge, die 0,24 - 9,49 kb RNA-Leiter [Roche] diente als Größenstandard.

10xMOPS-Gelpuffer:	200 mM	MOPS	
	50 mM	Na-Acetat	
	10 mM	EDTA	mit NaOH auf pH 7,0

1xFA-Laufpuffer:	10%	(v/v)	10xMOPS-Gelpuffer
	2%	(v/v)	Formaldehyd (37%)

5xRNA-Probenpuffer:	0,2%	(v/v)	Bromphenolblaulösung, gesättigt
	0,8%	(v/v)	500 mM EDTA, pH 8,0
	7,2%	(v/v)	Formaldehyd (37 %)
	20%	(v/v)	Glycerin
	30%	(v/v)	Formamid
	40%	(v/v)	10xMOPS-Gelpuffer

3.4.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels NucleoSpinExtract 2 in 1 Kit [Macherey & Nagel] bzw. QIAquick Gel Extraction Kit [Qiagen] isoliert. Nach dem Ausschneiden des Fragmentes aus dem Gel wurde die Agarose chemisch und thermisch aufgelöst und die eluierte DNA über eine Ionentauschersäule gereinigt. Die Elutions- und Reinigungsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Ausbeute und Reinheit wurden gelelektrophoretisch überprüft.

3.4.9 5`-Rapid amplification of cDNA ends (5`-RACE)

Die Methode der RACE wurde erstmals von Frohmann et al. (1988) beschrieben und in der Literatur häufig als „one sided PCR“ bezeichnet. Dabei nutzt man einen kleinen, bekannten Sequenzabschnitt aus, um das vollständige 5`-Ende einer mRNA bzw. cDNA zu amplifizieren. Für die 5`-RACE (Abbildung 9) verwendet man ausgehend von mRNA für eine reverse Transkription einen transkriptspezifischen Primer und hängt im zweiten Schritt mittels der Terminalen Transferase einen polyA-Schwanz an die synthetisierte einzelsträngige cDNA. Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges startet man dann mit dem komplementären Ankerprimer für die reverse Transkription. Die gebildete doppelsträngige cDNA dient anschließend als Matrize für eine zweite nested PCR. Dies war die Methode der Wahl, um das 5`-Ende des *SbHNL*-Gens zu identifizieren.

Die 5`-RACE wurde mit dem 5`/3`RACE Kit unter weitgehender Verwendung der Anleitung von Roche durchgeführt.

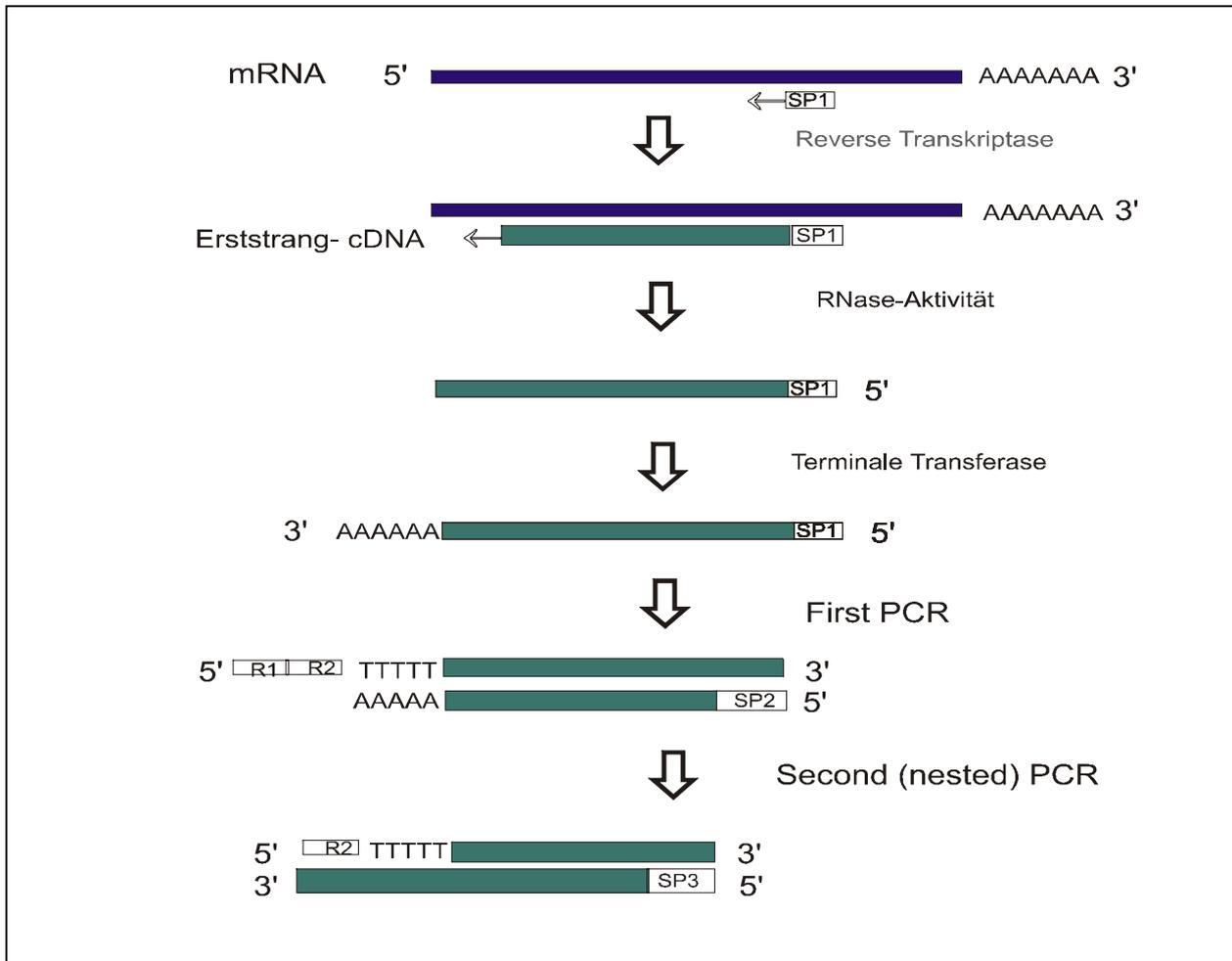


Abbildung 9: Schema der 5'-RACE zur Amplifizierung des 5'-Endes des *SbHNL*-Gens

3.4.9.1 Synthese der Erststrang-cDNA mittels Reverser Transkriptase

Zur Synthese der Erststrang-cDNA für die 5'-RACE wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

15	µl	mRNA aus <i>Sorghum bicolor</i> (1 µg)
6	µl	cDNA Synthesepuffer (5x)
1	µl	Primer für Erststrang-cDNA (S-Oxy 5-24)
4,5	µl	H ₂ O _{DEPC}

Der Ansatz wurde zuerst für 3 min auf 70°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen (Hairpins, RNA-Duplizies) zu lösen. Danach erfolgte ein sofortiges Abkühlen auf Eis und das Zufügen der thermolabilen Komponenten:

1	µl	RNAse Block I [Stratagene]
0,5	µl	dNTP-Lösung (100 mM), RNA-grade
2	µl	AMV Reverse Transkriptase

Die Reaktion wurde 1 h bei 55°C durchgeführt, um die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Abgestoppt wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 70°C. Die AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase besitzt eine hohe Temperaturstabilität und ihre intrinsische RNAse H-Aktivität degradiert nach cDNA-Synthese spezifisch den als Templat benötigten RNA-Strang.

Nach der Synthese wurden der Primer, die Reverse Transkriptase und die Nukleotide mit dem High Pure PCR Product Purification Kit [Roche] aus dem Ansatz entfernt. 150 µl Bindungspuffer wurde mit der Mixtur gemischt und auf den High Pure Filter gegeben. Es folgten einige Waschriffe nach Herstellerangaben bevor die cDNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl_{DEPC}, pH8, eluiert und zum polyA-Tailing eingesetzt wurde.

3.4.9.2 Anhängen des polyA-Schwanzes mittels Terminaler Transferase

An das 3'-Ende der synthetisierten Erststrang-cDNA wurde nun ein Homopolymer-Schwanz unter Verwendung von dATP und einer terminalen Transferase wie folgt angehängt.

20	µl	aufgereinigte cDNA
6	µl	Reaktionspuffer
2,5	µl	dATP (2mM)

Da auch einzelsträngige cDNA zur Bildung von Sekundärstrukturen insbesondere am 3'-Ende neigt, wurde der Ansatz 3 min bei 95°C inkubiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 1,5 µl terminale Transferase zugegeben und zuerst 1 h auf Eis inkubiert, um das 3'-Ende für die „Tailing“-Reaktion denaturiert und damit verfügbar zu halten. Anschließend wurde 20 min bei 37°C (Temperaturoptimum der terminalen Transferase) inkubiert und zum Abstoppen der polyA-Synthese für 10 min bei 70°C inaktiviert.

3.4.9.3 Amplifizierung der 5`-SbHNL-cDNA

Die Amplifizierung des 5'-Endes der SbHNL-cDNA erfolgte über zwei hintereinander ablaufende PCRs.

3.4.9.3.1 Erste PCR zur Synthese des cDNA-Doppelstranges

Die polyA-cDNA konnte direkt mittels PCR unter Einsatz eines oligo dT-Anchor-Primers und eines genspezifischen Primers nach folgendem Ansatz amplifiziert werden.

5	µl	polyA-Erststrang-cDNA
2	µl	oligo dT-Anchorprimer (37,5 µM)
2	µl	Genspezifischer Primer S-Oxy 20-24 (10 µM)
5	µl	dNTP-Mix (je 2 mM)
5	µl	Polymerase-Puffer (10x)
1	µl	DNA-Polymerase [Dynazyme von Stratagene; 2,5 U/µl]

ad 50 µl mit H₂O_{DEPC}

Zur Amplifizierung des 5`-Endes der SbHNL-cDNA wurde nach zahlreichen Variationen der Annealingtemperatur und des genspezifischen Primers folgendes Programm im Thermocycler definiert:

Initiale Denaturierung:		2 min	94°C
Zyklen:	Denaturierung:	30 sec	94°C
(10x)	Annealing:	30 sec	52°C
	Elongation:	1 min	72°C
Zyklen	Denaturierung:	30sec	94°C
mit Zeitinkrement:	Annealing:	30sec	52°C
(25x)	Elongation:	1 min+20 sec pro Zyklus	72°C
Terminale Elongation:		10 min	72°C

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem 1% igen Agarosegel überprüft. Die Produktbanden waren meist zu schwach, so dass eine zweite, sog. nested PCR durchgeführt werden musste.

3.4.9.3.2 Zweite (Nested) PCR zur Synthese des cDNA-Doppelstanges

Um die Spezifität der ersten PCR zu erhöhen, wurde eine nachfolgende Amplifizierung des Produktes der ersten PCR mit zwei ineinandergeschachtelten, sog. nested Primern durchgeführt.

5	µl	Produkt der First PCR
1	µl	Anchor-Primer (12,5 µM)
1	µl	Genspezifischer Primer S-Oxy 21-21 (10 µM)
5	µl	dNTP-Mix
5	µl	Polymerase-Puffer
1	µl	DNA-Polymerase [Dynazyme von Stratagene; 2,5 U/µl]

ad 50 µl mit H₂O_{DEPC}

Die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie unter 3.4.9.3.1

Wiederum wurde der PCR-Ansatz gelektrophoretisch aufgetrennt, das PCR-Produkt isoliert und in den Vektor pUC18 blunt-end kloniert. Somit stand das 5'-Ende der SbHNL zur Sequenzierung zur Verfügung.

3.4.10 Ortsspezifische Mutagenese

Die gerichtete Änderung der Nukleotidsequenz, welche den Austausch einer Aminosäure u.a. im potentiellen aktiven Zentrum der LuHNL bewirkte, wurde mit dem Quick-Change™ Site-directed Mutagenesis Kit [Statagene, Heidelberg] nach den darin gemachten Angaben durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird ein aus dam⁺*E.coli*-Stämmen doppelsträngiges methyliertes Plasmid mit einem Mutageneseprimerpaar, welches die gewünschte Mutation einführt, als Ganzes in Reaktionszyklen mittels *PfuTurbo*-Polymerase amplifiziert (Abbildung 10). Die Mutageneseprimer hybridisieren an korrespondierenden Stellen auf dem sense- und antisense-Strang des Plasmids. Das Polymerasereaktionsprodukt ist das Plasmid mit der Mutation auf beiden Strängen sowie jeweils einer Strangbruchstelle (nick, ⚡) auf jedem Plasmidstrang, welche nach Transformation von der Empfängerzelle repariert werden kann. Das parentale Plasmid wird vor der Transformation durch die für methylierte und hemimethylierte DNA spezifische Restriktionsendonuclease *Dpn* I abgebaut.

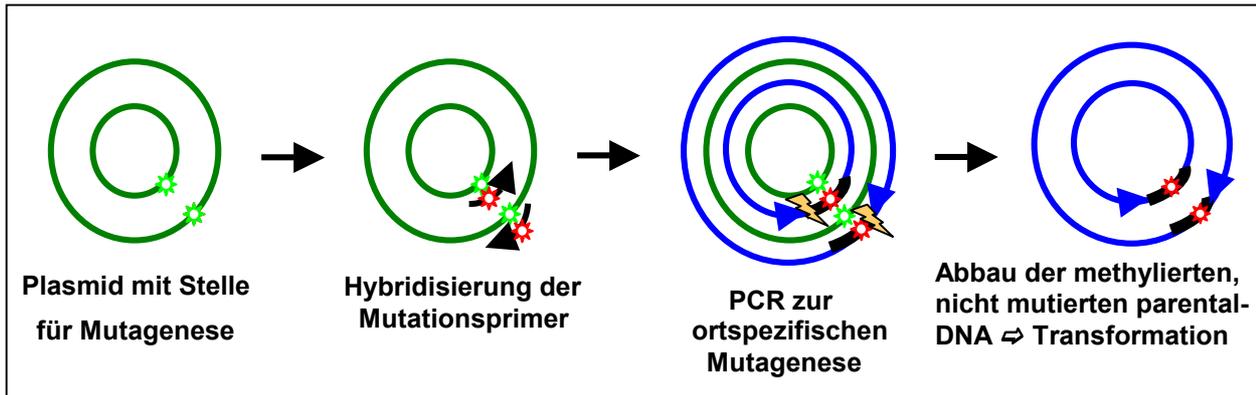


Abbildung 10: Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese mit dem Quick-Change™ Site-directed Mutagenesis Kit [Statagene, Heidelberg]

Für die Mutagenese wurden unterschiedliche Mengen (10-50 ng) Vektor-*LuHNL*-DNA in einem 50 µl Ansatz mit 2,5 U *Pfu-Turbo* Polymerase in Gegenwart von ca.175 ng Mutageneseprimern unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung:		30 sec	95°C
Zyklen: (17x)	Denaturierung:	30 sec	95°C
	Annealing:	1 min	55°C
	Elongation:	7 min	68°C
Terminale Elongation :		20min	68°C

Anschließend wurde der nicht mutierte und methylierte parentale DNA-Strang mit 10 U *Dpn I* für 1 h bei 37°C restringiert. „Epicurian Coli® XL1-Blue supercompetent cells“ wurden mit 5µl der mutierten Plasmid DNA aus dem *Dpn I* behandelten PCR-Ansatz transformiert und waren in der Lage, die Einzelstrangbrüche zu reparieren. Die Klone wurden mittels Restriktionsanalyse charakterisiert, und durch Sequenzierung wurde der Erfolg der Mutagenese verifiziert.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Kultivierung von *E. coli* und *P. pastoris* zur heterologen Genexpression

3.5.1.1 Optimierung der Expression in *E. coli*

Das rekombinante Wildtyp *LuHNL* (*recLuHNL*)-Gen wurde sowohl in verschiedenen *E. coli*-Stämmen als auch in unterschiedlichen Vektoren kloniert und exprimiert. Weitere Parameter für die Optimierung der Genexpression in *E. coli* waren neben der Induktorkonzentration, der Induktionszeitpunkt sowie die Kultivierungstemperatur und -dauer. Exprimiert wurde in den *E. coli*-Stämmen SG13009[pREP4], JM105, JM109, XL1Blue und AD494(DE3) sowie mittels der Vektoren pQE9, pKK223-2 und pBTac2. Die Anzucht erfolgte im 100 ml Maßstab auf einem Reziprokschüttler mit 180 rpm nach Inokulation mit einer Übernachtskultur (1:100) in LB-Medium unter Selektionsdruck. Die Expression der *LuHNL* wurde mit IPTG (β -D-Isopropylthiogalactosid) unter Variation der Konzentration im Bereich 0-2 mM induziert. Als Induktionszeitpunkt wurden optische Dichten der Kulturen bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,3 und 1,5 gewählt. Eine Induktionsdauer zwischen 3 und 16 h wurde getestet. Die Kultivierungstemperatur wurde zwischen 18°C und 37°C variiert. Die Zellen wurde durch Zentrifugation (10 min, GSA-Rotor, 5000 rpm, 4°C) geerntet und nach Zellaufschluss wurde im zellfreien Rohextrakt die spezifische Aktivität der *LuHNL* bestimmt. Zudem wurden die unterschiedlichen Expressionsraten mittels SDS-PAGE bestimmt.

3.5.1.2 Optimierung der Expression in *P. pastoris*

Das rekombinante Wildtyp *SbHNL* (*recSbHNL*)-Gen wurde sowohl mit als auch ohne Leader-Sequenz in die *Pichia*-Expressionsvektoren pPIC α C (sekretorische Expression) und pPICB (intrazelluläre Expression) kloniert und in den *Pichia*-Stämmen KM71, X33 und GS115 exprimiert. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren und Glucose-reprimierbaren AOX (Alkoholoxidase)-Promotors.

Um eine Steigerung der Expressionsrate zu erzielen, wurden Anzuchtmedien sowie Induktionsdauer und -zeitpunkt variiert. Als Medien wurden sowohl gepuffertes sowie ungepuffertes Minimalmedium (BMM und MM) als auch gepuffertes Komplexmedium (BMMY) verwendet (siehe 3.3.2). Die Anzucht erfolgte im 100 ml Maßstab bei 30°C auf einem Reziproschüttler bei 220 rpm, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Induziert wurde bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ zwischen 1 und 10 für 6 h, 12 h, 24 h bis 5 Tage mit 0,5% - 1% Methanol. Aufgrund der Metabolisierung des Methanols als C-Quelle durch die *Pichia*-Zellen wurde täglich Methanol ins Medium nachgefüllt. Die Zellen bzw. der Kulturüberstand wurde durch Zentrifugation (GSA-Rotor, 3000 rpm, 10 min) geerntet. Nach Aufschluss der Zellen bzw. nach Umpufferung des Überstandes in 50 mM Kpi, pH7,5, wurde die Enzymaktivität bestimmt und die Enzymproduktion auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.2 Zellaufschlussverfahren

3.5.2.1 Zellaufschluss durch Sonifikation [*E. coli*]

Der Aufschluss geringer Mengen bakterieller Zellen, insbesondere nach Bildung von Inclusion Bodies, erfolgte durch gepulsten Ultraschall. Die in TE-Puffer, pH 8,0, resuspendierten *E. coli*-Zellen wurden am Pulsed Sonifier [Branson] dreimal 20 Ultraschallpulsen bei 25%iger Intensität und Kühlungsintervallen ausgesetzt. Die Zelltrümmer und weiterhin unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (15 min, 4°C, 10000 g) und der Überstand zur Enzymaktivitäts- und Proteingehaltsbestimmung eingesetzt, sowie einer SDS-PAGE-Analyse unterworfen. Unlösliche Proteinanteile im Pellet konnten nach einstündiger Inkubation in 6 M Harnstoff weitestgehend resolubilisiert werden und ebenso in eine SDS-PAGE eingesetzt werden.

3.5.2.2 Enzymatischer Zellaufschluss [*E. coli*]

Zur Expressionskontrolle konnten geringe Mengen an Zellmaterial schonend mittels des zellwandabbauenden Enzyms Lysozym aufgeschlossen werden. *E. coli*- Zellen einer 50 ml-Kultur wurden pelletiert und in 900 µl Lysispuffer resuspendiert.

Nach Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (100 mg/ml) wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zelldebris wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 10 min, 4°C, 10000 rpm) und das zellfreie Rohextrakt zur Enzymaktivitätsbestimmung (Kapitel 3.5.4) verwendet.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl
15 mM EDTA pH 7,5

3.5.2.3 Mechanischer Zellaufschluss mittels Nassmahlverfahren [*E. coli* und *P. pastoris*]

In den meisten Fällen erfolgte der Zellaufschluss mechanisch mittels Glasperlen (Ø 0,3 mm bei *E. coli*, Ø 0,5 mm bei *P. pastoris*). Die Zellen der Flüssigkulturen wurde durch Zentrifugation (4°C, 5000 g, 10 min) geerntet, in 50 mM Kpi-Puffer, pH 7,5, auf 20 % (w/v) der Organismenmasse suspendiert und der 1,5-fache Gewichtsanteil an Glasperlen zugefügt. Der Aufschluss erfolgte je nach Volumen in einer Schwingmühle (1-10 ml) der Fa. Retsch GmbH & Co KG (Hummel & Kula, 1989), in einem Disintegrator (20-50 ml, 4000 rpm) [Fa. IMA, Heidelberg] oder in einer Rührwerkskugelmühle (1-5 l) der Fa. Netsch Feinmahltechnik über einen Zeitraum von 30 min bei ausreichender Kühlung. Die Glasperlen und Zelltrümmer wurde anschließend aus dem Zellhomogenat abzentrifugiert (15 min, 4°C, 12000 g), das Pellet mit dem Aufschlusspuffer gewaschen, erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Die gewonnenen Rohextrakte wurden entweder für eine Aufreinigung oder Enzymaktivitätsbestimmung benutzt, bzw. einer elektrophoretischen oder immunochemischen Analyse unterworfen.

3.5.2.4 Aufschluss von pflanzlichen Blattmaterial

Für die Isolierung sowohl der *Lu*HNL als auch der *Sb*HNL wurde das frisch geerntete oder tiefgefrorene Blattmaterial (siehe 3.2.) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem eisgekühlten Mörser mit einem Pistille zu feinem Pulver homogenisiert. Die gemörserten Lein-Keimlinge wurde in 20 mM Kpi-Puffer, pH 6,2, suspendiert (15% (w/v)) und ü.N. bei 4°C extrahiert.

Dann wurde Triton X114 bis zu einer End-konzentration von 2,5 % (v/v) zugegeben, 10 min gerührt, anschließend 2 h bei RT im Überkopfschüttler (Eigenbau der Institutswerkstatt) geschüttelt und danach für 30 min auf 30°C zwecks Phasentrennung erwärmt. Dieses Tensid-Zwei-Phasensystem wurde zur Klärung des Zellaufschlusses verwendet (Minuth, 1996). Zell- und Organellmembranen sowie an diese gebundenen Chlorophyllmolekülen wurden von der in der wässrigen Phase enthaltenen *LuHNL* getrennt. Außerdem wurden im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (20 min, GSA-Rotor, RT, 4000 rpm) neben einer Phasentrennung die korpuskulären Bestandteile sedimentiert. Die obere tensidarme Phase enthielt die *LuHNL* und wurde abdekantiert.

Die fein gemörserten Hirsekeimlinge wurden in 50 mM Kpi-Puffer pH, 7,5, (15 % (w/v)) suspendiert und bei RT 3 h lang extrahiert. Die groben und unlöslichen Zell- und Pflanzenbestandteile wurden abzentrifugiert (GSA-Rotor, RT, 20 min, 8000 rpm) und der Überstand nochmals über einen Glasfilter geklärt.

Eine Proteingehaltsbestimmung der Rohextrakte nach den unterschiedlichen Zellaufschlussverfahren ermöglichte die Beurteilung der Aufschlussgüte. Darüberhinaus konnte die spezifische Aktivität der beiden HNLn bestimmt werden.

3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Proteinlösung wurde photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Sie beruht auf der Bindung des ionischen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische Aminosäuren. Dazu wurden 100 µl Probenlösung mit 900 µl Bradford-Reagenz gemischt, 7 min bei RT inkubiert und die Extinktion im Spektralphotometer bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve im Bereich von 10 – 100 µg/ml ermittelt.

Bradford-Reagenz:	100	mg	Coomassie Brilliant-Blue G-250
	50	ml	Ethanol (abs.)
	100	ml	85%ige Phosphorsäure
	ad 1 l mit A. dest.		

3.5.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten

3.5.4.1 Test auf *LuHNL* –Aktivität

Zur Bestimmung der HNL-Aktivität aus *Linum usitatissimum* wurde die Abspaltung von Blausäure aus ihrem natürlichen Substrat Acetoncyanhydrin gemessen (Albrecht, 1991). Der Test beruht auf der photometrischen Quantifizierung des freigesetzten Cyanids durch eine Farbreaktion, bekannt als modifizierte Königs-Reaktion (Lambert et al. 1975; Selmar et al., 1987). Dazu wurde das Reagenzienkit Spectroquant® 14800 Cyanid der Fa. Merck verwendet.

50 µl Proteinlösung wurden zu 438 µl Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,2, gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 12 µl Acetoncyanhydrinlösung initiiert. Nach 10-minütiger Reaktionszeit bei 30°C wurden 50 µl des Ansatzes in 5 ml A. bidest. gegeben und nacheinander mit je einem Mikrolöffel der Kitreagenzien CN-1, CN-2 und 3 Tropfen CN-3 versetzt. Nach jeder Reagenzienzugabe wurde gemischt und anschließend 5 min bei RT bis zum Endpunkt der Farbreaktion inkubiert. Die Absorption wurde bei $\lambda=585$ nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Zur Absicherung der Messwerte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Menge an freigesetztem Cyanid wurde anhand einer mit Lithiumcyanid (0-2,5 mM) erstellten Eichgerade bestimmt.

Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,2:	38 ml	0,2 M	Natriumhydrogenphosphatlösung
	62 ml	0,1 M	Citronensäure

Acetoncyanhydrinlösung:	1 ml	Acetoncyanhydrin (frisch destilliert)
	9 ml	0,1 M Citronensäure

Reagenz CN-1:	N-Chlor-Succinimid
Reagenz CN-2:	1,3-Dimethylbarbitursäure
Reagenz CN-3:	Pyridin

3.5.4.2 Test auf SbHNL- Aktivität

Die Aktivität der SbHNL lässt sich mittels eines kontinuierlichen Photometertests bestimmen. Basierend auf der Spaltung von p-Hydroxymandelonitril in p-Hydroxybenzaldehyd und Blausäure wird eine Absorptionzunahme bei $\lambda=285$ nm bewirkt, die auf der Freisetzung des p-Hydroxybenzaldehyds beruht (Seely & Conn, 1971). Aus der zeitlichen Absorptionsänderung wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bestimmt. Die Messlösung bestand aus 1 ml Reagenzienlösung und 25 μ l Enzymlösung. Die Messung erfolgte bei $\lambda=285$ nm und 25 °C in Quarzküvetten über 60 sec. Die Volumenaktivität wurde dann über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v_0) bei gesättigter Substratkonzentration unter definierten Versuchsbedingungen bestimmt.

Citrat-Phosphat-Puffer, pH 3,75:	34 ml	0,2 M	Natriumhydrogenphosphatlösung
	66 ml	0,1 M	Citronensäure

Reagenzienlösung:	50 mM	Citrat-Phosphat-Puffer, pH 3,75
	1 mM	p-Hydroxymandelonitril

	v_0	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als Mass für die Enzymaktivität [U/ml]
	dA/dt	Extinktionsänderung pro Zeiteinheit [s^{-1}]
	ϵ	Extinktionskoeffizient [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] bei 285 nm, wobei: $\epsilon_{p\text{-Hydroxymandelonitril}} = 300$ [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] $\epsilon_{p\text{-Hydroxybenzaldehyd}} = 16300$ [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
	V:	Volumen Testansatz [ml]
	v:	Volumen Enzymlösung [ml]

3.5.4.3 Test auf Alkoholdehydrogenase-Aktivität

Der Test misst die NAD^+ - bzw. die $NADP^+$ -Reduktion, die bei der Alkoholoxidation durch die ADH stattfindet. Die Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenase beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme von NADH bzw. NADPH bei 340 nm. Der Aktivitätstest wurde bei 30°C und pH 9,0 über 1,5 min verfolgt. Der Testansatz setzte sich wie folgt zusammen:

850	µl	80 mM Glycin-Puffer pH 9
66,7	µl	45 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺
33,3	µl	Alkohol (Methanol/Ethanol/Isopropanol)
50	µl	Enzymlösung

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet.

3.5.4.4 Test auf Formaldehydehydrogenase-Aktivität

Ähnlich dem Test auf ADH-Aktivität wird hier die Zunahme an reduziertem NAD⁺ bzw. NADP⁺ gemessen. Der Assay wurde wie folgt nach Schütte et al. (1992) angesetzt:

900	µl	Na-Phosphat-Puffer pH 8,0
33,3	µl	Glutathion bzw. A.dest
33,3	µl	NAD ⁺
33,3	µl	Formaldehyd

Der Reaktion erfolgte durch Zugabe der Enzymlösung bei 30°C.

3.5.4.5 Test auf Carboxypeptidase-Aktivität

Der Test auf Carboxypeptidase-Aktivität erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelplatten. Der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl Enzymlösung ($c = 25 \mu\text{g/ml}$) zu 100 µl einer 20 mM Dipeptidlösung in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,0. Dieser Assay wurde 18 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurden je 10 µl des Reaktionsansatzes auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄ aufgetragen. Als DC-Laufmittel wurden n-Butanol/Eisessig/H₂O (50:30:20) verwendet. Zur visuellen Detektion der Aminosäuren bzw. Dipeptide diente als Sprühreagenz 0,3 % Ninhydrin in Isopropanol. Die Entwicklung und Trocknung der DC-Platten erfolgte bei 100 °C im Trockenschrank.

3.5.5 Chromatographische Reinigungsverfahren

Die säulenchromatographischen Reinigungsverfahren wurden weitestgehend mittels FPLC durchgeführt.

3.5.5.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butylsepharose

Eine zur Trennung von Proteingemischen anwendbare Eigenschaft ist die Fähigkeit der Proteine, aufgrund von oberflächenständigen, unpolaren Seitenketten verschiedener Aminosäuren mit hydrophoben Liganden Wechselwirkungen einzugehen. Diese hydrophoben Wechselwirkungen werden mit zunehmender Konzentration an Salzen verstärkt.

Diese Methode wurde als letzter Schritt zur Aufreinigung der *recLuHNL* mit Butylsepharose FF [Pharmacia, Freiburg] als hydrophobem Liganden angewendet. Im Falle der *wtLuHNL* musste ein weiterer Aufreinigungsschritt folgen (siehe 3.5.5.2.2). 30 ml Säulenmaterial wurde in Puffer A äquilibriert und die vorgereinigte Enzymlösung aufgetragen. Mit einer Flussrate von 3 ml/min wurde solange mit Puffer A gespült, bis kein Protein mehr von der Säule eluiert wurde. Die Feinreinigung der *recLuHNL* wurde durch Anlegen eines linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von Puffer A nach Puffer B erreicht, wobei das Enzym bei ca. 10% (w/v) Ammoniumsulfat eluierte. Die Elution der *wtLuHNL* erfolgte über einen Stufengradienten von Puffer A nach Puffer B bei ca. 15% (w/v) Ammoniumsulfat.

Puffer A: 20 mM Kaliumphosphat pH 6,2
40% (w/v) Ammoniumsulfat

Puffer B: 20 mM Kaliumphosphat pH 6,2

3.5.5.2 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)

Unter Anwendung der IMAC kann man Proteine nach ihrer unterschiedlichen Bindungsaffinität zu Metallionen, welche durch Chelatbildung an Liganden immobilisiert werden, trennen. Die Stärke und Spezifität der Bindung ist daneben noch abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke.

3.5.5.2.1 IMAC an Ni-NTA-Agarose

Eine schnelle und effiziente Methode zur Aufreinigung von rekombinaten Proteinen mit einem Hexahistidin-Rest (sog. „His-tag“) ist die IMAC an Ni-NTA-Agarose. Somit war die Aufreinigung der *recLuHNL* mit N-terminalem His-tag in einem Schritt möglich. Für die präparative Reinigung der *recLuHNL*(His)₆ wurde Ni-NTA-Agarose der Fa. Qiagen [Hilden] verwendet. Ni²⁺-Ionen werden mittels des vierzähligen Liganden Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert und an einer Agarose-Matrix immobilisiert. 20 ml Ni-NTA-Superflow™ wurde in 50 mM Kpi-Puffer, pH 7,5 äquilibriert. Der Rohextrakt wurde aufgetragen und solange mit dem Äquilibrierungspuffer gespült, bis alle nichtgebundenen Proteine ausgewaschen waren. Ein Imidazolstufengradient von erst 20 mM Imidazol im Äquilibrierungspuffer wurde mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die Säule gegeben und eluierte schwach gebundene Fremdproteine. Die Elution von reiner *recLuHNL*(His)₆ erfolgte mit 200 mM Imidazol in 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5.

3.5.5.2.2 IMAC an Cu²⁺-Chelating-Sepharose

Die IMAC an Cu²⁺-Chelating Sepharose wurde sowohl als letzter Schritt zur Aufreinigung der *wtLuHNL* modifiziert nach Woker et al. (1992) als auch zur Reinigung der *wtSbHNL* durchgeführt. 50 ml Chelating Sepharose FF [Pharmacia, Freiburg] wurde mittels 200 mM CuSO₄-Lösung mit Cu²⁺-Ionen beladen und anschließend mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftrag der *wtLuHNL*- bzw. *wtSbHNL*-haltigen Proteinlösung wurde solange zuerst mit Puffer A und anschließend mit Puffer B gespült, bis kein Protein mehr abgetrennt wurde. Die Elution der *wtLuHNL* erfolgte nach Reäquilibrierung in Puffer A über einen linearen Gradienten von 0 – 50 mM Imidazol in Puffer A über 6 Säulenvolumina bei 12,5 mM Imidazol und einer Flussrate von 10 ml/min. Die *wtSbHNL*-haltigen Fraktionen wurden über 30 Säulenvolumina bei 10 mM Imidazol und gleicher Flussrate erhalten.

Puffer A_{*wtLuHNL*} : 20 mM Kaliumphosphat pH 6,2

Puffer A_{*wtSbHNL*} : 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Puffer B : 50 mM Natriumacetat pH 4,5

3.5.5.2.3 IMAC an Zn²⁺-Chelating-Sepharose

Die IMAC an Zn²⁺-Chelating-Sepharose wurde zur Feinreinigung der recLuHNL(His)₆ aus *P. pastoris* versucht. 5 ml Chelating Sepharose wurden mittels 200 mM ZnSO₄ mit Zn²⁺-Ionen beladen und in Puffer A äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen und ein linearer Imidazolgradient von 0-200 mM über 10 Säulen-volumina mittels Puffer B bei einer Flussrate von 2 ml/min angelegt. Die Säule wurde mit 400 mM Imidazol nachgewaschen. Die recLuHNL(His)₆ eluierte bei 75 mM Imidazol.

Puffer A: 40 mM Natriumacetat
150 mM NaCl pH 6,0

Puffer B : 40 mM Natriumacetat
150 mM NaCl
400 mM Imidazol pH 6,0

3.5.5.3 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

Bei der Anionenaustauschchromatographie binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine positiv geladene Matrix. Die Methode fand zur Aufreinigung sowohl der wtLuHNL bzw. recLuHNL als auch der wtSbHNL ihre Anwendung. Als Anionentauscher wurde in allen Fällen Q-Sepharose FF [Amersham Pharmacia Biotech] verwendet, der auf der Basis quervernetzer Agarose quarternäres Ammonium trägt. 50 ml Q-Sepharose FF wurde in Puffer A äquilibriert und nach dem Auftragen der HNL-haltigen Proben und anschließendem Waschschrift wurden die Enzyme mittels eines linearen Salzgradienten eluiert. Die recLuHNL wurde in Puffer B bei 20 mM KCl und einer Flussrate von 10 ml/min über 20 Säulenvolumina eluiert. Die wtLuHNL wird bei 30 mM KCl und gleicher Flussrate angereinigt. Die SbHNL wird in Puffer B bei einer Flussrate von 10 ml/min über 20 Säulenvolumina bei 27 mM NaCl eluiert.

Puffer A_{LuHNL} : 20 mM Kaliumphosphat pH 6,2

Puffer A_{SbHNL} : 50 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Puffer B_{LuHNL} : 20 mM Kaliumphosphat
1 M KCl pH 6,2

Puffer B_{SbHNL} : 50 mM Kaliumphosphat
1 M NaCl pH 7,5

3.5.5.4 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration, als chromatographische Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrer Größe, wurde sowohl zum Entsalzen der enzymhaltigen Proben als auch zur Abtrennung niedermolekularer pflanzlicher Verbindungen (natürliche Substrate der HNL und Chlorophylle) angewandt. Darüberhinaus wurde sie zur Trennung eines Proteingemisches nach Anreinigung der recLuHNL(His)₆ aus *P. pastoris* eingesetzt. Im Falle der wtLuHNL wurde eine Sephadex G-25 [Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala] zum Entsalzen der HIC-Eluate verwendet. 600 ml Säulenmaterial wurde mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,2, äquilibriert und die Proteinlösung in gleichem Puffer bei einer Flussrate von 20 ml/min eluiert. Ebenso wurde die wtSbHNL sowohl nach der Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose als auch nach der IMAC an Cu²⁺-Chelating-Sepharose über eine G-25-Säule in 50 mM Kpl-Puffer, pH 7,5, entsalzt. Darüberhinaus wurde die SbHNL nach deren Aufschluss nach gleichem Schema über eine Sephadex G-25 von ihrem natürlichen Substrat und von pflanzlichen Farbstoffen getrennt. Zur Entfernung eines Begleitproteins neben der recLuHNL(His)₆ aus *Pichia* wurde eine Sephadex G-75 benutzt, die im höhermolekularen Bereich eine Trennung ermöglicht. 120 ml Säulenmaterial wurden mit 50 mM Kpl-Puffer, pH 6,2, äquilibriert und die im gleichen Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min erhaltenen Proteinpeaks elektrophoretisch analysiert.

3.5.6 Weitere Reinigungsverfahren

3.5.6.1 Ammoniumsulfatfällung

Im Zuge der Aufreinigung der wtLuHNL wurde dem Tensid-Zwei-Phasensystem aus Kapitel 3.5.2.4 eine Ammoniumsulfatfällung angeschlossen. Zur tensidhaltigen Proteinlösung wurde soviel Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine zu 40% gesättigte Lösung vorlag. Die bis zu dieser Konzentration gefällten Proteine wurde abzentrifugiert (GSA-Rotor, 20 min, 10000 rpm, RT) und der salzhaltige Überstand zur HIC eingesetzt.

3.5.6.2 Ultrafiltration

Enzymlösungen wurden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und gegebenenfalls umgepuffert. Hierzu wurden Rührzellen [Amicon] mit Amicon YM 10-Membranen (10 kDa Ausschlussgröße) im Falle der *LuHNL* und YM 35-Membranen (35 kDa Ausschlussgröße) im Falle der *SbHNL* verwendet.

3.5.7 Elektrophoretische Verfahren

3.5.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Dokumentation der einzelnen Aufreinigungsschritte, sowie zur Expressionsanalyse wurden die proteinhaltigen Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die denaturierende SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) unter Verwendung diskontinuierlich gegossener 10-12% iger PAA-Trenngele durchgeführt. Zu 50 ml Trenngellösung wurden 40 µl TEMED als Katalysator und 120 µl 10%-iges APS als Starter der Polymerisation gegeben. Das Trenngel wurde in die Gelkammer gegossen, mit Isopropanol überschichtet und dort auspolymerisiert. Die Polymerisation der 20 ml Sammelgellösung wurde durch Zugabe von 75 µl 10% igem APS und 25 µl TEMED ausgelöst und nach Entfernung des Isopropanols wurde sie auf das Trenngel gegossen. Die Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer verdünnt, 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Nach dem Auftragen der Proben und des Premixed Protein Molecular Weight Markers [Roche] bzw. des Prestained Low Range Markers [Bio-Rad] für zu blottende Gele, wurde der Elektrophoreselauf bei 20 mA durchgeführt.

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl	pH 8,0
	130 mM Glycin	
	0,1% (w/v) SDS	

Trenngel (10 % / 12,5 %):	375 mM Tris-HCl	pH 8,8
	10% / 12,5% (w/v) Acrylamid	
	0,1% (w/v) SDS	

Sammelgel (4 %):	125 mM	Tri-HCl	pH 6,8
	4% (w/v)	Acrylamid	
	0,1% (w/v)	SDS	

Probenpuffer:	10% (v/v)	Glycerin	
	0,2% (w/v)	SDS	
	125 mM	Tris-HCl	pH 6,8
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau	
	10% (w/v)	DTT	

Zur Dokumentation aussagekräftiger Proteinanalysen wurden hochauflösende Fertiggele der Fa. Novex verwendet.

3.5.7.2 Elektroblothing nach Kyhse-Andersen

Zum immunologischen Nachweis der HNLn und zur N-terminalen Sequenzierung wurden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran Optitran [Schleicher und Schüll, Dassel] bzw. PVDF-Membran Immobilon P [Millipore, Bedford, USA] transferiert. Für dieses Blothing wurde das diskontinuierliche Puffersystem nach Kyhse-Andersen (1984) verwendet.

Das PAA-Gel wurde nach der Elektrophorese mit Millipore-Wasser gewaschen und anschließend 5 min im Kathodenpuffer äquilibriert. Nitrocellulosemembranen wurde direkt in Anodenpuffer II inkubiert, PVDF-Membranen wurden 5 min in Methanol geschüttelt, bevor sie im Anodenpuffer II äquilibriert wurden. Die Kathode der Blothingapparatur wurde mit Anodenpuffer I befeuchtet und zwei, in gleichem Puffer getränkte Filterpapiere in Gelgröße wurden aufgelegt. Darüber folgten ein mit Anodenpuffer II angefeuchtet Filterpapier und die Membran. Auf letztere wurden drei, in Kathodenpuffer getränkte, Filterpapiere aufgelegt und die Anode aufgesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in 45 min bei 1,5 mA/cm² Gelfläche.

Anodenpuffer I:	0,3 M	Tris-HCl	pH 10,4
	10 % (v/v)	Methanol	

Anodenpuffer II:	20 mM	Tris-HCl	pH 10,4
	10 % (v/v)	Methanol	

Kathodenpuffer:	25 mM	Tris-HCl	pH 9,4
	40 mM	ε-Aminohexansäure	
	10 % (v/v)	Methanol	

3.5.8 Färbung von Proteinen

3.5.8.1 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in dem Entfärber unter mehrmaligem Wechseln der Lösung solange geschüttelt, bis distinkte Proteinbanden zu erkennen waren. Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem Leuchttisch durch Aufnahme mittels einer Spiegelreflexkamera [Olympus OM-2].

Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
40% (v/v) Ethanol techn.
10% (v/v) Essigsäure
in A.dest.

Entfärbelösung: 40% (v/v) Ethanol techn.
10% (v/v) Essigsäure
in A.dest.

3.5.8.2 Färbung mit Silbernitrat

Die Silberfärbung der Proteingele erfolgte nach Blum et al. (1987) und ist ca. 10fach sensitiver als die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Die SDS-Gele wurden dreimal 20 min in Fixierlösung geschüttelt und anschließend je 10 min in 20%igem Ethanol und A. bidest. gewaschen. Die Proteinfärbung erfolgte durch Sensitivierung in 2%iger (w/v) Natriumthiosulfatlösung für 1 min, dreimaligem kurzem Waschen in A. bidest. und 45-minütiger Inkubation in der Silberlösung. Nach Spülen in A. bidest. zur Entfernung der überschüssigen Silberionen, wurde das Gel solange in der Entwicklerlösung geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Entwicklung wurde dann durch Zugabe der Fixierlösung gestoppt. Das Proteingel wurde wie unter Kapitel 3.5.8.1 dokumentiert.

Fixierlösung: 40% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure
in A.bidest.

Silberlösung: 2% (w/v) Silbernitrat
0,75 ml/l 37% Formaldehyd
in A.bidest.

Entwicklerlösung: 6% (w/v) Natriumcarbonat
0,5 ml/l 37% Formaldehyd
25 mg/l Natriumthiosulfat
in A.bidest.

3.5.8.3 Amidoschwarzfärbung

Die Detektion von Proteinen nach Blotting auf PVDF-Membranen erfolgte mit Amidoschwarz analog der Coomassie-Färbung. Nach der Entfärbung wurde die Membran an der Luft getrocknet, in eine Kunststoffolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,1% (w/v) Amidoschwarz
40% (v/v) Ethanol techn.
10% (v/v) Essigsäure
in A. bidest.

3.5.9 N-terminale Sequenzierung

Zur Identifizierung der aufgereinigten ADH aus *P. pastoris* wurden die ersten 29 Aminosäuren mittels Edman-Abbau in einem Automated Sequencer 477A [Applied Biosystems] bestimmt. Zur Sequenzanalyse wurden die Proteinproben über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.5.7.1) und vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 3.5.7.2). Die Proteine auf der Membran wurden mit Amidoschwarz angefärbt (siehe 3.5.8.3), die zu bestimmende Bande ausgeschnitten und N-terminal sequenziert. Die HPLC-Chromatogramme der abgespaltenen PTH-Aminosäuren wurden manuell ausgewertet.

3.5.10 Immunfärbung von Western Blots

Die spezifische Markierung der auf eine Membran immobilisierten Proteine (siehe 3.4.7.2), erfolgte mittels polyklonaler Antikörper gegen die verschiedenen Untereinheiten der HNLn. Die Detektion wurde mit einem enzymgekoppelten Anti-Antikörperkonjugat unter Verwendung des ECL Plus™-Kits [Amersham Pharmacia Biotech] durchgeführt. Je nach immunisiertem Antikörperproduzenten wurden anti-rabbit-IgG-POD bzw. anti-mouse-IgG-POD benutzt. Die Chemolumineszenz wurde durch Zugabe von H₂O₂ als Substrat der Antikörper-gekoppelten Peroxidase erzeugt und am Luminographen [Berthold, Bad Wildbad] detektiert. Die Intensitäten konnten vergleichend abgeschätzt werden. Um freie und unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran aus Kapitel 3.4.7.2 direkt nach dem Western-Blotting in 200 ml Blockinglösung überführt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in TBS-T erfolgte die Antikörperinkubation (1:5000 in TBS-T verdünnt) für 1 h bei 37°C unter Schütteln. Nach drei wiederholten 1-minütigen Waschschriften wurde eine 1-stündige Inkubation mit dem gegen den Wirtsorganismus gerichteten IgG-POD-Konjugate (1:10000 in TBS-T verdünnt) durchgeführt. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörpermoleküle wurde wiederum dreimal kurz gewaschen und die proteinbeladene Membran mit ECL-Detektionslösung 1 und 2 (1:1) benetzt. Nach Peroxidase-Reaktion erfolgte der Chemolumineszenz-Nachweis luminographisch.

Blockinglösung:	10 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	5% (w/v)	Milchpulver	
	1% (w/v)	Tween 20	

TBS-T:	10 mM	Tris-HCl	
	0,9% (w/v)	NaCl	
	0,2% (w/v)	BSA	
	0,1% (w/v)	Tween 20	

3.5.11 Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur NAD(P)H-Bindung

Eine mögliche NAD(P)H-Bindung der *LuHNL* wurde mittels fluoreszenzspektroskopischen Messungen untersucht. An dem Luminescence Spectrometer LS 50 B [Percin Elmer] wurden Emissionsspektren (Fluoreszenzspektren) der *LuHNL* in An- und Abwesenheit von NADH bzw. NADPH aufgezeichnet und mit Kontrollspektren Nucleotidbindender Proteine (Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae*) sowie nicht NAD-bindender Proteine (Rinderserumalbumin = BSA) verglichen. Zum einen wurde bei einer NAD(P)H-Absorptionswellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge über einen Detektor nach spektraler Auflösung im Wellenlängenbereich von 385-600 nm analysiert [NAD(P)H-Fluoreszenzspektrum]. Zum anderen wurden die proteinhaltigen Lösungen bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt, um die Fluoreszenzintensität der aromatischen Aminosäuren im Wellenlängenbereich von 300-500 nm zu ermitteln [Protein-Fluoreszenzspektrum]. Die Einstellungen der Spaltbreite am Spektrometer lagen bei 5 nm für die Excitation und 15 nm für die Emission. Alle protein- und NAD(P)H-haltigen Lösungen wurden mit 50 mM Kpi, pH 7,5, angesetzt. Die coenzymhaltigen Ansätze waren äquimolar zur Proteinlösung und wurden in einem Konzentrationsbereich von 2,5 μ M und 10 μ M bestimmt.

3.5.12 Test auf Enzymstabilität

Zur Bestimmung der Stabilität der *LuHNL* in Gegenwart ausgewählter Cofaktoren und Chelatbildener, wurde das Enzym homogen aufgereinigt und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, gelöst.

3.5.12.1 Stabilitätstest in Gegenwart von NAD(P)⁺ und Zn²⁺

In Gegenwart der Cofaktoren NAD(P)⁺ im Konzentrationsbereich von 10 µM – 10 mM und ZnSO₄ im Konzentrationsbereich von 5 µM – 10 µM wurden 0,5 µg - 2 µg *LuHNL* bei Temperaturen zwischen 30°C und 70°C über einen Zeitraum von 60 min inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach jeweils 15 min bei verschiedenen Konzentrations- und Temperaturwerten. Nach Durchführung des Enzymtests unter Kapitel 3.5.4.1 wurden die Restaktivitäten in Bezug auf die Aktivitäten ohne Cofaktoren bestimmt. Parallel wurden die Proteinkonzentrationen in den Proben nach Bradford bestimmt.

3.5.12.2 Stabilitätstest in Gegenwart von EDTA und 1,10-Phenanthrolin

Der Einfluss von Chelatbildnern für zweiwertige Metallionen auf die Enzymaktivität der *LuHNL* wurde bei 30°C und 50°C untersucht. Dazu wurde das Enzym mit EDTA und 1,10-Phenanthrolin im Konzentrationsbereich von 1 – 10 mM inkubiert und nach 15 min dessen Restaktivität in Bezug auf die Aktivität ohne Chelatbildner bestimmt. Der Enzymtest erfolgte wie unter Kapitel 3.5.4.1. beschrieben und parallel wurden die Proteinkonzentrationen in den Proben nach Bradford bestimmt.

3.5.13 Homologes Protein-Modelling

Das Homologie Modelling sowohl für die *LuHNL* als auch für die *SbHNL* wurde mit dem automatisierten Protein Modelling Server [SWISS Model] von GlaxoSmithKline [Genf, Schweiz] entwickelt ([www.expasy.ch / tools](http://www.expasy.ch/tools)). Die Generierung der 3D-Struktur beider in ihrer Aminosäuresequenz bekannten Enzyme, basiert auf einem vergleichenden Modelling homologer und bereits in ihrer Kristallstruktur aufgeklärter Proteine.

Die Visualisierung und vergleichende Analyse der modellierten 3D-Strukturen hinsichtlich aktiver Zentren, Aminosäureaustauschen, Bindungsverhalten und -abständen erfolgte mit Hilfe des Anwenderprogramms Swiss-pdb[protein data bank]-Viewer ([www.expasy.ch / tools](http://www.expasy.ch/tools)). (Schwede et al., 200; Peitsch et al., 1997; Guex & Peitsch, 1997; Peitsch, 1996).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Hydroxynitril-Lyase aus *Linum usitatissimum*

Die LuHNL ist ein nicht-glykosyliertes Homodimer mit einem Molekulargewicht von 84 kDa und benötigt zur Reifung seiner enzymatischen Funktion keine spezifischen posttranslationalen Proteolyseschnitte. Deshalb konnte das Enzym sowohl in einem prokaryotischen Expressionssystem [*E. coli*], als auch in eukaryotischen Einzellern [*P. pastoris*] funktionell exprimiert werden (Breithaupt, 1997; Trummler, 1997).

4.1.1 Expressionsoptimierung der recLuHNL in *E. coli*

Das Ziel einer heterologen Überexpression ist eine hohe Ausbeute an möglichst löslichem Zielprotein in der rekombinanten Wirtszelle. Dazu wurde das Gen der recLuHNL in verschiedene Expressionsvektoren mit starken bakteriellen Promotoren kloniert und in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen exprimiert (Stader, 1995; Breithaupt, 1997).

Als Expressionsvektoren wurden die Plasmide pBTac2, pKK223-2 und pQE9 verwendet. pBTac2 [Roche] und pKK223-2 [Amersham Pharmacia Biotech] besitzen einen IPTG induzierbaren *tac*-Promotor (*trp-lac*-Hybridpromotor) mit einer sehr starken Transkriptionsinitiationsstelle. Dieser Promotor steht unter der Kontrolle des *lac*-Repressors (*lacI*) und benötigt einen diesen Repressor stark und konstitutiv exprimierenden *E. coli*-Wirtsstamm. Der Repressor ist entweder auf genomischer Ebene kodiert, wie in *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* JM105 bzw. *E. coli* JM109 oder plasmidär lokalisiert, wie bei *E. coli* SG13009 [pREP4]. Der Expressionsvektor pQE9 [Qiagen] besitzt einen T5-Promotor und zusätzlich zwei *lac*-Operator Sequenzen, welche die Bindung eines *lac*-Repressors ermöglichen. Bei dem T5-Promotor handelt es sich um einen sehr starken Phagenpromotor, welcher von der *E. coli*-eigenen RNA-Polymerase erkannt wird. Aus diesem Grund sind auch hier hohe Konzentrationen an *lac*-Repressor notwendig, um den starken Promotor effizient zu regulieren. IPTG ist ebenso bei diesem System in der Lage, den Repressor zu inaktivieren und die Transkription zu induzieren. Außerdem besitzt pQE9 eine für einen N-terminalen Hexahistidin-Rest (sog. „His-tag“) kodierende Sequenz, welche eine schnelle und effiziente Aufreinigung des zu exprimierenden Proteins ermöglicht.

Da die *recLuHNL* einige Cystein-Reste aufweist, die potentiell im Enzym Disulfidbrücken bilden können, wurde neben *E. coli* JM105 und *E. coli* SG13009 der *E. coli*-Stamm AD494(DE3) [Novagen] zur Expression herangezogen. Aufgrund seiner fehlenden Thioreduktase-Aktivität, ist dieser Stamm in der Lage Disulfidbrücken im Cytoplasma auszubilden. Außerdem ist *E. coli* AD494(DE3) auch zur Überexpression des *lac*-Repressors fähig. Zum Testen auf Expression von aktiver *recLuHNL* wurden die unterschiedlichen *E. coli*-Stämme mit den entsprechenden *recLuHNL*-Vektor-Konstrukten transformiert.

Breithaupt (1997) zeigte, dass nach einer Anzucht bei 37°C und einer Induktion mit 1 mM IPTG keine Enzymaktivität messbar war, obwohl die Bildung der *recLuHNL* nach Immunfärbung des Rohextrakt-Pellets im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Die *recLuHNL* wurde in unlöslicher und daher inaktiver Form als sog. Inclusion Bodies gebildet. Dies ist ein weitverbreitetes Phänomen bei der heterologen Genexpression in *E. coli* (Schein, 1990; Strandberg & Enfors, 1991; Georgiou & Valax, 1996). Genauer handelt es sich dabei um unlösliche Proteinaggregate, welche sich infolge inkorrektur Faltung aufgrund einer zu hohen Expressionsrate oder fehlerhafter Konformation bilden. Unter dem Lichtmikroskop sind sie in Form von Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) im Cytoplasma der Zelle sichtbar. Solche Aggregate können aufgrund unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen zustande kommen (Mozhaev & Martinek, 1984). Diese Wechselwirkungen werden möglich, weil in entfalteten oder nur teilweise gefalteten Polypeptidketten hydrophobe Aminosäureseitenketten exponiert und lösungsmittelzugänglich sind, während sie im gefalteten Protein normalerweise dessen hydrophoben Kern bilden. Bei der Bildung von Inclusion Bodies spielt ebenso die Ladung, wie auch die Anzahl und Verteilung an Helix-bildenden Aminosäuren des Proteins eine Rolle (Wilkinson & Harrison, 1991). Eine Minderung der Translationsrate und damit die Vermeidung zu hoher lokaler Proteinkonzentrationen können diesen Präzipitationen entgegenwirken. Deshalb können durch ein Absenken der Kultivierungstemperatur unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen unterdrückt werden. Eine Senkung der Kultivierungstemperatur auf 28°C ermöglichte die Expression von aktiver *LuHNL* in allen untersuchten *E. coli*-Stämmen. Die Bildung von Inclusion bodies muss jedoch nicht unbedingt von Nachteil sein, wenn es möglich ist, das Protein *in vitro* zurückzufalten (Rudolph & Lilie, 1997; Carrio & Villaverde, 2001).

Große Mengen an aggregiertem rekombinatem Protein können durch Zentrifugation leicht von der löslichen Proteinfraction getrennt werden und sie sind vor dem Abbau durch cytoplasmatische Proteasen geschützt. Renaturierungsexperimente haben jedoch gezeigt, dass sich die *recLuHNL* in Form von Inclusion Bodies nicht wieder in aktives lösliches Enzym zurückfalten lässt (Breithaupt, 1997).

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Bildung der Inclusion Bodies zu reduzieren und somit die Ausbeute an löslichem und korrekt gefaltetem Protein im Cytoplasma zu erhöhen. Dazu wurden neben der Kultivierung bei 28°C weitere Strategien durch Variation der gegebenen Expressionsparameter [Vektor-Wirt-System, Induktionsbedingungen] getestet.

4.1.1.1 Optimierung des Vektor-Wirt-Systems

Eine Optimierung der Expression setzte im Vorfeld die Wahl eines geeigneten Expressionssystems voraus. Es konnte gezeigt werden, dass ein N-terminaler Hexahistidin-Rest die spezifische Aktivität nicht beeinträchtigt (Breithaupt, 1997). Deshalb fiel die Entscheidung auf den Expressionsvektor pQE9, um eine erleichterte Aufreinigung der *recLuHNL* zu ermöglichen. Ein geeigneter Wirtsstamm war zu ermitteln. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue, SG13009[pREP4], JM 105, JM109 und AD494(DE3) mit dem *recLuHNL*-pQE9-Konstrukt transformiert und im 200 ml Maßstab bei 28°C kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte OD_{600} von 1,5 für 3 h mit 1 mM IPTG. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

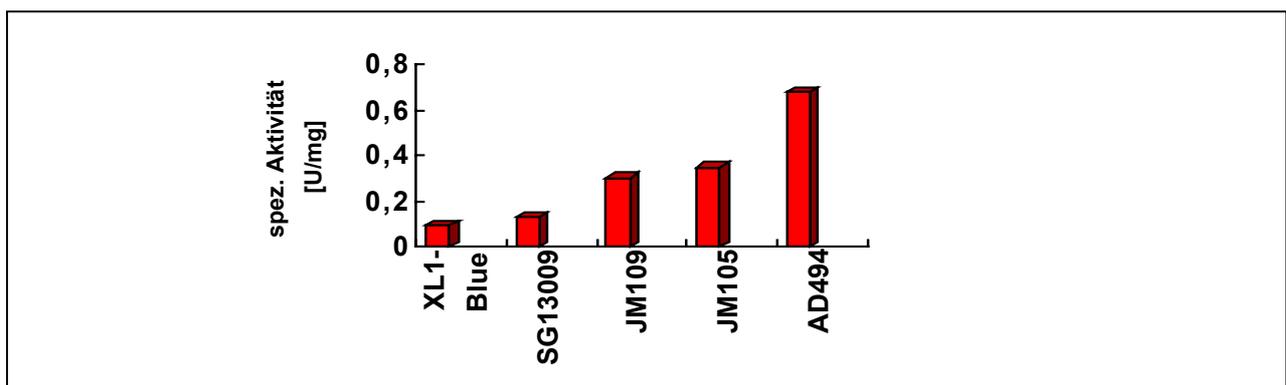


Abbildung 11: Spezifische Aktivitäten der *recLuHNL*(His)₆ im Expressionsvektor pQE9 in verschiedenen *E. coli*-Wirtsstämmen

Kultivierungstemperatur: 28°C

Induktorkonzentration: 1 mM IPTG

Induktionspunkt: $OD_{600} = 1,5$

Induktionsdauer: 3 h

Sie zeigt eindeutig den thio-reduktasedefizienten *E. coli*-Stamm AD494(DE3) als den Wirt, mit dem die höchste spezifische Aktivität erzielt werden kann. Dies könnte ein Hinweis auf eventuell vorhandene notwendige Disulfidbrücken sein, was in Kapitel 4.1.5.6.2 weiterführend untersucht wurde.

4.1.1.2 Optimierung der Induktionsparameter

Geringere Expressionsraten durch eine Kombination von reduzierter Induktionstemperatur unter 37°C und Induktorkonzentration unter 1 mM können eine korrekte in vivo Faltung des Proteins mit verringerter Aggregation ermöglichen (Strandberg & Enfors, 1991; Georgioux & Valax, 1996). Aus diesem Grund wurde die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Induktorkonzentration getestet (Abbildung 12).

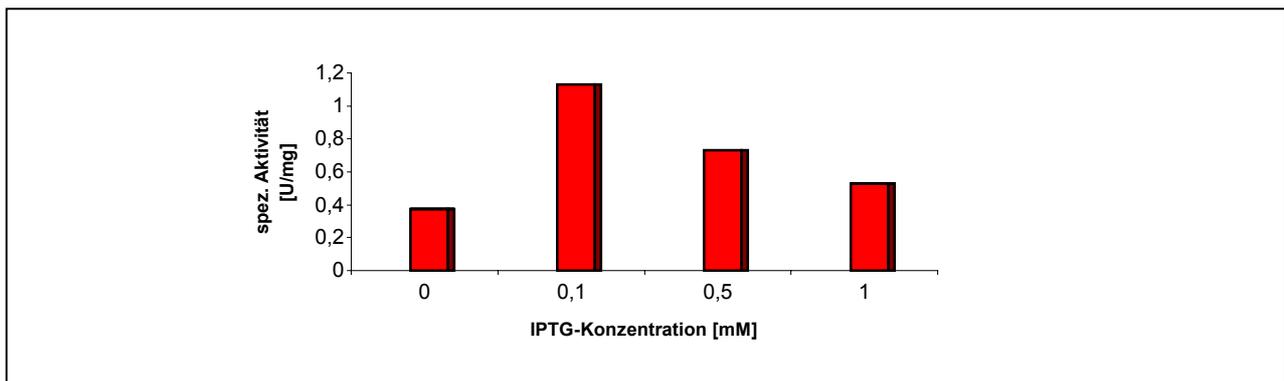


Abbildung 12: Spezifische Aktivitäten der recLuHNL(His)₆ nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen

Kultivierungstemperatur 28°C

Vektor-Wirt-System pQE9/AD494

Induktionspunkt: OD₆₀₀ = 1,5

Induktionsdauer: 3 h

Die höchste spezifische Aktivität wurde nach Induktion mit 0,1 mM IPTG erreicht. Weiterhin konnte durch geringe Erhöhung der Kultivierungs- und Induktionstemperatur von 28°C auf 30°C eine Steigerung der spezifischen Aktivität um 20 % erreicht werden. Eine Verlängerung bzw. Verkürzung der Induktionsdauer von 3h ergab keine Steigerung der Aktivitätswerte. Dies galt ebenso für einen Induktionspunkt bei einer OD₆₀₀ >1.

Wie aus Abbildung 12 zu erkennen, zeigt das Vektor-Wirt-System pQE9/AD494 auch eine recLuHNL Bildung im nicht induzierten Ansatz.

Dies war ebenso auf dem SDS-Gel nach PAGE und im Western-Blot nach Immunfärbung mit einem *LuHNL* spezifischen Antikörper zu sehen (Abbildung 13). Dies bedeutet, dass der Promotor entweder aufgrund einer zu geringen Repressorkonzentration bzw. einer zu starken RNA-Polymerase-Aktivität, oder aber infolge einer Repressorinaktivierung bedingt durch Lactose-Verunreinigungen der Medienbestandteile nicht effizient reprimiert wird. Letzteres konnte ausgeschlossen werden, da nach Anzucht der Zellen in von lactosehaltigen Verunreinigungen freien Medienbestandteilen [Yeast Extract und Pepton von Difco] die Hintergrundexpression zwar etwas gemindert, aber nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Eine Cotransformation mit dem Repressorplasmid pREP4, zur Erhöhung der Repressorkonzentration, war nicht sinnvoll, da sowohl das Plasmid als auch das AD494-Genom eine Kanamycin-Resistenz kodieren und somit eine Stabilisierung des Plasmids über Selektionsdruck nicht möglich war.

Nach Solubilisierung der pelletierten, weil unlöslichen Proteinfraction in 6 M Harnstoff über 1 h und dessen anschließender elektrophoretischer Auftrennung, zeigten die Analysen der SDS-PAGE, dass noch ca. 25% der synthetisierten *recLuHNL(His)₆* des *E. coli* AD494(DE3) in unlöslicher Form vorliegen (Abbildung 13).

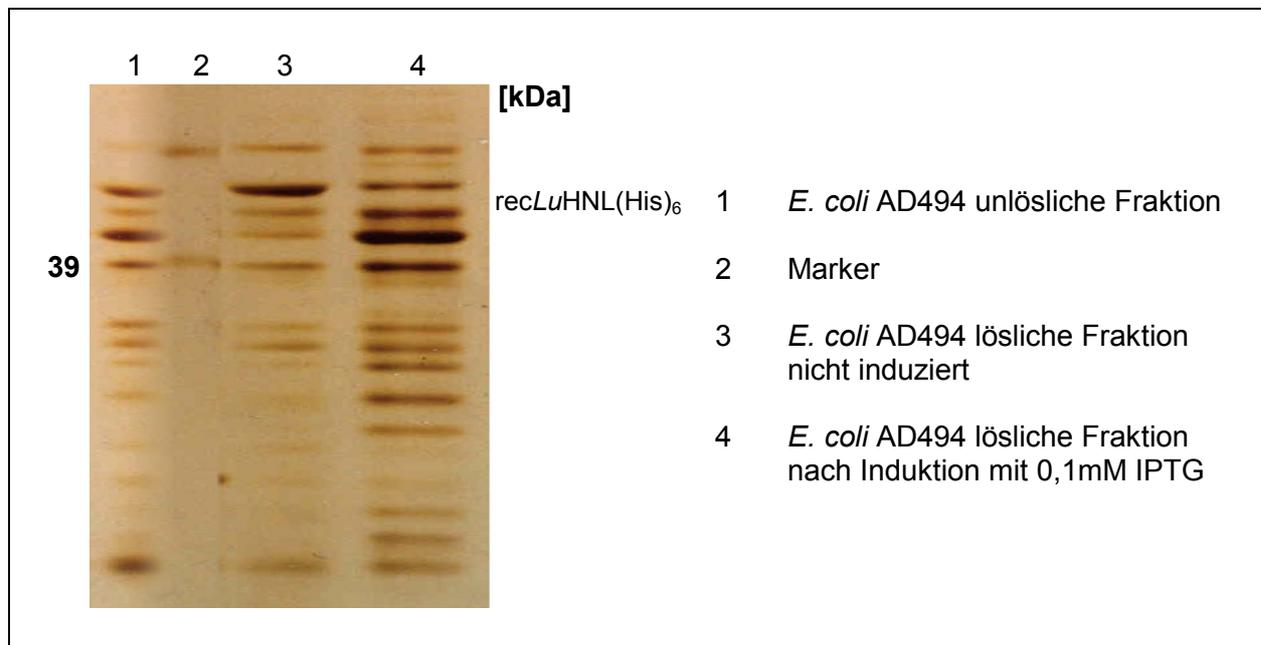


Abbildung 13: *LuHNL*-Expression in *E. coli* AD494
Kontrolle der Induktion und der Bildung von Inclusion Bodies

Trotz vorhandener Grundaktivität und der nicht vollständig unterdrückten Bildung von Inclusion Bodies, ist der *E. coli*-Stamm AD494(DE3) für die rekombinante Expression der *LuHNL* zu bevorzugen, da er die bestmögliche Expressionsrate liefert und die Ausbildung von möglicherweise notwendigen Disulfidbrücken begünstigen kann.

Nach Optimierung des Expressionssystems ließen sich aus 4 g Zellfeuchtmasse 57 U reinste *recLuHNL*(His)₆ gewinnen. Dies entspricht der Enzymmenge, die aus 500 g Pflanzenmaterial gewonnen werden kann. Außerdem bietet die Expression in *E. coli* den entscheidenden Vorteil, dass sich die *recLuHNL*(His)₆ in einem einzigen Schritt über IMAC an Ni-NTA-Agarose homogen aufreinigen lässt (siehe 4.1.2).

Im Falle der HNL aus *Hevea brasiliensis* wurde beobachtet, dass die Expression der HNL im prokaryotischen System zur Bildung von Inclusion Bodies führt, während größere Mengen an löslichem Enzym in Hefen gebildet werden können (Hasslacher et al., 1997b). Während fast der gesamte Anteil an exprimierter *HbHNL* in *E. coli* XL1Blue in unlöslicher Form vorlag, konnte eine intrazelluläre Expression in *S. cerevisiae* den Anteil an aktivem Enzym im Cytosol um das 8fache steigern. In der Hefe *P. pastoris* gelang die Synthesesteigerung sogar um das 26fache. Renaturierungsexperimente mit der nicht-löslichen Proteinfraction aus *E. coli* schlugen im Falle der *HbHNL* ebenso fehl, wie eine versuchte Expression auf sekretorischem Weg in den beiden Hefen.

Deshalb wurde die Expression und Reinigungsprozedur der *recLuHNL* aus *E. coli* mit jener aus einem bereits existierenden *P. pastoris*-System¹ verglichen (Trummler, 1997).

Die spezifische Aktivität der *recLuHNL*(His)₆ im Rohextrakt des *E. coli*-Stammes AD494 betrug nach Expressionsoptimierung ca. 1,1 U / mg, während die bestimmte spezifische Aktivität der *recLuHNL*(His)₆ in *P. pastoris* SMD1168 bei 3,5 U / mg und der *recLuHNL* in *P. pastoris* GS115 bei 4,1 U / mg lag. Der verstärkten Expression der *recLuHNL* mit Hexahistidinrest steht jedoch eine nicht-homogene Reinigung über IMAC gegenüber (siehe 4.1.3).

¹ Zellen der rekombinaten *Pichia*-Stämme SMD1168 mit *recLuHNL*(His)₆ und GS115 mit *recLuHNL* wurden mir von Herrn Dr. Wajant (Universität Stuttgart) für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Reinigung der recLuHNL(His)₆ aus *E. coli*

Um eine erleichterte Aufreinigung der recLuHNL mit immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie [IMAC] zu erzielen, wurde an das Gen mittels des Expressionsvektors pQE9 ein N-terminaler Hexahistidin-Rest kloniert (Porath et al., 1975). Als zur Reinigung erforderlichen Metallionen dienten Ni²⁺-Ionen, welche über den Linker Nitrilotriessigsäure an einer Agarosematrix immobilisiert wurden.

Nach Kultivierung der Zellen in LB^{Amp}-Flüssigmedium und mechanischem Zellaufschluss von 8,5 g Feuchtzellmasse wurde der Rohextrakt über Ni-NTA-Agarose gereinigt.

Die gelelektrophoretische Analyse der Aufreinigung ist in Abbildung 14 dargestellt.

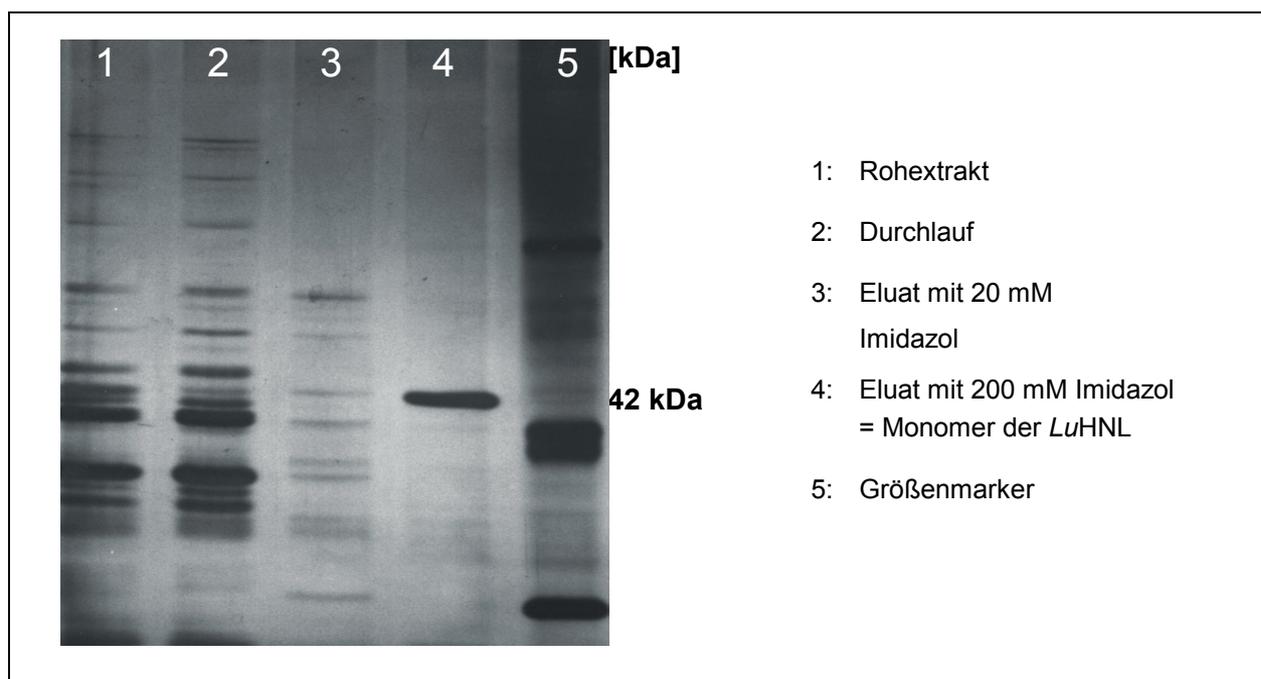


Abbildung 14: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der recLuHNL(His)₆ aus *E. coli* nach IMAC an Ni-NTA-Agarose.
Es wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die recLuHNL über einen Aufreinigungsschritt mittels IMAC in reinster Form gewonnen werden kann. Der Reinigungsfaktor beträgt 83.

Der Erfolg der Aufreinigung wird in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Reinigung der recLuHNL(His)₆ aus *E. coli* mittels IMAC an Ni-NTA-Agarose

Reinigungsschritt	Volumenaktivität [U/ml]	Protein-gehalt [mg/ml]	Gesamtaktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	9,8	8,9	137,2	1,1	100	1
IMAC	3,6	-	114	-	83	-
Amicon YM10	13,2	0,14	105	92	75	83

Aufgrund eines starken Aktivitätsverlustes bei Lagerung in 200 mM Imidazol, war eine anschließende Umpufferung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, über eine Amicon YM 10 Membran mittels Amicon-Rührzelle erforderlich.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitätswerte der aufgereinigten Fraktionen zwischen wtLuHNL und recLuHNL ist in Kapitel 4.1.3 aufgeführt und erläutert.

4.1.3 Reinigung der recLuHNL aus *P. pastoris*

Neben dem bakteriellen System zur Expression der recLuHNL(His)₆ existierte bereits ein weiteres in der Hefe *P. pastoris* (Trummler, 1997).

Zum einen wird die recLuHNL mit C-terminalem Hexahistidin-Rest mittels des Vektors pGAPZ in *P. pastoris* SMD1168 und zum anderen ohne „His-tag“ im Vektor pPIC3 und dem Wirtstamm GS115 intrazellulär exprimiert.

4.1.3.1 Reinigung der recLuHNL aus *P. pastoris* GS115

Die Reinigung der recLuHNL aus dem *Pichia*-Stamm GS115 erfolgte primär in Anlehnung an das Reinigungsprotokoll der wtLuHNL. Durch Variationen der Chromatographieschritte in Bezug auf Reihenfolge und Profil konnte die Reinigungsprozedur im Vergleich zur beschriebenen Aufreinigung aus Leinsamen verkürzt und verbessert werden (Albrecht et al., 1993; Breithaupt, 1997).

30 g Hefezellen wurden mechanisch mittels Disintegrator aufgeschlossen und die recLuHNL mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC) an Q-Sepharose angereinigt. Eine nach Ammoniumsulfatfällung folgende hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butylsepharose lieferte reines Enzym.

Die gelelektrophoretische Reinheitskontrolle der säulenchromatographischen Reinigungsschritte ist in Abbildung 15 dokumentiert.

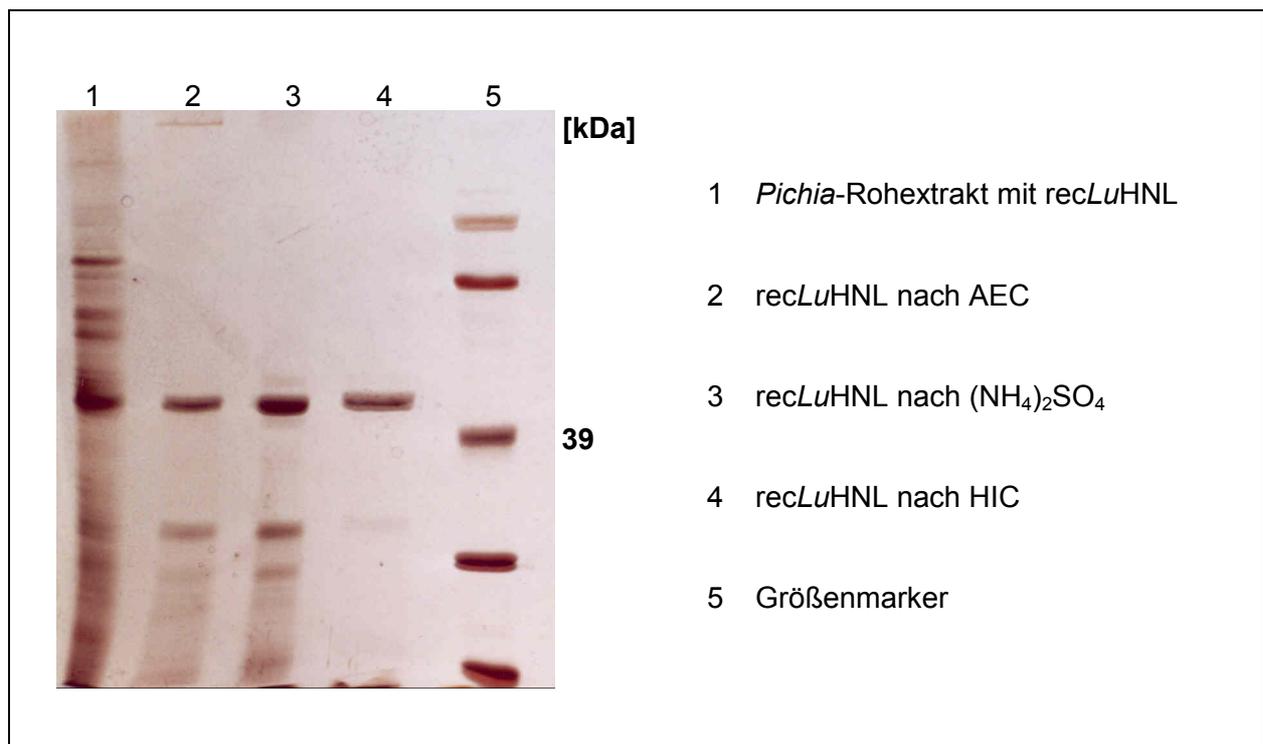


Abbildung 15: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der recLuHNL aus *P. pastoris* GS115 nach IMAC an Ni-NTA-Agarose. Es wurden jeweils 7 μg Protein aufgetragen.

Das Ergebnis der Reinigung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Reinigung der recLuHNL aus *P. pastoris* GS115

Reinigungsschritt	Volumenaktivität [U/ml]	Proteingehalt [mg/ml]	Gesamtaktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	32	7,8	2240	4,1	100	1
AEC	6,5	1,25	1625	5,2	72,5	1,3
HIC	19,8	0,61	1292	93	58	23

Die spezifische Aktivität der recLuHNL(His)₆ aus *Pichia* entspricht der des Enzyms aus *E. coli*. Aufgrund der stärkeren Expression in *Pichia* ist der Reinigungsfaktor mit 23 um etwa 4-fach niedriger als nach Reinigungsprozedur aus *E. coli*.

4.1.3.2 Reinigung der recLuHNL(His)₆ aus *P. pastoris* SMD1168

Der erste Ansatz zur Reinigung des konstitutiv exprimierten Enzyms mit C-terminalem Hexahistidin-Rest aus dem *Pichia*-Stamm SMD1168 erfolgte ebenso wie die Reinigung der recLuHNL(His)₆ aus *E. coli* über IMAC an Ni-NTA-Agarose. Nach mechanischem Aufschluss von 30 g Zellen wurde das entsprechende Chromatographieprotokoll verwendet. Die SDS-PAGE in Abbildung 16 zeigt neben der gereinigten recLuHNL(His)₆ ein weiteres Begleitprotein, welches durch zahlreiche Variationen von Bindungs- und Elutionsbedingungen der IMAC an Ni-NTA-Agarose (pH- und Salzshift, linearer Imidazolgradient, Zugabe von β -Mercaptoethanol) nicht zu eliminieren war. Auch die Affinitätschromatographie an einem alternativen Chromatographiematerial, der Zink-Chelating-Sepharose, mit linearem Imidazolgradienten war nicht dazu in der Lage, die beiden Proteine zu trennen. Ebenso wenig lieferten weder eine Gelfiltration an Superdex G75 noch eine Ionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose reine recLuHNL(His)₆.

Eine Untersuchung dieses Begleitproteins war ratsam, um störende Nebenaktivitäten im Rahmen der folgenden Homologieuntersuchungen auszuschließen. Daher wurde das Begleitproteins isoliert (Abbildung 18) und grob charakterisiert, wie in Kapitel 4.1.4 dargestellt.

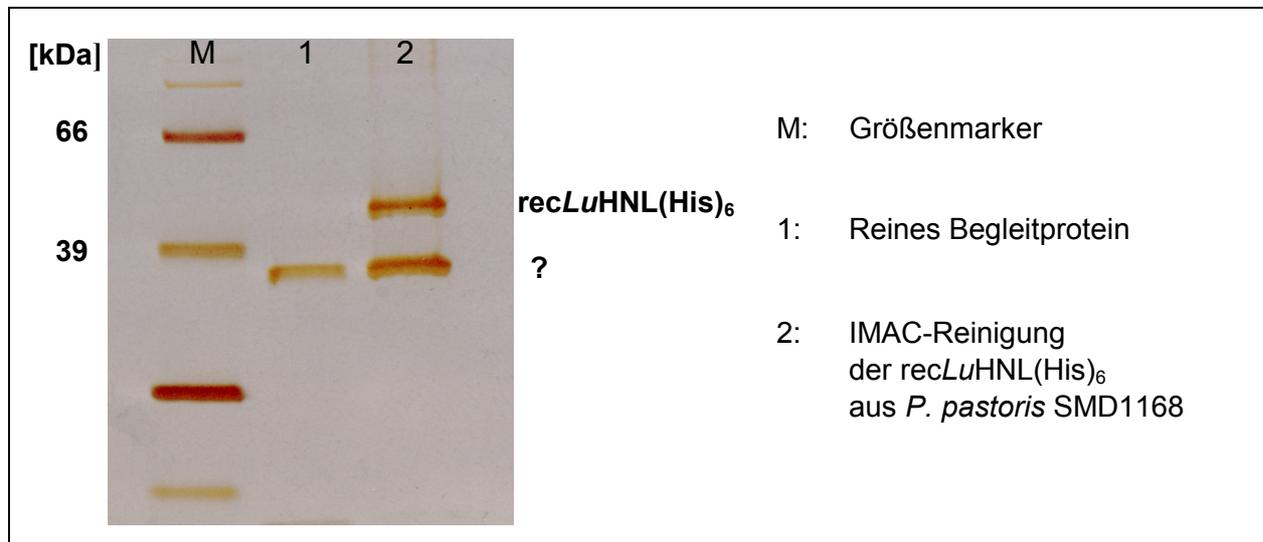


Abbildung 16: SDS-PAGE (Silberfärbung) zur Reinheitskontrolle der *recLuHNL* aus *P. pastoris* SMD1168 nach IMAC an Ni-NTA-Agarose. Es wurden jeweils 3 µg Protein aufgetragen.

Die Analyse der Reinigung ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Reinigung der *recLuHNL(His)₆* aus *P. pastoris* SMD1168 mittels IMAC an Ni-NTA-Agarose

Reinigungs-schritt	Volumen-aktivität [U/ml]	Protein-gehalt [mg/ml]	Gesamt-aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	12,4	3,52	1488	3,5	100	1
IMAC	29,7	-	1248	-	84	-
Amicon YM10	75	0,88	1123	65,5	74	19

Eine Gegenüberstellung der spezifischen Aktivitäten der aufgereinigten und meist homogenen Fraktionen der recLuHNL zur wtLuHNL ist in Tabelle 6 gegeben.

Tabelle 6: Spezifische Aktivitäten nach LuHNL-Präparationen

Präparation	wtLuHNL aus <i>Linum usitatissimum</i>	recLuHNL(His) ₆ aus <i>E. coli</i> AD494(DE3)	recLuHNL aus <i>P. pastoris</i> GS115	recLuHNL(His) ₆ aus <i>P. pastoris</i> SMD1168
spez. Aktivität [U/mg]	34	92	93	65,5
Reinheitsgrad [geschätzt nach SDS-PAGE und Silberfärbung]	~ 20%	~ 100 %	~ 100%	~ 50 %

Die gesteigerte spezifische Aktivität der recLuHNLn im Vergleich zur wtLuHNL von mehr als 100% ist maßgeblich auf die homogenen Proteinpräparationen aus den rekombinanten Mikroorganismen zurückzuführen. Eine Anreicherung von reinem Enzym war aus Leinsamen nicht durchführbar (Breithaupt, 1997).

4.1.4 Charakterisierung des Begleitproteins aus *P. pastoris*

Der sequenzierte N-Terminus des Begleitproteins von 29 Aminosäuren lieferte nach Datenbank-Recherche (Basic Local Alignment Search Tool = BLAST) eine Übereinstimmung von 24 identischen Aminosäuren mit der Alkoholdehydrogenase II aus *P. stipitis* respektive 23 Aminosäuren mit ADH II aus *C. albicans* (Abbildung 17).

Begleitprotein aus <i>P. pastoris</i> :	SPTIPTTQKAVIFETNGGPLEYKKIPVPK +IPTTQKAVIFETNGGPL YK IPVPK
ADH II aus <i>P. stipitis</i> :	MSIPTTQKAVIFETNGGPLYKDI PVPK
Begleitprotein aus <i>P. pastoris</i> :	SPTIPTTQKAVIFETNGGPLEYKKIPVPK ++PTTQKAVIFETNGG LEYK IPVPK
ADH II aus <i>C. albicans</i> :	MSVPTTQKAVIFETNGGKLEYKDI PVPK

Abbildung 17: N-terminale Aminosäuresequenz des Begleitproteins und deren Vergleich mittels BLAST

Bisher wurden nur die Gene für die ADH II aus *P. stipitis* (Cho & Jeffries, 1998; Passoth et al., 1998) und *C. albicans* identifiziert und isoliert. Enzymatische Untersuchungen bzw. Isolierungsversuche erfolgten für die ADHII aus beiden Organismen bis dato nicht. In *P. pastoris* wurde 1981 eine für sekundäre Alkohole spezifische ADH beschrieben, aber nicht genauer charakterisiert (Hou et al., 1981).

Die theoretische Molekulargewichtsbestimmung mittels ExPASy (Expert Protein Analysis System)-Tools ergibt einen Wert von 36,6 kDa im Falle der *P. stipitis*-ADH bzw. 36,8 kDa für die *Candida*-ADH. Das apparente Molekulargewicht der ADH aus *P. pastoris* nach SDS-PAGE-Analyse ergibt ca. 37 kDa (Abbildung 18). Die Gene der ADH II aus *P. stipitis* und *C. albicans* zeigen eine Homologie von 77% zueinander, ebenso wie zu *K. marxianus* und *S. cerevisiae* (Passoth et al., 1998).

Auf proteinchemischer Ebene bedeutet dies, dass die *P. stipitis*-ADHII und die *Candida*-ADHII 78% identische und 89% ähnliche Aminosäuren aufweisen. Beide gehören zur Familie der long chain ADHn und bilden ein Homotetramer aus der beschriebenen Untereinheit.

Für die Bindung der *Pichia*-ADH an Ni-NTA-Agarose scheint insbesondere deren Primär-, bzw. auch Tertiär- und Quartärstruktur verantwortlich zu sein. Diese Annahme kann man zum einen durch Sequenzvergleiche unterstützen und durch einen Reinigungsversuch nicht-transformierter *Pichia*-Stämme verifizieren (siehe 4.1.4.1).

Geht man von einem vergleichbaren Homologiegrad der ADHIn aus *C. albicans* bzw. *P. stipitis* zur *P. pastoris*-ADH aus, kann man beide Aminosäuresequenzen auf den Gehalt an bestimmte Ni²⁺-bindende Aminosäuren (z.B. Histidine und Cysteine) hin untersuchen, um Anhaltspunkte für die mühelose Aufreinigung an Ni-NTA-Agarose zu erhalten. Beide Enzyme weisen fünf Histidine und sieben Cysteine bei einer Primärstruktur von 348 Aminosäuren pro Untereinheit auf. Drei katalytisch wirksame zinkbindende Motive der Form Cys-His-Cys kommen darin vor. Ein weiteres strukturell essentielles Zn²⁺ wird außerdem gebunden. Ob die Aminosäuresequenz mit den Ni²⁺-bindenden Aminosäuren und die sich daraus ergebende Tertiär- und Quartärstruktur mit 4 Untereinheiten zu einer effektiven Bindung an Ni-NTA in der Lage sein kann, ließe sich durch einen ADH-Reinigungsversuch über IMAC mit *P. stipitis*- und *C. albicans*-Rohextrakt überprüfen. Einen direkteren Hinweis erhielt man in folgendem Versuch, mit einer Reinigung von Rohextrakten nicht-transformierter *Pichia*-Stämme über IMAC an Ni-NTA-Agarose.

4.1.4.1 Reinigung der ADH aus *P. pastoris*

In erster Linie sollte überprüft werden, ob die oben beschriebene *Pichia*-ADH nur bei der Expression der *recLuHNL(His)₆* gebildet bzw. mit ihr aufgereinigt wird und ob eine Methanolinduktion für ihre Bildung verantwortlich ist.

Dazu wurden die nicht transformierten *Pichia*-Stämme SMD1168, GS115 und der Wildtyp-Stamm X33 in einer 400 ml Schüttelkultur im zweifachen Ansatz bis zu einer OD_{600} von 1 in BMGY-Medium kultiviert. Ein Ansatz wurde mit Methanol induziert, indem die Zellen abzentrifugiert und in 400 ml BMMY-Medium überführt wurden. Der andere Ansatz wurde weiter im nicht-methanolhaltigen BMGY-Medium geschüttelt. Es wurden somit die Anzuchtbedingungen während der Expression der recLuHNL(His)₆ mit entsprechender Kontrolle ohne Induktion gewählt. Nach Erreichen einer Zellfeuchtmasse von 3 g wurden die Zellen der jeweiligen Ansätze geerntet und mechanisch aufgeschlossen. Es erfolgte ein IMAC-Reinigungsschritt an 5 ml Ni-NTA-Agarose nach dem Protokoll zur Aufreinigung der recLuHNL(His)₆ aus *E. coli*. Nach dem Waschen der Säule mit 20 mM Imidazol in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 wurde restliches auf der Säule verbliebendes Protein mit 200 mM Imidazol eluiert. Das Ergebnis der Reinigung ist in Abbildung 18 dargestellt und zeigt eindeutig, dass sich die bis dato noch nicht beschriebene ADH aus *P. pastoris* problemlos in einem Schritt mittels IMAC an Ni-NTA-Agarose aufreinigen lässt. Darüberhinaus zeigte der Versuch, dass die *Pichia*-ADH sowohl während der Anzucht in glycerinhaltigen Medium als auch in glycerin-/methanolhaltigem Medium in gleichem Maße gebildet wird. Die Methanolinduktion ist deshalb nicht für eine verstärkte Expression verantwortlich. Dies bedeutet, dass diese *Pichia*-ADH aufgrund ihrer Struktur und Konformation im Vergleich zu den restlichen *Pichia*-Proteinen am stärksten an Ni-NTA-Agarose bindet und auf diese Weise homogen aufgereinigt werden kann.

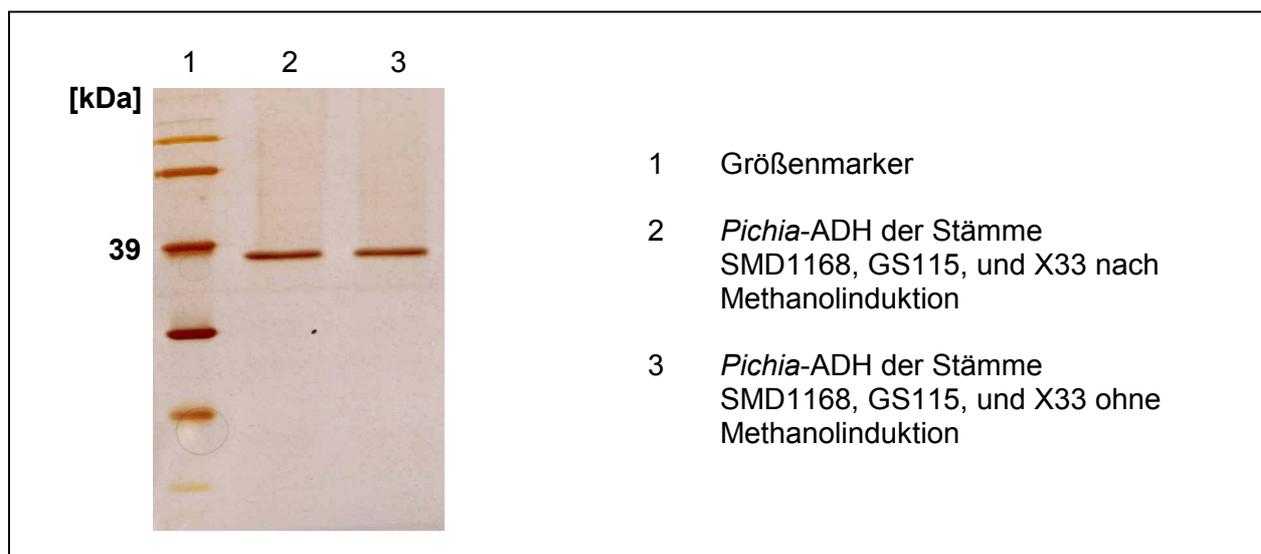


Abbildung 18: Reinigung verschiedener *Pichia*-Rohextrakte mittels IMAC über Ni-NTA-Agarose

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der ADH II aus *P. stipitis* (Passoth et al., 1998; Cho & Jeffries, 1999) ist anzunehmen, dass aufgrund einer Sauerstofflimitierung während der Zellkultivierung die Bildung der ADH induziert wird. Diese ermöglicht die Oxidation von Ethanol, welches sich während der Fermentation bildet. Der dabei entstehende Acetaldehyd kann dann via Tricarbonsäurecyclus oder als Intermediat der Gluconeogenese metabolisiert werden.

4.1.4.2 Aktivität der ADH aus *P. pastoris*

Bei dem im Zuge der Reinigung der recLuHNL(His)₆ isolierten Begleitprotein konnte eine Alkoholdehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Der Test auf ADH-Aktivität wurde mit den unter Kapitel 4.1.4.1 aufgereinigten Enzympräparationen durchgeführt. Die höchste spezifische Aktivität von 46 U/mg besitzt die reine *P. pastoris*-ADH in Glycin-Puffer bei pH 9,0 mit dem Substrat Isopropanol. Die spezifische Aktivität für die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd beträgt 19,2 U/mg. Methanol hingegen wird nicht umgesetzt. Im Vergleich zu den spezifischen Aktivitäten der kommerziell erhältlichen ADH II aus *S. cerevisiae* [Roche] ist die *Pichia*-ADH in der Oxidation des sekundären Alkohols Isopropanol zu Aceton um den Faktor 1,7 aktiver. Die Aktivität für die Oxidation von Ethanol ist um den Faktor 15,6 geringer.

3 g Zellfeuchtmasse von *P. pastoris* lieferten 0,22 mg reine ADH.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bisher unbekannte Alkoholdehydrogenase aus *P. pastoris* identifiziert, isoliert und in den für die Arbeiten mit der LuHNL relevanten Ansätzen charakterisiert. Da dieses erstmalig beschriebene Enzym jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit werden sollte, wurde auf eine umfassende Charakterisierung verzichtet.

4.1.5 Phylogenetische Verwandtschaft der *LuHNL* zu den Alkoholdehydrogenasen

4.1.5.1 Homologie der Primärsequenzen

Ein Vergleich der *LuHNL*-Aminosäuresequenz mit bisher ermittelten Primärsequenzen mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ergab eine signifikante Verwandtschaft zu den zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen (ZnADHn). Die in Abbildung 19 angegebene Konsensus-Sequenz bestehend aus 275 AS, wurde aus einem Vergleich von 177 bekannten ZnADHn aus allen Organismengruppen bestimmt und zeigt eine Homologie von 31% identischen bzw. 49% ähnlichen Aminosäuren zur *LuHNL*-Sequenz (Jörnvall et al., 1987; Sun & Plapp, 1992).

<i>LuHNL</i>	36	+++ ++	DTVQIIDIQVDPQNV	ELRVKMLCASV	CRTDILTIEG	-FMAPTQFPKIN		
ZnADH	7		KVLEVEEVPVPE	PGPGEVLVKVKA	AGICRSDLHIYNG	GYPLPDVKPLVL		
<i>LuHNL</i>	84	++ +	GHEGVGII	ESMGPDKNFKVGD	VI	VAPTLGECQV	CSSCRSGRTNFCQNY	
ZnADH	56		GHEGAGVVVEV	GSVGTGFKVGD	RVVLP	IVGCCGCEYCK	SGRENLCPKD	
<i>LuHNL</i>	133		GANESALEPDGTSR	FSYIDSDGKKKLL	YYKLG	CSTWTQY	MMVDSNYATK	
ZnADH	105		G-----	FGGTTGDG	-----	GFAEYVVV	PARFLVK	
<i>LuHNL</i>	182	+ +	LNEIAPELPPPHGS	IILSCAFATGYG	AVWLDAAVQEG	DSVAIFGVGS	VGI	
ZnADH	130		IPD---GLP	LEEAAALGCAGL	TAYGALVRAAV	VVLKGD	TVLVHGAGVGL	
							h1-l-l-G-G--G-	
<i>LuHNL</i>	231	+ +	S	AVIAAKELKAKQI	IVVDRNEYK	LKMAMEL	GATHCINSEKL	PEGVTPSQ
ZnADH	176		AAIILAKAAG	AARVIAVD	SSEKKLELAKEL	GAAADFVN	NSRKED---	FVE
			--l--l-----	--l-l-a				
<i>LuHNL</i>	280	++	AVRKLTPKEV	GVDASIESS	GYDVF	MNEAMKAAI	HG	
ZnADH	222		AVKELTGG--	GVDVVLD	-CGGATLDA	ALALLKPG		

Abbildung 19: Vergleich der *LuHNL* zur Konsensus-Sequenz bestimmt aus 177 ZnADHn
Gelb: identische AS, **Blau:** Strukturell (♦) und katalytisch wichtige Zn-bindende Liganden, **Dunkelgrün:** Sterische wichtige Glycine, **Hellgrün:** für eine Substratbindung in ZnADHn entscheidende und konservierte AS, **Grau hinterlegt:** ADP-bindendes Motiv (h: hydrophiler oder basischer Aminosäurerest, l: kleiner lipophiler Aminosäurerest, a: saurer Aminosäurerest), **Rot:** Potentielles katalytisches Zentrum der *LuHNL* (siehe 4.1.5.2).

Von entscheidender Bedeutung ist, dass viele der innerhalb der Klasse der ADHn konservierten Aminosäuren auch in der LuHNL wiederzufinden sind (Breithaupt et al., 1999). Neben Jörnvall et al. (1987) identifizierten auch Sun & Plapp (1992) einige in ADHn hochkonservierte Aminosäuren, die an der Bindung von Zinkionen bzw. des Cofaktors NAD sowie am Katalysemechanismus und der Strukturhaltung beteiligt sind. Die dabei bedeutenden Aminosäurereste sind in Tabelle 7 aufgeführt und werden den Resten der LuHNL gegenübergestellt.

Tabelle 7: Funktion ausgewählter und in ADHn konservierter Aminosäurereste im Vergleich zu den korrespondierenden Resten der LuHNL.

Die sich in ihrer funktionellen Gruppe unterscheidenden Reste sind fett dargestellt

AS-Reste ADHn	AS-Reste LuHNL	AS-Reste ADHn	AS-Reste LuHNL
Liganden für strukturerhaltendes Zn ²⁺		sterisch wichtige Glycinreste	
C87	C115	G56	G84
C90	C118	G61	G89
C93	C121	G67	G95
C101	C129	G76	G104
Liganden für katalytisches Zn ²⁺		G189	G217
C35	C63	G198	G226
D38	D66	G201	G229
H57	H85	G233	G261
E58	E86	cofaktorbindende ASn	
C171	C199	R36	R64
substratbindene AS der ADHn		S37	T65
V70	T98	H40	L68
ADP-bindendes Motiv		D220	D248
T191-D220	S219-D248		

Neben den vier in dichter Abfolge stehenden Cysteinresten (C115/C118/C121/C129) der *LuHNL*-Sequenz, welche im Falle der ZnADHn als Liganden für strukturell relevante Zinkionen fungieren, sind auch die Liganden für das katalytisch wirksame Zn^{2+} konserviert. Zwei Cysteine (C63/C199) koordinieren mit einem Histidin (H85) und einem H_2O -Molekül das Zinkion im katalytischen Zentrum der ZnADHn. Als Second-sphere-Liganden für das katalytisch bedeutende Zn^{2+} sind D66 und E86 verantwortlich.

Weiterhin sind neun Glycinreste in Positionen konserviert, an denen aus sterischen Gründen Aminosäuren mit größeren Seitenketten ohne funktionelle Einschränkungen nicht möglich wären. Außerdem ist in den ZnADH-Sequenzen ein Valin in Position 70 hochkonserviert, dessen Äquivalent bei der *LuHNL* gegen ein Threonin ausgetauscht ist. In den ZnADHn spielt V70 eine wichtige Rolle bei der Substratbindung (Sun & Plapp, 1992).

Die Sequenz der *LuHNL* weist darüber hinaus ein konserviertes ADP-Bindemotiv auf (S219-D248). Es handelt sich um eine $\beta\alpha\beta$ -Einheit mit Consensus-Sequenz nach Wierenga et al. (1986). Dieses Motiv beinhaltet bestimmte konservierte lipo- und hydrophile Reste (in Abbildung 19 grau hinterlegt) und bildet bei den ZnADHn die Topologie zur Cofaktor-Bindung (Rossmann Fold). An der eigentlichen NAD(P)-Bindung könnten im Falle der *LuHNL* neben dem Asparaginsäurerest (D248) der Consensus-Sequenz, welcher zwei Wasserstoffbrücken zur Adenin-Ribose des NAD ausbilden kann, die Aminosäuren R64, T65, L68 der *LuHNL* beteiligt sein. Auch sie können analog zu den ZnADHn zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Nicotinamid-Ribose (T65/L68) bzw. zum Phosphatsauerstoff (R64) dienen (Reid & Fewson, 1994; Eklund et al., 1990). Abgesehen von L68 sind die restlichen drei Aminosäuren der *LuHNL* an den erwähnten Positionen dazu auch in der Lage. Bei den ZnADHn befindet sich an dieser Stelle meist ein Histidinrest, der zur Ausbildung eines Protonen-Relay-Systems befähigt und somit für die Initiation der Redoxreaktion eine wichtige Rolle spielt (Reid & Fewson, 1994).

Da die Sequenzdaten sowohl auf eine Zink- als auch Nukleotidbindung hindeuten, sollte anhand von Stabilitätstests (siehe 4.1.5.5.1 und 4.1.5.6.1) und Fluoreszenzmessungen (siehe 4.1.5.5.2) auf eine tatsächliche Bindung überprüft werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass insbesondere bei einer Cofaktorbinding neben den Wasserstoffbrücken auch elektrostatische Wechselwirkungen mit umliegenden Aminosäureresten eine entscheidende Bindungseigenschaft haben können. Ob der *LuHNL* aufgrund der oben beschriebenen Ähnlichkeiten auch eine ADH-Aktivität zugeordnet werden kann, sollte ein etablierter Enzymtest klären (siehe 4.1.5.4.1). Darüberhinaus machten die deutlichen Sequenzähnlichkeiten zu bereits in ihrer Kristallstruktur aufgeklärten ZnADHn ein Homologiemodelling möglich.

4.1.5.2 Homologie-Modell der *LuHNL*

Das molekulare Modelling bietet bei unbekannter Kristallstruktur und dem Vorliegen geeigneter homologer und in ihrer 3D-Struktur aufgeklärter Templatproteine eine Möglichkeit zu Vorhersagen und Erklärungen in Bezug auf Konformation, Katalysemechanismus und Bindungseigenschaften (Kazlauskas, 2000).

Aufgrund der auffälligen Homologien zwischen der *LuHNL* und den long-chain ADHn wurde mittels SWISS-Modell [An Automated Comparative Protein Modelling Server] die Erstellung eines Homologiemodells versucht. Die Visualisierung des Modells gelang mit Hilfe des pdb [protein data bank]-viewers (Peitsch, 1996; Guex & Peitsch, 1997; Peitsch et al., 1997; Schwede et al., 2000).

Das generierte Modell basiert auf den Koordinaten der Human liver chichi ($\chi\chi$) ADH² (Glutathion-abhängige Formaldehyddehydrogenase, Klasse III ADH) [SWISS-PROT-Eintrag: ADHX_Human (P11766); PDB-Eintrag: 1TEHA.pdb] und einer Leu141-Mutante der Human sigmasigma ($\sigma\sigma$) ADH² (Klasse IV ADH) [SWISS-PROT-Eintrag: ADH7_Human (P40394); PDB-Eintrag: 1D1TA.pdb], deren Sequenzen zum Vergleich in Abbildung 20 wiedergegeben sind.

² chi (χ) bzw. sigma (σ) bezeichnen die Untereinheiten der Human ADHn. Ihre Wiederholung bestimmt deren Anzahl.

<i>Lu</i> HNL	1	MASLPVSAKPKDKNGVITCKAIMLKEAKLPGMSYADTVQIIDIQVDPQNVEL
<i>Hχ</i> ADH	1	ANEVIKCKAAVAWEAGKPLSIEEIEVAPPKAHEV
<i>Hσ</i> ADH	1	MGTAGKVIKCKAAVLWEQKQPFSEIEEIEVAPPKTKEV
<i>Lu</i> HNL	54	RVKMLCASVCRTDILTIEGFMAPTQFPKINGHEGVGIIESMGPDTKNFKVGDV
<i>Hχ</i> ADH	35	RIKIIATAVCHTDAYTLGADPEGCFFVILGHEGAGIVESVGGVTKLKAGDT
<i>Hσ</i> ADH	38	RIKILATGICRTDDHVIKGTM-VSKFPVIVGHEATGIVESIGEGVTVKPGDK
<i>Lu</i> HNL	107	IVAPTLGECQVCSSCRSGRTNFCQNYGANE-SALEPDGTSRFSYIDSDGKKKL
<i>Hχ</i> ADH	88	VIPLYIPQCGECKFCLNPKTNLCQKIRVTQKGKLMFDGTSRFTC---KGKTIL
<i>Hσ</i> ADH	91	VIPLFLPQCRECNACRNPDGNLDIRSDIT-GRGVLADGTTTRFTC---KGKPVH
<i>Lu</i> HNL	160	LYYKLCSTWTQYMVVDSNYATKLNIEAPELPPPHGSIILSCAFATGYGAVWLD
<i>Hχ</i> ADH	141	HY--MGTSTFSEYTVVADISVAKIDPLAP-LD--KVCLLGGISTGYGAAVNT
<i>Hσ</i> ADH	144	HF--LNTSTFTEYTVVDES SVAKIDDAAP-PE--KVCLIGCFSTGYGAAVKT
<i>Lu</i> HNL	213	AAVQEGDSVAIFGVGSVGISAVIAAKELKAKQIIVVDRNEYKMKMAMELGATH
<i>Hχ</i> ADH	194	AKLEPGSVCAVFLGGVGLAVIMGCKVAGASRIIGVDINKDKFARAKEFGATE
<i>Hσ</i> ADH	197	GKVKPGSTCVVFLGGVGLSVIMGCKSAGASRIIGIDLNKDKFEKAMAVGATE
<i>Lu</i> HNL	266	CINSEKLPEGVTPSQAVRKLTPKEVGVDASIESSGYDVFMEAMKAAIHGKAK
<i>Hχ</i> ADH	247	CINPQDFSK---PIQEVN-IEMTDGVDYSFECIGNVKVMRAALEACHKGWGV
<i>Hσ</i> ADH	250	CISPKDSTK---PISEVL-SEMTGNVGYTFEVIHLETMIDALASCHMNYGT
<i>Lu</i> HNL	319	TVITGEGIY-ENDRIFFDFKDFLFGGNVVGNTGRVRIHSDPGLLRKAQEPV
<i>Hχ</i> ADH	300	SVVVGVAASGE-EIATRPFQL-----VTGRTWKGTAFGGWKSVESVP-
<i>Hσ</i> ADH	303	SVVVVPPSAKMLTYDPMLL-----FTGRTWKGCVFGLKSRDDVP-
<i>Lu</i> HNL	372	IRAGMDKIL-GYDAATMKCKYEVDIREGTPALLKALEEVENVDCVKLVIKLNDY
<i>Hχ</i> ADH	353	-----KLVSEYMSKKIKVDEFVTHNLSFDEINKAFELMHDGKSIRTVVKI
<i>Hσ</i> ADH	356	-----KLVTEFLAKKFDLDQLITHVLPFKKISEGFELLNSGQSIRTVLTF

Abbildung 20: Sequenzvergleich zwischen *Lu*HNL und den ADHn als Basismoleküle des Homologie-Modells

- : Modellbereich
- Rot:** potentielle katalytische Triade
- Grün:** wichtige AS für Substratbindung bei ADHn
- Grau:** ADP-bindendes Motiv
- Gelb:** identische ASn
- Dunkelblau:** Liganden für strukurerhaltendes Zn²⁺
- Hellblau:** Liganden für katalytisches Zn²⁺

Die *LuHNL* zeigt 35% identische und 49% ähnliche Aminosäuren zur Human liver χ ADH (Kaiser et al., 1988 und 1991; Engeland et al., 1993; Yang et al., 1997) respektive 32% identischen und 51% ähnlichen Aminosäuren zur Human σ ADH-Mutante (Hurley et al., 1994; Xie et al., 1997).

Das Mindestmaß an Sequenzidentität zur Generierung eines sinnvollen Homologiemodells liegt bei 25%. Bei einer Sequenzübereinstimmung von 50% kann man von einer relativen Standardabweichung im Bereich von 1Å ausgehen. Mit den hier vorgegebenen 35% identischen Aminosäuren kann man mit einer relativen Standardabweichung von ca. 3 Å rechnen (Schwede et al., 2000). Obwohl das resultierende Modell nicht unbedingt die „kristallographische Wirklichkeit“ widerspiegelt und einen eingeschränkten Sequenzbereich (29 AS fehlen N-terminal; 96 AS fehlen C-terminal) umfasst, kann es zur Betrachtung der allgemeinen Topologie und der Anordnung bestimmter Aminosäureseitenketten in Bezug auf mechanistische Untersuchungen herangezogen werden.

Von vorrangigem Interesse war die Identifizierung eines potentiellen katalytischen Zentrums der *LuHNL*. In Analogie zu den bisher untersuchten und in der Einleitung vorgestellten Reaktionszentren der HNLn aus *Hevea* bzw. *Manihot* und *Sorghum* wurde auch hier auf drei katalytisch aktive Aminosäuren geachtet, die sich in geeigneter räumlicher Anordnung zueinander befinden. Die in Frage kommende potentielle katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren D66, H85 und T111, ist in Abbildung 21 dargestellt. Sie wurde nach visueller und mechanistischer Analyse des Homologiemodells als einzig relevantes katalytisches Lyasezentrum identifiziert.

In Korrespondenz zu der in der Einleitung vorgestellten Enzymkatalyse der *HbHNL* besteht diese Triade aus einem Asparaginsäurerest, dessen negativ geladene Carboxylgruppe das positiviert Histidin stabilisieren kann, welches wiederum deshalb zur Deprotonierung des Threoninrestes in der Lage ist. Der nun nukleophile Threoninrest kann das Carbonyl-C-Atom des Substrates angreifen und die Lyasereaktion initiieren. Somit würde dieser Reaktionsmechanismus dem für α/β -Hydrolasen typischen Muster folgen. Da sich die *LuHNL*, nach der in der Einleitung vorgestellten mutmaßlicher Hypothese zu ihrer Phylogenie, aus Vorläuferproteinen mit einer für Oxidoreduktasen typische ADP-bindene Domäne, parallel zum Zweig der α/β -Hydrolasen mit katalytischer Triade entwickelt hat, scheint eine mechanistische Verbindung zwischen beiden Entwicklungssträngen zu bestehen (siehe Einleitung 1.5).

Auf der Grundlage dieses Modells wurden die „Knock-out“-Mutanten in Kapitel 4.1.5.3 geplant. Deutlich zu erkennen sind die beiden Domänen der *LuHNL*-Untereinheit. Im Falle der ADH's liegt links die katalytische Domäne mit dem koordinierten Zinkion unter Beteiligung des Pendants zum H85 der *LuHNL* und die Substratbindungstasche, während sich rechts die Cofaktor-Bindungsdomäne mit Rossmann Fold befindet. Genauer betrachtet bindet der Nucleotid-Cofaktor in der zentralen Spalte, die das Monomer in die beiden Domänen teilt (Yang et al., 1997). Obwohl das Modell nicht die gesamte Aminosäuresequenz der *LuHNL* berücksichtigt, ergab ein Vergleich mit dem 3D-Modell der Templatproteine, dass der um 29 Aminosäuren verkürzte N-Terminus mit hoher Wahrscheinlichkeit frei an der Enzymoberfläche liegt, während zu dem um 96 Aminosäuren verkürzten C-Terminus hinsichtlich dessen Lokalisation keine sichere Aussage getroffen werden kann. Da sich dieser im Falle der beiden als Template für

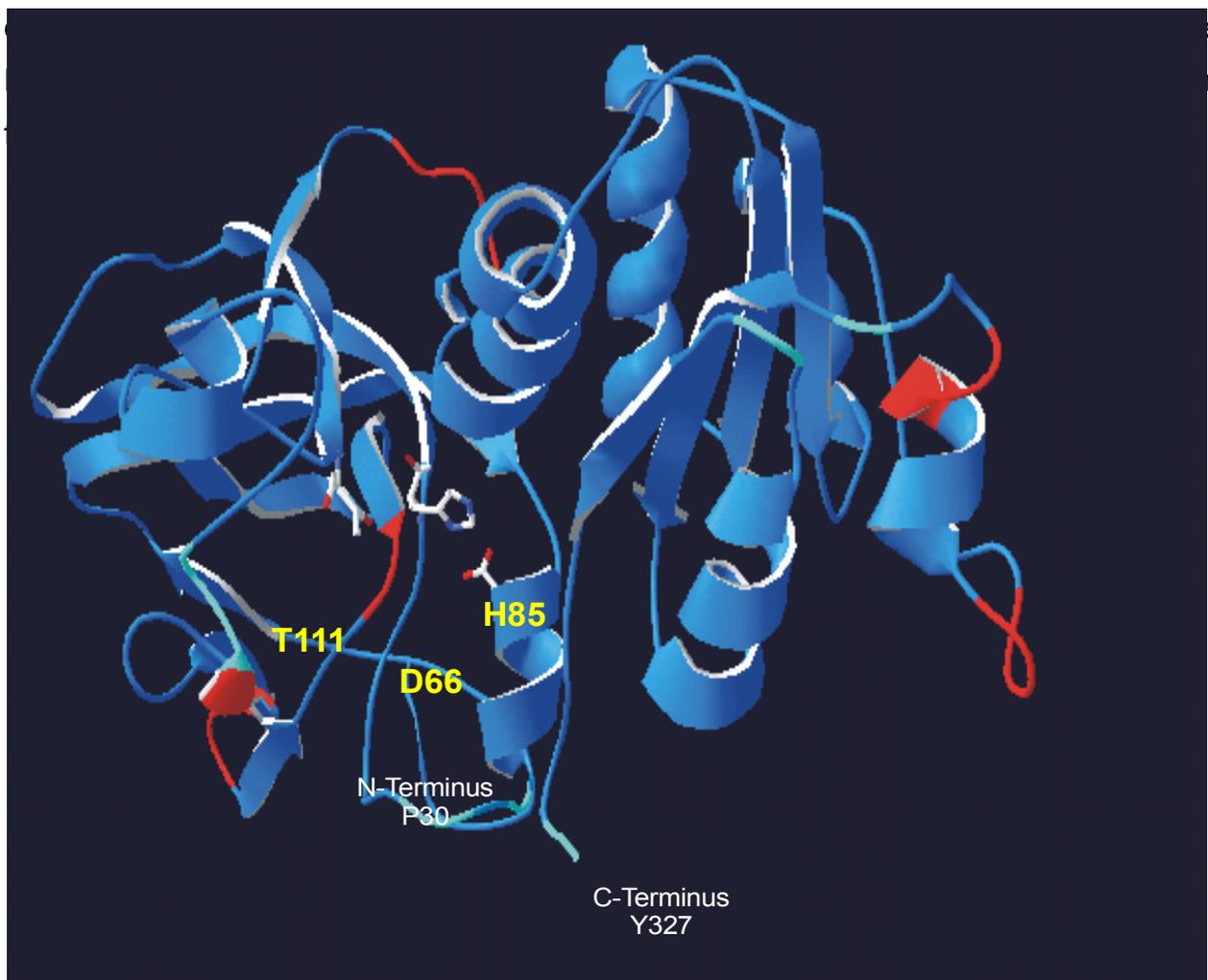


Abbildung 21: Homologie-Modell des *LuHNL*-Monomers.

Dargestellt ist die Hauptkette mit potentieller katalytischer Triade (gelb) und Termini (weiss). blau: α -Helices und β -Faltblätter, rot: im Vergleich zum Templatmolekül inserierte ASn, cyan: Bereich nichtähnlicher ASn [erstellt mit Swiss-Modell und pdb-viewer]

4.1.5.3 Ortsgerichtete Mutagenese zur Untersuchung des katalytischen Zentrums

Die im Rahmen des Homologiemodellings postulierten Aminosäuren eines potentiellen katalytischen Zentrums der Lyase-Aktivität (Abbildung 21) sollten mittels gerichteter Mutagenese auf ihre Funktionalität hin untersucht werden (siehe 4.1.5.2). Die mögliche katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren T111-H85-D66 sollte durch den Austausch sowohl des Histidins als auch des Threonins gegen Alanin auf Aktivitätsverlust der *recLuHNL* hin überprüft werden. Das im Vergleich zu Glycin sterisch voluminösere Alanin besitzt in der Seitenkette keine funktionelle Gruppe, die als Ligand oder Reaktant wirken oder aber ein Substrat über ionische Wechselwirkung binden könnte. Die Identifizierung eines katalytisch essentiellen Aminosäurerestes durch dessen Eliminierung bzw. Austausch durch gerichtete Mutagenese ist eine etablierte Methode (Peracchi, 2001). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass selbst geringe Veränderungen der Primärsequenz Auswirkungen auf die 3D-Struktur haben können, die nur durch Strukturaufklärung identifiziert werden können.

Die Mutagenese wurden mit den im Anhang angegebenen Mutageneseprimern durchgeführt. Dabei wurde sowohl auf die Codon usage des Wirtes als auch auf die Vermeidung unnötiger Fehlpaarungen, sowie die üblichen Richtlinien des Primer-Designs geachtet. Um einen möglichen Aktivitätsverlust der Muteine H85A und T111A exakt über die spezifischen Aktivitätswerte bestimmen zu können, war eine homogene Aufreinigung der Muteine zum Vergleich mit der *recLuHNL* erforderlich. Deshalb wurde zu deren Expression das *E. coli*-System gewählt.

Die ortsspezifische Mutagenese wurde bei allen Mutanten mit dem „Site-Directed-Mutagenesis“-Kit [Stratagene] durchgeführt. Nach Selektion wurde die DNA entsprechender Transformanten zur Identifizierung der Mutation sequenziert. Diejenigen Transformanten, die außer der gewünschten Punktmutation keine weiteren Mutationen zeigten, wurden nach Expression und Aufreinigung der mutierten *recLuHNL* auf ihre entsprechende Lyase-Aktivität hin untersucht.

Die Werte der Restaktivitäten sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Restaktivitäten der verschiedenen *LuHNL*-Muteine

Nach Isolierung und Reinigung der Muteine über IMAC an Ni-NTA-Agarose wurden ihre spezifischen Aktivitäten mit jener der reinen rec*LuHNL* verglichen

<i>LuHNL</i> - Muteine	$A_{\text{spez.}} (\% \text{ wt}LuHNL)$
H85A	3
T111A	4,3

Die das potentielle katalytische Lyasezentrum verändernden Muteine H85A und T111A zeigen eine drastische Reduktion der katalytischen Acetoncyanhydrinspaltung um über 95%. Aufgrund der Schwankungen von nicht enzymkatalysierten Hintergrundspaltungen kann man von einer fast vollständigen Inaktivierung sprechen.

Das katalytische Zentrum der *LuHNL* wurde identifiziert und durch einen plausiblen Katalysemechanismus (siehe 4.1.5.2) charakterisiert.

Fast alle bisher beschriebenen katalytischen Triaden werden aus den Aminosäuren Asparaginsäure (Elektrophil), Serin (Nucleophil) und Histidin (Base) gebildet (Heinz, 1999). Doch Threonin kann als methyliertes Serin durchaus dessen Aufgabe übernehmen. Die Analyse des Homologiemodells lässt aufgrund der Konstellation und Lage katalytisch aktiver Reste kein anderes Reaktionszentrum als das der Triade D66-H85-T111 zu. Durch gerichtete Mutagenese konnten zwei [H85 und T111] der drei katalytischen Reste identifiziert und das Modell verifiziert werden. Die Beteiligung der D66 an der HNL-Reaktion gilt nach dem „Triadenprinzip“ in Analogie zum Katalysemechanismus der *HbHNL* und *SbHNL* als fast sicher.

Inhibitionsstudien von Trummler und Wajant (1997) mit dem Seringruppen-modifizierenden Agens DIPP [Diisopropyl-fluorophosphat] zeigten eine Inaktivierung der *LuHNL*-Aktivität um ca. 70%. Da DIPP mit der Hydroxylgruppe des Serins reagiert, könnte ebenso eine Beeinträchtigung der Hydroxylgruppe des Threonins hier seine Wirkung gezeigt haben.

Demgegenüber zeigten Inhibitionsstudien mit dem Histidin-modifizierenden Agens DEPC [Diethylpyrocarbonat] kaum eine Hemmung der Lyaseaktivität (< 5%), was auf die Abwesenheit eines Histidinrestes im Katalysezentrum hindeuten lässt. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den von ihnen und den oben durchgeführten Mutageneseexperimenten, bei denen nach Austausch des H85 gegen Alanin eine fast vollständige Inaktivierung die Folge war (Trummler, 1997).

Diese katalytische Triade bildet bei genauerer Betrachtung eine Schnittstelle zwischen den HNL-Vorläufern mit α/β -Hydrolase-fold und jenen mit einer ADP-bindenden Domäne. Folgende Hypothese könnte dafür eine Erklärung liefern:

Einerseits entwickelte sich die *Lu*HNL, nach der in der Einleitung unter 1.5 vorgestellten Hypothese, im Laufe einer erst divergenten Evolution aus einem Vorläufermolekül mit ADP-bindendem Motiv. Andererseits bediente sie sich anschließend im Zuge einer konvergenten Evolution dem für Enzyme mit α/β -Faltungsmuster typischen Mechanismus der katalytischen Triade. Letzteres geschah offensichtlich unter Beteiligung des ehemaligen Katalysezentrums der Oxidoreduktase. Die zufällige Einführung eines Threoninrestes nach Mutation [Asparaginsäure und Histidin sind konserviert] konnte die Bereitstellung eines *Lu*HNL-Reaktionszentrum ermöglichen und die Abweichung von den bisher beschriebenen katalytischen Triaden, bestehend aus Ser-Asp-His, erklären.

4.1.5.4 Untersuchung der *LuHNL* auf ADH-Aktivität

Die signifikanten Sequenzähnlichkeiten der *LuHNL* zu den ADHn betreffen insbesondere die Liganden der für die ADHn strukturell und katalytisch notwendigen Zinkionen [Cystein- und Histidin-Reste], die sterisch wichtigen Glycinresten und das ADP-bindende $\beta\alpha\beta$ -Motiv.

Diese beschriebenen markanten Struktur-Homologien veranlassten zur Prüfung der *LuHNL* auf eine ADH-Nebenaktivität. Diese sollte zuerst durch einen herkömmlichen ADH-Test erfolgen und falls nicht detektierbar durch einen Mutageneseansatz generiert werden.

4.1.5.4.1 Test auf ADH-Aktivität mit *recLuHNL*

Auf die Eigenschaft zur Oxidation ausgewählter Alkohole wurden sowohl die reine *recLuHNL*(His)₆ aus *E. coli* als auch die homogene *recLuHNL* bzw. die Elutionsfraktion nach Aufreinigung der *recLuHNL*(His)₆ aus *P. pastoris* untersucht. Dabei wurden die Substrate jener ADHn getestet, zu welchen die *LuHNL* die stärksten Homologien zeigt. Dies waren neben der ADH aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel) mit ihrem Substrat Ethanol, auch die Glutathion (GSH)-abhängige Formaldehyddehydrogenase aus *C. maltosa* mit Formaldehyd und Glutathion als umzusetzende Edukte. Dabei wird nach Reduktion des Cofaktors NAD⁺ S-Formylglutathion gebildet. Der Test wurde entsprechend dem Nachweis der GSH-abhängigen Formaldehyddehydrogenase aus *C. boidinii* nach Schütte et al. (1982) durchgeführt. Darüberhinaus wurde auch ein Ansatz ohne Glutathion als Cosubstrat getestet. Zusätzlich wurden noch die handelsüblichen Alkohole Methanol und Isopropanol getestet.

Die reinen *LuHNL*-Fraktionen zeigten keine Dehydrogenaseaktivität bezüglich der Substrate Methanol, Ethanol und Isopropanol. Dies gilt sowohl in Gegenwart von NAD⁺ als auch von NADP⁺ als Reduktionsäquivalent. Ebenso konnte keine Oxidation des Formaldehyds mit oder ohne Glutathionzusatz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war in der eluierten IMAC-Fraktion aus Kapitel 4.1.3.2 nach Reaktion mit Ethanol bzw. Isopropanol und dem dazu notwendigen Cofaktor NAD⁺ eine ADH-Aktivität nachweisbar. Sie konnte jedoch eindeutig der mit angereinigten ADH aus *P. pastoris* zugeordnet werden (siehe 4.1.4.2).

Ein vergleichbares Phänomen ist bei der *PaHNL* zu beobachten. Trotz signifikanter Ähnlichkeiten in ihrer räumlichen Struktur zur Familie der Glucose-Methanol-Cholin (GMC)-Oxidoreduktasen, der nachgewiesenen Bindung des Redoxfaktors FAD und dem Vorhandensein wichtiger Aminosäuren mit Schlüsselfunktion für eine Redoxaktivität, konnte eine ebensolche nicht nachgewiesen werden. Eine genaue Erklärung dafür fehlt bislang (Dreveny et al., 2001).

Ein Testen der kommerziell erhältlichen ADHn sowohl aus Hefe als auch aus Pferdeleber auf Lyaseaktivität hin, zeigten in Analogie keine Spaltung des Acetoncyanhydrins. Unter Berücksichtigung der im vorherigen Kapitel postulierten Triade, könnte das Fehlen des katalytisch aktiven Threoninrestes für dieses Phänomen verantwortlich sein.

Trotz ihrer ausgeprägten Primärstruktur-Homologie zu den Alkohol- und Formaldehyddehydrogenasen ist die *LuHNL* nicht zur Oxidation dieser ausgewählten Alkohole in der Lage. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben:

Zum einen kann das katalytische Zentrum aufgrund fehlender oder nicht effektiv bindender Redoxfaktoren degeneriert sein. Wie schon im Kapitel 4.1.5.1 erwähnt, ist ein ausgewählter Histidinrest an der Cofaktorbindung und dem Protonentransfer beteiligt. Innerhalb der Sequenz zinkabhängiger ADHn befindet sich dieser Rest in Position 39 (Abbildung 19). Dieser für die Redoxreaktion offensichtlich essentielle Rest ist in der *LuHNL*-Sequenz nicht zu finden und kann eine Ursache für die fehlende Aktivität sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass R64 der *LuHNL* die Rolle des Histidins zur Cofaktorbindung und Protonentransfer übernehmen kann.

Zum anderen kann eine unzureichende Substratbindung für das Fehlen der ADH-Aktivität verantwortlich sein. Wie ebenfalls in Kapitel 4.1.5.1 erwähnt, ist das hochkonservierte und für eine Substratbindung verantwortliche Valin an Position 70 der zinkabhängigen ADHn gegen ein Threonin ausgetauscht (Sun & Plapp, 1992). Diese Aminosäure T98 wurde deshalb im folgenden als Target für eine ortsgerichtete Mutagenese ausgewählt.

4.1.5.4.2 Ortsgerichtete Mutagenese zur Generierung einer ADH-Aktivität

Da das Fehlen einer substratbindenden Aminosäure die Oxidation der Alkohole verhindern kann, sollte nach Einführung einer solchen die Redoxaktivität neu untersucht werden. Eine weitere Intension, die in der Auswahl dieser Aminosäure lag, war die mögliche Generierung einer Bifunktionalität. Unter der zuvor gesetzten Annahme, dass die *LuHNL* ein noch intaktes ADH-Katalysezentrum besitzt und das fehlende Redoxpotential nur in einem Verlust der Substratbindung begründet liegt, sollte mit dem T98V-Mutein neben der Lyaseaktivität eine ADH-Nebenaktivität geschaffen werden. Die Lage des T98 zum katalytischen Lyasezentrum, welches in seiner Position dem ADH-Reaktionsbereich entspricht, ist in Abbildung 22 dargestellt.

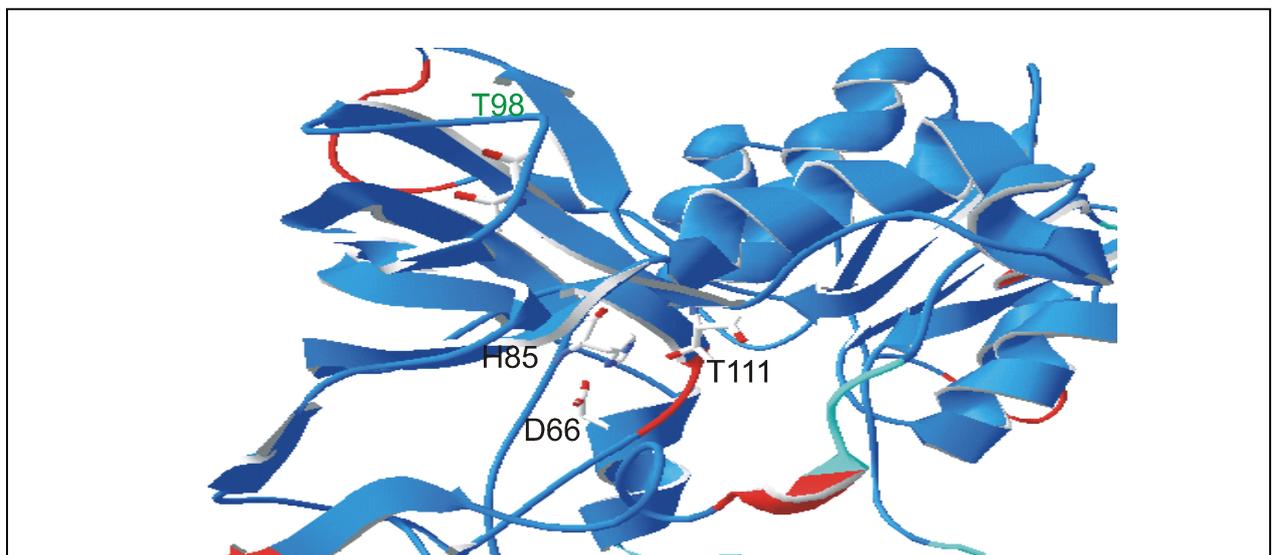


Abbildung 22: Homologie-Modell des generierten *LuHNL*-Muteins T98V
erstellt mit SWISS-Model und pdb-viewer

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit den im Anhang angegebenen Mutageneseprimern T98V und unter Verwendung des „Site-Directed-Mutagenesis“-Kit [Stratagene] durchgeführt. Dabei wurde sowohl auf die Codon usage des Wirtes als auch auf die Vermeidung unnötiger Fehlpaarungen, sowie die üblichen Richtlinien des Primer-Designs geachtet. Zur Expression wurde das bakterielle System gewählt, weil ein homogen aufgereinigtes Mutein T98V beim Test auf ADH-Aktivität nicht durch störende Hintergrundaktivitäten beeinträchtigt werden konnte (siehe 4.1.1).

Der Test des Muteins T98V auf ADH-Aktivität, nach Einfügen einer essentiellen Bindungsstelle für die potentiellen Substrate Methanol, Ethanol, Isopropanol, zeigten kein Oxidationspotential für diese Alkohole. Auch Formaldehyd wurde unabhängig von der Anwesenheit von Glutathion nicht umgesetzt.

Die Generierung einer bifunktionellen *LuHNL* scheint mit einer einzelnen Mutation nicht möglich zu sein. Anders als im Falle der Lyasereaktion, sind zahlreiche Aminosäuren an der koordinierten Abfolge der ADH-Reaktion beteiligt. Je nach Ausmaß und Spezifität der Substrattasche können eine Reihe von Resten an deren Ausbildung beteiligt sein. Daneben sind auch die Aminosäuren zur Cofaktorbindung bzw. Zinkkoordination und jene des Protonentransfersystems von Bedeutung. Ihre Identifizierung und die Bestimmung ihrer Auswirkungen und Austauschbarkeit ist recht komplex. Der negativ verlaufene Test auf ADH-Aktivität des Muteins T98V ist deshalb wenig überraschend. Doch es war ein sinnvoller Ansatz, um mit einem Aminosäureaustausch ein Enzym mit Doppelaktivität schaffen zu wollen. In der Literatur sind einige erfolgreiche Beispiele beschrieben, die mit nur einer Punktmutation ein Enzym mit neuer Aktivität schufen (O'Brien & Herschlag, 1999).

Die weitere hochkonservierte und essentielle Aminosäure der ADHn, welche als mögliches Mutageneseziel zur Herstellung einer ADH-Aktivität dienen könnte, betrifft direkt oder indirekt das Lyasezentrum. Es handelt sich um das L68 der *LuHNL* und das Pendant innerhalb der homologen ADH-Sequenzen ist zu 98% durch meist Histidin, seltener Tyrosin ersetzt. Dieser Rest ist neben einer Cofaktor- und Substratbindung, auch an der direkten Katalyse durch Protonentransfer beteiligt (Sun & Plapp, 1992; Reid & Fewson, 1994). L68 befindet sich 2 Aminosäuren vom katalytisch aktiven D66 entfernt und ein Einfluss auf die Lyaseaktivität ist deshalb nicht auszuschließen. Die Einführung einer Bifunktionalität wäre hier durch ortsgerichtete Mutagenese sehr unwahrscheinlich und wurde daher nicht versucht.

Auch die Rolle des H85 sollte hierbei nicht außer Acht gelassen werden. Bei den ZnADHn ist dieser Rest an der Koordination des katalytisch aktiven Zinkions beteiligt, während die *LuHNL* H85 offensichtlich zur Lyasereaktion benötigt (siehe 4.1.5.3). Inwieweit dieses Zinkion noch gebunden vorliegt und wie sich diese unter Umständen noch vorhandenen Koordination während der *LuHNL*-Reaktion verhält, kann auf der Basis des Homologie-Modells nicht sicher geklärt werden.

Die Untersuchung des Einflusses der Mutation T98V auf die Lyaseaktivität, zeigte eine Minderung der spezifischen Aktivität des aufgereinigten und homogenen Muteins um 35%. Es bleibt zu diskutieren, weshalb die Mutagenese des T98 offenbar einen Einfluss auf die Lyaseaktivität ausübt. Der erste Verdacht fiel auf jenes Threonin, welches an einer Cyanhydrin-Fixierung über seine Nitrilgruppe beteiligt sein könnte. Im Falle der *HbHNL* wurde dieses Phänomen in der Einleitung unter 1.6 beschrieben. Eine Analyse des Homologiemodells gerät hier an Grenzen, da eine bestimmte Aussage über die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des T98 und der Nitrilgruppe zu unsicher ist. Zu beachten bleibt, dass dieses für die Alkoholbindung essentielle T98 auch bei der Substratbindung der *LuHNL* mit einer Rolle spielen könnte. Eine Reduzierung der Lyaseaktivität durch einen destabilisierenden Effekt aufgrund des Aminosäureaustauschs ist jedoch ebenso denkbar.

4.1.5.5 Untersuchung auf Bindung von Nucleotidcofaktoren

Die für eine Redox-Aktivität der ADHn notwendigen Cofaktoren NAD(H) bzw. NADP(H) werden zwar vermutlich nicht für die Lyase-Aktivität benötigt, doch könnten sie für eine strukturelle Stabilisierung von Bedeutung sein. Im Falle der *PaHNL* konnte eine solche stabilisierende Wirkung des Redoxfaktors FAD nachgewiesen werden (Hickel et al., 1996).

Das Homologie-Modell der *LuHNL* offenbart, dass die topologischen Voraussetzungen für die Bindung eines Nucleotid-Cofaktors vorhanden sind, sie geben jedoch keine gesicherten Erkenntnisse über eine tatsächliche Bindung. Diese können nur aus Strukturdaten gewonnen werden. Das Modell bietet jedoch eine Vorstellung über die mögliche Lage und Orientierung des Cofaktors, sowie seine Position zum aktiven Zentrum (Abbildung 23). Es wird deutlich, dass das NAD sehr nahe an die potentielle katalytische Triade heranreichen würde.

Deshalb sollte zum einen der Cofaktor-Einfluss auf die HNL-Stabilität nach Temperaturerhöhung bestimmt und zum anderen eine Bindung fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden.

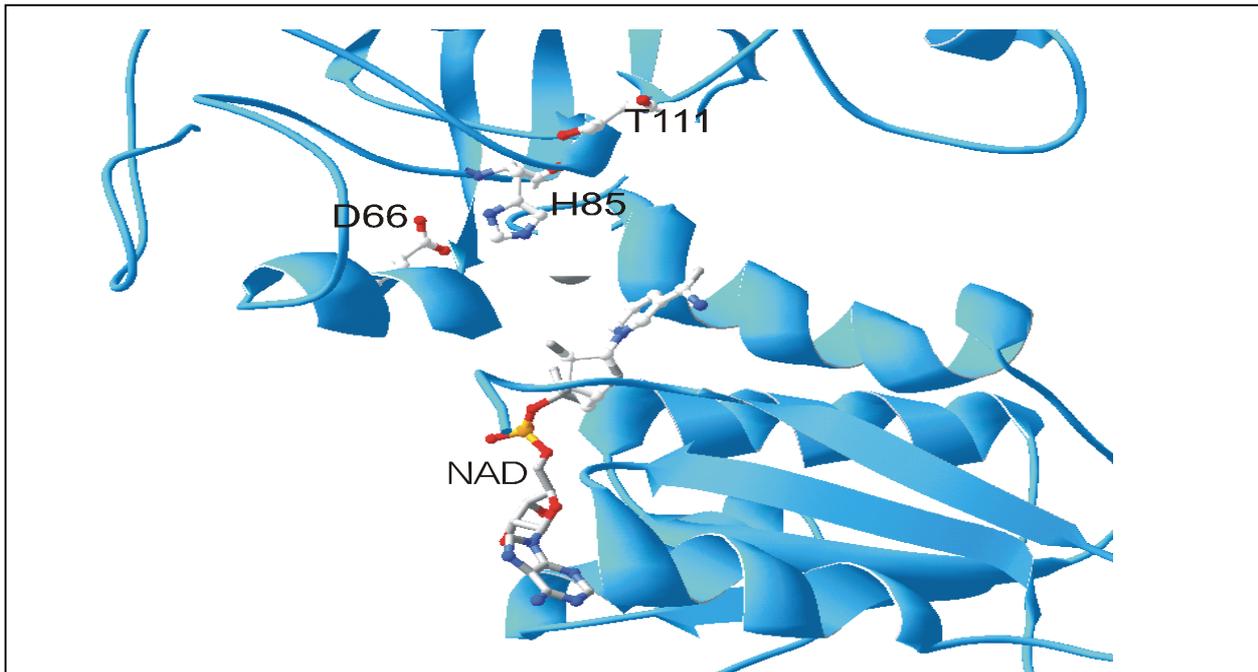


Abbildung 23: Lage und Orientierung eines potentiell gebundenen NAD-Moleküls im Homologiemodell der LuHNL
erstellt mit SWISS-Model und pdb-viewer

4.1.5.5.1 Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart von NAD(P)⁺ und NAD(P)H

Der Test auf HNL-Aktivität wurde nach Inkubation von 2 µg homogener recLuHNL mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H (10 µM -10 mM) im Bereich von 15-60 min bei verschiedenen Temperaturen (30°C-70°C) durchgeführt. Zuerst wurde der Temperaturbereich ermittelt, der die beste Aussage über Stabilitätsunterschiede in Gegenwart potentiell gebundener Cofaktoren liefert. Bei 30°C und 40°C wurde erwartungsgemäß keine signifikante Abnahme der enzymatischen Aktivität in Abwesenheit der Cofaktoren über einen Zeitraum von 1 h ermittelt, wohingegen bei 60°C und 70°C die LuHNL schon nach 5 min kaum noch Aktivität zeigte. Die Inkubation des Enzyms bei 50°C zeigte eine kontinuierliche Abnahme seiner Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit (Abbildung 24). Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen der Dinukleotide im Bereich von 10 µM bis 10 mM getestet. Bei Konzentrationen von 10 und 100 µM konnte kein eindeutiger Effekt auf eine erhöhte Stabilität bei 50°C in Anwesenheit der Cofaktoren festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Erst bei höheren Konzentrationen, insbesondere bei 10 mM NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H zeigte sich eine Erhöhung der recLuHNL-Stabilität über einen Zeitraum von 1 h bei 50°C (Abbildung 24).

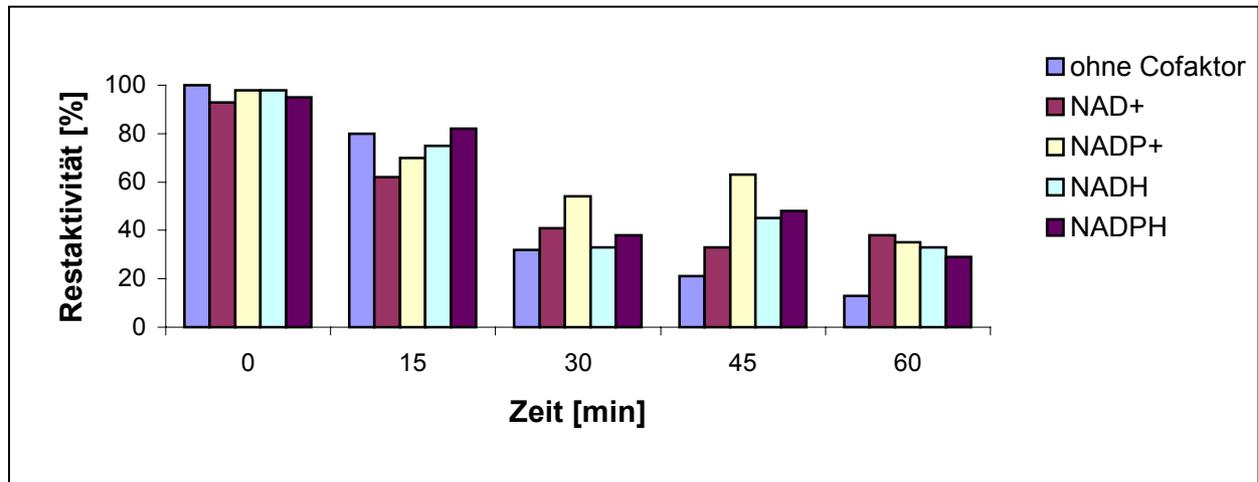


Abbildung 24: Stabilität der recLuHNL bei 50°C nach Inkubation mit 10 mM NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 angegeben ist die Restaktivität nach LuHNL-Standardtest (bezogen auf dem Wert zum Zeitpunkt t=0 min ohne Cofaktor) als Maß für die Stabilität bei 50°C nach Inkubation mit 10 mM NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H über 60 min.

Eine kontinuierliche Abnahme der Enzymaktivität ist in Abwesenheit der Dinukleotide zu beobachten. Zwar ist eine Aktivitätsminderung über den gesamten Zeitraum auch nach Cofaktorinkubation erkennbar, jedoch ist insbesondere nach 45 und 60 min eine um mehr als das zweifache höhere Restaktivität vorhanden.

Offensichtlich scheinen die Cofaktoren einer Enzyminaktivierung aufgrund von Konformationsänderungen oder -stabilisierung entgegen zu wirken. Inwieweit dieser Effekt jedoch auf einer spezifischen Bindung der Dinukleotide in eventuell noch vorhandenen Cofaktorbindungsstellen beruht oder aber einfach die Folge einer konzentrationsabhängigen unspezifischen Stabilisierung des globulären Proteins ist, kann nicht eindeutig unterschieden werden. Auf letzteres lassen sowohl die vergleichsweise hohen Cofaktorkonzentrationen (1 bzw. 10 mM), sowie die scheinbar fehlende Diskriminierung zwischen NAD und NADP schließen. Die K_m -Werte für NAD(H) bzw. NADP(H) liegen bei den von diesen Cofaktoren abhängigen Enzymen im allgemeinen im Bereich zwischen 10 und 100 μ M und die meisten beschriebenen Enzyme sind entweder NAD oder NADP-abhängig (Eklund et al., 1990; Carugo & Argos, 1997).

Obwohl sich NADP von NAD nur durch die Anwesenheit einer zusätzlichen Phosphat-Gruppe, verestert mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose des Adenin-Endes, unterscheidet, wird das phosphorylierte Dinukleotid hauptsächlich für reduktive Biosynthesen benötigt, während NAD in oxidativen Katabolismen seinen Einsatz findet. Ebenso unterscheiden die an diesen Prozessen beteiligten Enzyme zwischen den beiden Cofaktoren. Es gibt nur ganz wenige Ausnahmen, wie z.B. die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*, die beide Cofaktoren binden und umsetzen können (Naylor et al., 2001). Zwar gibt es ein gemeinsames ADP-bindendes Motiv ($\beta\alpha\beta$ -Element) mit einer Consensus-Sequenz nach Wierenga et al. (1986), doch letztendlich beruht die Cofaktorbindung auf der Beschaffenheit der Bindungstasche. Einheitlich bei NAD-bindenden Enzymen ist eine Carboxyl-Seitenkette, die die Diol-Gruppe der Adenin-Ribose chelatisiert. Demgegenüber besitzen die NADP-abhängigen Enzyme eine Arginin-Seitenkette, welche mit dem Phosphomonoester interagiert (Carugo & Argos, 1997). Ein solcher Argininrest wurde im *LuHNL*-Modell nicht gefunden.

Trotz des in der Primärstruktur der *LuHNL* vorhandenen ADP-bindenden Motivs und einiger zu einer NAD(P)-Bindung über Wasserstoffbrücken befähigten Aminosäuren (siehe 4.1.5.1), kann aus den beschriebenen Untersuchungen zur Stabilität nicht auf eine spezifische Cofaktorbindung geschlossen werden.

Weitere Untersuchungen zum Cofaktor-Bindungsverhalten wurden deshalb mittels fluoreszenzspektroskopischer Messungen durchgeführt (siehe 4.1.5.5.2).

4.1.5.5.2 Fluoreszenzspektroskopische Messungen zur NAD(P)H-Bindung

Um das Bindungsverhalten der Dinukleotide in der *LuHNL* nach Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen weiterführend zu klären, wurden vergleichende fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt.

Zum Verständnis und zur Motivation dieser Untersuchungen, soll an dieser Stelle auf eine Begriffserläuterung eingegangen werden. Als Fluoreszenz bezeichnet man die Abgabe von Energie durch spontane Emission von Photonen aus einem angeregten Niveau eines Moleküls oder Atoms. Dabei wird ein Elektron durch selektive Absorption elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge aus seinem Grundzustand in den angeregten Zustand überführt. In Bezug auf die vorhandenen Energieniveaus bedeutet dies, dass die Elektronen aus dem Grundzustand S_0 auf ein höheres Energieniveau in die Anregungs- oder sog. Singulettzustände S_1 und S_2 transferriert werden. Im angeregten Zustand erleidet das Molekül kinetische Zusammenstöße mit Nachbarmolekülen (z.B. mit Lösungsmittelmolekülen oder unmittelbar benachbarten Aminosäuren der Proteine) und in dem Maße, wie es seine absorbierte Anregungsenergie hier in Form von kinetischer Energie oder Wärme an sie abgibt, fällt es die Leiter der Schwingungsniveaus abwärts (Interne Konversion und Schwingungsrelaxation). Sind die Moleküle in der Umgebung aber nicht in der Lage, die großen Energiedifferenzen abzufangen, wird das Molekül den Energieüberschuss spontan als Fluoreszenzstrahlung emittieren (Abbildung 25).

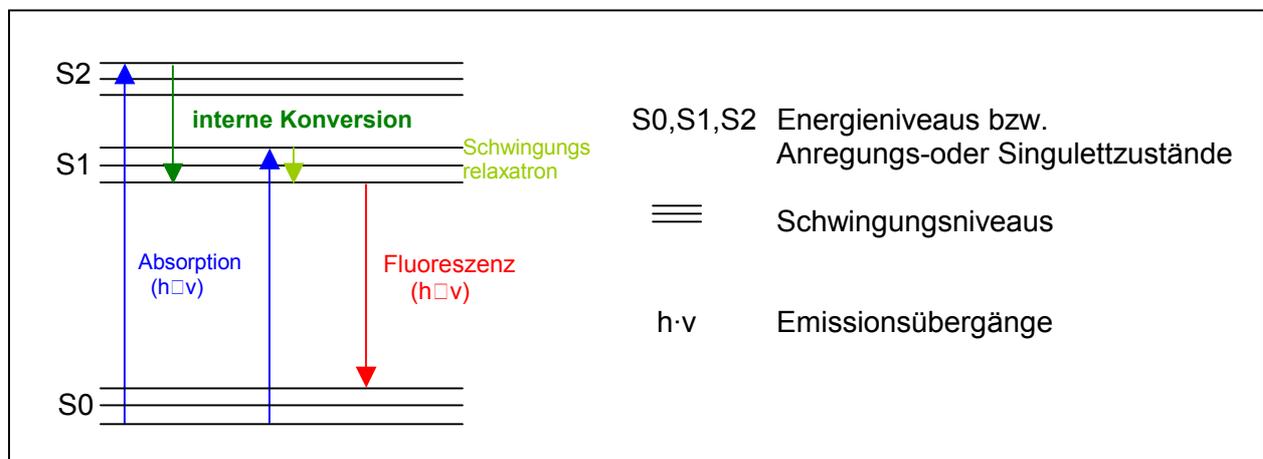


Abbildung 25: Jablonski-Diagramm

Das emittierte Licht ist energieärmer als das ursprünglich absorbierte und besitzt daher eine höhere Wellenlänge (Stokessche Regel).

Wird aber die absorbierte Energie vollständig von den benachbarten Molekülen übernommen und abtransportiert bzw. wird sie durch deren Anregung wieder ausgestrahlt, spricht man von Fluoreszenzlöschung („Quenching“). Dieser Energietransfer wird durch Reduktion der Fluoreszenzintensität des absorbierenden Moleküls messbar. Ist das benachbarte und energieaufnehmende Molekül ebenfalls ein Fluorophor, kann in diesem Falle eine Steigerung der Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

Die Fluoreszenz wird somit durch das Fluorophor selbst (Konzentration, intrinsische Moleküle) und durch seine Umgebung (Lösungsmittel, benachbarte Makromoleküle, Temperatur) determiniert.

In Zellen befinden sich eine Vielzahl von Stoffen, die mit der geeigneten Wellenlänge angeregt werden können. Natürliche Fluorophore, die im Rahmen dieser Untersuchung von Interesse waren, sind die Pyridinnukleotide NADH und NADPH, sowie die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Die für den Zellmetabolismus wichtigen Cofaktoren NADH und NADPH sind starke Fluoreszenzfarbstoffe, die bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt werden und bei 450 nm am stärksten emittieren. Ihre oxidierten Formen NAD^+ und NADP^+ fluoreszieren jedoch nicht, da die fluorezierende Gruppe im NAD(P)-Molekül der reduzierte Nikotinamidring ist. Die kovalente Bindung an Adenin mindert zwar die Fluoreszenzintensität des Nicotinamidrings, jedoch entsteht eine vierfache Fluoreszenzsteigerung bei einer Bindung an Proteine. Auf diesem Phänomen sollten die Untersuchungen zur NAD(P)H-Bindung beruhen.

Ebenso wie die Absorptionseigenschaften von Proteinen werden auch deren Fluoreszenzeigenschaften von den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bestimmt. Um das Fluoreszenzspektrum eines Proteins aufzunehmen, wird dieses bei einer Wellenlänge 280 nm angeregt, weil dort Tryptophan und Tyrosin am stärksten absorbieren. Da Tryptophan nicht nur stärker absorbiert, sondern auch fluoresziert als Tyrosin dominieren die Tryptophanreste die Fluoreszenzspektren der Proteine.

Die Tryptophanfluoreszenz in Proteinen ist ca. 20 mal intensiver als die Tyrosinfluoreszenz, was durch eine 4 mal stärkere Absorption und eine ca. 5 fach höhere Quantenausbeute (Verhältnis zwischen der Zahl der absorbierten und der Zahl der emittierten Photonen) von Tryptophanresten zustande kommt. Ebenso wie im Falle der NAD(P)H-Fluoreszenz kommt es auch bei Proteinen nach Bindung eines Liganden häufig zu einer veränderten Tryptophanfluoreszenz (Bazzi et al., 2001).

Aufgrund der Änderungen der Fluoreszenzintensitäten der intrinsischen Fluorophore NAD(P)H und Trp/Tyr nach Protein-Cofaktor-Wechselwirkung wurden verschiedene Fluoreszenzspektren aufgenommen. Sowohl die NADH als auch die Protein-Fluoreszenzspektren der *recLuHNL* mit und ohne NADH wurden mit den Kontrollspektren NAD-bindender Proteine (Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* [Roche]) und nicht NAD-bindender Proteine (BSA, [Fluka]) verglichen (Abbildungen 26 und 27). Die NAD(P)H-Emissionspektren (Abbildung 26) und die Proteinfluoreszenzspektren (Abbildung 27) sind nachfolgend dargestellt. Dabei wurden die Nukleotidcofaktoren äquimolar zu den potentiellen Cofaktorbindungsstellen eingesetzt.

Der Vergleich der NAD(P)H-Fluoreszenzspektren deutet darauf hin, dass die *recLuHNL* keine Wechselwirkung über eine Cofaktorbindung mit NADH bzw NADPH eingeht. Die postulierte Steigerung der Fluoreszenzintensität nach Bindung der Cofaktoren ist nicht zu beobachten. Dies zeigt insbesondere der Vergleich mit den Kontrollspektren der ADH aus Bäckerhefe (Abbildung 26b) und von BSA (Abbildung 26a).

Die ADH aus *S. cerevisiae* ist ein Heterotetramer und bindet 1 NADH pro Untereinheit. Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität um mehr als 100% im Vergleich zur Summe der NADH- und ADH-Emissionsspektren (Abbildung 26b). Außerdem ist eine Verschiebung des NADH-Fluoreszenzmaximums zum kurzwelligeren Spektralbereich (Blauverschiebung) zu beobachten. Dieser Spektralshift durch Emission von energiereicherem Licht, ist auf die resultierenden Bewegungseinschränkung des NADH-Moleküls nach dessen Bindung und einem damit verbundenen geringeren Energieverlust zurückzuführen. Die Cofaktorbindung ist somit spektral nachgewiesen.

Demgegenüber zeigt das NADH-Spektrum des nicht cofaktorbindenden Proteins BSA keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach NADH-Inkubation im Vergleich zu dessen Summenspektrum aus NADH und BSA.

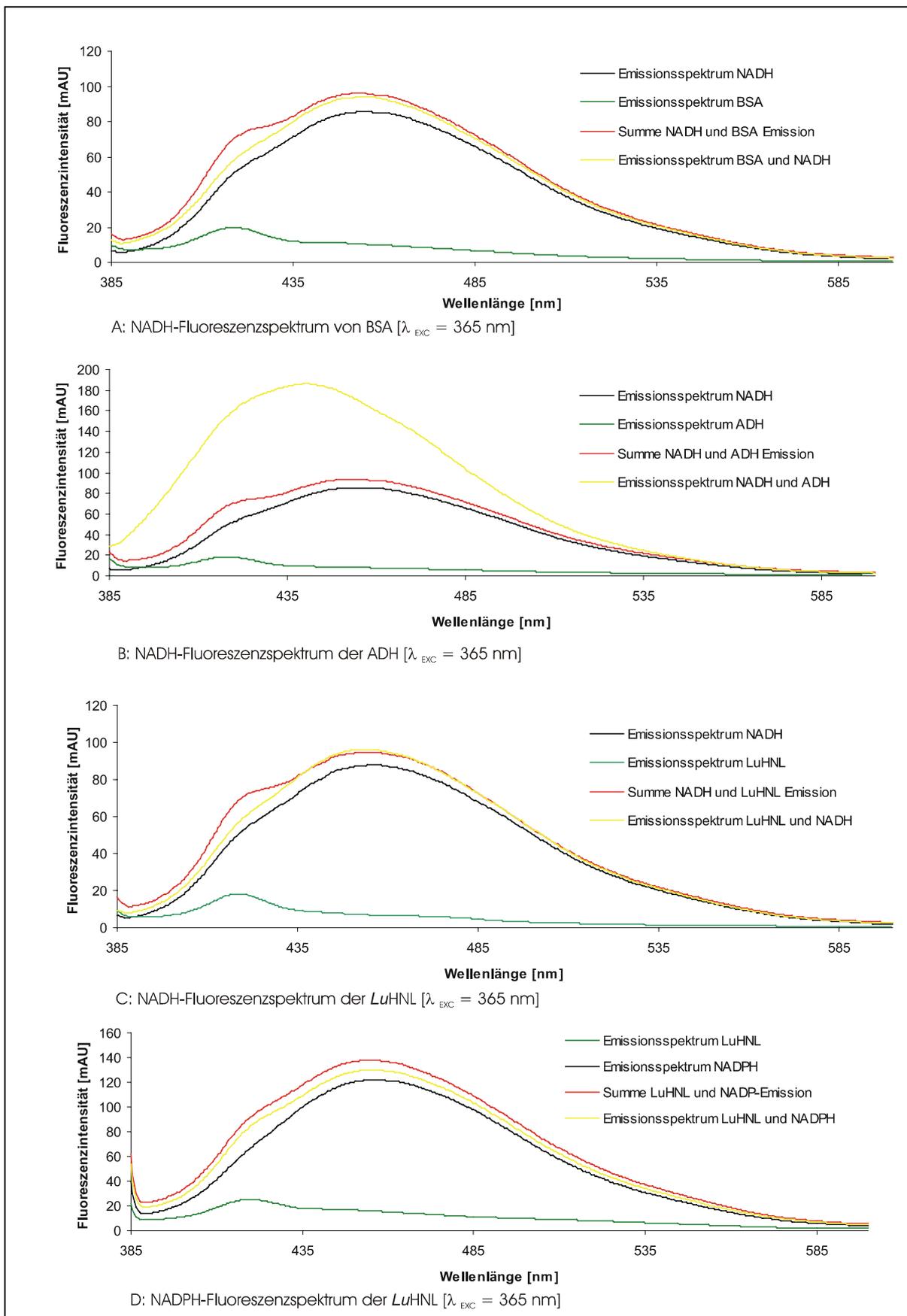


Abbildung 26: NAD(P)H-Fluoreszenzspektrn [$\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$]
 Messungen mit $2,5 \mu\text{M}$ Proteinlösung in 50 mM Kpi, $\text{pH}7,5$, bei RT

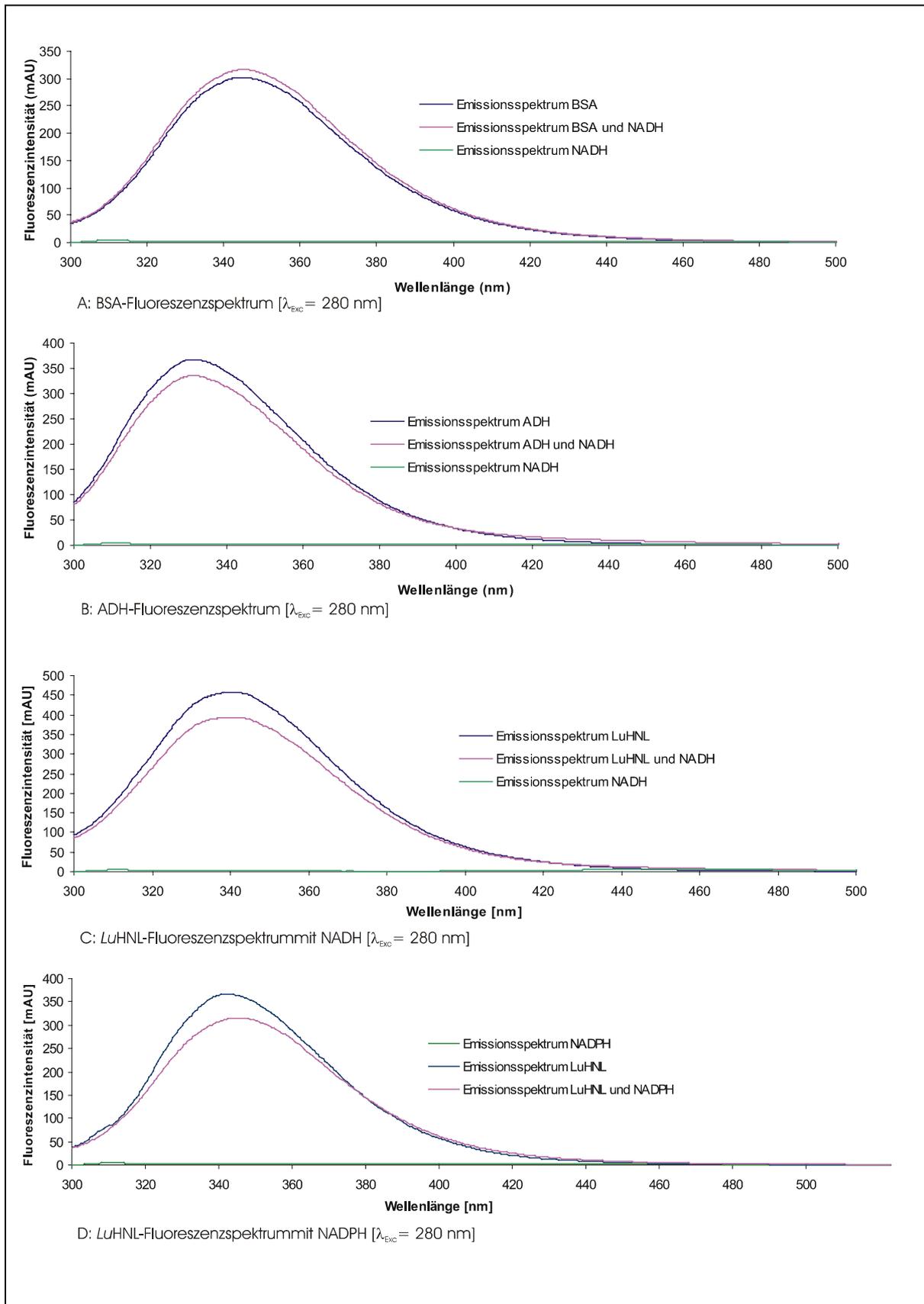


Abbildung 27: Protein-Fluoreszenzspektren [$\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$]
Messungen mit 2,5 μM Proteinlösung in 50 mM Kpi, pH7,5, bei RT

Im Vergleich dazu zeigen die NAD(P)H-Spektren der recLuHNL (Abbildungen 26c und 26d) ebenfalls nicht-cofaktorbindende Eigenschaften des Enzyms.

Um diese Ergebnisse abzusichern, wurden anschließend Spektren der Proteinfluoreszenz aufgenommen. Ihre Darstellung ist oben in der Abbildung 27 wiedergegeben.

Man unterscheidet verschiedene Arten von Energieübertragungsmechanismen in Lösung (Galla, 1988). Eine dynamischen Fluoreszenzlöschung entsteht durch Kollisionsprozesse und eine statischen Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung. Außerdem kann eine Energieübertragung über einen Bereich von bis zu maximal 100 Å (10 nm) stattfinden, wenn das Akzeptormolekül ebenfalls ein Fluorophor ist und sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt (Förster-Transfer). Dies ist im vorliegenden Falle gegeben, da das Emissionsmaximum des Tryptophans und das Absorptionsmaximum des NADH bei der gleichen Wellenlänge von 340 nm liegen. Nachweisbar ist dieser Transfer dann im Tryptophanspektrum durch eine Fluoreszenzsteigerung im Bereich von 460 nm, unter der Voraussetzung, dass die Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor eine geeignete Orientierung zueinander besitzen.

Im Falle des ADH-Spektrums ist in Anwesenheit von NADH eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abbildung 27b). Dieses Phänomen tritt auch im Proteinspektrum der recLuHNL mit NADH bzw. NADPH auf (Abbildungen 27c und 27d). Insgesamt gesehen, ist das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung aber zu gering (8-12%), um eine Bindung des NAD(P)H-Moleküls in der Nähe eines Tryptophanrestes dafür verantwortlich zu machen. Im Falle einer Cofaktorbindung ist eine Reduktion der Fluoreszenzintensität im Bereich von 25-50% relevant (Gabellieri et al., 1996). Das BSA-Molekül zeigt keine Verringerung der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von NADH.

Die Hefe-ADH besitzt 5 Tryptophanreste pro Untereinheit, die sich nach Erstellung und Auswertung ihres Homologiemodells im Bereich von 20-40 Å zum NADH-Molekül befinden (ohne Abbildung). Die Berechnung der Abstände der beiden Tryptophanreste im LuHNL-Modell ergab Werte von 28 Å für W210 und 40 Å für W169. Zwei weitere Tryptophanreste befinden sich außerhalb des Modellbereiches, dürften sich aber in ähnlichen Abständen zur potentiellen NADH-Bindungsstelle befinden.

Trotz Varianz des Homologiemodells dürften die Entfernungen zwischen Cofaktormolekül und fluoreszierendem Aminosäurerest für einen Förster-Transfer somit theoretisch ausreichen. Offensichtlich hat ein ebensolcher aber nicht stattgefunden, da keine Steigerung der Fluoreszenzintensität bei 460 nm in der Spektren der Proteinfluoreszenz erkennbar ist. Eine günstige Orientierung der Dipolmomente beider Fluorophore ist Voraussetzung für den Förster-Transfer und scheint hier nicht existent zu sein (Galla, 1988). Eher ist die geringe Fluoreszenzlöschung auf dynamische Kollisionsprozesse zurückzuführen, da eine statische Komplexbildung zwischen NADH und Tryptophanrest aufgrund ihrer Abstände unwahrscheinlich und das Ausmaß der Fluoreszenzreduktion dafür zu gering ist. BSA besitzt 3 Tryptophanreste, welche keiner Fluoreszenzlöschung durch NADH-Moleküle ausgesetzt waren. Vermutlich befinden sie sich im Inneren ihrer, durch zahlreiche Disulfidbrücken geschützten, Proteinstruktur und sind für die Dinukleotide nicht zugänglich.

Fasst man die Aussagen aller ermittelten Fluoreszenzspektren und die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zusammen, ist eine Dinukleotidbindung der *LuHNL* nicht zu beobachten.

Trotz vorhandener Consensus-Sequenz bietet diese lediglich die Topologie, in welche sich die Cofaktoren einlagern können. Neben einigen Resten dieses Motivs sind noch zahlreiche weitere, nicht genau definierbare, Aminosäurereste an der Fixierung des Cofaktormoleküls über ionische Reste und Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischer Wechselwirkungen beteiligt. Diese unter Umständen noch vorhandenen und den ADHn homologen NAD-bindenden Reste, können aufgrund von Aminosäureinsertionen (siehe Abbildungen 18 und 19) und daraus resultierenden Konformationsänderungen eine für das Cofaktormolekül nicht bindungsfähige Lokalisierung haben. Eine effiziente Bindung würde somit unterbleiben.

Unter der Annahme, dass sich die *LuHNL* aus Oxidoreduktase-Vorläufern entwickelt hat, bestand kein Selektionsdruck zur Konservierung der Dinukleotidbindung. Es wurde weder für die HNL-Reaktion benötigt, noch war dessen Nähe zum potentiellen Lyasezentrum sterisch günstig. Der Verlust der stabilen Bindung des ehemaligen Cofaktors im Zuge einer konvergenten Evolution scheint daher erklärbar.

4.1.5.6 Untersuchung auf Zink-Bindung

Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, in welchem Maße Zn^{2+} -Ionen für die *LuHNL* von Bedeutung sind. Zwar sind die Liganden für strukturell wichtige und katalytisch wirksame Zn^{2+} -Ionen der *ZnADHn* auch in der *LuHNL* konserviert (C115, C118, C121, C129 sowie C63, H85, C199), doch eine katalytische Rolle spielen zweiwertige Ionen bei der Lyase-Reaktion vermutlich nicht (Trummler et al., 1998; Breithaupt et al., 1999).

Trummler (1997) postulierte die *LuHNL* bereits als ein zinkhaltiges Metalloprotein. Der mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmte Zinkgehalt von zwei Zinkionen pro Monomer impliziert die Koordination der für die *ADHn* strukturell und katalytisch wirksamen Zn^{2+} -Ionen (Trummler et al., 1998).

Mit Hilfe des *LuHNL*-Homologie-Modells ist es möglich, sich eine Vorstellung über Position und Koordination der Zinkionen zu machen. In Abbildung 28 ist die mögliche Koordination des Zn^{2+} -Ions im katalytischen Zentrum und die Lage des strukturell bedeutenden Zn^{2+} -Ions in der katalytischen Domäne dargestellt.

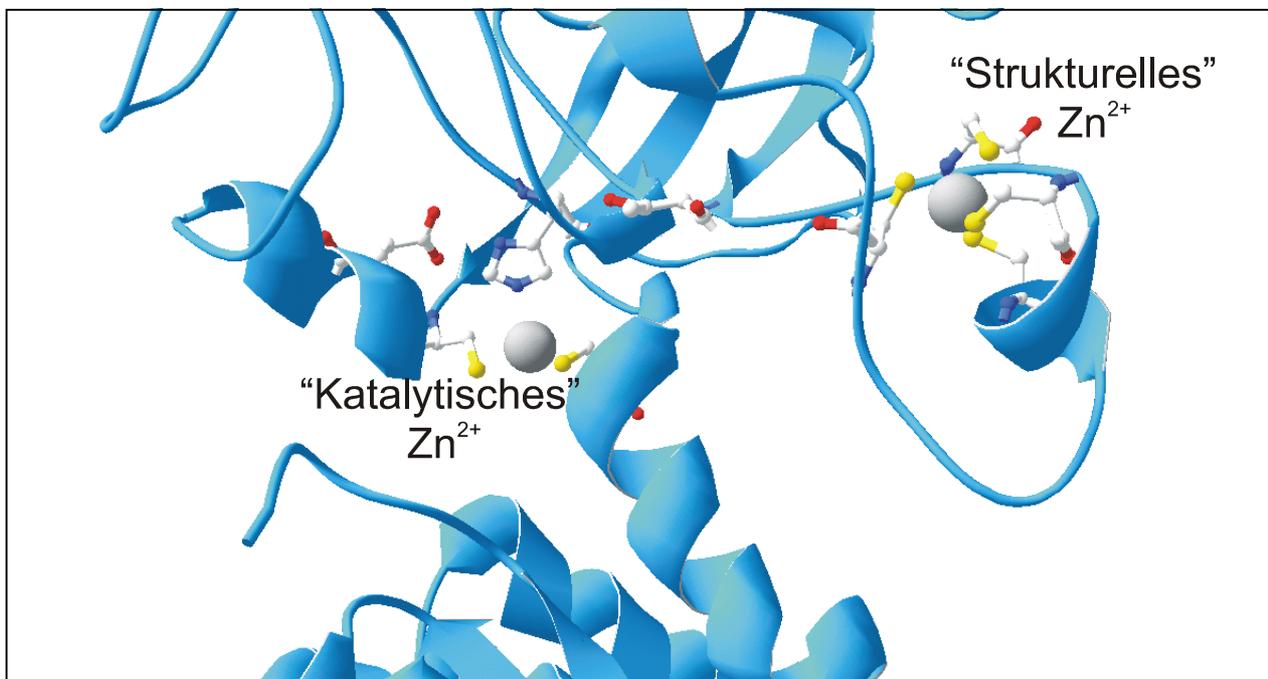


Abbildung 28: Potentielle Koordination und Position der Zinkionen im Homologiemodell der *LuHNL* [erstellt mit SWISS-Model und pdb-viewer]

Demgegenüber konnte aber das Zn^{2+} -Ionen komplexierende Agens 1,10-Phenanthrolin bei Raumtemperatur keinen Einfluss auf die HNL-Aktivität ausüben, obwohl Untersuchungen mit der ADH aus Pferdeleber nach Inkubation mit gleichen Konzentrationen eine fast vollständige Hemmung der Redoxaktivität zeigten (Trummler, 1997 und eigene Daten). Dies deutet zumindest auf eine Zugänglichkeit des „katalytischen“ Zn^{2+} -Ions für zweiwertige Komplexbildner hin.

Insofern sollte die Rolle der Zinkionen bzw. ihrer komplexierenden Cysteinreste in Bezug auf stabilisierende Eigenschaften, insbesondere bei höheren Temperaturen, untersucht werden.

4.1.5.6.1 Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen

Dazu wurden 0,5 μg homogene recLuHNL ohne Hexahistidin-Rest in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 50°C mit verschiedenen Konzentrationen (5 μM – 100 μM) an ZnSO_4 inkubiert und die Lyase-Aktivität im Standardtest nach 15, 30, 45 und 60 min bestimmt (Abbildung 29).

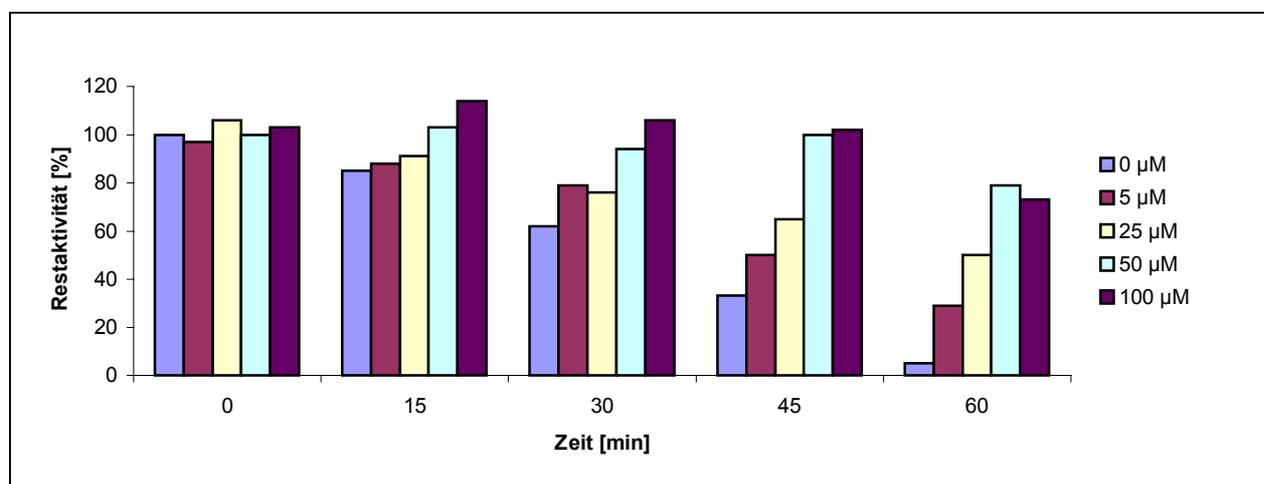


Abbildung 29: Stabilität der recLuHNL bei 50°C nach Inkubation mit verschiedenen ZnSO_4 -Konzentrationen in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 angegeben ist die Restaktivität nach LuHNL-Standardtest (bezogen auf dem Wert zum Zeitpunkt t=0 min ohne Zinksupplementation) als Maß für die Stabilität bei 50°C nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an ZnSO_4 über 60 min.

Bei Raumtemperatur war keine Änderung der Enzymaktivität in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen festzustellen (ohne Abbildung).

Allerdings haben Zn^{2+} -Ionen ab einer Konzentration von 50 μM einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität bei 50°C. Wie in Abbildung 29 zu erkennen, ist nach 45 und 60 min ein Erhalt der Lyase-Aktivität in Abhängigkeit von steigender $ZnSO_4$ -Konzentration festzustellen. Die *recLuHNL* ohne Zinksupplementation zeigt nach 60 min nur noch 8% ihrer Ausgangsaktivität, während sie nach Inkubation mit 50 μM $ZnSO_4$ noch fast 80% Restaktivität aufweist. Offensichtlich stabilisieren die Zn^{2+} -Ionen die *recLuHNL*-Struktur bei Temperaturerhöhung und schützen sie vor Denaturierung bzw. Inaktivierung. Von Magonet wurde dieses Phänomen auch für die Hefe-ADH beschrieben (1992).

Unterstützt wurden diese Beobachtungen durch die Untersuchung des Einflusses von EDTA und 1,10-Phenanthrolin auf die Stabilität der *recLuHNL* bei 50°C. EDTA und 1,10-Phenanthrolin sind Komplexbildner für zweiwertige Ionen und sind somit in der Lage Zn^{2+} -Ionen zu chelatisieren und u.U. deren Bindung aus dem Protein zu lösen. Bei Raumtemperatur zeigen beide Komplexbildner bei einer Konzentration von 1 mM - 10 mM über 30 min keinen Einfluss auf die Lyase-Aktivität. Dies bestätigt die Ergebnisse von Trummler (1997). Nach Inkubation bei 50°C in Gegenwart der Komplexbildner wurde jedoch eine Abnahme der Enzymaktivität schon in Gegenwart von jeweils 1 mM EDTA bzw. 1 mM 1,10-Phenanthrolin beobachtet. Im Falle von 1 mM EDTA sank die Aktivität im Vergleich zum Kontrollansatz um 30%, mit 1 mM 1,10-Phenanthrolin sogar um fast 40%. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei 1,10-Phenanthrolin um den stärkeren Komplexbildner handelt.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Zinkionen eindeutig einen stabilisierenden Effekt auf die *LuHNL* ausüben, der insbesondere bei Temperaturerhöhungen zur Geltung kommt. Zum anderen scheinen die beiden Komplexbildner bei einer Temperatur von 50°C, welche vermutlich eine höhere Flexibilität der Proteinstruktur und eine gleichzeitige Destabilisierung der Zn^{2+} -Bindung bewirkt, die Zinkionen zu komplexieren und aus ihrer Bindung herauslösen zu können.

Inwieweit neben dem strukturell wichtigen Zinkion, koordiniert durch C115, C118, C121 und C129 auch das „katalytische“ Zinkion eine stabilisierende Rolle spielt, kann durch obigen Versuch nicht genau definiert werden. Die Tatsache, dass selbst 1 mM 1,10-Phenanthrolin zur fast vollständigen Inaktivierung der ADH aus Pferdeleber in der Lage ist, lässt zumindest die freie Zugänglichkeit dieses Zinkions vermuten. Dies ist angesichts seiner Position im katalytischen Zentrum auch nicht überraschend. Die Lyaseaktivität bleibt bei Raumtemperatur jedoch selbst nach Inkubation mit 20 mM 1,10-Phenanthrolin fast unverändert. Dieses fast gegensätzliche Hemmmuster bei signifikanten Inhibitorkonzentrationen, lassen weder auf eine Beteiligung der Zn^{2+} -Ions an der HNL-Reaktion, noch auf eine stabilisierende Wirkung bei Raumtemperatur schließen (Trummler & Wajant, 1997).

Man sollte die Möglichkeit jedoch nicht außer Acht lassen, dass die das katalytische Zinkion koordinierenden Cysteinreste Disulfidbrücken ausgebildet und somit das Zinkion eliminiert haben. Darüberhinaus besitzt die *LuHNL* noch sechs weitere Cysteinreste, die ebenso zur Bildung dieses Strukturmerkmals in der Lage wären. Um obige Untersuchungen etwas weiterzuführen und mögliche Erklärungen für die Bildung der Inclusion bodies in *E. coli* bzw. für die verbesserte Expression im Thioreduktase-defizienten *E. coli*-Stamm AD494 zu erhalten, wurde ein eingehender Test auf Disulfidbrücken durchgeführt.

4.1.5.6.2 Test auf Disulfidbrücken

Die *LuHNL* besitzt keine intermolekularen Disulfidbrücken zwischen ihren beiden Untereinheiten. Dies ist mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen nachweisbar. Als reduzierende Agentien sind β -Mercaptoethanol oder DTT in der Lage, Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten zu Sulfhydrylgruppen zu reduzieren und damit die über diese Struktur miteinander verbundenen Strukturbereiche zu trennen. Das Protein nach Reduktion mit einem der beiden Agentien zeigt ebenso wie nicht reduziertes Enzym eine Bande bei Größe der Untereinheit von 42 kDa (ohne Abbildung), wodurch intermolekulare Disulfidbrücken bei der *LuHNL* ausgeschlossen werden können.

Ob die *LuHNL* intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Auf das Vorliegen von S-S-Brücken können die Ergebnisse der *recLuHNL*-Expression in *E. coli* (siehe 4.1.1.2) deuten. Sowohl die Bildung von Inclusion Bodies als auch die höhere Aktivität im Thioreduktase-defizienten Stamm *E. coli* AD494 lassen das Vorhandensein von Disulfidbrücken als tertiärstrukturbildendes Element vermuten. Darüberhinaus lieferte die Expression in *P. pastoris*, die als eukaryotischer Wirtsorganismus zur Disulfidbrückenbildung in der Lage ist, den höchsten Anteil an löslichem und aktivem Enzym. Die Aminosäuresequenz weist zwölf Cysteinreste auf, die prinzipiell zu deren Ausbildung in der Lage sind (Abbildung 20). Obwohl der modellierte Bereich der *LuHNL* nur neun dieser Cysteinreste berücksichtigt, wurden diese im Homologiemodell lokalisiert. Ihre Position ist in Abbildung 30 wiedergegeben.

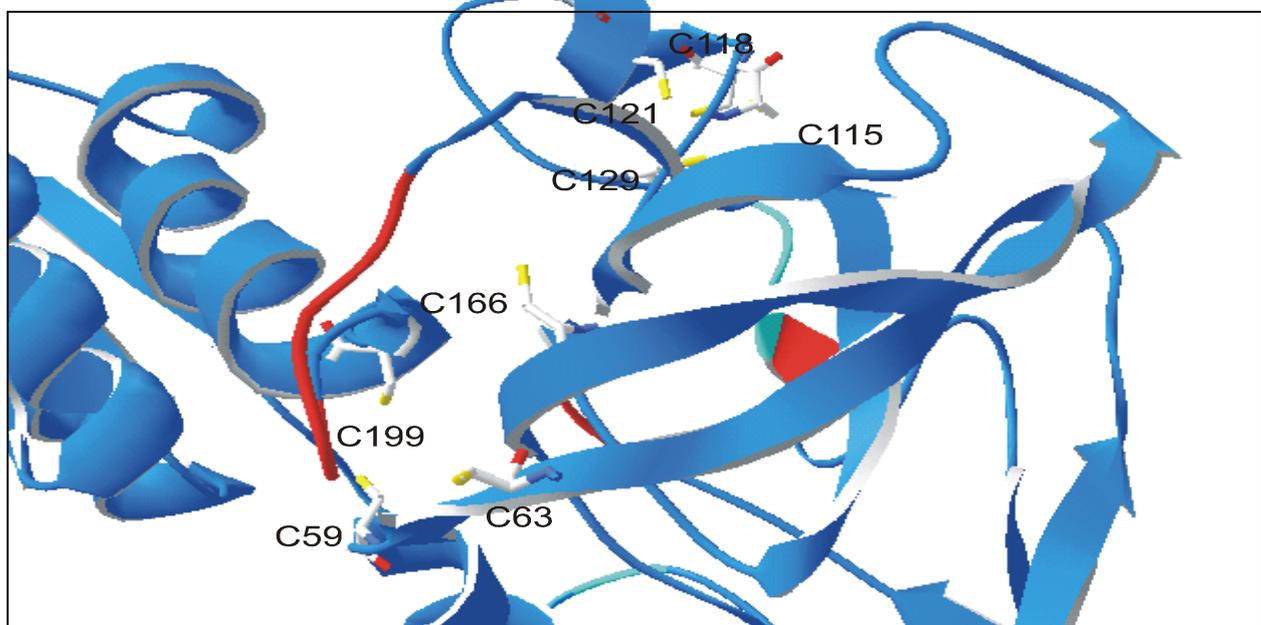


Abbildung 30: Position ausgewählter Cysteinreste im Homologiemodell der *LuHNL* erstellt mit SWISS-Model und pdb-viewer

Gekennzeichnet sind neben den Cysteinresten, welche das strukturerhaltende Zn^{2+} -Ion koordinieren (C115/C118/C121/C129), auch die Reste des katalytischen Zinkkomplexes der ADH (C63 und C199). Deutlich zu erkennen sind zwei weitere Cysteinreste in enger Nachbarschaft (C59 und C166), welche innerhalb der ADH-Sequenzen nicht vor-kommen.

Das verbleibende C266 liegt im Modell in keiner unmittelbaren Umgebung zu einem weiteren Cysteinrest. Die Bestimmung der Abstände von 6,5 – 12 Å ist unter Berücksichtigung der Varianz des Modells zu betrachten. Außerdem fehlen drei weitere Cysteinreste der *LuHNL*, deren Position aufgrund ihrer Lage außerhalb des Modellbereiches nur vermutet werden kann (Abbildung 20). Eine Homologie zu den ADHn besitzen diese Reste nicht.

Deshalb wurde zum einen eine vergleichende SDS-PAGE-Analyse mit und ohne β -Mercaptoethanol vorgenommen und zum anderen Aktivitätsuntersuchungen in Anwesenheit reduzierender Agentien durchgeführt.

- Test auf intramolekulare Disulfidbrücken mittels SDS-PAGE -

Es wurden 4 von 7 Ansätzen homogener *recLuHNL* unter reduzierenden Bedingungen der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE unterworfen. β -Mercaptoethanol besitzt die Fähigkeit während des Elektrophoreselaufs horizontal in das Gel zu diffundieren und somit bei nebeneinander liegenden Spuren von reduzierten und nicht-reduzierten Proben auch beim nicht-reduzierten Protein eine Änderung des Laufverhaltens zu bewirken. Ein sog. „smile“-Effekt kann sich dann bei Vorliegen von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen reduzierter und nicht-reduzierter Probe ausbilden, weil das nicht-reduzierte Protein aufgrund seiner Disulfidbrücken i.d.R. kompakter ist und deshalb ein scheinbar geringeres Molekulargewicht präsentiert. Bei Reduktion der Disulfidbrücken zeigt das Protein im Vergleich dazu eine geringere Laufstrecke. Nach Auftragung von drei nicht-reduzierten Ansätzen flankiert von jeweils zwei reduzierten Proben auf einem großen SDS-Gel und Elektrophoreselauf über Nacht konnte nach Silberfärbung kaum ein Unterschied im Laufverhalten zwischen beiden Ansätzen festgestellt werden (Abbildung 31). Dieses Ergebnis ist jedoch kein absoluter Beweis für die Abwesenheit von intramolekularen Disulfidbrücken. Letztere können auch so strukturiert sein, dass das Lösen ihrer Bindung keine Auswirkung auf die Kompaktheit der Molekülstruktur hat. Ein Unterschied im elektrophoretischen Laufverhalten wäre demzufolge nicht unbedingt erkennbar.

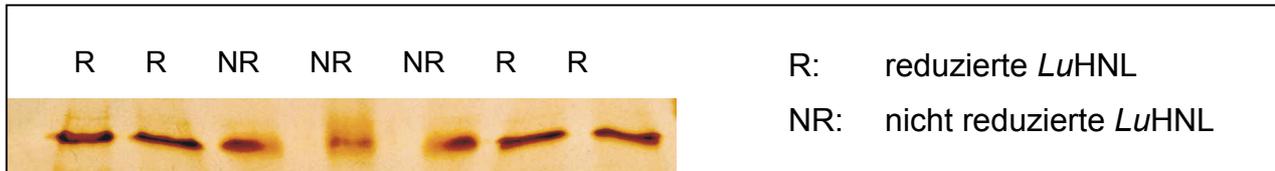


Abbildung 31: Vergleichende SDS-PAGE von mit und ohne β -Mercaptoethanol reduzierter LuHNL nach Silberfärbung
reduzierte LuHNL: 50 μ l Enzymproben mit 5 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und 3 min bei 100°C denaturiert.
nicht-reduzierte LuHNL: 50 μ l Enzymproben 3 min bei 100°C denaturiert.

- Aktivitätstest in Anwesenheit reduzierender Agentien -

Der Test auf *LuHNL*-Aktivität wurde mit homogen aufgereinigtem Enzym nach Inkubation mit β -Mercaptoethanol bzw. DTT in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Kontrollansätze zeigten, dass β -Mercaptoethanol den Enzymtest zu stark verfälscht, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. Im Gegensatz dazu wirkte sich DTT nicht störend auf den colorimetrischen Test aus. DTT-Konzentrationen von 1, 10 und 100 mM zeigten keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der *recLuHNL*. Selbst nach 1 h Inkubationsdauer in 50 mM Kpi pH 7,5 wurde keine Aktivitätsabnahme beobachtet. Aber auch hier kann das Fehlen von Disulfidbrücken nicht völlig ausgeschlossen werden, da ein Lösen dieser Bindung nicht unbedingt einen Aktivitätsverlust zur Folge haben muss.

Sowohl die vergleichende SDS-PAGE-Analyse als auch die Aktivitätsuntersuchungen in Gegenwart des Disulfidbrücken reduzierenden Agens DTT lassen nicht auf das Vorhandensein intramolekularer Disulfidbrücken schließen. Bei genauerer Betrachtung der Expressionsstudien ist zu berücksichtigen, dass die *recLuHNL* in *E. coli* AD494 zwar verstärkt in aktiver Form gebildet wird, jedoch immer noch ca. 25% in unlöslicher Form vorliegen. Daneben kann die Expression in *Pichia* aufgrund einer koordinierteren Translationsmaschinerie eine zu hohe lokale Proteinkonzentration während der Translation und somit die unspezifische Aggregation aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Proteinmoleküle verhindern.

Aufgrund dieser Beobachtungen und obiger Untersuchungen kann man die *LuHNL* als zinkhaltiges Enzym beschreiben, welches mindestens eines der beiden zweiwertigen Ionen nur noch zur Stabilisierung seiner Konformation benötigt. Während das strukturerhaltende Zn^{2+} -Ion, koordiniert durch vier Cysteinreste (C115/C118/C121/C129), im Verlauf der Lyasereaktion erhalten bleibt, dürfte der durch H85 und C48/C199 koordinierte Zinkkomplex beim pH-Optimum der *LuHNL* von 5,5 destabilisiert sein. Bei diesem pH-Wert liegt der Histidinrest zu wahrscheinlich mehr als 50% protoniert vor, denn der pK_S für die Imidazoleseitenkette beträgt bei 25°C ohne Berücksichtigung seiner Proteinumgebung 6,04 (Trummler, 1997). Und genau diese pH-Verhältnisse könnten die Lyasereaktion unter der Beteiligung der drei im Homologiemodell bestimmten katalytischen Reste einleiten. Der Protonierung des größten Anteils an H85 bei pH-Werten < 6 wirkt die Carboxylgruppe des second-sphere Liganden des „katalytischen“ Zinkions D66 entgegen. Diese Aktivierung wiederum dürfte zur Deprotonierung des T111 führen und den nukleophilen Angriff auf Carbonyl-C-Atom des Substrates einleiten.

Obige Vermutung unterstützt die Hypothese, dass allein die Schaffung einer geeigneten „Mikroumgebung“, bestehend aus einem geeigneten pH-Milieu, unterstützt durch eine katalytische Triade, eine HNL-Aktivität generieren kann. Die „Makroumgebung“ ist somit von untergeordneter Bedeutung, weshalb sich die HNLn aus den unterschiedlichsten Vorläuferenzymen entwickeln konnten. Bei Betrachtung der in Abbildung 19 dargestellten Consensus-Sequenz könnte eine Mutation von Prolin [AS 83 der ADHn] zum T111 in der *LuHNL* diese Konstellation geschaffen haben, denn H85 und D66 sind innerhalb der ZnADHn konserviert.

4.2 Die Hydroxynitril-Lyase aus *Sorghum bicolor*

Die *SbHNL* besteht aus einer schweren [α -Untereinheit von 33 kDa] und einer leichten [β -Untereinheit von 23 kDa] Kette die zu einem Heterotetramer dimerisieren. Beide Ketten sind glykosyliert und über zwei essentielle Disulfidbrücken miteinander verbunden (Jansen et al., 1992; Wajant & Mundry, 1993). α - und β -Untereinheit werden in Form eines gemeinsamen Präproteins mit Linkerpeptid synthetisiert, welches eine korrekte proteolytische Spaltung und Prozessierung in schwere und leichte Kette erfordert.



Abbildung 32: Schematischer Aufbau der *SbHNL* [cDNA und Enzym]

Der N-Terminus der 23 kDa-UE konnte mit proteinchemischen Methoden problemlos sequenziert werden, während der N-Terminus der 33 kDa-UE blockiert und die Art der Schutzgruppe unbekannt war (Jansen et al., 1992). Durch Edman-Abbau einer großen Probenmenge gelang jedoch die Bestimmung einer schwach präsenten Aminosäuresequenz und lieferte nach einem Vergleich mit der in ihrer Primärstruktur homologen Serincarboxypeptidase aus Weizen [CPII-W] einen in Abbildung 35 dargestellten potentiellen N-Terminus der großen Untereinheit (Juchem, 1996). Es blieb dennoch offen, ob der geringe sequenzierte Bereich der großen Kette den vollständigen N-Terminus repräsentiert.

Die bis dato bekannte Teilsequenz von ca. 75% des 3'-Bereiches der *SbHNL*-cDNA (Wajant et al., 1994) und der identifizierte, potentielle N-Terminus des Präenzym (Jansen et al., 1992, Juchem, 1996) waren Ausgangspunkt zur Identifizierung der vollständigen *SbHNL*-cDNA. Ebenso war der C-Terminus der schweren Kette bzw. die Position des proteolytischen Spaltstelle des Präproteins unbekannt.

4.2.1 Identifizierung der *Sb*HNL-cDNA

Dazu wurden drei verschiedene Ansätze parallel verfolgt. Neben dem Versuch der Amplifizierung des *Sb*-HNL-Gens mit degenerierten Primern, abgeleitet aus dem sequenzierten potentiellen N-Terminus und homologen Primern des bekannten 3'-Endes, wurde die Herstellung einer partiellen genomischen Bank eingeleitet. Bei diesen Ansätzen war jedoch zu berücksichtigen, dass die so zugängliche eukaryotische Gensequenz unter Umständen nicht codierende Intronsequenzen beinhalten kann. Nachdem in vorangehenden Arbeiten das Screening einer von der Fa. Invitrogen kommerziell erhältlichen cDNA-Bank aus *Sorghum bicolor* ebenfalls nur unvollständige, im 5'-Bereich verkürzte Sequenzen lieferte, wurde neben den beiden oben genannten Ansätzen der Schwerpunkt auf eine Genisolierung mittels 5'-RACE [Rapid Amplification of cDNA-Ends] gelegt.

4.2.1.1 5'-RACE [Rapid Amplification of cDNA-Ends]

Dabei wurde ausgehend von isolierter mRNA und nach Anlagerung des genspezifischen Primers S-Oxy 5-24 im 3'-Bereich mittels einer Reversen Transkriptase-Reaktion ein cDNA-Strang in Richtung 5'-Ende synthetisiert. Die mRNA wurde durch intrinsische RNase-Aktivität abgebaut und nach Aufreinigung der Erststrang-cDNA wurde durch eine terminale Tranferase-Reaktion ein polyA-Tail an das 3'-Ende der cDNA angelagert. Die Amplifizierung des 5'-Endes der gesuchten cDNA erfolgte dann über zwei aufeinanderfolgende und ineinander geschachtelte (nested) PC-Reaktionen.

Die erste PCR benötigte einen oligodT-Anchor-Primer und den genspezifischen Primer S-Oxy 20-24. Die zweite Runde mit dem nested Primer S-Oxy 21-21 und dem anchor-Primer diente dazu, die bei der ersten PCR entstandenen unspezifischen Produkte zu unterdrücken. Die entstandenen Amplifikate wurden dann in pUC18 ligiert und in *E. coli* XL1-Blue kloniert. Nach anschließender Isolierung der Vektor-Insert-Konstrukte wurden diese sequenziert.

Dieser Ansatz lieferte zwar neue Sequenzinformationen, die jedoch nicht die vollständige Nucleotidsequenz des *SbHNL*-Gens beinhaltete.

Zahlreiche Variationen der 5'-RACE in Bezug auf Polymerisierungsbedingungen der reversen Transkriptase- und terminalen Transferase-Reaktion sowie der PCR [Primer- und Enzymauswahl; Temperaturshift, Zugabe von DMSO, Formamid bzw. Trehalose zur Überwindung anscheinend vorhandener unerwünschter Sekundärstrukturen] wurden durchgeführt (Schäfer, 1995; Carninci et al., 1998). Daneben wurde zuvor mechanisch beschädigtes Pflanzenmaterial eingesetzt, um eventuell die Transkription des *SbHNL*-Gens zu induzieren bzw. seine Transkriptionsrate zu steigern.

Die Identifizierung von 75 bisher unbekannt Basen im 5'-Bereich der *SbHNL*-cDNA wurde nach Formamid-Zugabe während der Erststrang-cDNA-Synthese und unter Verwendung der zuvor genannter Primer erreicht (Abbildung 35).

4.2.1.2 Touch Down PCR mit degenerierten Primern

Bei der Touch down (TD)-PCR mit vom potentiellen N-Terminus abgeleiteten und deshalb degenerierten Primern, wurde die Annealing-Temperatur in jedem Zyklus kontinuierlich von einem Wert oberhalb der erwarteten optimalen Temperatur auf einen Wert unterhalb gesenkt.

Mit dem 5'-Primer N-Term_{pot} und dem 3'-Primer C23 wurden nach TD-PCR mehrere Amplifikate unterschiedlicher Größe erhalten. Da diese von genomischer Templat-DNA gebildeten PCR-Produkte über Intronsequenzen verfügen konnten und deshalb eine eindeutige Größe nicht zu bestimmen war, wurden die erhaltenen Amplifikate auf eine Membran transferiert und fixiert (Southern Blotting). Hybridisiert und detektiert wurde mit einer Digoxigenin-markierten 730bp DNA-Sonde_{N-Term1/C23}, die aus dem bisher bekannten N-terminalen Bereich generiert wurde. Leider ließ sich in den ersten Ansätzen trotz zahlreicher PCR-Produkte kein deutliches Signal in ausreichender Mindestgröße von 1030 kb im Southern Blot nachweisen (Abbildung 33). Nur ein schwaches Signal war in diesem Größenbereich zu detektieren, während eine weitaus stärkere Chemolumineszenz im niedermolekularen Bereich auftrat.

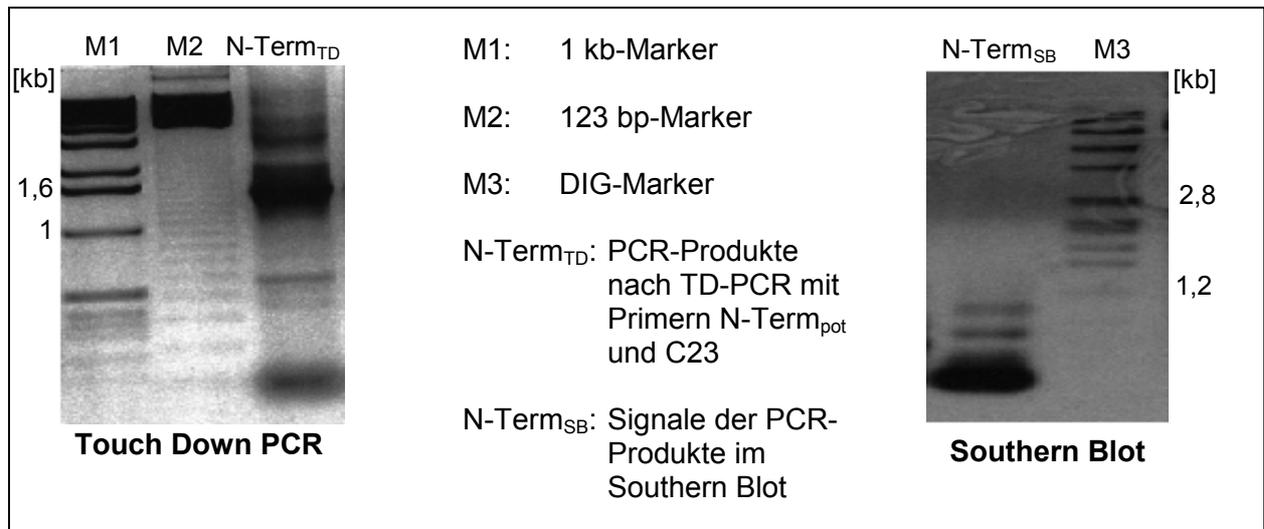


Abbildung 33: Touch-down PCR mit Southern Blot-Nachweis zur Isolierung des *SbHNL*-Gens

4.2.1.3 Herstellung einer partiellen genomischen Bank

Zur Herstellung einer partiellen genomischen Bank wurde das isolierte *Sorghum*-Genom mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden nur solche Restriktionsenzyme gewählt, welche keine Erkennungsregion in der bisher bekannten *SbHNL*-Sequenz aufweisen.

Nach einem Southern Blotting wurde die Membran mit der DIG-markierten DNA-Sonde_{N-Term1/C23} hybridisiert und nach Chemolumineszenz-Nachweis dokumentiert (Abbildung 34).

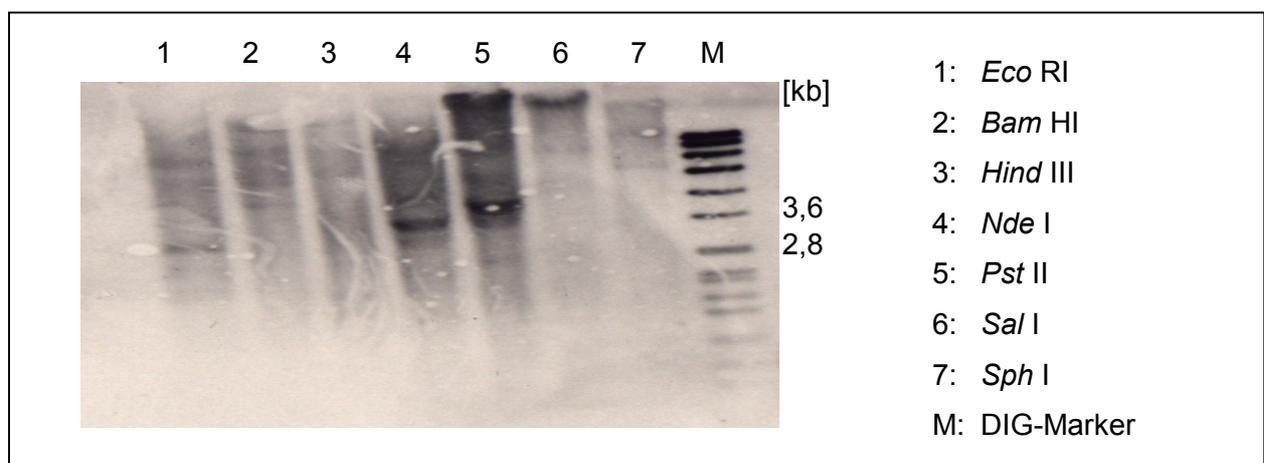


Abbildung 34: Southern Blot zur Herstellung einer partiellen genomischen Bank aus *Sorghum bicolor*

Eindeutige Lumineszenz-Signale in akzeptablen Größebereichen von mehr als 1,2 kb wurden nach Restriktion mit *Eco* RI (Spur 1), *Nde* I (Spur 4) und *Pst* II (Spur 5) erhalten.

4.2.1.4 Sequenz der *SbHNL*-cDNA

Im Verlauf der geschilderten Untersuchungen wurde mir die vollständige und klonierte *SbHNL*-cDNA-Sequenz aus parallel laufenden Arbeiten von Herrn Dr. Wajant (Universität Stuttgart) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abbildung 35).

Die Analyse der Sequenzdaten mittels GeneBee-RNA secondary structure prediction [www.genebee.msu.su] gab dann Aufschluss über die eigenen Schwierigkeiten bei der Isolierung des 5'-*SbHNL*-Gen-Terminus.

Die Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen innerhalb GC-reicher Regionen der einzelsträngigen mRNA im Bereich der Basen 102-163 und 325-378 behinderten offensichtlich die Reverse Transkriptase-Reaktion insofern, als die DNA-abhängige RNA-Polymerase an diesen Stellen nicht über die RNA-Matrize hinweg ablesen konnte und die Polymerisierungsreaktion an diesen Stellen abbrach. Das Ergebnis waren unvollständige Sequenzinformationen, wie im Falle der 5'-RACE bestätigt wurde. Die neu ermittelten Nukleotide reichen nur bis zur ersten kritischen GC-reichen Region im Basenbereich 378.

Der außergewöhnlich hohe GC-Gehalt innerhalb der ersten 380 Basen von über 70% war offensichtlich auch der Grund für erschwerte PCR-Bedingungen, die sich neben der TD-PCR auch im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigten. Nur wenige DNA-Polymerasen sind in der Lage über diese Matrizensequenz hinweg einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren (siehe 4.2.2.3 mit Abbildung 38).

Wie in der in Abbildung 35 dargestellten Sequenz zu erkennen, ist dem *SbHNL*-Gen eine sog. Leadersequenz vorgelagert.

284	H P T P E C T E V W N K A L A E Q G	301
865	CAC CCC ACG CCG GAG TGC ACC GAG GTG TGG AAC AAG GCC CTG GCA GAG CAA GGC	918
302	N I N P Y T I Y T P T C D R E P S P	319
919	AAC ATC AAC CCC TAC ACC ATC TAC ACG CCC ACG TGC GAC AGG GAG CCC AGC CCG	972
320	Y Q R R F W A P H G R A A P P P L M	337
973	TAC CAG CGC AGG TTC TGG GCG CCC CAC GGC CGC GCA GCC CCA CCA CCA TTG ATG	1026
338	L P P Y D P C A V F N S I N Y L N L	355
1027	CTG CCC CCC TAC GAC CCC TGC GCA GTC TTC AAC TCC ATC AAC TAC TTG AAT CTC	1080
356	P E V Q T A L H A N V S G I V E Y P	373
1081	CCC GAG GTG CAA ACG GCC TTA CAT GCC AAT GTC AGC GGC ATC GTA GAG TAC CCA	1134
374	W T V C S N T I F D Q W G Q A A D D	391
1135	TGG ACT GTA TGC AGC AAT ACC ATA TTT GAT CAG TGG GGA CAG GCA GCC GAT GAC	1188
392	L L P V Y R E L I Q A G L R V W V Y	409
1189	CTG CTA CCC GTC TAT AGG GAG CTC ATT CAA GCT GGA CTC AGG GTC TGG GTC TAC	1242
410	S G D T D S V V P V S S T R R S L A	427
1243	AGT GGT GAC ACA GAC AGT GTA GTG CCG GTG AGT TCG ACC AGG CGC TCT CTT GCC	1296
428	A L E L P V K T S W Y P W Y W A P T	445
1297	GCC CTG GAG CTT CCT GTT AAA ACT AGC TGG TAC CCA TGG TAC ATG GCC CCA ACC	1350
446	E R E V G G W S V Q Y E G L T Y V S	463
1351	GAG CGC GAG GTT GGT GGC TGG AGT GTG CAG TAT GAA GGC CTG ACC TAT GTC TCA	1404
464	P S G A G H L V P V H R P A Q A F L	481
1405	CCG TCC GGC GCC GGG CAC TTG GTT CCT GTG CAC CGT CCG GCA CAG GCG TTC CTC	1458
482	L F K Q F L K G E P M P A E E K N D	499
1459	CTG TTC AAG CAA TCC CTC AAG GGC GAA CCC ATG CCG GCC GAG GAA AAG AAT GAC	1512
500	I L L P S E K A P F Y *	511
1513	ATC CTC CTT CCT AGT GAG AAG GCT CCC TTC TAC TGA GCA GGG GAG CAC CTG TGC	1566
1567	GGC.....AAA AAA AAA.....	2259

Abbildung 35: Sequenz der SbHNL

Kursiv: gesuchter N-Terminus

Grau unterlegt: GC-reiche Regionen

Unterstrichen: Homologe Bereiche, die stabile Sekundärstrukturen ausbilden können

Rot: Durch 5'-RACE ermittelte Sequenz

Blau: Signalsequenz bzw. Leaderpeptid

Gelb: Linkersequenz

Grün: Sequenzierter N-Terminus

Dunkelgrün: Sequenzbereich der degenerierten Primer

Mit PSORT [Computer program for the prediction of protein sorting signals and localisation sites in amino acid sequences unter ExPasy-Tools] wurde überprüft, ob dieses translatierte Propeptid eine in Zellkompartimente dirigierende Signalsequenz beinhaltet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 51,5 % wurde eine Sequenz zum Transport der *SbHNL* in Chloroplasten postuliert (Bannai et al. 2001). Das von Claros et al. (1997) beschriebene Signalsequenz-Muster für Chloroplasten-Proteine stimmt insofern mit der *SbHNL*-Leadersequenz überein, als die ersten beiden Aminosäuren in fast allen Fällen aus Methionin und Alanin bestehen und eine große Anzahl hydroxylierter Reste [meist Serin, aber auch Threonin] vorkommen. Immunologische Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der *SbHNL* gaben schon Hinweise auf ihr Vorkommen in Zellorganellen und im Cytoplasma (Wajant et al., 1994). Die *SbHNL* galt lange Zeit als ein cytosolisches Enzym (Kojima et al., 1983). Dies steht aber nun im Widerspruch zu seiner nachgewiesenen Glykoylierung und der ihm vorgelagerten Leadersequenz.

Nach einer weiteren Untersuchung mit SignalP (prediction of signal peptide cleavage site) wurde die Spaltstelle des Propeptids für das Signalpeptid beruhend auf der (3,-1)-Regel [kleine und neutrale Aminosäure in Position -3 und -1 relativ zur Spaltstelle] zwischen G46 und S47 bestimmt (Nielsen et al., 1997 und 1999).

Auffallend ist der stark hydrophobe Bereich innerhalb der Aminosäuren 24-45, hervorgerufen durch Alanin, Valin und Leucin-Seitenketten, die auf eine Membranassoziation schließen lassen können. Ungewöhnlich sind auch die repetitiven Sequenzbereiche bestehend aus 7 aufeinanderfolgenden Threonin- bzw. 6 Alanin-Resten. Dem klassischen Muster eines Signalpeptid, bestehend aus einer positiv geladenen N-terminalen Region, gefolgt von einer hydrophoben Kernregion und einer abschließenden neutralen aber polaren C-terminalen Region entspricht die *SbHNL*-Leadersequenz nicht konsequent. Dennoch wurden die Aminosäuren 11 bis 46 dieses Propeptids mit einer Wahrscheinlichkeit von 68,5% als Signalsequenz identifiziert (Nielsen et al., 1997).

Ein Vergleich verschiedener Signalsequenzen zum Transfer bestimmter Proteine in das Thylakoidlumen zeigte eine Übereinstimmung hinsichtlich Lage und Länge der stark hydrophoben Region zur Spaltstelle einer membrangebundenen TPP (thylakoidal processing peptidase), welche nach oben genannter (-3,-1)-Regel nach Translokation spaltet (Howe & Wallace, 1990; Robinson & Klösgen, 1994).

Ein weiteres Indiz, welches für eine Lokalisation der *SbHNL* in den Chloroplasten sprechen könnte, ist der dem pH-Optimum der Lyasereaktion entsprechende relativ niedrige pH-Wert von 5,0 innerhalb des Thylakoidlumens.

Jedoch ungeachtet dessen, kann das Propeptid auch für korrekte Faltungsprozessen von Bedeutung und sogar notwendig sein (Baker et al., 1993; Ramos et al., 1994). Im Falle der *HbHNL* kann der hydrophobe N-terminale Bereich die Konformation einer β -Faltblattstruktur annehmen und eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten begünstigen (Hasslacher et al., 1996).

Ein weiteres Charakteristikum des *SbHNL*-Vorläuferproteins ist dessen Linkerpeptid bestehend aus den Aminosäuren 319-337, dessen Spaltung die Reifung der 33kDa grossen (AS 61-319) und 23 kDa kleinen (AS 335-512) Untereinheit bewirkt.

Eine konkrete Spaltstelle ist nicht zu bestimmen, weil die interne Sequenz mehrere Erkennungsregionen für Endoproteasen bietet. Die meisten endoproteolytischen Spaltprozessen von inaktiven Precursor-Proteinen verlangen ein Motiv von zwei basischen Resten der Aminosäuren Lysin bzw. Arginin in der Form (Lys/Arg)-X_n-(Lys/Arg), mit n= 0,2,4,6 (Seidah & Chrétien, 1997). Prolinreste in direkter Nachbarschaft wurden beobachtet, vermutlich um die Peptidkette für den Angriff einer Endoprotease in Position zu bringen (Andrews et al., 1987). Demzufolge könnte eine Spaltung zwischen R322 und R323 oder aber zwischen R323 und R330 stattfinden (Abbildung 35). Eine proteolytische Spaltung muss aber nicht unbedingt von gegebenen Consensussequenzen abhängig sein, sondern kann auch strukturell bedingt veranlasst werden. Deshalb sind Prolin-Motive, vermutlich aufgrund einer exponierten Faltungsstelle in der Polypeptidkette, für einen Angriff von Prolylendopeptidasen prädestiniert (Vanhoof et al., 1995). Drei hintereinanderliegende Prolinreste sind in der internen Region der *SbHNL* zu finden und könnten den Ort der Spaltung bestimmen. Jedoch gleich an welcher Stelle definitiv endoproteolytisch in große und kleine Untereinheit getrennt wird, in jedem Fall haben nachfolgend Exopeptidasen die korrekten N- bzw. C-terminalen Enden der beiden Peptidketten prozessiert. Der C-Terminus der 33kDa-Untereinheit kann durch den Sequenzvergleich mit der verwandten SCP aus Weizen vermutet werden (Abbildung 35).

Die bereitgestellte cDNA-Sequenz der *SbHNL* war die Voraussetzung zur daraufhin angestrebten rekombinanten Expression des Enzyms.

4.2.2 Klonierung und Expression der *SbHNL* in *P. pastoris*

Die proteolytischen Prozessierungen sind neben der korrekten Ausbildung zweier Disulfidbrücken und einer Glykosylierung beider Untereinheiten als posttranslationale Modifikationen für eine Expression in rekombinaten Mikroorganismen von Bedeutung und z.T. sogar notwendig.

Für die durch Jansen et al. (1992) bestimmten zwei Disulfidbrücken wurde eine essentielle Funktion in Bezug auf Enzymstabilität und -aktivität nachgewiesen (Juchem, 1996). Die Glykosylierung der *SbHNL* ist jedoch nicht unbedingt zur Entfaltung ihrer katalytischen Fähigkeiten notwendig. Dies zeigten Experimente nach einer partiellen und reversiblen Denaturierung des Enzyms mit Guanidiniumhydrochlorid zur Abspaltung der Kohlenhydratkette der 33 kDa-Untereinheit (Juchem, 1996). Eine Deglykosylierung unter nativen Bedingungen war aus vermutlich sterischen Gründen [Glykosylierungsstelle im Inneren der Proteinstruktur] nicht möglich (Wajant & Mundy, 1993). Wurde die glykosylierte *SbHNL* jedoch mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und die N-Glykosidase F (NGF) während der Rückfaltung des Enzyms zugesetzt, konnten die glykosidischen Reste vollständig entfernt und die enzymatische Aktivität wiedergewonnen werden. Gleiche Experimente zeigten aber auch, dass der Einfluss einer Glykosylierung auf Faltung und Stabilität nicht unerheblich ist. Nach reversibler Denaturierung der *SbHNL* mit β -Mercaptoethanol unter gleichzeitiger Inkubation mit NGF war ein Wiedererlangen der ursprüngliche Enzymaktivität nicht möglich (Wajant, 1993).

Aufgrund dieser äußerst komplexen und weitestgehend relevanten posttranslationalen Prozessierungen, ist nur der Versuch einer heterologen Expression in eukaryotischen Wirtszellen sinnvoll. Bakterielle Systeme sind insbesondere zu Glykosylierungen und korrekten proteolytischen Prozessierungen nicht in der Lage und die Ausbildung von Disulfidbrücken kann von ihnen nicht gewährleistet werden. Als eukaryotisches Wirtssystem zur funktionellen Expression einer aktiven rekombinaten *SbHNL* wurde die Hefe *P. pastoris* gewählt. Ihre relativ gut erforschten genetischen Manipulationsmöglichkeiten, der hohe erreichbare Expressionslevel aufgrund des sehr starken AOX-Promotors, die beträchtliche Toleranz an Fremdprotein und die geringe endogene Proteinsekretion machen *Pichia* zum Expressionssystem der Wahl (Faber et al., 1995; Sreekrishna et al, 1997; Hollenberg & Gellissen, 1997; Cereghino & Cregg, 1999 und 2000).

4.2.2.1 Klonierung der *SbHNL*-cDNA in *Pichia*-Expressionsvektoren

Da die 56 N-terminalen Aminosäuren neben ihrer Bedeutung für ein Proteintargeting auch für die korrekte Faltung des Enzyms wichtig sein können, wurde das *SbHNL*-Gen sowohl mit als auch ohne Leader-Sequenz in die methanol-induzierbaren *Pichia*-Vektoren pPICZB und pPICZ α C [Invitrogen] kloniert. Die Klonierung erfolgte weitgehend mit den Komponenten des EasySelect™ *Pichia* Expression Kit [Invitrogen] und die Strategie ist in Abbildung 36 schematisch dargestellt.

Der Vektor pPICZB veranlasst die intrazelluläre Synthese der *SbHNL*, während pPICZ α C über den α -Faktor der Hefe *S. cerevisiae* für die Sekretion des Enzyms verantwortlich ist. B und C bezeichnen jeweils einen der drei möglichen Leserahmen. Die beiden Expressionsplasmide pPICZB und pPICZ α C generieren neben einem C-terminalen Hexahistidin-Rest zur vereinfachten Aufreinigung ein sog. c-myc Epitop, welches zur Detektion des Fusionsproteins mit c-myc-Antikörpern genutzt werden kann. Beide Shuttle-Vektoren besitzen einen Zeocin-Resistenz-Marker, der sowohl zur Selektion in *E. coli* als auch in *P. pastoris* befähigt.

Nach Elektroporation und Vermehrung der Ligationsprodukte in *E. coli* wurden die Konstrukte auf ihre Sequenz und „in frame“- Insertion hin überprüft.

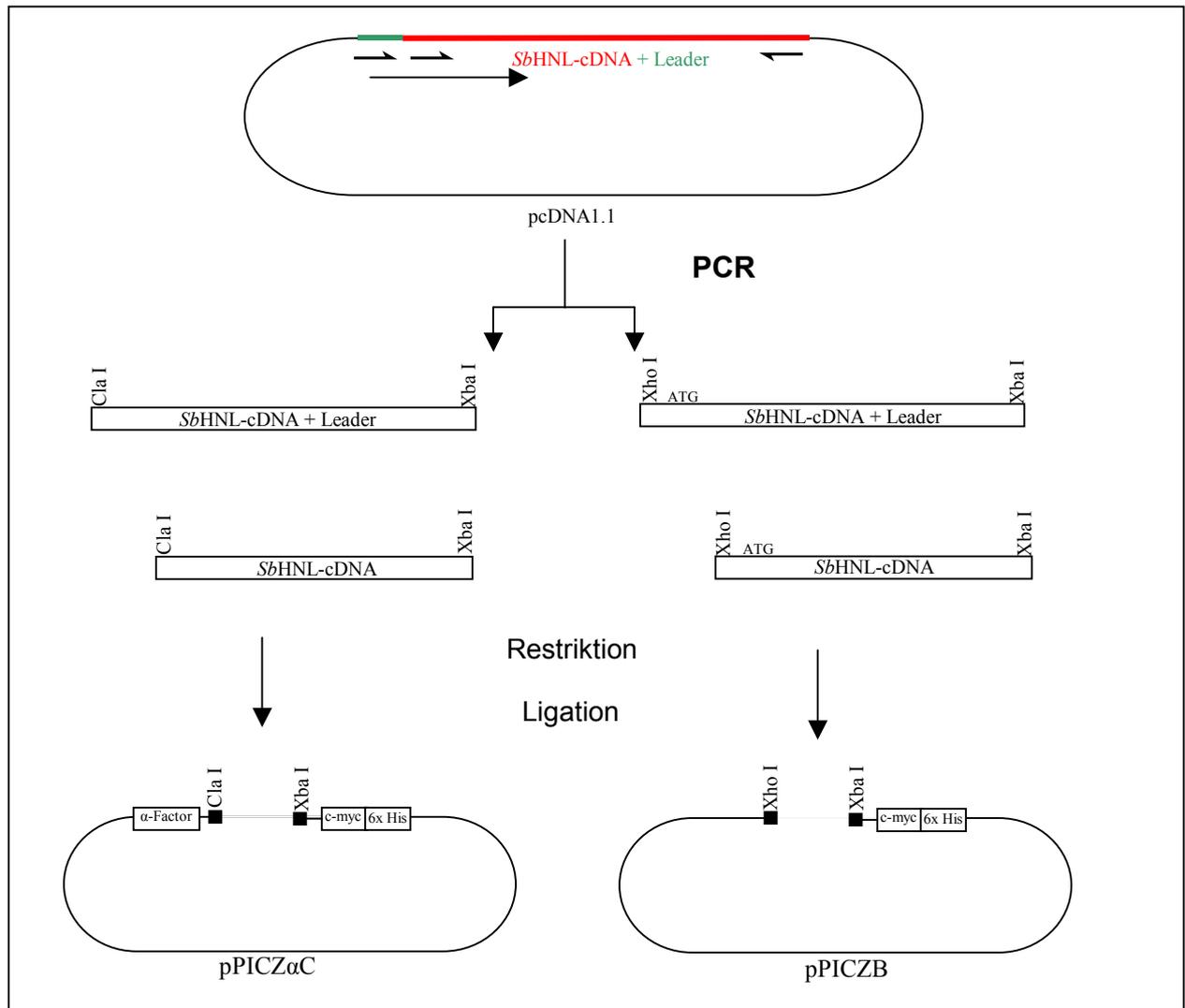


Abbildung 36: Schema zur Klonierung der *SbHNL*-cDNA in die *Pichia*-Expressionsvektoren *pPICZα* (sektretorisch) und *pPICZB* (intrazellulär)

Die cDNA wurde mittels PCR mit den 5'-Primern PICZα-Soxy-NIICla [N-terminaler Primer für Klonierung ohne Leader-Sequenz] bzw. PICZα-Soxy-NICla [N-terminaler Primer für Klonierung mit Leader-Sequenz] und dem 3'-Primer PICZα-Soxy-CXba [C-terminaler Primer] zur Klonierung in den sekretorischen Vektor *pPICZαC* amplifiziert. An beiden cDNA-Enden wurden Restriktionsstellen [N-terminal *Cla* I und C-terminal *Xba* I] zur Klonierung in das Expressionsplasmid angefügt. Die Amplifikate wurden nach Restriktion mit den Enzymen *Cla* I und *Xba* I in den mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten Expressionsvektor ligiert.

Die Klonierung der *SbHNL* in das Plasmid *pPICZB* zur intrazellulären Expression erfolgte ebenfalls per PCR. Mit den 5'-Primern PICZB-Soxy-NXho [N-terminaler Primer für Klonierung mit Leader-Sequenz] bzw. PICZB-Soxy-NIIXho [N-terminaler Primer für Klonierung ohne Leader-Sequenz] und dem 3'-Primer PICZB-Soxy-Xba [C-terminaler Primer] wurde die cDNA amplifiziert und über die Restriktionsstellen *Xho* I und *Xba* I in den Expressionsvektor *pPICZB* kloniert.

4.2.2.2 Transformation von *P. pastoris* mit *SbHNL*-cDNA

Im Anschluss an die Klonierung in *E. coli* erfolgte die Transformation von *P. pastoris* sowohl mit circulärer Plasmid-DNA (100 µg) als auch mit linearisierten Plasmiden, nachdem jeweils 10 µg DNA durch die Endonuclease *Pme* I restringiert wurde. Dazu wurden die Konstrukte in verschiedene kompetente *Pichia*-Stämme durch LiCl-Transformation mittels Hitzeschock (Ito et al., 1983) oder Elektroporation (Becker & Guarente, 1991) transferriert. Als Wirtsorganismen dienten die Histidin-auxotrophen *P. pastoris*-Stämme GS115, KM71 sowie der Wildtyp-Stamm X33.

Nach Transformation mit circulärer DNA wurden keine Zeocin-resistenten Klone detektiert. Die Plasmid-DNA ist wegen nicht vorhandener autonom replizierender Sequenzen zur Entfaltung der Resistenz auf eine Intergration ins Genom angewiesen. Obwohl die zur DNA-Aufnahme kompetenten *Pichia*-Zellen leichter circuläre als lineare DNA aufnehmen, werden jedoch für den Rekombinationsvorgang freie homologe DNA-Enden bevorzugt. Dies wiederum macht eine Integration circulärer DNA weniger wahrscheinlich (Sreekrishna & Kropp, 1996). Demgegenüber war die Transformation der verschiedenen *Pichia*-Stämme mit linearisierter DNA, insbesondere mit der Hitzeschock-Methode nach LiCl-Kompetenz erfolgreich.

4.2.2.3 Screening auf heterologe Expression der *SbHNL*-cDNA

Die das beste Wachstumsverhalten aufweisenden Zeocin-resistenten Transformanten wurden auf funktionelle Expression gescreent, wobei primär auf Enzymaktivität hin untersucht wurde. Dazu wurden die Transformanten in dem die Genexpression reprimierenden Medium BMGY angezogen und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 in das die Expression induzierende, methanolhaltige BMMY-Medium überführt. Nach unterschiedlicher Wachstumsdauer (8-30 h) wurden die Zellen geerntet und im Falle des sekretorischen Systems wurden die Enzyme im Kulturmedium in 50 mM KPi, pH 7,5, umgepuffert bzw. die Zellen bei intrazellulärer Expression in gleichem Puffer aufgeschlossen.

Es konnte nur im sekretorischen Ansatz beim Konstrukt ohne Leadersequenz eine schwache Lyaseaktivität nach 30h Induktionsdauer nachgewiesen werden. Die weitere Untersuchung der Transformanten erfolgte immunologisch über einen Nachweis der *SbHNL*-Synthese mittels polyklonaler Antikörper gegen die große [33kDa]-Untereinheit der *SbHNL*. Auch hier zeigten nur die Transformanten des sekretorischen Expressionansatzes mit der *SbHNL*-cDNA ohne Leaderpeptid ein eindeutiges Chemolumineszenz-Signal bei ca. 66 kDa im Western Blot (Abbildung 37).

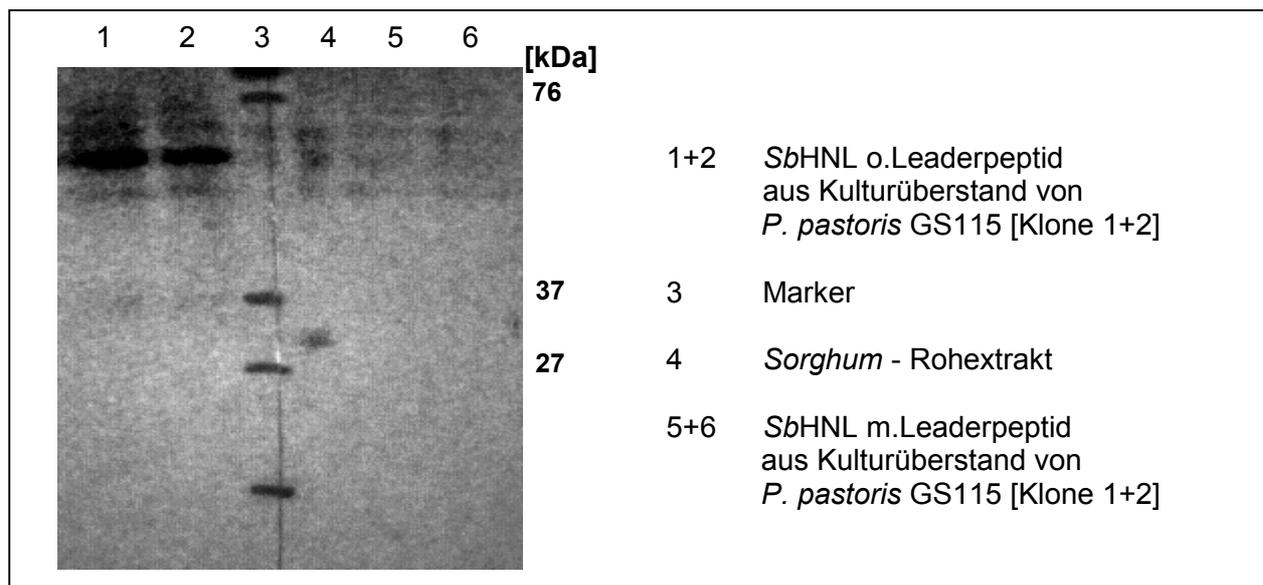


Abbildung 37: Western Blot der Kulturüberstände verschiedener *Pichia*-Transformanten nach 30 h Induktionsdauer
[immunologischer Nachweis mit polyklonalen Antikörpern gegen die 33 kDa-Untereinheit; Antiserum 1:5000 verdünnt; Detektion der Chemolumineszenz mit 50% Verstärkerleistung am Luminographen]

Dies war der erste Hinweis auf eine Expression der *SbHNL*-cDNA als nicht proteolytisch gespaltenes Präprotein. Die Diskrepanz zwischen dem zu erwartenden Molekulargewicht des Präproteins [58,25 kDa, vgl. Abbildung 32] mit c-myc-Epitop und Hexahistidin-Rest [2,75 kDa] von 61 kDa und dem apparenten Molekulargewicht berechnet mit 66 kDa, kann auf eine verstärkte Glykosylierung zurückzuführen sein. Dieses Phänomen wird in Kapitel 4.2.2.4 noch ausführlich diskutiert.

Die fehlende Nachweise der weiteren Ansätze im Western Blot können in einer erfolglosen oder falsch lokalisierten Integration der Plasmid-DNA ins Genom, einem intrazellulären Abbau nach inkorrekt Faltung oder aber einem fehlgesteuerten Targeting und daraus resultierendem proteolytischem Abbau begründet sein.

Die Expression des *SbHNL*-Präproteins wurde nach Überprüfung der Transformanten auf eine Integration der heterologen DNA ins *Pichia*-Genom mittels PCR-Analyse bestätigt.

In Abbildung 38 ist das PCR-Produkt unter Verwendung von genomischer *Pichia*-DNA als Templat und unter Einsatz der Primer homolog zum α -Faktor sowie zur 3'AOX-site dargestellt. Zur Größe der *SbHNL*-cDNA ohne Leader-Sequenz von 1,35 kb müssen die Basen der Expressionskassette von 0,25 kb addiert werden. Dies ergibt ein Molekulargewicht von 1,6 kb und entspricht der Größe der amplifizierten DNA in Abbildung 38. Außerdem ist die Bildung eines PCR-Produktes mit dem α -Faktor-Primer nur nach erfolgreicher Integration des Konstruktes ins *Pichia*-Genom möglich. Die Sequenzierung des Amplifikats ergab die korrekte Basenfolge der *SbHNL*-cDNA. Die Amplifikation gelang jedoch nur mit der Herculase [Stratagene], weil diese in der Lage ist über die GC-reichen Regionen der *SbHNL*-cDNA hinweg zu polymerisieren. Die *Pfu*-Polymerase [Promega] bildet im gleichen PC-Reaktionsansatz nur ein sehr schwaches Produkt (siehe 4.2.1.4).

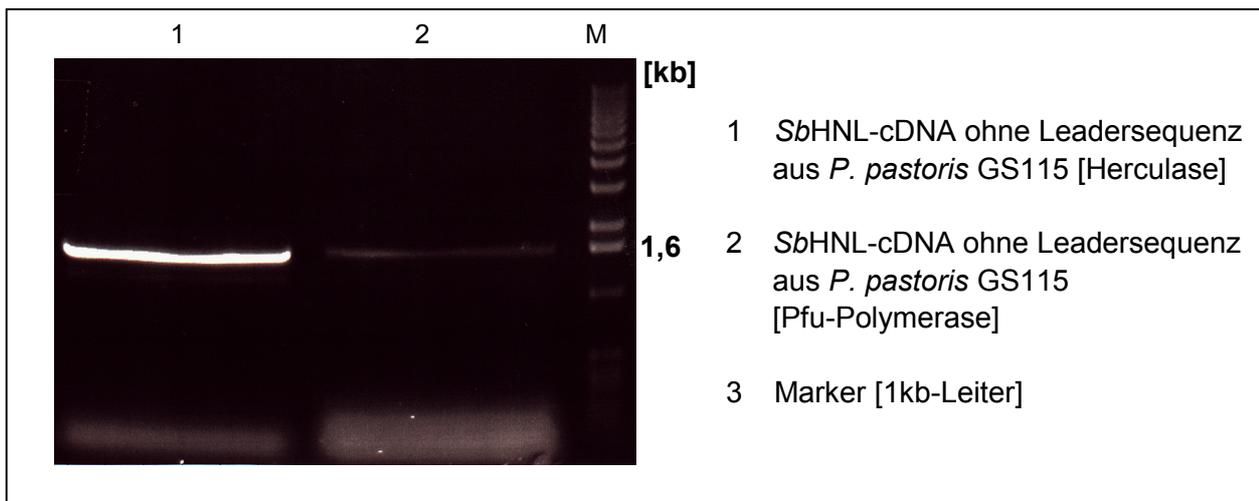


Abbildung 38: Nachweis der Integration der *SbHNL* in das *Pichia*-Genom mittels PCR unter Verwendung zweier verschiedener DNA-Polymerasen
 [1 μ g genomische DNA als Templat, Annealingtemperatur: 58°C, Polymerisierungstemperatur: 68°C (Herculase) bzw. 72°C (*Pfu*-Polymerase)]

4.2.2.4 Analyse des sekretorischen Expressionssystems der recSbHNL ohne Leaderpeptid

Die weiteren Arbeiten erfolgten mit dem sekretorischen Konstrukt ohne Leadersequenz, da dieses im ersten und weiteren Ansätzen eine Expression der SbHNL-cDNA zeigte. Außerdem ist für die Expression eines glykosylierten und in ein pflanzliches Zellorganell dirigierten Proteins das sekretorische System zu bevorzugen (Romanos et al., 1992). Darüberhinaus bildet *P. pastoris* nur einen geringen Anteil an extrazellulären Proteinen, die eine Aufreinigung des rekombinanten Enzyms erleichtern würden (Cereghino & Cregg, 1999). Aus diesen Gründen wurden die sekretierenden Transformanten des *Pichia*-Stammes GS115, welcher das beste Wachstumsverhalten auf zeocinhaltigem Medium zeigte, weiter untersucht. Sinnvollster Ansatz war eine Verlängerung der Induktionsdauer von 30 h auf 5 d, um unter Umständen die noch nicht initiierte proteolytische Spaltung zu ermöglichen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Spaltung des Präproteins nur im sauren Milieu stattfinden kann, weil dort die dafür notwendige Proteasen ihre volle Aktivität entfalten können. Eine Messung des pH-Werts während der Kultivierung ergab, dass dieser in gepuffertem Komplexmediums nach 96 h auf 4,5 sinkt. Deshalb erfolgte die Anzucht, unter täglicher Methanol-Supplementierung aufgrund seines Abbaus als C-Quelle, über einen Zeitraum von 120 h. Die Anzucht in ungepuffertem Komplexmedium zeigte nach 96 h bei einem pH-Wert von 2,3 kein aktives Enzym mehr.

Nach Umpufferung und Aufkonzentrierung des Kulturüberstands wurden die Aktivitätswerte nach jeweils einem Tag bezogen auf 100 ml Kulturmedium ermittelt (Abbildung 39). Auf die Angaben einer spezifischen Aktivität wurde an dieser Stelle verzichtet, da durch eintretende Zellyse kein relevanter Proteingehalt bestimmt werden konnte.

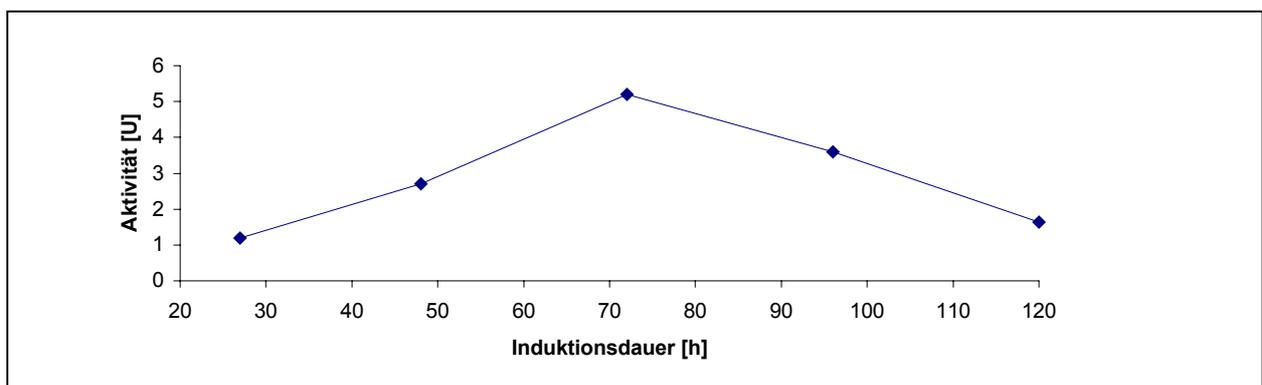


Abbildung 39: Volumenaktivität der recSbHNL aus *P. pastoris* GS115 nach Langzeitinduktion bezogen auf 100 ml Kulturüberstand

Anhand der Aktivitäten ist zu erkennen, dass es nach einer Steigerung der Enzymaktivität über die ersten drei Tage hinweg nach 96 h zu einem Absinken der Volumenaktivität kommt. Dies kann möglicherweise neben einem Abbau durch extrazelluläre Proteasen, insbesondere Exopeptidasen, auch an einer Inaktivierung bzw. Denaturierung aufgrund der Inkubation bei 30°C während der Kultivierung über einen relativ langen Zeitraum liegen. Die Aktivitätszunahme innerhalb der ersten drei Tage kann als Folge der proteolytischen Spaltung des Enzyms in aktive große und kleine Untereinheiten und/oder der kontinuierlichen Synthese und Sekretion der recSbHNL begründet werden. Die Spaltung des Präproteins scheint nicht unbedingt zur Generierung einer Grundaktivität notwendig zu sein. Ob sie jedoch nicht zur Entfaltung des vollen Aktivitätspotentials notwendig ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Wie im Homologiemodell zu erkennen, liegen die Aminosäuren der potentiellen Proteolysestelle R318 und P343 zwar nach Spaltung in räumlicher Nähe, so dass das Linkerpeptid die aktive Konformation zwar behindern, aber nicht unbedingt verhindern kann (Abbildungen 40 und 43). Eine daraus resultierende Aktivitätseinschränkung ist jedoch denkbar. Außerdem kann es zu einer eingeschränkten Substratbindung kommen, da das Linkerpeptid zum aktiven Zentrum und zur Substratbindungstasche hingewandt liegt (siehe 4.2.3.3).

Eine Western Blot-Analyse des 48-stündig induzierten Kulturüberstandes nach Antikörperreaktion gegen die große Untereinheit der SbHNL zeigt neben der 66 kDa-Bande das Auftauchen einer ca. 33,5 kDa großen Bande (Abbildung 40).

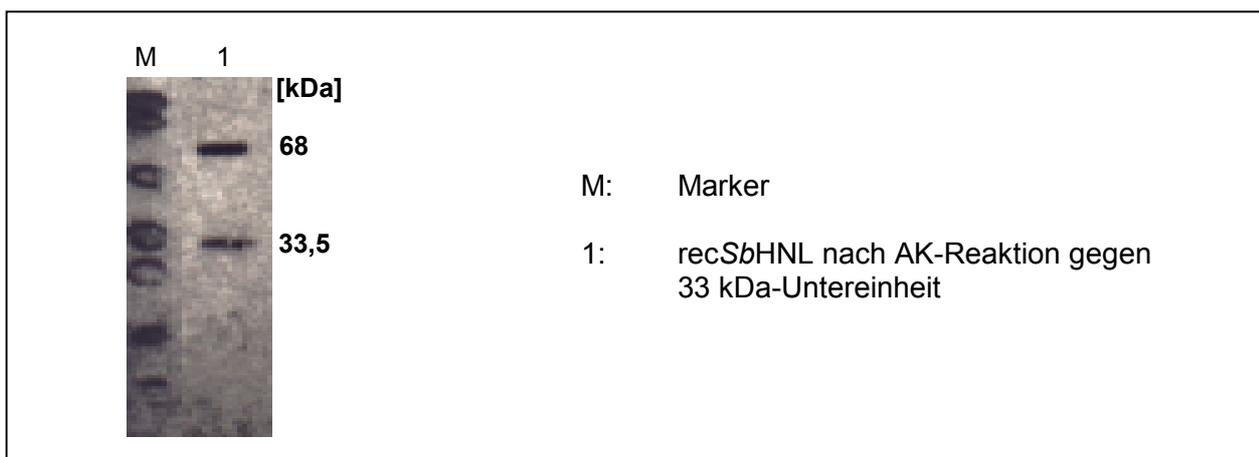


Abbildung 40: Western Blot des Kulturüberstands der Transformante SbHNL ohne Leadersequenz in *P. pastoris* GS115 nach 48h Methanolinduktion.

Das Ergebnis zeigt, dass das Präprotein nur teilweise proteolytisch gespalten wird, während die größere Enzymmenge noch unprozessiert vorliegt. Da die Detektion nur mit dem polyklonalen Antikörper gegen die 33 kDa-Untereinheit gerichtet war, ist die 23 kDa-Untereinheit nicht zu erkennen. Eine effiziente Spaltung des Linkerpeptids, insbesondere während des sekretorischen Transportes, ist offensichtlich nicht möglich. Dies kann nun verschiedene Ursachen haben. Entweder fehlt *P. pastoris* intrazellulär die dafür spezifische Protease oder aber diese kann ihre Aktivität nicht vollständig entfalten. Ein Grund für letzteres könnte eine mögliche Hyperglykosylierung des *SbHNL*-Vorläufers sein. Die *SbHNL* weist in ihrer nativen Form jeweils eine N-Glykosylierungsstelle pro Untereinheit auf (Abbildung 41). Von *P. pastoris* werden insbesondere sekretorischen Proteinen Zuckerreste des high-mannose Typs mit im Durchschnitt 8-14 Mannose-Resten über die Amidgruppen von Asparaginseitenketten im Motiv Asn-Xaa-Thr/Ser angelagert (Bretthauer & Castellino, 1999). Dieses Grundgerüst entspricht auch dem Glykosylierungsmuster pflanzlicher Glykoproteine (Lerouge et al., 1998). Jedoch wurden in *Pichia* neben weiteren Anlagerungen von (α 1-6)-Mannosebausteinen an die (α 1-3)-verknüpfte Core-Struktur auch O-Glykosylierungen beobachtet (Gemmill & Trimble, 1999). Eine Untersuchung der *SbHNL* auf mögliche O-Glykosylierungsstellen über Serin- und Threoninreste mittels NetOGlyc Prediction [www.cbs.dtu.dk] bestimmte neben S178, S423 und S424 auch T289 als potentielle Stellen, an welchen über die OH-Seitenketten der beiden Aminosäuren (α 1-2)-Mannose-Reste der pentameren Form angelagert werden können (Duman et al., 1998; Christlet & Veluraja, 2001). Diese möglichen Hyperglykosylierungen könnten sowohl eine proteolytische Spaltung behindern als auch die Konformation des aktiven Zentrums stören. Letzteres wegen der räumlichen Nähe der Reste S423 und S424 zur katalytischen Triade im Homologiemodell.

Desweiteren kann die dafür notwendige intrazelluläre Protease aber auch völlig fehlen. Die bisher in Hefen beschriebenen Proteasen befinden sich hauptsächlich in deren Vakuole (van den Hazel et al., 1996). Neben der Carboxypeptidase Y sind u.a. Proteinase A und B sowie die Aminopeptidase Y dort lokalisiert. Sie durchlaufen wie die extrazellulären Proteasen den sekretorischen Pathway.

Nach deren Faltung und Glykosylierung im Endoplasmatischen Reticulum werden weitere Prozessierungen im Golgi-Apparat vorgenommen. Die vakuolären Proteine werden dann über Endosomen in deren Bestimmungsort dirigiert, während die sekretorischen Proteasen mittels des Vesikeltransportes zur Plasmamembran geleitet werden (van den Hazel et al., 1996).

Da die Exo- und Endoproteasen der Vakuole i.d.R. erst dort proteolytisch aktiviert werden, ist es wahrscheinlicher, dass zu Beginn der Kultivierung nur extrazelluläre Proteasen für eine Prozessierung der *SbHNL* in Frage kommen. Offensichtlich sind aber auch diese nicht zu einer effektiven Prozessierung in der Lage. Man kann vermuten, dass bei fortgeschrittener Kultivierungsdauer die vakuolären Proteasen infolge einer einsetzenden Zellyse einen Teil der proteolytischen Spaltung bewerkstelligen, jedoch offensichtlich nicht vollständig. Der Versuch die Prozessierung des Präproteins mit *Sorghum*-Rohextrakt herbeizuführen, konnte aufgrund des relativ hohen Hintergrundes der *Sorghum* eigenen HNL nicht eindeutig ausgewertet werden.

Neben der ineffizienten proteolytischen Prozessierung und der Hyperglykosylierung ist auch die Expressionsrate der *recSbHNL* bisher nicht befriedigend. SDS-Gel-Analysen zeigten keine Überexpression des Enzyms (ohne Abbildung). Obwohl *P. pastoris* zur Sekretion von Proteinen mit vergleichbarer Größe zum *SbHNL*-Präprotein prinzipiell in der Lage ist, kann ein vollständiger Transport durch die Plasmamembran nicht gewährleistet werden. Dies zeigte z.B. der Versuch, die *HbHNL* in *P. pastoris* und *S. cerevisiae* auf dem sekretorischen Weg zu exprimieren. Es konnte kein Enzym im Kulturüberstand nachgewiesen werden, weil es die Plasmamembran möglicherweise wegen einer kryptischen „Stop-Transfer“-Sequenz nicht passieren konnte (Haslacher et al., 1997). Demgegenüber ist die sekretorische Expression der *SbHNL* nicht vollständig blockiert. Außerdem konnte das Enzym nicht über IMAC an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden.

Ein Vergleich des höchsten Aktivitätswerts von 5,2 U/100ml Kulturüberstand mit der Aktivitätsausbeute aus *Sorghum bicolor* besagt, dass 110 g Pflanzenmaterial der Anzucht einer 2 l *Pichia*-Kultur über 72 h Methanolinduktion entsprechen.

Man kann in diesem Falle nicht von einem verwertbaren Expressionssystem sprechen. Aus diesem Grund wurde auch von weiteren Untersuchungen hinsichtlich Hyperglykosylierung, proteolytischer Spaltung und Expressionsoptimierung abgesehen. Darüberhinaus erwies sich der *Pichia*-Selektionsmarker Zeocin als instabil, was die Untersuchungen zusätzlich erschwerte.

Diese Ergebnisse zur Expression der recSbHNL in *P. pastoris* zeigen die Schwierigkeiten bei komplexen posttranslationalen Prozessierungen in Fremdorganismen auf. Schmidt & Griengl (1999) beurteilten mit aus diesem Grund die rekombinante Expression der SbHNL als in naher Zukunft nicht möglich.

Die folgenden Untersuchungen zu den Verwandtschaftsverhältnissen zwischen der HNL aus *Sorghum* und der Serin-Carboxypeptidase II aus Weizen [CPII-W] wurden daher mit homogen aufgereinigtem Wildtyp-Enzym durchgeführt.

4.2.3 Homologieuntersuchungen der SbHNL zu den Serin-Carboxypeptidasen

4.2.3.1 Homologie der Primärsequenzen

Der Vergleich der Primärstrukturen von SbHNL und der Serin-Carboxypeptidase II [CPII-W] aus *Triticum vulgare* [Weizen] in Abbildung 41 zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 73% bzw. 57% identische Aminosäuren (gelb).

Ebenso wie die an den Disulfidbrücken beteiligten Cysteinreste (blau) sind die potentiellen Glykosylierungsstellen über Asparaginseitenketten (grün) konserviert.

Deshalb ist es wenig überraschend, dass die SbHNL und die CPII-W auch hinsichtlich ihrer Quartärstruktur ausgeprägte Übereinstimmungen zeigen. Beide Enzyme bilden in ihrer nativen Struktur ein glykosyliertes Heterotetramer und weisen ein für die meisten hydrolytischen Enzyme typisches Faltungsmuster auf: die α/β -Hydrolase Faltung.

Sb-HNL 1	MAVFISSSGSPGRATATTTTTTTTTLLAVLAAAAAAGLLLAPVAARGSPPE
	A
Sb-HNL 51	HDKQLQLQQQEDDRIPGLPGQPNGVAFGMYGGYVTIDDNNGRALYYWF
CPDII-W 1	PSGHAADRRIARLPGQP-AVDFMYSGYITVDEGAGRSIFYLL
	+ + + + +
Sb-HNL 99	QEADTADPAAAPLVLWLNNGPGCSSIGLGAMQELGPFVRVHTNGESLLLN
CPDII-W 48	QEA-PEDAQPAPLVLWLNNGPGCSSVAYGASEELGAFRVKPRGAGLVLN
	+ + +
Sb-HNL 148	EYAWNKAANILFAESPAGVGFYSYNTSSDL-SMGDDKMAQDITYTFLVKW
CPDII-W 97	EYRWNKVANVLFLDSPAGVGFYSYNTSSDIYTSGDNRTAHDSYAFLAKW
	+ + + + + + + +
Sb-HNL 197	FERFPHYKYREFYIAGES--GHFIPQLSQVVYRNRNNSPFINFQGLLV
CPDII-W 146	FERFPHYKYRDFYIAGESYAGHYVPELSQLVHRSKN--PVINLKGFMVG
	+ + + + + + + +
Sb-HNL 246	SGLTNDHEDMI-MFESWWHGLISDETTRDSGLKVCPGTSFMHPTPECTE
CPDII-W 195	NGLIDDYHDYVGTFFFWNHGIVSDDTYRRLKEACLHDSFIHPSACDA
	+ + + + + + + +
Sb-HNL 295	VWNKALAEQGNINPYTIYTPPCDREPSPYQRRFWAPHGRAAPPPLM
CPDII-W 244	ATDVATAEQGNIDMYSLYTPVCNITSS-----
	+ + + + +
	B
Sb-HNL 341	LPPYDPCAVFNSINYLNLPQVQALHANVSGIVEYPTVCSNTIFDQW
CPDII-W 290	TGSYDPCTEERYSTAYYNRDVQMALHANVTGAMNYTWATCSDTINTHW
	+ + + + +
Sb-HNL 389	GQAADDLLPVYRELIQAGLRVWVYSGDSDSVPVSSTRRSLAALELPV
CPDII-W 338	HDAPRSMLEPIYRELIAAGLRIVVFSGDSDAVVPLTATRYSIGALGLPT
	+ + + + + + + +
Sb-HNL 437	KTSWYPWYMAPTEREVGGWSVQYEGLTYVSPSGAGHLVPVHRPAQAFL
CPDII-W 386	TTSWYPWY---DDQEVGGWSQVYKGLTLVSVRGAGHEVPLHRPRQALV
	+ + + + +
	B
Sb-HNL 485	LFKQFLKGEPMPEEKNDILLPSQKAPFY
CPDII-W 434	LFQYFLQKPMGQTKNAT

Abbildung 41: Homologie der SbHNL zur Serin-Carboxypeptidase aus Weizen (CPDII-W)

gelb: identische AS; +: ähnliche AS; rot: katalytische Triade; blau: Cystein-Reste der Disulfidbrücken; grün: potentielle N-Glykosylierungsstellen; : Bereich der großen (A) und kleinen (B) Untereinheit des Homologiemodells unter 2.2.3; : Spaltstelle der Signalsequenz; aquamarin: AS der Substratbindungstasche

Letzteres spiegelt ihre Verwandtschaft infolge einer divergenten Evolution wider (Ollis et al., 1992; Wajant & Mundry, 1993). Dieses Faltungsmuster ist gekennzeichnet durch meist 8 antiparallel angeordnete β -Faltblattstrukturen die durch α -Helices miteinander verbunden sind, welche eine leichte Drehung der zentralen Kernstruktur bewirken. Zu dieser Superfamilie gehören eine Reihe von Enzymen mit unterschiedlichsten katalytischen Funktionen. Neben Hydrolasen, Lipasen, Esterasen, Carboxypeptidasen und Dehalogenasen entsprechen auch die HNLn aus *Hevea* und *Manihot* diesem Strukturtyp (Zuegg et al., 1999; O'Brien & Herschlag, 1999; Holmquist, 2000).

Hochkonserviert ist in diesem Faltungsmuster die katalytische Triade bestehend aus einem Nucleophil, einer Säure und einem Histidinrest (Ollis et al., 1992). Sowohl die *SbHNL* als auch die CPII-W weisen als Nucleophil ein Serin und als Säurerest die Asparaginsäure neben dem Histidin in konservierter Position der Primär- und Tertiärstruktur auf (Liao & Remington, 1989; Liao et al., 1992).

Darüberhinaus entspricht das pH- und Stabilitätsoptimum der *SbHNL* bei pH 4,5 dem der in der pflanzlichen Vakuole lokalisierter CPII-W (Jansen et al., 1992; Bullock et al., 1994).

Auffallend ist auch die Struktur ihrer jeweiligen bevorzugten Substrate, denn beide besitzen einen hydroxylierten aromatischen Rest in vergleichbarer Position (Abbildung 42). Als natürliche Substrate bevorzugt die CPII-W hydrophobe oder basische Aminosäurereste am Carboxyterminus der zu hydrolysierenden Peptide (Bullock et al., 1994). Höchste Präferenz besitzen Arginin, Lysin und aromatische Aminosäuren.

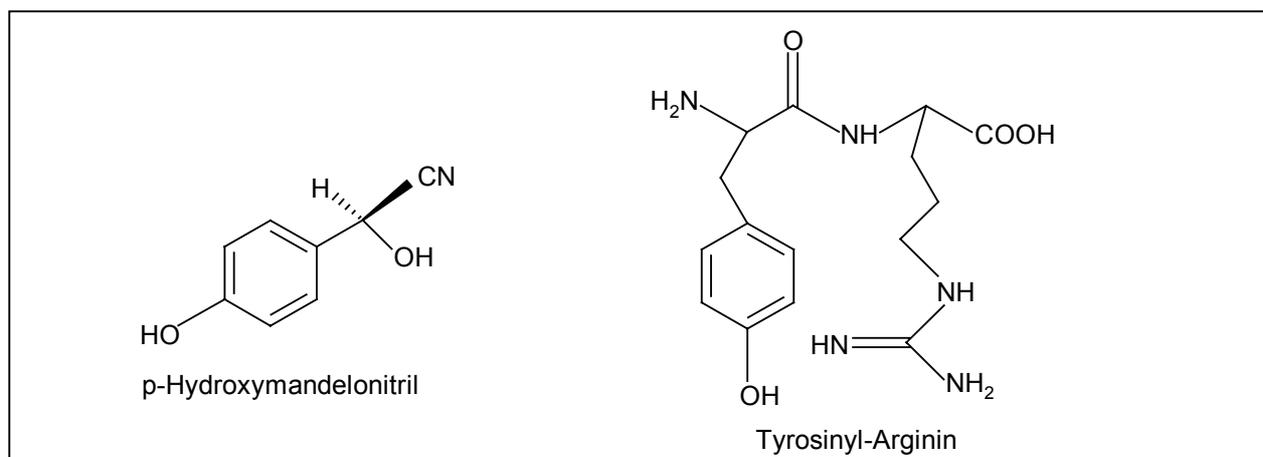


Abbildung 42: Substrate der *SbHNL* [p-Hydroxymandelonitril] und der CPII-W [Tyr-Arg]

Obwohl beide Enzyme unterschiedliche Reaktionen katalysieren, benutzen sie höchstwahrscheinlich das gleiche Reaktionszentrum. Im Falle der *SbHNL* wird die C-C-Bindung des α -Hydroxynitrils und bei der C_{PII}-W die C-terminale Amidbindung eines Peptids unter Beteiligung der Triade Ser/Asp/His gespalten. Diese drei katalytisch aktiven Aminosäuren wurden im Falle der C_{PII}-W durch Röntgestrukturanalysen im Komplex mit Inhibitoren als Reaktionszentrum identifiziert (Bullock et al., 1994 und 1996). Der in ihrer Kristallstruktur bisher noch nicht aufgeklärten *SbHNL* konnte die Beteiligung eines Serinrestes am Katalysemechanismus durch Inhibitionsstudien mit den Seringruppen-modifizierenden Reagentien DFP und dem stabileren Pefablock nachgewiesen werden (Wajant et al. 1994 und eigene Daten). Außerdem bietet sich dieses Katalysezentrum nach Analyse des Homologiemodells in Kapitel 4.2.3.3 in Anlehnung an den bekannten Mechanismus der *HbHNL* als einzig in Frage kommendes an.

Die serologische Verwandtschaft aufgrund von Kreuzreaktionen zwischen der C_{PII}-W und dem *SbHNL*-Antiserum vervollständigen die Homologienachweise (Wajant et al., 1994)

4.2.3.2 Test der *SbHNL* auf Carboxypeptidase-Aktivität

Aufgrund dieser markanten Übereinstimmungen drängte sich die Frage auf, inwieweit beide Enzyme die Aktivität des jeweils anderen Enzyms aufweisen.

Der Test auf eine Spaltung des *p*-Hydroxymandelonitrils mit der kommerziell erhältlichen und der C_{PII}-W entsprechenden Serincarboxypeptidase W [Roche] zeigte keine Freisetzung von *p*-Hydroxybenzaldehyd. Daneben wurde auch die kommerziell erhältliche Carboxypeptidase aus Hefe (CP-Y) auf eine Fähigkeit zur Lyasereaktion hin untersucht. Ebenfalls konnten keine Spaltprodukte des *p*-Hydroxymandelonitrils nachgewiesen werden.

Demgegenüber konnte bei der homogen aufgereinigten wt*SbHNL* eine Carboxypeptidase-Nebenaktivität nachgewiesen werden. Dazu wurden verschiedene Dipeptide mit und ohne Schutzgruppe als potentielle Substrate getestet.

Der Nachweis der Umsetzung erfolgte chromatographisch im semiquantitativen Maßstab auf Dünnschichtplatten und die Ergebnisse der Hydrolysereaktionen sind in Tabelle 9 dargestellt. Abbildung 43 zeigt die SDS-PAGE der homogen aufgereinigten wtSbHNL und veranschaulicht die Abwesenheit von unter Umständen verfälschenden Hintergrundaktivitäten mit angereinigter Enzyme.

Tabelle 9: Bestimmung der Carboxypeptidase-Aktivität der SbHNL im Vergleich zur CPII-W. Die Spaltung verschiedener Dipeptide und Aminosäureester als Substrate wurde semiquantitativ und dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit 3% Ninhydrin in Isopropanol
+++ : vollständige Umsetzung; ++ : partielle Umsetzung; + : schwache Umsetzung; - : keine Umsetzung

Substrat P ₂ -P ₁ -P ₁ '	SbHNL	CPII-W
Dipeptide		
Mal-Tyr-Arg	++	+++
Tyr-Arg	++	+++
Tyr-Lys	++	+++
Phe-Arg	++	+++
Phe-Ala	-	+
Phe-Leu	-	+
Ala-Arg	-	++
Leu-Arg	-	+++
Aminosäureester		
Tyr-OMe	++	+++
Phe-OEt	++	++
Phe-OBu	-	-
Arg-OMe	-	-

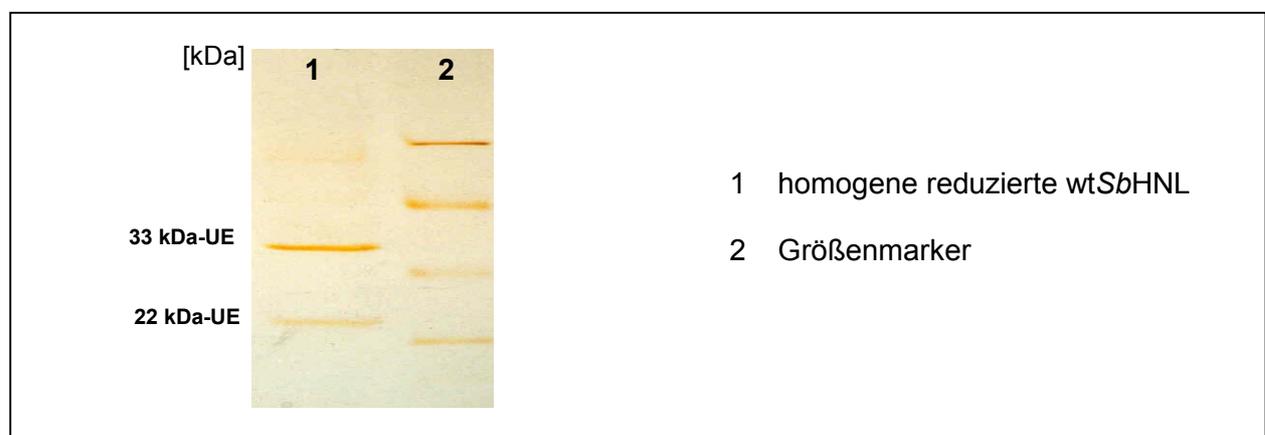


Abbildung 43: SDS-PAGE homogener wtSbHNL nach Silberfärbung

Die Carboxypeptidase-Aktivität der *SbHNL* bezogen auf die Substrate Tyrosinyl-Arginin, Tyrosinyl-Lysin und Phenylalanyl-Arginin beträgt ca. 1/10 im Vergleich zu der in gleicher Menge eingesetzten Serincarboxypeptidase W. Anhand der ausgewählten Substrate ist deutlich zu erkennen, dass die *SbHNL* nur Dipeptide mit einem aromatischen Rest in N-terminaler, neben einem basischen, positiv geladenen Rest in C-terminaler Position spaltet. Wird entweder der aromatische N-Terminus oder der basische C-Terminus gegen einen aliphatischen Rest ausgetauscht, findet keine Peptidhydrolyse durch die *SbHNL* statt. Ihr Substratspektrum für Dipeptide ist deshalb enger als das der CP11-W, entspricht diesem jedoch hinsichtlich der Präferenz für basische Aminosäuren am C-Terminus und aromatische Aminosäuren am N-Terminus.

Die von Hickel (1996) nachgewiesenen Esteraseaktivität der *HbHNL* war der Anlass, um auch die *SbHNL* auf eine Spaltung von Aminosäureestern hin zu untersuchen. Auch in deren Umsetzung spiegelt sich in Bezug auf die Dipeptid-Hydrolyse beschriebene Auffälligkeit wider, denn auch hier werden aromatische Aminosäuren, verestert mit kurzkettigen Alkoholen, bevorzugt.

Die beobachteten Carboxypeptidase- und Esterase-Nebenaktivitäten sind von wesentlicher Bedeutung für die evolutive Beziehung zwischen Hydroxynitril-Lyase und Serin-Carboxypeptidasen. Die Enzyme vom α/β -Hydrolase-Typ sind ein Beispiel für eine Superfamilie mit einem konserviertem mechanistischen Merkmal, welches verschiedene Reaktionen katalysieren kann. Ihre Gemeinsamkeit ist die gleiche α -Helix/ β -Faltblatt-Architektur und die damit geschaffenen Topologie für die katalytische Triade. Diese drei Aminosäurereste sind in der Lage Esterbindungen bzw. Amidbindungen zu hydrolysieren [Esterasen/Amidase], C-C-Bindungen unter Freisetzung von HCN zu spalten [HNL] oder aber auch weitere C-C-Verknüpfungen mit einer Carbonylverbindung [Semialdehyd-Hydrolase] oder einer C-Halogen-Verbindung [Haloalkan-Dehalogenase] zu hydrolysieren. Deshalb ist es wenig überraschend, dass eine Reihe von Enzymen existieren, die eine sog. „katalytische Promiskuität“ besitzen (O'Brien & Herschlag, 1999; Holmquist, 2000). Die genannten Enzyme sind in der Lage, diverse chemische Transformationen durchzuführen. Sie können unterschiedliche Bindungen spalten, wobei in der Regel eine der alternativen Reaktionstypen auf einem niedrigeren Aktivitätslevel verläuft. An dieser Stelle sei z.B. das Chymotrypsin erwähnt, welches sowohl Amide, Ester, Thiolester, als auch Säurechloride und -anhydride hydrolysieren kann.

Diese Beobachtungen stehen somit im Einklang mit der hier nachgewiesenen Nebenaktivität der *SbHNL*. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die *SbHNL* neben ihrer Hauptaktivität zur Lyse einer C-C-Verknüpfung auch die Fähigkeit zur Hydrolyse von Amid- und Esterbindungen besitzt.

4.2.3.3 Homologie-Modell der *SbHNL*

Die ausgeprägten Kongruenzen zwischen der *SbHNL* und der C_{PII}-W, insbesondere auf der Basis ihrer Primär-, Tertiär- und Quartärstrukturen, und das Vorliegen der nach Kristallisation der C_{PII}-W bestimmten 3D-Struktur, bildeten die Grundlage für ein Homologie-Modelling mittels SWISS-Model [An Automated Comparative Protein Modelling Server] (Liao et al., 1989 und 1992; Bullock et al., 1996; Peitsch, 1996; Guex und Peitsch, 1997; Peitsch et al., 1997; Schwede et al., 2000).

Die in Abbildung 44 dargestellte potentielle 3D-Struktur der *SbHNL* ist aufgrund ihrer starken Homologie zur C_{PII}-W (SWISS-PROT-Eintrag: CBP2_Wheat (P08819); PDB-Eintrag: 1W_{HSA}.pdb und W_{HSB}.pdb) von 57% identischen und 73 % ähnlichen Aminosäuren sehr wahrscheinlich (Liao et al., 1989 und 1992; Bullock et al., 1994 und 1996). Selbst bei nur 50%iger Sequenzidentität, ist nur mit einer Varianz von ca. 1 Å des modellierten Kohlenstoffrückgrats zu rechnen (Schwede et al., 2000). Die Vorhersage dürfte im Vergleich zur *LuHNL* aus Kapitel 4.1.5.2 aufgrund der höheren Sequenzähnlichkeit auch genauer sein.

Der Sequenzbereich des Homologiemodells ist in Abbildung 44 mit  markiert.

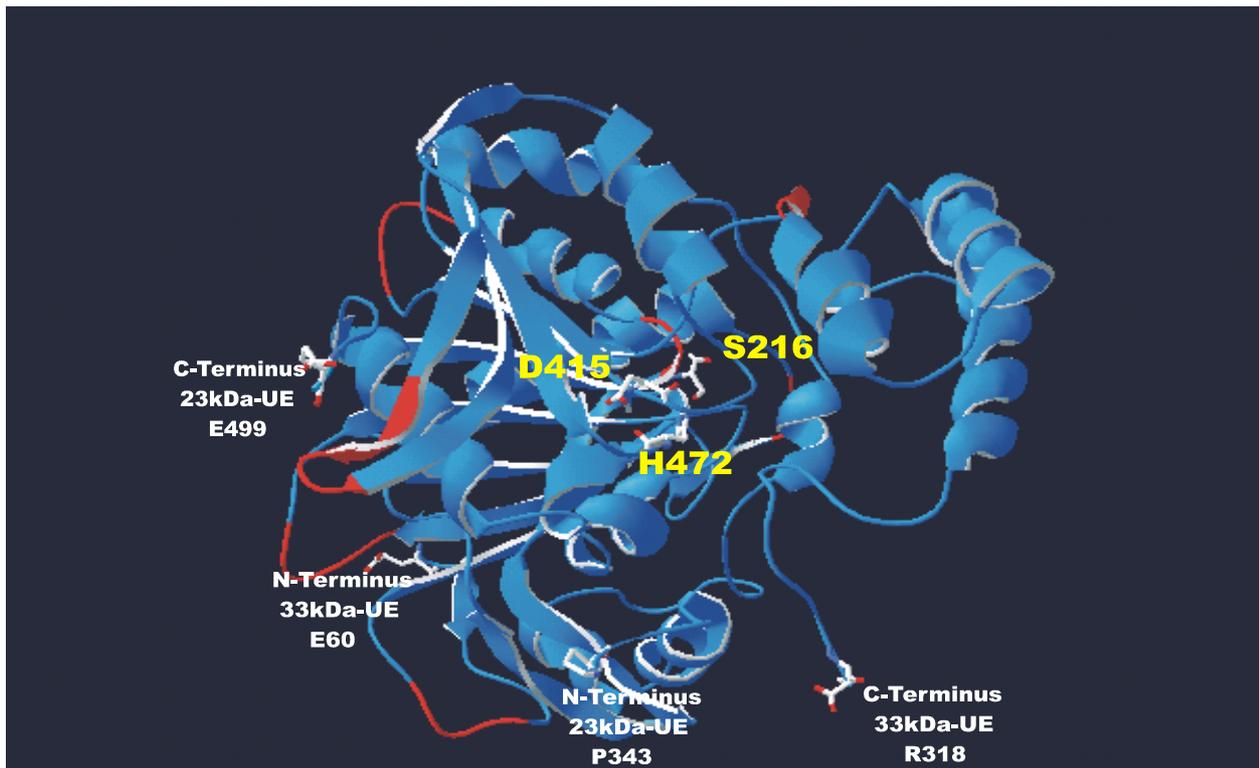


Abbildung 44: Homologie-Modell des SbHNL- Dimers

Dargestellt sind grosse [33 kDa] und kleine [23 kDa] Untereinheit mit potentieller katalytischer Triade (gelb) und Termini (weiss).

blau: α -Helices und β -Faltblätter, rot: im Vergleich zum Templatmolekül inserierte ASn, cyan: Bereich nichtähnlicher ASn
[erstellt mit Swiss-Modell und pdb-viewer]

Zu erkennen ist die für Proteine des α/β -Hydrolase-Typs leicht gedrehte β -Faltblattstruktur, bestehend aus 5 zentralen und 3 peripheren β -Faltblättern, welche von 6 α -Helices umgeben ist. Zentral gelegen ist die katalytische Triade S216-D415-H472 (Nummerierung bezieht sich auf Abbildung 41).

Markiert sind auch die C- und N-Termini der schweren und leichten Kette. Der C-Terminus der 33kDa-Untereinheit und der N-Terminus der 23kDa-Untereinheit liegen in räumlicher Nähe zueinander, was auf eine nicht unbedingt notwendige proteolytische Spaltung des Linkerpeptids zur Dimerisierung hindeutet. Die Spaltung nach Ausbildung der Quartärstruktur ist eher wahrscheinlich. Die Proteolysestelle liegt jedoch zur aktiven Seite des Enzyms hin gewandt und kann bei Nicht-Spaltung sowohl die Ausbildung eines katalytisch optimal wirksamen Zentrums als auch die Substratzugänglichkeit behindern.

Ein Vergleich der Aminosäuren um die aktiven Reste Serin und Histidin der *SbHNL* mit den Consensus-Motiven der Serin-Carboxypeptidasen zeigt eine weitgehende Homologie [Expasy: Description of Patterns and Profiles]. Der einzige, aber möglicherweise entscheidende Unterschied, ist das Fehlen zweier Aminosäuren in C-terminaler Richtung neben dem katalytisch aktiven Serin (Abbildung 41). Dies könnte eine Ursache für die abgeschwächte Carboxypeptidase-Aktivität und die Akzeptanz der unter Kapitel 5.2.3.1 ausgewählten Substrate sein. Die strukturellen Mindestanforderungen für die hydrolytisch aktiven Enzyme mit α/β -Faltstruktur, sind zum einen ein nukleophiler Rest, welcher zwar variieren kann, aber Bestandteil folgender Umgebung sein muss:

[Sm-X-Nu-X-Sm-Sm] Sm=kleiner Rest; X=beliebiger Rest; Nu=Nukleophiler Rest

Dieses Motiv wird auch nukleophiler Ellbogen genannt und bildet einen scharfen Knick zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix (Ollis et al., 1992; Heikinheimo et al., 1999; Holmquist, 2000). Und zum anderen die Anordnung der katalytischen Triade in der Reihenfolge: Nukleophil - Säure - Histidin. Die *SbHNL* genügt den Ansprüchen der Positionierung [S216-D415-H472], jedoch nicht der Nukleophilumgebung [G214-E-S-gap-gap-G217] und könnte somit ihr ehemals hydrolytisches Potential [G214-E-S-Y-A-G219] eingebüßt haben (Abbildung 41). Andererseits könnte diese Veränderung mit ein Bestandteil ihrer später erworbenen Eigenschaft zur Spaltung von Cyanhydrinen mit einem aromatischen Rest sein.

Einen weiteren Grund kann man in der Fähigkeit zur Substratbindung und -differenzierung vermuten. Die Gegenüberstellung der dafür relevanten Aminosäuren zeigt nur Abweichungen in den für die Substratvariabilität verantwortlichen Aminosäuren (Elslinger et al., 1996). Von den 16 Aminosäurereste der Substratbindungstasche der Carboxypeptidasen aus Weizen [in Abbildung 41 aquamarin markiert], Hefe und Mensch sind 11 Reste konserviert und die restlichen 5 Aminosäuren können variieren. Die Bindungstasche beinhaltet die beiden katalytischen Reste Serin und Histidin. In der *SbHNL*-Sequenz sind die konservierten Reste erhalten geblieben.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, warum die C_{PII}-W nicht zur Spaltung des p-Hydroxymandelonitrils in der Lage ist.

Die Antwort könnte darin begründet liegen, dass die oben erwähnten Deletionen der beiden Aminosäuren neben dem katalytisch aktiven Serin nicht vorhanden sind und zum anderen möglicherweise die Fähigkeit zur Nitril-Fixierung fehlt. Der aufgeklärte Katalysemechanismus der *HbHNL* zeigt, dass an der Wasserstoffbrückenbindung zum α -Hydroxynitril ein Threoninrest beteiligt ist. Dieser Rest scheint ebenso in der Katalysereaktion der *LuHNL* von Bedeutung zu sein (siehe Einleitung 1.6).

Ein Vergleich der Aminosäuren der Substratbindungstasche identifizierte den Rest T310 (in der *SbHNL*-Sequenz aquamarin markiert) als ein Threonin, welches die *SbHNL* im Gegensatz zur CPII-W besitzt (Abbildung 45). Zur CPII-W gehört an dieser Stelle ein Serin, welches die Aufgabe der Wasserstoffbrückenbindung über ihre Hydroxylgruppe übernehmen könnte. Jedoch weist die *SbHNL* zwei Aminosäuren in N-terminaler Richtung versetzt ein Prolin auf, welches in einer Polypeptidkette meist einen „Knick“ verursacht und somit das Threonin in der Bindungstasche möglicherweise korrekt für die Cyanhydrinbindung positioniert. Deshalb kann man spekulieren, dass diese Aminosäureaustausche an der Bildung der Lyasefähigkeit mit beteiligt war.

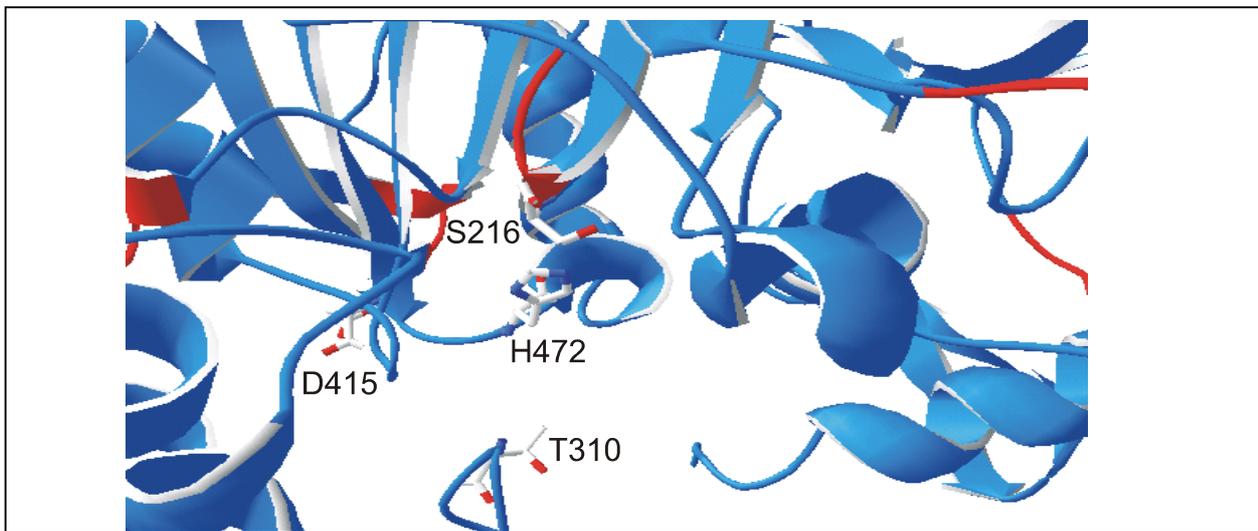


Abbildung 45: Katalytisches Zentrum der *SbHNL* mit einem potentiellen cyanhydrinbindenden Threoninrest
[erstellt mit Swiss-Modell und pdb-viewer]

Die Katalyse entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit im Prinzip dem in der Einleitung für die *HbHNL* vorgestellten Mechanismus. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich sowohl die *HbHNL* als auch die *SbHNL* eines gleichen Reaktionszentrums bedienen, jedoch in ihrer Struktur kaum Ähnlichkeiten aufweisen (Wajant & Pfizenmaier, 1996; Hasslacher et al., 1997a).

5 Zusammenfassung

Die (R)-HNL aus *Linum usitatissimum* [LuHNL] und die (S)-HNL aus *Sorghum bicolor* [SbHNL] waren die rekombinant zu exprimierenden und hinsichtlich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse zu charakterisierenden Enzyme der vorliegenden Arbeit. Ihre signifikanten Homologien bezogen sich bei der LuHNL auf die zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen und im Falle der SbHNL auf die Serin-Carboxpeptidasen. Die Modellierung ihrer 3D-Strukturen unterstützten sowohl die Homologieuntersuchungen als auch die Aufklärung mechanistischer Aspekte.

LuHNL

Nach Optimierung der Expression der recLuHNL(His)₆ in *E. coli* wurde das Enzym aus dem Stamm AD494 mittels IMAC an Ni-NTA-Agarose in einem Schritt homogen aufgereinigt. Aus 1 Liter Kulturvolumen konnten 57 U reinste recLuHNL gewonnen werden. Die Reinigung der recLuHNL ohne Hexahistidinrest im bereits existierenden *Pichia*-Expressionssystem GS115 wurde ebenfalls bis zur Homogentität nach SDS-PAGE erreicht. Die Prozedur von AEC, (NH₄)₂SO₄-Fällung und HIC konnte im Vergleich zur Isolierung der wtLuHNL um 2 Stufen verkürzt und in ihrem Reinigungserfolg verbessert werden. Der Versuch einer optimalen Aufreinigung der recLuHNL(His)₆ aus dem ebenfalls bereits existierenden *Pichia*-System SMD1168 resultierte in der Identifizierung einer bislang unbekanntes Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *P. pastoris*. Ihre homogene Anreicherung in einem Schritt über IMAC an Ni-NTA-Agarose war bemerkenswert. Sie besitzt eine fast zweifach höhere spezifische Aktivität zur Oxidation von Isopropanol als die kommerziell erhältliche ADH aus Bäckerhefe. Reine recLuHNL wurde zu Homologieuntersuchungen eingesetzt.

Die HNL aus *Linum* und die Klasse der zinkabhängigen ADHn besitzen zu 49% ähnliche Aminosäuren. Dazu gehören folgende charakteristische Merkmale der ADHn:

- ADP-bindende Sequenzmotiv [bietet die Topologie zur NAD(P)-Bindung]
- Liganden für strukturell und katalytische essentielle Zinkionen
- Strukturell wichtige Glycine

Zur Aufklärung der Bedeutung dieser Reste für die Aktivität und Stabilität bzw. Konformation der LuHNL wurden Enzymtests mit den Cofaktoren NAD(P)H und Zn²⁺ bei

einer Temperatur von 50°C durchgeführt. Zinkionen haben einen wesentlich deutlicheren Einfluss auf den Erhalt ihrer Stabilität bei erhöhten Temperaturen als die Dinukleotide. Beide sind für die Katalysereaktion nachweislich nicht von Bedeutung. Weiterführende Untersuchungen zur NAD(P)H-Bindung mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden lassen eine effektive NAD(P)H-Fixierung nicht vermuten.

Ein mittels SWISS-Modell und pdb-Viewer generiertes 3D-Modell, basierend auf der Homologie der *LuHNL* zu bereits in ihrer Kristallstruktur aufgeklärten ADHn, diente als ausgezeichnete Grundlage zur Identifizierung mechanistisch relevanter Aminosäuren. Ein Lyasezentrum bestehend aus einer katalytischen Triade D66-H85-T111 konnte nach Ansicht des Homologiemodells bestimmt und durch gerichtete Mutagenese verifiziert werden. Außerdem wurde ein möglicher Katalysemechanismus unter Beteiligung einer weiteren, durch Mutageneseexperimente identifizierten Aminosäure T98 vorgestellt.

SbHNL

Ausgehend von einer bis dato bekannten Teilsequenz der *SbHNL*-cDNA und den mittels Edman-Abbaus bestimmten Aminosäuren eines potentiellen N-Terminus wurde über verschiedene parallele Methoden [5'-RACE, PCR mit degenerierten Primern, partielle genomische Bank] versucht, die vollständige Sequenz des *SbHNL*-Gens zu ermitteln. Im Zuge dieser Ansätze und nach Gewinnung neuer Sequenzinformationen wurde mir freundlicherweise die Gesamtsequenz von Herrn Dr. Wajant (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die *SbHNL*-cDNA besitzt eine Leadersequenz, welche das Enzym vermutlich in Zellorganellen [Chloroplasten] dirigieren kann, und codiert die Synthese eines Präproteins. Die Bildung der nativen Enzymstruktur umfasst komplexe posttranslationale Modifizierungen, wie die proteolytische Spaltung und Prozessierungen des Präproteins zur Reifung in eine große [33kDa] und kleine [23kDa] Untereinheit, das korrekte Schließen von Disulfidbrücken und eine Glykosylierung.

Die *SbHNL* besitzt eine markante Homologie von 57% identischen Aminosäuren zur Serin-Carboxypeptidase aus Weizen [CPII-W]. Dies spiegelt sich in einem ähnlichen Enzymaufbau, bestehend aus einer glykosylierten und über Disulfidbrücken verbundenen heterotetrameren Struktur und einem α/β -Hydrolase Faltungsmuster mit katalytischer S216-D415-H472 Triade wieder.

Diese Übereinstimmungen waren ebenfalls Grundlage zur Generierung eines 3D-Modells der *SbHNL*.

Eine schwache Carboxypeptidase- und Esterase-Nebenaktivität konnte der *SbHNL* nachgewiesen werden. Diese katalytische Promiskuität ist ein weiterer Nachweis der vorgestellten phylogenetischen Entwicklung des Enzyms.

Hauptziel der Arbeiten zur *SbHNL* war nach Klonierung dessen funktionelle rekombinante Expression. Aufgrund der umfassenden posttranslationalen Prozessierungen wurde sowohl das sekretorische als auch das intrazelluläre *P. pastoris*-Expressionssystem gewählt. Trotz erfolgreicher Expression und Sekretion des rec*SbHNL*-Präprotein ist dessen proteolytische Spaltung beeinträchtigt. Mit dem nicht optimierten System gewinnt man aus einer 2 l *Pichia*-Kultur nach 72 h Methanol-induktion ca. 100 U rec*SbHNL* im Überstand.

Die Untersuchungen der beiden Enzyme hinsichtlich ihrer phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse erweiterten die Hypothese ihrer Entwicklung aus Vorläuferproteinen ursprünglich unterschiedlicher Funktion. Dabei wechselten die katalytischen Zentren offenbar ihr Reaktionspotential:

Die ehemals vorhandene Redoxaktivität der ZnADHn ging zugunsten der neu gewonnen Lyaseaktivität vollständig verloren. Dazu hat wahrscheinlich der Verlust des NAD(P)H infolge eines nicht mehr vorhandenen Selektionsdrucks bei der *LuHNL* geführt. In diesem Falle sind die Reaktionstypen [Oxidoreduktase- und Lyase-Reaktion] völlig verschieden und der Nachweis der ursprünglichen Aktivität deshalb unwahrscheinlich.

Demgegenüber hat der Wechsel des Hydrolasezentrums zum Lyasezentrum seine ursprünglichen katalytischen Fähigkeiten nicht komplett eingebüßt. Das Hydrolysepotential der *SbHNL* ist zwar eingeschränkt, aber nachweislich messbar. In diesem Falle sind der ehemals vorhandene und neu entwickelter Reaktionstyp prinzipiell gleich.

Die in dieser Arbeiten gewonnen Erkenntnisse zu *LuHNL* und *SbHNL* lassen zusammen mit dem aufgeklärten Katalysemechanismus der *HbHNL* die katalytische Triade als generalisiertes Motiv bei den Lyasen stark vermuten. Neu und deshalb von Interesse ist im Falle der *LuHNL* die Beteiligung eines Threoninrestes als nucleophile Aminosäure der Triade.

6 Literaturverzeichnis

- Adewusi SRA (1990). Turnover of dhurrin in green sorghum seedlings. *Plant Physiol* **94**: 1219-24.
- Alberts BB, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1989). *Molecular Biology of the cell*. New York and London, Garland Publishing Inc.
- Albrecht J, Jansen I, Kula MR (1993). Improved purification of an (*R*)-oxynitrilase from *Linum usitatissimum* (flax) and investigation of the substrate range. *Biotechnol Appl Biochem* **17**: 191-203.
- Albrecht J (1991). *Aufreinigung und Charakterisierung der Oxynitrilase aus Linum usitatissimum*. Diplomarbeit. Universität Düsseldorf.
- Andrews P, Brayton KA, Dixon JE (1989). Post-translational proteolytic processing of precursors to regulatory peptides. *Experientia Suppl* **56**: 192-209.
- Baker D, Shiau AK, Agard DA (1993). The role of pro regions in protein folding. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 966-970
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2001). *Views: Fundamental building blocks in the process of knowledge discovery*, AAAI Press: 233-238.
- Bauer M, Griengl H, Steiner W (1999). Kinetic studies on the enzyme (*S*)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* using initial rate methods and progress curve analysis. *Biotechnol Bioeng* **62**(1): 20-29.
- Bazzi M, Rabbani N, Duhaiman AS (2001). High-affinity binding of NADPH to camel lens zeta-crystallin. *Biochim Biophys Acta* **1544**: 283-288.
- Becker DM & Guarente L (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* **194**: 182-187.
- Becker W. & Pfeil E (1966). Über das Flavinenzym D-Oxynitrilase. *Biochem Zeitschr* **346**: 301-321.
- Bellamacina CR (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *Faseb Journal* **10**: 1257-69.
- Birnboim HC & Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-95.
- Bornscheuer U & Pohl M (2001). Improved biocatalysis by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 137-143.
- Bove C & Conn EE (1961). Metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J Biol Chem* **236**(1): 207-210.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Breithaupt H, Pohl M, Bönigk W, Heim P, Schimz KL, Kula MR (1999). Cloning and expression of (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *J Mol Catal B: Enzym* **6**: 315-332.
- Breithaupt H (1997). *Klonierung und Expression der (R)-Hydroxynitril-Lyase aus Linum usitatissimum (Lein)*. Dissertation. Universität Düsseldorf.

- Bretthauer RK & Castellino FJ (1999). Review: Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* **30**: 193-200.
- Brussee J & van der Gen A (2000). Biocatalysis in the enantioselective formation of chiral cyanohydrins, valuable building blocks in organic synthesis. *Stereoselective Biocatalysis*. R. N. Patel: 289-320.
- Bullock T, Branchaud B, Remington SJ (1994). Structure of the complex of L-benzylsuccinate with wheat serine carboxypeptidase II at 2.0-Å Resolution. *Biochem* **33**: 11127-34.
- Bullock T, Breddam K, Remington SJ (1996). Peptide aldehyde complexes with wheat serine carboxypeptidase II: Implications for the catalytic mechanism and substrate specificity. *J Mol Biol* **255**: 714-725.
- Butenuth J & Pfeil E (1972). Zur Substratspezifität des Flavinenzyms Hydroxynitril-Lyase (D-Oxynitrilase) und zum Reaktionsmechanismus der durch das Enzym katalysierten Reaktion. *Sommertagung der Gesellschaft für Biologische Chemie*: 14-15.
- Carninci P, Nishiyama Y, Westover A, Itoh M, Nagaoka S, Sasaki N, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y (1998). Thermostabilisation and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 520-524.
- Carrio MM & Villaverde A (2001). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters* **489**: 29-33.
- Carugo O & Argos P (1997). NADP-dependent enzymes I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **28**: 10-28.
- Cereghino JL & Cregg JM (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotech* **10**: 422-427.
- Cereghino JL & Cregg JM (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 24-66.
- Cheng IP & Poulton JE (1993). Cloning of cDNA of *Prunus serotina* (R)-mandelonitrile lyase and identification of a putative FAD-binding site. *Plant Cell Physiol* **34**(7): 1139-43.
- Cheng SH, Yang GH, Wu J, Sun WR (2000). Cloning, expression and preliminary application of an alpha-hydroxynitrile lyase from cassava. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **17**(1): 78-83.
- Cho JY & Jeffries TW (1998). *Pichia stipitis* genes for alcohol dehydrogenase with fermentative and respiratory functions. *Appl Environ Microbiol* **64**(4): 1350-58.
- Cho JY & Jeffries TW (1999). Transcriptional control of ADH genes in the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol* **65**(6): 2363-68.
- Christlet THT & Veluraja K (2001). Database analysis of O-Glycosylation sites in proteins. *Biophys J* **80**: 952-960.
- Claros M, Brunak S, von Heijne G (1997). Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 394-398.
- Conn EE (1980). Cyanogenic Glycosides. *Encycl Plant Physiol*. Bell EA & Charlwood BV, Eds. Springer Verlag. **8**: 461-492.
- Conn EE (1981). Biosynthesis of cyanogenic glycosides. *Cyanides in Biology*. Vennesland B et al., Eds. London, Academic Press: 183-196.
- Conn EE (1991). Metabolism of a natural product: lessons learned from cyanogenic glycosides. *Planta Medica*. *Planta Medica* **57**(Supplement 1): S1-S9.

- Cutler A, Sternberg M, Conn EE (1985). Properties of a microsomal enzyme system from *Linum usitatissimum* (linen flax) which oxidizes valine to acetone cyanohydrin and isoleucine to 2-methylbutanone cyanohydrin. *Arch Biochem Biophys* **238**(1): 272-279.
- Cutler AJ & Conn EE (1981). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum* (linen flax) in vitro. *Arch Biochem Biophys* **212**(2): 468-474.
- Denessiouk K, Rantanen VV, Johnson MS (2001). Adenine Recognition: a motif present in ATP-, CoA-, NAD-, NADP- and FAD-dependent proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **44**: 282-291.
- Do N & Adams RP (1991). A simple technique for removing plant polysaccharides contaminants from DNA. *BioTechniques* **10**: 163-166.
- Dreveny I, Gruber K, Glieder A, Thompson A, Kratky C (2001). The Hydroxynitrile Lyase from almond. A lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure (Camb)* **9**(9): 803-815.
- Duffey SS (1981). Cyanide and Arthropodes. *Cyanide in Biology*. Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, Eds. New York, Academic Press: 385-414.
- Duman J, Miele RG, Liang H, Grelle DK, Sim KL, Castellino F, Bretthauer RK (1998). O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol Appl Biochem* **28**: 39-45.
- Dutton C, Paynton C, Sommer SS (1993). General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucl Acids Res* **21**(12): 2953-54.
- Effenberger F (1994). Synthese und Reaktionen optisch aktiver Cyanhydrine. *Angewandte Chemie* **106**: 1609-19.
- Effenberger F, Förster S, Wajant H (2000). Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. *Curr Opin Biotech* **11**: 532-539.
- Effenberger F, Gutterer B, Ziegler T, Eckhardt E, Aichholz R (1991). Enantioselektive Veresterung racemischer Cyanhydrine und enantioselektive Hydrolyse oder Umesterung racemischer Cyanhydrinester mittels Lipasen. *Liebigs Ann Chem*: 47-54.
- Effenberger F (1997). Hydroxynitrile lyases, interesting biocatalysts in stereoselective organic synthesis. Phuket, Symposium.
- Eklund H (1988). Nicotinamide nucleotide dependent enzymes. University of Sheffield, Report 293-296
- Eklund H, Muller-Wille P, Horjales E, Futer O, Holmquist B, Vallee BL, Hoog JO, Kaiser R, Jornvall H (1990). Comparison of three classes of human liver alcohol dehydrogenase. Emphasis on different substrate binding pockets. *Eur J Biochem* **193**(2): 303-310.
- Elsiger M, Pshezhetsk AV, Vinogradova MV, Svedas VK, Potier M (1996). Comparative modeling of substrate binding in the S₁' subsite of serine carboxypeptidases from yeast, wheat and human. *Biochem* **35**: 14899-909.
- Engeland K, Hoog JO, Holmquist B, Estonius M, Jornvall H, Vallee BL (1993). Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proc Natl Acad Sci* **90**(6): 2491-94.
- Faber K, Harder W, Ab G, Veenhuis M (1995). Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**: 1331-44.
- Fan TW & Conn EE (1985). Isolation and characterization of two cyanogenic beta-glucosidases from flax seeds. *Arch Biochem Biophys* **243**(2): 361-373.
- Förster S, Roos J, Effenberger F, Wajant H, Sprauer A (1996). Über die erste rekombinante Hydroxynitril-Lyase und ihre Anwendung in der Synthese von (S)-Cyanhydrinen. *Angew Chem* **108**(4): 493-494

- Frohmann MA, Dush MK, Martin GR (1988). Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using single gen-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8998-9002.
- Gabellieri E, Rahuel-Clermont S, Branlant G, Strambini GB (1996). Effects of NAD⁺-binding on the luminescence of Tryptophans 84 and 310 of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem* **35**:12549-59
- Galla HJ (1988). *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag.
- Gemmill TR & Trimble RB (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 227-237.
- Georgiou G & Valax P (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* **7**: 190-197.
- Gerstner E & Pfeil E (1972). Zur Kenntnis des Flavinenzyms Hydroxynitril-Lyase (D-Oxynitrilase). *Hoppe Seyler's Z Physiol* **353**: 271-286.
- Gibb MC, Carbery JT, Carter RG, Catalinac S (1974). Hydrocyanic acid poisoning of cattle associated with sudan grass. *New Zealand Vet J* **22**(7): 127.
- Gietz RD & Schiestl RH (1995). Transforming yeast with DNA. *Meth Mol Cell Biol* **5**(5): 255-269.
- Gregory RJH (1999). Cyanohydrins in Nature and the Laboratory: Biology, Preparations and Synthetic Applications. *Chem Rev* **99**: 3649-82.
- Griengl H, Schwab H, Fechter M (2000). The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Tibtech* **18**: 252-256.
- Gruber K (2001). Elucidation of the mode of substrate binding to hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **44**(1): 26-31.
- Guex N & Peitsch MC (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-23.
- Halkier B, Scheller HV, Moller BL. (1988). Cyanogenic glucosides: the biosynthetic pathway and the enzyme system involved. Cyanide compounds in biology. D. H. Evered, S. Ciba Foundation Symposium 140.
- Halkier BA & Moller BL (1989). The biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved. *Plant Physiol* **90**: 1552-59.
- Halkier BA & Moller BL (1990). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-ACI-nitro-2-(p-hydroxyphenyl)ethane as an intermediate. *J Biol Chem* **265**(34): 21114-21.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hasslacher M, Kratky C, Griengl H, Schwab H, Kohlwein SD (1997). Hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: Molecular characterisation and mechanism of enzyme catalysis. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **27**: 438-449.
- Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Lückl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif* **11**: 61-71.

- Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1996). Molecular cloning of the full-length cDNA of (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and identification of an active site residue. *J Biol Chem* **271**(10): 5884-91.
- Hegnauer R (1986). Cyanogene Verbindungen. Chemotaxonomie der Pflanzen. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis DL (1999). Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* **7**(6): 141-146.
- Heinz DW (1999). A phospholipase with a novel catalytic triad. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**(16): 2348-51.
- Hempel J, Nicholas H, Jornvall H (1991). Thiol proteases and aldehyde dehydrogenases: evolution from a common thiolesterase precursor *Proteins* **11**(3): 176-183.
- Hickel A (1996). Screening, kinetic and stabilization investigations of the enzyme hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Dissertation. TU Graz.
- Hickel A, Hasslacher M, Griengl H (1996). Hydroxynitrile lyases: Functions and properties (Minireview). *Physiol Planta* **98**: 891-898.
- Hickel A, Radke CJ, Blanch HW (1999). Hydroxynitrile Lyase at the diisopropyl ether/water interface: evidence for interfacial enzyme activity. *Biotechnol Bioeng* **65**(4): 425-436.
- Hickel A, Radke CJ, Blanch HW (2000). Role of organic solvents on *Pa*-hydroxynitrile lyase interfacial activity and stability. *Biotechnol Bioeng* **74**(1): 18-28.
- Higgins DR & Cregg JM (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* **103**: 1-15.
- Hollenberg C & Gellissen G (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotech* **8**: 554-560.
- Holmquist M (2000). Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Curr Protein and Peptide Science* **1**: 209-235
- Hösel W, Tober I, Eklund SH, Conn E (1987). Characterisation of β -Glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings. *Arch Biochem Biophys* **252**: 152-162.
- Hou CT, Patel R, Barnabe N, Marczak L (1981). Stereospecificity and other properties of a novel secondary-alcohol-specific alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem* **119**(2): 359-364
- Howe CJ & Wallace TP (1990). Prediction of leader peptide cleavage sites for polypeptides of the thylakoid lumen. *Nucl Acids Res* **18**(44): 3517.
- Hu Z & Poulton JE (1999). Molecular analysis of (R)-(+)-mandelonitrile lyase microheterogeneity in black cherry. *Plant Physiol* **119**: 1535-46.
- Hughes J, Francisco JP, de Carvalho C, Hughes MA (1994). Purification, characterisation and cloning of α -hydroxynitrile lyase from *Cassava* (*Manihot esculenta*). *Arch Biochem Biophys* **311**(2): 496-502.
- Hughes J, Lakey JH, Hughes MA (1996). Production and characterisation of a plant α -hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng* **53**(3): 332-338.
- Hummel W & Kula MR (1989). Simple method for small scale disruption of bacteria and yeasts. *J Microbiol Methods* **9**: 201-209.
- Hurley T, Bosron WF, Stone CL, Amzel LM (1994). Structures of three human beta alcohol dehydrogenase variants. Correlations with their functional differences. *J Mol Biol* **239**(3): 415-429.

- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Jansen I, Woker R, Kula MR (1992). Purification and protein characterisation of hydroxynitrile lyases from sorghum and almond. *Biotechnol Appl Biochem* **15**: 90-99.
- Jansen I (1992). Proteinchemische Untersuchungen der Oxynitrilasen und deren Verwendung zur Cyanhydrinsynthese in lyotropen Flüssigkristallen. Dissertation. Universität Düsseldorf.
- Johnson D, Zabelinskaja-Mackova AA, Griengl H (2000). Oxynitrilases for asymmetric C-C formation. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 103-109.
- Johnson DV & Griengl H (1999). Biocatalytic applications of hydroxynitrile lyases. *Adv Biochem Eng Biotech* **63**: 31-55.
- Jones BJ (1986). Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron* **42**(13): 3351-403
- Jordan D, Bacot KO, Carlson TJ, Kessel M, Viitanen PV (1999). Plant riboflavin biosynthesis. *J Biol Chem* **274**(31): 22114-21.
- Jorns MS (1979). Mechanism of catalysis by the flavoenzyme oxynitrilase. *J Biol Chem* **254**(23): 12145-52.
- Jörnvall H, Persson B, Jeffery J (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases: The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem* **167**: 195-201.
- Juchem B, (1996). Proteinchemische Charakterisierung der (S)-Oxynitrilase aus *Sorghum bicolor*. Diplomarbeit, FH-Jülich.
- Kahn R, Fahrendorf T, Halkier BA, Moller BL (1999). Substrate specificity of the cytochrome P450 enzymes CYP79A1 and CYP71E1 involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch Biochem Biophys* **363**(1): 9-18.
- Kaiser R, Holmquist B, Hempel J, Vallee BL, Jörnvall H (1988). Class III human liver alcohol dehydrogenase: a novel structural type equidistantly related to the class I and class II enzymes. *Biochem* **27**: 1132-40.
- Kaiser R, Holmquist B, Vallee BL, Jörnvall H (1991). Human class III alcohol dehydrogenase/glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J Protein Chem* **10**(1): 69-73.
- Kazlauskas RJ (2000). Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 81-88.
- Kiljunen E & Kanerva LT (1997). Novel (R)-oxynitrilase sources for the synthesis of (R)-cyanohydrins in diisopropyl ether. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**: 1225-34.
- Knowles CJ & Bunch AW (1986). Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol* **27**: 73-110.
- Kojima M, Poulton JE, Thayer SS, Conn EE (1979). Tissue distributions of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol* **63**: 1022-28.
- Kragl U, Niedermeyer U, Kula MR, Wandrey C (1990). Engineering aspects of enzyme engineering. Continuous asymmetric carbon-carbon bond formation in an enzyme-membrane-reactor. Okada H, Tanaka A, Blanch HW, Eds. *Ann NY Acad Sci* **613**: 167-175.
- Kruse DG (1992). Chiral Cyanohydrins - Their manufacture and utility as chiral building blocks. Chirality in Industry. Collins AN, Sheldrake GN, Crosby J, Eds. John Wiley & Sons Ltd.
- Kuroki GW & Conn EE (1989). Mandelonitrile lyase from *Ximenia americana* L.: stereospecificity and lack of flavin prosthetic group. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(18): 6978-81.

- Kyhse-Andersen J (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-209.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-685.
- Lambert JL, Ramasamy J, Paukstelis JV (1975). Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified König reactions. *Analytical Chemistry* **47**(6): 916-919.
- Lauble H, Förster S, Miehlich B, Wajant H, Effenberger F (2001). Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis. *Acta Cryst* **D57**: 194-200.
- Lauble H, Miehlich B, Förster S, Wajant H, Effenberger F (2001). Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with acetone cyanohydrin. *Protein Sci* **10**: 1015-22.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem* **16**: 4743-51.
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* **38** (1-2): 31-48.
- Liao D, Breddam K, Sweet RM, Bullock T, Remington SJ (1992). Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochem* **31**: 9796-9812.
- Liao DI & Remington SJ (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem* **265**(12): 6528-31.
- Lizotte PA & Poulton JE (1988). Catabolism of cyanogenic glycosides by purified vicianin hydrolase from squirrel's foot fern (*Davallia trichomanoides* Blume). *Plant Physiol* **86**: 322-324.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**(1): 16-20.
- MacFarlane I, Lees EM, Conn EE (1975). The in vitro biosynthesis of dhurrin, the cyanogenic glycoside of *Sorghum bicolor*. *J Biol Chem* **250**(12): 4708-13.
- Magonet E, Hayen P, Delforge D, Delaive E, Remacle J (1992). Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem J* **287**: 361-365.
- Minuth T (1996). Untersuchungen zur praktischen Anwendbarkeit wässriger Zweiphasensysteme auf der Basis nichtionischer Tenside als technische Reinigungsmethode für amphiphile Proteine. Dissertation. Universität Düsseldorf.
- Moller BL & Conn EE (1980). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants: channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor*. *J Biol Chem* **255**(7): 3049-56.
- Mozhaev VV & Martinek K (1984). Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enz Microb Technol* **6**: 50-59.
- Nahrstedt A (1973). Cyanogene Glykoside in höheren Pflanzen. *Pharm Unserer Zeit* **2**: 147-155.
- Nahrstedt A (1985). Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Plant Syst Evol* **150**: 35-47.
- Nahrstedt A (1988). Flachs, Hornklee, Widderchen und Blausäure. Cyanogenese in Schmetterlingen. *Biol Unserer Zeit* **18**: 105-109.

- Naylor C, Gover S, Basak AK, Cosgrove MS, Levy RH, Adams MJ (2001). NADP+ and NAD binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphat dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Cryst* **D57**: 635-648.
- Niedermeyer U & Kula MR (1990). Enzymkatalysierte Synthese von (S)-Cyanhydrinen. *Angew Chem* **102**(4): 423-425.
- Niedermeyer U (1990). Untersuchungen zur enzymatischen C-C-Verknüpfung am Beispiel der chiralen Cyanhydrinbildung. Dissertation. Universität Düsseldorf.
- Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals (Review). *Prot Engineer* **12**(1): 3-9.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Engineer* **10**(1): 1-6.
- North M (1993). Catalytic asymmetric cyanhydrine synthesis. *Synlett*: 807-820.
- O'Brien PJ & Herschlag D (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzyme activities. *Chemistry and Biology* **6**: 91-105.
- Ollis D, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A (1992). The α/β hydrolase fold. *Prot Engineer* **5**(3): 197-211.
- Passoth V, Schäfer B, Liebel B, Weierstall T, Klinner U (1998). Molecular cloning of alcohol dehydrogenase genes of the yeast *Pichia stipitis* and identification of the fermentative ADH. *Yeast* **14**: 1311-25.
- Peitsch MC (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* **24**: 274-279.
- Peitsch MC, Wilkins MR, Tonella L, Sanchez JC, Appel RD, Hochstrasser DF (1997). Large-scale protein modeling and integration with the SWISS-PROT and SWISS-2DPAGE databases: the example of *Escherichia coli*. *Electrophoresis* **18**: 498-501.
- Peracchi A (2001). Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. *Trends Biochem Sci* **26**(8): 497-503.
- Plapp B, Ganzhorn AJ, Gould RW, Green DW, Hershey A (1987). Structure and function in yeast alcohol dehydrogenase. *Prog Clin Biol Res* **232**: 227-236.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**(5536): 598-599.
- Poulton J (1988). Localization and catabolism of cyanogenic glycosides. Cyanide compounds in biology. Evered D & Harnett S, Eds. Ciba Foundation Symposium. **140**: 67-91.
- Poulton JE (1989). Toxic compounds in plant foodstuffs: Cyanogens. *Food Proteins*. Krusella JE, Soucie WG, Eds. 381-401.
- Poulton JE (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol* **94**: 401-405.
- Poulton JE & Li CP (1994). Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged prunus seeds. *Plant Physiol* **104**(1): 29-35.
- Proksch P (1991). Pflanzliche Sekundärstoffe als chemischer Frassschutz gegen herbivore Insekten. *Pharm Unserer Zeit* **20**(5): 217-224.
- Ramos C, Winther JR, Kielland-Brandt MC (1994). Requirement of the propeptide for in vivo formation of active yeast carboxypeptidase Y. *J Biol Chem* **269**(9): 7006-12.

- Reay PF & Conn EE (1974). The purification and properties of an uridine diphosphate glucose:aldehyde cyanohydrine β -glycosyl-transferase from *sorghum* seedlings. *J Biol Chem* **249**: 5826-30.
- Reid MF & Fewson CA (1994). Molecular characterisation of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microb* **20**(1): 13-56.
- Robinson C & Klosgen RB (1994). Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane—a multitude of mechanisms. *Plant Mol Biol* **26**: 15-24.
- Rogers SO & Bendich AJ (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. Gelvin SB & Schilperoort RA, Eds. Boston, Kluwer Academic Publishers. **A6**: 1-10.
- Romanos M, Scorer CA, Clare JJ (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Rosenthaler L (1908). Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen. *Biochem Zeitschr* **14**: 238-253.
- Rudolph R & Lilie H (1997). In vitro-Faltung von Inclusion Body-Proteinen. *Nach Chem Tech Lab* **45**: 753-758.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Eds. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Saunders JA & Conn EE (1978). Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from *Sorghum*. *Plant Physiol* **61**: 154-157.
- Schaefer BC (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning full-length cDNA ends. *Analytical Biochem* **227**: 255-273.
- Schein CH (1990). Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnology* **8**(4): 308-317.
- Schmidt M & Griengl H (1999). Oxynitrilases: from cyanogenesis to asymmetric synthesis. *Biocatalysis—from discovery to application*, Springer-Verlag. 193-226
- Schulze B & Wubbolts MG (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr Opin Biotech* **10**: 609-615.
- Schütte H, Hummel W, Kula MR (1982). Purification and characterization of a nicotinamide adenine dinucleotide-dependent secondary alcohol dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Biochim Biophys Acta* **716**(3): 298-307.
- Schütte H, Kula MR, Sahm H (1982). Formaldehyd dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Meth Enzymol* **89**: 527-531
- Schwede T, Diemand A, Guex N, Peitsch MC (2000). Protein structure computing in the genomic era. *Res Microbiol* **151**: 107-112.
- Seely MK & Conn EE (1971). Metabolism of amino acids and amines: Hydroxynitrile lyase (*Sorghum vulgare*). *Methods in Enzymology* Vol. XVIIIB. Tabor H & Tabor CW, Eds. New York, U.S.A., Academic Press.
- Seidah NG & Chretien M (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* **8**: 602-607.
- Seigler DS (1977). The naturally occurring cyanogenic glycosides. *Progress in Phytochemistry* **4**: 83-120.
- Seigler DS (1991). Cyanide and cyanogenic glycosides. *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Rosenthal GA & Berenbaum MR, Eds. 2nd Edition, Academic Press, New York: 35-77.

- Selmar D, Carvalho FJ, Conn EE (1987). A colorimetric assay for α -hydroxynitrile lyase. *Analytical Biochem* **166**: 208-211.
- Selmar D, Irandoost Z, Wray V (1996). Dhurrin-6'-glucoside, a cyanogenic diglucoside from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* **43**: 569-572.
- Selmar D, Lieberei R, Biehl B (1988). Mobilization and utilization of cyanogenic glykosides. The Linustatin pathway. *Plant Physiol* **86**: 711-716.
- Selmar D, Lieberei R, Biehl B, Conn EE (1989). α -hydroxynitrile lyase in *Hevea brasiliensis* and its significance for rapid cyanogenesis. *Plant Physiol* **75**: 97-101.
- Sibbesen O, Koch B, Halkier BA, Moller BL (1994). Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450TYR, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(21): 9740-44.
- Smitskamp-Wilms E, Brussee J, van der Gen A, van Scharrenburg GJM, Sloothaak JB (1991). Hydroxynitriles lyases from almond and *sorghum* as biocatalysts. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **110**: 209-215.
- Solis A, Luna H, Perez HI, Manjarrez N, Sanchez R, Albores-Velasco M, Castillo R. (1998). New sources of (R)-oxynitrilase: capulin (*Prunus capuli*) and mamey (*Mammea americana*). *Biotech Letters* **20**(12): 1183-85.
- Soto-Blanco B, Gorniak SL, Kimura ET (2001). Physiopathological effects of the administration of chronic cyanide to growing goats - a model for ingestion of cyanogenic plants. *Vet Res Commun* **25**(5): 379-389.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith HL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA (1996). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.
- Sreekrishna K & Kropp KE (1996). *Pichia pastoris*. Non conventional yeasts in Biotechnology. Wolf K, Ed. Springer: 203-252.
- Stader J (1995). Gene expression in recombinant *Escherichia coli*. Gene expression in recombinant microorganisms. Smith A, Ed. 1-51.
- Strandberg L & Enfors SO (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **57**(6): 1669-74.
- Sun HW & Plapp BV (1992). Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J Mol Biol* **34**(6): 522-535.
- Swain E, Li CP, Poulton JE (1992). Tissue und subcellular localization of enzymes catabolizing (R)-amygdalin in mature *Prunus serotina* seeds. *Plant Physiol* **100**: 291-300.
- Tattersall D, Bak S, Jones PR, Olsen CE, Nielsen JK, Hansen ML, Hoj PB, Moller BL (2001). Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* **293**(5536): 1826-28.
- Thayer SS & Conn EE (1981). Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades. *Plant Physiol* **67**: 617-622.
- Theil F (1997). *Enzyme in der Organischen Synthese*, Spektrum Verlag.
- Trummler K (1997). α -(R)-Hydroxynitril-Lyase aus *Linum usitatissimum*: Klonierung, funktionelle Expression und Charakterisierung. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Trummler K, Roos J, Schwaneberg U, Effenberger F, Förster S, Pfizenmeier K, Wajant H (1998). Expression of the Zn²⁺-containing hydroxynitrile lyase from flax (*Linum usitatissimum*) in *Pichia pastoris* - utilisation of the recombinant enzyme for enzymatic analysis and site-directed mutagenesis. *Plant Science* **139**: 19-27.

- Trummler K & Wajant H (1997). Molecular cloning of acetone cyanhydrin lyase from flax (*Linum usitatissimum*). Definition of a novel class of hydroxynitrile lyases. J Biol Chem **272**(8): 4770-74.
- Van Den Hazel H, Kielland-Brandt MC, Winther JR (1996). Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. Yeast **12**(1): 1-16.
- Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D, Scharpe S (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J **9**(9): 736-744.
- Vetter J (2000). Plant cyanogenic glycosides. Toxicon **38**: 11-36.
- Wagner UG, Hasslacher M, Griengl H, Schwab H, Kratky C (1996). Mechanism of cyanogenesis: The crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Structure **4**: 811-822.
- Wajant H (1993). (S)-Hydroxynitril-Lyase aus *Sorghum bicolor* L.: Reinigung, Charakterisierung und Klonierung. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Wajant H (1997). Hydroxynitril-Lyasen höherer Pflanzen. Habilitationsschrift. Universität Stuttgart.
- Wajant H, Böttinger H, Mundry KW (1993). Purification of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* L. (sorghum) by affinity chromatography using monoclonal antibodies. Biotechnol Appl Biochem **18**: 75-82.
- Wajant H, Förster S, Böttinger H, Effenberger F, Pfizenmaier K (1995). Acetone cyanhydrin lyase from *Manihot esculenta* (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases. Plant Science **108**: 1-11.
- Wajant H, Förster S, Selmar D, Effenberger F, Pfizenmaier K (1995). Purification and characterization of a novel (R)-mandelonitrile lyase from the fern *Phlebodium aureum*. Plant Physiol **109**: 1231-38.
- Wajant H, Mundry KW, Pfizenmaier K (1994). Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor*. Homologies to serine carboxypeptidases. Plant Mol Biol **26**: 735-746.
- Wajant H, Riedel D, Benz S, Mundry KW (1994). Immunocytological localisation of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* and *Linum usitatissimum*. Plant Science **103**: 145-154.
- Wajant H & Effenberger F (1996). Hydroxynitrile lyases of higher plants (Review). Biol Chem **377**: 611-617.
- Wajant H & Mundry KW (1993). Hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor*: A glycoprotein heterotetramer. Plant Science **89**: 127-133.
- Wajant H & Pfizenmaier K (1996). Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis. J Biol Chem **42**(oct 18).
- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WGJ (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in Proteins, using an amino acid sequence fingerprint. J Mol Biol **187**: 101-107.
- Wilkinson DL & Harrison RG (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology **9**: 443-448.
- Woker R, Champluvier B, Kula MR (1992). Purification of (S)-oxynitrilase from *Sorghum bicolor* by immobilized metal ion affinity chromatography on different carrier materials. J Chromatography **584**: 85-92.
- Woker R, Vernau J, Kula MR (1994). Purification of oxynitrilases from plants. In: Methods in Enzymology. Walter H & Johnson G, Eds. Academic Press, New York. 584-590
- Woker R (1992). Aufreinigung von Enzymen an Metallchelatkomplexen. Dissertation. Universität Düsseldorf.

-
- Wu HC & Poulton JE (1991). Immunocytochemical localization of mandelonitrile lyase in mature black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Plant Physiol* **96**: 1329-37.
- Xie P, Parsons SH, Speckhard DC, Bosron WF, Hurley TD (1997). X-ray structure of human class IV sigmasigma alcohol dehydrogenase. Structural basis for substrate specificity. *J Biol Chem* **272**(30): 18558-63.
- Xu L, Singh BK, Conn EE (1988). Purification and characterization of acetone cyanohydrin lyase from *Linum usitatissimum*. *Arch Biochem Biophys* **263**(2): 256-263.
- Yang ZN, Bosron WF, Hurley TD (1997). Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: A glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J Mol Biol* **265**: 330-343.
- Zuegg J, Gruber K, Gugganig M, Wagner UG, Kratky C (1999). Three-dimensional structures of enzyme-substrate complexes of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Protein Sci* **8**(10): 1990-2000.

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer für die Arbeiten zur *LuHNL*

7.1.1 Klonierungsprimer

LuHNLNTerm4	5'-CGATAGAATTCAATGGCGTCTCTTCCTGTTA-3'
LuHNLNTerm7	5'-AGTTCAGAATCCGCGTCTCTTCCTGTTAGCT-3'
LuHNLCTerm3	5'-ACTGCAAGCTTGAATCAATAATCGTTCAACTTG-3'

7.1.2 Mutageneseprimer

Tabelle 10: Mutageneseprimer für die ortsgerichtete Mutagenese der *recLuHNL*

In der Sequenz der sense-Mutageneseprimer sind die mutierten Basen fett dargestellt. Zu jeder *LuHNL*-Mutante ist die korrespondierende Wildtyp (wt)-Sequenz mit dem kursiv gedruckten Codon für die zu ersetzende Aminosäure und der Startposition der gezeigten Sequenz dargestellt. Der antisense-Mutageneseprimer ist nicht gezeigt; seine Sequenz ist jeweils komplementär zum sense-Primer.

potentielles katalytisches Zentrum:	
wt	286 C CCT AAA ATC AAT GGG CAT GAA GGT GTT
H85A	5'- C CCT AAA ATC AAT GGG GCT GAA GGT GTT
wt	370 C GTG GCT CCG ACG TTA GGA GAG TGC C
T111A	5'- C GTG GCT CCG GCG TTA GGA GAG TGC C
ADH-Substratbindungsstelle:	
wt	332 GC CCG GAC ACG AAG AAC TTC AAA GTG GG
T98V	5'- GC CCG GAC GTG AAG AAC TTC AAA GTG GG

7.2 Verwendete Primer für die Arbeiten zur *SbHNL*

7.2.1 Primer für die 5'-RACE

S-Oxy5-24	5'-GGCTGGGCTTCCCTGTTCGCACGTGG-3'
S-Oxy20-24	5'-CCTTGTTCCACACCTCGGTGC-3'
S-Oxy21-21	5'-CCACCACAGCTCGAACATGCC-3'
oligodTanchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
anchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'

7.2.2 Primer für die TD-PCR

N-Term _{Pot} (degenerierter Primer)	5'-GA(GA)CA(CT)GA(CT)(AC)G(AGCT)AT(ACT)(CT)T(AGCT)GG (AGCT)(CT)T(AGCT)CC-3'
C23	5'-GAGTCCAGCTTGAATGAGCTCCC-3'

7.2.3 Primer für DNA-Sonde

N-Term1	5'-CGCGGCCGCTCGAGTACGCATGGAACAAAG-3'
C23	5'-GAGTCCAGCTTGAATGAGCTCCC-3'

7.2.4 Klonierungsprimer

PICZ α Soxy-NIICla	5'-GCATCGATCGAGGACGACCGC-3'
PICZ α Soxy-NCl α	5'-GCATCGATGGCCGTCTTCATCAGC -3'
PICZ α Soxy-CXba	5'-GATCTAGAGTAGAAGGGAGCCTCCA-3'
PICZBSoxy-NIIXho	5'-CCGCTCGAGGATCGAGGACGACCGC -3'
PICZ α Soxy-NXho	5'-CCGCTCGAGGATGGCCGTCTTCATCAGC-3'
PICZBSoxy-CXba	5'- GATCTAGAGTAGAAGGGAGCCTCCA-3'

7.2.5 Primer für Integrationsnachweis

α -Factor	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'
3'-AOX	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Alle verwendeten Primer wurden von MWG Biotech, München bezogen.

Die lyophilisierten Primer wurden in sterilem A.bidest. mit einer Endkonzentration von 100 pmol/ μ l gelöst und bei -20°C gelagert

Danksagung

Von vielen Personen sind mir im Verlauf meiner Dissertation fachlicher Rat, technische Hilfe und persönlicher Beistand zuteil geworden. Sie haben damit dazu beigetragen, dass meine Arbeit zur vorliegenden Form „reifen“ konnte. Bei ihnen möchte ich mich herzlich bedanken.

Insbesondere danke ich Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula für die Ermöglichung der Durchführung dieser Dissertation am Institut für Enzymtechnologie und für die aussergewöhnlich guten Arbeitsbedingungen - sowohl fachlicher als auch menschlicher Natur - an ihrem Institut.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl bedanke ich mich für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre konstruktiven Anregungen und die Koreferenz dieser Arbeit .

Herrn Priv.-Doz. Dr. Werner Hummel danke für die Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Harald Wajant für die überaus freundliche und hilfreiche Bereitstellung der *SbHNL*-cDNA und der rekombinanten *Pichia*-Stämme SMD1168 und GS115.

Desweiteren danke ich Simone Münch für ihre engagierte technische Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Heike Slusarczyk, Dr. Stefan Verseck und Dr. Bettina Riebel bin ich für ihre Ratschläge zu den molekularbiologischen Arbeiten und die kollegiale Atmosphäre im Labor 206 dankbar.

Bei Dr. Mara Bönitz bedanke ich mich für den aufmunternden Labor- und Büroalltag und die „moralische“ und tatkräftige Unterstützung in allen Zeiten. Ebenso bei den weiteren Kollegen der „Bürogemeinschaft“ Shukry Naamnieh und Sebastian Neumann für ihre rege Diskussionsbereitschaft und aufbauenden Worte.

Für ihre Hilfe bei den „technischen Dingen“ des Doktorandenlebens danke ich Andrea Weckbecker („Online-Dienst“), Dr. Thomas Linden („Design“) und Dr. Stephan Felber (Modelling). Dagmar Müller und Birgit Henßen danke ich für die Proteinsequenzierung.

Weiterhin danke ich Priv.-Doz. Dr. Joachim Grötzinger für die Unterstützung bei der computer-technischen Analyse der 3D-Struktur der *LuHNL*.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den übrigen Mitglieder meiner Arbeitsgruppe (insbesondere Peter Iwan, Elena Janzen, Lutz Krieg, Dr. Bettina Lingen, Konrad Odendahl, Maja Piqueray) und den weiteren (auch ehemaligen) Mitarbeitern des Instituts, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat geholfen und für eine sehr angenehme und nicht selten heitere Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Last but not least möchte ich mich herzlichst bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir in dieser Zeit, insbesondere an weniger erfolgreichen Tagen, zur Seite gestanden und mich unterstützt und ermutigt haben. Mit ihnen und auch vielen oben genannten „Kollegen“ habe ich manche schöne Tage ausserhalb des Institutes in Erinnerung.