# Biochemische Untersuchung des enzymatischen Verteidigungsmechanismus im Mittelmeerschwamm *A. cavernicola*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

# **Bartosz Lipowicz**

aus Langenfeld im Rheinland

Düsseldorf, Dezember 2012

aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Mama und meinen Papa

## Inhaltsverzeichnis

Von terrestrischen und marinen Naturstoffen	1
Ökologische Funktion sekundärer mariner Naturstoffe	2
Verteidigungs- und Schutzmechanismen im Tier- und Pflanzenreich	3
Schwämme der Gattung Aplysina	5
Vergleich der Inhaltsstoffmuster von A.aerophoba und A.cavernicola	5
Verletzungsinduzierte Biotransformationsreaktion der Aplysina-Schwämme	7
Nitrilhydratasen	9
Nitrilhydratasen in <i>Aplysina</i> -Schwämmen1	2
Zielsetzung der Arbeit1	3
Material und Methoden 1	3
Chemikalien und Materialien 1	3
Herkunft des Schwammmaterials1	6
Herkunft des verwendeten Substrats Aeroplysinin-11	7
HPLC1	7
Aktivitätsassay Nitrilhydratase1	8
Pufferäquilibrierung1	8
Zellaufschluss	20
Entsalzung2	21
Ammoniumsulfatfällung 2	21
Dialyse	22
Aufkonzentrierung	23
Abtrennung niedermolekularer Substanzen2	23
Bestimmung der Proteinkonzentration2	24
TCA Fällung2	24
Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)2	25
Wiederherstellung der Aktivität durch hitzeinaktivierte Proteinproben	27
Ionenaustauschchromatographie2	28
Ionenaustauschchromatographie für das Cosubstrat2	28
Ionenaustauschchromatographie für die Nitrilhydratase	0
Flammenabsorptionsspektroskopie	1
Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität3	2

Einfluss verschiedener Metallionen auf EDTA-inaktiviertes Enzym	33
pH Stabilität	33
Größenauschschlusschromatographie	34
Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
In Gel Anfärben	36
Überprüfung der Spezifität des Nachweises	38
Zweidimensionale Gelelektrophorese	39
Aktivitätsnachweis im Gel	40
Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität	41
Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität	42
Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität	44
Aktivitätsassay mit Aeroplysinin-1 Derivaten	45
Enzyminhibition durch Aeroplysinin-1 Derivate	47
Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Aeroplysininderivate	48
Temperaturabhängigkeit	49
Kinetikmessungen	50
Trypsin-Verdau und Massenanalyse der Nitrilhydratase	52
Auswaschen der Proteine	52
Trypsinverdau und Elution der Proteine	53
Massenanalyse	53
Synthese von Aeroplysinin-1 Derivaten	54
Acetylierung von Aeroplysinin-1	55
HP 20 Säulenchromatographie	. 56
Sephadex LH20 Säulenchromatographie	. 56
Kieselgel Säulenchromatographie	57
Semipräparative HPLC	. 57
HPLC-MS	. 58
GC-MS	58
NMR-Spektroskopie	. 59
rgebnisse	60
Pufferäquilibrierung	60
Zellaufschluss	61
Entsalzung	63
Ammoniumsulfatfällung	64
	Einfluss verschiedener Metallionen auf EDTA-inaktiviertes Enzym

Dialyse65
Wiederherstellung der Aktivität durch eine hitzeinaktivierte Proteinprobe
IEX der Protein-freien Fraktion67
Flammenatomabsorptionsspektroskopie69
Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität72
Einfluss verschiedener Metallionen auf EDTA-inaktiviertes Enzym
pH Stabilität74
Ionenaustausch-und Größenausschlusschromatographie für die Nitrilhydratase75
Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 5,8 ohne Aussalzen 75
Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 5,8 mit Aussalzen 82
Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 4,9 mit Aussalzen 87
Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 3,9 mit Aussalzen 92
Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese98
In Gel Anfärben101
Überprüfung der Spezifität des Nachweises103
Zweidimensionale Gelelektrophorese
Aktivitätsnachweis im Gel
Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität
Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität 111
Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität116
Aktivitätsassay mit Aeroplysinin-1 Derivaten
Enzyminhibition mit Aeroplysinin-1 Derivaten
Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Aeroplysininderivate119
Temperaturabhängigkeit
Kinetikmessungen
Trypsin Verdau und Massenanalyse der Nitrilhydratase
Diskussion
Verletzungsinduzierte Biotransformation in Aplysina-Schwämmen
Aufreinigung der Nitrilhydratase aus dem Schwamm A.cavernicola
Zellaufschluss und Entsalzung126
Ammoniumsulfatfällung, Dialyse und Wiederherstellung der Aktivität durch eine hitzeinaktivierte Probe
Ionenaustauschchromatographie der proteinfreien Fraktion
Flammenatomabsorptionsspektroskopie

Ionenaustauschchromatographie für die Nitrilhydratase
Größenausschlusschromatographie für die Nitrilhydratase
Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese130
In Gel Anfärben131
Zweidimensionale Gelelektrophorese und Aktivitätsnachweis im Gel
Charakterisierung der Nitrilhydratase aus dem Schwamm A.cavernicola
pH und Temperaturoptima132
pH Stabilität
Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität134
Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität
Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität 135
SubstratSpezifität und die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Derivate
Vinatikmassungan
Tampin Verden and Messeneneluse der Nitrilhudretese
Ölerle sierle Euroltien der Nitrillerdertere
Okologische Funktion der Nitriinydratase
Zusammenfassung
Summary
Referenzen
Anhang
Danksagung
Lebenslauf
Erklärung

Inhaltsverzeichnis

### Von terrestrischen und marinen Naturstoffen

Die Natur ist seit jeher die Quelle zur Befriedigung der grundlegenden menschlichen Bedürfnisse, wie zum Beispiel Nahrung und Kleidung, aber auch von Medizin. Der Mensch hat im Laufe der Zeit durch das Probieren der unterschiedlichsten Tier- und Pflanzenteile gelernt, welche der vorhandenen Pflanzen wann zu verwenden sind und welche als Heilkräuter ungeeignet sind. Die ersten Aufzeichnungen über die Verwendung von Drogen sind über vier Tausend Jahre alte Tontafeln aus dem Zweistromland, die unter anderem von der Verwendung der Süßholzwurzel (Glycyrrhiza glabra ) und des Schlafmohns (Papaver somniferum) sprechen (Cragg and Newman 2005). Diese Drogen sind noch heute in Verwendung, zum Beispiel die Süßholzwurzel als Teedroge oder als Ausgangsdroge für als Lakritz und der Schlafmohn Ausgangsdroge zur Extraktion verschiedener Morphinalkaloide, unterschiedlichster Wirkung.

Vom Papyrus Ebers, einer Textsammlung mit über 700 Hundert pflanzenbasierten Arzneien aus dem 15 Jahrhundert vor Christus, über die Arbeit Galenus, bis hin zu den mittelalterlichen Klöstern, wurde das Wissen über die Benutzung von Heilpflanzen aufgeschrieben, erweitert und weitergegeben. Der Begriff "Klostermedizin", der für die Medizin des Abendlandes im Mittelalter steht, verdeutlicht die Bedeutung der Klöster in dieser Zeit.

Mit der Benutzung der Drogen, kam mit der Zeit auch das Interesse an den Inhaltstoffen (Butler 2004). Dies führte im 19. Jahrhundert zur Isolierung diverser pharmakologisch aktiver und pharmazeutisch relevanter Naturstoffe, wie Morphin, Chinin und Reserpin, die auch heute, nach mehr als 150 Jahren, noch von Bedeutung sind.

In dieser ganzen Zeit galt dem Meer, als mögliche Quelle neuer Arzneien, kaum Interesse. In der Volksmedizin gab es über die Jahrtausende nur wenige arzneiliche Nutzungen aus der marinen Umwelt (Dias, Urban et al. 2012). So wurden zum Beispiel Aufgüsse aus den Rotalgen *Chondrus crispus* und *Mastocarpus stellatus* bei Erkrankungen der oberen Atemwege verwendet.

Die ersten nennenswerten Reinsubstanzen, die aus Meeresorganismen, in diesem Fall der in der Karibik vorkommende Schwamm *Cryptotheca crypta*, isoliert wurden, waren Spongouridin und Spongothymidin, zwei Nucleosidanaloga, die als Leitsubstanzen für das später entwickelte Virustatikum Ara-A dienten. Mit dem rasant fortschreitendem

technologischem Fortschritt in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts und der Entwicklung neuer Technologien zur Erschließung des Meeres, wie bemannter Tauchboote oder ferngesteuerter Unterwasserfahrzeuge (ROV) (Dias, Urban et al. 2012), wurde das Augenmerk der Naturstoffforscher immer mehr auf marine Organismen gelenkt. Mittlerweile wurden, neben Ara-A, noch weitere Substanzen aus marinen Organismen, oder deren Derivate, auf den Arzneimittelmarkt gebracht, oder befinden sich in klinischen Studien. So sind zum Beispiel Ziconotid unter dem Handelsnamen Prialt<sup>®</sup> als Anagetikum, Trabectedin unter Yondelis<sup>®</sup> als Chemotherapeutikum und Omega-3-fettsäureethylester unter Lovaza<sup>®</sup> bei Hyperlipidämie käuflich erhältlich. Die in klinischen Studien befindlichen Substanzen sind fast allesamt zur Anwendung bei Krebs gedacht. Unter den gerade klinisch geprüften Substanzen zeigt sich, dass die Quellen aus denen diese erhalten wurden, nicht nur Schwämme, sondern auch Manteltiere, Mollusken, Korallen, Moostierchen, Würmer und Pilze umfassen (Gerwick and Moore 2012). Bei dieser Vielfältigkeit und der Tatsache, dass mehr als ein Drittel der Erdoberfläche von Wasser bedeckt ist, ist die Erwartung und Hoffnung groß, viele weitere Substanzen zumindest als Leitstrukturen für die großen Krankheiten des 21. Jahrhunderts, wie Krebs, neuen wie alten Viruserkrankungen, oder auch geriatrischen Erkrankungen, die mit der Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung ebenfalls zunehmen werden, zu entdecken.

## Ökologische Funktion sekundärer mariner Naturstoffe

Sekundäre Naturstoffe unterscheiden sich von primären dadurch, dass sie für das Wachstum, die Entwicklung und Reproduktion nicht von essentieller Bedeutung sind (Dias, Urban et al. 2012). Jedoch können diese von großer Bedeutung für das Wohl des produzierenden Organismus sein, indem die Sekundärmetabolite aufgrund von Toxizität vor Fraßfeinden schützen, oder durch ihre Färbung andere Spezies anlocken oder warnen (Derwick 2009).

Interessanterweise gibt es Substanzen, die einerseits schützend vor Fraßfeinden wirken und gleichzeitig von anderen Lebewesen als Locksignal für das Vorhandensein von Nahrung wahrgenommen werden. Einer der Hauptmetabolite des karibischen Seetangs *Chlorodesmis fastigiata* wirkt abschreckend auf Fische, dient aber gleichzeitig als Signal für die Krabbe *Caphyra rotundifrons*, welche sich ausschließlich von diesem Seetang ernährt (Hay 2009). Ein weiteres Beispiel dieser Art bietet die Schnecke *Tylodina perversa*, ein spezialisierter Fraßfeind von *Aplysina*-Schwämmen, welche einen hohen Anteil an fraßhemmenden

2

Alkaloiden enthalten, die die Sekundärmetabolite ihrer Nahrung selber im Gewebe als Schutz vor größeren Feinden lagert (Ebel, Marin et al. 1999). Anders als bei *Tylodina perversa* gibt es eine Krebsart, *Pseudamphithoides incurvaria*, die sich nicht durch die Akkumulation artfremder Metabolite schützt, sondern mit einem Seetang bedeckt, welcher wiederrum eine Substanz mit fraßhemmender Wirkung besitzt (Hay, Duffy et al. 1990).

Eine weitere wichtige Rolle kommt zum Beispiel auch der chemisch vermittelten Verständigung zu. So können einige Meerestiere an noch unbekannten Substanzen, die im Urin ausgeschieden werden, erkennen, wenn sie ein Tier antreffen, mit dem sie bereits einmal in eine Auseinandersetzung geraten sind. Sie verhalten sich dementsprechend dominant oder unterwürfig, in Abhängigkeit davon, ob sie das erste Aufeinandertreffen gewonnen oder verloren haben (Hay 2009).

Eine Gefahr für marine Organismen stellt das Fouling dar. Fouling beschreibt den Bewuchs von Oberflächen, wie zum Beispiel Steinen oder auch marinen Organismen, wie Schwämmen, durch Mikro- als auch Makroorganismen (zum Beispiel Bakterien und Algen), beschränkt sich aber nicht nur auf natürliche Oberflächen, da auch der Bewuchs von künstlichen Oberflächen, wie Schiffsrümpfen, vorkommt. Bei Schwämmen kann das Fouling lebensbedrohlich sein, wenn der Bewuchs die Ostien, der für die Nahrungsaufnahme verantwortlichen Kanäle, betrifft und somit die Nahrungszufuhr verhindert. Die Naturstoffchemie hat aber gezeigt, dass eine Großzahl der isolierten marinen Naturstoffe eine Antifouling Aktivität aufweisen (Fusetani 2011).

## Verteidigungs- und Schutzmechanismen im Tier- und Pflanzenreich

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich Primär- und Sekundärmetabolite in ihrer Funktion. Jedoch bildet der Primärstoffwechsel (der Stoffwechsel, der die Primärmetabolite biosynthetisiert) generell die Vorstufen vieler sekundärer Inhaltssstoffe (Iriti and Faoro 2009). Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die zum Schutz vor antimikrobiellem Befall gebildet werden, kann man in zwei Gruppen einteilen, die Phytoanticipine und Phytoalexine. Die Phytoanticipine beschreiben Substanzen, die entweder vor dem Befall schon in der Pflanze vorhanden sind, oder nach dem Befall aus Vorstufen gebildet werden. Phytoalexine hingegen sind Substanzen, die erst nach dem Befall de novo synthetisiert und gespeichert werden (Iriti and Faoro 2009).

Hierin wird ein grundsätzlicher Unterschied zwischen zwei verschiedenen Arten von Abwehrmechanismen deutlich, einerseits der konstitutiven und andererseits der induzierten Abwehr. Zu den konstitutiven Verteidigungsmechanismen zählt nicht nur die konstante Einlagerung von chemischen Substanzen, sondern auch die Ausbildung von mechanischen Abwehrbarrieren, wie zum Beispiel Stacheln. Solche Schutzmechanismen werden gebildet, wenn der Organismus einem stetigen Druck ausgesetzt ist (Hay and Fenical 1988). Anders sieht es bei der induzierten Abwehr aus, wobei die Abwehrsubstanzen erst nach dem Auftreten eines Reizes neu gebildet werden. Dies bedeutet wiederum, dass diese Abwehr für den akuten Notfall ungeeignet ist, da die Synthese Zeit erfordert und somit die Substanzen den Organismus auf zukünftige Angriffe vorbereiten. Zu den Phytoanticipinen zählen nicht nur Substanzen, die zur induzierten Abwehr gehören, sondern auch zu einer weiteren, dritten Art des Schutzes, der aktivierten Abwehr. Die aktivierte Abwehr zeichnet sich durch ihre Schnelligkeit aus. Dabei werden aus gespeicherten Vorstufen in einer direkten Antwort auf einen Angriff in kurzer Zeit Toxine gebildet (Paul and Van 1992).

Saponine, eine pharmazeutisch wichtige Pflanzeninhaltsstoffgruppe, sind ein in der Pflanzenwelt weit verbreitetes Beispiel für die konstitutive Abwehr gegen Mikroorganismen. Als Eigenschutz vor der Wirkung der Saponine, werden diese in speziellen Zellorganellen gespeichert. Die Saponine entfalten ihre Wirkung durch Interaktion mit den Zellmembranen von Mikroorganismen, wodurch deren Zellwände destabilisiert werden.

Ein gut untersuchtes Model für die induzierte Abwehr ist die Gartenbohne, *Phaseolus vulgaris*, die sich vor dem Pilzbefall mit *Colletotrichum lindemuthianum* durch die Bildung von unterschiedlichen Isoflavonoiden schützt (Iriti and Faoro 2009). Cyanogene Glykoside stellen ein gutes Beispiel für die aktivierte Abwehr dar. Diese Glykoside kommen in über 2500 unterschiedlichen Pflanzengattungen vor (Zagrobelny, Bak et al. 2008) und werden enzymatisch nach einer Gewebeverletzung aus speziellen Zellorganellen freigesetzt, kommen dadurch mit einer entsprechenden Glukosidase und anschließend mit einer Lyase in Kontakt, was letztendlich zur Bildung von Blausäure führt, welche als Atmungsgift wirkt.

Ein weiteres Beispiel dieser Art der verletzungsinduzierten Biotransformationsreaktion ließ sich erstmals im marinen Umfeld in der karibischen Grünalge *Halimeda ssp.* finden (Paul and Van 1992). Die Alge enthält genuin als einen der Hauptmetabolite das Diterpen Halimedatetraacetat, welches nach Gewebsverletzung zum stärker fraßhhemmenden Halimedatrial umgesetzt wird. Bei Schwämmen wurde solch eine Reaktion erstmals 1993 für den Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba* postuliert (Teeyapant and Proksch 1993). Auf einen Teilschritt dieser Reaktion wird im Folgenden weiter eingegangen.

### Schwämme der Gattung Aplysina

Schwämme der Gattung *Aplysina* sind weit verbreitet und kommen sowohl in der Karibik, als auch im atlantischen Ozean und Mittelmeer vor (Pawlik, Chanas et al. 1995). Die Inhaltsstoffmuster der verschiedenen Arten sind gut untersucht und weisen unter anderem unterschiedliche bromierte, von Tyrosin abgeleitete, Isoxazolinalkaloide auf (Ciminiello, Costantino et al. 1994; Ciminiello, Dell'Aversano et al. 1996; Ciminiello, Fattorusso et al. 1997; Ciminiello, Dell'Aversano et al. 1999; Ciminiello, Dell'Aversano et al. 2001). Die im Mittelmeer vorkommenden und dort einen Großteil der Schwammpopulation ausmachenden Arten sind *A.aerophoba* und *A.cavernicola*. Der Erstgenannte bevorzugt als Lebensraum flachere Gewässer von bis zu 15 m Tiefe und der zweite tiefer gelegene und abgedunkelte Orte und Höhlen in einer Tiefe von bis zu 40 m (Wilkinson 1979; Thoms, Ebel et al. 2003).

## Vergleich der Inhaltsstoffmuster von A.aerophoba und A.cavernicola

Aufgrund ihrer sehr ähnlichen morphologischen Eigenschaften war es eine Zeit lang umstritten, ob die Schwämme *A.aerophoba* und *A.cavernicola* zwei verschiedene Arten bezeichnen.

Ciminiellos Untersuchung von zwei in situ klar voneinander unterschiedenen Aplysina Spezies, die als *A.aerophoba* und *A.cavernicola* identifiziert wurden, zeigten deutlich die Unterschiede in den Inhaltsstoffspektren der beiden Arten auf (Ciminiello, Fattorusso et al. 1997). Den Hauptunterschied im Alkaloidmuster machen demnach Aerothionin (1) und Isofistularin-3 (2) aus. Aerothionin (1) stellt den Hauptanteil der Isoxazolinalkaloide von *A.cavernicola* aus, während es aus Schwämmen der zweiten Mittelmeerart- wenn überhauptlediglich in verschwindend geringen Mengen isoliert werden kann. Im Gegensatz dazu steht Isofistularin-3 (2), welches einen Hauptmetaboliten von *A.aerophoba* ausmacht. Neben dem Alkaloidmuster kann man die beiden Schwammarten auch anhand ihrer zwei typischen Schwammpigmente unterschieden. Während *A.aerophoba* sich durch das polymerisierende Farbpigment Uranidin (5) an der Luft dunkel verfärbt (Cimino, De et al. 1984), bleibt diese Reaktion in *A.cavernicola*, welcher stattdessen 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure (6) akkumuliert (Thoms, Ebel et al. 2003; Thoms, Wolff et al. 2004), aus.



Abbildung 1: Typische Inhaltsstoffe der Mittelmeerschwämme *A.aerophoba* und *A.cavernicola*, sowie deren typische Farbpigmente.

## Verletzungsinduzierte Biotransformationsreaktion der Aplysina-Schwämme

Im Jahr 1993 wurde erstmals eine enzymatische Umsetzung der Hauptmetabolite von *A.aerophoba* postuliert (Teeyapant and Proksch 1993). Extrakte des Schwammes zeigten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Proben, zum Beispiel mit Säure oder durch Hitzezufuhr, unterschiedliche Gehälter an Isoxazolinalkaloiden und den Reaktionsprodukten. Weitere Untersuchungen (Weiss, Ebel et al. 1996; Ebel, Brenzinger et al. 1997; Thoms, Ebel et al. 2006) bestätigten den enzymatischen Abbau der Alkaloide.

Der enzymatische Abbau der Isoxazolinalkaloide führt zur Bildung von Aeroplysinin-1 (3), welches wiederum weiter zu einem Dienon (4) umgesetzt wird. Diese Abbaureaktion ist für den Schwamm insofern wichtig, als die genuin enthaltenen Alkaloide eine fraßhemmende Eigenschaft besitzen (Thoms, Wolff et al. 2004), die den Schwamm vor eventuellen Angriffen schützen sollen und die Abbauprodukte antibiotische und cytotoxische Eigenschaften aufweisen (Teeyapant, Woerdenbag et al. 1993), die den Schwamm nach einem erfolgten Angriff vor einem möglichen mikrobiellem Befall schützen sollen.

Seit der Dissertation von Teeyapant im Jahr 1994 (Teeyapant 1994) arbeiteten noch weitere Doktoranden im Arbeitskreis Prof. Dr. Proksch (in Würzburg wie auch in Düsseldorf) an der Abbaureaktion und konnten in der Zeit beweisen, dass die genannte Reaktion erstens enzymkatalysiert und zweitens verletzungsinduziert ist, was zwischenzeitlich in der Literatur bezweifelt wurde (Puyana, Fenical et al. 2003).

Ebel erbrachte in seiner Arbeit den wichtigen Beweis, dass es sich bei der Abbaureaktion der Isoxazolinalkaloide um eine artspezifische Reaktion handelt, die mit Enzymextrakten anderer Schwamm Familien und Gattungen nicht abläuft (Ebel 1998).

Während dieser Arbeiten lag das Hauptaugenmerk auf dem ersten Schritt der Reaktion, der Spaltung des Spirozyklus und der Bildung des Nitrils. Erste Charakterisierungsversuche von Teeyapant, Ebel und Fendert (Teeyapant 1994; Fendert 2000) ermittelten für das Isoxazolinspaltende Enzym

Temperatur- und pH-Optima bei 50 °C und pH 5,8. Zudem wurde von Ebel und Fendert die Substratspezifität untersucht, die ergab, dass Substrate mindestens drei Charakteristika erfüllen müssen, um vom Enzym akzeptiert zu werden. Zum einen muss das Spirohexadienonisoxazolin-Ringsystem intakt sein, zweitens muss eine Säureamid-Seitenkette vorliegen und drittens müssen die Position 1 des Cyclohexadienon-Rings hydroxyliert und die Kohlenstoffe zwei und vier bromiert vorliegen. Die Charakterisierung des Enzyms erfolgte in den oben genannten Arbeiten jeweils mit einem Enzymrohextrakt,



Abbildung 2: Verletzungsinduzierte Biotransformation der Hauptalkaloide in Aplysina-Schwämmen am Beispiel von Isofistularin-3 nach Teeyapant und Proksch 1993 (Teeyapant and Proksch 1993).

wobei eine Aufreinigung des für die Reaktion verantwortlichen Enzyms in keiner der Arbeiten gelang. Erst mit der Arbeit von Frau Putz im Jahr 2009 konnte ein Erfolg, was die Aufreinigung betrifft, verbucht werden (Putz 2009). Sie konnte aus dem Rohextrakt durch differentielle Ultrazentrifugation, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie und anschließendem Western Blot fünf Proteine identifizieren, die eine Affinität zum Substrat Aerophobin-2 aufweisen. Eine anschließende Massenanalyse der Proteine konnte eines der Proteine als Actin identifizieren.

Das Enzym, das in der zweiten Reaktion Aeroplysinin-1 (3) zum Dienon (4) umsetzt, wurde zuletzt von Fendert (Fendert 2000) im Jahr 2000 charakterisiert. Seine Ergebnisse zu dem Thema werden weiter unten zusammengefasst.

## Nitrilhydratasen

Bereits in den 70 iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde in Versuchen mit Zellen von Corynebacterium (Fukuda, Fukui et al. 1971) und Nocardia rhodochrous (DiGeronimo and Antoine 1976) festgestellt, dass Nitrile zu den korrespondierenden Säureamiden umgesetzt werden. Das verantwortliche Enzym wurde allerdings erst Anfang der 1980 iger Jahre von Asano isoliert und als Nitrilhydratase bezeichnet (Asano, Tani et al. 1980; Asano, Fujishiro et al. 1982). 1982 wurde ebenfalls von Asano eine Methode zur enzymatischen Herstellung von Acrylamid vorgestellt (Asano, Yasuda et al. 1982), wodurch die Herstellung diverser Säureamide revolutioniert wurde (Prasad and Bhalla 2010). Der Vorteil, den die neue Methode brachte, lag in den Reaktionsbedingungen. Die enzymatische Umwandlung erfolgte in einem wässrigen, fast neutralen Milieu, bei Temperaturen von unter 30 °C und führte mit einer sehr hohen Ausbeute zu den gewünschten Produkten. Im Gegensatz dazu stand die chemische Umsetzung, für die entweder stark saure oder basische Katalysatoren bei Temperaturen von über 200 °C unter großem Druck verwendet werden mussten und die eine geringe Ausbaute lieferte. Die heutige Produktion von Acrylamid unter Verwendung einer Nitrilhydratase beläuft sich auf mehrere hunderttausend Tonnen im Jahr (van, Quignard et al. 2008). Nicotinamid wird ebenfalls in einem Maßstab von mehreren tausend Tonnen pro Jahr hergestellt (Shaw, Robins et al. 2003).

In der Natur liegt die Rolle der Nitrilhydratasen in der Stickstoffversorgung von Microorganismen (Nagasawa and Yamada 1989; Hjort, Godtfredsen et al. 1990; Kobayashi, Yanaka et al. 1992; Shaw, Robins et al. 2003). Dabei ist die Nitrilhydratase Teil eines Enzymsystems, dass ein Nitril zunächst durch die Nitrilhydratase in das korrespondierende Säureamid umwandelt und dann durch ein weiteres Enzym, eine Amidase, das Säureamid zur entsprechenden Carbonsäure und Ammoniak abbaut (Martinkova and Kren 2002). Eine zweite Möglichkeit der Biotransformationsreaktion von Nitrilen ist der Abbau durch sogenannte Nitrilasen, die Nitrile ohne ein Zwischenprodukt in die korrespondierende Säure umwandeln (Mahadevan and Thimann 1964; Thimann and Mahadevan 1964). Somit gibt es zwei verschiedene Wege des Nitrilabbaus zur Stickstoffgewinnung in der Natur.

Ein Großteil der bis heute isolierten und charakterisierten Nitrilhydratasen stammt aus Bakterien der Stämme Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria und Firmicutes. Zusätzlich ist diese Enzymklasse auch aus Pilzen bekannt. Neueste Untersuchungen zeigten, dass für die Nitrilhydratase codierende Gene auch in weiteren Eukaryoten gefunden werden konnten. Foerstner et al. entdeckten 2008 in Kragengeißeltierchen, der mit den Metazoa engsten Verwandten, entsprechende Genmuster, die für eine Nitrilhydratase codieren (Foerstner, Doerks et al. 2008). Weitere Untersuchungen in diese Richtung ergaben 2012, dass entsprechende Genmuster in mehreren übergeordneten eukaryotischen Gruppen (,eukaryotic supergroups' (Adl, Simpson et al. 2005)) gefunden werden konnten (Marron, Akam et al. 2012). Die Autoren der Arbeit gestehen jedoch ein, dass über die Funktion und entsprechende natürliche Substrate der theoretisch gefundenen Nitrilhydratase überhaupt nichts bekannt ist.

Nitrilhydratasen können in zwei Gruppen eingeordnet werden: in die Eisen- oder Cobalthaltigen Nitrilhydratasen. Sie sind im Normalfall aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt, deren Größe ungefähr bei 27 kDa liegt. Diese können dann in di- oder tetrameren Zuständen vorliegen. Die Größe der Nitrilhydratasen variiert zwischen 54 und 530 kDa. Eine kürzlich isolierte Nitrilhydratase mit einer Größe von 430 kDa besteht aus insgesamt sechs Untereinheiten und weist die Besonderheit auf, dass es im katalytischen Zentrum ein Cobalt, zwei Kupfer und ein Zink Atom pro Enzymmolekül enthält (Okamoto and Eltis 2007). Die meisten Nitrilhydratasen sind thermolabil und weisen Temperaturoptima zwischen 20 und 35 °C auf. Für die Biosynthese einer Nitrilhydratase ist das Vorhandensein der entsprechenden Zentralatome unerlässlich (Song, Yuan et al. 2008; Rzeznicka, Schaetzle et al. 2010).

Eine Strukturanalyse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zeigte, dass es einen hochkonservierten Bereich in der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheiten gibt. Die Metall-bindende Domäne weist folgende Sequenz auf VC(T/S)LCSC(Y/T), die für alle Nitrilhydratasen, egal ob Cobalt- oder Eisen-abhängig, gleich ist. Die Cobalt-abhängigen Nitrilhydratasen weisen Threonin und Tyrosin als dritte und achte Aminosäure auf, während die Eisen-abhängigen Serin und Threonin enthalten (Prasad and Bhalla 2010). Der Grund für die Einlagerung eines der beiden Metalle in das katalytische Zentrum ist bisher nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass der Austausch von Eisen durch Cobalt in einer Eisen-abhängigen Nitrilhydratase zu einem Aktivitätsverlust (Nojiri, Nakayama et al. 2000) führt.







Abbildung 3: a) ,Inner-sphere mechanism'; b) ,Outer-sphere mechanism' ; c) ,Second outer-sphere mechanism' nach Huang et al. 1997

Der Reaktionsmechanismus der Nitrilhydratasen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden momentan drei Reaktionsmodelle, "Inner-sphere mechanism", "Outer-sphere mechanism" und "Second outer-sphere mechanism" nach Huang et al. (Huang, Jia et al. 1997), diskutiert.

Im ersten Mechanismus ersetzt das Nitril einen enzymassoziierten Hydroxid-Liganden des Metallions und wird anschließend von einem Wassermolekül hydrolisiert. Daraus entsteht in einer Zwischenstufe ein Iminol, welches sich zum Amid umstrukturiert.

Im zweiten möglichen Reaktionsmechanismus kommt es zu einem nucleophilen Angriff des enzymassoziierten Hydroxid-Liganden am Nitril-Kohlenstoff. Es entsteht ein Iminolation, welches über die Sauerstofffunktion des Iminolats am Metallion gebunden ist. Nach einer Neuanordnung zum Amid, wird das Produkt aus dem katalytischen Zentrum entlassen.

Im dritten möglichen Fall, wird ein freies Wassermolekül, welches sich in der Nähe des katalytischen Zentrums befindet, vom Hydroxid-Liganden deprotoniert. Die folgende Hydrolyse wird dann vom neu entstandenen Hydroxidion durchgeführt.

## Nitrilhydratasen in Aplysina-Schwämmen

Die Charakterisierung des Enzyms, das Aeroplysinin-1 (3) zum Dienon (4) abbaut, erfolgte durch Fendert, wie schon beim bereits besprochenen Isoxazolinin-spaltendem Enzym, ebenfalls mit einem Enzymrohextrakt, welcher über eine PD-10 Säule zusätzlich entsalzt wurde. Als funktionale Temperatur- und pH-Optima wurden 20 bis 30 °C und ein pH-Bereich von 7,0 bis 7,5 ermittelt. Das Stabilitätsoptimum des Enzyms wurde in einem Lagerungsversuch bei pH 8 angesiedelt. Auch für dieses Enzym wurden Versuche zur Substratspezifität durchgeführt, wobei sich hier zeigte, dass es spezifisch zu sein scheint, da es nur das natürliche Substrat umsetzte. Jedoch wurden für den Versuch nur entfernt vergleichbare Substrate verwendet, sodass keine genauen Aussagen darüber getroffen werden konnten, welche Voraussetzungen ein Molekül haben muss, um vom Enzym transformiert zu werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedenster Agenzien auf die enzymatische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse legten nahe, dass im aktiven Zentrum des Enzyms Schwefelhaltige Aminosäuren bei der Reaktion eine Rolle spielen und dass mehrwertige Kationen an der Reaktion beteiligt sind. Sehr interessant war ein Experiment zur Klärung, ob die Hydrolyse von Aeroplysinin-1 (3) unter Einbeziehung der Hydroxylgruppe an Postion 1 abläuft, was

unter den gewählten Reaktionsbedingungen aus dem erhaltenen Ergebnis geschlossen wurde. Bei diesem Versuch wurde der Umsatz von Aeroplysinin-1 (3) zum Dienon (4) in deuteriertem Wasser durchgeführt und mit einem Parallelansatz mit normalem Wasser verglichen. Es wurde vermutet, dass eine intramolekulare Wasserumlagerung dann bewiesen ist, wenn das entstandene Produkt ein um zwei Masseneinheiten geringeres Masse-Ladungsverhältnis aufweist, als ein Produkt, welches durch deuteriertes Wasser, also Wasser aus dem Lösungsmittel, hydrolisiert wurde. Untersuchungen zur Enzymkinetik ermittelten einen ungewöhnlich hohen K<sub>m</sub>-Wert von 84 mM.

Obwohl in Fenderts Arbeit das Enzym nicht isoliert werden konnte, postulierte er, dass es sich bei dem gesuchten Enzym um eine Nitrilhydratase handeln muss, da die ablaufende Reaktion, die Bildung eines Säureamids aus dem korrespondierenden Nitril, typisch für eine Nitrilhydratase ist.

## Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Isolierung und Charakterisierung der Nitrilhydratase aus dem Schwamm *Aplysina cavernicola*.

Es sollte einerseits ein Reinigungsprotokoll entwickelt werden, welches es erlaubte, die Nitrilhydratase aus einem Enzymrohextrakt zu isolieren. Als zweites sollten Untersuchungen bezüglich des zentralen Metallions unternommen werden, um dieses zu bestimmen. Drittens sollte das isolierte Enzym biochemisch charakterisiert werden.

## **Material und Methoden**

## **Chemikalien und Materialien**

## Allgemeine Materialien

- Pipettenspitzen (2,5µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg
- Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg
- Multipette Plus, Eppendorf AG, Hamburg
- Combitips Plus, Eppendorf AG, Hamburg

- Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), Eppendorf AG, Hamburg
- Konische Probenröhrchen ,Falcon tubes' (15 und 50 ml), Beckton Dickinson GmbH
- Mikrotiterplatten 96 Näpfchen, Greiner

## Chemikalien

Tabelle MM 1 listet alle Chemikalien auf, die für Puffer, Elektrophoresen, die Synthese und Chromatographie verwendet wurden.

Chemikalien	Hersteller
2-(N-morpholino)ethansulfonsäure	Roth
(MES)	
4-(2-hydroxyethyl)-1-	Roth
piperazine inansultonsaure (HEPES)	C' 411 ' 1
2-Hydroxy-4-metnoxybenzaldenyd	Sigma-Aldrich
Acetanhydrid z.S	Merck
Aceton	Acros Organics
Acrylamid/Bis-solution 30%	Roth
Aluminiumsulfathydrat	Roth
Ammoniak 25%	Grüssing
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ammoniumsulfat, p.a.	Acros Organics
Benzylchlorid z.S.	Merck
Bis(2-hydroxyethyl)amino-	Sigma-Aldrich
tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	
Blei(IV)-tetraacetat p.a.	Sigma-Aldrich
Bovines serum albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Riedel-deHaen
Citronensäuremonohydrat	Grüssing
Chloroform p.a.	VWR
Ciprofloxacin p.a.	Fluka
Cobalt(III)chlorid	Merck
Coomassie Brilliant blue G 250	Roth
Dichlormethan	VWR
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Eisen(II)sulfatheptahydrat	Fluka
Eisen(III)chlorid	Fluka
Essigsäure 99-100 %	VWR
Ethanol absolut	Prolabo
Ethylacetat p.a.	VWR
Ethylendiaamintetraessigsäure	Merck
Formaldehyd p.a.	VWR

Glycerol	Poth	
Clycin n a	Roth	
Hippursöura 08 %	Sigma Aldrich	
Hydroxylaminhydrochlorid n a	Applichem	
Kaliumaarhanat wagaarfrain a	Applichent VWD	
Kaliumhudrovid na		
Kunfar(II)gulfataantahydrat		
Mangan (II) sulfatman abudrat	V W K Morol	
Mathemal (HDLC)	Drolaho	
Mileheäure 00 % DAD	Prolado	
Minchsaule 90 % DAB	Caelo	
NanoPure Wasser"	Invitus and	
NativeMark Unstained Protein Standard	Invitrogen	
Natriumacetat p.a.		
Natriumchlorid	J.I.Baker	
Natriumhydroxid	J.T.Baker	
Natriumthiosulfatpentahydrat p.a.	Roth	
Nickel(II)chloridhexahydrate	Merck	
PageRulerTM prestained protein ladder (10 to 170	Fermentas	
KDa) Palladium/Aktivkable 10% Pd	March	
Dhearthears	AgaliChaga	
Phosphorsaure 85 %	AppliChem	
Ponceau S	Roth	
Pyriainiumoromiaperoromia z.S.	Merck	
Pyridin wasserfrei	VWR	
Ritampicin p.a.	AppliChem	
Salzsaure 37%	Sigma-Aldrich	
Schwefelsäure (95 %)	Sigma-Aldrich	
SDS ultra pure	Roth	
Silbernitrat > 99,9%	Roth	
Tetramethylethylendiamin	Merck	
Tetrazyklin p.a.	Sigma-Aldrich	
Trichloressigsäure	Roth	
N-( <u>Tri</u> (hydroxymethyl)methyl)gly <u>cin</u> (Tricin)	Sigma-Aldrich	
Trifluoressigsäure (99%)	Prolabo	
Tri-Natriumcitrat	Prolabo	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich	
Vancomycin p.a.	AppliChem	
Zink(II)chlorid	Sigma-Aldrich	
β-Mercaptoethanol	Roth	

Tabelle MM 1: Verwendete Chemikalien.

Das für alle Puffer und biochemischen Experimente verwendete Wasser wurde vor Benutzung durch Ionenaustauschchromatographie (NANOpure, Barnstead gereinigt) und wird nachfolgend als Nanopure Wasser bezeichnet.

## Geräte

Forma Scientific Amersham Biosciences System Syngene
Amersham Biosciences System Syngene
System Syngene
Orion
Sartorius
Varian
Büchi
Grant
IKA
Pharmacia Biosystems
UniEqip GmbH
Labtech
Bandelin
Beckmann
Beckmann
Camag
IKA
IKA
Eppendorf
Heraeus
Heraeus

## Herkunft des Schwammaterials

Das für die Untersuchungen verwendete Schwammaterial wurde Ende Oktober 2009 vor der Küste der italienischen Mittelmeerinsel Elba von Mitarbeitern der auf der Insel befindlichen Meeresstation Hydra gesammelt. Nach Angaben der dortigen Mitarbeiter wurde das Schwammaterial an der gleichen Stelle gesammelt wie neun Jahre zuvor, als mehrere Individuen des Schwammes *Aplysina cavernicola* für Dr. Carsten Thoms, in einer Tiefe von 40 m vor dem "Capo di Fonza", gesammelt wurden.

Das gesammelte Schwammmaterial wurde nach der Bergung sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht mit Trockeneis an die HHU Düsseldorf geschickt. Die einzelnen Schwammindividuen wurden gefriergetrocknet, von Schmutz, Salz und angelagerten Meeresorganismen, wie Krustentieren, gesäubert, gemörsert und bei -80 °C gelagert.

## Herkunft des verwendeten Substrats Aeroplysinin-1

Das für die diese Arbeit verwendete Aeroplysinin-1 wurde während der Promotionsarbeit von Dr. Carsten Thoms isoliert. Die daraus hergestellte Substratlösung wurde in einer Konzentration von 0,1 % in Methanol hergestellt und im Tiefkühlfach bei -20 °C gelagert.

## HPLC

Die Untersuchung derenzymatischen Aktivität des Schwammaterials erfolgte mittels der High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Das verwendete System bestand aus einer Waters 510 Pumpe, einem Waters 717plus Autosampler, einem Säulenofen K3, der Firma TechLab, einer Säule der Firma Knauer, Eurospher 100-C18, 5 µm,125x4 mM i.d. und einem Waters 996 Photo Dioden Array Detektor.

Die Elution wurde isokratisch mit einer Flussrate von 1,5 ml pro Minute und einem Verhältnis von Methanol zu 0,1% Trifluoressigsäure von 0,34/0,66 durchgeführt.

Zur Untersuchung der Nitrilhydratase wurden 10  $\mu$ l in die HPLC eingespritzt. Die Auswertung erfolgte im Absorptionsmaximum von Aeroplysinin-1 bei 280nm.

Zur Überprüfung der einzelnen Syntheseschritte wurde das beschriebene System verwendet, mit dem Unterschied, dass nicht isokratisch, sondern mit einem linearen Gradienten, wie folgt, eluiert wurde:

0 min	10% Methanol
5 min	10% Methanol
35 min	100% Methanol
40 min	100% Methanol
45 min	10% Methanol

Während der Untersuchung des Abbaus der synthetisierten Substanzen und des Inhibitionsassays musste das Programm ebenfalls geändert werden.

0 min	34% Methanol
4 min	34% Methanol
35 min	100% Methanol
40 min	100% Methanol
15 min	34% Methanol

## Aktivitätsassay Nitrilhydratase

Zur Untersuchung der Nitrilhydratase wurden 20  $\mu$ l der zu untersuchenden Proteinfraktionen mit 8  $\mu$ l einer Aeroplysinin-1 Lösung 10 mg/ml (29 mM) und 12  $\mu$ l einer 1 zu 1 Mischung aus HEPES Puffer pH 7 1 M und Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M (Tris-HEPES Puffer) in ein 0.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur (21 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und einzeln aufgetaut, auf 100  $\mu$ l mit HPLC Methanol aufgefüllt, kurz zentrifugiert und sofort per HPLC vermessen. Kontrollen wurden auf die gleiche Art ohne Substratzusatz hergestellt. Für jede Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die enzymatische Aktivität jeder einzelnen Fraktion wurde als Abnahme der Fläche an Aeroplysinin-1 im Vergleich zur Aeroplysinin-1 Kontrolle ohne Enzymumsatz berechnet.

Abweichende Pipettierschema werden bei den entsprechenden Experimenten erläutert. Eine Übersicht über das Pipettierschema:

20 µl	Enzymlsg.
6 µl	HEPES Puffer pH 7 1 M
6 µl	Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M
8 µl	Aeroplysininlsg. 29mM

## Pufferäquilibrierung

Enzyme besitzen neben einem Temperaturoptimum auch ein pH-Optimum, welches im Normalfall dem pH-Wert des Kompartiments, in dem das Enzym lokalisiert ist, entspricht.

Die Aktivität des Enzyms wird durch Abweichungen des pH-Werts vom Optimum durch z.B. strukturelle Veränderungen des Enzyms verringert. Zu große Veränderungen des pH-Wertes können zu irreversiblen strukturellen Veränderungen am Enzym und damit zu totalem Aktivitätsverlust führen.

Untersuchungen von Dr. Fendert in seiner Dissertation wiesen ein pH-Optimum von 7 bis 7,5 auf. Um ein optimales Puffersystem, welches in diesem genannten Bereich liegt und die Enzymlösungen auch aus pH Bereichen von drei bis vier abpuffert, für das Aktivitätsassay zu finden, wurden sieben verschiedene Mischungen aus HEPES Puffer pH 7 1 M und Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M hergestellt. 12  $\mu$ l dieser Mischungen wurden zu 20  $\mu$ l Fraktion pipettiert und nach Zugabe von 8  $\mu$ l Substratlösung 20 min lang inkubiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und kurz vor der Vermessung aufgetaut und mit 60  $\mu$ l Methanol verdünnt. Das Pipettierschema sah wie folgt aus:

20 µl	Enzymlsg.
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

Tabelle MM 2 zeigt die verschiedenen Mischungen der beiden Puffersysteme.

Probe	HEPES Puffer pH 7,8 1 M	Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M
pH 7	12 μl	0 µl
рН 7,2	10 µl	2 µl
pH 7,5	8 µl	4 µl
pH 7,8	6 µl	6 µl
pH 8,1	4 µl	8 µl
pH 8,5	2 µl	10 µl
pH 8,8	0 μl	12 µl

Tabelle MM 2: Verschiedene Mischungen des HEPES Puffer pH 7,8 1 M mit Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M, die zur Pufferäquilibrierung verwendet wurden.

Zu jeder Puffermischung wurden Negativkontrollen erstellt, bei denen die Enzymlösung durch MES-Puffer 50 mM pH 5,8 ersetzt wurde.

#### Zellaufschluss

Der erste Schritt einer Proteinaufreinigung ist die Zerstörung der Zellverbände, in denen das Zielprotein enthalten ist. Nach dem Aufbrechen der Zellen kann ein Gemisch aus intakten und beschädigten Zellen, Zellorganellen, Membranfragmenten und kleiner chemischer Verbindungen aus zerstörten Zellkompartimenten vorliegen. Danach erfolgt oft eine grobe Fraktionierung durch die differentielle Zentrifugation. Das Probenmaterial wird aufsteigend mit unterschiedlichen Kräften zentrifugiert, um die Zellbestandteile grob voneinander zu trennen, wobei bei 800 x g z.B. Zellen und Zellkerne, bei 10.000 x g Kern- und Plasmamembranen, sowie Mitochondrien und bei 100.000 x g Membranproteine sedimentieren und als Niederschlag zurückbleiben. Nach einer mehr als einstündigen Zentrifugation bei 100.000 x g findet man im Überstand noch Ribosomen und lösliche Proteine.

Die Aufreinigung des Schwammaterials wurde mit einem Zellaufschluss durch Ultraschallwellen begonnen. Dazu wurden 2,5 g gefriergetrocknetes Probenmaterial in Zentrifugationsröhrchen gewogen und mit 20 ml Citratpuffer pH 5,8 50 mM versetzt. Nach einer 45 minütigen Inkubation in einem eisgekühlten Ultraschallbad wurden die Proben 20 Minuten lang bei 800 x g und 4° Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und der Niederschlag P1 in 5 ml Citratpuffer suspendiert und für weitere 15 min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände, S1, vereinigt und der Niederschlag P1 in 2 ml Puffer resuspendiert. In diesem ersten Schritt wurden nicht gelöste Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne abgetrennt. Der Überstand S1 wurde danach zur Abtrennung der Zellorganellen für eine halbe Stunde bei 10.000 x g und 4° Celsius zentrifugiert. Der Niederschlag P2 wurde in 2 ml resuspendiert. Im letzten Schritt wurden die Zellmembranen aus dem Überstand S2 durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g abzentrifugiert. Im Überstand S3 blieben alle löslichen Zellbestandteile übrig. Der Niederschlag P3 wurde mit 750 µl Citratpuffer gewaschen. Von jeder Fraktion wurden jeweils 200 bis 500 µl abgenommen und für Aktivitätstests und SDS-Gelelektrophoresen aufbewahrt. Der Zellaufschluss wurde in den meisten Fällen mit 4 bis 8 mal 2,5 g Schwammaterial durchgeführt. Im Verlauf der Arbeiten wurde der

Citratpuffer 50 mM pH 5,8 durch einen MES-Puffer 50 mM pH 5,8 ersetzt. Nachdem sich zeigte, dass es sich bei dem gesuchten Enzym um ein lösliches Protein handelt, wurde auf den zweiten Zentrifugationsschritt im oben genannten Protokoll verzichtet.

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bradford Assays bestimmt. Zur Aktivitätsbestimmung wurden zu 20 µl Fraktion 8 µl Substrat und 12 µl Tris-HEPES Puffer

gegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation wurden die Proben mittels HPLC vermessen und die Substratabnahme bestimmt. Das Proteinspektrum wurde durch

SDS-Gelelektrophoresen überprüft, wobei pro Fraktion ca. 150  $\mu$ g auf das Gel aufgetragen wurde.

## Entsalzung

Das Entsalzen der ersten erhaltenen Rohextrakte wurde mittels PD-10 Säulen, gefüllt mit Sephadex G 250, welches einen cut-off von 5 kDa aufweist, durchgeführt. Die Entsalzung verläuft nach demselben Prinzip wie die Größenausschlusschromatographie, welche unter dem entsprechenden Absatz näher erläutert wird.

Ein Entsalzen von Probelösungen ist normalerweise dann angebracht, wenn z.B. die Ionenstärke der vorliegenden Lösung aus einem vorherigen Reinigungsschritt für den Folgenden zu hoch ist.

Dies war nach der Ultrazentrifugation und dem Erhalt der S3 Fraktion nicht der Fall. Das Ziel war es, die im Enzymextrakt enthaltenen niedermolekularen Substanzen, die im Aktivitätsassay stören, Aeroplysinin und Dienon, zu entfernen, um Chromatogramme der S3 Fraktion zu erhalten, die frei von dem natürlichen Substrat und dem Produkt der Enzymreaktion waren.

Die Säulen wurden mit dem fünffachen Säulenvolumen äquilibriert. 2,5 ml der S3 Fraktion wurden auf die Säule aufgetragen und nachdem die Probe in das Säulenmaterial eingelaufen war, wurde mit 3,5 ml Puffer eluiert. Das erhaltene Eluat wurde bei -20°C für Aktivitätstests gelagert.

Zur Messung der Aktivität wurde der Aktivitätsassay wie unter *Aktivitätsassay* beschrieben durchgeführt.

## Ammoniumsulfatfällung

Ein grundlegender Reinigungsschritt in der Proteinanalytik ist die Aussalzung. Dieser Methode liegen zwei Effekte zu Grunde, einerseits die Erhöhung der Clusterstruktur des Wassers und andererseits die Dehydratation der Proteine durch Aufbau einer großen Hydrathülle an den eingesetzten Salzen.

Wasser hat die besondere Eigenschaft im flüssigen Zustand durch die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindungen tetraedisch strukturierte Netzwerke zu bilden. So können Temperaturzufuhr und einige Salze (Strukturbrecher, z.B. Harnstoff) diese Clusterstrukturen aufbrechen, wodurch das Wasser hydrophiler wird und sich somit die Lösungseigenschaften gegenüber polaren Substanzen erhöhen. Umgekehrt des Wassers führen eine Temperaturerniedrigung und die Zugabe von Strukturbildnern, wie Ammoniumsulfat, zu einer Verstärkung der Netzstruktur, wodurch das Wasser hydrophober wird. Somit kann bei ausreichender Zugabe eines Strukturbildners die Löslichkeit eines Proteins unterschritten werden, wodurch dieses ausfällt.

Des Weiteren führt die Zugabe von Ammoniumsulfat dazu, dass es Wassermoleküle aus der Hydrathülle von Proteinen entfernt um eine Eigene aufzubauen. In diesem Fall führt der Wegfall der Hydrathülle ebenfalls zu einer Fällung der Proteine.

Die Ammoniumsulfatfällung wurde während der Benutzung des Citratpuffers bei pH 8- beim Wechsel zum MES-Puffer wurde der pH-Wert der zu fällenden Lösung nicht mehr auf 8 eingestellt, da es zu unerwarteten Niederschlägen in der Proteinlösung kam- und ca. 4°C im Kühlkabinett durchgeführt, wobei der Probe unter ständigem Rühren zunächst Ammoniumsulfat bis zu einer 41% Sättigung langsam zugegeben wurde. Nachdem die erwünschte Sättigung erreicht wurde, ließ man die Probe noch für eine halbe Stunde rühren. Danach wurde die Probe bei 13000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und diesmal bis zu einer 67% Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Nach Erreichen der Sättigung verfuhr man mit der Probe wie beim ersten Schritt. Nach der Zentrifugation wurde allerdings der Überstand verworfen und der Niederschlag mit dem entsprechendem Puffer aufgenommen und anschließend dialysiert.

Nachdem sich zeigte, dass das Enzym bei pH 4 noch stabil war, wurde das zweite erhaltene Pellet mit Lactatpuffer 50 mM pH 3,9 aufgenommen.

## Dialyse

Nach einer Ammoniumsulfatfällung ist die Dialyse der gefällten Enzyme der nachfolgende Schritt. Die Dialyse ist eines der gängigsten Entsalzungsverfahren. Verwendet wird dafür ein Dialyseschlauch, der aus einer semipermeablen Membran mit einer bekannten Porengröße besteht. Moleküle, die kleiner als die Porengröße (Molekulargewichtsauschlussgröße, cut off-Wert) sind, können ungehindert durch die Membran diffundieren. Dem Konzentrationsgefälle folgend, wird die in den Schlauch gefüllte Lösung von allen Molekülen, die kleiner als der cut off sind, befreit.

Die Dialyse erfolgte bei 4°C unter ständigem Rühren und mehrmaligem Pufferwechsel. Der Schlauch wurde zu zwei Drittel gefüllt. Die erhaltene Probe wurde als P2 dialysiert bezeichnet.

## Aufkonzentrierung

Die teilweise niedrige Proteinkonzentration der erhaltenen Enzymfraktionen und die damit verbundene niedrige Aktivität der Proben, machte es nötig, die Proben aufzukonzentrieren. Zu diesem Zweck wurden Amicon Ultra-15 Zentrifugationsfiltereinheiten der Firma Millipore mit einem Ausschlussvolumen von 3 kDa verwendet. Diese Zentrifugationsfiltereinheiten bestehen aus einem äußeren Reaktionsgefäß und einer inneren Filtereinheit mit einer Membran definierter Porengröße. Die aufzukonzentrierende Probe wird in die innere Einheit gefüllt. Bei der anschließenden Zentrifugation verringert sich das Volumen dadurch, dass das Lösemittel mit allen gelösten Substanzen, die kleiner als das Ausschlussvolumen sind, durch die Membran fließen können.

Die Proben wurden bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war.

## Abtrennung niedermolekularer Substanzen

Die Tatsache, dass das Enzym nach der Entsalzung keine Aktivität mehr aufwies und erst durch eine inaktivierte Enzymprobe wieder in den aktiven Zustand überführt werden konnte, zeigte, dass Moleküle, deren Größe unterhalb der Ausschlussgrenze der PD-10 Säulen lag, für die Aktivität mitverantwortlich sein mussten. Um diese niedermolekularen Substanzen abzutrennen wurde die oben beschriebene Methode verwendet, wobei jedoch für die darauf folgenden Versuche der Durchfluss verwendet wurde und nicht die Probe innerhalb der Filtereinheit.

#### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen der erhaltenen Fraktionen wurden mittels des Bradford Assays gemessen. Bei diesem kolorimetrischen Assay entsteht aus dem roten Coomassie Reagenz durch Proteinbindung Coomassie Blau. Die steigende Lichtabsorption des gebildeten Coomassie Blau bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzetration, wodurch sich die in den Proben enthaltende Konzentration an Proteinen bestimmen lässt. Zur Kalibrierung der Messung verwendet man Poteinstandards, für gewöhnlich bovines Rinderalbumin.

Für die Messung wurde eine BSA Konzentrationsreihe mit 0, 5, 10, 30, 50, 70, 90, 100 und  $1000 \mu g/ml$  hergestellt.

Die Bradford Stammlösung wurde wie folgt hergestellt:

Bradford Stammlösung: 70 mg Coomassie Brilliant Blue gelöst in 50 ml Ethanol p.a. Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %) Auffüllen mit Nanopure Wasser ad 200 ml lichtgeschützte Lagerung bei 4 °Celsius

Für die Bradford Messungen wurde die Stammlösung 1 zu 5 verdünnt, über Nacht kühl gelagert und filtriert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µl der zu messenden Probe mit 300 µl der verdünnten Bradford Lösung in ein Feld einer Mikrotiterplatte pipettiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595 nm vermessen. Um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren wurden immer 3 Messungen für jede Fraktion durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

## **TCA Fällung**

Geringe Proteinkonzentrationen machten es nötig, die meisten Proben für die SDS PAGE durch eine Fällung mit Trichloressigsäure aufzukonzentrieren. Zur Fällung von 4 Teilen Probe wurde ein Teil TCA hinzupipettiert und zehn Minuten bei 4° Celsius inkubiert. Danach wurden die Proben zehn Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 200 µl kaltem Aceton gewaschen und erneut zehn Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nachdem die Proben mit Aceton gewaschen wurden und der Acetonüberstand entfernt wurde, wurden die Proteinniederschläge kurz bei 95 °Celsius im Heizblock getrocknet. Die trockenen Niederschläge wurden mit 12  $\mu$ l Nanopure Wasser und 3 $\mu$ l des 5-fachen Probenpuffers resuspendiert. Zeigte diese Lösung ein gelb-grünliche Färbung, so wurde so viel Tris-HCl Puffer 1,5 M pH 8.8 zugegeben, bis sich die Lösung blau färbte.

Nachdem sich zeigte, dass die aktiven Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie meist eine sehr geringe Proteinkonzentration aufwiesen, wurde bei der Proteinfällung auf den zweiten Waschschritt verzichtet. Zudem wurden die getrockneten Proteinniederschläge nicht mit Nanopure Wasser, sondern mit 12  $\mu$ l Tris-HCl Puffer 1.5 M pH 8.8 aufgenommen.

## Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Nach jedem Reinigungsschritt wurden die aktiven und benachbarten Fraktionen auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden

SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt, bei denen die Proteine nach Größe getrennt werden. Die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Proteinproben führt zu einer Überlagerung der Eigenladung von Proteinen mit negativ geladenem SDS. Durch Ladungsabstoßung der negativen Ladungen kommt es zu einer Längsstreckung der Proteine. Um Cysteinbrücken zu spalten werden reduzierende Thiole, z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol, den Proben zugesetzt. Danach werden die Proben meistens 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel aufkonzentriert und erst danach im Trenngel nach Größe aufgetrennt. Dabei dient das Trenngel als eine Art Sieb, bei der die Maschengröße vom Acrylamidgehalt abhängt. Kleinere Proteine können durch die Maschen einfacher wandern als Große und laufen somit schneller durch das Gel.

Mit dieser Methode konnte die Komplexität der gemessenen Fraktionen bezüglich der Proteinmuster untersucht und gleichzeitig die aktiven und inaktiven Fraktionen auf Unterschiede in ihrem Bandenmuster hin verglichen werden.

Es wurden jeweils pro Ansatz 15  $\mu$ l große Probenmengen aus 12  $\mu$ l Nanopure Wasser und 3  $\mu$ l des 5-fachen Probenpuffers hergestellt, die dann bei 37 °C im Wasserbad erhitzt wurden, von denen 10  $\mu$ l aufs Gel aufgetragen wurden. Die eingesetzte Proteinmenge variierte in den einzelnen Reinigungsschritten.

Mit jedem Gel wurde eine Protein-Standard-Leiter mit Referenzproteinen von 10 bis 170 kDa vermessen. Das Gel wurde bei 70 V laufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Danach wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreimal jeweils für zehn Minuten mit Nanopure Wasser gewaschen und dann über Nacht in die Färbelösung eingelegt. Nach dem Färbeschritt wurde das Gel nochmals mit Nanopure Wasser gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu entfernen. Die Gele wurden gescannt und danach im Kühlschrank in Plastikfolien aufbewahrt. Für ein SDS-Gel mit besonders niedrigen Proteinkonzentrationen wurde eine Silberfärbung versucht. Dazu wurde das fertige Gel 30 min in einer Fixierlösung geschwenkt, bei diese nach 20 min gewechselt wurde. Danach wurde das Gel zweimal je 20 min in der Waschlösung geschwenkt. Anschließend wurde es noch eine halbe Stunde mit Nanopure Wasser, welches nach 10 min gewechselt wurde, gewaschen. Alle weiteren Arbeiten erfolgten im Kühlraum.

Das Gel wurde eine Minute in der Sensitizer-Lösung inkubiert, dann zweimal für 30 Sek. mit Nanopure Wasser gewaschen und dann 20 min in der Silber-lösung inkubiert. Diese wurde dann vollständig entfernt und das Gel noch dreimal für 15 Sek. mit Nanopure Wasser gewaschen, bevor es in die Entwickler-Lösung gelegt wurde. Der Färbeprozess wurde durch Abspülen der Lösung mit Nanopure Wasser gestoppt. Zum Schluss wurde das Gel 5 min in 5 % Essigsäure eingelegt.

Beschreibung	Komponenten	Volumenanteile
Fixierlösung	Nanopure Wasser	50%
	Ethanol	40%
	Essigsäure	10%
Waschlösung	Nanopure Wasser	70%
	Ethanol	30%
Sensitizer-Lösung	Natriumthiosulfat	0,02%
	Nanopure Wasser	99,98%
Silberlösung	Silbernitrat	1,69 g
	Nanopure Wasser	ad 100 ml
	Formaldehyd	0,02%
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat	2%
	Formaldehyd	0,04%
	Reinstwasser	97,96%

Tabelle MM 3: V	/erwendete Lösunger	für eine	Silbernitratfärbung	eines SDS-	-Gels.

Beschreibung	Komponenten	Volumen
Sammelgel 4%	Nanopure Wasser	6.1 ml
	0.5M Tris-HCl, pH 6,8	2.5 ml
	10%(m/v) SDS-Lösung	0. 1ml
	30%(m/v) Acrylamid-Bis-Lösung	1.3 ml
	10%(m/v) APS-Lösung	0.05 ml
	TEMED	0.01 ml
Trenngel 12%	Nanopure Wasser	3,4 ml
	0.5M Tris-HCl, pH 6,8	2.5 ml
	10%(m/v) SDS-Lösung	0.1 ml
	30%(m/v) Acrylamid-Bis-Lösung	4.0 ml
	10%(m/v) APS-Lösung	0.05 ml
	TEMED	0.005 ml
Probenpuffer 5x	Nanopure Wasser	2.75 ml
	0.5M Tris-HCl, pH 6,8	1.25 ml
	Glycerol	2.5 ml
	10%(m/v) SDS-Lösung	2.0 ml
	0.5%(m/v) Bromphenolblau-Lösung	1.0 ml
SDS-Puffer 10x	Tris	30.3 g
	Glycin	144.0 g
	SDS	10.0 g
	Nanopure Wasser	ad 1000 ml
Färbelösung	0.02% Coomassie Brilliant Blau	100 mg
	2%(m/v) Phosphorsäure	12 ml (85%)
	5% Aluminiumsulfat	25 g
	10% Ethanol	50 ml
	Nanopure Wasser	438 ml

Tabelle MM 4: Gele und Puffer für die SDS-PAGE.

## Wiederherstellung der Aktivität durch hitzeinaktivierte Proteinproben

Der Verlust der Aktivität einer aktiven Enzymlösung durch Entsalzen beziehungsweise durch Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse, hätte einen Grund darin haben können, dass niedermolekulare, nicht proteinartige Substanzen, die für die Aktivität notwendig sind, durch Entsalzen wie auch durch Dialyse entfernt wurden.

Um zu beweisen, dass es sich bei diesen Substanzen tatsächlich nicht um Proteine handelt, wurde eine aktive S3 Fraktion durch Hitze inaktiviert und danach zu einer dialysierten Probe gegeben, um daraufhin einen Aktivitätsassay mit der Probe durchzuführen.

Eine aktive S3 Fraktion wurde für 20 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. 30  $\mu$ l des Überstandes wurden zu der gleichen Menge einer P2 dialysierten Fraktion, sowie zur entsalzten S3 Fraktion gegeben. Nach Zugaben von 12  $\mu$ l Tris-HEPES Puffer und der Substratlösung wurden die Proben 20 min lang inkubiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und kurz vor der Messung aufgetaut und mit 20  $\mu$ l Methanol verdünnt.

### Material und Methoden

Für diesen Versuch wurden zwei Arten von Kontrollen hergestellt, Kontrollproben ohne jegliche Proteinlösung, sondern lediglich 60 µl Puffer und Kontrollen mit inaktivierter S3 Fraktion ohne die P2 dialysiert bzw. S3 entsalzt Fraktion.

Das Pipettierschema zu diesem versuch stellt sich wie folgt dar:

30 µl	S3 inaktiviert
30 µl	P2 dialysiert/S3 entsalzt
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg. 29mM

## Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschehromatographie (IEX) ist ein analytisches Trennverfahren, mit dem man Substanzen nach ihrer Ladung trennen kann. Diesem Verfahren liegen reversible Adsorptionsvorgänge von geladenen Molekülen und gegensätzlich geladenen immobilisierten Gruppen zu Grunde. Als stationäre Phasen dienen geladene Trägermaterialien, die als Kationenaustauscher zum Beispiel Sulfonsäurereste und als Anionenaustauscher quartäre Amine tragen.

Proteine können in ihren Seitenketten Carbonyl- und Aminfunktionen tragen und haben dementsprechend pH-abhängig nach außen hin eine Eigenladung. Außer am isoelektrischen Punkt (IEP), wo die positiven und negativen Ladungen der verschiedenen funktionellen Gruppen sich gegenseitig aufheben und das Molekül nach außen hin ungeladen erscheint, liegen Proteine bei pH-Werten über ihrem IEP als Anionen und bei pH-Werten unter ihrem IEP als Kationen vor. So könnten zum Beispiel Proteine, die bei einem bestimmten pH-Wert als Anionen und an einen Anionenaustauscher gebunden vorliegen, durch pH-Änderungen oder durch Elution mit steigender Ionenstärke der mobilen Phase von der Säule eluiert werden.

## Ionenaustauschchromatographie für das Cosubstrat

Nachdem sich herausstellte, dass eine niedermolekulare Substanz mit einer Größe unter 5 kDa Einfluss auf die Aktivität hat, wurde der Versuch unternommen, diese Substanz zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine aktive S3 Fraktion mittels einer
Zentrifugationsfiltereinheit mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa 45 min lang bei 4000rpm, unter gelegentlichem Waschen der Filtermembran, um ein Verstopfen dieser zu verhindern, zentrifugiert.

Eine HiTrap Säule SP Sepharose XL (starker Kationenaustauscher) und ein ÄKTAprime plus FPLC System wurden zur Aufreinigung des enzymfreien Extraktes verwendet. Das ÄKTAprime plus FPLC System ist aus folgenden Geräten aufgebaut:

Pump P-900,	Amersham Biosciences
Autosampler Frac-920,	Amersham Biosciences
Detector UV-900,	Amersham Biosciences
Software	Unicorn

Bevor die Probe auf die Säule aufgetragen wurde, wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina (Säulenvolumen 1ml) Nanopure Wasser gewaschen und danach mit mindestens 10 Säulenvolumina von Puffer A (siehe unten) mit einer Flussrate von 1ml/min äquilibriert.

Puffer A:	HEPES-Puffer 50 mM pH 7
Puffer B:	HEPES-Puffer 50 mM pH 7 + NaCl 2 M

6,5 ml der Probe wurden über eine 7ml Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen und ungebundene Substanzen heruntergewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über eine Zeit von 22,5 min und detektiert wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm. Der ungebundene Durchfluss wurde in zwei Fraktionen a 5 ml in zwei 15 ml Falcon tubes gesammelt. Während der Elution wurden 15 Fraktionen a 1,5 ml in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach der Benutzung wurde die Säule erneut mit Nanopure Wasser gewaschen und bei 4 °Celsius im Kühlschrank bis zur erneuten Benutzung gelagert. Noch am selben Tag wurden für die Aktivitätsassays zu 40 μl jeder Fraktion 20 μl P2 dialysiert, 12 μl Tris-HEPES Puffer und 8 μl Substrat pipettiert und weiter wie unter *Aktivitätsassay Nitrilhydratase* beschrieben behandelt.

Das Pipettierschema:

20 µl	Enzymlsg.
40 µl	IEX Fraktion
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

### Ionenaustauschchromatographie für die Nitrilhydratase

Um die Nitrilhydratase zu reinigen, wurden mehrere Versuche mit Kationen- und Anionenaustauschern unternommen. Als erstes wurden ein starker Anionenaustauscher (HiTrap Säule Q Sepharose XL) und ein starker Kationenaustauscher (HiTrap Säule SP Sepharose XL) zu Trennung verwendet. In beiden Fällen erfolgte die Durchführung wie oben beschrieben, jedoch wurde der Gradient auf 24 min verlängert und es wurde jeweils 1 ml pro Fraktion gesammelt. Verwendet wurden folgende Puffer:

Puffer A:	Citratpuffer 50 mM pH 5,8
Puffer B:	Citratpuffer 50 mM pH 5,8 + NaCl 2 M

Da die Elution mit diesem Puffer nicht erfolgreich war, wurde ein neuer Versuch mit einem anderen Puffersystem unternommen. Dazu wurde ein neuer Zellaufschluss unter der Benutzung eines MES-Puffers 50 mM pH 5,8, wie unter dem Abschnitt *Zellaufschluss* beschrieben, durchgeführt. Die S3 Fraktion wurde beim ersten Versuch lediglich dialysiert und beim Zweiten ausgesalzt und dialysiert und mit dem vorher beschrieben starken Anionenaustauscher chromatographiert. Als Puffer dienten:

Puffer A:	MES-Puffer 50 mM pH 5,8
Puffer B:	MES-Puffer 50 mM pH 5,8 + NaCl 2 M

Nachdem diese Methode noch keine ausreichend guten Ergebnisse zeigte, wurde mit weiteren Pufferwechseln versucht, den Trennerfolg zu vergrößern. Es wurden die zwei folgenden Puffersysteme mit einer P2 dialysiert Fraktion ausprobiert.

1.	Puffer A:	Acetatpuffer 50 mM pH 4,9		
	Puffer B:	Acetatpuffer 50 mM pH 4,9 + NaCl 2 M		

2.	Puffer A:	Lactatpuffer 50 mM pH 3,9
	Puffer B:	Lactatpuffer 50 mM pH 3,9 + NaCl 1M

#### Material und Methoden

Alle erhaltenen Fraktionen, die zu einer Absorptionssteigerung bei 280 nm führten, wurden jeweils am gleichen Tag im Aktivitätsassay vermessen. Zu 50 µl Fraktion wurden 30 µl Mangan(II)-Lsg. 25 mM, 12 µl Tris-HEPES Puffer und 8 µl Substrat pipettiert und weiter wie unter *Aktivitätsassay Nitrilhydratase* beschrieben behandelt. Hier das Schema in der Übersicht:

50 µl	Enzymlsg.
30 µl	Mangan(II)-lösung 25mM
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg. 29mM

### Flammenabsorptionsspektroskopie

Um einen Eindruck über das Vorkommen verschiedener Metalle in aktiven Proteinfraktionen zu erhalten, wurden diese spektroskopisch vermessen.

Bei der Flammenabsorptionsspektroskopie emittiert eine Lampe Licht, mit einer für das zu messende Element entsprechenden Wellenlänge. Die Proben werden in einer Flamme aus einem Acetylen/Luft Gemisch atomisiert und in anregbare Atome überführt. Befinden sich Atome im Strahlengang, die das entsprechende Licht absorbieren, wird dessen Intensität geschwächt und diese Schwächung registriert. Die Absorption unterliegt dem Lambert-Beer'schen Gesetz und kann zur quantitativen und qualitativen Analyse herangezogen werden.

Die Flamme des verwendeten Spektrometers wurde mit einem Acetylen/Luft Gemisch (Acetylen 13,5 l/min, Luft 2 l/min) betrieben. Die Multielement-Hohlkathodenlampe wurde eine halbe Stunde vor Beginn der Messungen eingeschaltet, um konstante Ergebnisse zu erhalten. In Abhängigkeit von dem zu messenden Atom wurde die Wellenlänge entsprechend eingestellt, das Gerät gegen Luft und danach gegen den entsprechenden Puffer genullt.

Da vor der ersten Messung aus der Literatur nichts über die in dem Schwamm vorkommenden Elemente bekannt war, wurde zunächst eine S3 Fraktion auf alle von der Hohlkathodenlampe messbaren Elemente -Chrom, Mangan, Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer-, geprüft. Chrom, Kupfer und Eisen waren in der Probe nicht vorhanden. Weitere Messungen erfolgten mit einer S3, sowie einer dialysierten P2 Fraktion, wobei diese nur noch auf die vorher gefundenen Elemente untersucht wurden. S3 und die dialysierte P2 Fraktion wurden für jedes zu bestimmende Element in einer Doppelbestimmung, mit einer vier sekündigen Pause zwischen den zwei Messungen, vermessen, während die Standardlösungen der Elemente in einer Dreifachbestimmung vermessen wurden.

Die aus der Ionenaustauschchromatographie der niedermolekularen Substanzen erhaltenen Fraktionen wurden aufgrund der geringen Probenmenge lediglich auf Mangan getestet. Zwischen jeder Messreihe wurde der Injektionsschlauch, über den die Proben manuell eingeführt wurden, intensiv mit Nanopure Wasser gewaschen.

Zur Gehaltsbestimmung der einzelnen Elemente wurde jeweils eine Kalibriergerade erstellt. Verwendet wurden Lösungen der Elemente mit einer Konzentration zwischen 0,05mM und 1,25mM. Da Citronensäure die Eisenbestimmung stören kann, wurden alle Messungen für Eisen in einem MES-Puffer pH 5,8 50 mM durchgeführt, während alle anderen Messungen mit Citronensäurepuffer pH 5,8 50 mM erfolgten.

## Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität

Die Ergebnisse, die aus der Entsalzung, Dialyse und Ionenaustauschchromatographie, sowie der Atomabsorptionsspektroskopie erhalten wurden, deuteten auf die Beteiligung mehrwertiger Ionen bei der Enzymreaktion hin. Die Zugabe des Komplexbildners EDTA, der als nichtkompetitiver Hemmer bekannt ist, zu einer aktiven S3 Probe, müsste unter der oben genannten Voraussetzung, der Beteiligung mehrwertiger Ionen bei der Enzymreaktion, die Aktivität mindern oder ganz verhindern.

Zu Beginn wurden 20  $\mu$ l S3 mit 10  $\mu$ l einer 100 mM EDTA-Lsg. für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min wurden 50  $\mu$ l Nanopure Wasser, 12  $\mu$ l Tris-HEPES Puffer und 8  $\mu$ l Substratlösung hinzugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben nach 20 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und erst kurz vor der Vermessung aufgetaut.

Es wurde wie folgt pipettiert:

20 µl	S3
10 µl	EDTA-Lsg. 100 mM
50 µl	Nanopure Wasser
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

Material und Methoden

## Einfluss verschiedener Metallionen auf EDTA-inaktiviertes Enzym

Die Zugabe unterschiedlicher Salze zu einer S3 Fraktion, welche mit EDTA inaktiviert wurde, sollte einen Hinweis darauf geben, welches Ion einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt. Es wurden 25 mM Lösungen der folgen Salze hergestellt: Mangan(II)sulfat-Monohydrat, Nickel(II)chlorid-Hexahydrat, Cobalt(II)chlorid und Eisen(II)sulfat-Heptahydrat.

Zunächst wurden 20 µl der S3 Fraktion und 12 µl Tris-HEPES Puffer mit 10 µl 100 mM EDTA-Lsg. für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl der entsprechenden Salzlösung und 8 µl Substratlösung zu den Proben gegeben und für weitere 20 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und erst kurz vor der Vermessung aufgetaut.

Bei dieser Versuchsreihe stellte sich das Pipettierschema so dar:

20 µl	S3
10 µl	EDTA-Lsg. 100 mM
12 µl	Tris-HEPES Puffer
50 µl	Salzlsg. 25 mM
8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

### pH Stabilität

Die ersten Aufreinigungen per IEX bei einem pH von 5,8 führten zu keinem befriedigenden Ergebnis. Aus diesem Grund sollten weitere Versuche bei niedrigeren pH-Werten unternommen werden. Vorher musste allerdings die pH-Stabilität des Enzyms ermittelt werden, um zu überprüfen, wie weit man mit dem pH-Wert der verwendeten Puffer herunter gehen kann, ohne das Enzym dauerhaft zu beschädigen.

Um zu ermitteln, wie unterschiedliche pH-Bereiche die Aktivität beeinflussen, wurde eine S3 Fraktion mit Salzsäure 3,7 % bzw. Natronlauge 0,1 M auf die pH-Werte von

## 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9

eingestellt und 30 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 200 µl der einzelnen Proben mit 120 µl Tris-HEPES Puffer auf einen pH von ca. 7,8 eingestellt. Aus diesen Proben wurden die Proteingehalte mittels *Bradfordassay*, wie in dem besagten Abschnitt beschrieben, ermittelt. Von allen Proben wurden für den Aktivitätsassay 32 µl mit einer Proteinmenge von 25,4 µg (was für einige Proben durch Verdünnung mit Nanopure-Wasser erreicht wurde) eingesetzt. Zu 32 µl Probelösung wurde die Substratlösung- für die Kontrollen nur Methanolhinzupipettiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und kurz vor dem Vermessen aufgetaut und mit 60 µl Methanol verdünnt. Hier zeigt sich das Pipettierschema wie folgt:

32 μl Enzymlsg.(1,26 mg/ml)8 μl Aeroplysininlsg. 29mM

## Größenauschschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ist im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie ein analytisches Trennverfahren, bei dem Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Das Säulenmaterial, oft aus Agarose und Dextran aufgebaut, bildet eine Porenmatrix, welche einen Molekularsiebeffekt besitzt. Moleküle, die größer als das Ausschlussvolumen des Säulematerials sind, können in die Poren nicht eindringen, werden somit von der stationären Phase nicht zurückgehalten und eluieren vor den Molekülen, die von den Poren zurückgehalten werden.

Die Aufreinigung per Ionenaustauschchromatographie erzielte auch im besten Fall keine reinen Proteinfraktionen. Aus diesem Grund wurden im Anschluss die an Ionenaustauschchromatographie identische aktive Fraktionen zusammengeführt, auf ein Volumen von 500 ul eingeengt und mit einer Superdex 200 10/300 Gelfiltrationssäule der Firma GE Healthcare und dem, unter Ionenaustauschchromatographie beschriebenem, ÄKTAprime plus FPLC System getrennt. Mit steigender Flussrate von zunächst 0,2ml/min bis maximal 0,5ml/min wurde die Säule vor der Benutzung mit dem anderthalbfachen des Säulenvolumens und dem entsprechenden Puffer, MES Puffer 50 mM pH 5,8 + NaCl 0,1 M, gewaschen. Um einen Schaden an Säule und Pumpe zu verhindern wurde der Maximaldruck auf 1 MPa gesetzt. Die eingeengte Probe wurde über eine 500 µl Injektionsschleife Injekt-F der Firma Braun, unter einem Fluss von

0,5 ml/min, auf die Säule gegeben. Die Detektion erfolgte bei 280 nm, während Fraktionen von 0,5 ml Größe über den Fraktionssammler gesammelt wurden.

#### Material und Methoden

Nach der Benutzung der Säule wurde diese intensiv mit Nanopure Wasser und im Anschluss mit 20 % Ethanol gewaschen. Jeweils 5  $\mu$ l der erhaltenen Fraktionen wurden im Aktivitätsassay mit 3  $\mu$ l Mangan(II)-lösung 25mM, 1,2  $\mu$ l Tris-HEPES Puffer und 0,8  $\mu$ l Aeroplysinin-1 vermessen. Die Proben wurden inkubiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und kurz vor der Messung aufgetaut und mit 60  $\mu$ l Methanol verdünnt. Das Pipettierschema sah wie folgt aus:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Mangan(II)-lösung 25mM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Aeroplysininlsg. 29mM

## Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Aufreinigung des Enzymextrakts per Zentrifugation, Aussalzung, Ionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie führte in den besten Fällen zu Proteinfraktionen, die in der SDS-PAGE zwei Banden aufwiesen. Um zu überprüfen, ob die zwei Banden in einem Zusammenhang zueinander stehen und Untereinheiten des gleichen Proteins sind, wurde die Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese mit aufgereinigten Proben durchgeführt.

Bei der Blauen Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese dient das Acrylamidgel wie bei der SDS-PAGE als Sieb, so dass auch bei dieser Methode die Proteine nach Größe getrennt werden. Es wird aber bei dieser Methode auf den Zusatz von denaturierenden Substanzen, wie SDS oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, verzichtet, wodurch die Proteine im nativen und aktiven Zustand verbleiben.

Während des Laufs lagert sich der anionische Farbstoff Coomassie-Blau, welcher sich im Kathodenpuffer befindet, an die hydrophoben Seitenketten der Proteine und verleiht diesen eine negative Ladung, wodurch sie im elektrischen Feld zur Anode wandern und der Größe nach aufgetrennt werden. Der Farbstoff hat zusätzlich den Vorteil, dass die Proteine direkt angefärbt werden.

Die zu vermessenden Proben wurden wie unter *Aufkonzentrierung* beschrieben auf ein Minimum an Volumen aufkonzentriert. 18,75 µl der Probe und 6,25 µl NativePAGE Sample Buffer (4x) wurden gemischt und auf ein 10 Well NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gel aufgetragen. Für 15 Well Gele wurden 10  $\mu$ l der Probe und 3,3  $\mu$ l NativePAGE Sample Buffer (4x) gemischt. Als Protein Standardleiter wurde NativeMark Unstained Protein Standard mit Standards der Größen von 20 bis ca. 1200 kDa verwendet. Leere Taschen wurden mit 10  $\mu$ l NativePAGE Sample Buffer (4x) gefüllt, um eine gleichmäßige Lauffront zu erhalten. Der Anodenpuffer NativePAGE Running Buffer (20x) wurde vor der Verwendung 1:20 mit demineralisiertem Wasser verdünnt. 10 ml des NativePAGE Cathode Buffer (20x) wurden, zur Herstellung der Kathodenpuffers, mit 10 ml NativePAGE Running Buffer (20x) gemischt und auf 200 ml mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt.

Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei ungefähr 8°C eine Stunde lang bei 150 V und danach für den Rest der Zeit bei 200 V unter Verwendung einer XCell SureLock Mini-Cell durchgeführt. Beendet wurde die Elektrophorese, wenn die Lauffront -deutlich sichtbar durch das im Kathodenpuffer enthaltene Coomassie- das Ende des Gels erreichte. Die geringe Proteinmenge der Proben und dementsprechend die ebenfalls geringe Proteinmenge pro Proteinbande machte es nötig, dass das Gel nach der Elektrophorese zusätzlich in der, unter *SDS-PAGE* beschriebenen, sensitiven Coomassie Färbelösung über Nacht gefärbt und danach dreimal für zehn Minuten mit Nanopure Wasser gewaschen werden musste.

Beschreibung	Komponenten	Volumen
NativePAGE Running Buffer 20x	BisTris	209,2 g
	Tricine	179,2 g
		ad 1000
	Nanopure Wasser	ml
NativePAGE Sample Buffer 4x	BisTris	0,418 g
	6 N HCl	0,107 g
	Glycerol	4g
	NaCl	0,117 g
	Ponceau S	0,4 mg
	Nanopure Wasser	ad 10 ml
NativePAGE Cathode Buffer 20x	Coomassie G-250	1 g
	Nanopure Wasser	ad 250 ml

Tabelle MM 5: Verwendete Puffer für die Blau Nativ-PAGE.

## In Gel Anfärben

Die Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9 und eine daran anschließende Größenausschlusschromatographie führten in den reinsten Fraktionen dazu, dass man bei der dazugehörigen SDS- und Native-PAGE jeweils nur noch zwei Banden erkennen konnte. Zur Klärung der Frage, welche der zwei Banden im Nativ-Gel der gesuchten Nitrilhydratase zuzuordnen war, wurde der Versuch unternommen, eine Methode zu entwickeln, das Protein im Gel anzufärben.

Es wurde überlegt, das Produkt der Reaktion, das entstehende Säureamid, im Gel, an der Stelle, an der es umgesetzt wurde und wo sich demnach das Enzym befinden musste, anzufärben. Eine Arzneibuchmethode zum Nachweis von Estern, Lactonen, Lactamen, Säureanhydriden, sowie  $\beta$ -Lactamen und Säureamiden, bei letzteren allerdings schlechter, ist die Bildung einer Hydroxamsäure im alkalischen und eine darauf folgende Komplexbildung mit Fe<sup>3+</sup>-Ionen im sauren, was zu einer Rot- bis Braunfärbung führt.



Um diesen Versuch durchzuführen, wurden zwei aktive Fraktion aus der Anionenaustauschchromatographie eingeengt und auf ein NativePAGE 4-16% BT 1.0 15 well der Firma Invitrogen aufgetragen und das Gel entsprechend dem Abschnitt *Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese* laufen gelassen.

Nachdem das Gel fertig gelaufen war, wurde es in MES-Puffer 50 mM pH 5,8 eingelegt und bei 8 °C aufbewahrt. Eine Bahn des Gels, auf die die Enzymprobe aufgegeben wurde, wurde ausgeschnitten und in ein Schnappdeckelglas gelegt, welches eine Lösung aus

2500 μl MES-Puffer 50 mM pH 5,8
1500 μl Mangan(II)-lösung 25 mM
600 μl Tris-HEPES Puffer
400 μl Aeroplysininlsg. 29 mM

enthielt. Das Gelstück wurde eine halbe Stunde lang in dieser Lösung inkubiert. Danach wurde die Lösung abgegossen und mit einer 10 % igen Kaliumhydroxidlösung überschichtet, in der 300 mg Hydroxylaminhydrochlorid gelöst waren. Das Schnappdeckelglas wurde verschlossen und eine halbe Stunde bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und danach mit einer 1 % igen Eisen(III)lösung versetzt. Nach der Zugabe der Eisen(III)-chloridlösung gab es keine sichtbare Veränderung der Gelbahn.

Daraufhin wurde am nächsten Morgen eine weitere Bahn aus dem Nativgel geschnitten und diesmal in folgende Lösung gelegt:

3000 μl Mangan(II)-lösung 25mM
1200 μl Tris-HEPES Puffer
400 μl MES-Puffer 50 mM pH 5,8

Diese Vorinkubation sollte erreichen, dass das Enzym im Gel genügend Zeit hat, um mit den für die Aktivität nötigen Manganionen in Kontakt zu kommen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden 400 µl Aeroplysininlsg. 29 mM hinzupipettiert und für weitere zwei Stunden inkubiert. Dann wurde die Lösung abgegossen und das Gel kurz mit Nanopure Wasser gewaschen. Die Gelbahn wurde mit 7 ml einer methanolischen KOH (5g KOH auf 10ml Wasser/Methanol 1:1), in der 300 mg Hydroxylaminhydrochlorid gelöst waren, überschichtet und auf pH 10 eingestellt. Daraufhin wurde das Schnappdeckelglas eine Stunde lang bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit Salzsäure auf pH 1 eingestellt und mit einer 1 % igen Eisen(III)lösung versetzt.

## Überprüfung der Spezifität des Nachweises

Nach mehreren Durchführungen des Assays, zeigte sich, dass nicht nur eine Bande spezifisch, sondern neben dem Gel selbst auch andere Banden unspezifisch, angefärbt wurden. Um dies zu überprüfen wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem mit vier Gelstücken eines vorgefertigten SDS-Gels, Precise Protein Gel, 4-20 %, 10 Well, Thermo Scientific, eine Abwandlung des Assays durchgeführt wurde.

Die vier gleich großen Gelstücke wurden in Schnappdeckelgläser gelegt, die mit unterschiedlichen Lösungen gefüllt waren. Das Proben 1 und 2 enthielten 4,6 ml MES-Puffer und 0,4 ml einer methanolischen 1 % igen Nicotinsäureamidlösung. Die Proben 3 und 4 enthielten anstatt der Nicotinsäureamidlösung nur Methanol. Die Proben wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach einmal mit Nanopure Wasser gewaschen. Danach wurden den Proben 1 und 3 7 ml einer methanolischen KOH (5g KOH auf 10ml Wasser/Methanol 1:1), in der 300 mg Hydroxylaminhydrochlorid gelöst waren, mit einem pH-Wert von 10 zugegeben. Die Proben 2 und 4 wurden nur mit 7 ml der methanolischen KOH überschichtet. Alle Proben wurden eine Stunde lang bei 95 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden alle Proben angesäuert und mit einer einer 1 % igen Eisen(III)lösung versetzt. Es wurde zusätzlich ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem ein Precast-Gel mehrere Tage in Wasser gewaschen und dann nochmal, wie oben beschrieben, untersucht wurde.

#### Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese, oder 2D- Gelelektrophorese, stellt eine Kombination aus zwei aufeinander folgenden gelelektrophoretischen Schritten, die orthogonal zueinander erfolgen, dar. Die ursprüngliche 2D- Gelelektrophorese bestand aus der isoelektrischen Fokussierung, bei der die Proteine anhand ihrer Landung innerhalb eines pH-Gradienten getrennt werden, als erstem und einer anschließenden SDS-PAGE als zweiten Schritt.

Für diese Methode wurde jedoch eine andere, häufig genutzte, Kombination der möglichen Trennverfahren gewählt. Die nach der kompletten Aufreinigung erhaltenen Proben enthielten in der Nativ-PAGE und SDS-PAGE immer noch zwei Banden. Um einen Zusammenhang zwischen den Banden aus beiden Methoden herstellen zu können, wurden diese kombiniert, indem zunächst eine Nativ-PAGE und im zweiten Schritt eine SDS-PAGE durchgeführt wurde.

Aus aufkonzentrierten Fraktionen der Größenausschlusschromatographie wurde im ersten Schritt eine Blaue Nativ-Gelelektrophorese, wie unter dem entsprechendem Absatz beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden von jeder Probe jeweils zwei Bahnen aufgetragen, um eine Bahn für die Anfärbung im Gel und die andere für eine weitere SDS-PAGE zu verwenden. Nach dem Lauf wurde eine der zwei Bahnen ausgeschnitten und für 15 min in eine 1 % ige SDS- und  $\beta$ -Mercaptoethanollösung eingelegt, um die in dem Gelstück enthaltenen Proteine einerseits mit SDS gleichmäßig zu laden und zusätzlich mit Mercaptoethanol zu denaturieren. Nach der Inkubation wurde das Gelstück in eine entsprechende Gelkassete für SDS-PAGE gelegt und mit einem, im Abschnitt *SDS-PAGE* beschriebenen, 12 % igen Trenngel umschlossen. Nach der Polymerisierung des Gels, konnte es in der zweiten Dimension entwickelt werden. Da das verwendete Gelkammersystem den gleichzeitigen Lauf von zwei Gelen erlaubt, wurde zu dem vorbereiteten Gel ein weiteres Gel hergestellt, auf welches die für den Versuch verwendete Proteinprobe aufgetragen wurde. Hierbei musste besonders beachtet werden, dass die Laufstrecken für die beiden Gele, die gleichzeitig laufen sollten, so gut wie identisch sein musste, um die Proben im Nachhinein miteinander vergleichen zu können.

Die Durchführung der Elektrophorese, das anschließende Waschen der Gele, sowie die Färbung der Gele erfolgten nach der Beschreibung im Abschnitt *SDS-PAGE*.

#### Aktivitätsnachweis im Gel

Die Ergebnisse, die mittels der Blau Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese erhalten wurden, zeigten, dass sich, wie bei den reinsten Proben, die mittels SDS-PAGE getrennt wurden, auch hier zwei Banden befanden. Es stellte sich somit die Frage, ob beide Enzyme aktiv sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde ein Aktivitätsnachweis der Enzyme im Gel versucht. Zunächst wurde eine Blau Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einer aufgereinigten Probe durchgeführt. Neben dem Standard wurden zwei weitere Bahnen mit derselben Proteinprobe befüllt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zwischen den beiden Proteinbahnen in zwei Teile getrennt. Das Gelstück, welches den Standard und eine Proteinbahn enthielt (Gel A), wurde mit einer Coomassielösung gefärbt, das zweite Gelstück (Gel B) über Nacht im MES-Puffer 50 mM pH 5,8 gelagert. Am nächsten Morgen wurde das Gel B dreimal für 10 min mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Gele A und B nebeneinander gelegt und in der ungefärbten Proteinbahn befanden. Die ausgeschnittenen Banden wurden eine halbe Stunde lang in einer Lösung aus

500 μl MES-Puffer 50 mM pH 5,8
300 μl Mangan(II)-lösung 25mM
150 μl Tris-HEPES Puffer

inkubiert. Danach wurde eine Aeroplysininlösung 0,03mg/100 µl hinzupipettiert. Nach 20 min wurden 100 µl entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und kurz vor der HPLC-Messung aufgetaut.

Es wurden Vergleichsproben auf dieselbe Weise durchgeführt, wobei das dabei vermessene Gelstück kein Protein enthielt. Als Kontrollen dienten Proben, die weitere Gelstücke aus Gel B enthielten.

## Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität

Nachdem sich zu Beginn der Untersuchungen zeigte, dass das Enzym ein Cosubstrat für seine Funktion benötigt, wurde ein Experiment durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität des Enzyms zu beobachten.

Für Enzyme ist bekannt, dass diese aus einem Proteinanteil und einer reversibel oder irreversibel gebundenen Gruppe bestehen. Als reversible Gruppe können Metallionen in Frage kommen. Für Nitrilhydratasen ist bekannt, dass diese entweder Eisen oder Cobalt tragen.

Die Abhängigkeit der Nitrilhydratase von einem Cosubstrat wurde zwei Mal untersucht. Nachdem sich bei der Atomabsorptionsspektroskopie die Hypothese aufstellen ließ, dass die Nitrilhydratase womöglich von einem Metallion abhängig ist, wurde der Einfluss von Cobalt(II)chlorid, Eisen(II)sulfat-Heptahydrat, Mangan(II)sulfat-Heptahydrat und Nickel(II)chlorid-Hexahydrat auf P2 dialysiert untersucht. Die Salzlösungen wurden in einer 25 mM Konzentration hergestellt und führten in diesem Versuch zu einer Endkonzentration von 7,5 mM im Probenvolumen.

Aus diesen Ergebnissen sollte geschlossen werden, welches der genannten Metallionen das für die Aktivität verantwortliche Zentralatom der Nitrilhydratase ist.

Das Pipettierschema für den ersten Versuch:

30 µl	Enzymlsg.
30 µl	Salzlösung 25 mM
12 µl	Tris-HEPES Puffer
8 µl	Aeroplysininlsg.29 mM

Ein zweites Mal wurde der Versuch durchgeführt, um die Ergebnisse am aufgereinigten Enzym zu bestätigen. Aufgereinigtes Enzym aus der Größenausschlusschromatographie wurde mit verschiedenen Salzen inkubiert und im Aktivitätsassay vermessen. Es wurden folgende Salze eingesetzt: Cobalt(II)chlorid, Eisen(II)sulfat-Heptahydrat, Eisen(III)chlorid, , Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat, Mangan(II)sulfat-Heptahydrat, Nickel(II)chlorid-Hexahydrat und Zink(II)chlorid,.

5 μl der Enzymlösung wurden mit 3 μl der jeweiligen Salzlösung 25 mM, 1,2 μl Tris-HEPES-Puffer und 0,8 μl Substratlösung 20 min inkubiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und kurz vor der Messung aufgetaut und mit 60 μl Methanol versetzt.

Das Pipettierschema war wie folgt:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Salzlösung 25 mM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Aeroplysininlsg.29 mM

Es wurden von jedem Ansatz drei Proben hergestellt. Kontrollen wurden mit entsprechendem Puffer anstatt der Enzymlösung hergestellt.

Zusätzlich gab es noch einen weiteren Ansatz bei dem die Salzlösung durch Nanopure Wasser ersetzt wurde.

## Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität

Neben dem Einfluss der verschiedenen Salze auf die Enzymaktivität, wurde mit Mangan(II)sulfat-Heptahydrat, dem Salz, welches den stärksten Einfluss auf die Aktivität besitzt, der Einfluss der Salzkonzentration auf die Enzymaktivität überprüft.

Dazu wurden sieben unterschiedlich konzentrierte Mangan(II)-lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

3,125 mM 6,25 mM 12,5 mM 25 mM 90 mM 170 mM 250 mM

Diese Lösungen erreichten im Probenvolumen eine Endkonzentration in mM von:

 $0,94 \ mM \quad 1,875 \ mM \quad 3,75 \ mM \quad 7,5 \ mM \quad 30 \ mM \quad 51 \ mM \quad 75 \ mM$ 

Es wurde mit allen Lösungen in Dreifachbestimmungen das Aktivitätsassay durchgeführt. Zu allen Proben gab es entsprechende Kontrollen ohne Enzym. Zusätzlich wurde Kontrollen hergestellt, die anstatt der Salzlösung Nanopure Wasser enthielten.

### Material und Methoden

So sah das Pipettierschema aus:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Salzlösung
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

Für die letzten Kinetik Messungen sollte die geringste Salzkonzentration gewählt werden, die noch eine deutliche Aktivität bei der Nitrilhydratase hervorruft.

Zu diesem Zweck wurde der obige Versuch mit folgenden Konzentrationen in mM durchgeführt:

0,0025	0,025	0,25	2,5	25
		,	-	

Diese eingesetzten Lösungen führten zu folgenden Endkonzentrationen in  $\mu M$  in den Proben:

 $0,75 \ \mu M$  7,5  $\mu M$  75  $\mu M$  750  $\mu M$  7500  $\mu M$  7500  $\mu M$ 

Da die letzten Kinetikmessungen auch für Cobalt und Nickel durchgeführt wurden und für die drei Metalle dieselbe Konzentration eingesetzt werden sollte, wurden nach obigem Schema ebenfalls Messungen für diese zwei Salze gemacht. Es wurden aber nur vier verschiedene Konzentrationen in mM gewählt:

0,0025 mM 0,25 mM 2,5 mM 25 mM

Diese erreichten im Endvolumen folgende Konzentrationen in µM:

 $0,75 \ \mu M$  75  $\mu M$  750  $\mu M$  7500  $\mu M$ 

Diese Messungen erfolgten in einer Einfachbestimmung.

Nachdem die endgültigen Kinetikmessungen keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurde der obige Versuch ein weiteres Mal wiederholt, um zu sehen, welches der Metallionen in der geringsten Konzentration noch die größte Aktivität hervorruft, bzw. in welchem Konzentrationsbereich die halbmaximale Aktivität des Enzyms erreicht wird. Dazu wurden folgende Konzentrationen der Stammlösungen in mM eingesetzt:

0,05 mM 0,1 mM 0,5 mM 0,75 mM 1,75 mM 2,5 mM 25 mM

Es wurden folgende Endkonzentrationen im Assay in  $\mu$ M erreicht:

 $15 \ \mu M$   $30 \ \mu M$   $150 \ \mu M$   $225 \ \mu M$   $525 \ \mu M$   $750 \ \mu M$   $7500 \ \mu M$ 

## Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität

Bevor die synthetisierten Substanzen, siehe *Synthese von Aeroplysinin-1 Derivaten*, in Enzymassays untersucht werden konnten, musste ein geeignetes Lösungsmittel für diese gefunden werden, da ein 8 % iger Methanolanteil am Probenvolumen nicht ausreichte, um die Derivate in Lösung zu halten. Aus diesem Grund wurde eine Messreihe gestartet, bei der das Probenvolumen am Ende 5 bzw. 10 % DMSO enthalten sollte.

Es wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt, bei dem zu 4  $\mu$ l Enzymlösung 3  $\mu$ l Mangan(II)lösung 25mM, 1,2  $\mu$ l Tris-HEPES Puffer, 1  $\mu$ l Wasser und 0,8  $\mu$ l der Substratlösung 29 mM pipettiert wurden. In einer zusätzlichen Probe wurden 0,5  $\mu$ l Wasser durch 0,5  $\mu$ l DMSO und in einer weiteren 1  $\mu$ l Wasser durch dasselbe Volumen an DMSO ersetzt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6
Enzymlsg.	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl
Mn(II)lsg. 25 mM	3 µl					
Tris-HEPES Puffer	1,2 µl					
Substratlösung 29 mM	0,8 µl					
Nanopure Wasser	1 µl	5 µl	0,5 µl	4,5 µl	0 µl	4 µl
DMSO	0 ul	0 ul	0.5 ul	0.5 ul	1 ul	1 ul

Tabelle MM 6: Verschiedene Pipettierschemata für den Vergleich des Einflusses von unterschiedlichen DMSO-Volumina auf die Enzymaktivität. Material und Methoden

## Aktivitätsassay mit Aeroplysinin-1 Derivaten

Ein wichtiges Kriterium zur Beschreibung eines Enzyms ist die Selektivität des Enzyms gegenüber angebotenen Substraten. Um das Charakteristikum der Spezifität zu untersuchen, wurden die synthetisierten Substanzen mit Hilfe des Aktivitätsassays untersucht.

Die Größe des katalytischen Zentrums, sowie die sterische Konfiguration ergeben eine stärkere oder wenige starke Spezifität.

Von jeder untersuchten Substanz wurden jeweils drei Ansätze mit und ohne Enzym vermessen. Als Positivkontrolle diente eine Versuchsreihe mit dem natürlichen Substrat, wobei diese Aktivität als maximale Aktivität festgesetzt wurde. Alle verwendeten Substanzen wurden nicht in Methanol 100 %, sondern in einer 1:1 Mischung aus Methanol und DMSO gelöst.

Um das eingesetzte Volumen des aufgereinigten Enzyms so gering wie möglich zu halten, wurde folgendes Pipettierschema gewählt:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Mangan(II)-lösung 25mM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Substratlösung 29mM

Nach der zwanzig minütigen Inkubation wurde den Proben 60 µl Methanol zugesetzt und diese weiter wie unter *Aktivitätsassay* beschrieben behandelt. Die HPLC Auswertung erfolgte über einen Total Plot.

Probenbezeichnung	Substanzname
1	Aeroplysinin-1
2	2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril
3	3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril
4	3,5-Dibromo-2-acetyl-4-methoxyphenylacetonitril
5	3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetonitril
6	3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäure
7	3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester
8	3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester

9	2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-
	oxoacetaldehyde O-methyloxim
10	6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion
11	Diacetylaeroplysinin

Tabelle MM 7: Probenbezeichnungen und Substanznamen der synthetisierten Aeroplysinin-1 Derivate und Aeroplysinin-1.





Abbildung MM 1: Strukturformeln der synthetisierten Aeroplysinin-1 Derivate und Aeroplysinin-1.

## **Enzyminhibition durch Aeroplysinin-1 Derivate**

Nach der Überprüfung der Selektivität der Nitrilhydratase, stellte sich die Frage, ob die Derivate womöglich eine kompetitiv hemmende Wirkung auf das Enzym haben.

Inhibitoren, die dem natürlichen Substrat ähneln, können mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren. Bei einer genügend hohen Konzentration an Inhibitor, kann das natürliche Substrat sogar vollkommen verdrängt werden. Im Umkehrschluss ist es möglich mit steigender Substratkonzentration den Inhibitor von der Bindungsstelle zu verdrängen. In solch einem Fall liegt eine kompetitive Hemmung vor.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im Abschnitt *Abbau synthetisierter Substanzen beschrieben*, mit dem Unterschied, dass 0,8  $\mu$ l einer äquimolaren Mischung aus Aeroplysinin-1 und eines Derivats eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle diente eine Versuchsreihe mit 0,4  $\mu$ l des natürlichen Substrats und 0,4  $\mu$ l einer 1:1 Mischung aus Methanol und DMSO. Alle verwendeten Substanzen in einer 1:1 Mischung aus Methanol und DMSO gelöst.

Das Pipettierschema für diesen Versuch:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Mangan(II)-lösung 25mM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,4 µl	Aeroplysininlsg. 29mM
0,4 µl	Derivatlsg. 29mM

## Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Aeroplysininderivate

Es wurde für Aeroplysinin-1 und die synthetisierten Substrate, durch Mitarbeiter des Institutes für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie AK Brötz, die MHK (minimale Hemmkonzentration) nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI M7-A8, 2008) durch Verwendung der, broth microdilution method" bestimmt. Für die Herstellung des Inokulums eines Bakterienstammes wurde die "direct colony suspension method" verwendet.

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

E. coli ATCC 25922 S. aureus ATCC 29213 P. aeroginosa PA01

Die Kultivierung der Stämme erfolgte für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Agar. 3 - 5 morphologisch ähnliche Kolonien wurden in 0.9 % NaCl-Lösung resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0.1 eingestellt. Die Zellzahl wurde anschließend durch Verdünnung in Mueller-Hinton-Medium auf 2 x  $10^5$  KbE / ml eingestellt. 50 µL jeder in Mueller-Hinton-Bouillon hergestellten Probenlösung wurden mit einer Konzentration von 64 µg/ml in einer 96-well – Mikrotiterplatte (=MTP) (von Sarstedt) vorbereitet und mit 50 μl Bakteriensuspension beimpft. Die Endkonzentration der Bakterien von ca. 1 x  $10^5$  KbE / ml in einem Volumen von 100 µl Mueller-Hinton-Bouillon wurde durch die Bestimmung der Keimzahl der Bakteriensuspension kontrolliert. Es wurden folgende Kontrollproben in der MTP angefertigt: Wachstumskontrolle (nur Bakteriensuspension), Sterilkontrolle (nur Mueller-Hinton-Bouillon) und Probenkontrolle (nur Testsubstanz und Mueller-Hinton-Bouillon um falsch positive Ergebnisse bei Konzentrationsproblemen der Substanz im Medium (Präzipitation) zu vermeiden).

Als Positivkontrolle wurde die MHK für Antibiotika mit bekannten, bakteriellen Targets (Ciprofloxacin (Fluka), Rifampicin (AppliChem), Tetracyclin (Sigma-Aldrich) und Vancomycin (AppliChem)) parallel bestimmt.

Die Mikrotiterplatten wurden für 16 - 20 h in einem Inkubator bei 37 °C bebrütet. Die MHK wurde durch visuelle Auswertung, als die niedrigste Konzentration einer Verbindung, die sichtbar das Koloniewachstum hemmte, bestimmt.

## Temperaturabhängigkeit

Chemische Reaktionen können durch Energie- oder Wärmezufuhr gestartet und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden. Die Arrhenius Gleichung

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}}$$

 $(k = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, A = präexponentieller Faktor, E_A = Aktivierungsenergie, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur) beschreibt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur. Nach der van-'t-Hoff'schen Regel verdoppelt bis vervierfacht sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturänderung von 10 K.$ 

Die Annahmen stimmen auch für Enyzmreaktionen. Jedoch muss man bei Enzymreaktionen beachten, dass mit der Temperatursteigerung auch eine Veränderung der Proteinstruktur einhergehen kann, was zu einer Verminderung der Aktivität führt. Das bedeutet, dass in einem bestimmten Temperaturbereich, meistens zwischen 0 °C und 40 °C, der positive Effekt der Temperatursteigerung überwiegt und ab einer Temperatur von ungefähr 40 °C jede weitere Temperaturerhöhung die Proteinstruktur so weit zerstört, dass es zu einer Aktivitätsabnahme kommt.

Die Bestimmung der Temperatur erfolgte bei sieben verschiedenen Temperaturen:

 $10 \circ C$  $20 \circ C$  $30 \circ C$  $40 \circ C$  $50 \circ C$  $60 \circ C$  $80 \circ C$ Es wurde für diesen Versuch folgendes Pipettierschema verwendet:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Mangan(II)-lösung 25 mM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Aeroplysininlsg. 29 mM

Die Proben wurden nach Zugabe der Substratlösung für 20 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und danach direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und erst kurz vor der Messung einzeln aufgetaut und mit 60 µl Methanol versetzt.

Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung hergestellt. Kontrollproben enthielten anstatt der Substratlösung nur Methanol.

#### Kinetikmessungen

Wie in der anorganischen und organischen Chemie, können auch in der Biochemie enzymatisch katalysierte Reaktionen auf ihren zeitlichen Reaktionsverlauf hin untersucht werden. Für Kinetik Messungen in der Biochemie legt man die Theorie von Michaelis-Menten zugrunde. Diese Theorie geht von folgendem Reaktionsmodell aus:

$$E + S \Longrightarrow ES \Longrightarrow E + P_1 + P_2$$

Für die Gesamtreaktion ist die Reaktion aus dem Enzym-Substrat-Komplex ES heraus geschwindigkeitsbestimmend.

Michaelis und Menten formten von dieser Annahme ausgehend und nach Ausformulierung der dazugehörigen Formeln die allgemein anerkannte Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit gleich dem Quotienten aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  multipliziert mit der Substratkonzentration und der Summe aus selbiger und der Substratkonzentration bei halbmaximaler Enzymsättigung K<sub>m</sub>, bekannt als Michaelis-Menten-Konstante.

Liegt die Hälfte des Enzyms als Enzym-Substrat-Komplex vor, ist  $K_m$  erreicht. Am  $K_m$ -Wert lässt sich die Affinität eines Enzyms zum dargebotenen Substrat abschätzen. Ist der Wert niedrig, ist eine geringe Substratkonzentration nötig um Halbsättigung zu erreichen, sodass die Affinität zum Substrat hoch ist und vice versa.

Um eine Ezymsättigung, oder die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$ , zu erreichen sind in der Regel Substratkonzentrationen nötig, die ungefähr dem zehnfachen Wert von  $K_m$  entsprechen.

Eine gängige Form zur Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes ist die Linearisierung der Michaelis-Menten-Kurve nach Lineweaver und Burk. Durch Doppellogarythmierung der x-

und y-Achse erhält man aus der Kurve eine Gerade der Form y=ax+b, bei der der y-Achsenabschnitt dem Kehrwert von  $V_{max}$  und der Betrag des x-Achsenabschnittes dem Kehrwert von  $K_m$  entspricht.



Um die Enzymkinetik zu messen, wird bei gleich bleibender Enyzmmenge, die Substratkonzentration so weit erhöht, bis die Sättigung erreicht wird.

Nachdem zunächst Messungen mit nicht komplett aufgereinigtem Enzym darauf hindeuteten, dass lediglich Manganionen die Aktivität wieder herstellen, im Nachhinein allerdings gezeigt werden konnte, dass Cobalt und Nickel ebenfalls einen positiven Effekt auf die Aktivität haben, wurden die Kinetikmessungen unter Zugabe aller drei Metallionen durchgeführt. Folgendes Pipettierschema wurde gewählt:

5 µl	Enzymlsg.
3 µl	Salzlösung 250 µM
1,2 µl	Tris-HEPES Puffer
0,8 µl	Aeroplysininlsg.

Für die Messungen wurden folgende Substratkonzentrationen in µmol/ml im Probenvolumen gewählt:

0,009 0,09 0,45 0,9 4,5 9 18 36 54 72 90 108

Alle Proben, deren Substratkonzentration über 36 mM lag, führten aufgrund der schlechten Löslichkeit zur Ausfällung des Substrats im Probenvolumen und wurden deswegen nicht weiter für die Ergebnisse beachtet.

Nach 20 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis kurz vor der Messung bei -80°C gelagert. Den Proben wurden vor

dem Vermessen 60 µl Methanol hinzugegeben. Alle Proben wurden in sechsfacher Ausführung erstellt. Kontrollen wurden durch Ersetzen der Substratlösung durch Methanol hergestellt.

## Trypsin-Verdau und Massenanalyse der Nitrilhydratase

Die Aufreinigung des Enzymextraktes führte in den reinsten Proben zu SDS-Gelen, die nur noch zwei deutliche Banden aufwiesen. Diese Banden wurden ausgeschnitten und zum Trypsin-Verdau und anschließender Massenanalyse beim BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich Heine Universität) abgegeben. Alle weiter beschriebenen Arbeiten wurden von Mitarbeitern des BMFZ durchgeführt. Tabelle MM 8 zeigt die vom Forschungszentrum verwendeten Chemikalien.

Marke	Chemikalie
Merck	Acetonitril, HPLC Grad
Fluka	Ammoniumhydrogencarbonat, p.a.
	Ameisensäure
Promega	Trypsin V511a, Sigma proteomics Grad T6567

Tabelle MM 8: Verwendete Chemikalien für den Trypsin-Verdau und die Massenanalyse.

## Auswaschen der Proteine

Die in Frage kommenden Proteinbanden wurden so eng wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten und vorsichtig, unter Vermeidung einer Kontamination des Gelstücks mit Keratin, in 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Coomassie Färbung wurde mit einer entsprechenden Entfärbelösung entfernt und die Gelstücke zehn Minuten lang in 100 µl einer eins zu eins Mischung aus Ammoniumhydrogencarbonat 25 mM und Acetonitril inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig entfernt und in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden ein weiteres Mal mit 100 µl der genannten Mischung überschichtet und dieses Mal eine halbe Stunde lang unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abnehmen der Flüssigkeit und der Überführung in ein separates Reaktionsgefäß wurde dieser Schritt zwei weitere Male wiederholt. Zuletzt wurden die Gelstücke in Acetonitril 30 Minuten lang bis zur vollständigen Dehydrierung der Gele gewaschen. Danach wurde das Acetonitril entfernt, gesammelt und die Gelstücke in einer Zentrifuge unter Vakuum getrocknet.

### Trypsinverdau und Elution der Proteine

Die getrockneten Gelstücke wurden in einem bestimmten Volumen, welches sich nach der Anzahl der Gelstücke richtete und ausreichend sein musste, um diese vollständig zu bedecken, einer Trypsinlösung (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l in kaltem Ammoniumhydrogencarbonat Puffer 25 mM pH 8) 30 Minuten lang rehydratisiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke mit Ammoniumhydrogencarbonat Puffer 25 mM überschichtet und 12 bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Verdau wurden die Gelstücke abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Das Doppelte des Volumens, in dem die Gelstücke vorher über Nacht inkubierten, wurde den Gelstücken in Form von Wasser zugeführt. Die Stücke wurden fünf Minuten geschüttelt und weitere fünf Minuten im Ultraschallbad inkubiert und dann noch zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Die Gelstücke wurden daraufhin in einer Elutionslösung, bestehend aus 50 % Acetonitril, 45 % Ameisensäure und 5 % Wasser, eingelegt und 30 min geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen L Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die Gele noch mit Acetonitril überschichtet, was diese vollständig entwässerte und alle verbliebenen Proteine herauslöste. Die Proben wurden unter Schütteln 30 min inkubiert, danach zentrifugiert und der Überstand mit den restlichen Überständen vereint. Die eluierten Proteine wurden an einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeengt und dann bei -20 °C gelagert.

#### **Massenanalyse**

Die eluierten Proteine wurden über ein MALDI-TOF Gerät analysiert. Die erhaltenen Aminosäurebruchstücke wurden von den Mitarbeitern des Forschungszentrums de novo sequenziert. Sequenzierte Bruchstücke wurden in verschiedenen Proteindatenbanken (EMBL, NCBI blast, Mascot durch das BMFZ) gesucht, um eine Verbindung zu bereits bekannten Nitrilhydratasen herzustellen.

### Synthese von Aeroplysinin-1 Derivaten

Die Synthese von Aeroplysinin-1 und seiner Derivate wurde bereits 1975 von Andersen und Faulkner berichtet. Die erhaltenen Derivate eigneten sich als mögliche Substrate für die Nitrilhydratase, was Hinweise auf die Substratspezifität hätte geben können, sodass diese nachsynthetisiert werden sollten.

Für die Synthese wurden die Veröffentlichung von Farkas et al. (1971) (Farkas, Gottsegen et al. 1971) und der Bericht von Andersen und Faulkner (1975) (Andersen and Faulkner 1975) als Kochvorschriften verwendet.

a) Als Ausgangssubstanz diente 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd. 25 g davon wurden in 41,6 ml Dimethylformamid mit 20,7 ml Benzylchlorid und 20,7 g wasserfreiem Kaliumcarbonat dreieinhalb Stunden auf dem Wasserbad gerührt. Die Lösung wurde danach mit Wasser verdünnt, was zum Ausfallen des Produkts 2-Benzyloxy-4-methoxybenzaldehyd führte.

b) 14,38 g des 2-Benzyloxy-4-methoxybenzaldehyd wurden fünf Stunden in 150 ml Acetanhydrid mit 14,38 g wasserfreiem Natriumacetat und 26 g Hippursäure erhitzt. Das erhaltene Produkt, 4-(2-Benzyloxy-4methoxybenzyliden-)2-phenyl- $\Delta^2$ -oxazolin-5-on, konnte als Niederschlag abfiltriert werden.

c) 36 g des Azlactons wurden zwei Stunden in 170 ml einer 30 % igen Kaliumhydroxidlösung unter Rückfluss erhitzt. Zur abgekühlten Lösung wurden 15,6 g Hydroxylaminhydrochlorid in 32 ml Wasser gegeben. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 10 % iger Salzsäure bis zur vollständigen Fällung von (2-Benzyloxy-4-methoxyphenyl)-brenztraubensäureoxim angesäuert.

d) 18,5 g des getrockneten Oxims wurden portionsweise bei 40-50°C zu 70 ml Acetanhydrid gegeben. Nach zehn Minuten wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und mit Natriumhydroxid bis zur vollständigen Fällung des korrespondierenden Nitrils alkalisiert.

e) 14,9 g von (2-Benzyloxy-4-methoxyphenyl)acetonitril wurden über Nacht über Palladium hydriert.

f) 5,3 g des Nitrils wurden in 63,3 ml Pyridin gelöst. 23,6g Pyridiniumbromidperbromid in 63,3 ml Pyridin wurden hinzugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Lösung in Eiswasser gegeben. Es fiel 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril aus.

g) Zu 8 g des bromierten Nitrils in 360 ml Essigsäure wurden 25 g Blei(IV)tetraacetat in 553 ml Essigsäure gegeben und 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde

in Eiswasser gegeben, dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt und einrotiert. Aus diesem Schritt entstand entgegen der Angabe in dem Bericht nicht zu 35 % das diacetylierte Dienon, sondern 11 g eines Gemisches verschiendster Substanzen, die chromatographisch getrennt werden mussten.

Reaktionsschritt g) wurde aufgrund fehlender Angaben im Bericht von Andersen und Faulkner anhand einer Reaktionsvorschrift von Lee und Su (2007) (Lee and Su 2007) durchgeführt. Verunreinigungen mit Benzylchlorid führten zu den Benzoyloxy-Derivaten.

10,4 g Produkt aus dem letzten Reaktionsschritt wurden in Dichlormethan umkristallisiert. Nach der Umkristallisation blieben 4,9 g übrig. Diese wurden mittels einer HP20 Säule getrennt. Die zwei Fraktionen, die bei 85 und 90 % Methanol eluierten (insgesamt ca. 760 mg), hatten identische Chromatogramme und wurden zusammengeführt. Mit der zusammengeführten Probe, sowie den Fraktionen, die bei 95 % Methanol und 100 % Aceton eluierten, wurden Sephadex Säulen laufen gelassen.

Ungefähr 950 mg einer Fraktion aus der Aceton-Fraktion wurden weiter über eine Kieselgelsäule getrennt.

Alle erhaltenen Fraktionen wurden per HPLC auf ihre Zusammensetzung und Reinheit geprüft. Geeignete Proben wurden bei unzureichender Reinheit noch mittels der semipräparativen HPLC aufgereinigt.

Reine Substanzen wurden per HPLC-MS, oder GC-MS sowie über NMR aufgeklärt.

## **Acetylierung von Aeroplysinin-1**

Neben der Synthese einiger Aeroplysinin-1 Derivate wurde noch ein weiteres Derivat durch Acetylierung des natürlichen Substrats erhalten.

Dazu wurden 10 mg Aeroplysinin-1 in 0,75 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid versetzt und über Nacht in einem verschlossenen Gefäß stehen gelassen. Dann wurde das restliche Acetanhydrid abgedampft und das Pyridin dreimal mit 5 ml saurem Wasser pH 4-5 gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden einrotiert.

Es wurden 11,52 mg Substanz erhalten.

Die Struktur wurde per NMR und MS bestimmt.

#### HP 20 Säulenchromatographie

Die Auftrennung der nach Oxidation von 3,5-Dibromo-2-hyroxy-4-methoxyphenylacetonitril mit Bleitetraacetat entstandenen Produkte erfolgte säulenchromatographisch. Als Säulenmaterial diente DIAION HP20. Dieses Material gehört zu den synthetischen Adsorbentien, bestehend aus einer polymerisierten Polystyrenmatrix, welche sphärische Partikel bilden. Die sphärischen Partikel besitzen ein Porennetz, welches Substanzen, die in die Poren hinein diffundieren können, stärker zurückhält, als Substanzen, die nicht in die Poren, oder nicht so weit in die Poren, diffundieren können. Es erfolgt eine Auftrennung nach dem Prinzip des Größenausschlusses.

Das Säulenmaterial wurde einen Tag vor der Benutzung in Wasser aufgeschlemmt und in einer entsprechend großen Säule bis zum darauf folgenden Tag stehen gelassen. Die Probe wurde in Methanol gelöst, auf eine kleine Menge des Säulenmaterials aufgetragen und ebenfalls, zum Abdampfen des Methanols, über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag gab man die adsorbierte Probe gleichmäßig auf das vorher getrocknete Säulenmaterial in der Säule und füllte anschließend noch Glaswolle auf die Startzone, um ein Aufschwimmen des DIAIONs zu verhindern.

Beginnend mit 100% Wasser wurde danach mit aufsteigenden Gehältern an Methanol eluiert. Jeder Elutionsschritt wurde bis zum Trockenlaufen der Säule durchgeführt.

## Sephadex LH20 Säulenchromatographie

Nach der groben Auftrennung der mit Blei-(IV)-tetraacetat oxidierten Substanzen mittels HP 20 wurden anschließend einzelne Fraktionen durch die Verwendung von Sephadex LH20 weiter aufgereinigt. Sephadex LH20 besteht aus hydroxypropylierten Dextranpartikeln, die ebenso wie DIAION HP20 ein Porennetz aufweisen. Wie bei DIAION HP20 erfolgt die Auftrennung durch Größenausschluss. Im Unterschied zu DIAION HP20 ist aber bei Sephadex LH20 der Partikeldurchmesser in Methanol um fast ein Fünftel geringer, womit auch die Porengröße anders sein muss, was bei einer Auftrennung von identischen Proben zu einer unterschiedlichen Trennung führen würde.

Vor der Benutzung des Säulematerials wurde dieses zunächst im Fließmittel, Methanol, quellen gelassen, da sich das Volumen des Materials in Abhängigkeit vom Lösemittel ändern

kann. Die Proben wurden mit Methanol 100% eluiert. Fraktionen wurden alle 20 min gesammelt.

Eine Fraktion, die sich nur mit Aceton von der HP20 Säule spülen ließ, wurde mit einem äquivalenten Gemisch aus Methanol und Dichlormethan über die Sephadex Säule getrennt.

### Kieselgel Säulenchromatographie

Eine weitere Chromatographiemethode, die zur Auftrennung der Syntheseprodukte herangezogen wurde, war die Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase. Nachdem die Probe HP 20 Aceton über eine Sephadex LH20 Säule getrennt wurde, wurde eine der daraus erhaltenen Fraktionen über eine Kieselgelsäule getrennt.

Kieselgel besteht aus vernetztem Siliciumdioxid, welches an seiner Oberfläche Silanolgruppen trägt. Das Säulenmaterial kann in unterschiedlichen Partikelgrößen verwendet werden, was sich auf die Adsorptions- bzw. Trennleistung auswirkt. Die Trennung erfolgt durch reversible Sorptionsprozesse zwischen dem Analyten und der stationären und mobilen Phase. Verwendet wird Kieselgel als stationäre Phase dann, wenn man semi- bis unpolare Substanzgemische auftrennen möchte.

Die zu trennende Probe wurde zunächst mit Dichlormethan und nach einem Tag mit einem Methanol/Dichlormethan Gemisch von 1:9 eluiert. Alle 20 min wurde eine neue Fraktion gesammelt.

## **Semipräparative HPLC**

Diese Methode diente der endgültigen Reinigung der bei der Synthese erhaltenen Fraktionen. Die geeigneten Fließmittelzusammensetzungen wurden abhängig von der gesuchten Substanz vor jeder Reinigung in separaten Läufen ermittelt. Als Fließmittel dienten Methanol und Trifluoressigsäure 0,1 %. Die aufzureinigenden Proben wurden in Methanol in einer Konzentration von 1mg/100µl gelöst. Es wurden pro Injektion 100 µl über eine 100 µl Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Die Fließmittel wurden mit einer Flussrate von 5 ml/min gewählt und die Detektion der Proben erfolgte bei den entsprechenden Absorptionsmaxima der gesuchten Substanzen. Die aufgesammelten Proben wurden in Rundkolben gesammelt und nach beendeter Aufreinigung einrotiert. Für diese Aufreinigungsmethode wurde ein Merck-HPLC System verwendet. Als Gradientenpumpe diente eine LaChrom L-7100, als Detektor eine LaChrom L-7400. Es wurde eine Eurospher 100-C18, 5  $\mu$ m, 300 mm x 8 mm, der Firma Knauer verwendet.

### HPLC-MS

Die Untersuchung der Masse einiger der Syntheseprodukte erfolgte über ein Finnigan LCQ-DECA Massenspektrometer, an welches ein Agilent 1110 HPLC-System angeschlossen war. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Knauer, Eurospher 100-C18, 5  $\mu$ m, 250x2 mM i.d.

Massenspektrometer unterscheiden gemessene Substanzen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis. Es kann zur Identifizierung und/oder Bestimmung bekannter, sowie Substanzen dienen und sogar Informationen über unbekannter die chemische Zusammensetzung der Moleküle liefern, wenn in dem Molekül Atome mit definierten Isotopenmustern auftreten. Massenspektrometer bestehen aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor.

Als MS diente eine Finnigan LCQDeca, Thermoquest mit einer Vakuumpumpe, Edwards 30, BOC.

#### GC-MS

GC-MS Messungen wurden in der Abteilung Massenspektrometrie der Anorganischen und Organischen Chemie an der Heinrich Heine Universität durchgeführt.

Mit der Gaschromatographie (GC) können Substanzen, die sich bis 350 °C unzersetzt und vollständig verdampfen lassen, quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Die zu untersuchende Probe wird verdampft und gelangt mit dem inerten Trägergas in die temperierte Säule. Dort kommt es je nach Beschaffenheit der stationären Phase zu Verteilungs- oder De- und Adsorptionsvorgängen. Diese Verteilungsvorgänge werden durch die Temperatur der Säule beeinflusst. Die Elution kann dabei isothermisch erfolgen, oder durch einen programmierten Anstieg der Säulentemperatur in einem vorgegebenen Zeitintervall.

Die Detektion kann bei der GC auf verschiedene Weisen erfolgen. Die häufigsten Detektoren sind die FIDs (Flammenionisationsdetektoren) und Wärmeleitfähigkeitsdetektoren. Bei FIDs wird die Probe am Detektor verbrannt und eine dadurch veränderte Spannung in einem elektrischen Feld im Detektor registriert. Bei Wärmeleitfähigkeitsdetektoren vergleicht man die Wärmeleitfähigkeit des Trägergases mit dem Gemisch aus Trägergas und Substanz in einer zweigeteilten Messzelle.

Die verwendete GC war eine Thermo Finnigan Trace GC Ultra. Es wurde eine Kapillarsäule DB 5ms mit einer Länge von 15 m verwendet. Das Temperaturprogramm startete bei 50 °C und endete bei 250 °C, bei einer Aufheizrate von 20 °C/min.

Die angeschlossene MS war eine Thermo Finnigan Trace DSQ. Als Ionisierungsmethode diente EI (Elektronenstoßionisation) mit einer Spannung von 70 eV. Die Quellentemperatur lag bei 210 °C.

## **NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektroskopie, Kernspinresonanzspektroskopie, ist eine Methode zur Untersuchung von Molekülstrukturen. Sie beruht auf der Tatsache, dass bestimmte Atome, die eine ungerade Anzahl von Protonen und/oder Neutronen enthalten, einen sogenannten Kernspin besitzen. Solche Atome können in magnetischen Feldern unter bestimmten Voraussetzungen die durch das Gerät eingestrahlte Energie adsorbieren. Der eintretende Energieverlust wird registriert und führt zu entsprechenden Kernresonanzspektren (NMR-Spektrum). Die Resonanzfrequenz ist charakteristisch für Atome und deren Umgebung.

Die Messungen (1H NMR, 13C NMR, HMBC, HMQC) wurden bei 300 °K auf einem Bruker ARX-500 Gerät am Institut für Anorganische und Strukturchemie, HHU Düsseldorf, durchgeführt.

# Ergebnisse

Diese Kapitel faßt die Ergebnisse der Versuche, die im Methodenteil beschrieben wurden und die der Isolierung und Charakterisierung der Nitrilhydratase des Schwammes *Aplysina cavernicola* dienen, zusammen.

## Pufferäquilibrierung

Für ein funktionierendes Assay musste ein Puffer bzw. ein Puffersystem gefunden werden, welches es erlaubte, das Assay im pH-Optimum der Nitrilhydratase durchzuführen. Dieses wurde zuletzt von Fendert (2000) bestimmt und sollte bei pH 7 bis 7,5 liegen. Die Schwammextraktion wurde für diese Arbeit, in Anlehnung an die Arbeit von Frau Putz, bei pH 5,8 durchgeführt. Weitere Chomatographieschritte erfolgten bei pH 4, sodass ein Puffer für die Assays gewählt werden musste, der in der Lage war, die pH-Werte auf den entsprechenden pH einzustellen und am Ende noch genügend Pufferkapazität aufwies, um die Reaktion im pH-Optimum zu halten.



Diagramm 1: Relative Aeroplysininabnahme in % in Abhängigkeit vom zugesetzten Probenpuffer. Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

Für diesen Zweck wurden verschiedene Mischungen aus HEPES Puffer pH 7,8 1 M und Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,5 M hergestellt und zur Enzymlösung gegeben. Danach wurde die Substratlösung hinzupipettiert und die Reaktion nach 20 min gestoppt.

Die Aktivitäten der einzelnen Enzym-Puffermischungen zeigt Diagramm 1.

Die Ergebnisse zeigten, dass ein pH Anstieg von pH 7, zu pH 7,8 eine gleichzeitige Aktivitätszunahme von 9 auf bis zu 35 % bewirkte. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 8,8 hatte keine weiteren positiven Effekte. Es war ein Aktivitätsverlust von fast 30 % zu verzeichnen. Bei pH 7,8, einer eins zu eins Mischung aus HEPES Puffer und Tris-HCl Puffer, war die höchste Aktivität messbar. Aus diesem Grund wurde für alle weiter folgenden Aktivitätsmessungen immer eine eins zu eins Mischung dieser beiden Puffer verwendet.

### Zellaufschluss

Frühere Arbeiten, die sich mit der enzymatischen Umsetzung des Aeroplysinins zum korrespondierenden Dienon beschäftigten, wurden mit einem, durch Zellaufschluss hergestellten, Enzymrohextrakt mit anschließender PD-10 Entsalzung durchgeführt. Für diese Arbeit standen diverse Laborgeräte, die eine weitere Auftrennung des Rohextraktes erlaubten, zur Verfügung.

Um eine grobe Fraktionierung der aus dem Schwamm isolierten Proteine zu erhalten, wurde die differentielle Zentrifugation eingesetzt. Mit Hilfe des Aktivitätsassays wurde der Verlauf der Aufreinigung kontrolliert.

Im ersten Zentrifugationsschritt bei 800 x g wurden ungelöste Zellen, Zellbruchstücke und Zellkerne abzentrifugiert. Der abzentrifugierte Niederschlag zeigte nach Resuspendierung keine Aktivität, wohingegen der Überstand S1 deutlich aktiv war, mit einer relativen Eduktabnahme von ungefähr 17 %. Im zweiten Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g, in dem alle Zellorganellen entfernt wurden, zeigt sich ebenfalls, dass der Überstand eine viel höhere Aktivität von ungefähr 23 % aufweist, als der Niederschlag. Die höchste Aktivität zeigte sich im Überstand, in dem die löslichen Proteine des aufgeschlossenen Probenmaterials enthalten sind, nach der Ultrazentrifugation bei 100.000 x g. Mit einer relativen Aktivität von ca. 27 % gegenüber knapp 0,6 % in der Pelletfraktion, welche Membranproteine enthält, konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Nitrilhydratase um ein lösliches Protein handelt (siehe Diagramm 2).



Diagramm 2: Relative Aeroplysininabnahme in % im Aktivitätsassay mit Proben aus der Ultrazentrifugation. Pellet (P1) und Überstand (S1) aus dem ersten, Pellet (P2) und Überstand (S2) aus dem zweiten und Pellet (P3) und Überstand (S3) aus dem dritten Zentrifugationsschritt. Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktion wurden mit dem Bradfordassay ermittelt.

Tabelle 1 zeigt die Proteinkonzentrationen der sechs Fraktionen.

Die Gesamtmenge der aus dem Schwamm isolierten Proteine im Überstand aus der Ultrazentrifugation war reproduzierbar. Die Ergebnisse mehrerer Aufreinigungen (n = 3) zeigten, dass durchschnittlich 1,8 mg/ml +/- 0,2 mg/ml in der, die Nitrilhydratase enthaltenden, S3 Fraktion zu finden waren.

Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]	Gesamtvolumen [ml]	Gesamtproteinmenge [mg]
P1	1,0	10	10
S1	1,8	89,5	161
P2	1,3	8	10
S2	1,8	82,9	149
P3	1,7	3	5
S3	1,7	83	140

Tabelle 1: Proteinkonzentration, Gesamtvolumina und Gesamtgehalt der einzelnen Fraktionen aus der differentiellen Ultrazentrifugation. Die Proteinkonzentrationen wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt.



Abbildung 4: SDS-PAGE (12%) der Niederschläge und Überstände aus der differentiellen Zentrifugation. Niederschlag (P1) und Überstand (S1) aus dem ersten, Niederschlag (P2) und Überstand (S2) aus dem zweiten und Niederschlag (P3) und Überstand (S3) aus dem dritten Zentrifugationsschritt.

Die SDS-Gelelektrophorese sollte einen Eindruck über die Komplexität der einzelnen Fraktionen aus der Zentrifugation vermitteln (Abbildung 4).

Zwar war das Bandenmuster äußerst komplex, jedoch konnte man bereits intesive Banden, welche in allen Fraktionen, also auch denen, in denen keine Aktivität gemessen wurde, vorkamen, wie zum Beispiel die Banden bei 17 kDa und kurz über dem 43 kDa Standard, als mögliche Bruchstücke des Enzyms ausschließen.

### Entsalzung

Die durchgeführte Entsalzung durch PD-10 Säulen führte zu einem erstaunlichen Ergebnis. Das erhaltene Eluat war inaktiv, obwohl die auf die Säule aufgetragene Probe aktiv war. In der Dissertation von Fendert, der diese Methode als einzigen Reinigungsschritt nach dem Zellaufschluss durchgeführt hat, wird dieses Phänomen nicht erwähnt.

Dieses Ergebnis ließ die Vermutung zu, dass eine Substanz, die kleiner als die Ausschlussgröße des Säulenmaterials ist, in diesem Fall 5000 Da, einen wichtigen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt.

Da zu Beginn der Bearbeitung des Enzyms noch nichts über die, die Aktivität beeinflussende, Substanz bekannt war, wurden keine weiteren Entsalzungen mehr durchgeführt.

## Ammoniumsulfatfällung

Als ein Reinigungsschritt nach der Ultrazentrifugation etablierte sich die Ammoniumsulfatfällung der S3 Fraktion. In einer Zwei-Schritt-Fällung wurden im ersten Schritt, bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 41 % m/v Proteine mit einem hohen Anteil an hydrophoben Resten abgetrennt. In einem zweiten Schritt bis zur 67 % igen m/v Sättigung, wurden Proteine gefällt, deren Seitenketten überwiegend polar waren.

Keine der vier erhaltenen Fraktionen, zwei Pellets (P1 41 % und P2 67 %) und zwei Überstände (S1 41 % und S2 67 %), zeigte Aktivität. Die Proteingehälter und Bandenmuster im SDS-Gel (Abbildung 5) der einzelnen Fraktionen zeigten allerdings, dass grundsätzlich eine Trennung der Proteine erfolgt war.

Betrachtet man die fehlende Aktivität der Proben, ist dies nicht verwunderlich, da die Struktur der Proteine reversibel verändert wird und somit die Aktivität verloren gehen kann. Eine anschließende Dialyse des Pellets P2 67 % und Mangan(II)-Zugabe zeigten, dass die Nitrilhydratase in dieser Fraktion zu finden war.

Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]	Gesamtvolumen [ml]	Gesamtproteinmenge [mg]
P1 41 %	1,4	11	15,4
S1 41 %	0,7	22,5	15,75
P2 67 %	1,5	10	15
S2 67 %	0,4	1,8	0,72

Tabelle 2: Proteinkonzentrationen, Gesamtvolumina und Gesamtproteinmengen der Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung. Niederschlag (P1 41%) und Überstand (S1 41%) aus dem ersten, Niederschlag (P2 67%) und Überstand (S2 67%) aus dem zweiten Fällungsschritt.

Die Tabelle zeigt, dass 50 % aller in der eingesetzten Probe enthaltenen Proteine im ersten Schritt als Pellet P1 41 % gefällt wurden. Fast 95 % der im Überstand S1 41 % befindlichen Proteine wurden im zweiten Schritt gefällt.

Schaut man auf das entsprechende Bandenmuster der einzelnen Fraktionen, sieht man deutliche Unterschiede zwischen beiden Pellets. Knapp über dem 95 kDa Standard sieht man bei P1 41 % eine der Hauptbanden des Pellets, die im P2 67 % fehlt. Die nächsten zwei Hauptbanden von P1 41 % liegen knapp über, bzw. auf Höhe des 43 kDa Standards. Die etwas höher gelegene Bande tritt im Vergleichspellet nur sehr schwach auf, wohingegen die tiefer liegende fehlt.

Das Pellet P2 67 % hat zwei Hauptbanden auf Höhe des 95 kDa und 72 kda Standards, welche bei P1 41 % nicht auftreten. Eine dritte, deutlich hervortretende Bande, die bei
P1 41 % nur schwach auftritt, aber bei P2 67 % stark sichtbar ist, liegt knapp oberhalb von 26 kDa.



Abbildung 5: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung. Niederschlag (P41%) und Überstand (S41%) aus dem ersten, Niederschlag (P67%) aus dem zweiten Fällungsschritt.

## Dialyse

Die Dialyse des Pellets P2 67 % wurde durchgeführt, um das Ammoniumsulfat, welches zum Fällen der Proteine benötigt wurde, aus den Proben zu entfernen.

Die meisten Proteine vertragen das Aussalzen. Nach erfolgter Dialyse liegen die Proteine wieder im aktiven Zustand vor und stehen für eine weitere Aufreinigung bereit.

In diesem Fall war die erhaltene Proteinfraktion P2 nicht aktiv, trotz der Tatsache, dass aktives Enzym für die Fällung eingesetzt wurde. Es bestand in dem Fall die Möglichkeit, dass das Enzym unter den Bedingungen der Ammoniumsulfatfällung irreversibel beschädigt wurde und man diesen Aufreinigungsschritt nicht weiter verwenden sollte.

Andererseits zeigte schon das Entsalzen per PD-10 Säulen, dass niedermolekulare Substanzen die Aktivität womöglich beeinflussen. Wenn dies der Fall war, hätten die niedermolekularen Substanzen während der Fällung im Überstand S2 67 % bleiben können, oder hätten während der Dialyse aus dem Dialyseschlauch in den Puffer diffundieren können, da der cut-off des Schlauch (4-6 kDa) ähnlich dem Ausschlussvolumen der PD-10 Säulen (5 kDa) war.

Ausgeschlossen werden konnte, dass die Nitrilhydratase, wenn sie kleiner als der cut-off des Schlauchs wäre, während der Dialyse aus der Probe hinausdiffundierte, da sich der Gesamtproteingehalt, unter der Annahme von exakten Messungen, zwischen den eingesetzten

Proben für die Dialyse und den Erhaltenen aus der Dialyse nicht veränderte, wie man aus Tabelle 3 entnehmen kann.

Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]	Gesamtvolumen [ml]	Gesamtproteinmenge[mg]
P2 67%	1,5	10	15
P2 dial.	1,25	12	15

Tabelle 3: Proteinkonzentration, Gesamtvolumina und Gesamtproteinmenge des Pellets aus derAmmoniumsulfatfällung (P2 67%) und der daraus durch Dialyse entstandenen Probe (P2 dial.).

### Wiederherstellung der Aktivität durch eine hitzeinaktivierte Proteinprobe

Die Ergebnisse des Entsalzens der aktiven S3 Fraktion, sowie der Aktivitätsverlust der Enzymlösung nach der Ammoniumsulfatfällung und anschließender Dialyse, deuteten darauf hin, dass niedermolekulare Substanzen einen Einfluss auf die Aktivität der Nitrilhydratase haben könnten.

Es wurde deswegen ein Versuch unternommen, die Aktivität der besagten Proben mit einer, durch Hitze, inaktivierten S3 Probe wiederherzustellen.

Diagramm 3 zeigt die Aktivitäten der entsprechenden Proben. Eine unbehandelte S3 Fraktion, die als Kontrolle herangezogen wurde, zeigte einen Aeroplysininabbau von ungefähr 36 %. Mit der inaktivierten Probe, die bei 95°C vorinkubiert wurde, war kein Aeroplysininumsatz zu verbuchen. Genauso verhielt es sich bei der entsalzten S3 Fraktion und der dialysierten Probe. Nach Zugabe der inaktivierten Probe zur entsalzten Fraktion und dem Dialysat wurde in beiden Fällen eine Aktivität messbar.

In der entsalzten Probe kam es zu einem 5 % igen Umsatz und in der dialysierten Probe zu einer Aktivität von ca. 8 % Umsatz.

Das Fehlen der Aktivität in der inaktivierten Probe machte deutlich, dass die Wiederherstellung der Aktivität unter keinen Umständen durch das in der inaktivierten Probe enthaltene Enzym an sich zustande gekommen war. Auch war es unwahrscheinlich, dass generell eine proteinartige Substanz den positiven Effekt hervorrufen konnte, da die Inkubation bei 95°C die Proteine denaturieren würde.



Diagramm 3: Relative Aeroplysininabnahme in % einer dialysierten (P2 dialysiert) und einer entsalzten (S3 entsalzt) Proben ohne sowie mit einer inaktivierten Probe (S3 inaktiviert). Als Positivkontrolle dient die Fraktion S3+Ae (n=3).. Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

## **IEX der Protein-freien Fraktion**

Der Beweis, dass niedermolekulare Substanzen für die Nitrilhydratase von immenser Bedeutung sind, machte es nötig, herauszufinden, worum es sich bei der besagten Substanz handelt, bevor man die Aufreinigung des Enzyms fortführte.

Es konnte, wie bereits beschrieben, gezeigt werden, dass die fragliche Substanz, bzw. die Substanzen in der **S**3 Fraktion noch vorzufinden sind und durch Größenausschlusschromatographie entfernt werden konnten. Durch die Kenntnis des Ausschlussvolumens der PD-10 Säulen war bekannt, dass die Substanzen kleiner sein mussten als 5000 Da. Um diese Substanzen aufzureinigen, mussten sie erst von dem Proteinanteil der S3 Fraktion getrennt werden. Dazu wurde Zentrifugationsfiltereinheiten mit einem cut-off von 3 kDa verwendet.

Für Nitrilhydratasen sind Eisen- und Cobaltionen als Zentralatome bekannt. Es bestand also die Möglichkeit, dass es sich bei den gesuchten, niedermolekularen Substanzen um Metallionen handelt, sodass als Ionenaustauschchromatographiesäule ein starker Kationenaustauscher verwendet wurde, an den die Metallkationen hätten binden können.

Für diesen Versuch wurde ein ungekühltes ÄKTAprime plus FPLC System, sowie ein fertig gepackter Kationenaustauscher HiTrap Säule SP Sepharose XL, verwendet. Als Puffer dienten HEPES-Puffer 50mM pH 7, wobei im Elutionspuffer zusätzlich noch Kochsalz in einer Konzentration von 2 M gelöst war. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über 22,5 min. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Es wurden zwei mal 5 ml Durchfluss aufgefangen bis alle ungebundenen Substanzen von der Säule gewaschen wurden. Danach wurde der Gradient gestartet und es wurden bis zum Erreichen der maximalen Salzkonzentration Fraktionen von einer Größe von 1,5 ml gesammelt.

Im Chromatogramm (Diagramm 4) sieht man den Anstieg der Absorption zu Beginn des Laufes, bei dem die ungebundene Fraktion ausgewaschen wird und einen zweiten Anstieg bei Erreichen der maximalen Salzkonzentration. Da jedoch nicht bekannt war, was für eine Substanz für die Aktivität des Enzyms verantwortlich ist, konnte man sich im darauffolgenden Aktivitätsassay, bei dem zur dialysierten Pelletfraktion P2 die gesammelten Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie hinzugegeben wurden, nicht auf die Fraktionen beschränken, welche im Bereich des Absorptionsanstiegs eluierten.

Es wurden alle gesammelten Fraktionen auf die Wiederherstellung der Aktivität einer dialysierten Probe getestet.



Diagramm 4: Chromatogramm der Aufreinigung der proteinfreien Probe über eine Kationenaustauschersäule (HiTrap Säule SP Sepharose XL). Die Detektion erfolgte bei 280 nm.



Diagramm 5: Relative Aerophysininabnhame in % einer dialysierten Fraktion (P2) nach Zugabe der aus der Ionenaustauschchromatographie der proteinfreien Probe erhaltenen Fraktionen (n=3).

Das Diagramm 5 zeigt, dass mehrere Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie in der Lage waren, die Aktivität einer dialysierten, inaktiven Probe wiederherzustellen. Die erste Durchflussfraktion hatte den größten Effekt und führte zu einer 12 % igen Substratabnahme. Die zweite Durchflussfraktion, sowie die Fraktionen 22 und 24 hatten einen sehr ähnlichen Effekt und führten zu einer Aktivität von ca. 8-9 %. Die Fraktionen 21 und 23 hatten eine geringere Umsatzrate zur Folge mit einem Umsatz von 4 bis 6 %, jedoch war dieser immer noch deutlich über der Aktivität der Fraktionen 1 bis 20 und 25 bis 28, die lediglich zu einem Umsatz von unter 1 % führten.

Alle diese Proben lagen in Bereichen einer Absorptionssteigerung im Chromatogramm. Einen direkten Hinweis auf die Identität der gesuchten Substanz lieferte die Absorptionssteigerung jedoch nicht, da neben organischen Molekülen, die als Cosubstrate bekannt sind, wie z-B. NAD<sup>+</sup>/NADH, welches auch bei 280 nm Licht absorbieren würde, ebenfalls Metallionen in diesem Spektralbereich absorbieren könnten.

### Flammenatomabsorptionsspektroskopie

Die Flammenatomabsorptionsspektroskopie wurde als Methode gewählt, um einen Einblick in die Zusammensetzung einer aktiven Enzymlösung zu erhaltenen. Nitrilhydratasen sind

Enzyme, die im aktiven Zentrum Eisen oder Cobalt tragen. Fände man lediglich eines der beiden Metalle in der Probe, könnte man dieses dem Enzym als Zentralatom zuordnen.

Das für die Messung verwendete Gerät erlaubte neben der Messung von Eisen und Cobalt noch die Quantifizierung von Chrom, Kupfer, Mangan und Nickel, sodass auch der Gehalt dieser Metalle bestimmt wurde.

Für eine erste Übersicht, wurde mit einer S3 Fraktion überprüft, welche Metalle ein Signal über dem Hintergrundrauschen geben. Eisen - für die Bestimmung wurde ein gesonderter Ansatz mit einer S3 Fraktion in MES-Puffer durchgeführt, da Citronensäure bei Eisenbestimmungen stört -, Chrom und Kupfer wurden nicht gefunden.

Es folgte eine genaue Bestimmung der Cobalt-, Mangan- und Nickelgehälter in einer S3 Fraktion und einer, aus der entsprechenden S3 Fraktion hergestellten, dialysierten P2 Fraktion. Für alle Messungen wurden immer frische Eichgeraden der entsprechenden Metalle vor der Probenvermessung erstellt.

Den höchsten Gehalt in allen Proben zeigte Mangan, gefolgt von Nickel und Cobalt. Es wurde zwar lediglich der Überstand aus der Ultrazentrifugation vermessen, trotzdem kann man mit den erhaltenen Werten zumindest einen Anhaltspunkt über die im Schwamm mindestens enthaltenen Mengen an diesen drei Metallionen erhalten.

Mn-Gehalt / g TG [µg]	Co-Gehalt / g TG [µg]	Ni-Gehalt / g TG [µg]
104	8,9	22,7

Tabelle 4: Aus einer S3 Fraktion ermittelte Gehälter an Mangan, Cobalt und Nickel in µg bezogen auf 1 g gefriergetrocknetem Schwammaterial.

Für Cobalt errechnete sich ein Gehalt von 8,9  $\mu$ g in einem Gramm gefriergetrocknetem Schwamm. Bei Mangan lag der Wert bei 104  $\mu$ g und bei Nickel waren es 22,7  $\mu$ g.

Für die dialysierte Probe, mit einem Probenvolumen von 10 ml, sahen die Werte wie folgt aus:

Mn-Gehalt / ml [ng]	Co-Gehalt / ml [ng]	Ni-Gehalt / / ml [ng]
428,5	58,9	278,6

Tabelle 5: Aus einer dialysierten Probe ermittelte Gehälter an Mangan, Cobalt und Nickel in ng/ml.

Daraus ergaben sich die Gesamtgehälter der drei Metalle in der dialysierten Probe mit 4,3 µg Mangan, 589 ng Cobalt und 2,8 µg Nickel.

Die Tatsache, dass Mangan die höchste Konzentration, in Hinsicht auf die drei Metalle, aufwies, führte dazu, dass die Ionenaustauschchromatographiefraktionen der niedermolekularen Substanzen auf ihren Mangangehalt hin geprüft wurden.

Fraktion	Mn Konz. [µM]
D1	138,2
D2	110,7
Fr. 21	7,7
Fr. 22	24,8
Fr. 23	1,6
Fr. 24	2,6

Tabelle 6: Mangangehälter in  $\mu$ M in den Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie der niedermolekularen Substanzen, die einen aktivitätswiederherstellenden Effekt aufwiesen.

Die Fraktionen IEX 1 bis 20 wiesen keinen Mangangehalt auf. Die höchste Mangankonzentration war in den zwei Durchflussfraktionen zu finden. D1 und D2 zeigten eine Konzentration von 138 und 110  $\mu$ M auf. Mit Fraktion 21 beginnend, konnte in den folgenden Fraktionen Mangan nachgewiesen werden. Fraktion 21 enthielt eine Konzentration von 7,7  $\mu$ M, Fraktion 22 eine Konzentration von ungefähr 25  $\mu$ M und die folgenden Fraktionen 23 und 24 eine Konzentration zwischen 1,6 und 2,6  $\mu$ M.

Der Gesamtgehalt an Mangan in den besagten Proben war wie folgt:

Fraktion	Mn Gehalt [µg]
D1	37,9
D2	32,6
Fr. 21	0,63
Fr. 22	2,04
Fr. 23	0,13
Fr. 24	0,21

Tabelle 7: Mangangehälter in  $\mu g$  in den Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie der niedermolekularen Substanzen, die einen aktivitätswiederherstellenden Effekt aufwiesen.

Betrachtet man die Aktivitätsassays, in denen die IEX Fraktionen der niedermolekularen Substanzen zusammen mit einer dialysierten P2 Fraktion vermessen wurden, im Hinblick auf den Mangangehalt der Proben im Probenvolumen von 80 µl, so sehen die Konzentrationen so aus:

Fraktion	Mn Konz. [µM]
D1	69,1
D2	55,35
Fr. 21	3,85
Fr. 22	12,4
Fr. 23	0,8
Fr. 24	1,3

Tabelle 8: Mangangehälter in µM im Gesamtprobenvolumen in den Aktivitätsassays mit den Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie der niedermolekularen Substanzen.

Für die Fraktionen D1, D2 und IEX 21 bis 24, die einen wiederherstellenden Effekt auf die Aktivität einer dialysierten Probe hatten, wurde die Hypothese des Zusammenhangs zwischen der Aktivität des Enzyms und der Mangankonzentration aufgestellt.

# Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität

Es lag die Vermutung nahe, dass mehrwertige Metallionen an der Aktivität beteiligt sind. Wäre das der Fall, hätte man diese Ionen in einer aktiven Probe durch Zugabe eines Komplexbildners, in diesem Fall EDTA, komplexieren können, wodurch man einen Abfall der Aktivität hätte beobachten können.



Diagramm 6: Relative Aerophysininabnahme in % einer aktiven Probe (S3+Ae) aus der Ultrazentrifugation und der entsprechenden Probe nach Zugabe einer EDTA-Lösung (S3+EDTA 10 mM+Ae) (n=3). Der relative Aerophysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10  $\mu$ g.

Die Inkubation der Enzymlösung vor der Durchführung des Aktiviätsassays mit einer EDTA-Lösung führte im Vergleich zu einer äquivalenten Probe ohne EDTA zu einem totalen Aktivitätsverlust. Diagramm 6 weist die Aktivität der ungehemmten Probe mit knapp 25 % igem Substratabbau aus, wohingegen die EDTA-haltige Probe keine Veränderung in der Substratmenge aufweist.

## Einfluss verschiedener Metallionen auf EDTA-inaktiviertes Enzym

Der Verlust der Aktivität der Nitrilhydratase nach vorheriger Zugabe von EDTA war ein sehr starkes Indiz dafür, dass mehrwertige Metallionen an der Aktivität des Enzyms beteiligt sind. Daraus folgte die Überlegung, dass es möglich sein sollte, die Inaktivierung des Enzyms mit EDTA durch Zuführung des entsprechenden Kations aufzuheben.

Nach der Vorinkubation der Enzymlösung mit EDTA wurden dem Enzym verschiedene Salzlösungen in einem 1,25-fachen Überschuss zur EDTA-Lösung zugegeben.

Entgegen dem ersten Ergebnis aus dem Versuch der Cosubstratabhängigkeit, bei dem eine Wechselbeziehung des Enzyms mit Mangan festgestellt wurde, stellten in diesem Versuch alle vier der, dem Enzym dargebotenen Metallionen, die Aktivität der Nitrilhydratase, in unterschiedlichem Maße, her.

Man erkennt im Diagramm 7, dass die Zugabe von Eisen den geringsten Effekt ausübte. Es kam dabei lediglich zu einem ca. 4 % igen Substratabbau. Der Nickel-Einfluss war etwas größer, wobei ein ungefähr 6 % iger Aeroplysininabbau zu verzeichnen war. Die Wirkung von Mangan auf die Enzymaktivität war mit 8,5 % geringer als bei Cobalt, welches mit einer fast 12 % igen Substratabnahme die größte Wirkung erzielte.



Diagramm 7: Relative Aeroplysininabnahme in % mit EDTA inaktivierter Proben nach Zugabe diverser Salze (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

# pH Stabilität

Die durchgeführte Ionenaustauschchromatographie bei pH 5,8 lieferte nach einer anschließenden Größenausschlusschromatographie Proben, deren Bandenmuster in der SDS-PAGE noch sehr komplex waren. Es musste eine Methode gefunden werden, wie man den erhöht. Eine Trennerfolg Möglichkeit war, die Bedingungen während der Ionenaustauschchromatographie zu verändern, zum Beispiel durch die Veränderung des pH Wertes. Um eine irreversible Schädigung des Enzyms durch die pH-Änderung zu verhindern, musste vorher geprüft werden, bei welchen pH Werten das Enzym unwiederbringlich geschädigt wird.

Es wurde eine S3-Fraktion auf pH Werte zwischen 2 und 9 eingestellt und nach einer halbstündigen Inkubation auf einen pH von 7,8 gepuffert. Für den Aktivitätsassay wurden von allen Proben Proteinmengen von 25,4  $\mu$ g verwendet.



Diagramm 8: Relativer Aeroplysininabbau in % nach einer halbstündigen Inkubation einer S3 Fraktion bei pH Werten zwischen 2 und 9 (n=1). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10  $\mu$ g.

Diagramm 8 gibt die Aktivitäten für diesen Versuch wieder. Eindeutig sind die Ergebnisse für die pH Werte 2 und 3. Eine Überführung der Enzymlösung auf diese zwei Werte mit anschließender halbstündiger Inkubation führte trotz einer Rückführung auf einen fast neutralen pH Wert von 7,8 zu einem totalen Aktivitätsverlust. Alle anderen Proben, die im pH-Bereich zwischen 4 und 9 lagen, zeigten nach der Abpufferung auf pH 7,8 wieder eine deutliche Aktivität. Trotz der Tatsache, dass alle Proben in einer Einfachbestimmung vermessen wurden, reichte dies, um festzuhalten, dass pH Werte von 2 und 3 zur irreversiblen Denaturierung des Enzyms führen und somit nicht für die Ionenaustauschchromatographie geeignet sind. Da die Proben, die auf pH 5, bzw. 4 eingestellt wurde, noch Aktivität zeigten, wurde für die folgenden Ionenaustauschchromatographieversuche entsprechende Puffer gewählt, in diesem Fall Acetat- und Lactatpuffer.

## Ionenaustausch-und Größenausschlusschromatographie für die Nitrilhydratase

#### Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 5,8 ohne Aussalzen

Nachdem mit den ersten Ergebnissen aus den Versuchen der Metallionenzugabe festgestellt wurde, dass Manganionen als mögliche Cofaktoren für die Nitrilhydratase dienen, konnte mit der Aufreinigung des Enzyms fortgefahren werden.

Zu Beginn Schwammaterials Citratpuffer der Bearbeitung des wurde als Extraktionsmedium verwendet, dass auch die ersten Versuche so zur Ionenaustauschchromatographie mit Citratpuffer bei pH 5,8 durchgeführt wurden. Als Probe für diesen Chromatographieschritt diente eine dialysierte P2 Fraktion. Verwendet wurde das bereits erwähnte ÄKTAprime plus FPLC System. Es wurde ein Gradient über 24 min gefahren von 100 % Puffer A (Citratpuffer 50 mM pH 5,8) zu 100 % Puffer B (Puffer A + NaCl 2 M). Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Es wurden 1 ml pro Fraktion bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt.

Da der isoelektrische Punkt des Enzyms unbekannt war, mussten zwei Versuche zur Aufreinigung per Ionenaustauschchromatographie durchgeführt werden und zwar erstens mittels eines Kationen (HiTrap Säule SP Sepharose XL) - und zweitens mittels eines Anionenaustauschers (HiTrap Säule Q Sepharose XL), beides vorgepackte Säulen. In beiden Fällen wurden jeweils starke Austauscher verwendet.

Weder am Anionenaustauscher, noch am Kationenaustauscher konnte das Enzym gebunden werden. Lediglich die Durchflussfraktionen aus beiden Aufreinigungsversuchen zeigten eine Aktivität. Eine Erklärung für die ausbleibende Bindung des Enzyms an einen der Austauscher war entweder die Tatsache, dass mit dem gewählten pH zufällig der isoelektrische Punkt des Enzyms getroffen wurde, das Enzym somit ungeladen war, was aber im Normalfall zu einer sichtbaren Fällung des Enzyms geführt hätte, oder dass der Puffer für diese Art der Chromatographie in diesem Fall ungeeignet war. Citratpuffer haben durch ihre Mehrfachladung eine hohe Ionenstärke, sodass es möglich war, dass den Proteinen beim Auftragen auf die Säule nicht die Möglichkeit zur Ausbildung einer Ionenbindung zum Säulenmaterial gegeben und diese sofort wieder ausgewaschen wurden. Der Citratpuffer wurde durch MES-Puffer ersetzt, der auch schon für die Eisenmessungen mittels AAS verwendet wurde. MES hat den Vorteil, dass es lediglich nur einen geladenen bzw. ungeladenen Sulfonsäurerest tragen kann und damit die Ionenstärke gegenüber dem maximal dreifach geladenen Citronensäureanion geringer ist.

Für diesen Versuch wurde zunächst der beschriebene Anionenaustauscher verwendet. Als Probe diente hier jedoch lediglich eine dialysierte S3 Probe, da sich bei der Ammoniumsulfatfällung zeigte, dass sich beim Einstellen des pH-Werts der Lösung Niederschläge bildeten, die bei Verwendung des Citratpuffers nicht auftraten. So wurde zunächst auf ein Aussalzen der Proteine als Reinigungsschritt verzichtet.

Mit diesem System aus MES-Puffer 50 mM pH 5,8 (Puffer A) und dem starken Anionenaustauscher gelang es die Nitrilhydratase unter den oben genannten Bedingungen an die Säule zu binden und mit dem entsprechenden Puffer B (Puffer A + NaCl 2 M) wieder zu eluieren, was bewies, dass der Versuch mit dem Citratpuffer an der Ionenstärke des Citrats scheiterte.

Diagramm 9 zeigt das erhaltene Chromatogramm aus der ersten gelungenen Ionenaustauschchromatographie für die Nitrilhydratase. Tabelle 9 gibt die Aktivitäten der aktivsten Fraktionen wieder.

Zur Überprüfung der Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde ein SDS-Gel gegossen und die in Tabelle 9 genannten Proben wurden auf dieses aufgetragen (Abbildung 6).



Diagramm 9: Chromatogramm der Aufreinigung der S3 Fraktion ohne vorherige Ammoniumsulfatfällung über eine Anionenaustauschersäule (HiTrap Säule Q Sepharose XL). Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Das Bandenmuster aller aufgetragenen Fraktionen war äußerst komplex und schwer zu interpretieren. Es waren lediglich geringe Unterschiede zwischen den drei Durchflussfraktionen und den mit Puffer B eluierten Fraktionen sichtbar. So sieht man zum Beispiel in den nicht gebundenen Fraktionen eine deutliche Bande kurz oberhalb des 92 kDa Standards, welche bei allen gebundenen Fraktionen fehlt. Andersherum tritt in diesen Fraktionen eine Bande leicht unterhalb des 92 kDa Standards auf, die im Durchfluss fehlt.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
D1	16,4	1109	0,193
D2	16,5	1149	0,194
D3	13,0	664	0,154
F21	21,9	768	0,258
F22	15,2	1275	0,180
F23	14,8	1277	0,175
F24	16,8	963	0,198
F25	19,3	544	0,228

Tabelle 9: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie einer S3 Fraktionen ohne vorherige Ammoniumsulfatfällung. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.



Abbildung 6: SDS-PAGE der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie einer S3 Fraktionen ohne vorherige Ammoniumsulfatfällung.

Eine intensive Bande zeigt sich auf Höhe des 17 kDa Standards im Durchfluss, welche auch noch sichtbar in den Fraktionen 21 und 22 ist und sich danach abschwächt.

Auf Höhe des 26 kDa Standards treten in den Fraktionen 22 bis 25 sehr deutliche Banden auf, die zu den am stärksten sichtbaren gehören. Im Durchfluss allerdings sind diese Banden nur schwach vertreten. Dafür tragen diese Fraktionen deutlichere Banden kurz oberhalb dieses Markers. Fraktion 21 hingegen hat eine seiner stärksten Banden kurz unterhalb dieses Markers.

Aus diesem Chromatographieschritt war aufgrund der Komplexität des Bandenmusters nicht abzulesen, welche der Banden der Nitrilhydratase hätte entsprechen können.

Der nächste Schritt in der Aufreinigung war die weitere Auftrennung einer, in diesem Fall zweier, Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung der Größenausschlusschromatographie. Die Fraktionen 21 und 22 wurden zusammengeführt und auf ein Volumen von ungefähr 600  $\mu$ l eingeengt. Die Probe wurde über eine 500  $\mu$ l Injektionsschleife auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL aufgetragen. Auch in diesem Fall wurde das verwendete ÄKTAprime plus FPLC System bei Raumtemperatur verwendet. Es wurde ein Fraktionsvolumen von jeweils 500  $\mu$ l bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gesammelt. Die Elution erfolgte mit einem MES-Puffer 50 mM pH 5,8 + 0,1M NaCl. Eluierte Fraktionen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.



Diagramm 10: Chromatogramm der Aufreinigung der zusammengeführten Fraktionen 21 und 22 aus der Anionenaustauschchromatographie der S3 Fraktion ohne vorherige Ammoniumsulfatfällung über eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Diagramm 10 zeigt das erhaltene Chromatogramm aus der Größenausschlusschromatographie der zwei zusammengeführten Ionenaustauschchromatographiefraktionen. Bei genauer Betrachtung des Chromatogramms erkennt man, dass es zu einem deutlichen Anstieg der Absorption ab der 23. min kommt.

Betrachtet man den Kurvenverlauf, erkennt man eine Trennung der in der aufgetragenen Probe enthaltenen Proteine. Bei ca. 17 min kommt es zu einem ersten Peak. Ab der 23. min eluiert erneut eine Proteinfraktion, deren Peak ein Maximum bei ca. 27 min. erreichen würde. Ab der 27. min wird das Gros der aufgetragenen Enzyme eluiert. Kurz vor der 40. min schließt sich noch ein kleiner Peak dem Hauptpeak an.

Der Proteingehalt und die dazugehörigen Aktivitäten der aktiven Fraktionen werden in Tabelle 10 dargestellt.

Fraktion 9 wurde ab der 23. min gesammelt. Die zwei aktivsten Fraktionen eluierten zwischen der 25. und 27. min, was den Fraktionen 11 und 12 entspricht. In beiden Fällen sieht man eine spezifische Aktivität von ungefähr 0,36. Allerdings beobachtet man, dass Fraktionen mit abnehmender Aktivität bis zur 30. min von der Säule gespült werden. Bei einer schlechten Trennleistung der verwendeten Säule, hätte das eine mögliche Erklärung dafür sein können, dass die Nitrilhydratase über einen langen Zeitraum von der Säule kommt.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
9	0	n.b.	0
10	6,2	93	0,073
11	60,4	146	0,356
12	63,2	199	0,373
13	40,6	266	0,239
14	23,5	351	0,139
15	11,9	466	0,070
16	0	nb	0

Tabelle 10: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktivsten Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie nach der Anionenaustauschchromatographie der S3 Fraktion ohne vorherige Ammoniumsulfatfällung.Für die Fraktionen 9 und 16 wurden die Proteinkonzentrationen nicht bestimmt (n.b). Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

Zur Überprüfung der Trennleistung wurden mit dem oben genannten Puffer Alkoholdehydrogenase mit einer Größe von 150 kDa und BSA mit einer Größe von 66 kDa zusammen auf die Säule aufgetragen. Diagramm 11 zeigt die gute Trennung der beiden Proteine.



Diagramm 11: Chromatogramm der Standards Alkoholdehydrogenase und BSA.

Da man im Diagramm 11 eine deutliche Trennung der beiden Enzyme sieht, konnte man davon ausgehen, dass auch eine Trennung der Proben aus der Ionenaustauschchromatographie erfolgte. Daraus ließ sich eine mögliche Erklärung für das breite Ausschlussvolumen der Nitrilhydratase ableiten und zwar das Vorhandensein mehrerer Isoformen. Immerhin ist bekannt, dass bakterielle Nitrihydratasen in di- und tetrameren Zuständen vorkommen.

Unter dieser Annahme, dass zwei Nitrilhydratasen isoliert wurden, hätten die Retentionszeiten dafür gesprochen, dass die eine Isoform eine Größe von über 160 kDa aufweist und die zweite eine Größe von ungefähr 140 kDa.



Abbildung 7: SDS-PAGE der aktivsten Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie.

Die Überprüfung der Reinheit der Proben, welche in Tabelle 10 aufgeführt werden, erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 7).

Man sah auch hier noch ein sehr komplexes Bandenmuster, wobei sich bei den Fraktionen 10 und 11 bereits einzelne klare Banden erkennen ließen. Aber die Komplexität aller Fraktionen erlaubte trotzdem noch keine Zuordnung der gesuchten Nitrilhydratase zu einer der Proteinbanden. Jedoch konnte man hier schon mögliche Banden als die Gesuchten ausschließen, wenn man die Bandenmuster mit der spezifischen Aktivität kombinierte. Banden, die bei gleichzeitiger Aktivitätsabnahme an Intensität zunahmen, konnten ausgeschlossen werden. So erschien zum Beispiel eine Bande knapp oberhalb der Lauffront ab Fraktion 13, die ausgeschlossen werden konnte. Gleiches galt für die Bande, die knapp oberhalb des 55 kDa Standards erschien.

# Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 5,8 mit Aussalzen

Die SDS-PAGE der ersten Größenausschlusschromatographie zeigte, dass die Aufreinigung nicht gut genug war, um die Nitrilhydratase rein zu isolieren. Es mussten Veränderungen am Extraktionsprotokoll vorgenommen werden.

Die erste Änderung war, dass nach der Ultrazentrifugation der Überstand S3 ohne Einstellen des pH-Wertes ausgesalzt wurde. Die Fällung erfolgte mit Ammoniumsulfat in zwei Schritten. Der erste Schritt erfolgte bis zu einer 41 % igen Sättigung, der Zweite bis zur 67 % igen Sättigung. Der erhaltene Niederschlag aus dem zweiten Schritt wurde mit MES-Puffer 50 mM pH 5,8 aufgenommen und dialysiert.

Die dialysierte Probe wurde per Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Über das ÄKTAprime plus FPLC System wurde ein Gradient über 24 min gefahren von 100 % Puffer A (MES-Puffer 50 mM pH 5,8) zu 100 % Puffer B (Puffer A + NaCl 2 M). Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Es wurden 1 ml pro Fraktion bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt. Der Verlauf des dazugehörigen Chromatogramms (Diagramm 12) zeigte keine Unterschiede zur Chromatographie ohne Aussalzen.



Diagramm 12: Chromatogramm der Aufreinigung der S3 Fraktion mit vorheriger Ammoniumsulfatfällung über eine Anionenaustauschersäule (HiTrap Säule Q Sepharose XL). Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Die Aktivitäten der erhaltenen Fraktionen allerdings waren deutlich anders als bei der ersten Ionenaustauschchromatographie (Tabelle 11).

Später zeigte sich, dass die geringe Aktivität dieser und der daraus folgenden Proben aus der Größenausschlusschromatographie an einem falsch hergestellten Tris-HEPES Puffer, dessen pH-Wert bei fünf bis sechs war, lag.

Im SDS-Gel der Fraktionen 16 bis 18 (Abbildung 8) sah man allerdings schon den Vorteil, den das Aussalzen brachte. Die Bandenmuster aller Fraktionen schienen annähernd so sauber, wie die Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie ohne vorherige Proteinfällung.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
14	3,9	n.b.	0
15	5,3	883	0,047
16	5,1	1295	0,063
17	3,3	1469	0,060
18	1,7	1397	0,039

Tabelle 11: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie einer S3 Fraktionen mit vorheriger Ammoniumsulfatfällung. Für Fraktion 14 wurde die Proteinkonzentration nicht bestimmt (n.b.). Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.



Abbildung 8: SDS-PAGE der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie einer S3 Fraktionen mit vorheriger Ammoniumsulfatfällung.

Auch hier war eine Interpretation immer noch sehr schwierig. Jedoch konnte man weitere Banden als mögliche Indikatoren für die Nitrilhydratase ausschließen. Zwischen dem 72 und 95 kDa Standard sah man eine Bande, deren Intensität von Fraktion 15 zu Fraktion 18 zunahm, trotz sinkender relativer und spezifischer Aktivität. Knapp oberhalb des 55 kDa Standards erschien ab Fraktion 16 eine Bande, die ausgeschlossen werden konnte.

Die nach diesem Schritt folgende Größenausschlusschromatographie wurde mit Fraktion 16 durchgeführt. Die Fraktion wurde mittels einer Zentrifugationsfiltereinheit auf ein Volumen von ungefähr 600  $\mu$ l eingeengt und über eine 500  $\mu$ l Injektionsschleife auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL aufgetragen. Gearbeitet wurde mit dem ÄKTAprime plus FPLC System. Die Elution erfolgte mit einem MES-Puffer 50 mM pH 5,8 + 0,1M NaCl und die eluierten Proben wurden bei 280 nm detektiert.



Diagramm 13: Chromatogramm der Aufreinigung der Fraktion 16 aus der Anionenaustauschchromatographie der S3 Fraktion mit vorheriger Ammoniumsulfatfällung über eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Das Verlaufsmuster des Chromatogramms (Diagramm 13) entspricht dem Verlauf aus dem bereits gezeigten Diagramm 10.

Wie bereits erwähnt, war der Tris-HEPES Puffer falsch hergestellt worden, sodass die Aktivitäten aus der aus diesem Reinigungsschritt erhaltenen Fraktionen nicht als Aeroplysininabbnahme messbar waren. Jedoch war trotz einer kaum messbareren Substratabnahme eine sichtbare Produktzunahme zu verzeichnen (Diagramm 14).

Da die Proben nach der Gelfiltration alle frei von Aeroplysinin und Dienon waren, kann die Dienonzunahme nicht an einer Produktverunreinigung innerhalb der Proben liegen. Eine hätte sein können, bei dieser mögliche Erklärung dass es Testreihe zu Pipettierungenauigkeiten gekommen ist, bei denen den Proben ein höheres Substratvolumen als der Referenzprobe zugegeben wurde. Das hätte dazu führen können, dass Aeroplysinin bis zu einer Substratmenge, die in der Referenzprobe enthalten ist, umgesetzt wird. Dadurch entsteht Dienon, aber aufgrund ähnlicher Aeroplysininpeakflächen hat man den Eindruck, dass nichts umgesetzt wurde.



Diagramm 14: Dienon Peakflächen der Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie der Fraktion 16 aus der Anionenaustauschchromatographie der S3 Fraktion mit vorheriger Ammoniumsulfatfällung nach dem Aktivitätsasssay.

Bei dem Versuch aus den Proben eine SDS-Page zu machen, wurden drei der Proben, Fraktionen 14, 15 und 17, in der Zentrifuge zerstört. Das SDS-Gel (Abbildung 9) zeigt lediglich die Fraktionen 13, 16 und 18. Zwischen Fraktion 13 und 16 wurde noch ein wenig von Fraktion 14, was sich aus dem in der Zentrifuge zerstörten Eppendorfgefäß abnehmen ließ, aufgetragen.

Das Fehlen verlässlicher Aktivitätsmessungen für diesen Reinigungsschritt machte es schwer, wenn nicht gar unmöglich, die Bandenmuster auf ihren Informationsgehalt hin zu analysieren und interpretieren. Allerdings war es möglich, den Effekt des zusätzlichen Fällungsschritts nach der Ultrazentrifugation zu bewerten. Fraktion 13 zeigt nur noch wenige, klar voneinander differenzierbare Banden.

Im Vergleich zu der Aufreinigung ohne vorherige Fällung ist dieses Ergebnis ein großer Fortschritt und zeigt den positiven Effekt des Aussalzens auf die Reinheit der zum Schluss erhaltenen Proben.

Vergleicht man die Fraktion 13 mit Fraktion 16 sieht man ebenfalls, dass sich die Bandenmuster deutlich sichtbar voneinander unterscheiden. Oberhalb des 26 kDa Markers sieht man bei Fraktion 16 eine sehr intensive Bande, die bei Fraktion 13 zu fehlen scheint. Oberhalb dieser Bande treten zusätzlich mehrere Banden gebündelt auf, die bei Fraktion 13 fehlen. Dahingegen fehlen Fraktion 16 klare Banden oberhalb des 55 kDa Markers, die aber in Fraktion 13 noch sichtbar sind.



Abbildung 9: SDS-PAGE Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie.

## Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 4,9 mit Aussalzen

Das oben gezeigte Ergebnis der Reinigung war ein erster Erfolg hinsichtlich der Proben-Reinheit, jedoch musste weiter versucht werden, das Enzym rein zu isolieren. Eine Möglichkeit war die Veränderung des pН Bereiches, bei dem die Ionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde. Der Vorteil einer pH-Änderung liegt darin, dass die Möglichkeit besteht den Ladungszustand der Proteine so zu verändern, dass diese nicht mehr an die Säule binden und somit entfernt werden. So kann man zum Beispiel durch Erniedrigen des pHs anionische Proteine in Proteinkationen überführen, wodurch diese nicht mehr an Anionenaustauscher binden.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
28	0	13	0
29	8,5	58	0,101
30	5,6	265	0,066
31+32	3,1	723	0,037
33	12,9	226	0,152
34	9,1	145	0,107
35	0	80	0

Tabelle 12: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie einer S3 bei pH 4,9. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

Aus diesem Grund wurde versucht, den pH-Bereich der Aufreinigung zu senken. Vorher musste allerdings die pH-Stabilität des Enzym überprüft werden, da verhindert werden musste, dass die Veränderung des pH-Wertes einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, oder das Enzym irreversibel beschädigt wird. Die Ergebnisse sind in dem Abschnitt pH-Stabilität erklärt.

Nach Überprüfung der Stabilität des Enzyms wurde ein Reinigungsschritt bei pH 4,9 durchgeführt. Dafür wurde ein neuer Zellaufschluss durchgeführt, die S3 Fraktion mit Ammoniumsulfat gefällt und das gefällte Enzym dialysiert. Der zweite gefällte Niederschlag wurde mit Acetatpuffer 50 mM pH 4,9 aufgenommen. Während der Dialyse dieser Probe kam es im Dialyseschlauch zu einer Niederschlagsbildung der Proteine, welche in dem

Bereich um pH 5 ihren isoelektrischen Punkt aufweisen.

Die erhaltene Fraktion P2 dialysiert wurde im Anschluss per Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Verwendet wurde auch hier das ÄKTAprime plus FPLC System. Es wurde ein Gradient über 24 min gefahren von 100 % Puffer A (Acetatpuffer 50 mM pH 4,9) zu 100 % Puffer B (Puffer A + NaCl 2 M). Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Es wurden 1 ml pro Fraktion bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt.

Im Diagramm 15 sieht man, dass sich der Elutionspeak bei pH 4,9 etwas deutlicher auftrennt, als es bei den vorherigen Schritten war. Dem steilen Hauptteil des Peaks um die 51 min herum, ist eine deutliche Schulter vorgelagert.

Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen waren aufgrund des Puffers, der erst nach dieser Messreihe und vor der darauf folgenden Größenausschlusschromatographie ausgetauscht wurde, sehr gering. Nach dem Austausch des Tris-HEPES Puffers wurde Fraktion 31 erneut im Aktivitätsassay vermessen und erreichte dort eine 60 % Substratabnahme, was einer ungefähren spezifischen Aktivität von 0,22 U/mg entspräche.

Abbildung 10 zeigt das dazugehörige SDS-Gel.

Ergebnisse



Diagramm 15: Chromatogramm der Aufreinigung der S3 Fraktion bei pH 4,9 über eine Anionenaustauschersäule (HiTrap Säule Q Sepharose XL). Die Detektion erfolgte bei 280 nm.



Abbildung 10: SDS-PAGE der aktiven Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 4,9.

Fraktion 31 wurde auf ein Volumen von ungefähr 600 μl eingeengt und über eine 500 μl
Injektionsschleife auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL aufgetragen.
Die Probe wurde mit einem MES-Puffer 50 mM pH 5,8 + 0,1M NaCl auf dem ÄKTAprime
plus FPLC System eluiert und Fraktionen bei 280 nm detektiert und mit einer Größe von

500 µl gesammelt. Die Flussrate war auf 0,5 ml/min eingestellt.

Tabelle 13 zeigt die Aktivitäten und Proteinkonzentrationen der dem Diagramm 16 zugeordneten Fraktionen. Nach dem Austausch des Tris-HEPES Puffers konnten wieder deutliche Substratabnahmen verzeichnet werden.

Die aktivsten Fraktionen aus diesem Reinigungsschritt waren, wie auch bei der Gelfiltration ohne vorheriges Aussalzen (Tabelle 13), die früh eluierenden Fraktionen. Fraktion 10 zeigte noch eine relative Aktivität von 25 %, wohingegen die Fraktionen 11 und 12 bereits relative Aktivitäten von über 90 % aufwiesen. Ab Fraktion 13 sank die relative Aktivität wieder.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
10	67,9	37,3	1,604
11	164,0	52,9	3,871
12	96,3	91,4	2,273
13	55,7	135	1,315
14	37,6	186	0,887
15	27,1	263	0,640
16	7,6	422	0,179
17	4,5	302	0,105
18	6,1	246	0,144
19	0	161	0

Tabelle 13: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktivsten Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie nach der Anionenaustauschchromatographie bei pH 4,9. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 5 µg.

Die zwei aktivsten Fraktionen 11 und 12 stimmten ebenfalls in ihren Retentionszeiten mit den Proben überein, die aus der Gelfiltration ohne vorheriges Aussalzen stammten. Sie wurden zwischen der 25. und 27. Minute gesammelt. Es zeigte sich sogar, dass bereits ab der 24. min (Fraktion 10) aktives Enzym eluierte.



Diagramm 16: Chromatogramm der Aufreinigung von Fraktion 31 aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 4,9 über eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Aus den Fraktionen 10 bis 19 wurde ein 12 % iges SDS-Gel angefertigt (Abbildung 11). Das Ergebnis dieser SDS-PAGE war das bis dahin beste. Fraktion 10 war leider in einer zu geringen Konzentration aufgetragen worden, aber Fraktion 11 schien fast sauber zu sein. Man konnte bei dieser Fraktion zwei deutliche Banden auf Höhe der 26 und 72 kDa Standards erkennen.

Zwischen den beiden Banden waren nur sehr schwache und unscheinbare Banden sichtbar. Ab Fraktion 12 wurden die Bandenmuster wieder komplexer, jedoch waren bis zu Fraktion 15 alle Banden scharf, sowie klar und deutlich voneinander getrennt.



Abbildung 11: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie.

Die Tatsache, dass Fraktion 11 nur zwei deutlich sichtbare Banden aufwies und gleichzeitig die zweitgrößte relative sowie spezifische Aktivität aufwies, ließ die Vermutung zu, dass die Banden auf Höhe des 26 und 72 kDa Standards Fragmente der gesuchten Nitrilhydratase sind. Alle Banden, die zwischen diesen beiden Markern vermehrt bei den spät eluierten Fraktionen vorkamen, konnten als mögliche Bestandteile des Enzyms so gut wie ausgeschlossen werden.

## Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bei pH 3,9 mit Aussalzen

Es konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung des pH-Wertes bei der Ionenaustauschchromatographie einen positiven Einfluss auf die Reinheit der Proben nach dem letzten Chromatographieschritt hatte. Die Veränderung des pH-Werts von 5,8 auf 4,9 führte zu einer fast reinen Probe, welche nur noch zwei Hauptbanden enthielt.

Da im Versuch der *pH-Stabilität* das Enzym noch bei pH 4 stabil zu sein schien, wurde ein weiterer Zellaufschluss durchgeführt, bei dem die Bedingungen während der Ionenaustauschchromatographie noch ein weiteres Mal verändert wurden. Der Acetatpuffer wurde gegen einen Lactatpuffer 50 mM pH 3,9 ausgetauscht. Während der Dialyse der ausgesalzten Fraktion fiel erneut ein Teil der Proteine aus.

Über das ÄKTAprime plus FPLC System wurde ein Gradient über 24 min gefahren von

100 % Puffer A (Lactatpuffer 50 mM pH 3,9) zu 100 % Puffer B (Puffer A + NaCl 2 M). Es wurden 1 ml pro Fraktion bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt und die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Die vorherigen Chromatogramme der Austauschchromatographie zeigten, dass ein größerer Anteil der aufgetragenen Proben nicht an die Säule gebunden wurde. Diagramm 17 zeigt, dass der Wechsel zum Lactatpuffer unter anderem dazu führte, dass ein Großteil der aufgetragenen Fraktion an die Säule gebunden werden konnte und dass nur noch ein kleiner Anteil ungebunden blieb.



Diagramm 17: Chromatogramm der Aufreinigung der S3 Fraktion bei pH 3,9 über eine Anionenaustauschersäule (HiTrap Säule Q Sepharose XL). Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Die Aktivitäten der eluierten Fraktionen zeigt Tabelle 14.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
8	0	25	0
9	3,6	299	0,421
10	24,9	62	2,940
11	24,9	71	2,934
12	26,4	61	3,111
13	26,4	42	3,113
14	54,0	11	6,371
15	21,5	18	2,542
16	2,2	5	0,254

Tabelle 14: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktiven und zweier benachbarter Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 1 µg.

Die gelungene Aufreinigung wurde durch die hohen relativen und spezifischen Aktivitäten sichtbar.

Die SDS-Gele der Fraktionen sind in Abbildung 12 abgebildet.



Abbildung 12: SDS-PAGE der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9.

Im Vergleich zu dem Reinigungsschritt bei pH 4,9 unter Verwendung des Acetatpuffers sah man eine weitere deutliche Verbesserung der Aufreinigung. Alle aufgetragenen Fraktionen zeigten Bandenmuster, bei denen die einzelnen Banden gut voneinander getrennt waren. Auch sah man in allen Fraktionen die bereits erwähnten Banden auf Höhe des 72 kDa Standards. Etwas schwächer konnte man Banden leicht oberhalb des 26 kDa Standards erkennen.



Diagramm 18: Chromatogramm der Aufreinigung der zusammengeführten Fraktion 9 bis 11 aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9 über eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Austauschchromatographie Im Anschluss an die wurde wieder eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Fraktionen 9, 10 und 11 wurden ein μl zusammengeführt und auf Volumen von ungefähr 600 mit einer Zentrifugationsfiltereinheit eingeengt. Die Probe wurde über eine 500 µl Injektionsschleife auf die Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit MES-Puffer 50 mM pH 5,8 + 0,1M NaCl bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Die Probe lief über das ÄKTAprime plus FPLC System. Detektiert wurden die erhaltenen Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Das erhaltene Chromatogramm (Diagramm 18) zeigte einen ähnlichen Verlauf zu den vorherigen aus der Größenausschlusschromatographie, mit dem Unterschied, dass man diesmal eine Trennung zweier Peaks zwischen der 25. und 30. min erkennen konnte. In den vorherigen Fällen sah man lediglich eine vorgelagerte Schulter am Hauptpeak mit einem Absorptionsmaximum bei ungefähr 30 min. In diesem Chromatogramm war auch der Absorptionsanstieg ab der 23. min sichtbar. Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen zeigt Tabelle 15.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
11	23,8	n.d.	-
12	6,6	5	28,100
13	4,3	7	7,816
14	4,0	8	5,126
15	23,8	14	4,721
16	0	nb	_

Tabelle 15: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktiven und einer benachbarten Fraktion aus der Größenausschlusschromatographie nach der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1  $\mu$ g. Für Fraktion 16 wurde die Proteinkonzentration nicht bestimmt (n.b.). Für Fraktion 11 war die Proteinkonzentration nicht detektierbar (n.d.).

Für Fraktion 11 konnte die Proteinkonzentration nicht bestimmt werden, da sie zu gering war. Die Fraktionen 12 bis 15 zeigten eine ebenfalls sehr geringe Proteinkonzentration. Trotz der geringen Konzentrationen konnte man bei den Fraktionen 11 bis 15 eine deutliche relative Aktivität messen. Die spezifische Aktivität der aktivsten Fraktionen erreichte sogar 28 U/mg. Fraktion 11 wurde ab der 25. min gesammelt.

Aufgrund der geringen Proteinmenge pro Probe wurde befürchtet, dass ein Coomassie gefärbtes Gel der Proben nichts zeigen wird. Aus diesem Grund wurde das Gel versucht mit einer Silberfärbung anzufärben, was nicht gelang. Da alles, was an Proben zur Verfügung stand, für das missglückte SDS-Gel verbraucht wurde, musste ein neuer Ansatz aufgereinigt werden.



Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie der neuen Aufreinigung zeigt Diagramm 19.

Diagramm 19: Chromatogramm der zweiten Aufreinigung aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9 über eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Auch hier zeigte sich derselbe Verlauf wie nach der vorherigen Reinigung. Tabelle 16 zeigt die Aktivitäten der eluierten Proben.

Fraktion	rel. Aktivität [%]	Proteinkonzentration [µg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
11	14,1	5	16,2
12	9,6	23	11,1
13	3,9	64	4,5
14	4,0	49	4,5
15	1,5	83	1,7
16	1,2	83	1,4
17	Messfehler	63	-
18	0	50	0

Tabelle 16: Relative Aktivitäten, Proteinkonzentrationen und spezifische Aktivitäten der aktiven und einer benachbarten Fraktion aus der zweiten Größenausschlusschromatographie nach der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9. Die relative Aktivität in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

Da der aufgereinigte Ansatz größer war als der vorherige, waren die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktion ebenfalls höher. Fraktion 11 wurde ab Minute 23,5 gesammelt, also früher als die Proben aus den vorangegangenen Reinigungen. Das und die Tatsache, dass

Fraktion 11 bereits eine spezifische Aktivität von 16,2 U/mg besaß, zeigte, dass das Protein schon vor der 25. min eluierte. Das aus den Proben gegossene SDS-Gel wurde wieder wie gewohnt mit Coomassie gefärbt (Abbildung 13).

Fraktion 11 enthielt zwei deutliche Banden, eine zwischen dem 55 und 72 kDa Standard, ungefähr bei 60 kDa und eine kurz unterhalb des 55 kDa Standards.



Abbildung 13: SDS-PAGE der aktivsten Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie bei pH 3,9.

Die Fraktionen 12 und 13 waren identisch und enthielten ebenfalls die Banden auf Höhe des 72 und des 26 kDa Standards. Fraktion 14 zeigte zwei zusätzliche Banden, eine bei 60 kDa und eine unterhalb des 55 kDa Markers. Die Fraktionen 15 bis 18 wurden in ihren Bandenmustern komplizierter. Diese Proben enthielten Hauptbanden kurz oberhalb des 26 kDa Markers und zwischen dem 34 und 43 kDa Marker. Die inaktive Fraktion 18 enthielt keine Banden mehr, die in den Fraktionen 12 und 13 vorkamen.

Unter der Annahme, dass alle in den Proben vorhandenen Proteine auch auf das Gel aufgetragen und deutlich sichtbar angefärbt wurden, konnten nur zwei Proteinbanden als in Frage kommende Bruchstücke der Nitrilhydratase angesehen werden, die Banden auf Höhe des 26 und 72 kDa Standards.

Das mehr als zufriedenstellende Ergebnis dieser Aufreinigung bestätigte die Sinnhaftigkeit der pH-Änderung bei der Ionenaustauschchromatographie. So wurde folgendes Reinigungsprotokoll für alle weiter folgenden Untersuchungen festgelegt:

- 1. Zellaufschluss und differentielle Ultrazentrifugation
- 2. Ammoniumsulfatfällung der S3 Fraktion
- 3. Dialyse der P2 Fraktion
- 4. Anionenaustauschchromatographie der dialysierten P2 Fraktion bei pH 3,9
- 5. Größenausschlusschromatographie

### Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das festgelegte Reinigungsprotokoll für die Nitrilhydratase erlaubte es den Enzymrohextrakt so weit aufzureinigen, dass nur noch zwei Proteinbanden in den aufgereinigten Proben zu finden waren. Es musste daraufhin festgestellt werden, ob diese zwei Proteinbruchstücke von ein und demselben Protein kommen, oder ob die reinen Proben immer noch mehr als ein Protein enthalten. Eine Möglichkeit dies in Erfahrung zu bringen war es, aufgereinigte Proben mit zwei unterschiedlichen elektrophoretischen Methoden zu vermessen und die Ergebnisse zu kombinieren.

Es wurde ein neuer Zellaufschluss durchgeführt. Während der Aufreinigung wurde die Reinheit der Proben mittels der SDS-PAGE überprüft. Abbildung 14 zeigt das Bandenmuster einiger der für die Größenausschlusschromatographie verwendeten Fraktionen.



Abbildung 14: SDS-PAGE aktiver Proteinfraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie.

Einige der Proben aus der Ionenaustauschchromatographie wurden zusammengeführt und per Größenausschlusschromatographie aufgetrennt.

Diese Proben wurden parallel per SDS- und Blue Native-PAGE getrennt. Dazu wurden sie von 500µl auf ungefähr 75 µl mittels Zentrifugationsfiltereinheiten eingeengt.

Für das Blau Nativ-Gel wurden jeweils 12,5 µl jeder Fraktion mit 4,1 µl NativePAGE Sample Buffer (4x) gemischt. Diese Proben wurden auf ein 15 Well NativePAGE Novex

4-16% Bis-Tris Gel aufgetragen. Für den Lauf wurde eine XCell SureLock Mini-Cell verwendet. Die erste Stunde lang wurde eine Spannung von 150 V angelegt, danach wurde diese auf 200 V erhöht. Das Ende des Laufs war erreicht, als die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte und kurz davor stand aus dem Gel zu laufen.

Da das Gel nach dem Lauf aufgrund der geringen Proteinmenge keine Bandenfärbung aufwies, musste es zusätzlich über Nacht mit der für die SDS-PAGE verwendeten sensitiven Coomassie Färbung gefärbt werden.

Parallel zu dieser Native-PAGE wurde ein 12 % iges SDS-Gel der Proben angefertigt, um die Ergebnisse aus beiden Methoden zu vergleichen und zu kombinieren.



Abbildung 15: links) Blau Nativ-PAGE der aus der Größenausschlusschromatographie erhaltenen Fraktionen. rechts) Die entsprechende SDS-PAGE der aus der Größenausschlusschromatographie erhaltenen Fraktionen.

Abbildung 15 zeigt die Gele der Native- und SDS-PAGE. Die Banden der SDS-PAGE waren in diesem Durchlauf unscharf. Trotzdem konnte man in der Negativdarstellung der SDS-

PAGE erkennen, dass Fraktion 13 zwei erwartete Banden auf Höhe des 26 und 72 kDa Standards enthielt. Die Fraktionen 14 bis 16 zeigte diese Muster ebenfalls, jedoch konnte man dort schon weitere diffuse Banden zwischen dem 72 und 55 kDa Marker erkennen.

Außerdem konnte man sehen, dass die Intensitäten der 72 und 26 kDa Banden parallel zur relativen Aktivität zunächst von Fraktion 13 zu Fraktion 16 zunehmen und dann wieder abnehmen, wobei die größere der beiden Banden auch die intensivere war.

Die Bandenmuster der Fraktionen 13 und 14 im Nativ-Gel schienen fast gleich zu sein. Bei Fraktion 13 sah man am deutlichsten eine Bande auf Höhe des 146 kDa Markers, sowie etwas schwächer, da diffuser, eine Bande auf Höhe des 242 kDa Standards. Bei Fraktion 14 ist die größere der beiden Proteinbanden ein wenig intensiver als die kleinere. Zusätzlich konnte man ganz leicht eine Bande kurz unterhalb des 146 kDa Markers erkennen. Diese drei genannten Proteinbanden wurden in allen Fraktionen beobachtet, wobei auch hier in der Native-PAGE, wie in der SDS-PAGE, die Bandenintensität bis Fraktion 16 zu und im Anschluss wieder abnimmt.

Ab Fraktion 15 zeigten sich immer mehr kleinere Banden, was für die gute Trennleistung der Chromatographiesäule sprach. Man konnte ab Fraktion 16 ungefähr in der Mitte zwischen dem 20 und 66 kDa Marker zwei scharfe Banden erkennen. Fraktion 18 und folgende zeigten eine scharfe Bande kurz oberhalb des 66 kDa Standards, sowie mehrere schwache oberhalb des 20 kDa Standards.

Durch das Ausschlussprinzip konnte man abschätzen, welche der angefärbten Banden, unter der Voraussetzung, dass alle Proteine auch angefärbt wurden, die Nitrilhydratase hätte sein können. Die wahrscheinlichsten Kandidaten waren die 146 und 242 kDa Banden, da diese bereits ab Fraktion 13 zu sehen waren und deren Intensität analog zur relativen Aktivität, zuund wieder abnahm. Die spezifische Aktivität nahm zudem von Fraktion 13 mit der Zunahme der Intensität weiterer Banden immer mehr ab.

Leider konnte dieses Ergebnis die Frage nicht klären, ob die 26 und 72 kDa Banden aus den SDS-Gelen in einem Zusammenhang standen, da in allen Fraktionen mehr als Bande zu sehen war.

Aus diesem Grund musste eine eindeutige Methode entwickelt werden, welche es erlaubte, die Nitrilhydratase im Nativ-Gel zu identifizieren.
# In Gel Anfärben

Die fehlende Eindeutigkeit der Ergebnisse aus der Blau Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese erforderte die Etablierung einer Methode die eindeutig die Nitrilhydratase im Blau Nativ-Gel identifizierte. Die einfachste Möglichkeit hätte die Verwendung von geeigneten Antikörpern und eine angeschlossene Sichtbarmachung dargestellt. Das Fehlen dieser Antikörper machte es nötig, eine andere Methode zu entwickeln.

Der Gedanke des Koppelung des Substrats an einen möglichen Farbindikator musste verworfen werden, da die einzigen in Frage kommenden Substituenten Hydroxylgruppen waren. Für diese gab es erstens keine spezifischen Marker, zweitens liegen beide Hydroxylgruppen sehr nah an dem Kohlenstoff, an dem die Hydrolyse stattfindet und drittens wird eine der Hydroxylgruppen während der Reaktion abgespalten. So musste überlegt werden, wie und ob man das Endprodukt der Reaktion nachweisen kann.

Dabei wurde folgende Überlegung angestellt: Wenn das Enzym im Nativ-Gel noch aktiv war, hätte es, unter geeigneten Bedingungen, Aeroplysinin-1 in das Säureamid umwandeln müssen. An der Stelle im Gel, an der sich das Enzym befindet, wäre womöglich ein Teil des Reaktionsproduktes zurückgeblieben, welches man nasschemisch hätte nachweisen können.

Ein nasschemischer Nachweis für Carbonsäureester, Lactame, sowie auch Carbonsäureamide, ist die Hydroxamatreaktion, bei der die Carbonsäurederivate zu Hydroxamsäuren umgesetzt werden, die farbige Komplexe mit Eisen(III)-Ionen bilden.

Für den ersten Versuch wurden die Fraktionenen aus einer Ionenaustauschchromatographie eingeengt und jeweils 18,75  $\mu$ l der Proben mit 6,25  $\mu$ l NativePAGE Sample Buffer (4x) gemischt und auf ein 10 Well NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gel aufgetragen.

Unter Verwendung einer XCell SureLock Mini-Cell wurde die Elektrophorese eine Stunde lang bei 150 V und danach für den Rest der Zeit bei 200 V durchgeführt. Nach dem Lauf wurde eine der beiden Proteinbahnen ausgeschnitten und für die weitere Versuchdurchführung verwendet. Der Rest des Gels wurde in MES-Puffer 50 mM pH 5,8 im Kühlschrank gelagert.

Die ausgeschnittene Proteinbahn wurde in Schnappdeckelglas eingelegt, welches 2500 µl MES-Puffer 50 mM pH 5,8, 1500 µl Mangan(II)-lösung 25 mM, 600 µl Tris-HEPES Puffer und 400 µl Aeroplysininlsg. 29 mM enthielt. Die Lösung wurde nach einer halbstündigen Inkubationszeit entfernt und das Gel mit einer 10 % igen Kaliumhydroxidlösung überschichtet, in der 300 mg Hydroxylaminhydrochlorid gelöst waren. Nach einer halben

Stunde bei 80 °C im Wasserbad wurde eine 1 % ige Eisen(III)-lösung der Lösung hinzugegeben.

Dies führte weder zu einer Färbung des Gels, noch zu einer Färbung der Lösung. Der Fehler die bei dieser Durchführung war fehlende Einstellung des pH-Werts der Kaliumhydroxidlösung, in der das Hydroxylaminhydrochlorid gelöst war, da es für den nucleophilen Angriff als freie Base vorliegen muss. Des Weiteren wurde vergessen, nach der Inkubation mit Hydroxylaminhydrochlorid, die Lösung anzusäuern, da die Hydroxamsäure für die Komplexbildung protoniert vorliegen muss. Außerdem müsste die Lösung nach der Zugabe der Eisenionen auf einen sauren pH eingestellt werden.

Am nächsten Morgen wurde ein neuer Versuch mit der zweiten Proteinbahn gestartet. Die Gelbahn wurde ausgeschnitten zunächst in einer Lösung aus 3000 µl Mangan(II)-lösung 25mM, 1200 µl Tris-HEPES Puffer und 400 µl MES-Puffer 50 mM pH 5,8 vorinkubiert.

Danach wurde die Substratlösung zugegeben und das Gel erneut inkubiert. Als nächstes wurde es einmal mit Nanopure Wasser gewaschen und mit einer methanolischen Kaliumhydroxidlösung, in der 300 mg Hydroxylaminhydrochlorid gelöst waren und deren pH-Wert auf 10 eingestellt war, überschichtet und bei 95 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung angesäuert und mit einer 1 % ige Eisen(III)-lösung versetzt. Das Gel verfärbte sich schlagartig rotbraun (Abbildung 16).



Abbildung 16: Ausgeschnittene Bahn aus der Blau Nativ-PAGE nach der In Gel Anfärbung.

Im Gel konnte man auch eine Bande auf Höhe des unteren Drittels erkennen, die sich von der Braunfärbung des Gels abhob (im Scan nicht sichtbar).

Die Tatsache, dass nach der Versuchsdurchführung eine Bande im Gel erkennbar war, das Gel sich allerdings ebenfalls anfärbte, bedingte weitere Wiederholungen dieses Experiments, unter Verwendung der als zweites beschriebenen Versuchsbedingungen.

Zum einen wurde diese Versuchsdurchführung parallel zu einer 2D-Gelektrophoresse durchgeführt (siehe *Zweidimensionale Gelelektrophorese*), sowie ein weiteres Mal mit einer Probe, die aus mehreren Fraktionen, die aus der Größenausschlusschromatographie stammten, zusammengeführt wurde.

Diese Proben aus der Größenausschlusschromatographie zeigten folgende Bandenmuster in der SDS-PAGE (Abbildung 17).



Abbildung 17: SDS-PAGE zusammengeführter Enzymfraktionen aus der Größenausschlusschromatographie.

Nach der, wie oben beschriebenen Versuchsdurchführung, zeigte die erhaltene Bahn mehrere angefärbte Banden (Abbildung 18).



Abbildung 18: Ausgeschnittene Bahn aus der Blau Nativ-PAGE der zusammengeführten Fraktionen aus Abbildung 17 und anschließender In Gel Färbung.

Das führte zu der Vermutung, dass die spezifische Anfärbung des Säureamids nicht gelungen ist.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde eine Testreihe durchgeführt, die zeigen sollte, ob sich das Gel unspezifisch anfärben lässt.

# Überprüfung der Spezifität des Nachweises

Für diese Überprüfung wurden vier Gelstücke eines vorgefertigten Gels in MES-Puffer, in welchem in zwei Fällen Nicotinsäureamid gelöst war, eingelegt. Das Nicotinsäureamid sollte in dieser Testreihe als Substrat für die Hydroxamsäurereaktion dienen. Nach einer

Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die vier Gelbahnen gewaschen. Jeweils ein Gel mit und ohne Nicotinsäureamid wurde entweder in eine Hydroxylaminhydrochlorid-haltige bzw.

-freie Kalilauge gelegt und im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben angesäuert und es wurde eine 1 % ige Eisen(III)-lösung zugesetzt und die Lösung angesäuert.

Dabei bestätigte sich die Vermutung, dass sich das Gel unspezifisch anfärbt, unabhängig davon, ob das Gel mit einem für die Hydroxamsäurereaktion geeignetem Substrat getränkt war, oder nicht. Proben, die mit Hydroxylaminhydrochlorid versetzt wurden, reagierten bei dieser Versuchsanordnung positiv und verfärbten sich auf dieselbe Art und Weise braun, wie es auch in den vorangegangenen Experimenten mit der Enzymlösung und Aeroplysinin-1 der Fall war. Dies war unabhängig davon, ob die Probe Nicotinamid als Substrat enthielt oder nicht. Das ließ nur die Schlussfolgerung zu, dass die Gele entweder eine Substanz enthielten, die sich anfärben lies, oder sie reagierten selber direkt in der Reaktion.

Da Nativ-Gele meistens mit Glycin, oder ähnlichen  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren laufen, die die Reaktion ebenfalls eingehen können, wurde nach einem System gesucht, welches keine Substanzen enthält, die bei der Versuchsdurchführung zu einer Braunfärbung des Gels führen würden. Da kein System gefunden wurde, wurde das oben genannte Experiment mit einem Gel, welches exzessiv mit Wasser ausgewaschen wurde, durchgeführt, um zu sehen, ob sich die störenden Substanzen aus dem Gel auswaschen lassen. Aber auch hier zeigte sich ebenfalls, dass die Proben mit Hydroxylamin zu einer Braunfärbung führten. Dies deutete darauf hin, dass die Gele selber die Reaktion eingehen und dass somit dieses Experiment in dieser Art nicht geeignet dafür war, die Nitrilhydratase im Gel anzufärben.

## Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine gute Möglichkeit um Zusammenhänge zwischen verschieden großen Proteinen herzustellen und um in Proteingemischen Proteinbruchstücke aus der SDS-PAGE den tatsächlichen Proteinen zuzuordnen.

Diese Methode wurde hier in der Form der Blau Nativ-Gelelektrophorese und anschließender SDS-PAGE verwendet. Es sollte unter anderem geprüft werden, ob die 72 und 26 kDa Banden aus der SDS-PAGE im Zusammenhang mit den 242 und 146 kDa Banden aus der Nativ-PAGE stehen. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Blau Nativ-Gel mit Proben aus der Größenausschlusschromatographie durchgeführt, danach eine Proteinbahn aus dem Gel ausgeschnitten und in eine SDS-/Mercaptoethanollösung eingelegt, um die Proteine zu laden 104

und Schwefelbrücken zu spalten und zum Schluss in der entsprechenden Apparatur mit einem 12 % igem Polyacrylamidgel umschlossen. Gleichzeitig wurde von derselben Probe ein normales SDS-Gel, ohne vorherige Trennung per Nativ-PAGE, gemacht, um dieses später mit dem 2D-Gel zu vergleichen. Beide Gele wurden gleichzeitig elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie gefärbt.

Abbildung 19 zeigt die erhaltenen Gele.



Abbildung 19: links) SDS-PAGE von vier Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie. rechts) 2D-Gel der Fraktion 13 (Abbildung links). Die roten Pfeile deuten auf das gefärbte Punktmuster im Gel, welches anzeigt, dass zwei Proteine, die nach der Trennung in der ersten Dimension (in der Abbildung wäre das von links nach rechts) zwei voneinander getrennte Proteinbanden ergaben, nach der Trennung in der zweiten Dimension in dieselben Bruchstücke zerfallen.

Für die Erstellung des 2D-Gels wurde die Fraktion 13 gewählt, deren Bandenmuster in der SDS-PAGE in Abbildung 19 links zu sehen ist. Die Fraktion wies zwei deutliche Banden auf Höhe des 72 kDa Markers und eine weitere kurz darunter zwischen diesem und dem 55 kDa Marker, ungefähr bei 60 kDa auf. Es waren noch zwei weitere schwache Banden erkennbar auf Höhe des 43 und 34 kDa Standards.

Im 2D-Gel waren vier angefärbte Proteinpunkte sichtbar. Da das SDS- und 2D-Gel so gefertigt wurden, dass die Laufstrecken so gut wie identisch waren, konnte man die Größe der Proteinbruchstücke im 2D-Gel am Marker des SDS-Gels abschätzen. Daraus ergab sich, dass die beiden höher gelegenen Punkte sich auf der Höhe des 72 kDa Markers und die zwei tiefer liegenden sich zwischen dem 72 und 55 kDa Marker befanden. Legte man beide Gele

übereinander, stimmte das Vierpunktmuster des 2D-Gels genau mit den zwei oben genannten Proteinbanden im SDS-Gel, der 72 und knapp 60 kDa Bande, überein. In der ersten Dimension bei der Blue Native-PAGE lagen die hier abgebildeten Proteine bei ungefähr 242 und knapp auf Höhe des 146 kDa Markers, also den im Abschnitt Blau Nativ-Gelelektrophorese aufgefallenen Proteinen, welche mit der Aktivität in Verbindung gebracht wurden.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die zwei Proteine, die in der Native-PAGE eine ungefähre Größe von 242 und 146 kDa aufwiesen, in dieselben Bruchstücke zerfallen und diese Bruchstücke den Proteinbanden entsprachen, die auch in den reinsten Fraktionen der Größenausschlusschromatographie per SDS-PAGE detektierbar waren. Vermutlich handelte sich somit um zwei Proteine mit denselben Untereinheiten, die aber in unterschiedlichen oligomeren Zuständen vorlagen.

## Aktivitätsnachweis im Gel

Da der Anfärbenachweis für die Nitrilhydratase im Blau Nativ-Gel kein positives Ergebnis zeigte, wurde eine weniger elegante Lösung herangezogen.

Es wurde überlegt einen Aktivitätsassay mit ausgeschnittenen Banden aus einem Nativ-Gel zu machen und dann den Substratgehalt der Lösungen im Vergleich zu einer Kontrolle zu messen.

Für diesen Versuch wurde eine Probe, die aus mehreren Fraktionen aus der Gelfiltration, die alle zwischen 24 und 26 min eluierten, zusammengeführt und aufkonzentriert wurde, mit einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ g/ml verwendet.

Neben dem Marker NativeMark Unstained Protein Standard wurden zwei Bahnen eines 15 Well NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gels mit 10 µl der Probe, gemischt mit 3,3 µl NativePAGE Sample Buffer (4x), gefüllt. Damit wurden 100 ng Protein pro Bahn Das Gel wurde weiter behandelt wie unter Blaue aufgetragen. Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese beschrieben. Nachdem der Lauf beendet war, wurde das Gel aus der Kassette entnommen und zwischen den beiden Proteinbahnen geteilt. Eine Proteinbahn wurde mit dem Marker über Nacht in der sensitiven Coomassie Färbung gefärbt, während die zweite Bahn über Nacht im Kühlschrank in MES-Puffer 50 mM pH 5,8 gelagert wurde.



Abbildung 20: Blau Nativ-PAGE des Standards und des Vergleichs für den In Gel Aktivitätsnachweis. Pfeile markieren die Stellen auf deren Höhe in der Probenbahn die Gelstücke ausgeschnitten wurden.

Am folgenden Morgen wurde die gefärbte Proteinbahn neben die ungefärbte gelegt. Auf Höhe der gefärbten Banden (siehe Abbildung 20) wurden die entsprechenden Gelstücke, zwei an der Zahl, aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden jeweils in eine Lösung aus MES-Puffer, Mangan(II)-lösung und TRIS-HEPES-Puffer gelegt und eine halbe Stunde lang inkubiert. Danach wurde die Substratlösung hinzugefügt und nach 20 min wurden 100  $\mu$ l jeder Probe entnommen und in der HPLC auf ihren Substratgehalt in Bezug auf den Substratgehalt einer Vergleichslösung vermessen. Die Vergleichslösung entsprach einer Probenlösung ohne ein Gelstück. Die Kontrollproben enthielten weitere Gelstücke aus der ungefärbten Proteinbahn.

Diagramm 20 zeigt das Ergebnis. Aufgrund der geringen Probenmenge, konnten nur zwei Bahnen mit Probe belegt werden, sodass es für die beiden überprüften Banden keine Standardabweichung für die Aktivität gibt.

Im Diagramm konnte man erkennen, dass der Substratabbau der beiden Proteinbanden deutlich höher war als der in der Kontrolle.



Diagramm 20: Relative Aeroplysininabbau in % der ausgeschnittenen Banden aus einer Blau Nativ-PAGE. Als Kontrollen wurden Protein-freie Gelstücke gleicher Größe verwendet. Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt die prozentuale Abnahme des Substrats in den Proben bezogen auf den Substratgehalt in Negativkontrollen.

Die obere Bande führte zu einem Abbau von ungefähr 13 %, während die untere Bande sogar zu einer fast 16 % igen Substratabnahme führte. Die Kontrolle zeigte einen Abbau von ca.

0,9 %, wobei die Standardabweichung sogar unter einen Substratabbau von 0 reichte und somit als inaktiv zu sehen war.

Abbildung 20 zeigte die gefärbte Proteinbahn sowie den Marker. Man konnte kurz unterhalb des 242 kDa Markers (an der Stelle, an der die Bahn gerissen ist) eine Bande erkennen, sowie eine leicht gefärbte Bande auf Höhe des 142 kDa Markers. Dies sind auch die Proteine, welche in den reinsten Fraktionen aus der Gelfiltration zu erkennen waren (siehe Blau Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese).

Dieses Ergebnis sprach dafür, dass beide isolierten Enzyme Nitrilhydratasen in unterschiedlichen oligomeren Zuständen darstellten. Dies konnte dann auch erklären, warum bei der Gelfiltration über einen größeren Zeitraum in den Fraktionen eine Aktivität messbar war, obwohl die Trennleistung der Säule gut war.

# Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität

Der Einfluss unterschiedlicher Schwermetallsalze auf die Aktivität der Nitrilhydratase wurde zwei Mal untersucht. Das erste Mal ging es darum festzustellen, welches Metallion vom

Enzym für seine Aktivität gebraucht wird, wobei eine dialysierte P2 Probe verwendet wurde. Diese Kenntnis war wichtig, um die Aufreinigung des Enzyms voranzutreiben. Ansonsten hätte während der Aufreinigung jedes Mal für die Aktivitätsassays eine S3 Probe inaktiviert werden müssen, um das gesuchte Cosubstrat dem Enzym zuzuführen. Dies hätte einen enormen Verbrauch an Schwammmaterial mit sich gebracht.

Ein zweites Mal wurde der Versuch mit einem größeren Ansatz und weiteren Salzen wiederholt, um die Ergebnisse des ersten Versuchs für das aufgereinigte Enzym zu bestätigen.



Diagramm 21: Relative Aerophysininabnahme in % einer dialysierten Probe (P2 dialysiert) nach Zugabe diverser Metallionen (n=3). Der relative Aerophysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 10 µg.

Diagramm 21 zeigt den Einfluss von Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> und Fe<sup>2+</sup> Ionen auf die Enzymaktivität. Bis auf das Mangan-Salz stellte keines der dem Enzym dargebotenen Metalle die Aktivität der Nitrilhydratase wieder her. Das führte zu der Schlussfolgerung, dass das Enzym manganabhägig ist, sodass ab diesem Zeitpunkt zu allen Proben ab der Dialyse 25 mM Manganlösungen zugeben wurden, um im Endvolumen eine Konzentration von 7,5 mM zu erreichen.

Nachdem ein Aufreinigungschema für die Nitrilhydratase erarbeitet wurde, wurde erneut der Einfluss verschiedener Metallionen auf die aufgereinigte Nitrilhydratase überprüft.



Diagramm 22: Relative Aerophysininabnahme in % einer dialysierten Probe (P2 dialysiert) nach Zugabe diverser Metallionen (7,5 mM) (n=3). Der relative Aerophysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von  $0,1 \mu g$ .

Mit einer frisch isolierten Enzymlösung aus der Größenausschlusschromatographie wurden Ergebnisse erhalten, die nicht denen entsprachen, die mit der dialysierten Probe erhalten wurden. Mangan hatte zwar immer noch den größten Effekt auf die Enzymaktivität, jedoch wiesen nun auch Cobalt und Nickel in absteigender Reihenfolge einen positiven Effekt auf. Mangan führte zu einer ca. 60 % igen Substratabnahme, wohingegen Cobalt nur zu einer 35 % igen und Nickel zu einer knapp 10 % igen Abnahme führte. Zink<sup>2+</sup>, Kupfer<sup>2+</sup>, Eisen<sup>2+</sup> und Eisen<sup>3+</sup> hatten keinen Effekt auf das Enzym.

Im Diagramm 22 wird der Effekt der Manganzugabe (7,5 mM) zu einer aufgereinigten Enzymlösung aus der Größenausschlusschromatographie gezeigt. Man sieht deutlich, dass die Probe ohne Zusatz des Metallions keine Aktivität besitzt, sondern, dass es erst durch Zugabe des Metallions zum Aeroplysininabbau kommt. In diesem Versuch führte die Addition von Mangan zu einer fast 63 % igen Abnahme des angebotenen Substrats



Diagramm 23: Relative Aeroplysininabnahme in % einer aufgereinigten Probe mit und ohne Zugabe von  $Mn^{2+}$  (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

### Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität

Mangan-, Cobalt- und Nickelsalze stellten die Enzymaktivität in einer Konzentration von 7,5 mM wieder her. Daraus stellte sich die Frage, in welchem Bereich eine Mindestkonzentration für eine messbare Aktivitätssteigerung liegt und ob wo das Maximum für den aktivitätssteigernden Effekt liegt.

Zunächst wurde eine Messreihe für Mangan durchgeführt, bei der der Einfluss von Mangankonzentrationen zwischen 0,9 und 75 mM gemessen wurde.

Diagramm 24 zeigt die, in unserer Versuchsanordnung, maximal erreichbare aktivitätssteigernde Konzentration für Mangan. Diese liegt hier zwischen 0,94 und der üblich eingesetzten Konzentration von 7,5 mM. Eine Vervierfachung der Konzentration von 7,5 auf 30 mM hatte bereits negative Auswirkungen auf die Aktivität, da diese bereits um knapp

30 % auf ca. 44 % sank. Eine weitere Erhöhung auf eine Endkonzentration von 75 mM, also dem Zehnfachen der normal eingesetzten Konzentration an Mangan führte zu einer 48 % Abnahme der Aktivität gegenüber dem im diesem Experiment erreichtem Optimum von ca. 62 %.

Daraus konnte geschlossen werden, dass Mangankonzentrationen über 7,5 mM eine denaturierende Wirkung auf das Enzym besitzen, was zu einer, nach Verzehnfachung dieser Konzentration, Halbierung der Aktivität führt.



Diagramm 24: Einfluss verschiedener Mangankonzentrationen zwischen 0,94 und 75 mM auf die Enzymaktivität (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1  $\mu$ g.

Für die vergleichenden Kinetikmessungen zwischen Mangan, Cobalt und Nickel sollte die geringste mögliche Salzkonzentration gewählt werden, bei der noch eine deutliche Aktivität messbar war. Zu diesem Zweck wurden fünf verschiedene Mangankonzentrationen zwischen 7,5 und 0,00075 mM auf ihren Einfluss auf die Nitrilhydratase hin in einer Dreifachmessung vermessen.



Diagramm 25: Einfluss verschiedener Mangankonzentrationen zwischen 7,5 und 0,00075 mM auf die Enzymaktivität (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von  $0,1 \mu g$ .

Die Ergebnisse aus Diagramm 25 zeigten, dass eine Konzentration von 75  $\mu$ M noch eine deutlich messbare Aktivität hervorrief, sodass diese Konzentration für die folgenden Kinetikmessungen gewählt wurde. Die in dieser Versuchsreihe verwendeten geringeren Konzentrationen von 7,5  $\mu$ M und 0,75  $\mu$ M hatten eine zu große Standardabweichung, um als aussagekräftiges Ergebnis gewertet zu werden und wurden als ein Ausbleiben der enzymatischen Aktivität angesehen.

Um vor den Kinetikmessungen noch einen kleinen Überblick über die Einflüsse von Cobalt und Nickel im Konzentrationsbereich von 7,5 bis 0,0075 mM zu haben, wurde eine Messreihe in einer Einfachbestimmung für diese zwei Salze durchgeführt. Diagramm 26 zeigt das Ergebnis. Beide Salze zeigten bei einer Konzentration von 7,5 mM noch eine deutliche Aktivität von knapp 30 bzw. 20 %. Die Konzentrationsabnahme um zwei Zehnerpotenzen führte zu einer gleichzeitigen Aktivitätsabnahme, wobei diese noch bei über 5 % lag, sodass mit den Ergebnissen aus den Manganmessungen für die Kinetikmessungen eine Salzkonzentration von 75 µM gewählt wurde.

Da sich zeigen sollte, dass die Kinetikmessungen keine eindeutigen Ergebnisse lieferten wurde überlegt, eine neue Messreihe mit allen drei Salzen durchzuführen, bei der verglichen werden sollte, welches der drei Metallionen in der geringstmöglichen Konzentration noch



Diagramm 26: Einfluss verschiedener Cobalt- und Nickelkonzentrationen zwischen 7,5 und 0,0075 mM auf die Enzymaktivität (n=1). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

einen aktivitätssteigernden Effekt besitzt, wodurch auf das tatsächliche Zentralatom im Enzym zurückgeschlossen werden sollte.

So wurden für Mangan, Cobalt und Nickel jeweils in einer Dreifachbestimmung acht Konzentrationen zwischen 7,5 mM und 15 µM getestet (Diagramme 27 und 28).

Zunächst einmal zeigte sich, dass die verwendete Enzymlösung, die zu dem Zeitpunkt bereits mehrere Wochen eingefroren war, durch die Lagerung an Aktivität verloren hatte. Zwar lag die Enzymaktivität bei der maximalen Salzkonzentration von 7,5 mM immer noch zwischen 40 und 50 % (Vergleich Diagramm 25), jedoch sank diesmal die Enzymaktivität bei der Konzentrationsabnahme um eine Zehnerpotenz rapide um fast 50 % auf knapp 25 %, was bei der ersten Messung (Diagramm 25) nicht der Fall war. Dort blieb die Aktivität fast konstant. Eine weitere Reduktion der Mangankonzentration auf 525  $\mu$ M halbierte erneut die Aktivität, die nur noch bei ungefähr 12 % lag. Die Konzentrationen von 150 und 30  $\mu$ M lieferten ähnliche Ergebnisse mit einer Aktivität von ungefähr 7 %, wohingegen die nächstniedrigere Konzentration von 15  $\mu$ M bereits keine Aktivität mehr aufwies. Somit konnte für diesen Versuch ein Konzentrationsminimum an Mn<sup>2+</sup> von 30  $\mu$ M und eine halbmaximale Aktivität bei 0,75 mM ermittelt werden.



Diagramm 27: Einfluss verschiedener Mangankonzentrationen zwischen 7,5 und 0,015 mM auf die Enzymaktivität (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von  $0,1 \mu g$ .



Diagramm 28: Einfluss verschiedener Cobalt- und Nickelkonzentrationen zwischen 7,5 und 0,3 mM auf die Enzymaktivität (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

Die Messergebnisse von Cobalt und Nickel wiesen den Aktivitätsverlust der Enzymprobe sogar noch stärker auf. Alle verwendeten Konzentrationen, außer 7,5 mM, hatten keinen Effekt mehr auf das Enzym. Dies zeigte im Vergleich mit Mangan deutlich, dass Mangan ganz offensichtlich eine viel höhere Affinität zur Nitrilhydratase aufweist, da es in wesentlich geringeren Konzentrationen als Cobalt oder Nickel die Aktivität des Enzyms fördert. Dies legt nahe, dass Mangan das natürliche Zentralatom für die Nitrilhydratase ist.

## Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität

Es wurde vor der Vermessung der synthetisierten Substanzen, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften schlecht wasser- und teilweise auch methanollöslich waren, untersucht, welchen Einfluss Dimethylsulfoxid auf die Enzymaktivität hat, da überlegt wurde, dieses dem Probenvolumen als Lösungsvermittler zuzusetzen. Dazu wurden Aktivitätsassays durchgeführt, die einen Anteil von 0, 5 und 10 % DMSO enthielten.

Diagramm 29 gibt das Ergebnis dieses Versuchs wieder. Es wird deutlich, dass eine 10 % ige DMSO-Zugabe zum Probenvolumen keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt. Die Aktivität liegt bei allen drei Proben um die 60 % Substratabbau.

So konnte für die Experimente mit den synthetisierten Substanzen DMSO als Cosolvens genommen werden, ohne dass eine Beeinflussung der Enzymaktivität oder ein Ausfallen der Substrate im zu hydrophilen Probenvolumen befürchtet werden musste.



Diagramm 29: Relativer Aeroplysininabbau in % unter Zugabe von 0, 5 und 10 % DMSO zum Probenvolumen (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1  $\mu$ g.

### Aktivitätsassay mit Aeroplysinin-1 Derivaten

Um die Selektivität der Nitrilhydratase zu untersuchen, wurden aufgrund der Tatsache, dass keine Substratanaloga käuflich zu erwerben waren, die einen zweifach bromierten, hydroxylierten und methylierten Sechsring mit einer Acetonitrilseitenkette enthielten, Aeroplysinin-1 Derivate synthetisiert. Die Synthese erfolgte ausgehend von 2-Hydroxy-4-methoxyphenylbenzaldehyd und lieferte nach mehreren Syntheseschritten 2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril als erstes Derivat. Weitere Reaktionsschritte führten zu den Syntheseprodukten in Abbildung MM 1. Diacetylaeroplysinin wurde durch Acetylierung von Aeroplysinin-1 partialsynthetisch gebildet.



Diagramm 30: Relativer Substratabbau in % von Aeroplysinin-1 und allen synthetisierten Derivaten (n=3). 1 = Aeroplysinin-1, 2 = 2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril, 3 = Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril, 4 = 3,5-Dibromo-2-acetyl-4-methoxyphenylacetonitril, 5 = 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4methoxyphenylacetonitril, 6 = 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäure, 7 = 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4methoxybenzoesäuremethylester, 8 = 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester,

9 = 2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-oxoacetaldehyde O-methyloxim, 10 = 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion, 11 = Diacetylaeroplysinin. Der relative Substratabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

Von den 11 eingesetzten Substraten wurde keines außer Aeroplysinin-1 in einem nennenswerten Umfang umgesetzt. Für keines der Derivate konnte im HPLC-

Chromatogramm ein Produktpeak ermittelt werden. Um alle Eventualitäten auszuschließen, wurde alle Assays mit einem Total Plot in der HPLC überprüft.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die Nitrilhydratase spezifisch sein natürliches Substrat Aeroplysinin-1 umsetzt, sagte allerdings noch nichts darüber aus, ob die Derivate nicht trotzdem eine Bindung zum katalytischen Zentrum des Enzyms eingehen. Um das zu untersuchen, wurde ein Inhibitionsassay durchgeführt.

# **Enzyminhibition mit Aeroplysinin-1 Derivaten**

Das Experiment zum enzymatischen Abbau der Derivate zeigte die Spezifität der Nitrilhydratase deutlich auf, da nur das natürliche Substrat vom Enzym akzeptiert und umgesetzt wurde. Da aber die Möglichkeit bestand, dass die Derivate trotz fehlendem enzymatischem Umsatz eine Affinität zum Enzym besitzen, wurde ein neuer Versuch durchgeführt, bei dem äquimolare Mengen von Aeroplysinin-1 und jeweils einem Derivat dem Enzym angeboten wurden. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Derivatzusatz. Eine Abnahme des Aeroplysininumsatzes würde die Hemmung des Enzyms bedeuten und zeigen, welche Derivate an das Enzym binden und womöglich auch, welche Charakteristika eine Substanz haben muss, damit eine Bindung zwischen dem Enzym und einer Substanz zustande kommt.

Diagramm 31 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Im Umsatz von Aeroplysinin-1 konnten keine klar erkennbaren Unterschiede zwischen der Aerolysinin-1 Kontrolle und den Aeroplysinin/Derivat-Mischungen festgestellt werden. Alle Umsätze befinden sich im Bereich von 50 bis 60 %, wobei sich die Standardabweichungen jeweils auch überschneiden. Somit konnte abschließend nach den Ergebnissen der Substratspezifität und des Inhibitionsassays festgehalten werden, dass die Nitrilhydratase ein sehr spezifisches Enzym Aeroplysinin-1 gegenüber ist und nur dieses akzeptiert.



Diagramm 31: Relativer Aeroplysininabbau in % von Aeroplysinin-1 und äquimolaren Mischungen von Aeroplysinin-1 jeweils einem der synthetisierten Derivate (n=3). 1 = Aeroplysinin-1, alle weiteren Proben sind Mischungen aus Aeroplysinin-1 mit: 2 = 2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril, 3 = Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl-acetonitril, 4 = 3,5-Dibromo-2-acetyl-4-methoxyphenylacetonitril, 5 = 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetonitril, 6 = 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäure, 7 = 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester, 8 = 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäure-methylester, 9 = 2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-oxoacetaldehyde O-methyloxim, 10 = 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion, 11 = Diacetylaeroplysinin. Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von 0,1 µg.

### Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Aeroplysininderivate

Die Synthese der Aeroplysininderivate sollte Aufschluss über die Spezifität der Nitrilhydratase geben, wobei in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte, dass unter den gewählten Bedingungen keines der Derivate, trotz struktureller Ähnlichkeiten, vom Enzym akzeptiert wurde.

Das führte zu der Frage, ob die Derivate zumindest vergleichbare antibiotische Eigenschaften wie Aeroplysinin-1 besitzen. Alle Substanzen inklusive Aeroplysinin-1 wurden in einer Konzentration von 64  $\mu$ g/ml auf ihre antibiotische Aktivität hin geprüft. Aeroplysinin-1 diente neben Ciprofloxacin, Rifampicin, Tetracyclin und Vancomycin als interner Standard und sollte einen Vergleich zu den Derivaten vereinfachen.

Außer Aeroplysinin-1 zeigte keines der Derivate eine antibiotische Aktivität gegen die verwendeten Bakterienstämme. Da die synthetisierten Substanzen bereits in der Anfangskonzentration inaktiv waren, wurden keine weiteren Messungen mit niedrigeren Substanzkonzentrationen durchgeführt.

### Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit des aufgereinigten Enzyms wurde durch Inkubation der Probenlösungen bei sieben verschiedenen Temperaturen untersucht. Frühere Bestimmungen des Temperaturoptimums durch Dr. Fendert zeigten ein Temperaturintervall von 20 bis 30 °C auf.

Die Untersuchung des reinen Enzyms wies ein Maximum des Substratumsatzes bei 35 °C auf und war somit etwas höher als der früher ermittelte Wert.



Diagramm 32: Relativer Aeroplysininabbau in % in abhängig von unterschiedlichen Unkubationstemperaturen zwischen 10 und 80 °C (n=3). Der relative Aeroplysininabbau in % beschreibt den Substratabbau im Aktivitätsassay bezogen auf eine Proteinmenge von  $0,1 \mu g$ .

# Kinetikmessungen

Die Untersuchungen der Enzymkinetik sollten einen Abschluss der Charakterisierung der Nitrilhydratase bilden. Während der vorangegangenen Versuche hatte sich gezeigt, dass drei Metallionen als mögliche Zentralatome für das Enzym in Frage kommen, Mangan, Cobalt und Nickel, da lediglich diese drei einen positiven Einfluss auf die enzymatische Aktivität ausübten. Kinetikuntersuchungen des Enzyms mit diesen drei Cosubstraten, hätten eindeutig, durch den Vergleich der K<sub>m</sub>-Werte klären sollen, welches nun das tatsächliche Cosubstrat darstellt. Das Salz, dass zum kleinsten K<sub>m</sub>-Wert führt, bei dem also mit der geringsten Substratkonzentration die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird, wäre das gesuchte, natürliche Cosubstrat.

Um eine bessere Differenzierung der Ergebnisse zu erhalten, wurde in Vorversuchen die geringste gemeinsame Salzkonzentration ermittelt, mit der alle drei Salze noch zu einer sichtbaren Aktivität führen. Die für den Versuch verwendeten Substratkonzentrationen wurden so breit gefächert gewählt, dass sie auch den recht hoch ausgefallenen von Fendert (2009) in seiner Arbeit ermittelten  $K_m$ -Wert von 84 mM einschlossen.

Während der Messungen zeigte sich allerdings, dass das Substrat trotz der Tatsache, dass Methanol mit einem Volumenanteil von 8 % im Probenvolumen als Cosolvens diente, bei Konzentrationen von über 36 mM ausfiel. Somit fehlten für einen vollständigen Datensatz Ergebnisse für Substratkonzentrationen von 54 bis 108 mM, also auch die von Fendert ermittelte Konzentration beim K<sub>m</sub>-Wert.

Trotz einer Vierfachbestimmung waren die Ergebnisse der Messungen im Hinblick auf das gesuchte Zentralatom nicht eindeutig. In den gemessenen Konzentrationsbereichen zeigten sich für alle drei verwendeten Salze lediglich Geraden der Form y = ax + b (Abbildung 21), so wie es bei der Michaelis-Menten Kinetik bei geringen Substratkonzentrationen im Anfangsbereich der Kurve üblich ist.

Das Wegfallen der höheren Substratkonzentrationen verhinderte jedoch, dass das Enzym mit Substrat gesättigt werden konnte. Somit konnten aus den ermittelten Graphen keine K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Werte bestimmt werden. Dementsprechend führte die doppelt-reziproke Darstellung der Daten im Lineweaver Burk-Plot ebenfalls zu keinem sinnvollen Ergebnis, da sehr geringe K<sub>m</sub>-Werte unter 1 mM errechnet wurden. Solch niedrige K<sub>m</sub>-Werte hätte man somit auch im direkten Michaelis-Menten Diagramm erkennen müssen, wenn man bedenkt, dass eine Sättigung des Enzyms bei einer Substratkonzentration erreicht, die dem zehnfachfachen des K<sub>m</sub>-Werts entsprechen. Bei einem theoretischen K<sub>m</sub> von unter 1 mM hätte man also ab einer Substratkonzentration von 10 mM eine Sättigungskurve sehen müssen.



Abbildung 21: Aufgenommene Reaktionskinetiken des Aeroplysinin-1 Umsatzes unter Zugabe von a) Mangan(II), b) Cobalt(II) und c) Nickel(II) zum Probenvolumen in einer Endkonzentration von 75 μM.

Bei einem Lineweaver Burk-Plot fallen geringe Substratkonzentrationen durch die Reziprokisierung viel schwerer ins Gewicht als die höheren. Das Weglassen der geringsten im Versuch verwendeten Substratkonzentration von 9  $\mu$ M führt demnach zu veränderten Ergebnissen, die zu den vorher angestellten Vermutungen bezüglich des Zentralatoms passten.





Abbildung 22: Lineweaver Burk-Plots für alle drei verwendeten Cosubstrate. Die geringste gemessene Substratkonzentration wurde nicht berücksichtigt.

Für Mangan und Cobalt ließen sich aus den Darstellungen in Abbildung 22 K<sub>m</sub>-Werte von 3,1 mM für Mangan und 18,2 für Cobalt errechnen. Die V<sub>max</sub>-Werte für beide Metallionen lauteten 0,11 bzw. 0,43 µmol/ml/min für Mangan und Cobalt. Für Nickel war auch in dieser Darstellung noch kein Wert erfassbar. Erst das Weglassen der zweitniedrigsten Substratkonzentration führte zu einem Ergebnis von 26,3 mM für K<sub>m</sub> und 0,59 µmol/ml/min für V<sub>max</sub>.

Diese mithilfe des Lineweaver Burk-Plots errechneten Werte deuteten wie schon die Versuche mit unterschiedlichen Salzen und Salzkonzentrationen darauf hin, bei denen Mangan den stärksten Einfluss hatte, dass eben Mangan das tatsächliche Zentralatom des Enzyms ist, da hierfür der geringste K<sub>m</sub>-Wert bestimmt wurde. Verwunderlich war allerdings, dass bei den drei Salzen mit steigendem K<sub>m</sub>-Wert der V<sub>max</sub>-Wert ebenfalls ansteigt und somit Nickel zur höchsten zu erreichenden Umsatzgeschwindigkeit führt. Man hätte eher erwartet,

dass das Salz bei dem die geringste Substratkonzentration zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit gebraucht wird, gleichzeitig zum größten Umsatz und größten Reaktionsgeschwindigkeit führt. Dies lässt wiederum an der Sinnhaftigkeit der Linearisierung der Geraden aus den Michaelis-Menten Graphen zweifeln.

# Trypsin Verdau und Massenanalyse der Nitrilhydratase

Während der Untersuchung der Enzymproben wurden beim Betrachten der einzelnen Enzymfraktionen in der SDS-PAGE, die durch unterschiedliche Reinigungsschritte erhalten wurden, besonders zwei Proteinbanden sichtbar, deren Intensität mit steigender enzymatischer Aktivität zu- und mit fallender Aktivität auch wieder abnahm. Desweiteren konnte die Auswahl der für die NHase in Frage kommenden Proteinbruchstücke durch Ausschluss mit dem oben genannten Kriterium der zu- bzw. abnehmenden Enzymaktivität, auf zwei Proteinbanden bei 72 und 26 kDa begrenzt werden. Die im späteren Verlauf der Untersuchungen aufgefallene 60 kDa Bande trat in den reinsten Fraktionen so schwach konzentriert auf, dass dies nicht für eine Massenanalyse ausreichte.

So wurden per Trypsin Verdau und anschließender MALDI-TOF-Massenanalyse die 72 und 26 kDa Proteinbanden untersucht. Die 72 kDa Bande lieferte 14 de novo sequenzierte Proteinsequenzen, wohingegen die 26 kDa Bande entweder durch unzureichenden Trypsin Aufschluss oder schlechte MS-analytische Eigenschaften kein Ergebnis lieferte.

Tabelle 17 zeigt einen Überblick über die erhaltenen Teilsequenzen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden in Online-Datenbanken auf Homologien geprüft. Zwar konnten für jede Sequenz (bei NCBI Blast) viele unterschiedliche Treffer in den Datenbanken gefunden werden, jedoch gab es keine Übereinstimmungen mit bekannten Nitrilhydratasen. Zudem gab es keine Übereinstimmungen in den gefundenen Homoogien zwischen den einzelnen Proteinsequenzen, sodass der Aussagewert der einzelnen Suchergebnisse zweifelhaft war. Somit musste festgehalten werden, dass dies entweder bedeutete, dass a) die 72 kDa Bande nicht zu einer Nitrilhydratase gehört, b) die Bande der Nitrilhydratase zuzuordnen ist, diese jedoch vollkommen anders aufgebaut ist, als bakterielle Nitrilhydratasen oder dass c) die Bande der Nitrilhydratase zuzuordnen ist, jedoch beim Trypsin Verdau zufällig keine Proteinsequenzen erhalten wurden, die typisch für eine Nitrilhydratase sind.

Proteinsequenz 6 ((PS/LA)LDLELATYR) stellt eine Verunreinigung mit menschlichen Hautschuppen dar. Eine Datenbanksuche für diese Sequenz ergab eine Übereinstimmung mit Keratin.

Proteinbande (kDa)	Proteinsequenz	Aminosäurenlänge
72	LSSEFGFK	8
72	FVTPDLR	7
72	WDETVVALVR	10
72	(FN)FDLTHQQQLDYLR	15
72	DLPASANDLPYFLLHAQDR	19
72	(PS/LA) LDLELATYR	11
72	xxVPDIEAGExxK	13 (4*)
72	ALEAWMoxR	7
72	TSDQKIIVR	9
72	SAFPR(HM)R	8
72	xxxxNNAEDxxx	12 (7*)
72	(TE)FIVAxxxxR	11 (4*)
72	xxxxYPPFIQxxASSK	16 (6*)
72	xxDVIEGNEQKFLNAAR	17 (2*)

Tabelle 17: Erhaltene Peptidsequenzen der 72 kDa Bande nach Trypsin Verdau und anschließender Massenanalyse. Mit \* markierte Zahlen stehen für die Anzahl nicht identifizierter Aminosäuren in der Teilsequenz.

# Diskussion

# Verletzungsinduzierte Biotransformation in Aplysina-Schwämmen

Die zur Verteidigung dienende Reaktionskaskade, die nach Verletzung des Schwammorganismus enzymatisch innerhalb von Sekunden (Thoms, Ebel et al. 2006) abläuft und die aus Isoxazolinalkaloiden entstehenden Metabolite Aeroplysinin-1 und das Dienon, schützen den Organismus vor mikrobiellem Befall (Weiss, Ebel et al. 1996). Im ersten Schritt der Biotransformation werden die im Schwamm akkumulierten Isoxazolinalkaloide durch ein Isoxazolin-spaltendes Enzym in einer biochemisch ungewöhnlichen Reaktion (Putz 2009) in ein Nitril, das Aeroplysinin-1, umgewandelt (Teeyapant and Proksch 1993; Ebel 1998; Fendert 2000; Putz 2009). In einer zweiten Reaktion wird das entstandene Produkt enzymatisch zum korrespondierenden Säureamid umgesetzt (Ebel 1998; Fendert 2000).

Das Isoxazolin-spaltende Enzym wurde teilweise von Putz (2009) aufgereinigt, wobei durch Western-Blot gezeigt werden konnte, dass mehrere Enzyme, unter anderem Actin, an der

Reaktion beteiligt sind (Putz 2009; Proksch, Putz et al. 2010). Das Enzym, welches für den zweiten Schritt der Biotransformation von Aeroplysinin-1 zum Säureamid verantwortlich ist, wurde von Fendert unter Verwendung eines Enzymrohextraktes grob charakterisiert (Fendert 2000). Aus der Art der ablaufenden Reaktion wurde gefolgert, dass es sich bei dem verantwortlichen Enzym um eine Nitrilhydratase handelt.

Nitrilhydratasen sind gut untersuchte Bakterien- und Pilzenzyme, die der Assimilation von Stickstoff dienen, indem sie Nitrile zu Säureamiden umwandeln. Bisher wurden noch keine Nitrilhydratasen isoliert und charakterisiert, die a) einen anderen Zweck als den oben genannten aufweisen und b) aus mehrzelligen Tieren stammen.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Isolierung und partiellen Charakterisierung einer Nitrilhydratase aus dem Schwamm *A.cavernicola*.

## Aufreinigung der Nitrilhydratase aus dem Schwamm A.cavernicola

## Zellaufschluss und Entsalzung

Die differentielle Zentrifugation wurde nach dem Zellaufschluß zur ersten, groben Fraktionierung der aus dem Schwammaterial extrahierten Enzyme herangezogen. Diese Methode war erfolgreich, da nach dem letzten Zentrifugationsschritt enzymatische Aktivität nur im Überstand messbar war. Vergleiche der Proteinmuster der erhaltenen Fraktionen per SDS-PAGE zeigten allerdings auch den groben Charakter der Fraktionierung auf.

Nach der Ultrazentrifugation war die Enzymaktivität im Überstand S3 zu finden, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der Nitrilhydratase nicht um ein membranständiges oder – assoziiertes, sondern um ein lösliches Protein handelt. Ein Vergleich zu bekannten NHasen fällt schwer, da es dazu keine Referenzen gibt. In den Reinigungsprotokollen wird meist mit einer Kraft von maximal 20.000 x g zentrifugiert. Es ist allerdings sehr gut möglich, dass es sich bei diesem Fund lediglich um ein Artefakt handelt und die NHase tatsächlich lose mit einem membranständigen Enzym assoziiert ist. Hier würde das Isoxazolin-spaltende Enzym in Frage kommen. Eine räumliche Nähe zu diesem Enzym hätte den Vorteil, dass es auch gleichzeitig räumlich nah am neugebildeten Substrat läge. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine Assoziation der Enzyme die kinetischen Parameter der NHase verändert, wodurch die Affinität und die Umsatzgeschwindigkeit positiv verändert werden kann.

Die Entsalzung des Überstandes S2 aus der Ultrazentrifugation mittels PD-10 Säulen lieferte ein erstes, überraschendes Ergebnis. Anders als in Fenderts Arbeit (Fendert 2000), führte die Entsalzung zum totalen Aktivitätsverlust der Probe. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass in dieser Arbeit die Entsalzung mit einer Probe aus der Ultrazentrifugation durchgeführt wurde und nicht mit dem Enzymrohextrakt. Allerdings befinden sich im Überstand der Ultrazentrifugation alle löslichen Substanzen, die auch im Rohextrakt enthalten waren. Somit ist es äußerst unwahrscheinlich, dass ein Unterschied in der Probenzusammensetzung für das unterschiedliche Ergebnis verantwortlich ist. Wahrscheinlicher ist es, dass sich *Aplysina*-Schwämme untereinander in dem Aufbau ihrer Nitrilhydratasen unterscheiden.

Aufgrund des Aktivitätsverlustes wurde bei darauffolgenden Aufreinigungen auf die Entsalzung verzichtet. Aber immerhin lieferte dieser Versuch einen ersten Hinweis darauf, dass die in dem Schwamm enthaltene NHase von einer leicht abspaltbaren bzw. abgehenden prosthetischen Gruppe, die kleiner als das Ausschlussvolumen der PD-10 Säulen (5 kDa) war, abhing.

# Ammoniumsulfatfällung, Dialyse und Wiederherstellung der Aktivität durch eine hitzeinaktivierte Probe

Nach der differentiellen Zentrifugation wurde eine weitere grobe Fraktionierung der Proteine mittels einer Zwei-Schritt-Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die anschließende Dialyse führte, wie die Entsalzung per PD-10 Säulen, ebenfalls zu inaktiven Proben. Dies unterstützte die These, dass niedermolekulare Substanzen, die dem Enzym als prosthetische Gruppe dienen, leicht abgetrennt werden können. Ein weiterer Beweis für das Zusammenspiel eines nicht-proteinogenen Cosubstrats mit der NHase lieferte die Zugabe einer hitzeinaktivierten Probe zu entsalzten (PD-10 Säule) und dialysierten Proben. So konnte eine aktive S3 Fraktion aus der Ultrazentrifugation, die durch eine 20 minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert wurde, die Enzymaktivität der entsalzten Proben teilweise wiederherstellen.

In der Festigkeit der Bindung der Cosubstrate scheint sich die Nitrilhydratase des Schwammes von den bakteriellen zu unterscheiden. Es gibt nur wenige Publikationen, die explizit auf die Bindung des Cosubstrats eingehen. Asano et al. (Asano, Fujishiro et al. 1982) erwähnen zwar Dialyseschritte, jedoch bleibt die Enzymaktivität dadurch unbeeinflusst. Bei Nagasawa et al. (Nagasawa, Nanba et al. 1987; Nagasawa, Takeuchi et al. 1991) wird deutlich ausgesagt, dass die Cosubstrate der untersuchten NHasen fest an die Enzyme gebunden sind 127

und sogar eine mehrtägige Dialyse bei verschiedenen pH-Werten nichts daran ändert. Ähnliche Aussagen finden sich auch bei Kobayashi et al. (Kobayashi, Nishiyama et al. 1991), sowie Okamoto et al. (Okamoto and Eltis 2007). Ein gegensätzlicher Sachverhalt wird nicht erwähnt. Somit scheint die in *A.cavernicola* enthaltene Nitrilhydratase eine Besonderheit für diese Enzymklasse darzustellen.

Nichtsdestotrotz konnte die Ammoniumsulfatfällung als Erfolg in der Aufreinigung gewertet werden, da die SDS-PAGE der erhaltenen Fraktionen bereits Unterschiede im Bandenmuster aufwiesen. So konnten in den Niederschlägen der Ammoniumsulfatfällung unterschiedliche Hauptbanden ausgemacht werden, die vornehmlich nur in einer der Fraktionen vorkamen. So fielen in der später für weitere Reinigungsschritte verwendeten Niederschlagsfraktion drei Hauptbanden auf Höhe des 95 kDa und des 72 kDa Standards auf, sowie eine Bande knapp oberhalb von 26 kDa Markers.

Allerdings wurde deutlich, dass eine weitere Aufreinigung des Enzyms ohne die Kenntnis des Cosubstrats schwierig werden würde. Es sollte per Ionenaustauschchromatographie versucht werden, das Cosubstrat aufzureinigen.

# Ionenaustauschchromatographie der proteinfreien Fraktion

Für die Ionenaustauschchromatographie wurden aus dem Überstand S3 der Ultrazentrifugation alle Substanzen abgetrennt, die größer als 3 kDa waren. Die verbliebene Probe wurde mit einem starken Kationenaustauscher HiTrap Säule SP Sepharose XL aufgetrennt. Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf einen aktivitätssteigernden Einfluss hin überprüft. Die Tatsache, dass einige der Fraktionen aktivitätssteigernde Eigenschaften aufwiesen, lieferte den endgültigen Beweis, dass nichtproteinogene, niedermolekulare Substanzen als Cosubstrate fungieren.

## <u>Flammenatomabsorptionsspektroskopie</u>

Die Flammenatomabsorptionsspektroskopie sollte einen Hinweis darauf geben, welches Metallion als Zentralatom in der NHase dient. Eisen- und Cobalt-abhängige NHasen sind bisher bekannt (Kobayashi and Shimizu 1998; Kobayashi and Shimizu 2000; Prasad and Bhalla 2010). Normalerweise werden aufgereinigte Enzymproben für die Ermittlung des Zentralatoms verwendet (Nagasawa, Nanba et al. 1987; Nagamune, Kurata et al. 1990;

Nagasawa, Takeuchi et al. 1991; Payne, Wu et al. 1997; Wieser, Takeuchi et al. 1998; Okamoto and Eltis 2007). In diesem Fall wurde lediglich die S3-Fraktion aus der Ultrazentrifugation verwendet, sodass keine eindeutigen Aussagen über das Zentralatom getroffen werden konnten. Jedoch konnte zumindest festgestellt werden, dass das Fehlen von Eisen in der vermessenen Probe gleichzeitig auch bedeutet, dass die Schwamm-NHase nicht Eisen-abhängig ist. Stattdessen wurden Mangan, Nickel und Cobalt in absteigenden Konzentrationen gefunden. Es wurden 104  $\mu$ g Mangan, 22,7  $\mu$ g Nickel und 8,9  $\mu$ g Cobalt auf ein Gramm gefriergetrockneten Schwamm errechnet. Diese Werte geben nicht den absoluten Gehalt der Metalle wieder, da hier nur der extrahierbare Anteil vermessen wurde.

Der Vergleich dieser Werte mit Werten aus der Literatur ist kaum möglich, da bisher noch keine Untersuchungen gemacht wurden, bei denen Metallgehälter in Enzymproben aus Schwämmen bestimmt wurden. Es gibt Untersuchungen zu Schwermetallverteilungen in Schwämmen (Araujo, Conceicao et al. 2003; Perez, Longet et al. 2005; Padovan, Munksgaard et al. 2012), aber auch diese können nicht als Vergleich herangezogen werden, da in diesen Fällen der ganze Schwamm und nicht der Zellinhalt vermessen wurde. Allerdings gehörte Mangan in den untersuchten Schwämmen teilweise zu den am stärksten vertretenen Schwermetallen.

Betrachtet man den Metallgehalt von *A.cavernicola*, so müssen die Metallkonzentrationen des Meerwassers berücksichtigt werden. Untersuchungen in den Küstengewässern des Tyrrhenischen Meeres (Manfra and Accornero 2005) zeigten eine zehnmal höhere Manganals Nickelkonzentration auf, die bei ungefähr 90 nM liegt. Mit einem Durchschnittswert von 0,05 nM liegt die Cobaltkonzentration im westlichen Mittelmeer sogar um zwei Zehnerpotenzen niedriger als die Nickelkonzentration (Morley, Burton et al. 1997). Diese Konzentrationsunterschiede machen deutlich, dass die Mengenunterschiede der drei Metalle im Schwamm nicht verwundern dürfen. Sie führten aber zu dem Gedanken, alle Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie der proteinfreien Probe auf Mangan hin zu untersuchen. Tatsächlich konnte Mangan in den aktivitätssteigernden Fraktionen gefunden werden, was die These aufstellte, dass Mangan etwas mit der Enzymaktivität zu tun hat.

# Ionenaustauschchromatographie für die Nitrilhydratase

Die Ionenaustauschchromatographie erwies sich als guter Zwischenschritt zur Aufreinigung des Enzyms. Für eine erfolgreiche Durchführung musste der Citronensäure-Puffer durch

MES-Puffer ersetzt werden und es musste ein starker Anionenaustauscher (HiTrap Säule Q Sepharose XL) verwendet werden. Der Reinigungserfolg konnte verbessert werden, indem der pH-Wert für die Reinigung gesenkt wurde. Die Fraktionen aus Chomatographieschritten bei pH 5,8 zeigten in der SDS-PAGE noch sehr komplexe Proteinmuster, die sich immer mehr lichteten mit abnehmendem pH-Wert des verwendeten Puffers. Eine Chromatographie mit Acetatpuffer bei pH 4,9 zeigte schon den ersten Erfolg, da die resultierenden Proben in der SDS-PAGE klar definierte und scharfe Banden lieferten. Eine weitere Absenkung des pH-Werts durch die Umstellung vom Acetat- zum Lactatpuffer pH 3,9 führte zum besten Trennergebnis. In der dazugehörigen SDS-PAGE war eine weitere Ausdünnung im Bandenmuster zu erkennen. Außerdem traten jetzt einige Banden deutlich als Hauptbanden hervor, zu denen auch die später untersuchte 72 kDa Bande zählte. Da das Enzym bei pH 3,9 noch als Anion vorlag, ist es zu einem großen Teil aus sauren Aminosäuren aufgebaut ist und besitzt einen niedrigen isoelektrischen Punkt.

Der Trennerfolg war reproduzierbar, was man durch den Vergleich unterschiedlicher SDS-PAGEs erkennen konnte. Aus diesem Grund wurde die Ionenaustauschchromatographie bei pH 3,9 auch für alle folgenden Aufreinigungen des Schwammaterials durchgeführt.

## Größenausschlusschromatographie für die Nitrilhydratase

Die Größenausschlusschromatographie als abschließende Reinigungsmethode lieferte gute Ergebnisse. Mit der Verbesserung der Reinigungsqualität der Anionenaustauschchromatographie verbesserten sich auch die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. Letztendlich führte die Größenausschlusschromatographie zu Proteinfraktionen, die nur noch zwei Proteinhauptbanden in der SDS-PAGE zeigten. Aus der Korrelation zwischen den Bandenmustern der SDS-PAGEs und der Enzymaktivität der Proben ließen sich auch Rückschlüsse auf die Größe der Nitrilhydratase, bzw. deren Bruchstücken ziehen. Als wahrscheinlichste Bruchstücke kamen dadurch eine 26 und 72 kDa Bande in Frage.

## Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Native-PAGE sollte der Zusammenhang zwischen den auffälligen Peptidbruchstücken der Größen von 26 und 72 kDa aus der SDS-PAGE überprüft werden. 130

Dazu Schwammaterial aufgeschlossen wurde neues und bis zur Größenausschlusschromatographie gereinigt. Daraus erhaltene Fraktionen wurden in einer SDS- und Native-PAGE elektrophoretisch getrennt und die Elektropherogramme nach der Entwicklung verglichen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den genannten Bruchstücken festgestellt werden, da die reinsten Proben in beiden Elektropherogrammen mehr als eine Bande aufwiesen. Allerdings ließ das Ergebnis die Vermutung zu, dass der Schwamm womöglich nicht nur eine, sondern zwei Nitrilhydratasen enthält, da die reinste Probe in der Native-PAGE zwei Banden auf der Höhe der 146 und 242 kDa Standards aufwies.

# In Gel Anfärben

Das Fehlen von spezifischen Antikörpern gegen Nitrilhydratasen führte zu dem Versuch, das Enzym im Blau Nativ-Gel spezifisch durch einen nasschemischen Nachweis anzufärben. Unter der Voraussetzung, dass die Enzyme im Nativ-Gel aktiv sind, sollte mit Hilfe der Hydroxamatreaktion das Dienon im Gel angefärbt werden und die Stelle farblich markieren, an der das Enzym lag.

Zwei unterschiedliche Färbeprotokolle führten zunächst zu einem falsch positiven Ergebnis. Weiterführende Versuche zeigten, dass entweder die Gele selbst oder Substanzen aus den Laufpuffern zu einer Einfärbung der Gele führen, sodass keine weiteren Experimente mehr in diese Richtung unternommen wurden.

## Zweidimensionale Gelelektrophorese und Aktivitätsnachweis im Gel

Eine aktive Fraktion aus der Größenausschlusschromatographie wurde erst per Native-PAGE und dann im Anschluss in der zweiten Dimension per SDS-PAGE aufgetrennt. Die für diesen Versuch verwendete Probe war keine der früh eluierenden Proben, sodass in der SDS-PAGE neben der 72 kDa noch eine ca. 60 kDa große Hauptbande auftrat. Das 2D-Gel dieser Probe zeigte zwei Enzyme der Größen 146 und 242 kDa, die auch schon in den reinsten Proben der Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgefallen waren. Diese Enzyme zerfielen beide in der zweiten Dimension in ein 72 und ein 60 kDa. Da vermutet wurde, dass die 72 kDa Bande mit der Aktivität des NHase korrelierte, bedeutete dieses Ergebnis, dass *A.cavernicola* womöglich zwei Nitrilhydratasen enthielt, von denen die eine als Heterodimer und die andere als Tetramer vorlag.

Endgültige Klarheit darüber, ob es mehr als eine Nitrilhydratase im untersuchten Schwamm gab, sollte ein Aktivitätsnachweis im Gel liefern. Eine aktive Probe aus der Größenausschlusschromatographie wurde dazu per Native-PAGE aufgetrennt. Mit zwei ausgeschnittenen Proteinbanden, deren Größe den vorher bereits identifizierten Enzymen entsprach (146 und 242 kDa), wurde anschließend ein Aktivitätsnachweis durchgeführt, der positiv verlief. Beide Proteinbanden zeigten eine deutliche Aktivität gegenüber einer Kontrolle auf, was bewies, dass der Mittelmeerschwamm *A.cavernicola* mindestens zwei Nitrilhydratasen enthält.

Das Vorhandensein von zwei NHasen in einem Organismus ist z.B. für *Rhodococcus rhodochrous J1*, den wichtigsten Biokatalysator für die industrielle Produktion von Acrylamid (Kobayashi, Nagasawa et al. 1992), bekannt, der eine NHase mit einem hohen und niedrigen Molekulargewicht enthält (Wieser, Takeuchi et al. 1998). Die beiden Formen unterscheiden sich zum Beispiel in ihrem pH- und Temperaturoptimum. Für die Nitrilhydratasen aus *A.cavernicola* könnte es vielleicht ähnlich sein. Zwei NHasen mit unterschiedlichen Temperaturoptima könnten zum Beispiel bei Veränderungen der Wassertemperatur ein bestimmtes Aktivitätsniveau über einen breiteren Temperaturbereich halten. Damit könnte sich das enzymatische Verteidigungssystem gegen Umwelteinflüsse, die das System negativ beeinflussen könnten, schützen.

Da aber die zwei Enzyme nicht voneinander getrennt werden konnten, müssen weitere Untersuchungen in diese Richtung folgen.

# Charakterisierung der Nitrilhydratase aus dem Schwamm A.cavernicola

## pH und Temperaturoptima

Vor Beginn der Aufreinigung, musste zunächst ein funktionierendes Assay für das zu isolierende Enzym erstellt werden. Für diesen Assay sollte ein Puffersystem verwendet werden, welches im von Fendert bestimmten pH-Bereich von 7,0 bis 7,5 lag. Zur Verfügung standen ein HEPES-Puffer pH 7,0 und ein Tris-HCl Puffer pH 8,8. Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die genannten Puffer in verschiedenen Mischungsverhältnissen einer

Enzymprobe und Aeroplysinin-1 zugegeben wurden. So konnte der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität beobachtet und gleichzeitig ein geeignetes Puffersystem für das zu etablierende Assay ausgewählt werden. Als günstigster pH-Wert, bei dem der größte Aeroplysinin-1 Umsatz gemessen werden konnte, wurde bei pH 7,8 ermittelt werden. Dieses Ergebnis weicht nur wenig von dem von Fendert ermittelten pH Bereich ab und kann zum Teil sicherlich Unterschieden im Assay einerseits und andererseits der Verwendung einer anderen *Aplysina*-Art und einer bereits durch differentielle Zentrifugation aufgereinigten Probe zugerechnet werden. Mit einem pH-Optimum von 7,8 liegt dieser im Bereich der bisher bekannten Nitrilhydratasen, die im Normalfall ihr Optimum zwischen pH 6,5 und 8,5 (Nagasawa, Takeuchi et al. 1991; Wieser, Takeuchi et al. 1998; Cramp and Cowan 1999) haben. Zudem liegt das pH-Optimum von pH 7,8 gleichfalls im Bereich des pH-Werts des Meerwassers (Rodolfo-Metalpa, Lombardi et al. 2010), wenn man das Tyrrhenische Meer als Beispiel nimmt. Dies ist nicht verwunderlich, da im Normalfall das pH-Optimum eines Enzyms dem pH-Wert des Kompartiments, in dem das Enzym lokalisiert ist, entspricht, bzw. in dem es seine katalytische Funktion ausübt.

Das Temperaturoptimum wurde mit einer aufgereinigten Probe aus der Größenausschlusschromatographie bestimmt und liegt bei 35 °C und unterscheidet sich damit kaum von bekannten Enzymen dieser Klasse (Asano, Fujishiro et al. 1982; Endo and Watanabe 1989; Nagasawa, Takeuchi et al. 1991; Prepechalova, Martinkova et al. 2001). Damit liegt die optimale Temperatur allerdings über den durchschnittlichen Wassertemperaturen vor Elba in einer Meerestiefe von 35 m, die laut Angaben der Meeresstation Hydra zwischen einer Tiefsttemperatur von 13 °C im Februar und einer Höchsttemperatur von 24 °C im August schwanken.

### <u>pH Stabilität</u>

Für die Durchführung der Ionenaustauschchromatographie bei verschiedenen pH Werten musste geprüft werden, in welchem pH-Bereich das Enzym stabil ist und seine Aktivität nicht dauerhaft verliert. Eine Inkubation einer Enzymprobe bei pH-Werten zwischen 2 und 9 und eine anschließende Rückführung auf pH 7,8 zeigte, dass Enzym in einem recht weiten Bereich von 4 bis 9 für mindestens einen Zeitraum von 30 min stabil ist. Die Inkubation des Enzyms unter einen pH von 4 führte zu unwiederbringlichem Aktivitätsverlust durch Denaturierung der Probe. Damit gehört das Enzym zu den NHasen mit einem recht weiten Stabilitätsbereich. Die meisten NHasen haben einen Stabilitätsbereich von pH 6 bis pH 8 133

(Nagasawa, Nanba et al. 1987; Nagasawa, Takeuchi et al. 1991; Wieser, Takeuchi et al. 1998; Cramp and Cowan 1999; Prepechalova, Martinkova et al. 2001). Selten hingegen ist ein sehr weiter Stabilitätsbereich, wie zum Beispiel bei der NHase aus *Rhodococcus sp.* Bakterienstamm YH3-3 (Kato, Tsuda et al. 1999), mit einem Bereich von pH 2,5 bis 11.

### Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass niedermolekulare Substanzen die Aktivität wiederherstellen und Mangan zu diesen Substanzen zählt, sollte die Zugabe von EDTA zu aktiven Enzymproben klären, ob es sich bei den Cosubstraten nur um mehrwertige Ionen handelt. So führte EDTA durchaus zu vollkommendem Aktivitätsverlust und bewies gleichzeitig, dass es sich bei den Cosubstraten, die durch Entsalzen, in welcher Form auch immer, entfernt werden, um mehrwertige Ionen handelt. Dieses Ergebnis entspricht auch dem, dass Fendert für die Nitrilhydratase aus *A.cauliformis* erhielt.

Weiterführend wurde nach vorheriger Inaktivierung des Enzyms mit EDTA der Einfluss eines 1,25-fachen Überschusses von Mangan, Cobalt, Eisen und Nickel gegenüber dem Komplexbildner getestet. Alle Metallionen führten zu einer Wiederherstellung der Aktivität, sodass daraus erst einmal nicht abgeleitet werden konnte, welches Metallion das natürliche Zentralatom der NHase ist. Betrachtet man die Komplexbildungskonstanten (Rauscher and Friebe 2000) der vier Metallionen mit EDTA, sieht man, dass Mangan die niedrigste Komplexbildungskonstante aufweist. Die nächsthöheren Konstanten weisen Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> in dieser Reihenfolge auf. Unter der Annahme, dass nur ein einziges Kation als Cosubstrat fugieren kann, hätte das in diesem Versuchsaufbau bedeutet, dass Mangan das natürliche Cosubstrat für die NHase ist. Das lässt sich wie folgt erklären: Das in der Probe enthaltene Mangan wird durch EDTA vollkommen komplexiert, was zur Inaktivierung des Enzyms führt. Die Zugabe von Metallionen, die eine höhere Affinität zu EDTA haben, führt zu einer Verdrängung von Mangan aus dem EDTA-Mangan-Komplex, sodass wieder genügend Mangan für die Aktivität vorhanden ist. Die Zugabe von Mangan zur inaktivierten Probe führt zu einer direkten Reaktivierung des Enzyms.

Später durchgeführte Experimente zeigten jedoch, dass nicht nur Mangan positiv auf das Enzym wirkt, sodass aus dem Experiment kein Rückschluss auf das natürliche Zentralatom gezogen werden kann.

Üblicherweise wird bei der Charakterisierung eines Enzyms der Einfluss vieler unterschiedlicher Reagenzien auf die Enzymaktivität einer aktiven Probe gemessen, so wie es auch Fendert getan hat (Fendert 2000). In dieser Arbeit wurden solche Experimente, außer mit EDTA, nicht unternommen, da aufgereinigte Proben, durch den Verlust ihrer prosthetischen Gruppe von alleine inaktiv waren.

## Einfluss verschiedener Metallionen auf die enzymatische Aktivität

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von mehrwertigen Kationen konnte bereits mit der Hemmung der Enzymaktivität durch EDTA bewiesen werden. Es sollte daraufhin der Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Aktivität einer dialysierten Probe, sowie einer aufgereinigten Probe aus der Größenausschlusschromatographie untersucht werden.

In der dialysierten Probe konnte nur Mangan die Aktivität wiederherstellen. Cobalt, Eisen und Nickel hatten in diesem Versuch keinen Einfluss. Die Aktivität der Probe aus der Größenausschlusschromatographie konnte jedoch durch Mangan, Cobalt und Nickel in absteigender Reihenfolge wiederhergestellt werden. Eisen, Zink und Kupfer hatten hier keinen Einfluss. Die geringe Aktivität der dialysierten Probe, in der die Manganzugabe nur zu einem 23 % Umsatz führte, verschleierte den positiven Einfluss von Cobalt und Nickel. Erst in der stärker aktiven Probe aus der Größenausschlusschromatographie wurde der Effekt sichtbar, wobei dieser allerdings deutlich schwächer ausfiel als bei Mangan.

Wie erwähnt, sind solche Versuche aus der Literatur mit aktiven Enzymen durchaus bekannt (Asano, Fujishiro et al. 1982; Nagasawa, Nanba et al. 1987; Nagamune, Kurata et al. 1990; Nagasawa, Takeuchi et al. 1991). Es gibt allerdings keine allgemeingültigen Regeln für die Einflüsse der einzelnen Metallsalze auf die enzymatische Aktivität. Interessanterweise wird ein positiver Einfluss von Mangan auf das Enzym ausgeschlossen (Kobayashi and Shimizu 1998). Auch in Fenderts Arbeit zur Nitrilhydratase aus *A.cauliformis* wird dem Mangan keine Bedeutung zugesprochen, was deutlich zeigt, dass sich die Nitrilhydratasen innerhalb der Gattung Aplysina deutlich voneinander unterscheiden.

## Einfluss verschiedener Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität

Neben dem Einfluss verschiedener Salze wurde auch der Effekt der Salzkonzentrationen von Mangan, Cobalt und Nickel untersucht. Der positive Effekt von Mangan war in den Versuchen limitiert und wurde bei einer Mangankonzentration von 7,5 mm erreicht. 30 mM Mangankonzentrationen im Probenvolumen führten sogar zu deutlichen Aktivitätsverlusten, die auf das Ausfällen der Proteine zurückzuführen waren. Eine Mindestkonzentration an Mangan von 30 µM wurde ermittelt, obwohl diese wahrscheinlich bei frisch aufgereinigten Proben noch niedriger liegen wird. Während Mangan in einer nicht ganz frisch aufgereinigten Probe noch bei einer Konzentratrion von 30 µM zu einer messbaren Aktivität führte, hatten Cobalt und Nickel nur noch in einer 7,5 mM Konzentration Einfluss auf das Enzym. Mangan hatte demnach den stärksten Einfluss auf das Enzym und konnte im Gegensatz zu

Cobalt und Nickel noch in mikromolaren Konzentrationen aktivitätssteigernde Eigenschaften aufweisen. Dies und die per AAS gemessenen Metallkonzentration in der S3 Fraktion, sowie den aktivitätswiederherstellenden Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie der proteinfreien Fraktion lassen darauf hindeuten, dass es sich bei der Nitrilhydratase aus *A.cavernicola* um ein manganabhängiges Enzym handelt.

# SubstratSpezifität und die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Derivate

Zehn Aeroplysinin-1 Derivate wurden als mögliche Substrate und Inhibitoren für die NHase getestet. Keine der Substanzen wurde umgesetzt. Es wurde weder eines der Substrate in einem nennenswerten Umfang vom Enzym abgebaut, noch verhinderte eines der Substrate in äquimolaren Mengen zum Aeroplysinin-1 dessen Abbau. Es konnte damit gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten NHasen um ein sehr spezifisches Enzym handelt, was im Gegensatz zu den meisten anderen NHasen aus der Literatur steht (Kobayashi, Nagasawa et al. 1992; Thomas, DiCosimo et al. 2002; Shaw, Robins et al. 2003; Wang 2005). Eine hohe Substratspezifität ist eher selten (Maier-Greiner, Obermaier-Skrobranek et al. 1991).

Die Derivate 2 und 3, die neben dem Diacetylaeroplysinin, die größte Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat aufwiesen, unterscheiden sich von Aeroplysinin-1 durch ihren aromatischen Zustand und das dadurch bedingte Fehlen der Hydroxylgruppe an Position C-1. Diacetylaeroplysinin unterscheidet sich lediglich durch die acetylierten Hydroxylfunktionen an den Positionen C-1 und C-2. Offensichtlich spielen die Hydroxylgruppen eine entscheidende Rolle bei der Hydrolyse der Nitrilseitenkette.

Fendert zeigte in seiner Arbeit, dass die Hydrolyse des Substrats nicht durch das Lösungsmittel geschieht, indem er Schweres Wasser als Reaktionsmedium verwendete und
#### Diskussion

das entstandene Produkt auf seine Masse hin untersuchte. Er konnte zeigen, dass sich die Masse des Produkts nicht um zwei Masseneinheiten vom Produkt der Kontrollreaktion in normalem Wasser unterschied, was der Fall hätte sein müssen, wenn das Wasser aus dem Reaktionsmedium für die Hydrolyse verantwortlich wäre. Daraus schloss er, dass es zu einer intramolekularen Hydrolyse unter Beteiligung der Hydroxylgruppe an C-2 kommt (Fendert 2000). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Hydroxylgruppe an C-2 und erklärt, warum eine Derivatisierung der Hydroxylgruppe dazu führt, dass das Substrat nicht mehr umgesetzt wird. Keines der getesteten Derivate zeigte im Vergleich zum antibiotisch wirksamen Aeroplysinin-1 eine antibiotische Aktivität auf, was ebenfalls auf die genannten strukturellen Unterschiede zurückzuführen ist.

#### **Kinetikmessungen**

Eine zufriedenstellende Kinetikmessung war nicht möglich, da die schlechte Löslichkeit von Aeroplysinin-1 in wässrigem Milieu dazu führte, dass es bei Konzentrationen von über 36 mM ausfiel. Somit konnten nicht genügend Daten gesammelt werden. Dies führte auch dazu, dass man leider nicht den Einfluss von Mangan, Cobalt und Nickel auf die Enzymkinetik untersuchen konnte, wodurch man einen weiteren Hinweis auf das tatsächliche Cosubstrat hätte bekommen können. Messungen die Alkaloidkonzentration betreffend zeigten, dass die 36 mM Substratkonzentration eine physiologisch vorkommende Substratkonzentration sein kann und tatsächlich relevant ist. Die für die Enzymisolierung verwendeten Schwammproben enthielten 35 mM Alkaloide (berechnet als Aerothionin) pro kg (l) Schwamm (frisch).

#### Trypsin Verdau und Massenanalyse der Nitrilhydratase

Es wurden keine Homologien mit bekannten Nitrilhydratasen für die identifizierten Bruchstücke der 72 kDa Bande gefunden. Zudem zeigten Vergleiche der für die Aminosäuresequenzen erhaltenen Ergebnisse untereinander ebenfalls keine Übereinstimmungen. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der 72 kDa Bande nicht um ein Bruchstück der gesuchten Nitrilhydratase handelt. Dann kann es auch sein, dass es sich bei der untersuchten Bande zwar um einen Teil der NHase handelt, die identifizierten Sequenzen allerdings nicht zu den konservierten Bereichen gehören. Eine dritte Möglichkeit ist die, dass die Nitrilhydratase des Schwammes vollkommen anders aufgebaut ist als die gut untersuchten bakteriellen NHasen.

#### Ökologische Funktion der Nitrilhydratase

Bisher isolierte Nitrilhydratasen haben in der Natur im Zusammenspiel mit der Amidase die Funktion der Stickstoffversorgung von Mikroorganismen (Nagasawa and Yamada 1989; Hjort, Godtfredsen et al. 1990; Kobayashi, Yanaka et al. 1992; Martinkova and Kren 2002; Shaw, Robins et al. 2003). Die in dieser Arbeit untersuchte Nitrilhydratase hat, wie durch Teeyapant (Teeyapant and Proksch 1993), Ebel (Ebel, Brenzinger et al. 1997) und Thoms (Thoms, Ebel et al. 2006) vermutet und aufgezeigt wurde, eine wichtige Rolle im Sekundärmetabolismus als ein Bestandteil der Enzymkaskade, welche die genuin enthaltenen Isoxazolinalkaloide in antibiotische und zytotoxische Produkte (Teeyapant, Woerdenbag et al. 1993; Weiss, Ebel et al. 1996) umwandelt. Somit ist die untersuchte Nitrilhydratase aus *Aplysina cavernicola* die erste isolierte und charakterisierte NHase mit einer anderen Funktion als dem Primärmetabolismus.

Die Herkunft der Nitrilhydratase ist allerdings nicht geklärt. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Nitrilhydratase ein schwammeigenes Enzym ist. Immerhin wurden Gene für NHasen in den nächsten Verwandten mehrzelliger Tiere, den Kragengeißeltierchen, gefunden (Foerstner, Doerks et al. 2008). Allerdings ist die NHase ein Enzym, welches hauptsächlich aus Bakterien bekannt ist. Da Bakterien als Schwammsymbionten bekannt sind und bis zu 40 % der Schwammasse ausmachen können (Vacelet 1975; Vacelet and Donadey 1977), besteht auch die Möglichkeit, dass die NHase aus Bakterien stammt. Dagegen spricht allerdings, dass bisher keine Hinweise auf eine Amidaseaktivität in *A.cavernicola* gefunden wurden, da bis jetzt noch nie die korrespondierende Säure zum Dienonamid isoliert wurde. Bekanntlich treten Nitrilhydratasen in Bakterien ausschließlich zusammen mit Amidasen auf.

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nitrilhydratase aus dem Schwamm *Aplysina cavernicola* untersucht. Zusammen mit dem Isoxazolin-spaltenden Enzym bildet es die Grundlage für den enzymatischen Verteidigungsmechanismus der Schwammgattung *Aplysina*. Bei einer Gewebsverletzung werden genuin enthaltene fraßhemmende Alkaloide, wie Aerothionin, in einem ersten Schritt zu Aeroplysinin-1 und in einem zweiten Schritt durch die Nitrilhydratase zu einem Säureamid abgebaut. Die Produkte dieser Reaktionen zeigen starke antimikrobielle Eigenschaften gegen marine Mikroorganismen und schützen den Schwamm, bzw. das verletzte und offenliegende Gewebe vor einem schädigenden Befall durch Mikroorganismen.

Es sind bis heute keine Nitrilhydratasen aus Tieren isoliert worden, sodass das Ziel dieser Arbeit darin lag, erstmals ein solches Enzym aus einem Schwamm zu isolieren und zu charakterisieren.

Es wurde ein Reinigungsprotokoll für die NHase aus *A. cavernicola* bestehend aus der differentiellen Zentrifugation, Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie erarbeitet. Eine Kombination aus unterschiedlichen gelelektrophoretischen Methoden und eines Aktivitätsassays im Gel zeigte das Vorhandensein von mindestens zwei Nitrilhydratasen unterschiedlicher molekularer Größe auf. Eine SDS-PAGE aufgereinigter Proben ließ vermuten, dass eine Untereinheit des Enzyms eine Größe von ungefähr 72 kDa aufwies. In-Gel Trypsinverdau und anschließende Massenanalyse konnten für dieses Peptid allerdings keine Übereinstimmungen mit bekannten Nitrilhydratasen finden.

Das Enzym hatte seine pH und Temperaturoptima bei pH 7,8 und 35 °C. In entsalzter Form war es inaktiv und konnte erst durch Zugabe von Mangan-, Nickel- oder Cobaltsalzen wieder aktiviert werden, wobei Mangan die stärkste Wirkung aufwies und im Vergleich mit Nickel und Cobalt über einen breiteren Konzentrationsbereich hinweg seine positive Wirkung behielt. Mittels spektroskopischer Messungen des Enzymextrakts wurden die Gehälter von Mangan, Cobalt und Nickel bestimmt, wobei Mangan den höchsten Gehalt aufwies, gefolgt von Nickel und Cobalt. Dies und der Manganeinfluss auf die Enzymaktivität führten zu der Hypothese, dass es sich bei der Nitrilhydratase um ein manganabhängiges Enzym handelt.

Untersuchungen zur SubstratSpezifität ergaben, dass das Enzym seinem natürlichen Substrat Aeroplysinin-1 gegenüber äußerst spezifisch ist, da keines der synthetisierten Derivate abgebaut wurde. Außerdem besaßen die Derivate weder eine inhibierende Wirkung auf das Enzym, noch zeigten sie eine antibiotische Wirkung. Enzymkinetische Untersuchungen lieferten keine Ergebnisse, da die Löslichkeit von Aeroplysinin-1 verhinderte, dass eine ausreichende Datenmenge für eine Michaelis-Menten Kinetik gesammelt werden konnte.

#### **Summary**

In this thesis we investigated a nitrile hydratase from the sponge *Aplysina cavernicola*. It forms together with isoxazolin-cleaving enzyme the basis of the enzymatic defence mechanism of the sponge genus *Aplysina*. Upon tissue wounding, fish deterring alkaloids, such as aerothionin, are enzymatically cleaved and lead to aeroplysinin-1 in a first step and in second step aeroplysinin-1 is transformed to a dienone amide by the nitrile hydratase. The products of these reactions show strong antibiotic properties against marine microorganisms and protect the sponge or rather the injured and exposed tissue from those microorganisms.

Up to date there are no reports of isolated nitrile hydratases from animals, so the objective of this work was to isolate and characterize such an enzyme from a sponge.

A purification protocol for the NHase from *A.cavernicola* was developed consisting of differential centrifugation, ammonium sulphate precipitation, anion exchange chromatography and size exclusion chromatography. A combination of different electrophoretic methods and an *in gel* activity assay revealed the presence of at least two nitrile hyratases with differing molecular sizes. SDS-PAGE of purified samples suggested that one subunit of the enzyme had a size of approximately 72 kDa. *In gel* trypsin digestion and subsequent mass analysis of that peptide did not show any homologies with known nitrile hydratases.

The enzyme had its pH and temperature optimum at pH 7.8 and 35 °C. In its desalted form the enzyme was inactive and only the addition of manganese, nickel or cobalt restored the enzyme activity. Manganese had the strongest effect compared to nickel and cobalt and restored the enzyme activity within a wide range of concentration of cosubstrates. Spectroscopic measurements of the enzyme extract determined the concentration of manganese, cobalt and nickel. Manganese had the highest concentration followed by nickel and cobalt. This and the influence of manganese on the enzymatic activity led to the hypothesis that the nitrile hydratase is manganese-dependent.

#### Zusammenfassung

Studies on the substrate specificity revealed that the enzyme has a high affinity towards its natural substrate aeroplysinin-1, since none of synthesized derivatives was converted. The derivatives also possessed neither an inhibitory effect on the enzyme, nor antibiotic activities. Enzyme kinetics did not give satisfactory results. Because of the low solubility of the substrate there were not sufficient data for a complete Michaelis-Menten kinetics.

## Referenzen

- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, et al. (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." J Eukaryot Microbiol 52(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 399-451.
- Andersen, R. J. and D. J. Faulkner (1975). "Synthesis of aeroplysinin-1 and related compounds." J. Am. Chem. Soc. 97(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 936-937.
- Araujo, M. F., A. Conceicao, et al. (2003). "Elemental composition of marine sponges from the Berlengas natural park, western Portuguese coast." <u>X-Ray Spectrom.</u> 32(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 428-433.
- Asano, Y., K. Fujishiro, et al. (1982). "Microbial degradation of nitrile compounds. Part V. Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter sp.* J-1. Purification and characterization." <u>Agric. Biol. Chem.</u> 46(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1165-1174.
- Asano, Y., Y. Tani, et al. (1980). "A new enzyme "nitrile hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase." <u>Agric. Biol. Chem.</u> 44(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2251-2252.
- Asano, Y., T. Yasuda, et al. (1982). "Microbial degradation of nitrile compounds. Part VII. A new enzymic method of acrylamide production." <u>Agric. Biol. Chem.</u> 46(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1183-1189.
- Butler, M. S. (2004). "The role of natural product chemistry in drug discovery." J Nat Prod **67**(12): 2141-2153.
- Ciminiello, P., V. Costantino, et al. (1994). "Chemistry of verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis* forma fulva." J. Nat. Prod. 57(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 705-712.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, et al. (2001). "Chemistry of verongida sponges, XI. Archerine, a novel anti-histaminic bromotyrosine-derived compound from the Caribbean marine sponge *Aplysina archeri*." <u>Eur. J. Org. Chem.(Copyright (C) 2012</u> American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 55-60.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, et al. (1996). "Chemistry of Verongida sponges. VII. Bromo compounds from the Caribbean sponge *Aplysina archeri*." <u>Tetrahedron</u> 52(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 9863-9868.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, et al. (1999). "Chemistry of Verongida Sponges.
   9.Secondary Metabolite Composition of the Caribbean Sponge *Aplysina cauliformis*."
   <u>J. Nat. Prod.</u> 62(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 590-593.
- Ciminiello, P., E. Fattorusso, et al. (1997). "Chemistry of verongida sponges. VIII. Bromo compounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*." <u>Tetrahedron</u> 53(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 6565-6572.
- Cimino, G., R. S. De, et al. (1984). "The zoochrome of the sponge *Verongia aerophoba* ("uranidine")." <u>Tetrahedron Lett.</u> **25**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2925-2928.
- Cragg, G. M. and D. J. Newman (2005). "Biodiversity: a continuing source of novel drug leads." <u>Pure Appl. Chem.</u> 77(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 7-24.
- Cramp, R. A. and D. A. Cowan (1999). "Molecular characterisation of a novel thermophilic nitrile hydratase." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1431(1): 249-260.

- Derwick, P. M. (2009). "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Third Edition. By Paul M. Dewick." John Wiley and Son: West Sussex, UK(Copyright (C) 2009 John Wiley and Son: West Sussex. All Rights Reserved.): 550.
- Dias, D. A., S. Urban, et al. (2012). "A historical overview of natural products in drug discovery." <u>Metabolites</u> 2(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 303-336.
- DiGeronimo, M. J. and A. D. Antoine (1976). "Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21." <u>Appl. Environ. Microbiol.</u> **31**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 900-906.
- Ebel, R. (1998). Wundinduzierte Biotransformation bromierter Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina*: Biochemische Charakterisierung und ökologische Bedeutung. <u>Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Würzburg</u>.
- Ebel, R., M. Brenzinger, et al. (1997). "Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba.*" J. Chem. Ecol. 23(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1451-1462.
- Ebel, R., A. Marin, et al. (1999). "Organ-specific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*." <u>Biochem. Syst. Ecol.</u> 27(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 769-777.
- Endo, T. and I. Watanabe (1989). "Nitrile hydratase of *Rhodococcus sp.* N-774. Purification and amino acid sequences." <u>FEBS Lett.</u> 243(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 61-64.
- Farkas, L., A. Gottsegen, et al. (1971). "Synthesis of the natural isoflavanones ferreirin, dalbergioidin, and ougenin." <u>J. Chem. Soc. C</u>(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1994-2000.
- Fendert, T. (2000). Charakterisierung der enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung Aplysina und Isolierung von Bromotyrosinalkaloiden aus Aplysina insularis. Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Würzburg.
- Foerstner, K. U., T. Doerks, et al. (2008). "A nitrile hydratase in the eukaryote *Monosiga brevicollis*." <u>PLoS One</u> **3**(12): e3976.
- Fukuda, Y., M. Fukui, et al. (1971). "Formation of α-amino acids from α-aminonitrile by cell suspensions of a strain of corynebacterium." <u>Hakko Kogaku Zasshi</u> 49(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1011-1016.
- Fusetani, N. (2011). "Antifouling marine natural products." <u>Nat. Prod. Rep.</u> 28(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 400-410.
- Gerwick, W. H. and B. S. Moore (2012). "Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology." <u>Chem. Biol.</u> (Oxford, U. K.) 19(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 85-98.
- Hay, M. E. (2009). "Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems." <u>Ann Rev Mar Sci</u> 1(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 193-212.
- Hay, M. E., J. E. Duffy, et al. (1990). "Host-Plant Specialization Decreases Predation on a Marine Amphipod - an Herbivore in Plants Clothing." <u>Ecology</u> 71(2): 733-743.
- Hay, M. E. and W. Fenical (1988). "Marine Plant-Herbivore Interactions the Ecology of Chemical Defense." <u>Annual Review of Ecology and Systematics</u> 19: 111-145.
- Hjort, C. M., S. E. Godtfredsen, et al. (1990). "Isolation and characterization of a nitrile hydratase from a *Rhodococcus sp.*" J. Chem. Technol. Biotechnol. 48(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 217-226.
- Huang, W., J. Jia, et al. (1997). "Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron center in a novel fold." <u>Structure (London)</u> 5(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 691-699.

- Iriti, M. and F. Faoro (2009). "Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution." <u>Int. J. Mol. Sci.</u> 10(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 3371-3399.
- Kato, Y., T. Tsuda, et al. (1999). "Nitrile hydratase involved in aldoxime metabolism from *Rhodococcus sp.* strain YH3-3. Purification and characterization." <u>Eur. J. Biochem.</u> 263(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 662-670.
- Kobayashi, M., T. Nagasawa, et al. (1992). "Enzymic synthesis of acrylamide: a success story not yet over." <u>Trends Biotechnol.</u> 10(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 402-408.
- Kobayashi, M., M. Nishiyama, et al. (1991). "Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous J1*." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1129**(1): 23-33.
- Kobayashi, M. and S. Shimizu (1998). "Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology." <u>Nat Biotechnol</u> **16**(8): 733-736.
- Kobayashi, M. and S. Shimizu (2000). "Nitrile hydrolases." <u>Curr. Opin. Chem. Biol.</u> 4(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 95-102.
- Kobayashi, M., N. Yanaka, et al. (1992). "Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue." <u>Biochemistry</u> **31**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 9000-9007.
- Lee, S.-S. and M.-J. Su (2007). Aporphine and oxoaporphine compounds and pharmaceutical use thereof, Lotus Pharmaceutical Co., Ltd., Peop. Rep. China . 48pp.
- Mahadevan, S. and K. V. Thimann (1964). "NITRILASE. II. SUBSTRATE SPECIFICITY AND POSSIBLE MODE OF ACTION." <u>Arch Biochem Biophys</u> 107(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 62-68.
- Maier-Greiner, U. H., B. M. Obermaier-Skrobranek, et al. (1991). "Isolation and properties of a nitrile hydratase from the soil fungus *Myrothecium verrucaria* that is highly specific for the fertilizer cyanamide and cloning of its gene." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 88(10): 4260-4264.
- Manfra, L. and A. Accornero (2005). "Trace metal concentrations in coastal marine waters of the central Mediterranean." <u>Mar Pollut Bull</u> **50**(6): 686-692.
- Marron, A. O., M. Akam, et al. (2012). "Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups." <u>PLoS One</u> 7(4): e32867.
- Martinkova, L. and V. Kren (2002). "Nitrile- and amide-converting microbial enzymes: Stereo-, regio- and chemoselectivity." <u>Biocatal. Biotransform.</u> **20**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 73-93.
- Morley, N. H., J. D. Burton, et al. (1997). "Distribution and behavior of some dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea." <u>Deep-Sea Res., Part II</u> 44(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 675-691.
- Nagamune, T., H. Kurata, et al. (1990). "Purification of inactivated photoresponsive nitrile hydratase." <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> 168(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 437-442.
- Nagasawa, T., H. Nanba, et al. (1987). "Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization." <u>Eur. J. Biochem.</u> 162(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 691-698.
- Nagasawa, T., K. Takeuchi, et al. (1991). "Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1." <u>Eur. J.</u> <u>Biochem.</u> 196(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 581-589.

- Nagasawa, T. and H. Yamada (1989). "Microbial transformations of nitriles." <u>Trends</u> <u>Biotechnol.</u> 7(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 153-158.
- Nojiri, M., H. Nakayama, et al. (2000). "Cobalt-substituted Fe-type nitrile hydratase of *Rhodococcus sp.* N-771." <u>FEBS Lett.</u> 465(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 173-177.
- Okamoto, S. and L. D. Eltis (2007). "Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus sp.* RHA1." <u>Mol. Microbiol.</u> **65**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 828-838.
- Padovan, A., N. Munksgaard, et al. (2012). "Trace metal concentrations in the tropical sponge Spheciospongia vagabunda at a sewage outfall: synchrotron X-ray imaging reveals the micron-scale distribution of accumulated metals." <u>Hydrobiologia</u> 687(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 275-288.
- Paul, V. J. and A. K. L. Van (1992). "Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda spp.*" J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 160(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 191-203.
- Pawlik, J. R., B. Chanas, et al. (1995). "Defenses of Caribbean Sponges against Predatory Reef Fish .1. Chemical Deterrency." <u>Marine Ecology-Progress Series</u> 127(1-3): 183-194.
- Payne, M. S., S. Wu, et al. (1997). "A Stereoselective Cobalt-Containing Nitrile Hydratase." <u>Biochemistry</u> 36(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 5447-5454.
- Perez, T., D. Longet, et al. (2005). "Effects of 12 years' operation of a sewage treatment plant on trace metal occurrence within a Mediterranean commercial sponge (*Spongia officinalis*, Demospongiae)." <u>Mar. Pollut. Bull.</u> 50(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 301-309.
- Prasad, S. and T. C. Bhalla (2010). "Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry." <u>Biotechnol. Adv.</u> 28(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 725-741.
- Prepechalova, I., L. Martinkova, et al. (2001). "Purification and characterization of the enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4." <u>Appl. Microbiol.</u> <u>Biotechnol.</u> 55(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 150-156.
- Proksch, P., A. Putz, et al. (2010). "Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes." <u>Phytochem. Rev.</u> 9(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 475-489.
- Putz, A. (2009). Secondary metabolites from marine sponges, with focus on the chemical ecology and biochemical characterisation of the stress induced biotransformation of *Aplysina* alkaloids. <u>Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Düsseldorf</u>, Düsseldorf.
- Puyana, M., W. Fenical, et al. (2003). "Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean?" <u>Mar. Ecol.: Prog. Ser.</u> 246(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 127-135.
- Rauscher, K. and R. Friebe (2000). <u>Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische</u> <u>Praxis</u>, Deutsch.
- Rodolfo-Metalpa, R., C. Lombardi, et al. (2010). "Effects of ocean acidification and high temperatures on the bryozoan Myriapora truncata at natural CO2 vents." <u>Mar. Ecol.</u> <u>(Berlin, Ger.)</u> 31(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 447-456.
- Rzeznicka, K., S. Schaetzle, et al. (2010). "Cloning and functional expression of a nitrile hydratase (NHase) from Rhodococcus equi TG328-2 in *Escherichia coli*, its

purification and biochemical characterisation." <u>Appl. Microbiol. Biotechnol.</u> **85**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1417-1425.

- Shaw, N. M., K. T. Robins, et al. (2003). "Lonza: 20 years of biotransformations." <u>Adv.</u> <u>Synth. Catal.</u> 345(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 425-435.
- Song, L., H.-J. Yuan, et al. (2008). "Efficient expression in E. coli of an enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis*." <u>Biotechnol. Lett.</u> **30**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 755-762.
- Teeyapant, R. (1994). Brominated secondary metabolites of the marine sponge *Verongia aerophoba* Schmidt and the sponge feeding gastropod *Tylodina perversa* Gmelin: Identification, biological activities, and biotransformation. <u>Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Würzburg</u>.
- Teeyapant, R. and P. Proksch (1993). "Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge Verongia aerophoba - evidence for an induced chemical defense?" <u>Naturwissenschaften</u> 80(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 369-370.
- Teeyapant, R., H. J. Woerdenbag, et al. (1993). "Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*." <u>Z Naturforsch</u> <u>C</u> 48(11-12): 939-945.
- Thimann, K. V. and S. Mahadevan (1964). "NITRILASE. I. OCCURRENCE, PREPARATION, AND GENERAL PROPERTIES OF THE ENZYME." <u>Arch Biochem Biophys</u> 105(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 133-141.
- Thomas, S. M., R. DiCosimo, et al. (2002). "Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry." <u>Trends Biotechnol.</u> 20(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 238-242.
- Thoms, C., R. Ebel, et al. (2003). "Sequestration of dietary alkaloids by the spongivorous marine mollusc *Tylodina perversa*." <u>Z Naturforsch C</u> **58**(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 426-432.
- Thoms, C., R. Ebel, et al. (2006). "Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited." <u>J. Chem. Ecol.</u> **32**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 97-123.
- Thoms, C., M. Wolff, et al. (2004). "Chemical defense of Mediterranean sponges Aplysina cavernicola and Aplysina aerophoba." <u>Z. Naturforsch., C: J. Biosci.</u> 59(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 113-122.
- Vacelet, J. (1975). "Electron-Microscope Study of Association between Bacteria and Sponges of Genus Verongia (Dictyoceratida)." Journal De Microscopie Et De Biologie <u>Cellulaire</u> 23(3): 271-&.
- Vacelet, J. and C. Donadey (1977). "Electron-Microscope Study of Association between Some Sponges and Bacteria." <u>Journal of Experimental Marine Biology</u> and Ecology 30(3): 301-314.
- van, P. S., S. Quignard, et al. (2008). "Nitrile hydratase CLEAs: The immobilization and stabilization of an industrially important enzyme." <u>Green Chem.</u> 10(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 395-400.
- Wang, M.-X. (2005). "Enantioselective biotransformations of nitriles in organic synthesis." <u>Top. Catal.</u> 35(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 117-130.
- Weiss, B., R. Ebel, et al. (1996). "Defense metabolites from the marine sponge Verongia aerophoba." <u>Biochem. Syst. Ecol.</u> 24(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1-12.

- Wieser, M., K. Takeuchi, et al. (1998). "Low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1: purification, substrate specificity and comparison with the analogous high-molecular-mass enzyme." <u>FEMS Microbiol. Lett.</u> 169(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 17-22.
- Wilkinson, C. (1979). "Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **37**: 91-104.
- Zagrobelny, M., S. Bak, et al. (2008). "Cyanogenesis in plants and arthropods." <u>Phytochemistry</u> 69(7): 1457-1468.

## Anhang



Abbildung A 1: 1H-NMR von 2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril in Aceton-d<sub>6</sub>



Abbildung A 2: EI-MS von 2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril

#### 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril



Abbildung A 3: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril in Methaol-d<sub>4</sub>



Abbildung A 4: ESI-MS von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril





Abbildung A 5: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-acetyl-4-methoxyphenylacetonitril in Methanol-d<sub>4</sub>



Abbildung A 6: EI-MS von 3,5-Dibromo-2-acetyl-4-methoxyphenylacetonitril

## 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetonitril



Abbildung A 7: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetonitril in Dichlormethan-d<sub>2</sub>



Abbildung A 8: EI-MS von 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetonitril





Abbildung A 9: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäure in Aceton-d<sub>6</sub>



Abbildung A 10: ESI-MS von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäure

## 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester



Abbildung A 11: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester in Dichlormethan-d<sub>2</sub>



Abbildung A 12: HMBC von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester in Dichlormethan-d<sub>2</sub>



Abbildung A 13: EI-MS von 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzoesäuremethylester

## 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester



Abbildung A 14: 1H-NMR von 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester in DMSO-d<sub>6</sub>



Abbildung A 15: HMBC von 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester in DMSO-d<sub>6</sub>



Abbildung A 16: ESI-MS von 3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxybenzoesäuremethylester

#### 2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-oxoacetaldehyd-O-methyloxim



Abbildung A 17: 1H-NMR von 2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-oxoacetaldehyd-O-methyloxim in DMSO-d\_6



Abbildung A 18: ESI-MS von 2-(3,5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxypehyl)-2-oxoacetaldehyd-O-methyloxim

## 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion



Abbildung A 19: 1H-NMR von 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion in Methanol-d<sub>4</sub>

Anhang



Abbildung A 20: HMBC von 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion in Methanol-d<sub>4</sub>



Abbildung A 21: EI-MS von 6,8-Dibromo-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3,4(2H)-dion

#### **Diacetylaeroplysinin**



Abbildung A 22: 1H-NMR von Diacetylaeroplysinin in Chloroform-d<sub>1</sub>



bartosz087 #1032-1049 RT: 28.07-28.46 AV: 5 NL: 3.32E8

Abbildung A 23: ESI-MS von Diacetylaeroplysinin

## Ergebnisse der NCBI/blastp Suche nach homologen Sequenzen des 72 kDa Proteins

Internetseite: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins (Datum 20.11.2012)

## Sequenzsuche für: LSSEFGFK

		environment				inks		U		U	U	U	U	U	U	C	U	U	U	M		U	U	U	E
		t+PIR+PRF excluding				<u>Max ident</u>	100%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	100%	100%	88%	100%	100%	100%	1900
		s+PDB+SwissPro				E value	34	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	281	299	300	301	302	302	0
		GenBank CDS translation 5 projects Citation				Query coverage	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87%	87%	100%	87%	87%	87%	
	티민	nr All non-redundant samples from WG BLASTP 2.2.27+ b				<u>Total score</u>	27.8	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	
	new enhanced repo	Database Name Description Program				<u>Max score</u>	27.8	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	
rs were adjusted to search for a short input sequence.	Search Strategies P Formatting options. P Download View these results in the View the View these results in the View these results in the View the View the View these results in the View these results in the View these results in the View the	366 . acid	h Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]	esources: 🚺 UniGene 🖻 GEO 🖸 Gene 🗟 Structure 🕅 Map Viewer 📓 PubChem BioAssay	ing significant alignments:	Description	Fmu (Sun) domain protein [Mucilaginibacter paludis DSM 18603] >gb EHQ25637.1  Fmu	hypothetical protein ST1102 [Sulfolobus tokodaii str. 7]	alpha-amylase [Sulfolobus tokodaii str. 7]	hypothetical protein SSO1172 [Sulfolobus solfataricus P2] >ref ZP_06389092.1  hypoth	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus HVE10/4] >gb ADX82369.1  gl	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus L.D.8.5] >gb ADB86853.1  glyc	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus M.16.4] >gb ACR41656.1  glyc	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus M.16.27] >gb ACP55018.1  gly	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus Y.G.57.14] >gb ACP45325.1  ç	glycoside hydrolase [Sulfolobus islandicus M.14.25] >gb ACP37825.1] glycoside hydrolz	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus L.S.2.15] >gb ACP35174.1  gly	glycoside hydrolase family protein [Sulfolobus islandicus Y.N.15.51] >gb ACP48878.1  ç	hypothetical protein Toce_0371 [Thermosediminibacter oceani DSM 16646] >gb ADL07	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens] >gb EDQ53001.1  predicted pr	hypothetical protein EMP_01262 [Thermotoga sp. EMP] >gb EJX26861.1  hypothetical	PREDICTED: ret finger protein-like 4A-like [Felis catus]	squalene-associated FAD-dependent desaturase [Gallionella capsiferriformans ES-2] >g	efflux pump protein [Clostridium kluyveri DSM 555] >ref YP_002473002.1  hypothetical	
our search parameters	and Resubmit Save S in Sequence (8 let	Query ID Ic  758 Description None olecule type amino a uery Length 8	her reports: > <u>Search</u> iphic Summary	end for links to other re.	Sequences producir	Accession	ZP 09613100.1	NP 377026.1	BAK54457.1	NP 342630.1	YP 005645583.1	YP 003419223.1	YP 002914324.1	YP 002843063.1	YP 002837247.1	YP 002829123.1	YP 002831819.1	YP 002840800.1	YP 003824775.1	XP 001782178.1	ZP 10918679.1	XP 003997457.1	YP 003847510.1	YP 001396233.1	

BLAST/ blastp suite/ Form	atting Results - APSC4CWA01R						
ir search paramete	s were adjusted to search for a short input sequence.						
nd Resubmit Save	Search Strategies > Formatting options > Download View these results in the Vou Much Learn about	e new enhanced rel ut the enhanced reg	<u>oort</u>				
n Sequence (7 le	tters)						
Query ID  d 33: Description None lecule type amino ery Length 7	63 acid	Database Nam Descriptio Progra	e nr n All non-redundar samples from WC n BLASTP 2.2.27+	tt GenBank CDS transla 55 projects • <u>Citation</u>	tions+PDB+SwissP	rot+PIR+PRF exclud	ng environmental
er reports:	I Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]						
phic Summary criptions							
end for links to other n	isources: 🚺 UniGene 🖬 GEO 🖬 Gene 🗟 Structure 🕅 Map Viewer 述 PubChem BioAssay						
Sequences produci	ng significant alignments:						
Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	Query coverage	🛆 E value	<u>Max ident</u>	Links
YP 781622.1	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase [Rhodopseudomonas palustris BisA53] >sp	26.1	26.1	100%	102	100%	U
ZP 10872447.1	ribose operon repressor [Sphingomonas sp. LH128] >gb EJU13374.1  ribose operon rep	26.1	26.1	100%	105	100%	
ZP 09959588.1	threonine synthase [Sphingomonas elodea ATCC 31461]	26.1	26.1	100%	107	100%	
YP 004808771.1	DNA mismatch repair protein mutS [halophilic archaeon DL31] >gb AEN06398.1  DNA m	26.1	26.1	100%	109	100%	U
XP 003713383.1	hypothetical protein MGG_10480 [Magnaporthe oryzae 70-15] >gb EHA53576.1  hypot	26.1	26.1	100%	109	100%	U
ZP 06912573.1	conserved hypothetical protein [Streptomyces pristinaespiralis ATCC 25486] >gb EDY6	24.0	24.0	100%	492	86%	
EKN16330.1	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit [Parabacteroides johnsonii CL02T12	24.0	24.0	100%	509	86%	
ZP 03478621.1	hypothetical protein PRABACTJOHN_04331 [Parabacteroides johnsonii DSM 18315] >gb	24.0	24.0	100%	510	86%	
EJK52873.1	hypothetical protein THAOC_27801 [Thalassiosira oceanica]	24.0	24.0	100%	513	86%	
YP 006245066.1	serine/threonine protein kinase [Streptomyces hygroscopicus subsp. jinggangensis 500	24.0	24.0	100%	519	86%	U
YP 003121367.1	phosphosulfolactate synthase [Chitinophaga pinensis DSM 2588] >gb ACU59166.1  Pho	23.5	23.5	100%	674	86%	U
YP 005010362.1	phosphosulfolactate synthase [Niastella koreensis GR20-10] >gb AEW00959.1  phosph	23.5	23.5	100%	675	86%	U
EKD92123.1	hypothetical protein ACD_29C00169G0001 [uncultured bacterium]	23.5	23.5	100%	677	86%	
AFV98200.1	formylmethionine deformylase [uncultured Sulfuricurvum sp. RIFRC-1]	23.5	23.5	100%	677	86%	
ABY65995.1	unknown [Actinomadura madurae]	23.5	23.5	100%	684	86%	
YP 006573931.1	hypothetical protein PGA1_c25290 [Phaeobacter gallaeciensis DSM 17395] >gb AF0922	23.5	23.5	100%	686	86%	U
YP 006563562.1	hypothetical protein PGA2_c23280 [Phaeobacter gallaeciensis 2.10] >gb AFO88317.1	23.5	23.5	100%	686	86%	U
YP 004150836.1	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase [Thermovibrio ammonificans HB-1] >gb ADU	23.5	23.5	100%	691	86%	٥

# Sequenzsuche für: FVTPDLR

				<i>i</i> ironmen				S																		
				cluding env				Link		G		U	G	G		U		U					U		U	
				ot+PIR+PRF ex				<u>Max ident</u>	100%	%68	%68	100%	100%	100%	%68	100%	89%	82%	82%	%68	%68	80%	20%	20%	75%	89%
				ions+PDB+SwissPr				🛆 E value	8.7	17	23	23	23	23	23	23	23	28	30	30	31	42	42	42	42	47
				tt GenBank CDS translati 35 projects • <u>Citation</u>				Query coverage	80%	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	%06	100%	100%	100%	100%	%06
		<u>ort</u>		e nr n All non-redundar samples from W( n BLASTP 2.2.27+				Total score	29.9	28.6	28.6	46.2	46.2	46.2	28.6	46.2	28.6	28.2	28.2	28.2	28.2	27.8	27.8	27.8	27.8	27.4
		new enhanced rep t the enhanced rep		Database Nam Descriptio Progran				Max score	29.9	<u>28.6</u>	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.2	28.2	28.2	28.2	27.8	27.8	27.8	27.8	27.4
natting Results - APSN1RNV014	ers were adjusted to search for a short input sequence.	Search Strategies      P Formatting options      P Download     View these results in the     You (1010) Learn about	letters)	867 D acid	ch Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]	resources: 🚺 UniGene 🖬 GEO 🖸 Gene S Structure 🔟 Map Viewer 🜌 PubChem BioAssay	ing significant alignments:	Description	hypothetical protein PMI01_02915 [Caulobacter sp. AP07] >gb EJL31106.1  hypothetic	hypothetical protein Pvag_3700 [Pantoea vagans C9-1] >gb AD011816.1  hypothetica	Beta-N-acetylhexosaminidase [Pantoea sp. aB] >gb EFM20243.1  Beta-N-acetylhexos:	beta-N-acetylhexosaminidase [Pantoea ananatis LMG 5342] >emb CCF11218.1  beta-N	beta-hexosaminidase NahA [Pantoea ananatis PA13] >gb AER34192.1  beta-hexosamin	beta-hexosaminidase precursor NahA [Pantoea ananatis AJ13355] >dbj BAK13702.1  b	beta-N-acetylhexosaminidase [Pantoea agglomerans IG1]	NahA [Pantoea ananatis LMG 20103] >gb ADD75642.1  NahA [Pantoea ananatis LMG 2	beta-N-acetylhexosaminidase [Pantoea sp. SL1_M5]	hypothetical protein HNE_1887 [Hyphomonas neptunium ATCC 15444] >gb ABI76700.1	ABC-type proline/glycine betaine transport system, permease component [Thiorhodovit	oxidoreductase [Sinorhizobium meliloti CCNWSX0020] >gb EHK75789.1  oxidoreductase	hypothetical protein THAOC_31870 [Thalassiosira oceanica]	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	hypothetical protein NECHADRAFT_37691 [Nectria haematococca mpVI 77-13-4] >gb E	hypothetical protein FPSE_01138 [Fusarium pseudograminearum CS3096]	ImcF-related family [Vibrio sp. Ex25] >ref YP_003287588.1  IcmF-related protein [Vibri	transposon protein, putative, unclassified [Oryza sativa Japonica Group]
BI/ BLAST/ blastp suite/ Form:	<ol> <li>Your search parameter</li> </ol>	Edit and Resubmit Save Save	Protein Sequence (10 l	Query ID Id 298 Description None Molecule type amino Query Length 10	Other reports: <a>Search</a> <a>E</a> <a>E</a> <a>Craphic Summary</a> <a>Descriptions</a>	Legend for links to other re	Sequences produci	Accession	ZP 10751828.1	YP 003933265.1	ZP 07378249.1	YP 005197255.1	YP 005994412.1	YP 005936498.1	ZP 10225299.1	YP 003518770.1	ZP 09511472.1	YP 760588.1	ZP 09868018.1	ZP 12976331.1	EJK49274.1	CAF97809.1	XP 003051510.1	EKJ78650.1	ZP 04921120.1	<u>ABA97748.1</u>

# Sequenzsuche für: WDETVVALVR

uiter Formatting Results - AFSTANETOIS anameters were adjusted to search for a short input sequence.  If Save Sarech Strategies P Formatting option Pownload If Save Sarech Strategies P formatting option II II Pownload If I Save Sarech Strategies P for Pownload If I Save Sarech Strategies P for Pownload If I Save Save Save Save Save P Publichem BioAssay If I Save Save Save Save Save Save P Publichem BioAssay If I Save Save Save Save Save Save P Publichem BioAssay If I Save Save Save Save Save Save Save P Publichem BioAssay If I Save Save Save Save Save P Pacing P 11 If Pacing Pacing P Pacing P 12 If Pacing P Pacing P Pacing P 12 If Pacing P Pacing P 22 If Pacing P Pacing P 22 If Pacing P Pacing P 22 If Pacing P Pacing P					1-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental es from WGS projects P 2.2.27+ P <u>Citation</u>					score Query coverage 🛆 E value Max ident Links	1.1 73% 0.56 82%	1.1 86% 0.58 73%	3.7 73% 0.76 82%	3.7 73% 0.76 82%	3.7 73% 0.76 82%	3.7 73% 0.76 82%	3.3 73% 1.0 77%	3.3 66% 1.0 90% G	3.3         66%         1.0         90%	3.3 66% 1.0 90%	3.3 66% 1.0 90%	3.3 66% 1.0 90%	3.3 66% 1.0 90%	0.3         66%         1.0         90%	2.0 73% 2.7 77% UGM	0.0 100% 2.8 67% GM	1.2 73% 5.0 73%	1.2 73% 5.0 73%	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	suite/Formatting Results - APSTAN5Y015	parameters were adjusted to search for a short input sequence.	mit Save Search Strategies P Formatting options. P Download View these results in the new enhanced report You (http://eam about the enhanced report	ance (15 letters)	ID     Icl     Icl <th>s: b Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment] Immary</th> <th>22</th> <th>ts to other resources: U UniGene 🖬 GEO 🖬 Gene 😒 Structure 🔟 Map Viewer 🗾 PubChem BioAssay</th> <th>es producing significant alignments:</th> <th>rcession Description Description Max score I otal score Query of</th> <th>5202.1 L-serine deaminase [Enterococcus faecalis Merz96] &gt;ref1ZP_06630445.1  L-serine deh 34.1 34.1 73'</th> <th>131.1 hypothetical protein ACD_34C0028750001, partial [uncultured bacterium] 34.1 34.1 86'</th> <th>2.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus mitis SPAR: 33.7 33.7 73'</th> <th><u>8623.1</u> L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus sp. SK140] <u>33.7</u> 33.7 73<sup>1</sup></th> <th>2023.1 L-serine dehydratase alpha subunit [Streptococcus infantis ATCC 700779] &gt;ref[ZP_12: 33.7 33.7 73'</th> <th>12355.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus infantis SK: 33.7 33.7 73"</th> <th>3356.1         beta-phosphoglucomutase [Joostella marina DSM 19592] &gt;gb EIJ376.1         beta-phosph         33.3         73*</th> <th>iron-sulfur-dependent L-serine dehydratase subunit alpha [Enterococcus faecalis V583 33.3 33.3 66'</th> <th>1234.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis TX0 33.3 33.3 66'</th> <th>2.1 L-serine ammonia-lyase [Enterococcus sp. 7L76] 33.3 66<sup>(</sup></th> <th>L-serine deaminase [Enterococcus faecalis CH188] &gt;ref ZP_07761753.1] L-serine dehy 33.3 33.3 66'</th> <th>1. errine deaminase [Enterococcus faecalis ATCC 4200] &gt;gb EEU15480.1  L-serine deal 33.3 33.3 66<sup>6</sup></th> <th>12827.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis ATC 33.3 33.3 66'</th> <th>1-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis TX0 33.3 33.3 66'</th> <th>33544.1 predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii] &gt;gb EDP08798.1  predicted protein [Chl. 32.0 32.0 73"</th> <th>33327.1 hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] &gt;emb CAK66000.1  unnamed 32.0 32.0 100</th> <th>0643.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha suburit [Streptococcus infantis X] 31.2 31.2 73'</th> <th>4657.1 L-serine dehydratase alpha subunit [Streptococcus peroris ATCC 700780] &gt;gb EFX413 31.2 31.2 73'</th> <th></th>	s: b Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment] Immary	22	ts to other resources: U UniGene 🖬 GEO 🖬 Gene 😒 Structure 🔟 Map Viewer 🗾 PubChem BioAssay	es producing significant alignments:	rcession Description Description Max score I otal score Query of	5202.1 L-serine deaminase [Enterococcus faecalis Merz96] >ref1ZP_06630445.1  L-serine deh 34.1 34.1 73'	131.1 hypothetical protein ACD_34C0028750001, partial [uncultured bacterium] 34.1 34.1 86'	2.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus mitis SPAR: 33.7 33.7 73'	<u>8623.1</u> L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus sp. SK140] <u>33.7</u> 33.7 73 <sup>1</sup>	2023.1 L-serine dehydratase alpha subunit [Streptococcus infantis ATCC 700779] >ref[ZP_12: 33.7 33.7 73'	12355.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Streptococcus infantis SK: 33.7 33.7 73"	3356.1         beta-phosphoglucomutase [Joostella marina DSM 19592] >gb EIJ376.1         beta-phosph         33.3         73*	iron-sulfur-dependent L-serine dehydratase subunit alpha [Enterococcus faecalis V583 33.3 33.3 66'	1234.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis TX0 33.3 33.3 66'	2.1 L-serine ammonia-lyase [Enterococcus sp. 7L76] 33.3 66 <sup>(</sup>	L-serine deaminase [Enterococcus faecalis CH188] >ref ZP_07761753.1] L-serine dehy 33.3 33.3 66'	1. errine deaminase [Enterococcus faecalis ATCC 4200] >gb EEU15480.1  L-serine deal 33.3 33.3 66 <sup>6</sup>	12827.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis ATC 33.3 33.3 66'	1-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [Enterococcus faecalis TX0 33.3 33.3 66'	33544.1 predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii] >gb EDP08798.1  predicted protein [Chl. 32.0 32.0 73"	33327.1 hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] >emb CAK66000.1  unnamed 32.0 32.0 100	0643.1 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha suburit [Streptococcus infantis X] 31.2 31.2 73'	4657.1 L-serine dehydratase alpha subunit [Streptococcus peroris ATCC 700780] >gb EFX413 31.2 31.2 73'	

# Sequenzsuche für: (FN)FDLTHQQQLDYLR

NCBI/ BLAST/ blastp suite.	Formatting Results - APSYNW7601R meters were adjusted to search for a short input sequence.						
Edit and Resubmit	Save Search Strategies b Formatting options b Download View these results in the 1 You (111) Learn about 119 (effents)	<u>new enhanced rep</u> the enhanced rep	<mark>ort</mark>				
Query ID   Description   Molecule type a Query Length	di 78233 Vone smino acid	Database Namo Description Progran	e nr All non-redundar samples from WC BLASTP 2.2.27+	t GenBank CDS translatic ss projects • <u>Citation</u>	ons+PDB+SwissPro	ot+PIR+PRF excludi	ng environmental
Other reports: P	search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment] arV						
Descriptions	Ĩ						
Legend for links to c	ther resources: 🔟 UniGene 🖬 GEO 🖸 Gene 🗟 Structure 🕅 Map Viewer 🗾 PubChem BioAssay						
Sequences pr	oducing significant alignments:						
Access	on Description	<u>Max score</u>	Total score	Query coverage	🔬 <u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
XP 00396418.	PREDICTED: bone morphogenetic protein 3B-like [Takifugu rubripes]	33.7	33.7	78%	1.0	73%	U
ZP 01772362.	1 Hypothetical protein COLAER_01366 [Collinsella aerofaciens ATCC 25986] >gb EBA3943	33.3	33.3	68%	1.4	73%	
EJD37407.1	hypothetical protein AURDEDRAFT_129468 [Auricularia delicata TFB-10046 SS5]	33.3	33.3	68%	1.4	86%	
CAG09371.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	31.2	31.2	73%	6.6	71%	
CCC89387.1	putative phosphatase-like protein [Trypanosoma congolense IL3000]	30.8	30.8	52%	8.8	%06	
YP 00260322	hypothetical protein HRM2_19570 [Desulfobacterium autotrophicum HRM2] >gb ACN150	30.8	30.8	89%	9.2	46%	U
NP 639203.1	hypothetical protein XCC3863 [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 3391	30.3	30.3	73%	12	71%	U
ZP 05074840.	1 Di-haem Cytochrome c peroxidase [Rhodobacterales bacterium HTCC2083] >gb EDZ42;	30.3	30.3	47%	12	100%	
BAE41850.1	unnamed protein product [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	12	55%	M U
BAE28019.1	unnamed protein product [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	M C
AAH57560.1	Unc5b protein [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	M U
BAE34445.1	unnamed protein product [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	U M
NP 084046.2	netrin receptor UNC5B precursor [Mus musculus] >sp Q8K1S3.1 UNC5B_MOUSE RecNar	30.3	30.3	89%	13	55%	C G M
<u>BAB31108.1</u>	unnamed protein product [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	UM
AAH48162.1	Unc5b protein, partial [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	M U
EDL32163.1	unc-5 homolog B (C. elegans), isoform CRA_a [Mus musculus]	30.3	30.3	89%	13	55%	U
EHL07341.1	hypothetical protein HMPREF0322_01901 [Desulfitobacterium hafniense DP7]	29.9	29.9	68%	13	69%	
XP 00232816(	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEE76046.1  predicted protein [Populus tri	29.9	29.9	47%	17	89%	۲ ۲

## Sequenzsuche für: DLPASANDLPYFLLHAQDR

Anhang

ers were adjusted to search for a short input sequence.						
<ul> <li>P Formatting options</li> <li>P Download</li> <li>View these results in the view these results in the view t</li></ul>	le new enhanced rej	port				
	Database Nam Descriptio Prograi	te nr M All non-redunda samples from W BLASTP 2.2.27+	int GenBank CDS translati (GS projects <u>► Citation</u>	ons+PDB+SwissP	orot+PIR+PRF exclu	ling environr
nomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]						
ene 🖬 GEO 🖸 Gene 💈 Structure 🔟 Map Viewer 🌌 PubChem BioAssay						
alignments:						
Description	Max score	<u>Total score</u>	Query coverage	🛆 E value	<u>Max ident</u>	Links
partial [Ambystoma mexicanum]	34.1	34.1	84%	0.48	91%	
ratin subunit protein, partial [Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.49	91%	M Q
): keratin, type II cytoskeletal 1 [Pongo abelii]	34.1	34.1	84%	0.49	91%	U
<ol><li>keratin, type II cytoskeletal 1-like [Nomascus leucogenys]</li></ol>	34.1	34.1	84%	0.49	91%	M C
: keratin, type II cytoskeletal 6B [Felis catus]	34.1	34.1	84%	0.49	91%	U
): keratin, type II cytoskeletal 4 [Sarcophilus harrisii]	34.1	34.1	84%	0.49	91%	U
<ol><li>keratin, type II cytoskeletal 1-like [Loxodonta africana]</li></ol>	34.1	34.1	84%	0.50	91%	M Q
<ol><li>keratin, type II cytoskeletal 1-like [Cavia porcellus]</li></ol>	34.1	34.1	84%	0.50	91%	M C
): keratin, type II cytoskeletal 1-like isoform 5 [Macaca mulatta]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	N C M
): keratin, type II cytoskeletal 1-like isoform 6 [Macaca mulatta] >gb EHH20	34.1	34.1	84%	0.50	91%	N C M
pe II cytoskeletal 1 [Pan troglodytes] >sp A5A6M6.1 K2C1_PANTR RecName	34.1	34.1	84%	0.50	91%	C G M
: keratin, type II cytoskeletal 1 [Papio anubis]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	ڻ ⊃
: keratin, type II cytoskeletal 1 [Pan paniscus]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U
40mo sapiens] >gb AAB47721.1  keratin 1 [Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U
40mo sapiens] >gb AAH63697.1  Keratin 1 [Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U
Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U
[Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U
Homo sapiens]	34.1	34.1	84%	0.50	91%	U

## Sequenzsuche für: (PS/LA)LDLELATYR

Four search parameters were aquesed to search for a short input sequence.             Fortiand Resubmit Sare Search Strategies > Formatting options > Download              Protein Sequence (13 lefters)              Protein Sequence (13 lefters)              Query ID  a 73826             Description None              Molecule type amino acid             Molecule type amino acid             Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a             Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a             Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a             Other reports: > Search Summary             Outorsists             Outorsists             Outorsists             Outorsists             Outorsists             Outorsists	<u>View these results in the ne</u> You (Und) Learn about th	w enhanced reportion enhanced reportion					
Edit and Resubmit Save Search Strategies > P Formatting options > P Download Cotern Sequence (13 letters) Query ID Idl/3826 Description None Molecule type amino acid Query Length 13 Cher reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a Query Length 13 Cher reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a Query Length 13 Cher reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a Graphic Summary Corter reports: > Search Structure [] Map Viewer [] Caraphic Summary Caraphic	View these results in the ne You The learn about th	ew enhanced reported reported reported and reported repor					
rotein Sequence (13 letters)         Query ID       Id 73826         Query Length       I3         Query Length       I4         Query Length       I0         Descriptions       I         Legend for links to other resources:       UniGene         Legend for links to other resources:       UniGene         Acoutors23331       I         XP 0016335.1       I         XP 00123583.1       I         XP 00123583.1       I         ZP 09203358.1       I         ZP 09204385.1       I         ZP 09204385.1       I         ZP 092041							
Query ID       Icl/3826         Description       None         Molecule type       amino         Query Length       13         Other reports: b Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a         Graphic Summary       Image: Structure ID         Descriptions       Image: Structure ID         Image: Second Structure ID       Map Viewer ID         Sequences Fordure       UniGene E       GEO ID       Gene ID         Sequences Fordure       Image: Second Structure ID       Map Viewer ID       Second Structure ID         X       001052388.1       Pescription       Secription         X       00105338.1       Pescription         X       001015786.1       Pescription         X       001015538.1       Pescription         X       001015538.1       Pescription         X       001015538.1       Pescription							
Other reports: b Search Summary ITaxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple a         Ocraphic Summary         Oescriptions         Legend for links to other resources: UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer M M Map Viewer M M M M Viewer M M Viewer M M Viewer M M M Viewer M Viewer M M M Viewer		)atabase Name Description Program	nr All non-redundant samples from WG. BLASTP 2.2.27+ b	: GenBank CDS translatio S projects • <u>Citation</u>	ons+PDB+SwissPr	ot+PIR+PRF exclud	ng environment
Ocraphic Summary         Descriptions         Legend for links to other resources: U UniGene E GEO C Gene Structure M Map Viewer S         Sequences producing significant alignments:         Accession         Pro 001625338.1         2P 001212398.1         2P 00212798.1         2P 00212798.1         2P 00212798.1         2P 00212798.1         2P 00212798.1	<u>ile alignment]</u>						
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer M Tegenences producing significant alignments:  Accession							
Sequences producing significant alignments:         Description           Accession         Epedicted protein [Nematostella vectensis] >gb ED033258.1]           XP 00152358.1         predicted protein [Nematostella vectensis] >gb ED033258.1]           XP 001527963.1         PREDICTED: similar to CG6178 CG6178 PA [Ciona intestinalis]           ZP 09204385.1         4-hvv/novv-3-methvhult-2-en-1-vf rinhonshere svorthase [Ciona	r 🌌 PubChem BioAssay						
Accession         Description           XP 001625358.1         predicted protein [Nematostella vectensis] >gb ED033258.1            XP 002127963.1         PREDICTED: similar to C66178 C66178-PA [Ciona intestinalis]           ZP 09204385.1         4-hvdroxv-3-methvlhut-2-en-1-vl dinboshate svorthase [Clo							
XP         001625338.1         predicted protein [Nematostella vectensis] >gb ED033258.1            XP         002127963.1         PREDICTED: similar to CG6178 CG6178-PA [Ciona intestinalis]           ZP         09204385.1         4-hvdroxv-3-methvlhur-2-en-1-vl dinhoschate svorthase [Clo		Max score	Total score	Query coverage	∆ <u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
XP         002127963.1         PREDICTED: similar to CG6178 CG6178-PA [Ciona intestinalis]           ZP         09204385.1         4-hvdroxv-3-methvlhut-2-en-1-vl dinhosohate svorthase [Clo	1.1 predicted protein [Nemat	27.8	27.8	84%	52	73%	() )
ZP_09204385.1 4-hvdroxv-3-methvlbiut-2-en-1-vl diphosphate svnthase [Clo	lis]	27.8	27.8	84%	53	73%	M C M
	Clostridium sp. DL-VIII] >gb	26.9	26.9	84%	96	73%	
YP 005678993.1 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase [	se [Clostridium botulinum H04	26.9	26.9	84%	96	73%	U
YP 002804868.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum A2 str.	26.9	26.9	84%	96	73%	U
YP 001787735.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum A3 str.	26.9	26.9	84%	96	73%	U
YP 001781967.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum B1 str.	26.9	26.9	84%	96	73%	U
ZP 02619295.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum Bf] >re	26.9	26.9	84%	96	73%	
ZP 02615360.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum NCTC 2	26.9	26.9	84%	96	73%	
YP 001391722.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum F str. L	26.9	26.9	84%	96	73%	U
YP 001254921.1 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase [Clo	Clostridium botulinum A str. /	26.9	26.9	84%	96	73%	U
ZP 05391192.1 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase [	se [Clostridium carboxidivoran	26.5	26.5	84%	131	73%	
XP 002610165.1 hypothetical protein BRAFLDRAFT_279625 [Branchiostoma flo	floridae] >gb EEN66175.1  h	26.5	26.5	84%	132	73%	0 D
YP 675652.1 ROK domain-containing protein [Chelativorans sp. BNC1] >gb	gb ABG64487.1  ROK domain	26.1	26.1	84%	179	73%	U
XP 002107769.1 hypothetical protein TRIADDRAFT_20283 [Trichoplax adhaere	erens] >gb EDV28567.1  hyp	26.1	45.8	84%	180	100%	U
BAI66600.1 [uciferase [Pyrophorus angustus luscus]		26.1	26.1	61%	180	88%	
AAQ19141.1 Inciferase [Pyrophorus mellifluus]		26.1	26.1	61%	180	88%	
ZP 07280326.1 conserved hypothetical protein [Streptomyces sp. AA4] >gb	gb EFL08695.1  conserved h	25.7	25.7	84%	243	69%	

# Sequenzsuche für: xxVPDIEAGExxK

			ironmenta			v																		
			luding envi			Link	U		U	U	U			U	U	U		U			U	U		
			ot+PIR+PRF exc			Max ident	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			ons+PDB+SwissPr			∆ <u>E value</u>	19	21	21	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
			tt GenBank CDS translati 55 projects • <u>Citation</u>			Query coverage	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			e nr n All non-redundar samples from W( n BLASTP 2.2.27+			Total score	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2
		e new enhanced rep ut the enhanced rep	Database Namo Description Progran			Max score	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2
matting Results - APTVVF6Y01R	ers were adjusted to search for a short input sequence.	<ul> <li>Search Strategies &gt; Formatting options &gt; Download</li> <li>Vow (tube Learn aboue the searn aboue the search about the search ab</li></ul>	526 o acid	ch Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]	resources: 🚺 UniGene 🖬 GEO 🖸 Gene Structure 🕅 Map Viewer 📓 PubChem BioAssay	cing significant augnments: Description	predicted protein [Micromonas pusilla CCMP1545] >gb EEH55441.1  predicted protein [	acetyltransferase, GNAT family family protein [Burkholderia thailandensis MSMB43] >gb	hypothetical protein Avi_1921 [Agrobacterium vitis S4] >gb ACM36378.1  conserved h	aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia eutropha JMP134] >gb AAZ60386.1  Am	hypothetical protein RSc2016 [Ralstonia solanacearum GMI1000] >emb CAD15718.1  pr	putative aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia syzygii R24]	putative aminoglycoside phosphotransferase [blood disease bacterium R229]	aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia solanacearum PSI07] >emb CBJ50773.1	aminoglycoside phosphotransferase [Cupriavidus taiwanensis LMG 19424] >emb CAQ69	aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia eutropha H16] >ref YP_004684880.1  ar	putative aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia solanacearum K60-1]	aminoglycoside phosphotransferase protein [Ralstonia solanacearum Po82] >gb AEG687	Phosphotransferase [Ralstonia solanacearum UW551] >ref YP_002259172.1  aminoglyc	phosphotransferase enzyme family protein [Ralstonia sp. 5_7_47FAA] >ref ZP_1098823	aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia pickettii 12D] >gb ACS63128.1  aminogly	aminoglycoside phosphotransferase [Ralstonia pickettii 121] >gb ACD27305.1  aminogly	aminoglycoside phosphotransferase [Cupriavidus basilensis OR16] >gb EHP44013.1  am	transposase IS66 [Sphingomonas sp. PAMC 26605]
LAST/ blastp suite/ Form	four search parameter	t and Resubmit Save 9 ein Sequence (7 lef	Query ID  c  315 Description None Molecule type amino Query Length 7	ther reports: > <u>Search</u> aphic Summary escriptions	gend for links to other re	Sequences product Accession	XP 003060672.1	ZP 02468111.1	YP 002549384.1	YP 295230.1	NP 520137.1	CCA84392.1	CCA83406.1	YP 003752065.1	YP 002005116.1	YP 725608.1	CCF99052.1	YP 006029255.1	ZP 00945091.1	ZP 07676629.1	YP 002981800.1	YP 001899737.1	ZP 09623499.1	ZP 10345983.1
<ul> <li>NCBI/BI</li> </ul>	0	Prot	20	0 0 0 0	Le																			

## Sequenzsuche für: ALEAWMoxR

.

NCBI/ BLAST/ blastp suite/ Forr	matting Results - APU063H4014						
Your search paramete	ers were adjusted to search for a short input sequence.						
Edit and Resubmit Save	Search Strategies > Formatting options > Download View these results in the r You (Tubp) Leam about	new enhanced rep t the enhanced rep	비				
Protein Sequence (9 l	etters)						
Query ID Id 78 Description None Molecule type amin Query Length 9	947 b o acid	Database Namo Description Progran	e nr All non-redundar samples from W( BLASTP 2.2.27+	tt GenBank CDS translati 35 projects • <u>Citation</u>	ions+PDB+SwissPr	ot+PIR+PRF exclud	ing environmental
other reports: ⊳ <u>Searr</u> <u> </u>	ch Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alianment]						
Legend for links to other	resources: 🔟 UniGene 🖬 GEO 🖸 Gene 😂 Structure 🕅 Map Viewer 述 PubChem BioAssay						
Sequences produc	cing significant alignments:						
Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	Query coverage	🛆 <u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
XP 003569016.1	PREDICTED: nudix hydrolase 9-like [Brachypodium distachyon]	28.2	28.2	88%	27	100%	ڻ ⊃
ZP 03726535.1	conserved hypothetical protein [Diplosphaera colitermitum TAV2] >gb EEG19458.1  cor	26.9	26.9	100%	68	%68	
ZP 06420161.1	hypothetical protein HMPREF0649_01672 [Prevotella buccae D17] >gb EFC75374.1  hy	26.1	26.1	100%	97	78%	
YP 005552517.1	protein-P-II uridylyltransferase [Arcobacter sp. L] >dbj BAK72200.1  protein-P-II uridy	26.5	26.5	100%	98	78%	C
XP 001443183.1	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] >emb CAK75786.1  unnamed	26.1	26.1	88%	126	88%	M (J
YP 004766706.1	oxidoreductase [Megasphaera elsdenii DSM 20460] >emb CCC73879.1  oxidoreductase	26.1	26.1	77%	129	100%	U
YP 004657304.1	histidinol-phosphate aminotransferase [Runella slithyformis DSM 19594] >gb AEI50172.	26.1	26.1	77%	129	100%	U
YP 005054753.1	hypothetical protein [Filifactor alocis ATCC 35896] >gb EFE28694.1  hypothetical prote	26.1	42.4	77%	130	100%	U
ZP 04011370.1	possible beta-fructofuranosidase [Lactobacillus ultunensis DSM 16047] >gb EEJ72038.1	26.1	26.1	77%	131	100%	
YP 003153083.1	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta [Anaerococcus prevotii DSM 20548] >gb A	26.1	26.1	77%	133	100%	U
EGC77392.1	ATP-dependent helicase HrpA [Treponema denticola F0402]	26.1	26.1	77%	133	100%	
NP 972259.1	ATP-dependent helicase HrpA [Treponema denticola ATCC 35405] >gb AAS12170.1  A	26.1	26.1	77%	133	100%	U
XP 003851354.1	hypothetical protein MYCGRDRAFT_86363 [Zymoseptoria tritici IPO323] >gb EGP86330.	25.7	25.7	88%	180	88%	U
ZP 11680828.1	hypothetical protein CBCST_04886 [Clostridium botulinum C str. Stockholm] >gb EG088	25.7	25.7	88%	181	88%	
EGG11484.1	hypothetical protein MELLADRAFT_76697 [Melampsora larici-populina 98AG31]	25.7	25.7	88%	182	88%	
EFA77121.1	hypothetical protein PPL_09876 [Polysphondylium pallidum PN500]	25.7	6.03	88%	184	88%	
XP 001438010.1	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] >emb CAK70613.1  unnamed	25.7	59.2	88%	184	100%	M Q
NP 490271.1	hypothetical protein all7165 [Nostoc sp. PCC 7120] >dbj BAB78249.1  all7165 [Nostoc	25.2	25.2	77%	231	100%	U

# Sequenzsuche für: TSDQKIIVR

Bits       Database Name       In         Description       All non-redundant Genary (CDS translations+PDB+5/wesPhot-PDR-5/wesPh			ding environment:				Links			0 0	C		U			M C	۲ ۲		0		C G M	0		۲ ۵	M C
Image: Second control the enhanced resolution and the e			t+PIR+PRF exclu				<u>Max ident</u>	100%	100%	100%	100%	88%	100%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%	88%
Bit International Control Contrecont Contrel Control Control Control Control Control Co			ns+PDB+SwissPro				🛆 E value	3.8	3.8	3.8	3.8	46	48	57	62	62	62	62	62	63	63	63	63	63	5
Control			: GenBank CDS translatio S projects • <u>Citation</u>				Query coverage	100%	100%	100%	100%	100%	87%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Biological region       Nutifiele allocane all obtained region         Color       Database Name       Database Name         Summary Taxonomy reports)       Distanced region       Database Name         Summary Taxonomy reports)       Distance tree of results)       Map Viewer Si PubChem BioAssay         Summary Taxonomy reports)       Distance tree of results)       Program         Summary Taxonomy reports)       Distance tree of results)       Profession         CC44- not transcription complex suburit 1- like (Mutsassi)       Distance (red red red red red red red red red red		ti ti	nr All non-redundan samples from WG BLASTP 2.2.27+ f				<u>Total score</u>	30.8	30.8	30.8	30.8	27.4	27.4	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	0 90
Bers)       Mathematical and the second state of results       Mathematical and the second state of the second state of the second state of the second and second state of the second and second state of the second and second second state of the second and second state of the second and second		new enhanced repo t the enhanced repo	Database Name Description Program				<u>Max score</u>	30.8	30.8	30.8	30.8	27.4	27.4	<u>26.9</u>	26.9	26.9	26.9	<u>26.9</u>	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	<u>26.9</u>	
	s were adjusted to search for a short input sequence.	Search Strategies > Formatting options. > Download <u>View these results in the</u> You (1010) Learn abou ttens)	80 acid	l Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]	ssources: 🔟 UniGene 🖬 GEO 🖸 Gene 🗟 Structure 🕅 Map Viewer 🖼 PubChem BioAssay	ng significant alignments:	Description	hypothetical protein R036_12891 [Rhizopus delemar RA 99-880]	hypothetical protein RO3G_10401 [Rhizopus delemar RA 99-880]	CCR4-not transcription complex, putative [Ixodes scapularis] >gb EEC16491.1  CCR4-r	PREDICTED: CCR4-NOT transcription complex subunit 1-like [Metaseiulus occidentalis]	arabinose efflux permease family protein [Pseudomonas sp. GM84] >gb/EJN30467.1  ar	CCR4-Not complex component [Naegleria gruberi] >gb EFC48539.1  CCR4-Not complex	unknown [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >gb ADE35116.1  unknown [Hordeum vulga	mCG48640 [Mus musculus]	unnamed protein product [Homo sapiens]	adrenal gland protein AD-005 [Homo sapiens]	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	PREDICTED: CCR4-NOT transcription complex subunit 1-like [Mus musculus] >ref XP_00	hypothetical protein DAPPUDRAFT_117361 [Daphnia pulex]	PREDICTED: CCR4-NOT transcription complex subunit 1-like [Vitis vinifera]	uncharacterized protein LOC100502409 [Zea mays] >gb ACR38386.1  unknown [Zea m	CCR4-NOT transcription complex subunit 1 [Crassostrea gigas]	unnamed protein product [Homo sapiens]	

# Sequenzsuche für: SAFPR(HM)R

# Sequenzsuche für: xxxxNNAEDxxx

			iding environmental					Links		U	U	U				U		U	U		U		U		U	
			ot+PIR+PRF exclu					<u>Max ident</u>	64%	64%	64%	64%	64%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			ons+PDB+SwissPr					🛆 <u>E value</u>	691	710	718	718	726	2208	2364	2364	2365	2394	2402	2411	2422	2425	2434	2434	2434	2437
			t GenBank CDS translatic is projects • <u>Citation</u>					Query coverage	100%	100%	100%	100%	100%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%	54%
		비	e nr All non-redundan samples from WG					Total score	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
		new enhanced report the enhanced report	Database Name Description Program					<u>Max score</u>	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
atting Results - AR7SWW6GA1N	s were adjusted to search for a short input sequence.	Search Strategies > Formatting options > Download View these results in the Vou (1010) Learn about	51 acid	Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Multiple alignment]			sources: 💟 UniGene 🖻 GEO 🖸 Gene 😒 Structure 🔟 Map Viewer 💆 PubChem BioAssay ng significant alignments:	Description	hypothetical protein H5P1_0158 [Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotype a s	predicted protein [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01] >gb EEH40094.1  predicted proteir	FHA domain-containing protein [Aggregatibacter actinomycetemcomitans D7S-1] >ref	FHA domain-containing protein [Aggregatibacter actinomycetemcomitans D7S-1] >ref	subtilisin-like serine protease PR1C [Metarhizium anisopliae ARSEF 23]	hypothetical protein SCNU_04201 [Gordonia neofelifaecis NRRL B-59395] >gb EGD5603(	conserved hypothetical protein [Octadecabacter arcticus 238] >gb EDY91616.1  cons	hypothetical protein Pden_0627 [Paracoccus denitrificans PD1222] >gb ABL68739.1  c	hypothetical protein OCGS_2047 [Oceaniovalibus guishaninsula JLT2003] >gb EKE4371:	lipopolysaccharide biosynthesis protein [Prevotella ruminicola 23] >gb ADE81400.1  lipc	hypothetical protein AARI_25970 [Arthrobacter arilaitensis Re117] >emb CBT76810.1	phage head completion [Oxalobacter formigenes HOXBLS] >gb EEO27232.1  phage hea	hypothetical protein [Sphingobacterium sp. 21] >gb ADZ80244.1  hypothetical protein	TetR family transcriptional regulator [Streptomyces sp. W007] >gb EHM24141.1  TetR	TetR family transcriptional regulator [Streptococcus macedonicus ACA-DC 198] >emb/c	TetR family transcriptional regulator [Streptococcus bovis ATCC 700338] >ref YP_0045	TetR family transcriptional regulator [Streptococcus gallolyticus UCN34] >ref ZP_07464	TetR family transcriptional regulator [Streptomyces vinaceusdrappus]
/ RI A CT/ hlactn cuito/ Forma	Your search parameters	Edit and Resubmit Save So	Oteln Sequence (11 le) Query ID Id16016 Description None Molecule type amino a Query Length 11	Other reports: > <u>Search</u>	Graphic Summary	now/hide Graphic Summary	Legend for links to other res Sequences producin	Accession	ZP 11572409.1	XP 002789142.1	YP 006286933.1	YP 006286346.1	EFY96063.1	ZP 08203810.1	ZP 05066377.1	YP 914435.1	ZP 11146974.1	YP 003573495.1	YP 003917781.1	ZP 04576270.1	YP 004318914.1	ZP 09407145.1	YP 005094351.1	ZP 07466217.1	YP 003430147.1	AFE16055 1 i.nlm.nih.aov/Blast.cai#
NCRU			ž		€ (	rs -	_																			

# Sequenzsuche für: (TE)FIVAxxxR
	Subject Strong Biologes         Samples from WGS projects         Program Biologes           Extended         Map Viewer Simples from WGS projects         Extended         Interaction
	DescriptionMax scoreTotal scoreQuery coverance $\Delta$ E valueMax identInitialotein (Cordyceps miltraris CM01)26.95.35.35.35.35.3%5.3%5.3%5.5%5
iene 😒 Structure 🕅 Map Viewer 🐹 PubChem BioAssay	Description         Max score         Destription         Max score         Set of the se
ene 🖸 Structure 🔟 Map Viewer 📓 PubChem BioAssay	Orden (LordyYceps mintans CMMJ)         20.3         7.3%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         0.7%         1.23         5.6%         6.6%         5.6%
Structure 🛄 Map Viewer 📓 PubChem BioAssay  Description  Description  Control of the coverage  Description  Control of the coverage  Description  Control of the coverage	upperformance of the control of the
Structure III Map Viewer III PubChem BioAssay Description Letter (Cordyceps militaris CM01) 26.0 5.3 5.3 5.3 75% 123 6.7% 6.7% 6.7% 6.7% 6.7% 6.7% 6.7% 6.7%	riginale str. Florida] >gb ACM49238.1  DNA topoiso       26.5       75%       169       56%       6         antium str. Gardel] >emb CA127795.1  DNA topoiso       26.5       26.5       75%       169       56%       6         antium str. Gardel] >emb CA127795.1  DNA topoiso       26.5       26.5       75%       169       56%       6         eensis str. Arkansas] >gb ABD44526.1  DNA topois       26.5       26.5       75%       169       56%       6         eensis str. Arkansas] >gb ABD44526.1  DNA topois       26.5       26.5       75%       169       56%       6         str. Jake] >gb AZ68357.1  DNA topois       26.5       26.5       75%       169       56%       6       6         erosis str. Arkansas] >gb ABD4526.1  Nyothet       26.5       26.5       75%       169       56%       6       6         0001 [uncultured bacterium]       26.1       66.5       37%       53%       56%       6       6         7 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A       24.8       37%       53%       60%       6       6         8 (michondrion) [Halicona sp. Moc-2012]       24.8       24.8       37%       6       100%       6       6         1 (Michondrion) [Halicona sp. Moc-2012]
Structure III Map Viewer III PubChem BioAsay         Description       Max score       Iotal score       Query coverage       E value       Max ident       Lin         notein [Condyceps militaris CM01]       26.9       53.9       75%       102       67%       C         agocytophilum Hz] >gbl/ABD43991.1       DNA topoison       26.5       26.5       75%       169       56%       C         qinale str. St. Maries] >ref[ZP_05277111.1]       DNA to       26.5       26.5       75%       169       56%       C	antium str. Gardel) >emb(Ca127795.1] DNA topois         26.5         75%         169         56%         G           antium str. Welgevonden) >ref(YP_19723.1] DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           eensis str. Arkansas] >gb ABD44526.1] DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           etensis str. Arkansas] >gb ABD44526.1] DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           str. Jakel         >gb AZ68367.1] DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           etensis str. Sapulpa] >gb EAMB5972.1] DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           0001 [uncultured bacterium]         26.1         26.5         27%         53%         100%         G           7 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         37%         537%         531         100%         G           8 (mitochondrion) [Halicona sp. ATCC6 3.1         24.8         24.8         37%         602         100%         G           9 (mitochondrion) [Halicona sp. Moc.2012]         24.8         24.8         37%         602         100%
Istructure III Map Viewer III     PubChem BioAssay       Description     Max score     Jotal score     Query coverage     Internet       Description     Max score     Jotal score     Query coverage     A E value     Max ident     Lin       Totein [Condyceps militaris CM01]     26.9     55%     56%     G       ginale str. Str. Maries] >ref [ZP_05277111.1] DNA topoison     26.5     26.5     75%     169     56%     C       rightale str. Florida] >gb1ACM49238.1] DNA topoison     26.5     26.5     75%     169     56%     C	antium str. Welgevonden) >ref1YP_19723.11 DNA         26.5         75%         169         56%         6           eensis str. Arkansas] >gb ABD44526.11 DNA topoic         26.5         26.5         75%         169         56%         6           etensis str. Arkansas] >gb ABD44526.11 DNA topoic         26.5         26.5         75%         169         56%         6           etensis str. Arkansas] >gb ABD44526.11 DNA topoic         26.5         26.5         75%         169         56%         6           etensis str. Jake] >gb AZ683976.11 DNA topoic         26.5         26.5         75%         169         56%         6           0001 [uncultured bacterium]         26.1         26.5         75%         169         56%         6         6           7 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         37%         531         100%         6           8 (mictohondrion) [Halicona sp.         24.8         24.8         37%         602         100%         6           1 (Mrcbinphthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         24.8         37%         602         100%         6         6           1 (mictohondrion) [Halicona sp.         24.8         24.8         24.8         37%         602         100%
Structure III Map Viewer III PubChem BioAssay         Description       Max score       I E value       Max ident       Lit         Description       Max score       I E value       Max ident       Lit         Otein [Condyceps militaris CM01]       26.9       53.9       55%       56%       G         otein [Condyceps militaris CM01]       26.9       53.9       75%       123       67%       11         otein [Condyceps militaris CM01]       26.5       53.9       75%       169       56%       G         gionale str. Florida] >gblACN49238.11 DNA topoiso       26.5       75%       169       56%       G       G         gionale str. Florida] >gblACN49238.11 DNA topoiso       26.5       75%       169       56%       G         antium str. Gardel] >emb(CA127795.11 DNA topoiso       26.5       75%       169       56%       G	censis str. Arkansas] >gb ABD44526.1  DNA topois         26.5         75%         169         56%         G           str. Jake] >gb AZ68357.1  DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           eensis str. Jake] >gb AZ68357.1  DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           eensis str. Jake] >gb EAM85972.1  DNA topois         26.5         26.5         75%         169         56%         G           0001 [uncutured bactenium]         26.1         26.5         26.5         75%         169         56%         G           7 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         49.6         37%         591         100%         G           1 (mitochured bactenium)         24.8         24.8         37%         602         100%         G           7 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         37%         602         100%         G           1 (mitochured bacterium)         24.8         24.8         37%         602         100%         G           1 (mitochured bacterium)         24.8         24.8         37%         602         100%         G           1 (mitochured bacterium)         24.8<
Structure III Map Viewer III PubChem BioAssay         Description       Max score       I E value       Max ident       Lit         Description       Max score       I E value       Max ident       Lit         Description       Max score       I E value       Max ident       Lit         Discription       26.5       53:9       56%       G         option (Condyceps militaris CM01]       26.9       53.9       75%       123       67%       C       C         option for LT       29.0       56.5       26.5       75%       169       56%       C       C         option for LT       20.5       26.5       75%       169       56%       C       C         antium str. Gardel] >enbl CA127795.11 DNA topoise       26.5       26.5       75%       169       56%       C       C         antium str. Welgevonden] >ref1YP_19723.11 DNA       26.5       26.5       75%       169       56%       C       C	str. Jake] >gb AAZ68367.1  DNA topoisomerase I       26.5       26.5       75%       169       56%       6         eensis str. Sapulpa] >gb EAM85972.1  DNA topoisc       26.5       26.5       75%       169       56%       6         0001 [uncutured bactenium]       26.1       26.5       26.5       75%       169       56%       6         0001 [uncutured bactenium]       26.1       26.1       68%       232       60%       6         7 [Myceliophtyora thermophila ATCC 42464] >gb A       24.8       49.6       37%       582       100%       6         7 [micochondrion] [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         7 (micochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       37%       602       100%       6         7 (micochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       37%       602       100%       6         7 (micochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       37%       602       100%       6         7 (micochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       37%       602       100%       6         7 (arcans NO1] >gb EA46678.1  fworeythrin [Three       24.8       37%       602       100%       6 <t< td=""></t<>
Bescription       Max yeare       Max score       Interview       Interview <td>ensis str. Sapulpa] &gt;gb EAM85972.1  DNA topoist       26.5       25.5       75%       169       56%         001 [uncultured bacterium]       26.1       68%       22.2       60%       60%         Medicago truncatula] &gt;gb AES8976.1  hypothet       24.8       49.6       37%       532       100%       6         I (Myceliophthora thermophila ATCC 42464] &gt;gb A       24.8       49.6       37%       531       100%       6         (mitochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         orans No11) &gt;plEAEX46678.11 Rubrenythin [Then       24.8       24.8       37%       602       100%       6         Aerococcus unia ArcC 42012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         I (mitochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         orans No11) &gt;plEAEX46678.11 Rubrenythin [Then       24.8       24.8       37%       602       100%       6         free Constructural and arcs 13.0-1 (Solida Scole 100)       24.8       24.8       37%       607       100%       6         derococcus uniana andis UM1779] &gt;gb AEC17768.1  deo       24.8       24.8       37%       609</td>	ensis str. Sapulpa] >gb EAM85972.1  DNA topoist       26.5       25.5       75%       169       56%         001 [uncultured bacterium]       26.1       68%       22.2       60%       60%         Medicago truncatula] >gb AES8976.1  hypothet       24.8       49.6       37%       532       100%       6         I (Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A       24.8       49.6       37%       531       100%       6         (mitochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         orans No11) >plEAEX46678.11 Rubrenythin [Then       24.8       24.8       37%       602       100%       6         Aerococcus unia ArcC 42012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         I (mitochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]       24.8       24.8       37%       602       100%       6         orans No11) >plEAEX46678.11 Rubrenythin [Then       24.8       24.8       37%       602       100%       6         free Constructural and arcs 13.0-1 (Solida Scole 100)       24.8       24.8       37%       607       100%       6         derococcus uniana andis UM1779] >gb AEC17768.1  deo       24.8       24.8       37%       609
tructure III Map Viewer III PubChem BioAssay Description Max Score I otal score Ouery coverante I E value Max ident III tein [Cordyceps militaris CM01] 26.9 53.9 75% 123 67% 109 56% 6 pocytophilum HZ] >gbl ABD43891.1   DNA topoison 26.5 75% 169 56% 6 alle str. Florida] >mbl X topoison 26.5 75% 169 56% 6 thium str. Weigevonden] >ref1YP_19723.11 DNA topoiso thium str. Weigevonden] >ref1YP_19723.11 DNA topoiso thium str. Advansas1 >gbl ABD44526.11 DNA topoiso tr. Jake] >gbl AAD44226.11 DNA topoiso tr. Jake] >gbl AAD44226.11 DNA topoiso tr. Jake] >gbl AAD4426.11 DNA topoiso tr. Jake] >gbl AAD44526.11 DNA topoiso tr. Jake] >gbl AAD4456.11 DNA t	001 [uncultured bacterium]         26.1         26.1         68%         232         60%
Concrete III Map Viewer III PubChem BioAssay         Max score         Total score         Query coverage         I         Value         Max score         I         I           Description         Hair Score         Oter Coverage         I         Value         Max score         I	Wedicago truncatula] >gb AES89976.1  hypothet         24.8         49.6         37%         582         100%         I           [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         49.6         37%         591         100%         I           [Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         37%         591         100%         I         I           (mitochondrion) [Haliciona sp. AMC-2012]         24.8         24.8         37%         602         100%         I         I           orans Nor1] >gb EAX46678.1  Rubrerythin [Then         24.8         24.8         37%         602         100%         I <t< td=""></t<>
tructure III Map Viewer III PubChem BioAssay tructure III Map Viewer III PubChem BioAssay teriction Description tein [Cordyceps militaris CM01] tein str. Adventasi ] xref[YP_0527111 DNA to tein str. Meigevonden] >ref[YP_19723.1] DNA topois tein str. Meigevonden] >ref[YP_19723.1] DNA topois tein str. Arkansasi >gb ABD445Ci.1] DNA topois tein str. Xenasasi >gb ABD445Ci.1] DNA topois tein str. Spolpab   ABD445Ci.1]	[Myceliophthora thermophila ATCC 42464] >gb A         24.8         49.6         37%         591         100%         I           (mitochondrion) [Haliclona sp. AMC-2012]         24.8         24.8         37%         602         100%         I           orans Nor1] >gb EAX46678.1 Rubrerythrin [Then         24.8         24.8         37%         602         100%         I           orans Nor1] >gb EAX46678.1 Rubrerythrin [Then         24.8         24.8         37%         602         100%         I           (EC 3.1.3) [Schistosoma mansoni) >emb CCD6         24.8         24.8         37%         604         100%         I           erococccus urinae ACS-120-V-Col10a] >gb AEC07         24.8         24.8         37%         607         100%         I           oacterium anatis UMN179] >gb AEC17768.1   deox         24.8         37%         609         100%         I
tructure  Map Viewer  Map Viewer  Map Viewer  May PubChem BioAssay tucture  Map Viewer  PubChem BioAssay tucture  Map Viewer  Max Function Description Descriptio	mitochondrion         Haliclona sp. AMC-2012         24.8         24.8         37%         602         100%           rans Nor1         >pb EXX46578.1         Rubrerythrin         Therr         24.8         37%         602         100%           rans Nor1         >pb EXX46578.1         Rubrerythrin         Therr         24.8         37%         602         100%           (EC 3.1.3)         [Schistosoma mansoni] >emb CCD6         24.8         24.8         37%         604         100%           erococcus urinae ACS-120-V-Col10a] >pb AEA0         24.8         24.8         37%         607         100%         G           acterium anatis UMN179] >pb AEC17768.1         deoz         24.8         37%         609         100%         G
Inclute III Map Viewer IIII Map Viewer IIIIII Map Viewer IIIIII Map Viewer IIIIII Map Viewer IIIIIII Map Viewer IIIIIII Map Viewer IIIIIIII Map Viewer IIIIIIII Map Viewer IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	rans Nor1] spb EAX46678.1  Rubrerythrin [Theri 24.8 24.8 37% 602 100% (EC 3.1.3) [Schistosoma mansoni] >mb CCD6 24.8 24.8 37% 604 100% UG erococcus urinae ACS-120-V-Col10a] spb AEAD 24.8 27% 607 100% G acterium anatis UMN179] spb AEC17768.1  deo: 24.8 27% 609 100% G
Inclure III Map Viewer III PubChem BioAssay         Max score         I coral score         Query coverage         E evalue         Max ident         In           Description         Max score         I coral score         Query coverage         E evalue         Max ident         In           Description         Max score         I coral score         Query coverage         E evalue         Max ident         In           Rein (Cordyceps militaris CM01]         26.9         53.9         7.5%         103         67%	(EC 3.1.3)         [Schistosoma mansoni] >embl CCD6         24.8         24.8         37%         604         100%         UC           erococcus urinae ACS-120-V-Col10a] >gb AEA0         24.8         24.8         37%         607         100%         C           acterium anatis UMN179] >gb AEC17768.1         deox         24.8         37%         609         100%         C
Structure III Map Viewer III PubChern BioAssay <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b> <b>Description</b>	Aerococccus urinae ACS-120-V-Col10a] >gb AEA0         24.8         24.8         37%         607         100%         C           bacterium anatis UMN179] >gb AEC17768.1         deo:         24.8         37%         609         100%         C
tucture	acterium anatis UMN179] >gb AEC17768.1  deo; 24.8 24.8 37% 609 100% C
Structure III Map Viewer III PubChem BioAssay         Hax score         Total score         OuterY coverance         E value         Hax store         Ital score         OuterY coverance         E value         Ital score         Ital score         Onery coverance         Ital score         Offer         Ital score         Offer         Ital score         Offer         Ital score         Offer         Offer         Offer         Ital score         Offer         Ital score         Offer         Ital score         Ital score </th <td></td>	

## Sequenzsuche für: xxxxYPPFIQxxASSK

# Anhang

<ul> <li>NCBI/ BLAST/ blastp suite/ Form</li> </ul>	matting Results - APUCEWYZ01R						
① Your search paramete	ers were adjusted to search for a short input sequence.						
Edit and Resubmit Save	e Search Strategies P Formatting options P Download View these results View the view the vi	in the new enhanced I about the enhanced I	eport eport				
Protein Sequence (17	letters)						
Query ID Id 83 Description None Molecule type amin Query Length 17	3663 B Diacid	Database Na Descript Progr	me nr ion All non-redund: samples from V am BLASTP 2.2.27-	ant GenBank CDS transla VGS projects +	tions+PDB+Swiss	Prot+PIR+PRF excl	iding environmental
Other reports: > <u>Searc</u>	ch Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Related Structures] [Multiple align	ment					
<u>Graphic summary</u> <u>Descriptions</u>							
Legend for links to other	resources: 🔟 UniGene 🖬 GEO 🖬 Gene 😒 Structure 🕅 Map Viewer 💆 PubChem BioAssay						
Sequences produc	cing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	<u>Total score</u>	Query coverage	🔬 <u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
1EPT B	Chain B, Refined 1.8 Angstroms Resolution Crystal Structure Of Porcine Epsilon-Tryps	ii <u>32.9</u>	32,9	82%	1.3	%62	S
1AKS A	Chain A, Crystal Structure Of The First Active Autolysate Form Of The Porcine Alpha	32.9	32.9	82%	1.5	79%	S
1MCT A	Chain A, The Refined 1.6 Angstroms Resolution Crystal Structure Of The Complex For	n <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	79%	S
<u>1AN1 E</u>	Chain E, Leech-Derived Tryptase InhibitorTRYPSIN COMPLEX >pdb 1C9P A Chain A, (	C( <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	%62	S
<u>1TFX A</u>	Chain A, Complex Of The Second Kunitz Domain Of Tissue Factor Pathway Inhibitor V	vi <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	79%	S
3MYW A	Chain A, The Bowman-Birk Type Inhibitor From Mung Bean In Ternary Complex With F	oc <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	26%	S
<u>2A31 A</u>	Chain A, Trypsin In Complex With Borate >pdb 2A32 A Chain A, Trypsin In Complex V	V <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	%62	<mark>s v</mark>
P00761.1	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor >pdb 4AN7 A Chain A, Kunitz Type Trypsin	II <u>32.9</u>	32.9	82%	1.6	79%	Ň
<u>1H9H E</u>	Chain E, Complex Of Eeti-Ii With Porcine Trypsin	32.9	32.9	82%	1.6	26%	S
<u>NP 001156363.1</u>	trypsinogen precursor [Sus scrofa] >gb ACR67004.1  trypsinogen precursor [Sus scr	0 <u>32.9</u>	32,9	82%	1.6	26%	C GM
XP 001489596.2	PREDICTED: anionic trypsin-like [Equus caballus]	31.6	31.6	82%	4.1	71%	C GM
XP 002751962.1	PREDICTED: cationic trypsin-3-like [Callithrix jacchus]	31.6	31.6	82%	4.1	71%	M D
ZP 09102726.1	hypothetical protein DesgiDRAFT_3844 [Desulfotomaculum gibsoniae DSM 7213] >gb	E <u>31.6</u>	31.6	70%	4.3	75%	
XP 003589533.1	GDSL esterase/lipase [Medicago truncatula] >gb AES59784.1  GDSL esterase/lipase	[] <u>31.2</u>	31.2	88%	5.8	71%	U
<u>AAG30949.1</u>	cationic trypsinogen [Homo sapiens]	30.3	30.3	82%	9.1	71%	U
<u>AAG30947.1</u>	cationic trypsinogen [Homo sapiens]	30.3	30.3	82%	9.1	71%	U
<u>AAC50728.1</u>	cationic trypsinogen, partial [Homo sapiens] >gb AA085800.1  protease serine 1 [Ho	n <u>30.3</u>	30.3	82%	9.1	71%	U
<u>AAZ40216.1</u>	trypsin I [Homo sapiens]	30.3	30.3	82%	9.1	71%	U

# Sequenzsuche für: xxDVIEGNEQKFLNAAR

### Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, denen ich meine Promotion verdanke (außer mir selbst natürlich).

Ich bedanke mich zunächst bei Prof. Dr. P. Proksch, der mir die Möglichkeit gab am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie zu promovieren. Ich bin sehr glücklich, dass ich die Chance bekommen habe abseits des normalen Betätigungsfeldes des Instituts zu forschen und mich mit der Biochemie des *Aplysina*-Schwammes zu beschäftigen.

Außerdem bin ich Prof. L. Schmitt für seine Tätigkeit als Co-Korrektor dankbar, sowie dafür, dass er es mir erlaubte den Großteil meiner Arbeit an seinem Institut durchzuführen. Dem ganzen Arbeitskreis Schmitt danke ich dafür, dass ich in den letzten Jahren jeden dort um Hilfe fragen durfte, wenn ich Probleme mit der Durchführung meiner Chromatographieund Elektrophoreseexperimente hatte. Besonders danken möchte ich in dem Zusammenhang Nino, Britta, Miro, Nacera, Christian, Philipp und Andre, denen ich besonders viele Fragen gestellt habe.

Ein ganz spezieller Dank geht an Dr. Nils Hanekop. Ich bin sehr froh und stolz, dass ich so einen guten Betreuer für meine Arbeit hatte, ohne den ich die Arbeit gar nicht hätte aufnehmen können. Er war in der ganzen Zeit immer für mich da, um mir bei meinen Fragen und Verständnisproblemen zu helfen, diese mit mir zu diskutieren und zu klären. Egal wie beschäftigt er war, er hatte immer genug Zeit für mich. Ich kann mir keinen besseren Betreuer vorstellen und ich hätte mir auch keinen besseren wünschen können. DANKE!!!!!!

Ich bedanke mich bei den Kollegen aus dem Arbeitskreis Kurz vom Institut für Pharmazeutische Chemie für deren Hilfestellung bei der Durchführung der Synthese.

Ich danke meinem ersten Laborpartner Sherif dafür, dass er sich in den ersten zwei Monaten meiner Arbeit am Institut sehr vorbildlich darum kümmerte, mich in die Arbeitstechniken der Naturstoffisolierung einzuweisen. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er während seiner Promotionszeit jedes meiner Mitarbeiterseminare gegenlas und gegebenenfalls korrigierte. Außerdem bin ich für die Freundlichkeit dankbar, mit der er mich am Institut empfing.

#### Danksagung

Ich danke Simone Miljanovic, Katja Friedrich, Eva Müller und natürlich Dieter Jansen für deren ständige technische Unterstützung, ohne die das Institut nicht länger als wenige Minuten funktionieren würde und kein Doktorand arbeiten könnte. Danke euch! Ich möchte allen Apotheker-Kollegen am Institut für deren freundliche Unterstützung und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden im Institut und der Mensa danken. Besonders danke ich Andreas Marmann und Lena Hammerschmidt, dass ich dort so viel Zeit im Labor quatschend und lachend verbringen konnte. Es hat mir wirklich viel Spaß gemacht!

Ich danke Wera Döring für den Spaß, den wir im PB II Praktikum teilweise hatten. Ich bin sehr froh, dass ich mit solch einer tollen Apothekerin (menschlich wie fachlich) zusammenarbeiten durfte.

Wo ich schon bei einem tollen Pharmazie-Professor bin, möchte ich mich jetzt bei all denen bedanken, die mich überhaupt für die Pharmazie begeisterten, mich vorantrieben während des Studiums und motivierten, genug zu lernen, um alles auf Anhieb zu schaffen. Dazu zählen natürlich diverse Professoren. Prof. Paßreiter habe ich ja schon erwähnt. Besonders in Erinnerung werde ich immer Professor Horst Weber und Professor Hans-Dieter Höltje behalten!

Ohne das beste Pharmazie-Semester aller Zeiten, wäre bei mir wahrscheinlich auch alles anders gelaufen. Die Tatsache, dass wir das beste Semester waren führte dazu, dass ich den Willen hatte, alles zu lernen, egal wie blöd es war, nur um jede Prüfung zu bestehen, damit ich in diesem Semester bleiben konnte. Hervorheben möchte ich Bettina, Coco, Stephie, Thao Mi, Achim, David und Tim! Trotz der Hervorhebung möchte ich noch einmal darauf hinweisen, dass ich auch allen anderen aus meinem Semester aus tiefstem Herzen danke.

#### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich nicht nur in meinem Namen, sondern im Namen aller in der Pharmazie Beschäftigten, bei allen Pharmazie-Studenten bedanken. Ohne das Interesse der Studenten am schönsten Beruf der Welt, dem Apothekerberuf, hätte keiner von uns überhaupt eine Anstellung bekommen, weil es die Pharmazie in Düsseldorf dann gar nicht gäbe. Weder der Leiter des Arbeitskreises, noch seine Mitarbeiter hätten einen entsprechenden Job. Aus diesem Grund sollten wir alle jeden Tag den Studenten auf Knien danken und sie nicht als übles Beiwerk zur ach so wichtigen "Hochschulforschung" ansehen, was leider viel zu häufig und recht offensichtlich vorkommt.

Ich bedanke mich bei allen, die ich hier wegen meiner Vergesslichkeit namentlich nicht erwähnt habe, aber hätte erwähnen müssen.

Danke Achim für die vielen Gespräche während wir in Vorlesungen saßen. Danke für die vielen gemeinsam verbrachten Freistunden. Danke, dass wir uns selbst viele Freistunden gemacht haben. Danke für Deine Besuche in meinem Labor. Danke für Deine Freundschaft!

David, DANKE! Ich weiß nicht, was ich hier alles schreiben soll. Ich danke Dir für so viel, dass ich nicht wüsste, womit ich anfangen sollte und womit aufhören. Natürlich danke ich Dir für alles, wofür ich auch Achim dankbar bin (außer vielleicht für die selbst gemachten Freistunden, denn da war Achim aktiver). Besonders muss ich Dir aber für die letzten vier Jahre danken, denn ohne Dich, naja, den Rest kannst Du Dir denken...Deswegen nur so viel: ...to be a rock, and not to roll...

Ich danke meiner Stefania! Für die schönste Zeit meines Lebens, für Deine Unterstützung fast in der ganzen Zeit meiner Promotion und besonders für die Unterstützung in den letzten sechs Monaten, die sehr schwer für mich waren. DANKE!

Und ich danke meiner Mama! Ohne meine Mama hätte ich in meinem Leben nichts erreicht. Ich habe alles ihr zu verdanken. Ich denke, dass man mehr dazu gar nicht sagen braucht, weil mich wahrscheinlich jeder verstehen wird.

### Lebenslauf

Personalien	
Name:	Lipowicz
Vorname :	Bartosz Paul
Adresse :	Virchowstr.3 /51375 Leverkusen
Geburtsdatum :	01.07.1983
Geburtsort :	Langenfeld im Rheinland
Staatsangehörigkeit :	deutsch
Zivilstand :	ledig

### Ausbildung

März 2009	Approbation	als Apotheker
-----------	-------------	---------------

- Januar 2009 3. Staatsexamen der Pharmazie
- 2003 2007 Pharmaziestudium an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- 1993 2002 Städt. Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Leverkusen
- 1989 1993 Städt. Kath. Grundschule Leverkusen

Berufstätigkeit

Feb. 2009 – Juli 2012	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
Dez. 2007 – Dez. 2008	Pharmaziepraktikum in der Viktoria Apotheke Aachener Str., Köln
2002 - 2003	Zivildienst im Zentrallabor des Klinikum Leverkusen

### Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Biochemische Untersuchung des enzymatischen Verteidigungsmechanismus im Mittelmeerschwamm *A.cavernicola*" selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte Arbeit habe ich in dieser oder ähnlicher Form noch keinem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt.

Düsseldorf, den

Bartosz Lipowicz