

Untersuchung zur strukturellen Verwandtschaft von
Putrescin *N*-methyltransferase und Spermidinsynthase 1
aus *Datura stramonium* L.

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Pharm. Stefan Biastoff,
geb. am 10.12.1977 in Schmalkalden.

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Maike Petersen
3. Prof. Dr. Ludger Wessjohann

Halle (Saale), 10.02.2010

Es wird! die Masse regt sich klarer!
Die Überzeugung wahrer, wahrer:
Was man an der Natur Geheimnisvolles pries,
Das wagen wir verständig zu probieren,
Und was sie sonst organisieren ließ,
Das lassen wir kristallisieren.

J. W. v. Goethe, Faust, Zweiter Teil

The most commonly heard lament during a protein purification is, "I've lost my activity."
When this happens a careful analysis of the situation is required to determine the cause.

M. P. Deutscher, Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, Volume 182

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungen	V
Abbildungen	VII
Schemata	VIII
Tabellen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung von PMT in der Alkaloid-Biosynthese	1
1.2 Sequenzähnlichkeit von SPDS und PMT	3
1.3 PMT als Produkt einer Genduplikation.....	5
1.4 Methoden zur Messung von PMT-Aktivität	6
1.5 Aufgabenstellung	7
2 Materialien und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	9
2.1.2 Leerplasmide	9
2.1.3 Oligonukleotid-Primer	10
2.1.4 Kulturmedien für <i>E. coli</i>	12
2.1.5 Wurzelkultur von <i>Solanum lycopersicum</i>	12
2.1.6 Puffer und Reagenzien	13
2.1.7 Enzyme.....	15
2.1.8 Kits und Marker	16
2.1.9 Chemikalien	16
2.1.10 Instrumente und Apparaturen.....	19
2.1.11 Verbrauchsmaterialien	21
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA.....	22
2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	22
2.2.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	23
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23
2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.2.7 TA-Klonierung.....	24
2.2.8 PCR	25
2.2.8.1 PCR mit Pfu DNA Polymerase	25
2.2.8.2 Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase	25
2.2.8.3 Mutagenese-PCR.....	26
2.2.9 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	27
2.2.10 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	28
2.2.11 Sequenzierung	28
2.2.12 Glycerolkultur	28
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Proteinsynthese in <i>E. coli</i>	28
2.3.1.1 Vorkultur	28
2.3.1.2 Hauptkultur und Ernte.....	29
2.3.1.3 Bakterienlyse unter nativen Bedingungen.....	29

2.3.2	SDS-PAGE.....	29
2.3.3	Proteinbestimmung.....	30
2.3.4	Proteinextraktion aus der Wurzelkultur von <i>Solanum lycopersicum</i>	31
2.3.5	Proteinchromatographie.....	31
2.3.5.1	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC).....	32
2.3.5.2	Ionenaustauschchromatographie (IEX).....	32
2.3.5.3	Präparative Gelfiltration (SEC).....	33
2.3.5.4	Analytische Gelfiltration.....	33
2.3.5.5	Umpufferung von Proteinen.....	34
2.3.6	Aufkonzentrierung von Proteinen.....	35
2.3.7	Proteinkristallisation.....	35
2.3.7.1	Suche nach geeigneten Pufferbedingungen.....	35
2.3.7.2	Feineinstellung des Kristallisierpuffers.....	36
2.3.7.3	Zusatz von Additiven und Detergenzien.....	36
2.3.8	Protein-Massenspektrometrie.....	37
2.3.9	Enzymgekoppelter colorimetrischer PMT-Test.....	37
2.3.9.1	Synthese der SAH abbauenden Enzyme MTAN und LuxS.....	37
2.3.9.2	Validierung.....	38
2.3.9.3	Bestimmung der PMT-Aktivität.....	39
2.3.10	Spermidinsynthese- und PMT-Test mit HPLC.....	39
2.3.10.1	Enzymtest.....	39
2.3.10.2	HPLC-Analyse der gebildeten Polyamine.....	40
2.3.10.3	Quantifizierung der Polyamine.....	41
2.3.10.4	Wiederfindung von Spermidin und N-Methylputrescin.....	42
2.4	Methoden der Bioinformatik.....	42
2.4.1	Homologiemodellierung.....	42
2.4.1.1	Datenbanksuche.....	42
2.4.1.2	Komparative Modellierung von DsPMT als Dimer.....	43
2.4.1.3	Überprüfung der stereochemischen Qualität.....	43
2.4.1.4	Überprüfung auf native Faltung.....	43
2.4.1.5	Modellierung des N-Terminus von DsPMT-N-his.....	44
2.4.1.6	Modellierung von DsSPDS als Dimer.....	44
2.4.1.7	Modellierung der chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT.....	44
2.4.2	Docking von niedermolekularen Liganden.....	45
2.4.3	Phylogenetische Analyse.....	45
2.4.4	Datenbanken und Computerprogramme.....	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Synthesevektoren für DsPMT und deren Verkürzungsmutanten.....	48
3.2	Etablierung des enzymgekoppelten colorimetrischen PMT-Tests.....	50
3.2.1	Quantifizierung von Homocystein.....	52
3.2.2	Enzymatische Umwandlung von SAH zu Homocystein.....	53
3.2.3	Nukleophilie von Putrescin.....	54
3.2.4	SAM als mögliches Substrat von MTAN.....	55
3.2.5	K_m -Werte von DsPMT-C-his für Putrescin und SAM.....	56
3.2.6	HPLC-Kontrolle der Produktbildung.....	57
3.3	Aufklärung der Inhomogenität von DsPMT-C-his.....	58
3.4	Reinigung von DsPMT-N-his.....	60
3.5	Dimerisation von <i>D. stramonium</i> PMT.....	62
3.5.1	Enzymkinetische Messungen mit DsPMT-N-his.....	62
3.5.2	Analytische Gelfiltration von DsPMT-N-his.....	63
3.6	Homologie-Modell der PMT.....	64

3.7	Eigenschaften des N-Terminus von PMT	65
3.7.1	Mutante -22-N-PMT	67
3.7.2	Mutante -54-N-PMT	67
3.8	Suche nach Protein-Komplexen mit <i>Solanum lycopersicum</i> PMT	68
3.9	Kristallisation von <i>Datura stramonium</i> PMT	69
3.9.1	Kristallisation von DsPMT-C-his	69
3.9.2	Kristallisation von DsPMT-N-his	70
3.9.3	Probleme bei der Diffraktionsmessung	71
3.10	Homologiemodell der DsSPDS	72
3.11	Vergleich der aktiven Zentren von DsSPDS und DsPMT	73
3.12	Synthesevektor für DsSPDS und deren Punktmutanten	74
3.13	Charakterisierung des DsSPDS-Wildtyps	75
3.13.1	Reinigung und Stabilität	75
3.13.2	Aktivitätsbestimmung mit HPLC	76
3.13.3	Kinetische Eigenschaften von DsSPDS	77
3.13.4	pH-Optimum	78
3.13.5	Analytische Gelfiltration von DsSPDS	79
3.14	Eigenschaften der Punktmutanten von DsSPDS	80
3.14.1	Einzelmutanten	80
3.14.2	Mehrfachmutanten	80
3.15	Synthesevektoren für die chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT	82
3.16	Charakterisierung der chimären Proteine aus DsPMT und DsSPDS	84
3.16.1	Reinigung und Stabilität	84
3.16.2	Charakterisierung von DsPMT-SPDS	84
3.16.2.1	Produktnachweis mit HPLC	84
3.16.2.2	Kinetische Eigenschaften	85
3.16.2.3	pH-Optimum	86
3.16.3	Charakterisierung von DsSPDS-PMT	86
3.16.3.1	Produktnachweis mit HPLC	86
3.16.3.2	Kinetische Eigenschaften	87
3.17	Homologiemodelle der chimären Proteine DsPMT-SPDS und DsSPDS-PMT	88
4	Diskussion	90
4.1	Bindung von SAM in PMT	90
4.2	Bindung von Putrescin in PMT	93
4.2.1	Bindung von Diamin-Inhibitoren der PMT	96
4.3	Katalytischer Mechanismus von PMT	97
4.4	Kinetischer Vergleich von PMT und SPDS	100
4.5	Phylogenetische Entwicklung der PMT	102
4.6	PMT – ein evolutionärer Vorteil?	105
5	Zusammenfassung und Ausblick	108
6	Anhang	111
6.1	Quantifizierung der Polyaminstandards	111
6.2	Sequenzdaten	112
6.3	Multiples Sequenzalignment	114
6.4	Literatur	117
	Publikationen und wissenschaftliche Beiträge	128
	Danksagung	130
	Erklärung	132

Biographische Angaben 133

Abkürzungen

½ MS-Medium	Murashige & Skoog Medium mit halber Salzkonzentration
A	Absorption oder Ampere
Abb.	Abbildung
AdoDATO	<i>S</i> -Adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctan
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool Protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz
C-his	His-Tag am C-Terminus
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dcSAM	decarboxyliertes <i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DsPMT	<i>Datura stramonium</i> Putrescin <i>N</i> -methyltransferase (Protein)
DsPMT-SPDS	Proteinchimäre aus DsPMT (N-terminal) und DsSPDS (C-terminal)
DsSPDS	<i>Datura stramonium</i> Spermidinsynthase 1 (Protein)
DsSPDS-PMT	Proteinchimäre aus DsSPDS (N-terminal) und DsPMT (C-terminal)
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat (Ellman's Reagenz)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-Q-TOF	Elektrosprayionisation-Quadrupol-Flugzeitdetektor-Massenspektrometer
EST	Expressed Sequence Tag
FWD	Vorwärts (Forward)-Primer
g	Fallbeschleunigung
GRAVY	Grand Average of Hydropathy
Hcy	Homocystein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His-Tag	Hexahistidin- bzw. (His) ₆ -Anhang
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IBA	Indol-3-buttersäure
IEX	Ionenaustauschchromatographie (Ion Exchange Chromatography)
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid
k.A.	keine Angabe
kat	Katal, 1 kat = 1 mol/s
k _{cat}	Wechselzahl
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LuxS	S-Ribosylhomocystein Lyase
M	Molarität (mol/l) oder molare Masse
MTA	5'-Methylthioadenosin
MTAN	5'-Methylthioadenosin / S-Adenosylhomocystein Nukleosidase
max.	maximal
n.b.	nicht bestimmt
N-his	His-Tag am N-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt)
p.a.	für analytische Zwecke (<i>pro analysi</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	RCSB Protein Data Bank
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMT	Putrescin N-methyltransferase (Protein)
<i>pmt</i>	Putrescin N-methyltransferase (Gen)
R ²	Korrelationskoeffizient
rcf	Relative Zentrifugalkraft
REV	Rückwärts (Reverse)-Primer
RP-18	Umkehrphase mit Octadecylsilyl-Kieselgel
rpm	Umdrehungen/min
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Gelfiltration (Size Exclusion Chromatography)
SPDS	Spermidinsynthase (Protein)
<i>spds</i>	Spermidinsynthase (Gen)
SPMS	Sperminsynthase (Protein)
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB-Medium	Terrific Broth Medium
TCA	Trichloressigsäure
TFB	Transformationspuffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, 1 U = 1 µmol/min
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen oder Volt
v	Reaktionsgeschwindigkeit (spezifische Aktivität)
v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit (maximale spezifische Aktivität)

Abbildungen

Abb. 1	Von Putrescin ausgehende Biosynthesewege.....	1
Abb. 2	Beispiele für Pflanzenalkaloide, die unter Beteiligung der PMT gebildet werden.	2
Abb. 3	Sequenzalignment relevanter SPDS- und PMT-Proteine.....	4
Abb. 4	Gradientenverlauf der HPLC-Methode.....	41
Abb. 5	Überblick über die Reaktionen im colorimetrischen PMT-Test.	51
Abb. 6	Absorption in Abhängigkeit von der Homocysteinkonzentration.....	52
Abb. 7	Wiederfindung von Homocystein.	53
Abb. 8	Wiederfindung von SAH.....	54
Abb. 9	Nukleophilie von Putrescin.	54
Abb. 10	Substratunterscheidung von MTAN gegenüber SAH und SAM.	55
Abb. 11	Kinetische Charakterisierung von DsPMT-C-his.....	56
Abb. 12	Vergleich der PMT-Aktivitäten mit HPLC und dem enzymgekoppelten Test.	57
Abb. 13	Reinigung von DsPMT-C-his mit präparativer Superdex-Gelfiltration.....	58
Abb. 14	ESI-Q-TOF Spektrum von DsPMT-C-his.....	59
Abb. 15	Reinigung von DsPMT-N-his mit Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC).....	61
Abb. 16	Reinigung von DsPMT-N-his mit Sephacryl-Gelfiltration.	62
Abb. 17	Auswertung der analytischen Gelfiltration von DsPMT-N-his.....	63
Abb. 18	Trennung von PMT-N-his-Dimeren an Nickel-Sepharose.	64
Abb. 19	Vollständiges Homologie-Modell der <i>D. stramonium</i> PMT.....	65
Abb. 20	Normalisierte Hydropathieprofile von PMT und SPDS.....	66
Abb. 21	PMT-Proteinkristalle.	70
Abb. 22	Vollständiges Homologiemodell der <i>D. stramonium</i> Spermidinsynthase 1.	72
Abb. 23	Modelle der aktive Zentren von DsSPDS und DsPMT.....	73
Abb. 24	Sequenzalignment von DsSPDS und DsPMT.....	74
Abb. 25	Mittlerer Cysteingehalt in PMT und pflanzlichen SPDS.	76
Abb. 26	Detektion von Polyaminen in Enzymtests.....	77
Abb. 27	Kinetische Charakterisierung von DsSPDS.....	78
Abb. 28	pH-Abhängigkeit der Aktivität von DsSPDS.....	79
Abb. 29	Auswertung der analytischen Gelfiltration von DsSPDS.....	79
Abb. 30	Charakterisierung der drei Einzelmutanten von DsSPDS.....	80
Abb. 31	Strukturvergleich von 10-fach mutierter DsSPDS mit DsPMT.....	82
Abb. 32	Produktnachweis für DsPMT-SPDS mit HPLC.....	84
Abb. 33	Kinetische Charakterisierung des chimären Proteins DsPMT-SPDS.	85
Abb. 34	pH-Abhängigkeit von DsPMT-SPDS.	86
Abb. 35	Produktnachweis für DsSPDS-PMT mit HPLC.....	87
Abb. 36	Kinetische Charakterisierung des chimären Proteins DsSPDS-PMT.	88
Abb. 37	Homologie-Modelle von DsPMT-SPDS und DsSPDS-PMT.	89
Abb. 38	Bindung von dcSAM und SAM in humaner SPDS.	91
Abb. 39	Variation des glycinreichen Methyltransferase-Motivs I.....	92
Abb. 40	Vergleichendes Docking von PMT-Inhibitoren und Putrescin.	97
Abb. 41	Möglicher Katalysemechanismus der PMT.	98
Abb. 42	Phylogenetischer Baum der PMT- und SPDS-Proteine.....	103
Abb. 43	Katalytische Aktivitäten der Proteinchimären aus DsPMT und DsSPDS.	109
Abb. 44	Kalibrierkurven der Polyaminstandards.....	111
Abb. 45	Protein- und cDNA-Sequenz der putativen <i>Capsicum annuum</i> PMT.....	113
Abb. 46	Protein- und cDNA-Sequenz der putativen <i>Ipomoea batatas</i> PMT.....	114

Schemata

Schema 1	Zusammensetzung und Ablauf der Ligation.	24
Schema 2	Zusammensetzung und Ablauf der PCR mit Pfu DNA Polymerase.	25
Schema 3	Zusammensetzung und Ablauf der Kolonie-PCR.	26
Schema 4	Zusammensetzung und Ablauf der Mutagenese-PCR.	27
Schema 5	Ablauf der Coomassie-Färbung.	30
Schema 6	Bestimmung der Enzymaktivität von MTAN und LuxS.	38
Schema 7	Bestimmung der PMT-Aktivität.	39
Schema 8	Dansylierungsprotokoll.	40
Schema 9	Versuch zur Wiederfindung von Spermidin und <i>N</i> -Methylputrescin.	42

Tabellen

Tab. 1	Eigenschaften der genutzten Bakterienstämme	9
Tab. 2	Leerplasmide	9
Tab. 3	Oligonukleotid-Primer	10
Tab. 4	Zusammensetzung der Kulturmedien	12
Tab. 5	Häufig gebrauchte Puffer und Reagenzien	13
Tab. 6	Kommerziell verfügbare Enzympräparationen	15
Tab. 7	Kits und Marker für DNA und Proteine	16
Tab. 8	Kommerziell verfügbare Chemikalien und Lösungsmittel	16
Tab. 9	Verwendete Instrumente und Apparaturen	19
Tab. 10	Verbrauchsmaterialien	21
Tab. 11	Bedingungen für den Doppelverdau von Plasmid-DNA	23
Tab. 12	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	30
Tab. 13	Chromatographische Parameter für IMAC	32
Tab. 14	Chromatographische Parameter für IEX an PBE 94	33
Tab. 15	Chromatographische Parameter für SEC	33
Tab. 16	Chromatographische Parameter für die analytische Gelfiltration	34
Tab. 17	Standards für die analytische Gelfiltration (Sigma)	34
Tab. 18	Umpufferung von Proteinen	34
Tab. 19	Schonende Aufkonzentrierung mit Zentrifugeneinsätzen bei 4 °C	35
Tab. 20	Pufferkits für die Proteinkristallisation	35
Tab. 21	Synthese und Reinigung von MTAN und LuxS	37
Tab. 22	Parameter der Polyaminanalyse mit HPLC	41
Tab. 23	Stationäre Computerprogramme	46
Tab. 24	Datenbanken und Computerprogramme auf Internet-Basis	46
Tab. 25	Synthesevektoren für DsPMT und deren N-terminale Verkürzungsmutanten	48
Tab. 26	Eigenschaften von MTAN und LuxS	50
Tab. 27	Reinigungstabelle für DsPMT-N-his	60
Tab. 28	Synthesevektor für DsSPDS und deren Punktmutanten	75
Tab. 29	Ausbeuten und GRAVY-Werte von DsSPDS-Mutanten	81
Tab. 30	Synthesevektoren für die chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT	83
Tab. 31	Vergleich des Inhibitor- und Substratspektrums von PMT und SPDS	93
Tab. 32	Vergleichendes Docking von PMT-Inhibitoren und Putrescin	96
Tab. 33	Kinetische Parameter von SPDS und PMT-Proteinen	100
Tab. 34	Datenbankeinträge von PMT- und SPDS-Proteinen	112

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von PMT in der Alkaloid-Biosynthese

Putrescin *N*-methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) ist eine *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferase und katalysiert die Monomethylierung des Diamins Putrescin, wobei *N*-Methylputrescin und *S*-Adenosylhomocystein (SAH) entstehen (Abb. 1). *N*-Methylputrescin wird zu 4-Methylaminobutanal oxidiert und zyklisiert spontan zum reaktiven *N*-Methylpyrrolinium-Kation. Dieses bildet den Pyrrolidinring von Nikotin und Tropanalkaloiden wie Hyoscyamin und Scopolamin (Abb. 2) (Hashimoto *et al.*, 1990; Hibi *et al.*, 1994). Die Aminosäuresequenzen von PMT-Proteinen ähneln stark denen der pflanzlichen Spermidinsynthasen (SPDS, EC 2.5.1.16). PMT und SPDS werden unter Einbeziehung der Sperminsynthasen (SPMS, EC 2.5.1.22) als Spermidinsynthase-Familie in der PROSITE-Datenbank zusammengefasst. SPDS katalysiert die Aminopropylierung von Putrescin mit decarboxyliertem *S*-Adenosylmethionin (dcSAM) als Aminopropylgruppendonator, wobei Spermidin entsteht. Eine zweite, symmetrische Aminopropylierung von Spermidin durch SPMS ergibt Spermin (Wu *et al.*, 2008).

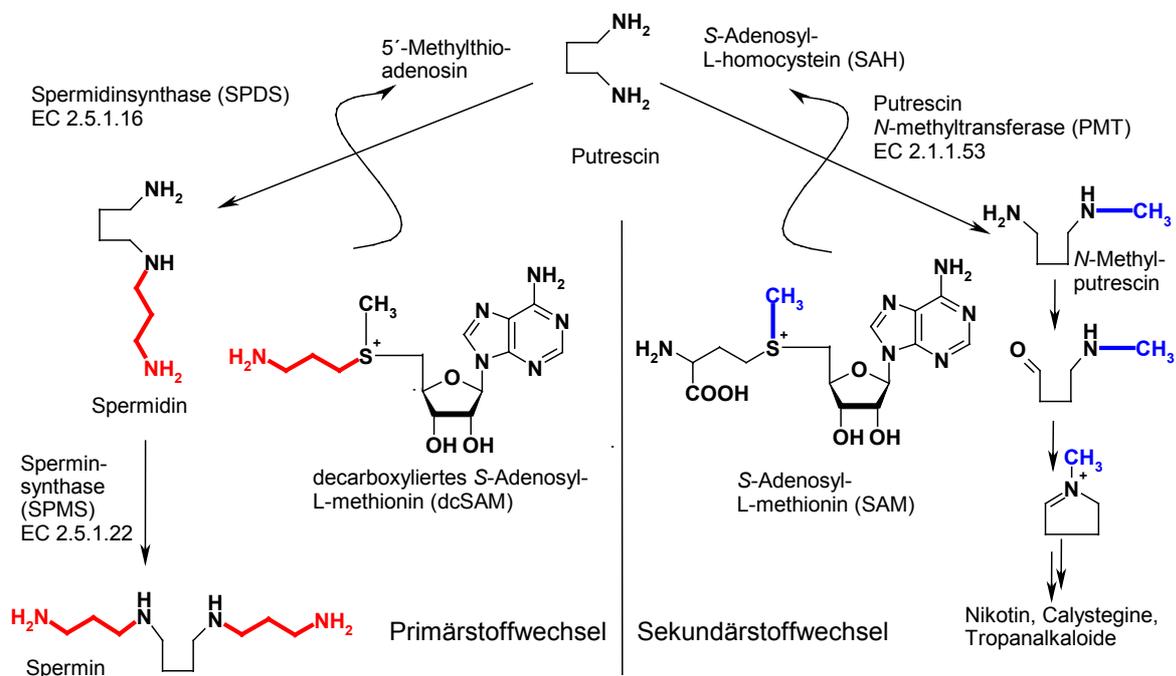


Abb. 1 Von Putrescin ausgehende Biosynthesewege.

Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin sind Teil des Primärstoffwechsels aller Lebewesen, während der Weg über *N*-Methylputrescin zu den verschiedenen Alkaloiden bislang nur in Pflanzen der Solanaceae und Convolvulaceae nachgewiesen wurde.

Putrescin, Spermidin und Spermin gehören zur Gruppe der Polyamine, die aliphatische Kohlenstoffverbindungen mit mehreren basischen Aminogruppen darstellen. Polyamine zeigen eine große Bandbreite an verschiedenen biologischen Aktivitäten, z. B. als Zellschutzstoffe und Signalmoleküle in der Reaktion auf abiotischen Stress (Bagni & Tassoni, 2001; Rhee *et al.*, 2007; Kusano *et al.*, 2008). So wurde Spermidinsynthese aus ganz verschiedenen Organismen wie z. B. *Escherichia coli* (Bowman *et al.*, 1973), Rind, *Bos taurus* (Raina *et al.*, 1984), und Sojabohne, *Glycine max* (Yoon *et al.*, 2000), gereinigt und biochemisch charakterisiert. PMT-Aktivität wurde hingegen nur in Pflanzen detektiert. Zudem beschränkt sich dies bislang auf die Familien Solanaceae und Convolvulaceae. Zuerst fand man PMT in Wurzeln von *Nicotiana tabacum* (Mizusaki *et al.*, 1971) und später in Tropanalkaloide bildenden Solanaceae wie *Atropa belladonna* (Walton *et al.*, 1990), *Datura stramonium* (Walton *et al.*, 1990; Walton *et al.*, 1994), *Hyoscyamus albus* (Hashimoto *et al.*, 1989a; Hashimoto *et al.*, 1989b) und *Hyoscyamus niger* (Hibi *et al.*, 1992). Die erste cDNA-Sequenz einer PMT wurde aus *N. tabacum* isoliert (Hibi *et al.*, 1994). Das Produkt der PMT, *N*-Methylputrescin, wurde auch in Kartoffelkeimen (*Solanum tuberosum*) entdeckt. Diese Pflanze enthält weder Nikotin noch Tropanalkaloide, sondern eine Gruppe von Nortropanalkaloiden, die als Calystegine bezeichnet werden (Keiner & Dräger, 2000; Stenzel *et al.*, 2006).

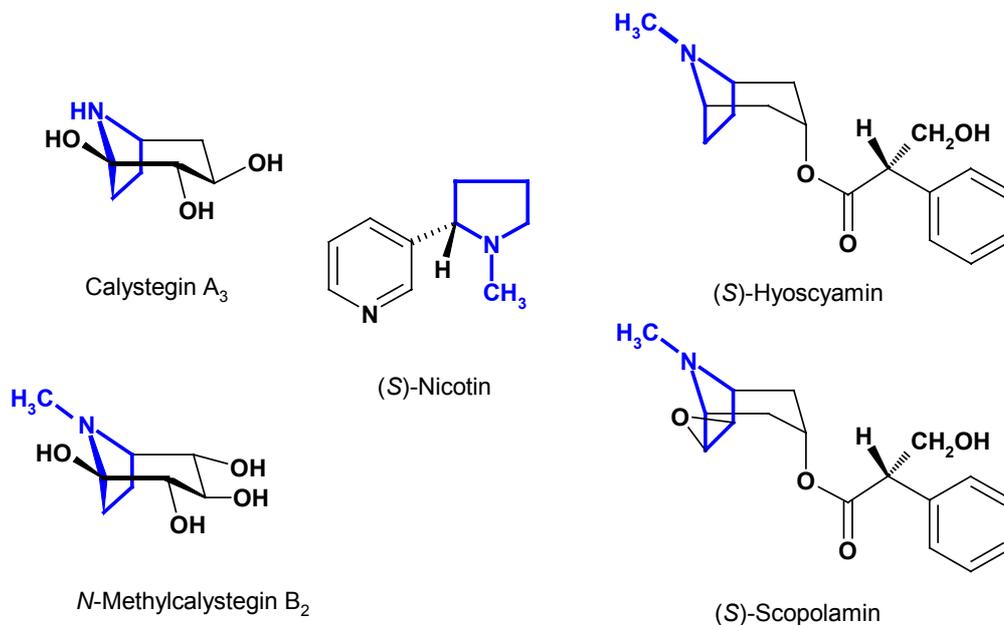


Abb. 2 Beispiele für Pflanzenalkaloide, die unter Beteiligung der PMT gebildet werden.

Der (*N*-Methyl)pyrrolidinring ist blau markiert. Bei Nortropanalkaloiden wie Calystegin A₃ wird eine spätere Demethylierung vermutet (Scholl *et al.*, 2001).

Calystegine (Abb. 2) sind ausgesprochen hydrophile, unveresterte Nortropanalkaloide mit drei bis fünf Hydroxylgruppen (entsprechende Gruppen A, B, C) und einer verbrückten Halbaminalstruktur (Dräger, 2004; Biastoff & Dräger, 2007). Diese Alkaloide wurden erstmals in der namensgebenden Pflanze *Calystegia sepium* und in *Convolvulus arvensis* (beide Convolvulaceae) entdeckt (Tepfer *et al.*, 1988). Die Isolierung einer PMT cDNA aus *S. tuberosum* belegte die Beteiligung dieses Enzyms an der Calysteginbiosynthese (Stenzel *et al.*, 2006). Weitere cDNA-Sequenzen wurden aus fünf Calystegine bildenden Pflanzen isoliert: *Solanum lycopersicum*, *Datura innoxia*, *D. stramonium*, *Physalis divaricata* (alle Solanaceae) und *C. sepium* als erste PMT der Convolvulaceae (Teuber *et al.*, 2007). Auch in *Solanum dulcamara* wurde eine PMT gefunden und das Vorkommen der Calystegine A₃, A₅, B₁ und B₂ nachgewiesen (Teuber *et al.*, 2007; Freydank *et al.*, 2008). Die wiederholten Funde von PMT in der Gattung *Solanum*, in deren Vertretern zwar Steroidalkaloide und Calystegine, nicht aber Hyoscyamin oder Scopolamin vorkommen, untermauern die Beteiligung des Enzyms an der Calysteginbiosynthese. Kürzlich wurden zwei weitere PMT-Sequenzen in der chinesischen Arzneipflanze *Anisodus acutangulus* (Solanaceae) identifiziert, in der die Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin vorkommen (Kai *et al.*, 2009).

1.2 Sequenzähnlichkeit von SPDS und PMT

In der Vergangenheit war die cDNA-Suche nach *pmt*-Genen stets mit dem Problem verbunden, dass man ungewollt *spds*-Sequenzen aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit isolierte. Auf der Ebene der Aminosäuren ergab sich eine durchschnittliche Identität von ca. 65 % (Hashimoto *et al.*, 1998a; Stenzel *et al.*, 2006). Die Klonierung zahlreicher PMT-Sequenzen erlaubte schließlich die Festlegung von vier PMT-spezifischen Motiven mit einer Länge von 11 bis 14 Aminosäuren (Abb. 3), die das Ableiten von spezifischen PCR-Primern zur selektiven Amplifizierung von *pmt*-Fragmenten wesentlich erleichterten (Teuber *et al.*, 2007). Ohne diese Motive waren zum einen zahlreiche empirische PCR-Anläufe zur Isolierung von *pmt*-Ganzlängenklonen und zum anderen die Bestimmung der katalytischen Aktivität nach heterologer Synthese des Proteins in *E. coli* erforderlich (Liu *et al.*, 2005).

Eine Analyse von *D. stramonium* PMT (DsPMT) in PROSITE ergab die Konsensus-Signatur [VAI] - [LAV] - [LIV](2) - G - G - G - x - [GC] - x(2) - [LIVA] - x - E (PROSITE-Einträge PS01330 und PS51006), welche grundsätzlich für SPDS und SPMS sowie PMT charakteristisch ist. Sie beinhaltet das zweite der vier PMT-spezifischen Motive (IIGGGIGFTLFE in

DsPMT), wobei das zwischen den Glycinresten gelegene Isoleucin in PMT absolut konserviert und in allen SPDS-Proteinen durch Aspartat ersetzt ist (Teuber *et al.*, 2007). Die Signatur ähnelt weiterhin einem glycinreichen Motiv, das für SAM-abhängige Methyltransferasen aus Pflanzen (Joshi & Chiang, 1998; Zubieta *et al.*, 2001) bzw. für SAM-abhängige DNA-(Amino)methyltransferasen definiert wurde (Malone *et al.*, 1995). Spermidinsynthasen mit dcSAM als Co-Substrat und zahlreiche SAM-abhängige Methyltransferasen weisen eine ähnliche Proteinfaltung auf, die aus sieben β -Faltblättern und sechs darum gruppierten α -Helices besteht (Schluckebier *et al.*, 1995; Martin & McMillan, 2002). Sie gehören damit zur großen Gruppe von Enzymen mit Rossmann-Faltung als grundsätzlichem Aufbauprinzip (Kozbial & Mushegian, 2005).

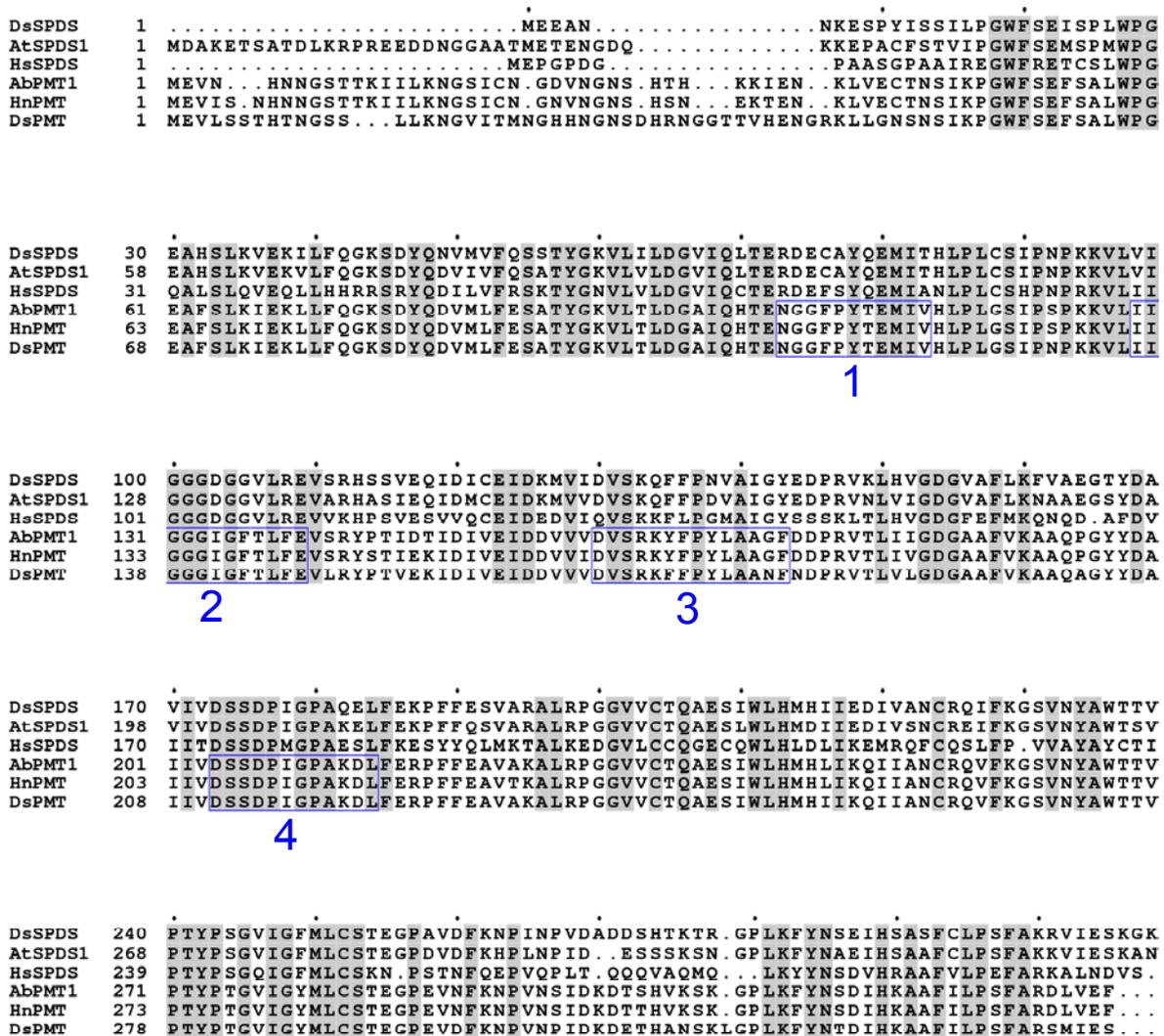


Abb. 3 Sequenzalignment relevanter SPDS- und PMT-Proteine. Identische Aminosäuren (grau), vier PMT-spezifische Aminosäuremotive (blau umrandet). *Arabidopsis thaliana* (At), *Homo sapiens* (Hs), *Atropa belladonna* (Ab), *Hyoscyamus niger* (Hn).

Aufgrund der hohen Sequenzidentität zu SPDS kann auch für PMT eine ähnliche Faltung angenommen werden. Allerdings fehlten bisher Hinweise auf die Gestalt der N-terminalen Domäne von PMT, die im Vergleich zu zahlreichen SPDS-Proteinen wie z. B. *Homo sapiens* SPDS oder *D. stramonium* SPDS1 (DsSPDS) deutlich verlängert war (Abb. 3). In den stark verlängerten N-Termini von PMTs aus *Nicotiana*-Arten finden sich zudem tandemartige Wiederholungen von Motiven aus 11 hydrophilen Aminosäuren mit bislang ungeklärter Funktion (Hashimoto *et al.*, 1998b).

1.3 PMT als Produkt einer Genduplikation

SPDS und PMT setzen das gleiche Substrat Putrescin mit den sehr ähnlichen Co-Substraten dcSAM bzw. SAM um. Neben der schon erwähnten hohen Sequenzähnlichkeit von SPDS- und PMT-Proteinen gab die ähnliche Intron-Exon-Struktur ihrer Gene Anlass zur Vermutung, dass sich *pmt* durch Duplikation und anschließenden Funktionswechsel eines *spds*-Gens entwickelte (Minguet *et al.*, 2008). Als Ursache für Genduplikationen nimmt man entweder ungleiches Crossingover, Wiedereinbau von revers transkribierter cDNA in das Genom oder Chromosomen(satz)verdopplungen an, wobei unter bestimmten Voraussetzungen die ursprüngliche Intron-Exon-Struktur erhalten bleibt (Zhang, 2003). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* liegen 65 % der enthaltenen Gene als Duplikate vor, in *Saccharomyces cerevisiae* sind es 30 % und im menschlichen Genom 38 % (Zhang, 2003). Es handelt sich aus phylogenetischer Sicht um sogenannte Paraloge, die jedoch bei Verlust ihrer Transkriptionselemente als funktionslose Pseudogene weiterexistieren können. Jeweils ein Paralog kann in einer anderen Spezies ein funktionell entsprechendes Ortholog besitzen (Knoop & Müller, 2006). Auch von *spds*-Genen finden sich in einigen Pflanzenspezies mindestens zwei funktionstüchtige Paraloge, z. B. in *A. thaliana* (Hanzawa *et al.*, 2002) und *Pisum sativum* (Alabadi & Carbonell, 1999). Die SPDS- und SPMS-Proteine aus *A. thaliana* bilden untereinander Heterodimere und können so als Polyamin-Metabolon aufgefasst werden (Panicot *et al.*, 2002). Aus *Datura stramonium* ließen sich zwei *spds*-Gene isolieren: *spds1* (GenBank-Eintrag Y08252) und *spds2* (GenBank-Eintrag Y08253) (Franceschetti *et al.*, 2004). Die kodierten Proteine DsSPDS1 (= DsSPDS) und DsSPDS2 sind zu 67 % bzw. 64 % identisch mit DsPMT (Teuber *et al.*, 2007).

Eine Genduplikation von *spds* ermöglichte neben der Evolution von *pmt*, den für alle Lebewesen essenziellen Biosyntheseweg der Polyamine Spermidin und Spermin (Abb. 1) mit einer *spds*-Kopie aufrechtzuerhalten, während das Genduplikat, das nicht aus dem Genom eliminiert wurde, frei mutieren konnte. Bemerkenswert ist, dass im Verlauf der Evolution in *Nicotiana*-Arten auch eine häufige Duplikation von *pmt* einsetzte, wobei in *N. tabacum* eine Familie von vier *pmt*-Genen entstand, die ihrerseits Rückschlüsse auf die Entstehung von kultiviertem Tabak zuließen (Riechers & Timko, 1999).

1.4 Methoden zur Messung von PMT-Aktivität

Die Bestimmung von PMT-Aktivität war in der Vergangenheit schwierig. Anfänglich wurde das Enzym wie andere Methyltransferasen in Enzymtests mit $^{14}\text{CH}_3$ -markiertem SAM inkubiert und das entstehende radioaktive *N*-Methylputrescin nach Extraktion durch Szintillationsmessungen quantitativ erfasst (Mizusaki *et al.*, 1971). Um die Arbeit mit radioaktiv markierten Substanzen zu umgehen, wurden HPLC-Methoden entwickelt, die jedoch eine chemische Derivatisierung von *N*-Methylputrescin erforderten. Zur Bestimmung kleiner Mengen biogener Amine wie Putrescin, Spermidin und Spermin in Tier- oder Pflanzengewebe wurde die Derivatisierung mit Dansylchlorid etabliert (Seiler, 1971; Smith & Davies, 1985). Der Dansylrest dient hierbei als Chromophor zur UV- oder fluorimetrischen Detektion. Auch *N*-Methylputrescin ließ sich als Dansylderivat von anderen dansylierten Polyaminen auf einer RP-18 HPLC-Säule mit Acetonitril-Wasser pH 5,2 (60:40) als mobiler Phase trennen (Feth *et al.*, 1985). Später wurde eine Gradientenmethode für dansylierte Polyamine mit Wasser-Acetonitril als Eluent entwickelt, wodurch sich die Trennleistung weiter verbesserte (Marcé *et al.*, 1995). *N*-Methylputrescin, andere Polyamine und PMT-Aktivität wurden auf diese Weise in Geweben von *S. tuberosum* bestimmt (Stenzel *et al.*, 2006). Auch die Charakterisierung von rekombinanten PMT-Enzymen gelang mit dieser Methode (Teuber *et al.*, 2007). Die HPLC-Bestimmung von *N*-Methylputrescin erforderte stets langwierige Derivatisierung und Extraktionen. Vor allem während der Proteinreinigung war ein schneller und zuverlässiger Enzymtest wünschenswert. Zudem war für die Kalibrierung des Detektors dansyliertes *N*-Methylputrescin als externer Standard notwendig. Allerdings ist *N*-Methylputrescin nicht käuflich zu erwerben. Die halbsynthetische Gewinnung des Stoffs, die von Putrescin ausgeht, ist zeitaufwendig (Feth *et al.*, 1985).

Als Alternative kann die Quantifizierung des PMT-Produkts SAH zur Bestimmung von Methyltransferase-Aktivität dienen (Hendricks *et al.*, 2004). SAH wird hierbei durch zwei Enzyme schrittweise zu Homocystein abgebaut: 5'-Methylthioadenosin/*S*-Adenosylhomocystein Nukleosidase (MTAN, EC 3.2.2.9) und *S*-Ribosylhomocystein Lyase (LuxS, EC 4.4.1.21). Homocystein reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) zu gelbem 2-Nitro-5-thiobenzoat, das sich bei 414 nm colorimetrisch bestimmen lässt.

1.5 Aufgabenstellung

Die Evolution von PMT-Proteinen in Solanaceae unter besonderer Berücksichtigung der PMT aus *Datura stramonium* (DsPMT) stand im Zentrum dieser Arbeit. Das rekombinante Protein war bereits biochemisch charakterisiert (Teuber *et al.*, 2007) und ließ sich in guter Ausbeute in *Escherichia coli* synthetisieren, wodurch die Chance zur zügigen Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse gegeben war. Für die zeitsparende und verlässliche Bestimmung von PMT-Aktivität während der mehrstufigen Proteinreinigung sollte ein Methyltransferase-Test adaptiert werden, der auf enzymatischer Umsetzung von SAH zu Homocystein und dessen colorimetrischer Erfassung beruht (Hendricks *et al.*, 2004).

Ein weiterer Ansatzpunkt der Arbeit war die Spermidinsynthase 1 aus *D. stramonium* (DsSPDS), die nach heterologer Synthese in *E. coli* für einen systematischen Vergleich mit der DsPMT biochemisch charakterisiert werden sollte. Auch hier war zuvor eine Adaption der HPLC-Methode zur Messung von Polyaminen in Enzymtests erforderlich (Stenzel *et al.*, 2006).

Ortsgerichtete Mutagenese von DsSPDS mit dem Ziel der Generierung von PMT-Aktivität in diesem Protein war neben der Kristallisation von DsPMT die zweite Strategie, um Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Evolution von SPDS zu PMT von maßgeblicher Bedeutung waren. Die Berechnung vollständiger Homologiemodelle von DsPMT und DsSPDS wurde als Voraussetzung betrachtet, um die Mutagenese von DsSPDS sinnvoll zu leiten.

Die Synthese und Charakterisierung rekombinanter, chimärer Proteine aus DsPMT und DsSPDS sowie Deletionsmutanten von DsPMT sollte zeigen, welche Proteindomänen über PMT- oder SPDS-Aktivität entscheiden bzw. überhaupt für katalytische Aktivität essenziell sind. Aktive chimäre Proteine eigneten sich auch, um eine grundsätzlich gleichartige Proteinfaltung von PMT und SPDS erstmals experimentell zu belegen.

Die Erstellung eines phylogenetischen Baumes aller verfügbaren PMT-Proteinsequenzen bot die Möglichkeit, die evolutionäre Entwicklung von PMT aus SPDS zu veranschaulichen. Anhand der Ergebnisse aus Homologiemodellierung, ortsgerichteter Mutagenese und Domänen austausch sollten die auf diesem Weg stattgefundenen strukturellen Umwandlungen geordnet und gewichtet werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob die phylogenetische Analyse die Zuordnung von neuen Sequenzen aus Solanaceae und Convolvulaceae zu PMT oder SPDS im Vorfeld einer geplanten biochemischen Charakterisierung erleichtert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme (*E. coli*)

Tab. 1 Eigenschaften der genutzten Bakterienstämme.

Bezeichnung und Hersteller	Genotyp
BL21(DE3) Novagen	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)
BL21-CodonPlus [®] (DE3)-RP Stratagene	$F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal \lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU proL Cam^r</i>]
M15[pREP4] QIAGEN	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺
One Shot [®] Top10 Invitrogen	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15$ $\Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK$ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
Rosetta-gami [™] (DE3) Novagen	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139$ <i>ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) $F' [lac^+ lacI^q pro]$ <i>gor522 :: Tn10 trxB pRARE</i> (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)
XL1-Blue Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [$F' proAB lacI^q \Delta M15 Tn10$ (Tet ^r)]

2.1.2 Leerplasmide

Tab. 2 Leerplasmide.

Amp^r = Ampicillinresistenz, Kan^r = Kanamycinresistenz, *LacZ α* = β -Galactosidase, (C) = C-terminal, (N) = N-terminal, His-Tag = (His)₆-Anhang, S-Tag = S-Protein-Anhang (104 Aminosäuren), T7-Tag = Anhang von 11 Aminosäuren zur Proteinreinigung mit monoklonalen Antikörpern.

Bezeichnung und Hersteller	Eigenschaften
pCR [®] 2.1 Invitrogen	3929 bp, Amp ^r , Kan ^r , <i>LacZα</i> -Fragment
pET-21d(+) Novagen	5440 bp, Amp ^r , T7-Tag (N), His-Tag (C)
pET-47b(+) Novagen	5203 bp, Kan ^r , His-Tag (N), S-Tag (C), Schnittstellen für HRV 3C Protease (N) und Thrombin (C)
pQE-30 QIAGEN	3461 bp, Amp ^r , His-Tag (N)

2.1.3 Oligonukleotid-Primer

Alle Primer (Tab. 3) wurden von Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, synthetisiert und als 100 µM Lösung in DEPC-Wasser bei –20 °C gelagert.

Tab. 3 Oligonukleotid-Primer.

Die Nummerierung (Nr.) bezieht sich auf die kumulative Mutagenese des *spds1*-Gens aus *D. stramonium*. Die kumulativen Aminosäureaustausche sind fett gedruckt. In den Primersequenzen sind mutierte Triplets unterstrichen und Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen fett gedruckt. FWD, Vorwärtsprimer; REV, Rückwärtsprimer. Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden mit dem Tm Calculator (Tab. 24) für Primer zur ortsgerichteten Mutagenese (Aminosäureaustausch) und mit dem Programm Omega (Tab. 23) für alle anderen Primer berechnet.

Nr.	Bezeichnung (ggf. Schnittstellen)	Sequenz (5' → 3')	T_m (°C)	
<i>pmt</i>-C-his in pET-21d				
-	DsPMT FWD NcoI (Teuber, 2008)	FWD CCATGGAAGTCTTGTCATCTACCCAC	66,0	
-	DsPMT REV XhoI (Teuber, 2008)	REV CTCGAGAGACTCTATCATACTTCTGGCAAAAGATG	69,8	
<i>pmt</i>-N-his in pQE-30				
-	DsPMT FWD BamHI (Teuber, 2008)	FWD GGATCCGAAGTCTTGTCATCTACCCAC	67,9	
-	DsPMT REV PstI (Teuber, 2008)	REV CTGCAGCTAAGACTCTATCATACTTCTGGCAAAAG	69,6	
<i>pmt</i>-Mutanten				
-	N182E	FWD CTACCTTGCGGCTAACTTTGAGGATCCTCGTGTAACCTTTGG REV CCAAAGTTACACGAGGATCCTCAAAGTTAGCCGCAAGGTAG	80,2 80,2	
-	-22-N- <i>pmt</i> in pQE-30	BamHI PstI FWD GGATCCAACGGCCACCACAATG REV CTGCAGCTAAGACTCTATCATACTTCTGGCAAAAG	70,7 69,6	
-	-54-N- <i>pmt</i> in pET-47b	XmaI XhoI FWD CCCGGGTGGTTTTTCAGAGTTTAGCG REV CTCGAGCTAAGACTCTATCATACTTCTGGCAAAAG	71,0 69,0	
<i>spds1</i>-C-his in pET-21d				
-	DsSPDS1 FWD	NcoI	FWD CCATGGAAGAAGCCAATAACAAAG	63,0
-	DsSPDS1 REV	XhoI	REV CTCGAGTTTTCTTTGGATTCAATC	63,4

Nr.	Bezeichnung (ggf. Schnittstellen)	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)
<i>spds1</i>-Mutanten			
1a	L70H	FWD GGTGTGATACAACACACAGAGCGGGATG REV CATCCCGCTCTGTGTGTTGTATCACACC	75,8 75,8
1b	D103I	FWD GTTATTGGAGGAGGTATTGGTGGTGTCTTGCGTG REV CACGCAAGACACCACCAATACCTCCTCCAATAAC	76,3 76,3
1c	Q79T	FWD GATGAATGTGCTTACACAGAAATGATCACTCATCTCC REV AGATGAGTGATCATTCTGTGTGAAGCACATTCATCCC	74,5 74,5
2	Q79T + D103I	FWD GTTATTGGAGGAGGTATTGGTGGTGTCTTGCGTG REV CACGCAAGACACCACCAATACCTCCTCCAATAAC	76,3 76,3
3	L70H + Q79T + D103I	FWD GGTGTGATACAACACACAGAGCGGGATG REV CATCCCGCTCTGTGTGTTGTATCACACC	75,8 75,8
4	L70H + E75G + Q79T + D103I	FWD CACACAGAGCGGGATGGATGTGCTTACACAGAAATG REV CATTCTGTGTAAGCACATCCATCCCGCTCTGTGTG	80,5 80,5
5	L70H + D74G + E75G + Q79T + D103I	FWD CAACACACAGAGCGGGGIGGATGTGCTTACACAGAAATG REV CATTCTGTGTAAGCACATCCACCCGCTCTGTGTGTTG	82,7 82,7
6	L70H + R73N + D74G + E75G + Q79T + D103I	FWD GGTGTGATACAACACACAGAGAACCGGTGGATGTGCTTACACAG REV CTGTGTAAGCACATCCACCGTTCTCTGTGTGTTGTATCACACC	78,8 78,8
7	L70H + R73N + D74G + E75G + C76F + Q79T + D103I	FWD CACACAGAGAACCGGTGGATTITGCTTACACAGAAATGATC REV GATCATTCTGTGTAAGCAAAATCCACCGTTCTCTGTGTG	79,5 79,5
8	L70H + R73N + D74G + E75G + C76F + A77P + Q79T + D103I	FWD CAGAGAACCGGTGGATTTCTTACACAGAAATGATCACTC REV GAGTGATCATTCTGTGTAAGGAAATCCACCGTTCTCTG	79,5 79,5
9	L70H + R73N + D74G + E75G + C76F + A77P + Q79T + D103I + G105F	FWD GTTATTGGAGGAGGTATTGGTTTTGTCTTGCGTGAGGTGTCTC REV GAGACACCTCACGCAAGACAAAACCAATACCTCCTCCAATAAC	80,2 80,2
10	L70H + R73N + D74G + E75G + C76F + A77P + Q79T + D103I + G105F + R108F	FWD GAGGTATTGGTTTTGTCTTGTTTGGAGGTGTCTCGGCATTCTTC REV GAAGAATGCCGAGACACCTCAAAACAAGACAAAACCAATACCTC	79,3 79,3

2.1.4 Kulturmedien für *E. coli*

Tab. 4 Zusammensetzung der Kulturmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl pH 7,5
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Agar. Ein geeignetes Antibiotikum (z. B. Ampicillin, Kanamycin) wurde gegebenenfalls zugesetzt.
SOB-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 6,8 – 7,0 Mg-Salze nach dem Autoklavieren zusetzen.
SOC-Medium (nach TA Cloning Kit Manual, Invitrogen)	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM D-Glucose
TB (Terrific Broth)-Medium	1,2 % Trypton 2,4 % Hefeextrakt 0,4 % Glycerol pH-Wert nicht eingestellt.

2.1.5 Wurzelkultur von *Solanum lycopersicum*

Samen von *S. lycopersicum* „Moneymaker“ wurden 10 min mit Ethanol 70 % und 5 min mit Natriumhypochlorit-Lösung (12 % aktives Chlor und 0,2 % Tween als Benetzer) sterilisiert. Die Samen quollen über Nacht bei 4 °C in sterilem Wasser und wurden auf mit 1 % Agar verfestigtem ½ MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) ohne Hormone und Saccharose ausgelegt. Wurzeln von 14 Tage alten Keimlingen wurden in 250 ml Gamborgs B5-Medium (Gamborg *et al.*, 1968) mit 3 % Saccharose und 0,4 mg/l (entspricht 4,5 µM) IBA überführt und nach zwei Wochen in hormonfreies B5-Medium umgesetzt.

Die Wurzelkulturen wurden bei 23 °C und 100 rpm unter Lichtausschluss kultiviert. Mediumproben wurden gelegentlich auf LB-Agarplatten ausgestrichen und nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C auf Abwesenheit von bakteriellen Kontaminationen geprüft. Zur Gewinnung von Gesamtprotein wurden die über 6 Wochen herangewachsenen Wurzeln geerntet.

2.1.6 Puffer und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurde entionisiertes Wasser ($\sigma = 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) als Lösungsmittel eingesetzt. Es wurde mit dem Wasseraufbereitungssystem TKA GenPure (TKA GmbH, Niederelbert) hergestellt und bei Bedarf autoklaviert. Wässrige Lösungen hitzelabiler Stoffe (z. B. Ampicillin) wurden vor Gebrauch steril filtriert (Celluloseacetat, $0,22 \mu\text{m}$). Chromatographiepuffer wurden vor Gebrauch partikelfrei filtriert (Celluloseacetat, $0,45 \mu\text{m}$). Weitere Herstellungshinweise und Lagerungsbedingungen sind bei der jeweiligen Rezeptur zu finden.

Tab. 5 Häufig gebrauchte Puffer und Reagenzien.

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
<i>10 x Laufpuffer für SDS-PAGE</i>	30,2 g Tris-Base 144,0 g Glycin 10,0 g SDS zu 1000 ml pH 8,3 (wird nicht eingestellt) Lagerung: Raumtemperatur, Lichtschutz. Für 1 x Laufpuffer für SDS-PAGE 1:10 mit Wasser verdünnen.
<i>10 x TAE-Puffer</i>	400 mM Tris-Base 200 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,6 mit Essigsäure einstellen. Für 1 x TAE-Puffer 1:10 mit Wasser verdünnen.
<i>100 x BSA</i> 10 mg/ml	New England Biolabs Lagerung: $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
<i>2 x Probenpuffer für SDS-PAGE</i>	0,09 M Tris-HCl pH 6,8 20 % (m/V) Glycerol 2 % (m/V) SDS 0,02 % (m/V) Bromphenolblau 0,1 M DTT Lagerung: $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
<i>5 x Probenpuffer für SDS-PAGE</i>	0,225 M Tris-HCl pH 6,8 50 % (m/V) Glycerol 5 % (m/V) SDS 0,05 % (m/V) Bromphenolblau 0,25 M DTT Lagerung: -20 °C.
<i>Ampicillin-Stammlösung</i> 100 mg/ml Ampicillin-Natrium	Die Lösung wird steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
<i>Chloramphenicol-Stammlösung</i> 34 mg/ml	Lösungsmittel: Ethanol 96 % (V/V). Lagerung: -20 °C.
<i>Cobalt(II)-chlorid-Lösung</i> 25 mM	Die Lösung wird steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
<i>Dansylchlorid-Lösung</i> 7,5 mg/ml	Lösungsmittel: Aceton. Lagerung: -20 °C, Lichtschutz.
<i>DEPC-Wasser</i> 0,1 % (V/V) Diethylpyrocarbonat	1 ml Diethylpyrocarbonat zu 1000 ml verdünnen, 2 h rühren und autoklavieren.
<i>dNTP-Mix 10 mM</i> 2,5 mM dATP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dTTP	Lösungsmittel: DEPC-Wasser. Lagerung: -20 °C.
<i>Ethidiumbromid-Lösung</i> 1 mg/ml	Lagerung: 4 °C, Lichtschutz.
<i>HEPES-Puffer</i> 20 mM, 50 mM oder 100 mM	Einstellung des pH-Wertes mit konz. Natronlauge. Lagerung: 4 °C.
<i>IPTG-Stammlösung</i> 100 mM oder 250 mM	Die Lösung wird steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
<i>Kanamycin-Stammlösung</i> 100 mg/ml Kanamycinsulfat	Die Lösung wird steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
<i>L-Prolin-Lösung</i> 100 mg/ml	Lagerung: -20 °C.
<i>Lysepuffer pH 8,0</i>	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol Einstellung des pH-Wertes mit konz. Natronlauge. Lagerung: 4 °C.
<i>Natriumcarbonatlösung, gesättigt</i>	Na ₂ CO ₃ , wasserfrei, wird in Wasser gelöst, bis ein unlöslicher Bodensatz entsteht.
<i>Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow</i>	GE Healthcare
<i>PageBlue Protein Staining Solution</i>	Fermentas

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
<i>Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of histidine-tagged proteins, DMSO solution</i>	Sigma-Aldrich
<i>Putrescin-Stammlösung</i> 1 M Putrescin-Base	Verdünnung zu 1 mM, 10 mM Lagerung: -20 °C.
<i>SAH-Stammlösung</i> 2 mM	Lösung in 100 mM HEPES pH 8,0 Photometrische Konzentrationsbestimmung ($\lambda = 260$ nm, $A^{1\text{mM}} = 15,4$ gegen Puffer, nach Herstellerangabe).
<i>SAM-Stammlösung</i>	Photometrische Konzentrationsbestimmung, $\lambda = 258$ nm, $A^{1\text{mM}} = 15,0$ gegen Wasser (Follmann <i>et al.</i> , 1975). Verdünnung zu 1 mM, 10 mM, Lag.: -20 °C.
<i>Stopp-Puffer</i>	200 mM EDTA pH 8,0 50 % (V/V) Glycerol 0,2 % Bromphenolblau Lagerung: 4 °C.
<i>X-Gal-Lösung</i> 40 mg/ml	Lösungsmittel: <i>N,N</i> -Dimethylformamid. Lagerung: -20 °C, Lichtschutz.

2.1.7 Enzyme

Tab. 6 Kommerziell verfügbare Enzympräparationen.

Enzym	Hersteller
BamHI (20 U/ μ l)	New England Biolabs
DNase I aus Rinderpankreas (1420 U/mg)	Fluka
HRV 3C Protease, rekombinant (2 U/ μ l)	Novagen
Lysozym BioChemica (20000 U/mg)	AppliChem
NcoI (10 U/ μ l)	New England Biolabs
Pfu DNA Polymerase, rekombinant (2,5 U/ μ l)	Fermentas
PstI (15 U/ μ l)	GE Healthcare
T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	Fermentas
Taq DNA Polymerase, rekombinant (1 U/ μ l)	Fermentas
XhoI (20 U/ μ l)	New England Biolabs
XmaI (10 U/ μ l)	New England Biolabs

2.1.8 Kits und Marker

Tab. 7 Kits und Marker für DNA und Proteine.

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TA Cloning® Kit	Invitrogen
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

2.1.9 Chemikalien

Tab. 8 Kommerziell verfügbare Chemikalien und Lösungsmittel.

Substanz	Qualität	Hersteller
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	≥ 99,5 %, Pufferqualität	AppliChem
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	≥ 97,5 %	Fluka
Aceton	≥ 99,5 %, chem. rein	Roth
Acetonitril HiPerSolv	99,9 %, gradient grade	VWR Prolabo
Acrylamid	≥ 99 %	AppliChem
Agar	für die Bakteriologie	AppliChem
Agarose	peqGold Universal	peqLab Biotech
Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	≥ 98 %	Serva
Ammoniaklösung 25 %	≥ 25 %, p.a.	Roth
Ammoniumnitrat	reinst	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	≥ 98 %, p.a.	Merck
Ammoniumsulfat	analytical grade	Serva
Ampicillin (Natrium-Salz)	≥ 99 %	AppliChem
Ascorbinsäure	reinst	AppliChem
Borsäure	p.a.	Merck
Bromphenolblau	research grade	Serva
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	für Molekularbiologie	Calbiochem
Chloramphenicol	research grade	Serva
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ · 6 H ₂ O)	≥ 98 %	Serva

Substanz	Qualität	Hersteller
Coomassie Brilliant Blau G-250	≥ 91 %	Serva
Coomassie Brilliant Blau R-250	reinst	Serva
Dansylchlorid	≥ 98 %	AppliChem
dATP	100 mM Lösung	Roth
dCTP	100 mM Lösung	Roth
dGTP	100 mM Lösung	Roth
Diethylether	≥ 99 %, p.a.	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	≥ 97 %	AppliChem
Dikaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	≥ 99 %, p.a.	Roth
Dimethylformamid	research grade	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥ 99,9 %	Sigma
Dinatriummethylenediamintetraessigsäure-Dihydrat (Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O)	≥ 99 %, p.a.	isocommerz
Dithiothreitol (DTT)	≥ 99,5 %	AppliChem
dTTP	100 mM Lösung	Roth
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat (FeSO ₄ · 7 H ₂ O)	> 99 %	Aldrich
Essigsäure	99-100 %	Roth
Ethanol, unvergällt	96 % (V/V), reinst	Roth
Ethanol, vergällt mit ca. 1 % MEK	96 % (V/V)	Roth
Ethidiumbromid-Lösung, wässrig	10 mg/ml	Sigma
Glucose-Monohydrat	≥ 99 %	Fluka
Glycerol, wasserfrei	≥ 98 %	Roth
Glycin	≥ 99,5 %, electrophoresis grade	ICN Biomedicals
Guanidiniumchlorid	≥ 98 %, reinst	AppliChem
Hefeextrakt	BioChemica	AppliChem
Homocystein	≥ 95,0 %, purum	Fluka
Imidazol	≥ 99 %	AppliChem
Indol-3-buttersäure (IBA)	≥ 99 %	Roth
Isopropylalkohol	reinst	Roth
Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid (IPTG)	Dioxan frei	Fermentas
Kaliumchlorid (KCl)	rein	Laborchemie Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	reinst, kristallin	Merck
Kaliumiodid	≥ 99,5 %, p.a.	Merck

Substanz	Qualität	Hersteller
Kaliumnitrat	reinst	Merck
Kanamycinsulfat	k.A.	Medexport
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	reinst, p.a.	Laborchemie Apolda
L-Prolin	$\geq 99 \%$	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	99,9 %	Sigma
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	$\geq 99 \%$, p.a.	Roth
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	analytical grade	Serva
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	für Pflanzenzellkultur	Sigma
Methanol	reinst	Roth
<i>myo</i> -Inositol (<i>meso</i> -Inosit)	$\geq 99 \%$	Merck
<i>N,N'</i> -Methylen-Bisacrylamid	research grade	Serva
Natriumacetat-Trihydrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)	min. 99 %	Laborchemie Apolda
Natriumcarbonat (Na_2CO_3), wasserfrei	p.a.	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	$\geq 99,9 \%$	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	$\geq 98 \%$, Ph. Eur.	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$> 97 \%$	Biomol
Natriumhydroxid (NaOH)	rein	Chemapol Praha
Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung	12 % Chlor	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	min. 99,0 %	Chemapol Praha
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat ($\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	$\geq 99 \%$, p.a.	Roth
Nicotinsäureamid	research grade	Serva
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	$\geq 99 \%$	Roth
Phosphorsäure 85 % (m/m)	reinst zur Analyse	Laborchemie Apolda
Piperazin-1,4-diethansulfonsäure (PIPES)	99 %	Merck
Poly(vinylpyrrolidon) (PVPP)	-	Sigma
Putrescin-Base	98 %	Sigma
Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆)	min. 99 %	AppliChem
Saccharose	$\geq 99,5 \%$, p.a.	Roth
<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein	99,8 %	Sigma

Substanz	Qualität	Hersteller
S-Adenosyl-L-methionin-chlorid	ca. 70 %	Sigma
Salzsäure	37 %	Roth
Spermidin-Trihydrochlorid	> 99 %	Merck
Spermin-Base	> 97 %	Merck
Stickstoff (N ₂), flüssig	≥ 99,8 % (V/V)	Air Liquide
Stickstoff (N ₂), gasförmig	5.0	Air Liquide
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	> 99 %	Fluka
Thiamin-HCl (Vitamin B ₁)	> 98,5 %	Roth
Toluol	99,99 %	Fisher Scientific
Trichloressigsäure	≥ 99 %	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	≥ 99,7 %, p.a.	Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	≥ 99 %	Boehringer Mannheim
Trypton (Caseinhydrolysat)	pankreatisch verdaut	Roth
Tween 80	BioChemica	AppliChem
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO ₄ · 7 H ₂ O)	für Pflanzenzellkultur	Sigma

2.1.10 Instrumente und Apparaturen

Tab. 9 Verwendete Instrumente und Apparaturen.

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	Standard Power Pack P25 Electrophoresis Power Supply PS 3002	Biometra GIBCOBRL Life Technologies
Brutschrank	B 6060	Heraeus Instruments
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik
DNA Speed Vac	DNA110	Savant
Flaschendruckminderer	Stickstoff, 200 bar → max. 10 bar	Elgas
Gel-Fotografie		
<i>Transilluminator (312 nm)</i>	TC-312A	Spectroline
<i>Videokamera Modul</i>	CCD Ser.-Nr.: 993249	Ltf-Labortechnik
<i>Videokopie Prozessor</i>	P91E	Mitsubishi
HPLC		
<i>Elite LaChrom</i>	Pumpe L-2130 Autosampler L-2200 Dioden-Array-Detektor L-2450 Säulenofen Jetstream 2	VWR Hitachi W.O. Electronics

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Inkubatorschüttler	3032 Innova 4230	GFL New Brunswick Scientific
Kühlschränke -80 °C 4 bis 8 °C, für die Chromatographie	Herafreeze HFU586STD-V14 Queue	Heraeus Instruments Nunc
Magnetheizrührer	IKAMAG RET	IKA Labortechnik
Mikroplatten-Lesegerät	Multiskan Ascent	ThermoLabsystems
Mikrowelle	Typ 700	Severin
pH-Messgerät	MV 870	Präcitronic
Kolbenhubpipetten 20 µl, 200 µl, 1000 µl 2,5 µl, 10 µl, 5000 µl	Labmate Research	ABIMED eppendorf
Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Unipack 250 Power Supply	Uniequip
Proteinchromatographie <i>ÄKTAexplorer 100</i>	Pumpe P-900 pH/Leitfähigkeitsmesser pH/C-900 UV-Detektor UV-900 Fraktionssammler Frac-900	Pharmacia Biotech
Proteinkristallisation <i>Pipettierroboter mit Software Feuchtigkeitsvernebler Kaltlichtmikroskop Plattenimager</i>	Cartesian Dispensing Systems MicroSys SQ AxSys Ver81.4 Humidifier Ultrasonic HM 480 KL 1500 LCD Oasis Imager LS 3	Genomic Solutions Genomic Solutions Genomic Solutions Leica Veeco
Röntgenstrukturanalyse <i>Röntgenstrahlungs- generator Detektor</i>	MicroMax™-007 HF microfocus R-AXIS IV++	Rigaku Rigaku
Schlauchpumpe	Pump P-1	Pharmacia Biotech
Schüttler	3005 Swip VKS 75	GFL Fa. Edmund Bühler
Sicherheitswerkbank	LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments
Speed Vac	RVC 2-25 Kühlfalle CT 02-50 Membran-Vakuumpumpe MZ 2C	Christ Christ Vacuubrand
Thermocycler für PCR	T3	Biometra
Thermoschüttler	5436 Vortemp 56	eppendorf Uniequip

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Trockenschrank	UM 500	Memmert
Ultraschallbad	Sonorex TK 52 Sonorex RK 100	Bandelin Bandelin
Ultraschallcycler	Sonifier 250	Branson
UV/VIS Spektralphotometer		
<i>DNA/RNA Spektrometer</i>	GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech
<i>Einstrahlphotometer</i>	Ultrospec III	Pharmacia LKB
<i>Zweistrahphotometer</i>	UV-160A	Shimadzu
Vortex-Mixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen		
<i>Analysenwaage</i>	BP 210S	Sartorius
<i>Feinwaage</i>	MC1 Backweigher LC 220S-00DC	Sartorius
<i>Laborwaage</i>	MC1 Laboratory LC 2200	Sartorius
Zentrifugen		
<i>Kühlzentrifuge</i>	Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
<i>Kühlzentrifuge</i>	GS-15R Centrifuge	Beckman
<i>Kühlzentrifuge</i>	Sigma 3K12	B.Braun Biotech
<i>Tischzentrifuge</i>	Biofuge fresco	Heraeus Instruments
<i>Minizentrifuge</i>	DW-41	Qualitron

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Tab. 10 Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Cellophan 325 P / 0,023 mm dick	Pütz Folien, Taunusstein
Filterspitzen 10E, 20, 100, 200, 1000(G)	Greiner bio-one
Kristallisationsplatte 96-Well CrystalQuick™, Polystyrol, quadratische Wells, flacher Boden	Greiner bio-one
Kristallisationsplatte CombiClover™	Emerald BioSystems
Membranfilter Celluloseacetat Typ 111, 47 mm Durchmesser	Sartorius
Mikroplatten F-Form, Polystyrol, mit Deckel	Diagonal
Papierfilter Typ 289, 80 g/m ² , 70 mm Durchmesser	Sartorius
Parafilm M	American National Can
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml Safe-Lock	eppendorf
Petrischalen, steril, Polystyrol, 10 cm Durchmesser	Diagonal
Plastibrand® UV-Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Brand
Polystyrol-Küvetten 1,5 ml halbmikro	Diagonal
Probenflaschen mit Gewinde ND8, Klarglas, 1,5 ml	VWR

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml Safe-Lock	eppendorf
Reaktionsgefäße Biopur [®] 1,5 ml Safe-Lock, RNase-frei	eppendorf
Schraubkappen, Polypropylen, ND8, mit zentralem Loch 5,5 mm	VWR
Septa ND8, Silikon weiß/PTFE blau, geschlitzt	VWR
Spritzen BD Plastipak [™] 2 ml	Becton Dickinson
Spritzen Omnifix [®] 10 ml, 50 ml	B.Braun
Spritzenvorsatzfilter Celluloseacetat 0,2 µm FP 030/3 Rotrand	Whatman
Spritzenvorsatzfilter Celluloseacetat 0,45 µm FP 030/2 Weißrand	Whatman
Universalindikatorpapier pH 1 bis 11	Feinchemie Sebnitz
Zentrifugentubes, konisch, Polypropylen, steril, 15 ml, 50 ml	Diagonal

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden One Shot[®] Top 10 und XL1-Blue Zellen (Tab. 1) in LB-Medium kultiviert (37 °C, 150 rpm, > 16 Stunden). Die Art und Menge des zugesetzten Antibiotikums (50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) richtete sich nach dem im Plasmid enthaltenen Resistenzgen (Tab. 2). Nach der Ernte der Bakterien (Zentrifugation bei 4500 g, 4 °C, 15 min) wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Kulturvolumen 5-15 ml) oder dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (Kulturvolumen 50 ml) isoliert. Sie wurde schließlich in je 30 µl sterilem Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit dem GeneQuant II DNA/RNA Calculator gemessen. Dazu wurde eine Quarzküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm, Füllvolumen 60 µl) mit der DNA-Lösung gefüllt und die Absorption A bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser gemessen. Vor allem die Purin-Gerüste der organischen Basen Adenin und Guanin absorbieren UV-Licht bei dieser Wellenlänge. Die zweite Messung bei 280 nm erfasst Protein-Verunreinigungen und ermöglicht die Berechnung des Quotienten A_{260}/A_{280} , der über 1,5 liegen sollte. Die gemessene Absorption bei 260 nm wurde vom Gerät unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in die DNA-Konzentration c [µg/ml] umgerechnet. Als Berech-

nungsgrundlage wurde das Lambert-Beersche Gesetz ($A = \varepsilon \cdot c \cdot d$) verwendet. Der Absorptionskoeffizient ε_{260} beträgt für dsDNA $0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau diente zur Gewinnung von Inserts und Vektorfragmenten zur späteren Ligation (Umklonierung) und zur Kontrolle von Synthesevektoren auf korrekte Zusammensetzung. Hierzu wurden die Restriktionsendonukleasen BamHI, PstI, NcoI, XhoI und XmaI (Tab. 6) alleine oder in Kombination (Doppolverdau, Tab. 11) mit 1-2 μg Plasmid-DNA in Ansätzen von 20 μl für ca. 2 Stunden inkubiert. Weitere Bedingungen wie Puffer (New England Biolabs), Temperatur und Zusatz von BSA wurden mit dem Double Digest Finder (Tab. 24) ermittelt.

Tab. 11 Bedingungen für den Doppolverdau von Plasmid-DNA.

Enzymkombination	Bedingungen (Puffer, Zusätze, Temperatur)
BamHI und NcoI	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9 (NEBuffer 3); 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; 37 °C
BamHI und PstI	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9 (NEBuffer BamHI); 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; 37 °C
NcoI und XhoI	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9 (NEBuffer 2); 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; 37 °C
XhoI und XmaI	50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat 1 mM DTT (NEBuffer 4), pH 7,9; 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; 37 °C

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau, PCR-Produkte oder Plasmide lassen sich mit der Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe auftrennen und hiermit von anderen Probenbestandteilen befreien. Die Gele bestanden aus 1,5 % (m/m) Agarose in 1 x TAE-Puffer. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1-2 μl Stopp-Puffer gemischt, und das Gel bei einer Spannung von 60-70 V in 1 x TAE-Puffer horizontal entwickelt. Es wurde in einem Ethidiumbromid-Bad (5 mg/l in 1 x TAE-Puffer) gefärbt, wodurch DNA-Banden im UV-Licht (312 nm) sichtbar wurden.

2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aus Agarosegelen ausgeschnittene DNA-Banden wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert und schließlich in je 30 μl sterilem Wasser eluiert. DNA-Fragmente mit

klebrigen Enden wurden unverzüglich weiterverarbeitet, um Abbau der Nukleotidüberhänge zu vermeiden.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Allgemeinen wurde für die Isolierung von Inserts 1 µg Plasmid verdaut (2.2.3) und die Insert-DNA nach Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) und Extraktion aus dem Gel (2.2.5) in 30 µl sterilem Wasser eluiert. Genauso wurde verfahren, um 1 µg Leervektor zu verdauen und damit zu linearisieren. Hiervon wurden nun zwei Ligationsansätze **A** und **B** hergestellt (Schema 1). Gelingt die Ligation damit nicht, wurde die Menge an T4-Ligase sowie die Konzentrationen von Insert und linearisiertem Leervektor im Ansatz verdoppelt. Hierzu wurden je 2 µg Ausgangsplasmid verdaut und wie beschrieben weiterbehandelt.

Schema 1 Zusammensetzung und Ablauf der Ligation.

	A	B
Insert	7,5 µl	13,0 µl
Leervektor, linearisiert	3,0 µl	3,0 µl
10 x T4-Ligase-Puffer ^a		2,0 µl
T4-Ligase (1 U/µl)		1,0 µl
steriles Wasser		zu 20,0 µl
<hr/>		
Ligation	22 °C, 2 h (oder länger)	
Inaktivierung	65 °C, 10 min	

^a 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8.

2.2.7 TA-Klonierung

PCR-Produkte wurden mithilfe des TA Cloning[®] Kit in geöffneten pCR[®]2.1 Vektor (Tab. 2) ligiert. Sofern das PCR-Produkt glatte Enden besaß, die immer bei PCR mit Pfu DNA Polymerase generiert werden, wurde es vor der Ligation mit Taq DNA Polymerase inkubiert (1 U Polymerase auf 50 µl PCR-Ansatz, 15 min, 72 °C). Somit wurden 3'-Adenin-Überhänge am PCR-Produkt gebildet, die an 3'-Thymin-Überhänge des geöffneten pCR[®]2.1 Vektors komplementär binden können.

2.2.8 PCR

Innerhalb dieser Arbeit wurden drei verschiedene PCR-Methoden eingesetzt: (1) Die PCR mit Pfu DNA Polymerase diente zur fehlerfreien Amplifizierung der *pmt*-Konstrukte und *pmt*-Deletionsmutanten. (2) Die Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase diente zur Kontrolle von Bakterienkolonien auf erfolgreiche Transformation. (3) Die Mutagenese-PCR diente zum Austausch von Nukleotiden bzw. Triplets in *pmt* und *spds1* aus *D. stramonium* (ortsgerichtete Mutagenese).

2.2.8.1 PCR mit Pfu DNA Polymerase

Das Reaktionsvolumen betrug hier 50 μ l. Negativkontrollen mit DEPC-Wasser anstelle der DNA-Matrize wurden stets mitgeführt. Die Zusammensetzung sowie das Temperaturprogramm der Pfu-PCR sind in Schema 2 dargestellt.

Schema 2 Zusammensetzung und Ablauf der PCR mit Pfu DNA Polymerase.

DNA-Matrize	bis zu 100 ng	
Vorwärtsprimer	1 μ M	
Rückwärtsprimer	1 μ M	
10 x Pfu-PCR-Puffer ^a	5,0 μ l	
dNTP-Mix 10 mM	4,0 μ l (200 μ M pro Spezies)	
Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	1,25 U	
DEPC-Wasser	zu 50,0 μ l	
<hr/>		
<i>initiale Denaturierung</i>	95 °C	2 min
zyklische Denaturierung	95 °C	50 s
34 x Primeranlagerung ^b	$T_m - n$ °C	50 s
zyklische Verlängerung	72 °C	3 min
<i>abschließende Verlängerung</i>	72 °C	5 min

^a 200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO₄, pH 8,8; ^b Die Schmelztemperaturen T_m aller Primer sind in Tab. 3 wiedergegeben; $5 \leq n \leq 8$.

2.2.8.2 Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase

Zunächst wurde eine Bakterienkolonie in 10 μ l sterilem Wasser suspendiert, 10 min bei 99 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Negativkontrollen mit 10 μ l sterilem Wasser anstelle von Bakteriensuspension wurden stets mitgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 μ l. Die

Zusammensetzung sowie das Temperaturprogramm der Kolonie-PCR sind in Schema 3 dargestellt.

Schema 3 Zusammensetzung und Ablauf der Kolonie-PCR.

Bakteriensuspension (Probe)	10 μ l
Vorwärtsprimer	2 μ M
Rückwärtsprimer	2 μ M
10 x PCR-Puffer ^a	2,5 μ l
dNTP-Mix 10 mM	2,0 μ l (200 μ M pro Spezies)
Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	0,5 U
DEPC-Wasser	zu 25,0 μ l
<hr/>	
<i>initiale Denaturierung</i>	95 °C 5 min
zyklische Denaturierung	95 °C 1 min
34 x Primeranlagerung ^b	$T_m - n$ °C 30 s
zyklische Verlängerung	72 °C 1-1,5 min
<i>abschließende Verlängerung</i>	72 °C 10 min

^a 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,0; ^b Die Schmelztemperaturen T_m aller Primer sind in Tab. 3 wiedergegeben; $5 \leq n \leq 8$.

2.2.8.3 Mutagenese-PCR

Hierzu wurde das QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 μ l. Matrize für die Mutagenese-PCR war stets eine Präparation des Vektors pET-21d(+) mit *D. stramonium pmt* oder *spds1* (bzw. *spds1*-Mutanten) aus One Shot[®] Top 10 oder XL1-Blue Zellen. Der Vektor wurde während der PCR unter Einbau der Mutageneseprimer vollständig amplifiziert. Die Mutageneseprimer wurden den folgenden Anforderungen angepasst: Länge 25-45 bp; $T_m \geq 78$ °C; mittlere Lage der Mutation mit mindestens 10-15 bp Abstand zu den Enden, die möglichst mit C oder G abschlossen; mindestens 40 % GC-Anteil. Die Matrize (aus *E. coli*) war außerdem methyliert, während das mutierte Amplifikat unmethyliert war. Die Matrize wurde deshalb mit dem Restriktionsenzym DpnI nach der PCR selektiv und vollständig verdaut (Schema 4). Das mutierte Vektor-Amplifikat wurde dann zur Transformation von One Shot[®] Top 10 oder XL1-Blue Zellen eingesetzt.

Schema 4 Zusammensetzung und Ablauf der Mutagenese-PCR.

Matrize		25 ng
Vorwärtsprimer		62,5 ng
Rückwärtsprimer		62,5 ng
10 x Mutagenesepuffer ^a		2,5 µl
dNTP-Mix ^a		0,5 µl
Pfu Ultra HF DNA Polymerase (2,5 U/µl) ^a		1,25 U
DEPC-Wasser		zu 25,0 µl
<hr/>		
<i>initiale Denaturierung</i>		95 °C 30 s
12 oder 16 Zyklen ^b	zyklische Denaturierung	95 °C 30 s
	Primeranlagerung	55 °C 1 min
	zyklische Verlängerung	68 °C 8 min
<i>Abkühlen</i>		4 °C variabel
<hr/>		
DpnI ^a		0,5 µl
<i>Verdau</i>		37 °C 3 h

^a im QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit enthalten; ^b Punktmutation: 12 Zyklen, Austausch von 2 oder 3 Basen im Triplet: 16 Zyklen.

2.2.9 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Hierzu wurden 250 ml SOB-Medium mit 10-12 Kolonien von einer frisch bewachsenen LB-Agarplatte angeimpft und bei 200-250 rpm und 18-25 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,45-0,75 wurde die Kulturflüssigkeit in sterile Zentrifugenbecher überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1000 g. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette vollständig abgenommen. Der Zellschlag wurde in 80 ml TFB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (wie oben beschrieben) und der vollständigen Abnahme des TFB-Puffers wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml TFB-Puffer suspendiert, mit 1,5 ml DMSO versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde portioniert, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB-Puffer

10 mM PIPES pH 6,7

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

55 mM MnCl₂

Das MnCl₂ wird erst nach der Einstellung des pH-Wertes zugegeben. Der Puffer wird steril filtriert.

2.2.10 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Zellen wurden auf Eis angetaut. Anschließend wurde 1 µl einer Plasmidpräparation oder 1-5 µl des Ligationsansatzes auf 50-250 µl kompetente Zellen gegeben. Das Temperaturprotokoll (TA Cloning[®] Kit) beinhaltete die Wärmebehandlung der Zellen (42 °C, 30 s) und die nachfolgende Inkubation mit SOC-Medium bei 37 °C.

LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin wurden für die Selektion transformierter *E. coli* verwendet (vgl. Tab. 2). Wenn One Shot[®] Top 10 und XL1-Blue Zellen mit pCR[®]2.1 transformiert waren, bestand auch die Möglichkeit des Blau-Weiß-Screenings. Hierzu wurde die Agarplatte vor dem Ausstreichen der Zellen mit 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl X-Gal-Lösung 40 mg/ml imprägniert (bei Top 10 nur X-Gal-Lösung) und 1 h stehen gelassen. Nach dem Ausstreichen von 50-200 µl Bakteriensuspension pro Platte wurde diese für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit Kolonie-PCR (2.2.8.2) analysiert und in einer Flüssigkultur weitervermehrt (2.2.1). Nach Isolation der Plasmid-DNA (2.2.1) wurde diese sequenziert.

2.2.11 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, übernommen.

2.2.12 Glycerolkultur

0,85 ml einer über 16 h gewachsenen Flüssigkultur (2.2.1) und 0,15 ml steriles Glycerol wurden gemischt und bei –80 °C eingefroren.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinsynthese in *E. coli*

2.3.1.1 Vorkultur

50 ml TB-Medium (oder LB-Medium für die Synthese von LuxS und MTAN) (Tab. 4), dem zur Unterstützung des Synthesevektors ein passendes Antibiotikum zugesetzt war, wurden mit transformierten *E. coli* inokuliert. Vorkulturen von BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RP Zellen enthielten auch 50 µg/ml Chloramphenicol. Alle Vorkulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt.

2.3.1.2 Hauptkultur und Ernte

10-15 ml der Vorkultur wurden mit 250 ml des gleichen Mediums verdünnt. Auch hier wurde zur Unterstützung des Synthesevektors ein passendes Antibiotikum zugesetzt. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, bis die OD₆₀₀ bei 0,8-1,0 lag. Dann wurde die Proteinsynthese mit 1 mM IPTG induziert. Wenn es sich um LuxS synthetisierende Bakterien handelte, wurden gleichzeitig 100 µM CoCl₂ zugesetzt, um den Einbau von Co²⁺ als Zentral-Ion gegenüber Fe²⁺ zu begünstigen. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität von Co-LuxS höher ist als die von Fe-LuxS (Zhu *et al.*, 2003). Die optimale Induktionsdauer wurde für alle Proteine ermittelt und lag bei 4-6 h. Die Bakterienfrischmassen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 4225 g) vom Kulturmedium abgetrennt. Die Zelniederschläge wurden ausgewogen und bei -80 °C eingefroren bzw. direkt in Lysepuffer pH 8,0 resuspendiert.

2.3.1.3 Bakterienlyse unter nativen Bedingungen

E. coli Zellen aus 250 ml Kultur wurden in 10 ml Lysepuffer pH 8,0 resuspendiert, dem vor Gebrauch ca. 75 µl Proteasehemmer-Cocktail für Proteine mit His-Tag (Sigma) zugesetzt wurden. Die Suspension wurde mit 800 µg/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert, woran sich die Lyse mit einem Ultraschall-Cycler anschloss (Branson Sonifier, Zeit: 45 s, Takt: 50 %, Leistungsabgabe: Stufe 1). Die Viskosität des Lysats wurde durch Zusatz von 5-10 µg/ml DNase I gesenkt. Nach der Zentrifugation (40 min, 15000 g, 4 °C) und Filtration (0,45 µm Celluloseacetat) stand das Rohlysat für die Proteinreinigung zur Verfügung.

2.3.2 SDS-PAGE

Die denaturierende SDS-PAGE (Laemmli, 1970) dient zur Beurteilung von Molekulargewicht, Reinheit und Stabilität von Proteinen sowie insbesondere zur Überprüfung einzelner Proteinreinigungsschritte. Hierzu wurden die Proteinproben im Verhältnis 1 : 2 mit 2 x Probenpuffer für die SDS-PAGE verdünnt. Bei geringer Proteinkonzentration wurden sie im Verhältnis 4 : 5 mit 5 x Probenpuffer für die SDS-PAGE gemischt. Die Gemische wurden für 3-10 min bei 95 °C erhitzt und die Proteine in einem Polyacrylamidgel (Tab. 12) elektrophoretisch aufgetrennt (Sammelgel mit 100 V / 25 mA, Trenngel mit 150 V / 40 mA). Hierzu wurde eine vertikale Trennkammer mit 1 x Laufpuffer für SDS-PAGE benutzt. Proteine wurden mit der Coomassie-Färbung (Schema 5) sichtbar gemacht.

Tab. 12 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Bestandteil	5 % Sammelgel (2 ml)	12,8 % Trenngel (6 ml)
Acrylamid	4,95 %	12,5 %
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	0,13 %	0,33 %
Tris-HCl pH 8,8	-	0,376 M
Tris-HCl pH 6,8	0,125 M	-
SDS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,1 %	0,17 %
APS	0,05 %	0,08 %

Schema 5 Ablauf der Coomassie-Färbung.

	Zusammensetzung der Lösung	Dauer
1. Fixierung	50 % Methanol 12 % Essigsäure	20 min
2. Färbung	2,0 g Coomassie Brilliant Blau R-250 425 ml Ethanol 96 % (V/V) 50 ml Methanol 100 ml Essigsäure 425 ml Wasser	30 min
3. Entfärbung	25 % Ethanol 96 % (V/V) 10 % Essigsäure	nach Bedarf
4. Trocknung	40 % Methanol 10 % Essigsäure 6 % Glycerol	15 min
	Einspannen in Cellophan und Lufttrocknung	2-3 d

2.3.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde mit dem Bradford-Test bestimmt (Bradford, 1976). Die Farbstofflösung wurde vor Gebrauch aus 1 ml 4 x Bradford-Stammlösung und 3 ml Wasser hergestellt. Davon wurde je 1 ml in die Küvetten vorgelegt und mit 50 µl Proteinlösung gemischt. Als Referenz dienten 50 µl des Puffers, in dem das Protein gelöst war. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration in µg/ml wurde mithilfe einer Kalibriergerade berechnet, die mit BSA-Verdünnungen unter gleichen Bedingungen erstellt worden war und die Bestimmung im Bereich von 25-200 µg/ml Protein ermöglichte.

4 x Bradford-Stammlösung

400 mg Coomassie Brilliant Blau G-250

400 ml Phosphorsäure 85 % (m/m)

200 ml Ethanol 96 % (V/V)

400 ml Wasser

Der Farbstoff wird unter Rühren in Ethanol und Phosphorsäure gelöst, mit Wasser aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C weitergerührt. Dann wird durch einen Papierfilter filtriert. Lagerung: 4 °C und Lichtschutz.

2.3.4 Proteinextraktion aus der Wurzelkultur von *Solanum lycopersicum*

Die Proteinextraktion orientierte sich an Vorgaben (McLauchlan *et al.*, 1993; Heim & Jelesko, 2004). 80-100 g gefrorene Wurzeln (2.1.5) wurden im Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver verrieben. Zu einem Massenteil des gefrorenen Wurzelpulvers wurden zwei Volumenteile Extraktionspuffer gegeben und die Mischung unter gelegentlichem Rühren aufgetaut. Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 25000 g) und dekantiert. Der klare Überstand wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf 30 % Sättigung gebracht, 30 min bei 4 °C stehen gelassen und zentrifugiert (20 min, 4 °C, 25000 g). Der Niederschlag wurde verworfen, und der Überstand auf 65 % Sättigung gebracht, 30 min bei 4 °C stehen gelassen und wieder zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde in Wasser gelöst, durch 0,2 µm Celluloseacetat filtriert und in 100 mM HEPES-Puffer pH 8,0 umgepuffert.

Extraktionspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM DTT

1 mM EDTA

0,1 mM PMSF

5 % (m/V) Poly(vinylpyrrolidon)

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung

Ammoniumsulfat wird in Wasser gelöst, bis ein Bodensatz bleibt.

Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 mit

Ammoniaklösung.

2.3.5 Proteinchromatographie

Alle chromatographischen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C mit dem Proteinchromatographie-System ÄKTAexplorer 100 ausgeführt, wobei kontinuierlich Druck und Leitfähigkeit sowie die Absorption bei 280 nm (A_{280}) zur Detektion von eluierendem Protein gemessen wurden. Zur Probenaufgabe standen Probenschleifen mit 500 µl, 1 ml, 2 ml und 5 ml sowie ein

Superloop mit maximal 50 ml zur Verfügung. Das Eluat wurde zu 1-2 ml automatisch fraktioniert oder als Gesamtmenge mit variablem Volumen gesammelt.

2.3.5.1 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

In dieser Arbeit wurden die Synthesevektoren pQE-30, pET-21d und pET-47b eingesetzt, um in *E. coli* rekombinante Fusionsproteine aus Zielprotein und einem Peptid aus sechs Histidin-Molekülen (His-Tag) am N- oder C-Terminus zu synthetisieren. Der His-Tag ist in der Lage, mit zweiwertigen Metallionen wie Ni^{2+} einen Komplex zu bilden. Über Ni^{2+} -Ionen, die am Säulenmaterial mit dem Chelatbildner Iminodiessigsäure (IDA) immobilisiert sind, werden die Proteine mit einem His-Tag fest an das Säulenmaterial gebunden. Sie lassen sich mit hohen Konzentrationen an Imidazol im Elutionspuffer aus dem Chelat-Komplex verdrängen. Auch von Natur aus histidinreiche Proteine können am Säulenmaterial binden, eluieren aber bei weitaus niedrigerer Imidazolkonzentration (Tab. 13).

Tab. 13 Chromatographische Parameter für IMAC.

Säule	HiTrap™ Chelating HP 5 ml (GE Healthcare), HisTrap™ HP 5 ml und 1 ml (GE Healthcare)	
Fluss	1 ml/min	
Equilibrierung	Bindepuffer IMAC pH 7,8 bis zur Konstanz von Druck und Leitfähigkeit	
Elution	linearer Gradient von 10 oder 20 mM bis 500 mM Imidazol (Länge: 5 SV bei 5 ml-Säulen, 20-30 SV bei 1 ml-Säulen)	
Bindepuffer IMAC pH 7,8	Elutionspuffer IMAC pH 7,8	
20 mM NaH_2PO_4	20 mM NaH_2PO_4	
500 mM NaCl	500 mM NaCl	
10 oder 20 mM Imidazol	500 mM Imidazol	

2.3.5.2 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Mit IMAC vorgereinigtes Protein wurde in 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0 umgepuffert und an PBE 94 getrennt. Das Säulenmaterial wird vom Hersteller zusammen mit Polybuffer™ zur Chromatofokussierung angeboten, lässt sich jedoch auch als Ionenaustauscher gebrauchen (Tab. 14).

Tab. 14 Chromatographische Parameter für IEX an PBE 94.

Säule	PBE 94 10 ml (selbst gepackt)
Fluss	1 ml/min
Equilibrierung	50 mM HEPES-Puffer pH 8,0 bis zur Konstanz von Druck und Leitfähigkeit
Elution	linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl in 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0 (Länge: 5 SV)

2.3.5.3 Präparative Gelfiltration (SEC)

Die präparative Gelfiltration (Tab. 15) erlaubt als Trennverfahren, das auf der Molekülgröße beruht, einen gleichzeitigen Pufferaustausch. Sie war in dieser Arbeit der abschließende Reinigungsschritt zur Herstellung von Kristallisationsproben der *D. stramonium* PMT.

Tab. 15 Chromatographische Parameter für SEC.

Säule	HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 pg und 200 pg (GE Healthcare) XK16/70 mit Sephacryl S-200 HR (Bettvolumen 119 ml, selbst gepackt)
Probenvolumen	max. 5-6 ml
Fluss	0,8-1 ml/min
Equilibrierung	20-100 mM HEPES-Puffer pH 8,0
Elution	isokratisch mit 20-100 mM HEPES-Puffer pH 8,0

2.3.5.4 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration (Tab. 16, Tab. 17) wurde zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen eingesetzt und unterschied sich von der präparativen Variante im Grad der Standardisierung. Die Proteinproben wurden unter den gleichen Bedingungen eluiert wie die Standards mit bekanntem Molekulargewicht. Die Elutionsvolumina (V_e) wurden aus den Chromatogrammen abgelesen. Die Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen die berechneten K_{av} -Werte der Proteinstandards aufgetragen [$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$].

Tab. 16 Chromatographische Parameter für die analytische Gelfiltration.

Säule	XK16/70 mit Sephacryl S-200 HR (Betthöhe 59 cm, Bettvolumen 119 ml, selbst gepackt)
Probenvolumen	0,5 ml
Fluss	0,5 ml/min
Equilibrierung	50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,5
Elution	isokratisch mit 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,5

Tab. 17 Standards für die analytische Gelfiltration (Sigma).

Bezeichnung	M (kDa)
Dextranblau	2000
β-Amylase aus Süßkartoffeln	200
Alkoholdehydrogenase aus Hefe	150
Rinderserumalbumin	66,0
Carboanhydrase aus Rindererythrocyten	29,0
Cytochrom c aus Pferdeherzen	12,4

2.3.5.5 Umpufferung von Proteinen

Der schonende und schnelle Pufferaustausch ist für die Erhaltung der enzymatischen Aktivität von Bedeutung. Drei Säulentypen standen je nach Probenvolumen für den Pufferaustausch zur Verfügung (Tab. 18). Vor dem Probeauftrag wurden die Säulen mit 15 ml (NAP-10, PD-10) oder 2 Säulenvolumen (Sephadex-Säule) des Puffers equilibriert, in dem das Protein eluiert und aufbewahrt werden sollte.

Tab. 18 Umpufferung von Proteinen.

Säule	Probenvolumen (ml)	Eluatvolumen (ml)	Fluss
illustra™ NAP-10 Säulen (GE Healthcare)	0,75-1,0	1,2-1,5	Gravitation
PD-10 Säulen (GE Healthcare)	2,5	3,5	Gravitation
XK16/20 Sephadex G25-Fine, 27 ml (selbst gepackt)	max. 10	variabel	ÄKTAexplorer 100, 2 ml/min

2.3.6 Aufkonzentrierung von Proteinen

Hierbei kamen entweder Größenausschlussmembranen als Zentrifugeneinsätze (Tab. 19) oder die TCA-Präzipitation zum Einsatz, sofern Proteinproben für die SDS-PAGE benötigt wurden. Die Proteinlösung wurde mit 5 % (V/V) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 16000 g) wurde das präzipitierte Protein mit 100 µl eiskaltem Ethanol 96 % (V/V) und danach mit 100 µl Diethylether gewaschen. Das denaturierte, getrocknete Protein wurde in wenigen µl einer Mischung aus Wasser und 2 x Probenpuffer für die SDS-PAGE (1 : 1) aufgenommen.

Tab. 19 Schonende Aufkonzentrierung mit Zentrifugeneinsätzen bei 4 °C.

Säule	Probenvolumen	Restvolumen	rcf
Macrosep [®] 10K Omega Centrifugal devices (Pall Life Sciences)	15 ml	ca. 1 ml	4500 g
Nanosep [®] 10K Omega Centrifugal devices (Pall Life Sciences)	50-500 µl	ca. 15 µl	16000 g

2.3.7 Proteinkristallisation

2.3.7.1 Suche nach geeigneten Pufferbedingungen

Mithilfe einer Mehrkanalpipette wurden je 110 µl Kristallisierpuffer in die Kammern einer 96-well CrystalQuick[™] Platte gefüllt. Ein Cartesian Pipettierroboter mischte die Kristallisationstropfen aus 200 nl einer Lösung des gereinigten PMT Proteins (1,5-15 mg/ml) und 200 nl des Puffers. Das Protein wurde in sitzenden Tropfen durch Dampfdiffusion zur Kristallisation gebracht. Die Kristallisierpuffer waren entweder als Kits (Tab. 20) käuflich verfügbar oder stammten aus dem internen Puffersortiment des Instituts für Biochemie und Biotechnologie der MLU Halle. Die Platten wurden nach der Beladung mit Klarsichtfolie verschlossen, mit dem Oasis Imager alle 3 bis 7 Tage fotografiert und die Bilder am PC ausgewertet. Eine direkte Inspektion der Platten war mit einem Leica Kaltlichtmikroskop möglich, das mit einer Digitalkamera gekoppelt war.

Tab. 20 Pufferkits für die Proteinkristallisation.

Bezeichnung	Hersteller
Crystal Screen Crystal Screen 2	Hampton Research

Bezeichnung	Hersteller
Internes Kristallisationskit (Zusammensetzung in Teuber, 2008)	MLU Halle, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Milton T. Stubbs
JBScreen Classic 1-10	Jena Bioscience
Sigma Crystallization Basic Kit Sigma Crystallization Cryo Kit Sigma Crystallization Extension Kit	Sigma

2.3.7.2 Feineinstellung des Kristallisierpuffers

Die Pufferbedingung mit 1 M Li_2SO_4 , 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Natriumcitrat, pH 5,6 wurde zur Optimierung des Kristallwachstums systematisch variiert. Zur Stabilisierung des Proteins und zur späteren Lokalisation des aktiven Zentrums wurden SAH oder SAM sowie Putrescin zur PMT-Lösung im molaren Verhältnis von 1 (SAH) : 2 (Putrescin) : 1 (PMT) bzw. 2 (SAM) : 2 (Putrescin) : 1 (PMT) zugesetzt. Die Lithiumsulfatkonzentration wurde von 0,8 bis 1,1 M und der pH-Wert von 4,1 bis 6,6 in 0,1-Schritten variiert, jeweils bei vier verschiedenen Proteinkonzentrationen (1,5-15 mg/ml). Die sitzenden Tropfen wurden in CombiClover™ Platten gemischt, wobei zunächst 500 μl des Puffers in das Reservoir und je 2,5 μl in die vier angrenzenden Kavitäten pipettiert wurden. Zu 2,5 μl Puffer wurden 2,5 μl PMT-Lösung pipettiert und gemischt. Dieser Versuch beinhaltete 768 definierte Bedingungen. Die Kristalle wurden mit einem MicroMax™-007 HF Microfocus Röntgen-Generator und einem R-Axis IV++ Imaging Plate Detektor (Rigaku) auf Röntgenbeugung untersucht, nachdem sie mit 15-20 % Glycerol als Gefrierschutz im jeweiligen Kristallisierpuffer getränkt worden waren.

2.3.7.3 Zusatz von Additiven und Detergenzien

Ausgehend von der Kristallisationsbedingung 0,1 M HEPES-Na, 0,8 M NaH_2PO_4 , 0,8 M Na_2HPO_4 pH 7,5 wurde mithilfe eines pH-Screens (5,6-7,9 in 0,1-Schritten) sowie der Kits Additive Screen 1 bis 3 und Detergent Screen 1 bis 3 (alle Hampton Research) versucht, die Kristallgröße zu optimieren. Hierzu wurden die sitzenden Tropfen aus 5 μl Proteinlösung (15 mg/ml) mit SAM im molaren Verhältnis 2 (SAM) : 1 (PMT) und 5 μl einer Mischung aus Puffer und Additiv bzw. Detergens nach Herstellervorgabe auf CombiClover™ Platten aufgebracht. Das Reservoir enthielt stets 500 μl Puffer oder 500 μl einer Mischung aus Puffer und Additiv, wenn letzteres flüchtig war.

2.3.8 Protein-Massenspektrometrie

Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (2.3.2), bei der alternativ auch gebrauchsfertige PageBlue™ Proteinfärbelösung (Fermentas) zum Einsatz kam, wurden relevante Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Dabei wurde die Kontamination mit Fremdproteinen minimiert (Weglassen des Markers, Manipulationen nur mit Skalpell und Pinzette). Die Proteine in den Gelstücken wurden mit Trypsin zu Peptiden abgebaut und mit einem ESI-Q-TOF Massenspektrometer (Q-TOF 2, Micromass, Manchester Daltonics) analysiert. PMT-Lösung wurde mit derselben Methode auch ohne vorherigen Verdau untersucht. Alle Messungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle) übernommen.

2.3.9 Enzymgekoppelter colorimetrischer PMT-Test

2.3.9.1 Synthese der SAH abbauenden Enzyme MTAN und LuxS

Transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Gen für 5'-Methylthioadenosin / S-Adenosylhomocystein Nukleosidase (MTAN, EC 3.2.2.9) aus *E. coli* in einem pProEx Vektor und dem Gen für S-Ribosylhomocystein Lyase (LuxS, EC 4.4.1.21) aus *Bacillus subtilis* in einem pET-29a Vektor wurden von Prof. Dr. Z. S. Zhou (Fachbereich Chemie, Washington State University, Pullman, USA) zur Verfügung gestellt. Beide Enzyme wurden als Fusionsproteine mit His-Tag synthetisiert und gereinigt (Tab. 21) (Biastoff *et al.*, 2006).

Tab. 21 Synthese und Reinigung von MTAN und LuxS.

	MTAN	LuxS
Proteinsynthese	LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin, 37 °C, Induktion bei OD ₆₀₀ = 1,0 für 5 h	LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin, 37 °C, Induktion bei OD ₆₀₀ = 1,0 für 5 h unter Zusatz von 100 µM CoCl ₂
Reinigung	IMAC (2.3.5.1)	IMAC (2.3.5.1)
Lagerungspuffer	50 mM HEPES pH 7,0 + 10 % (V/V) Glycerol	50 mM HEPES pH 8,0 + 10 % (V/V) Glycerol
Lagerungstemperatur (°C)	-80	-80

2.3.9.2 Validierung

Jede Vertiefung einer 96-well Mikroplatte enthielt ein Gemisch aus 60 μl der Enzymtestlösung und 180 μl der Reagenzlösung. Die Schichtdicke wurde mit 0,76 cm berechnet. Der Absorptionskoeffizient von 13819 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ist eine Literaturangabe (Riddles *et al.*, 1983). Die Richtigkeit der Quantifizierung nach dem Lambert-Beer-Gesetz und die Detektionsgrenze wurden mit einer Verdünnungsreihe von 5 bis 500 μM Homocystein in 100 mM HEPES pH 8,0 anstelle des Enzymtests (Schema 6) untersucht. Zur Bestimmung der Enzymaktivität von MTAN und LuxS wurden beide Enzyme mit SAH inkubiert (Schema 6). Zur Erkennung von Einflüssen der PMT-Substrate Putrescin und SAM auf MTAN, LuxS oder DTNB wurde dieser Versuch auch in Anwesenheit von 4 mM Putrescin (3 min Inkubation) und 0 bis 10 mM SAM (3 min, 15 min und 30 min Inkubation) wiederholt. In jeder Messreihe wurde ein Nullwert (Ansatz ohne Substrat) bzw. ein Blindwert (nur Puffer und Reagenzlösung) mitgeführt und zur Korrektur des Proteinfehlers bzw. der Eigenfärbung der Reagenzlösung ausgewertet.

Schema 6 Bestimmung der Enzymaktivität von MTAN und LuxS.

SAH	0 bis 120 μM
LuxS	124,1 μg entsprechend 17 μM
100 mM HEPES-Puffer pH 8,0; vor Gebrauch 20 min mit N_2 durchströmt	zu 300 μl (Gesamtvolumen)
Vorwärmen, 10 min, 37 °C	
MTAN (Starter)	2,9 μg entsprechend 0,3 μM
Inkubation, 3 min, 37 °C	
Mikroplatte: 60 μl Enzymtest + 180 μl Reagenzlösung mischen	
Inkubation, 5 min, 25 °C	
Mikroplattenleser: Messung bei 414 nm	

Reagenzlösung

244 μM DTNB (750 μM für Homocystein-Verdünnungsreihe)

8 M Guanidin-HCl

500 μM EDTA

100 mM HEPES pH 8,0

2.3.9.3 Bestimmung der PMT-Aktivität

PMT wurde zusammen mit SAM und Putrescin sowie den Enzymen MTAN und LuxS inkubiert (Schema 7). Wegen der geringen Reaktionszeit wurden die Ansätze 10 min bei 37 °C vorgewärmt, bevor entweder 127 µM SAM oder 3,8 mM Putrescin als Starter der Reaktion zugesetzt wurden.

Schema 7 Bestimmung der PMT-Aktivität.

Putrescin	3,8 mM
PMT	max. 1 µg
LuxS	124,1 µg entsprechend 17 µM
MTAN	2,9 µg entsprechend 0,3 µM
100 mM HEPES-Puffer pH 8,0; vor Gebrauch 20 min mit N ₂ durchströmt	zu 315 µl (Gesamtvolumen)
Vorwärmen, 10 min, 37 °C	
SAM (Starter)	127 µM
Inkubation, 3 min, 37 °C	
Mikroplatte: 60 µl Enzymtest + 180 µl Reagenzlösung mischen	
Inkubation, 5 min, 25 °C	
Mikroplattenleser: Messung bei 414 nm	

2.3.10 Spermidinsynthase- und PMT-Test mit HPLC

2.3.10.1 Enzymtest

Der Standardtest enthielt 10-25 µg gereinigtes Protein, 20 mM HEPES pH 8,0, 2 mM DTT, 1 mM Ascorbinsäure, 500 µM Putrescin, 400 µM SAM oder dcSAM in 250 µl. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und mit 250 µl gesättigter Natriumcarbonatlösung gestoppt. Das pH-Optimum wurde abweichend vom Standardtest mit 1 µg Protein in folgenden Puffern bestimmt, denen auch 2 mM DTT und 1 mM Ascorbinsäure zugesetzt waren: 50 mM Kaliumphosphat pH 6,5-7,5; 50 mM HEPES pH 7,5-8,5; 50 mM Tris-HCl pH 8,5-10,0. Für enzymkinetische Messungen wurde die Proteinmenge im Standardtest auf 1 µg reduziert und die Linearität der Produktbildung mit einer Zeitkurve abgesichert. Ein Substrat wurde variiert,

während das andere in der jeweiligen Sättigungskonzentration vorlag. Zur Detektion von möglicher SPMS-Aktivität wurde DsSPDS mit 500 μM Spermidin und 400 μM dcSAM im Standardtest inkubiert. Decarboxyliertes SAM (dcSAM) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K. Samejima (Musashino Universität, Japan) zur Verfügung gestellt. 15 mg dcSAM wurden eingewogen und in 1 ml Wasser gelöst. Als Referenzsubstanz für die Gehaltsbestimmung wurde SAH (Gehalt 99 %, Sigma) verwendet, weil es das gleiche Chromophor wie dcSAM besitzt. Die dcSAM-Stammlösung wurde nach der Konzentrationsbestimmung zu 12 mM verdünnt. Lagerung: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.10.2 HPLC-Analyse der gebildeten Polyamine

Eine HPLC-Methode (Marcé *et al.*, 1995; Stenzel *et al.*, 2006) ermöglichte die Trennung und Quantifizierung der in den Enzymtests gebildeten Polyamine nach Dansylierung. 200 μl eines gestoppten Enzymtests wurden mit 400 μl Dansylchlorid-Lösung 7,5 mg/ml versetzt und nach Schema 8 weiterbehandelt, das sich an eine publizierte Dansylierungsmethode anlehnt (Smith & Davies, 1985).

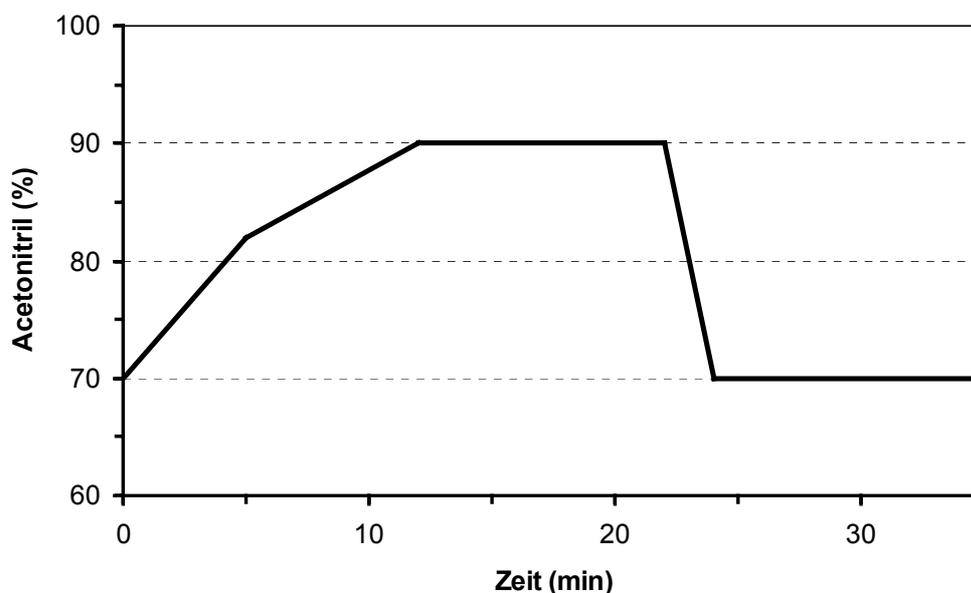
Schema 8 Dansylierungsprotokoll.

60 min, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 500 rpm, Lichtausschluss
+ 100 μl Prolinlösung (100 mg/ml)
30 min, Raumtemperatur, Lichtausschluss
Ausschütteln mit 3 x 500 μl Toluol
organische Phase im Vakuum bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Trockne einengen

Die Trockenrückstände (Schema 8) wurden nach Rücklösen in Acetonitril auf einer RP-18 Säule getrennt. Wichtige Parameter bzw. der Gradientenverlauf der HPLC-Methode sind in Tab. 22 bzw. Abb. 4 dargestellt. Jede enzymatische Untersuchung umfasste zwei bis drei unabhängige Probenreihen, die unter Einbeziehung von Polyamin-Standards derivatisiert wurden. Alle dansylierten Einzelproben wurden zweifach injiziert. Ein externer Standard der dansylierten Polyamine (100 ng in 40 μl Einspritzvolumen) wurde für jede HPLC-Messreihe mitgeführt.

Tab. 22 Parameter der Polyaminanalyse mit HPLC.

Säule	RP-18 Hypersil ODS (Knauer)
Säulenparameter	250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße
Gradientenelution	Laufmittel A: Acetonitril : Wasser = 10 : 90 Laufmittel B: Acetonitril : Wasser = 90 : 10
Flussrate	1 ml/min
Probenvolumen (gesamt)	400 µl
Injektionsvolumen	10-40 µl
Dauer eines Laufes	35 min
Temperatur des Säulenofens	40 °C
Detektion	Absorption bei 220 nm

**Abb. 4 Gradientenverlauf der HPLC-Methode.**

2.3.10.3 Quantifizierung der Polyamine

N-Methylputrescin, Spermidin und Spermin wurden über Kalibriergeraden quantifiziert. *N*-Methylputrescin · 2 HCl wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. T. Hashimoto (NAIST, Japan) zur Verfügung gestellt. Jeweils 0 bis 4 µg des Polyamins in einer Mischung aus 100 µl Wasser und 100 µl gesättigter Natriumcarbonatlösung wurden nach Schema 8 dansyliert und in 400 µl Acetonitril gelöst. Davon wurden 40 µl entsprechend 0 bis 400 ng des Polyamins injiziert. Die gemessenen Peakflächen wurden mit linearer Regression ausgewertet.

2.3.10.4 Wiederfindung von Spermidin und *N*-Methylputrescin

Wässrige Stammlösungen von Spermidin und *N*-Methylputrescin wurden mit Wasser oder üblichen Puffern für Enzymtests verdünnt. Anschließend wurden verschiedene Stopplösungen zugesetzt (Schema 9). Die Mischungen wurden nach Schema 8 dansyliert und mit HPLC analysiert.

Schema 9 Versuch zur Wiederfindung von Spermidin und *N*-Methylputrescin.

Polyamin (100 ng/ μ l) in Wasser (μ l)	10	10	10	10
Verdünnungsmittel 90 μ l	Wasser	100 mM Glycin pH 8,0	100 mM HEPES pH 8,0	100 mM Tris-HCl pH 8,0
Stopplösung:				
Wasser (μ l)	10	10	10	10
1 N HCl (μ l)	10	10	10	10
1 N NaOH (μ l)	10	10	10	10
17 N NaOH (μ l)	10	10	10 ^a	10 ^a
Gesättigte Na ₂ CO ₃ -Lösung (μ l)	100	100	100	100
Gesamtvolumen (μ l)	210	210	210	210

^a nicht untersucht für Spermidin

2.4 Methoden der Bioinformatik

2.4.1 Homologiemodellierung

2.4.1.1 Datenbanksuche

Die Proteinmodelle dieser Arbeit (DsPMT, DsSPDS, DsSPDS Mutante Nr. 10 sowie die chimären Proteine DsSPDS-PMT und DsPMT-SPDS) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Brandt (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle) erstellt. Sie basieren auf den dreidimensionalen Strukturen von Proteinen mit ähnlicher („homologer“) Sequenz, die in der RCSB Protein Data Bank (PDB) gespeichert sind. Passende Proteine mit mindestens 30 % Sequenzidentität wurden mit einer BLASTp-Suche (p = Protein) in den Datensätzen der PDB identifiziert. Den Datenbanken GenBank, UniProtKB und BRENDA (Tab. 24) wurden ergänzende Informationen (Nukleotidsequenzen, katalytische Eigenschaften, Taxonomie u. a.) entnommen.

2.4.1.2 *Komparative Modellierung von DsPMT als Dimer*

Die Kristallstruktur der *Arabidopsis thaliana* SPDS1 (AtSPDS, PDB 1XJ5) bot sich mit 68 % Sequenzidentität zur Modellierung der DsPMT an. Schwierigkeiten bereiteten aber die 51 N-terminalen Aminosäuren von DsPMT, für die sich kein brauchbares Alignment mit AtSPDS ergab. Die Kristallstruktur PDB 2O06 der *Homo sapiens* SPDS als Homodimer (Wu *et al.*, 2007) mit nur 46 % Sequenzidentität erlaubte jedoch die Modellierung von 8 weiteren N-terminalen Aminosäuren der DsPMT sowie die Darstellung der Quartärstruktur als Homodimer. Basierend auf PDB 2O06 wurden 10 Modelle des DsPMT-Dimers (zunächst ohne die 43 N-terminalen Aminosäuren) mit dem Programm MOE[®] (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) an einer Silicon Graphics Workstation (Silicon Graphics Inc.) generiert. MOE kopierte alle Koordinaten von konservierten Regionen, ansonsten nur die Koordinaten des Peptidrückgrats. Insertionen oder Deletionen wurden anschließend angepasst. Die Modelle wurden in Bezug auf Peptidrückgrat, Ausrichtung unpolarer Seitenketten und potenzieller Wasserstoffbrückenbindungen evaluiert. Sie wurden dann mit Charmm22-Kraftfeld (MacKerell *et al.*, 1998) und Born-Solvation (Pellegrini & Field, 2002) optimiert. Kraftfeld-Methode und Born-Solvation ermöglichten die Minimierung von Konformations- und Wechselwirkungsenergien innerhalb des Polypeptids.

2.4.1.3 *Überprüfung der stereochemischen Qualität*

Das zuverlässigste aller 10 DsPMT-Modelle von MOE wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Dieses Programm identifizierte unzulässige Spannungen in Torsionswinkeln, Bindungswinkeln und -längen sowie sterische Hinderungen zwischen benachbarten Atomen. Zur Darstellung der stereochemischen Qualität diente das Ramachandran-Diagramm, worin die Torsionswinkel Φ und Ψ des Peptids gegeneinander aufgetragen wurden. Zur Korrektur stereochemischer Fehler wurde das Peptidrückgrat fixiert und ausgewählte Bereiche schrittweise optimiert.

2.4.1.4 *Überprüfung auf native Faltung*

PROSA II (Protein Structure Analysis, Center of Applied Molecular Engineering, Salzburg, Österreich) (Sippl, 1990; Sippl, 1993) ist ein Programm zur Abschätzung der Proteinfaltung. Es berechnet Konformationsenergien der Modellstrukturen und stellt diese als geglätteten Energiegraph in Abhängigkeit von der Aminosäureposition dar. Dabei korrelieren negative Energien mit stabilen Faltungsbereichen und positive Energien mit nicht nativ gefalteten, d. h.

vermutlich fehlerhaften Bereichen (regionale Qualität). Das Programm bewertet die grundsätzliche (globale) Qualität eines Modells mit einem z-Score. Dieser sollte in einem Bereich liegen, in dem sich auch die z-Scores von allen Proteinen ähnlicher Sequenzlänge mit bekannter dreidimensionaler Struktur bewegen. Der z-Score besitzt daher nur zusammen mit der Sequenzlänge eine Aussagekraft.

2.4.1.5 Modellierung des N-Terminus von DsPMT-N-his

Das Programm SPRO (Cheng *et al.*, 2005) erlaubt die Vorhersage der Sekundärstruktur einzelner Bereiche eines Polypeptids. Für den N-Terminus von DsPMT wurde eine ungeordnete Struktur („Coil“) vorhergesagt, die nur von einigen sehr kurzen Faltblättern unterbrochen wurde. Dieses vorläufige Modell wurde energetisch minimiert und mit dem DsPMT-Modell überlagert. Die His-Tag Sequenz MRGSHHHHHHGS wurde nun manuell angehängt. Nach Überprüfung des Modells mit PROCHECK (2.4.1.3) und PROSA II (2.4.1.4) wurde die optimale Position des His-Tags mit Simulationen zur molekularen Dynamik (100 ps bei 300 K) evaluiert.

2.4.1.6 Modellierung von DsSPDS als Dimer

Die Kristallstruktur der *Arabidopsis thaliana* SPDS1 (AtSPDS, PDB 1XJ5) mit 81 % Sequenzidentität zu DsSPDS diente als Vorlage für die komparative Modellierung mit MOE (2.4.1.2). Die Modellierung des N-terminalen Bereiches verlief im Gegensatz zu DsPMT problemlos. Das Modell wurde mit PROCHECK (2.4.1.3) und PROSA II (2.4.1.4) überprüft.

2.4.1.7 Modellierung der chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT

Fasta-Dateien der chimären Sequenzen wurden erstellt und mit DsPMT sowie DsSPDS verglichen. Das Proteinmodell (DsPMT oder DsSPDS) mit der höheren Sequenzidentität diente jeweils als Vorlage für die komparative Modellierung mit MOE (2.4.1.2). Beide chimären Modelle wurden mit PROCHECK (2.4.1.3) und PROSA II (2.4.1.4) überprüft. Auf die gesonderte Modellierung des N-Terminus von DsPMT-SPDS wurde verzichtet.

2.4.2 Docking von niedermolekularen Liganden

Das Programm GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK) wurde für Dockingstudien eingesetzt. Es trifft eine Vorhersage über die Art und Weise der Bindung kleiner Moleküle (Liganden) an eine gegebene Proteinstruktur. Dazu nutzt es einen Genetischen Algorithmus (GA), der die volle Flexibilität der Ligandenkonformation voraussetzt, jedoch der Proteinstruktur nur teilweise Flexibilität (z. B. in den Seitenkettenkonformationen) zugesteht. Der GA ahmt den Prozess der Evolution in Datenstrukturen nach, wobei die Änderung derselben schließlich zur optimierten Darstellung der Ligand-Protein-Interaktionen führt. Diese Interaktionen werden mit der GOLDScore Fitness-Funktion bewertet. In den Fitness-Score fließen ein: (1) die Energien von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand, (2) die sterische Energie (Van-der-Waals-Energie) der Interaktionen zwischen Ligand und Proteingerüst sowie (3) die Interne Ligandenenergie (Van-der-Waals-Energie und Torsionsenergie), die sich aus der eingenommenen Ligandenkonformation ergibt. Der Fitness-Score ist die negative Summe der einzelnen Energiewerte (1) bis (3), sodass größere Fitness-Werte eine energieärmere und damit stabilere Bindung anzeigen (Jones *et al.*, 1997).

2.4.3 Phylogenetische Analyse

In der Sequenzdatenbank UniProtKB (Tab. 24) waren 24 vollständige PMT-Proteinsequenzen eingetragen (Stand: 27.04.2009). Die putative PMT aus *Scopolia parviflora* (Solanaceae) wurde in GenBank mit einer BLASTp Suche identifiziert (DsPMT als Suchsequenz). ESTs (Expressed sequence tags) aus *Capsicum annuum* (Solanaceae, Einträge CA518000; CA518369; CA518560; CA520943) und *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae, Einträge DV038077; EE876509) wurden in der NCBI EST Datenbank identifiziert (*D. stramonium pmt* und *Calystegia sepium pmt* cDNA als Suchsequenzen). Überlappende Fragmente wurden zusammengefügt und in vollständige PMT-Proteinsequenzen übersetzt. In die Analyse wurden alle 27 PMT-Sequenzen und weitere 20 SPDS aus UniProtKB eingeschlossen. Die Distanzen zwischen den Aminosäuresequenzen wurden mit der Poisson-Korrektur-Methode (Zuckermandl & Pauling, 1965) berechnet, die vereinfachend annimmt, dass alle Aminosäuren mit gleicher Häufigkeit vorkommen und dass die Substitutionsraten aller Reste identisch sind. Damit ließen sich Distanzen um multiple Substitutionen an derselben Position korrigieren. Mit der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987) wurde auf Grundlage der korrigierten Distanzen ein phylogenetischer Baum mit MEGA 4.0 (Center for Evolutionary

Functional Genomics, Tempe, USA) (Tamura *et al.*, 2007) konstruiert. Hierbei werden Sequenzpaare sukzessiv verknüpft, sodass die Gesamtdistanz (= Summe der Astlängen) des Baumes auf jeder Stufe der Verknüpfung minimal ist. Der Baum wurde mit der Bootstrap-Methode (1000 Wiederholungen) validiert (Felsenstein, 1985).

2.4.4 Datenbanken und Computerprogramme

Tab. 23 Stationäre Computerprogramme.

Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
DistCalc 1.2	H. Lohninger, TU Wien
GeneDoc 2.7.000	K. Nicholas (www.psc.edu/biomed/genedoc)
ISIS™/Draw 2.3	MDL Information Systems Inc.
Ligplot v.4.4.2	R. Laskowski, EBI, Cambridge (Wallace <i>et al.</i> , 1995)
Omega 2.0	Oxford Molecular Ltd.
PyMol v0.98 und v0.99	DeLano Scientific LLC
Sigmaplot 9.01 mit Enzymkinetik-Modul	Systat Software Inc.

Tab. 24 Datenbanken und Computerprogramme auf Internet-Basis.

Bezeichnung	Betreiber (Internetadresse)	Referenz
BLAST	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
BRENDA	Institut für Biochemie und Bioinformatik, TU Braunschweig (www.brenda-enzymes.org)	(Chang <i>et al.</i> , 2009)
ClustalW2	European Bioinformatics Institute, Cambridge, Großbritannien (www.ebi.ac.uk)	(Larkin <i>et al.</i> , 2007)
Double Digest Finder	New England Biolabs, Ipswich, USA (www.neb.com)	-
Esript	Institut de Biologie et Chimie des Protéines (http://esript.ibcp.fr)	(Gouet <i>et al.</i> , 1999)
ExpASy	Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Lausanne (www.expasy.org)	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
PROSITE		(Hulo <i>et al.</i> , 2006; Hulo <i>et al.</i> , 2008)
ProtParam Tool		(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
ProtScale Tool		(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)

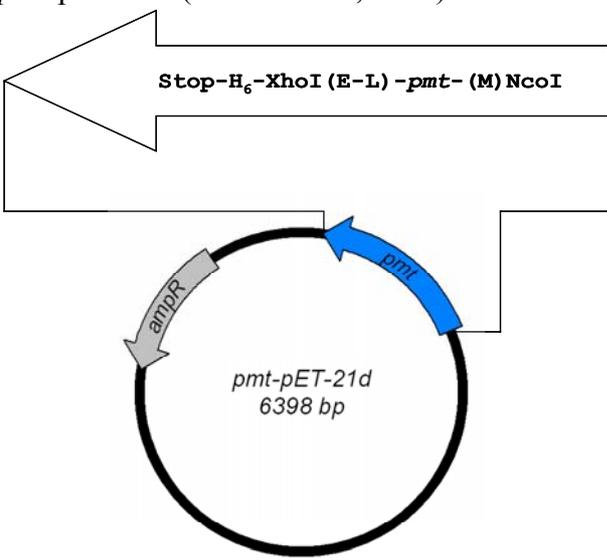
Bezeichnung	Betreiber (Internetadresse)	Referenz
GenBank	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)	(Benson <i>et al.</i> , 2008)
RCSB Protein Data Bank	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (www.pdb.org/pdb/home/home.do)	(Dutta <i>et al.</i> , 2009)
Tm Calculator	Stratagene, La Jolla, USA (www.stratagene.com)	-
UniProtKB	The UniProt Consortium (www.uniprot.org)	(Bairoch <i>et al.</i> , 2008)

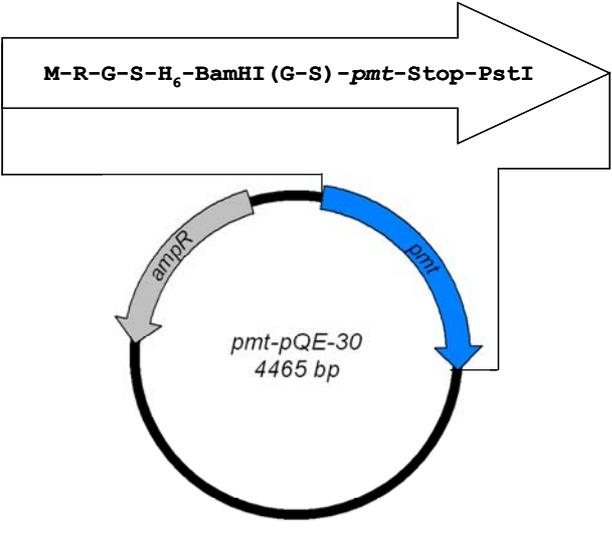
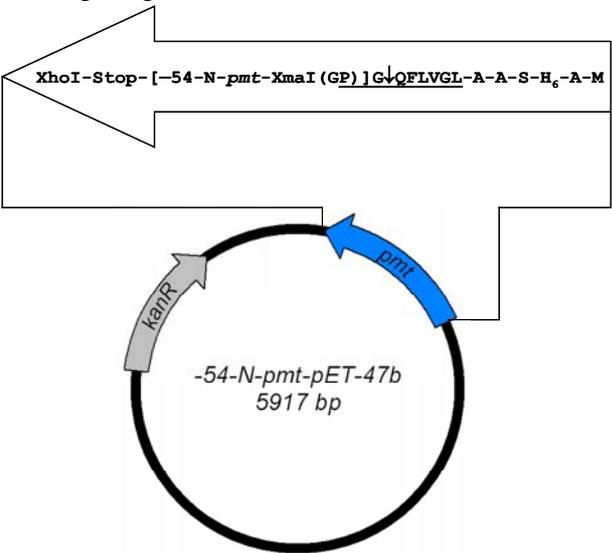
3 Ergebnisse

3.1 Synthesevektoren für DsPMT und deren Verkürzungsmutanten

Die Vektoren *pmt*-pET-21d (Teuber *et al.*, 2007) bzw. *pmt*-pQE-30 dienen zur Synthese von *D. stramonium* PMT mit C- bzw. N-terminalem His-Tag (DsPMT-C-his bzw. DsPMT-N-his). Mit dem Protein DsPMT-C-his gelangen im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung und Validierung eines enzymgekoppelten colorimetrischen PMT-Tests. Die Klonierung des *pmt*-Gens in den pQE-30-Vektor ergab sich aus Beobachtungen während der Reinigung von DsPMT-C-his, auf die noch eingegangen wird. Die Vektoren -22-N-*pmt*-pQE-30 und -54-N-*pmt*-pET-47b erlaubten die Synthese von *D. stramonium* PMT-Mutanten mit N-terminalem His-Tag ohne die ersten 22 bzw. 54 N-terminalen Aminosäuren des Wildtyp-Proteins. Das pET-47b-Konstrukt ermöglichte zudem die proteolytische Abspaltung des N-terminalen His-Tags mit HRV 3C Protease nach Affinitätschromatographie. In Tab. 25 sind Eigenschaften dieser Vektoren und der von ihnen kodierten Proteine gegenübergestellt.

Tab. 25 Synthesevektoren für DsPMT und deren N-terminale Verkürzungsmutanten.

Vektor ^a	Proteineigenschaften ^b
<p><i>pmt</i>-pET-21d (Teuber <i>et al.</i>, 2007)</p> 	<p>Name: DsPMT-C-his</p> <p>Stamm: Rosetta-gami (DE3)</p> <p>Länge des Proteins: 352 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, C-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 38792,2</p> <p>Die erste Aminosäure (M) des Leserahmens wird von der Schnittstelle NcoI kodiert.</p>

Vektor ^a	Proteineigenschaften ^b
<p><i>pmt-pQE-30</i></p> 	<p>Name: DsPMT-N-his</p> <p>Stamm: M15[pREP4]</p> <p>Länge des Proteins: 355 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, N-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 38994,3</p> <p>Das erste Triplet vom <i>pmt</i> (kodiert M) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart vor dem His-Tag ersetzt.</p>
<p><i>-22-N-pmt-pQE-30</i></p> <p>Die Vektorkarte ist bis auf den um 22 Triplets verkürzten Leserahmen von <i>pmt</i> identisch mit <i>pmt-pQE-30</i>.</p>	<p>Name: -22-N-PMT</p> <p>Stamm: M15[pREP4]</p> <p>Länge des Proteins: 334 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, N-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 36823,9</p>
<p><i>-54-N-pmt-pET-47b</i></p> 	<p>Name: -54-N-PMT</p> <p>Stamm: BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RP</p> <p>Länge des Proteins:</p> <p>vor Proteolyse: 308 Aminosäuren</p> <p>nach Proteolyse: 291 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, N-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da):</p> <p>vor Proteolyse: 34062,1</p> <p>nach Proteolyse: 32077,8</p> <p>Die ersten 56 Triplets vom <i>pmt</i> wurden weggelassen und durch 20 vektorkodierte Triplets ersetzt.</p> <p>Der Pfeil ↓ kennzeichnet die Schnittstelle der HRV 3C Protease, deren Erkennungssequenz unterstrichen ist.</p>

^a Die Vektorkarten sind in der vom Hersteller angegebenen Orientierung gezeichnet. ^b Proteinlänge und Molekulargewicht beziehen sich auf das gesamte kodierte Fusionsprotein.

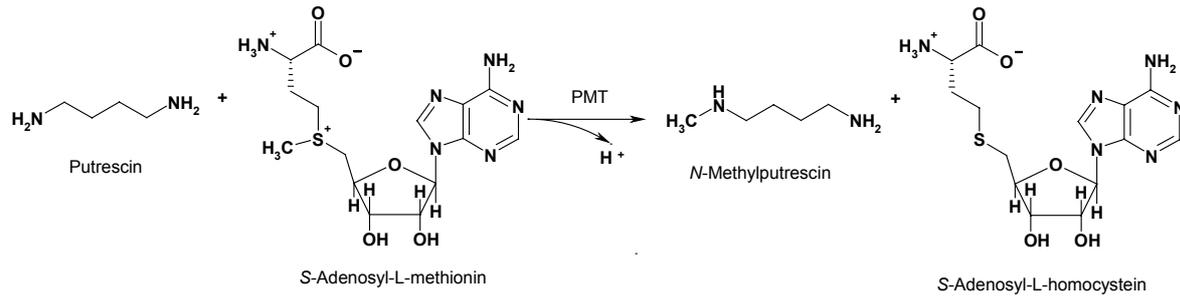
3.2 Etablierung des enzymgekoppelten colorimetrischen PMT-Tests

In diesem Enzymtest (Formelschema in Abb. 5) wurde das von der PMT aus SAM gebildete SAH von der 5'-Methylthioadenosin / S-Adenosylhomocystein Nukleosidase (MTAN, EC 3.2.2.9) zu S-Ribosylhomocystein abgebaut. Dieses wurde von der S-Ribosylhomocystein Lyase (LuxS, EC 4.4.1.21) weiter zu Homocystein umgesetzt, das durch Farbreaktion mit DTNB spektrometrisch quantifizierbar war. Relevante Eigenschaften von MTAN und LuxS wurden in Tab. 26 zusammengefasst.

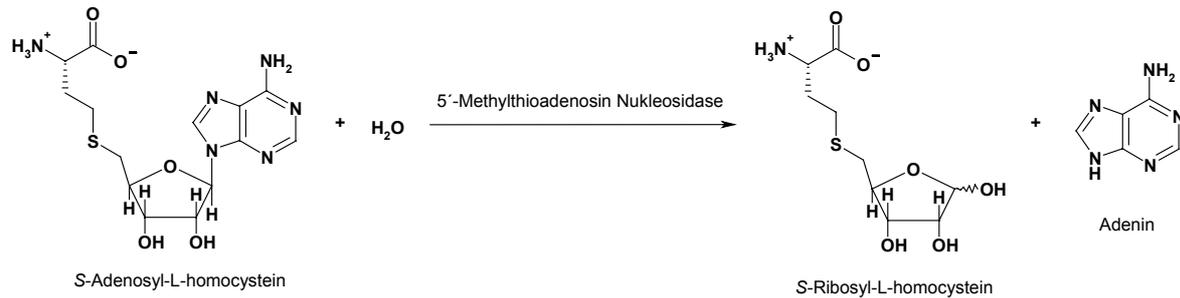
Tab. 26 Eigenschaften von MTAN und LuxS.

	MTAN	LuxS
Ursprungsorganismus	<i>Escherichia coli</i> (Cornell & Riscoe, 1998)	<i>Bacillus subtilis</i> (Hilgers & Ludwig, 2001)
GenBank-Eintrag	U24438	AAC00235.1
M (CDS) (kDa)	24,4	17,7
M (SDS-PAGE) (kDa)	28,8	23
Co-Faktoren	k.A.	zweiwertige Metallionen Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
Substrate	(1) 5'-Methylthioadenosin (2) S-Adenosylhomocystein (Cornell <i>et al.</i> , 1996)	S-Ribosylhomocystein (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
Produkte	(1) Adenin und 5'-Methylthioribose (2) Adenin und S-Ribosylhomocystein (Cornell <i>et al.</i> , 1996)	L-Homocystein und (S)-4,5-Dihydroxypentan-2,3- dion (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
Temperaturoptimum (°C)	(1) 37-45 (Cornell <i>et al.</i> , 1996)	k.A.
pH-Optimum	(1) und (2) 6,5 (Duerre, 1962)	k.A.
k _{cat} (s ⁻¹)	(1) 80 berechnet nach Angaben (Cornell <i>et al.</i> , 1996) (2) 47 berechnet nach Angaben (Cornell <i>et al.</i> , 1996; Duerre, 1962)	0,035 (mit Co ²⁺ als Zentralion) (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
K _m (μM)	(1) 0,43 (2) 4,3 (Cornell <i>et al.</i> , 1996)	2,3 (mit Co ²⁺ als Zentralion) (Zhu <i>et al.</i> , 2003)

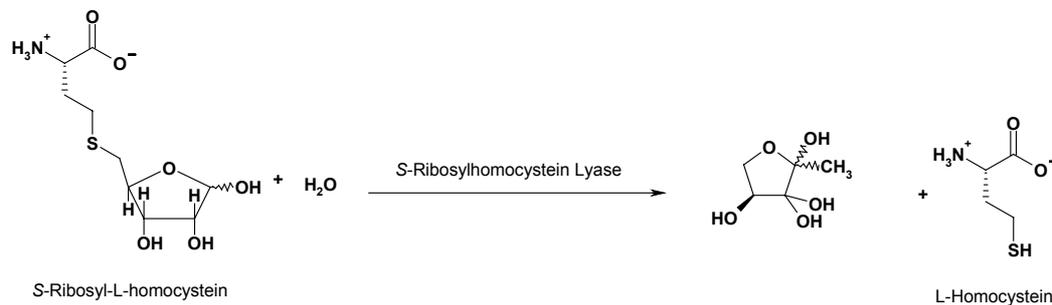
1. PMT-Reaktion:



2. MTAN-Reaktion:



3. LuxS-Reaktion^a:



4. Farbreaktion (Mikroplatte):

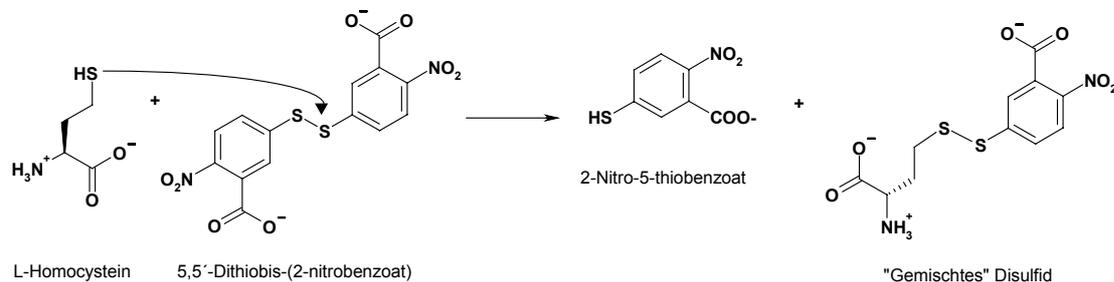


Abb. 5 Überblick über die Reaktionen im colorimetrischen PMT-Test.

L-Homocystein wird im äquimolaren Verhältnis zu *N*-Methylputrescin gebildet und nach einer Farbreaktion mit Ellman's Reagenz, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat), bei 414 nm im Mikroplattenleser quantifiziert. ^a LuxS katalysiert eine interne Redoxreaktion und anschließende β -Elimination, bei der nicht Ribose sondern 4,5-Dihydroxypentan-2,3-dion entsteht, das vermutlich zum Halbacetal zyklisiert und hydratisiert wird (Pei & Zhu, 2004).

3.2.1 Quantifizierung von Homocystein

Die Richtigkeit der Quantifizierung von Homocystein nach Umsetzung mit DTNB (2.3.9.2) wurde mit einer Kalibriergerade (Abb. 6) und einem anschließenden Soll-Ist-Vergleich gesichert.

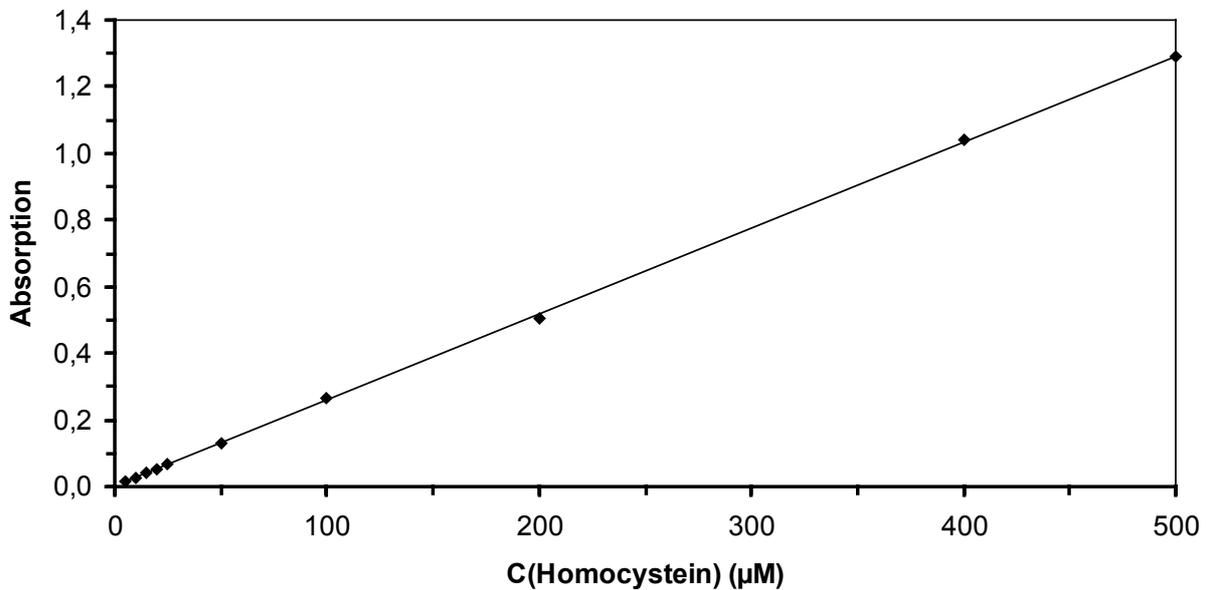


Abb. 6 Absorption in Abhängigkeit von der Homocysteinkonzentration.

Die Geradengleichung lautet $A = 0,002577 \cdot C(\text{Homocystein}) + 0,001703$; $R^2 = 0,999868$.

Die gemessenen Absorptionen wurden mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes in die Konzentration von Homocystein umgerechnet:

$$C(\text{Homocystein}) = (A \cdot 10^6 \cdot f) / (\varepsilon \cdot d)$$

A, gemessene Absorption

C(Homocystein), Konzentration an Homocystein in μM

d, Schichtdicke = 0,76 cm

ε , Absorptionskoeffizient = $13819 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei $\lambda = 414 \text{ nm}$ (Riddles *et al.*, 1983)

f, Verdünnungsfaktor = 4 (60 μl Testlösung + 180 μl Reagenzlösung = 1 : 4)

Die Auftragung der berechneten (wiedergefundenen) gegen die tatsächlichen Homocystein-Konzentrationen der Verdünnungsreihe ergab eine Gesamtwiederfindung von 98,1 % und eine Reststandardabweichung s_y von 2,17 μM (Abb. 7). Die Reststandardabweichung s_y ist ein Maß für den Abstand der einzelnen Messwerte von der berechneten Kalibriergerade. Die Bestimmungsgrenze lag bei 5 μM Homocystein in der Testlösung, was einer Stoffmenge von 1,6 nmol in 315 μl eines Enzymtests entsprach.

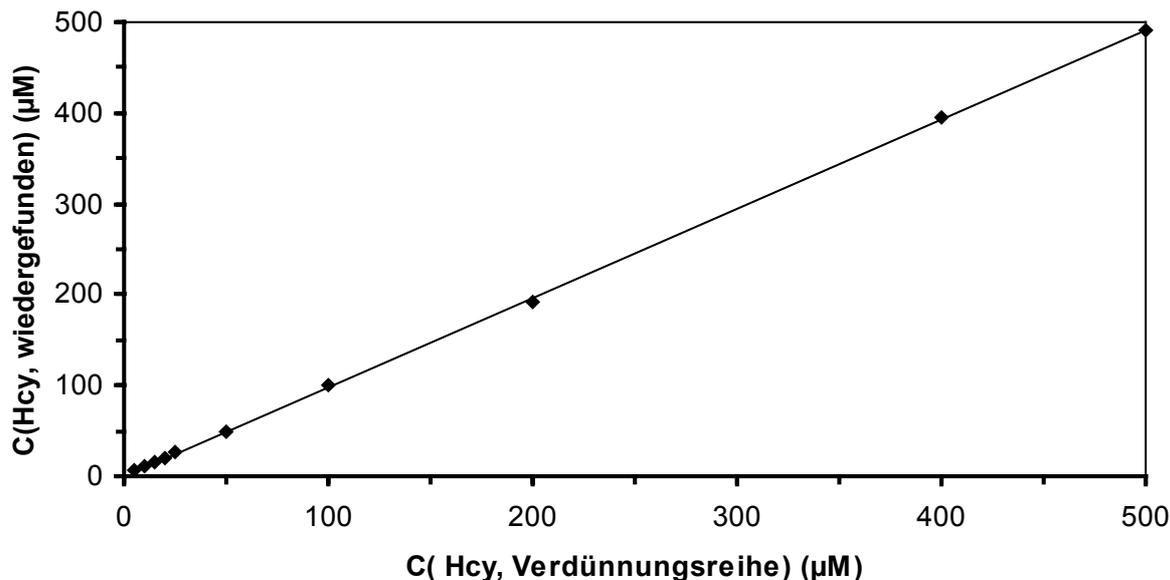


Abb. 7 Wiederfindung von Homocystein.

Die Geradengleichung lautet $C(\text{Hcy, wiedergefunden}) = 0,981 \cdot C(\text{Hcy, Verdünnungsreihe}) + 0,648$; $R^2 = 0,999$. Hcy, Homocystein.

3.2.2 Enzymatische Umwandlung von SAH zu Homocystein

Aminosäuren mit einer Thiolgruppe wie z. B. Cystein sind sehr leicht oxidierbar (Apel & Hirt, 2004). Das im gekoppelten PMT-Test freigesetzte Homocystein (Abb. 5) erwies sich ebenso anfällig gegen Oxidation, obwohl die verwendeten Puffer vor Gebrauch mit Stickstoffgas durchströmt wurden, um darin gelösten Sauerstoff zu verdrängen. Lediglich 84 % des im Test enthaltenen SAH wurden nach der Inkubation mit LuxS und MTAN für 3 min (Schema 6) als Homocystein wiedergefunden. Eine Nullprobe (Ansatz ohne SAH) wurde hierbei mitgeführt, um die Reaktion von freien Thiolgruppen der Proteine mit DTNB zu berücksichtigen. Die SAH-Stammlösung wurde jeweils frisch hergestellt und zur Kontrolle photometrisch vermessen (Tab. 5). Unter diesen Bedingungen war der Absorptionsanstieg linear bis 115 µM SAH, und die Wiederfindung von 84 % war mit einer Reststandardabweichung s_y von 1,96 µM reproduzierbar (Abb. 8). Somit wurde ein Korrekturfaktor von 1,19 in die Berechnung einbezogen. Wurde die Reaktionszeit auf 8 oder 15 min ausgedehnt, war die Wiederfindung geringer.

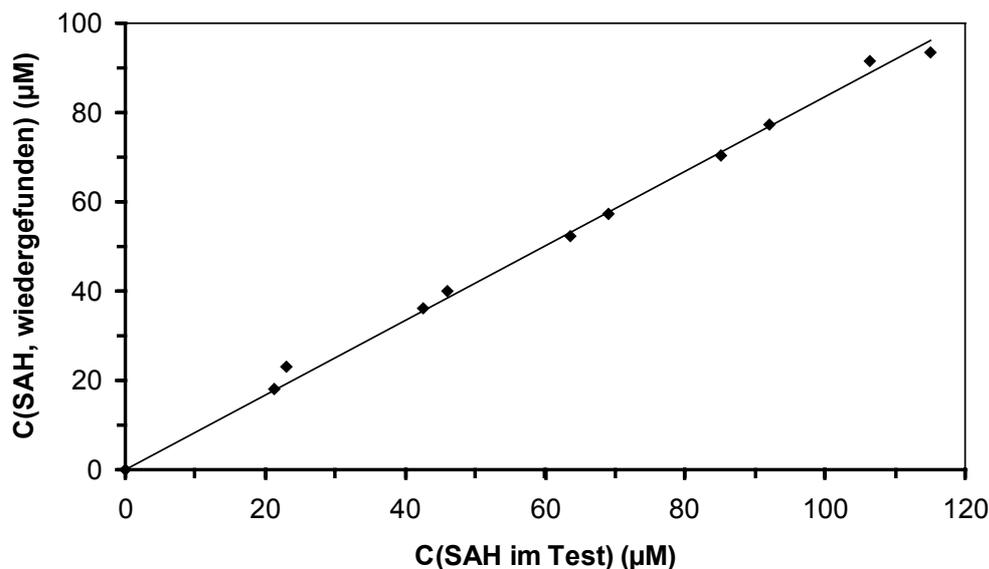


Abb. 8 Wiederfindung von SAH.

Die Geradengleichung lautet $C(\text{SAH, wiedergefunden}) = 0,836 \cdot C(\text{SAH im Test})$; $R^2 = 0,996$.

3.2.3 Nukleophilie von Putrescin

Die Wiederfindung von SAH (Abb. 8) wurde auch in Gegenwart von 4 mM Putrescin untersucht. Es zeigte sich dabei kein Einfluss auf die Aktivität von MTAN und LuxS. Bis zu 10 mM Putrescin-Base wurden von 100 mM HEPES-Puffer pH 8,0 vollständig auf pH 8-9 abgepuffert. Bei diesem pH-Wert ist die Nukleophilie von Putrescin zu schwach, um mit DTNB reagieren zu können. 100 mM Putrescin-Base in 100 mM HEPES-Puffer pH 8,0 überschreiten jedoch die Pufferkapazität und ergeben etwa pH 10. Hier wird bereits eine nennenswerte Menge an DTNB umgesetzt, was im Absorptionsanstieg deutlich wird (Abb. 9).

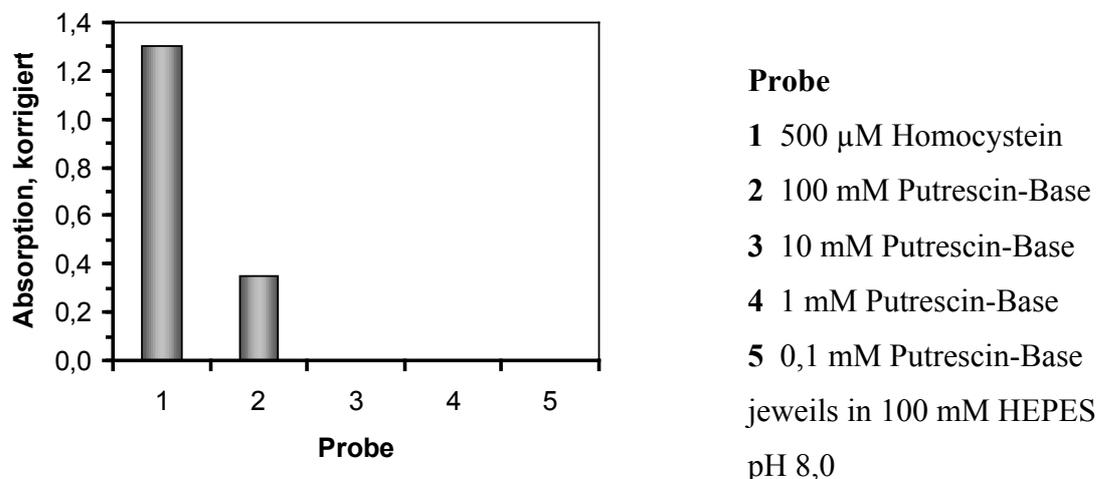


Abb. 9 Nukleophilie von Putrescin.

3.2.4 SAM als mögliches Substrat von MTAN

Die Substratspezifität von MTAN gegenüber SAH wurde im Vergleich zu SAM als potenziellem Substrat untersucht (Abb. 10). Umsatz von SAM wurde bei weniger als 130 μM SAM im Test nicht gemessen. Die Umsetzung von SAH begann jedoch schon bei 20 μM . Bei SAM-Konzentrationen über 130 μM wurde Umsatz gemessen, der wahrscheinlich auf Abbauprodukte von SAM zurückzuführen ist, das in einer chargenabhängigen Reinheit von ca. 80 % käuflich verfügbar war. Inkubation von SAM mit MTAN oder LuxS alleine sowie in Abwesenheit beider Enzyme führten nicht zu Messwerten über dem jeweiligen Nullwert. SAM störte den Test in höheren Konzentrationen entweder durch Verunreinigung mit SAH aus dem Herstellungsprozess oder durch MTAN-Aktivität gegenüber SAM. Im Gegensatz zu SAH und 5'-Methylthioadenosin wurde SAM von zellfreien Extrakten aus *E. coli* nicht hydrolysiert (Duerre, 1962). Die HPLC-Analyse von Stichproben aus kommerziell erhältlichem SAM wies allerdings Verunreinigungen mit SAH nach (Hoffman, 1986). Als Konsequenz wurde die SAM-Konzentration in allen Enzymtests auf 127 μM begrenzt.

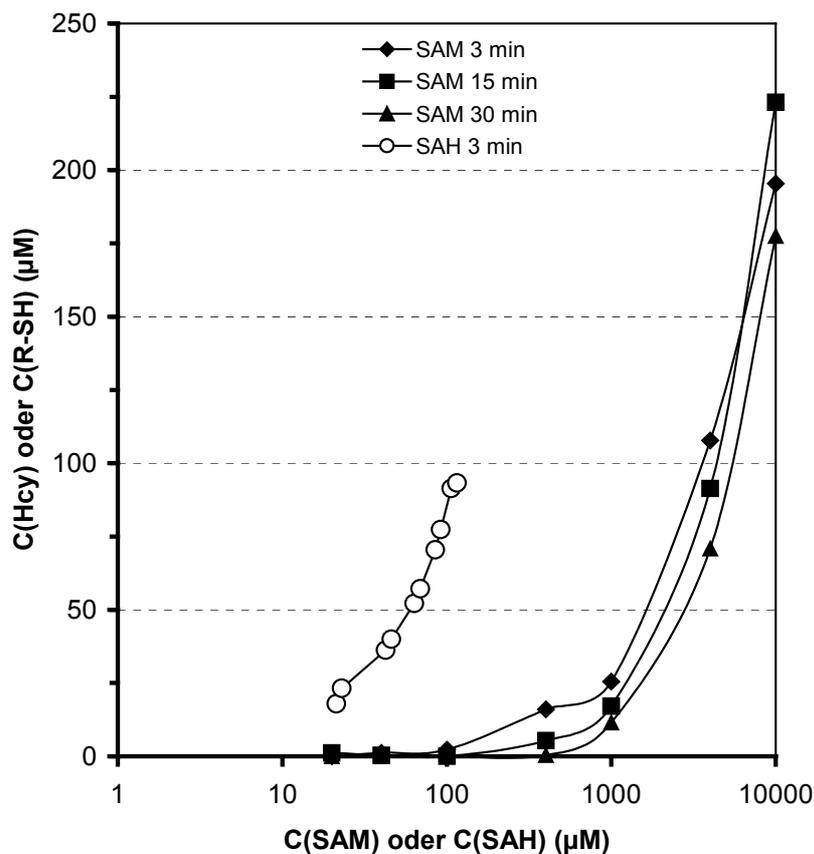


Abb. 10 Substratunterscheidung von MTAN gegenüber SAH und SAM.

Die Abszisse ist logarithmisch skaliert. R-SH, aktive Thiolgruppen aus SAM; Hcy, Homocystein. Die Konzentrationen C(Hcy) bzw. C(R-SH) wurden errechnet aus der Absorption bei 414 nm.

3.2.5 K_m -Werte von DsPMT-C-his für Putrescin und SAM

DsPMT-C-his (Tab. 25) wurde zweimal mit IMAC (2.3.5.1) über eine HiTrap Chelating HP 5 ml Säule gereinigt und in 100 mM Glycin-NaOH-Puffer pH 9,0 umgepuffert. Das Protein (ca. 41 mg aus einem Liter Bakterienkultur) ließ sich über einen Monat bei 4 °C lagern. Es zeigte nach der Reinigung eine Doppelbande in der SDS-PAGE (Abb. 11). Die enzymkinetischen Parameter wurden mit 1 µg Protein im enzymgekoppelten PMT-Test nach Schema 7 bestimmt.

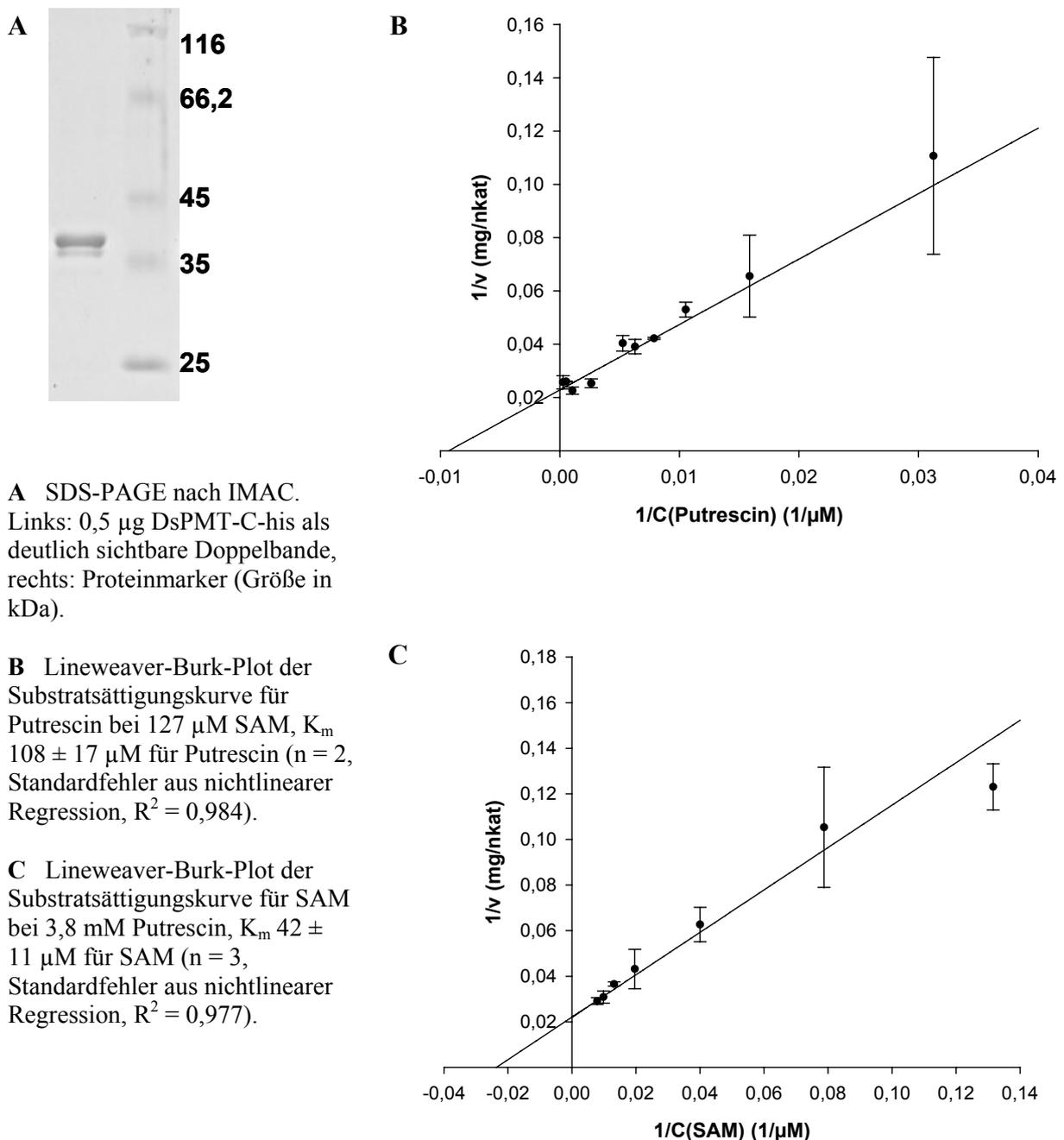


Abb. 11 Kinetische Charakterisierung von DsPMT-C-his.

Die kinetischen Parameter wurden mit dem enzymgekoppelten PMT-Test ermittelt.

3.2.6 HPLC-Kontrolle der Produktbildung

Im enzymgekoppelten PMT-Test (2.3.9.3, Schema 7) wurde die Methyltransferase-Aktivität über die Bildung von Homocystein colorimetrisch quantifiziert (Abb. 12, Kurve 1). Die PMT-Aktivität betrug 45 nkat/mg. Wenn die SAH abbauenden Enzyme MTAN und LuxS in den gleichen Enzymtests weggelassen wurden, zeigte sich nach HPLC-Bestimmung von *N*-Methylputrescin (2.3.10.2) eine erheblich niedrigere PMT-Aktivität von etwa 10 nkat/mg (Abb. 12, Kurve 2). Die Zugabe von MTAN und LuxS zu diesen Enzymtests mit anschließender HPLC-Bestimmung ergaben einen starken Anstieg der Aktivität (Abb. 12, Kurve 3).

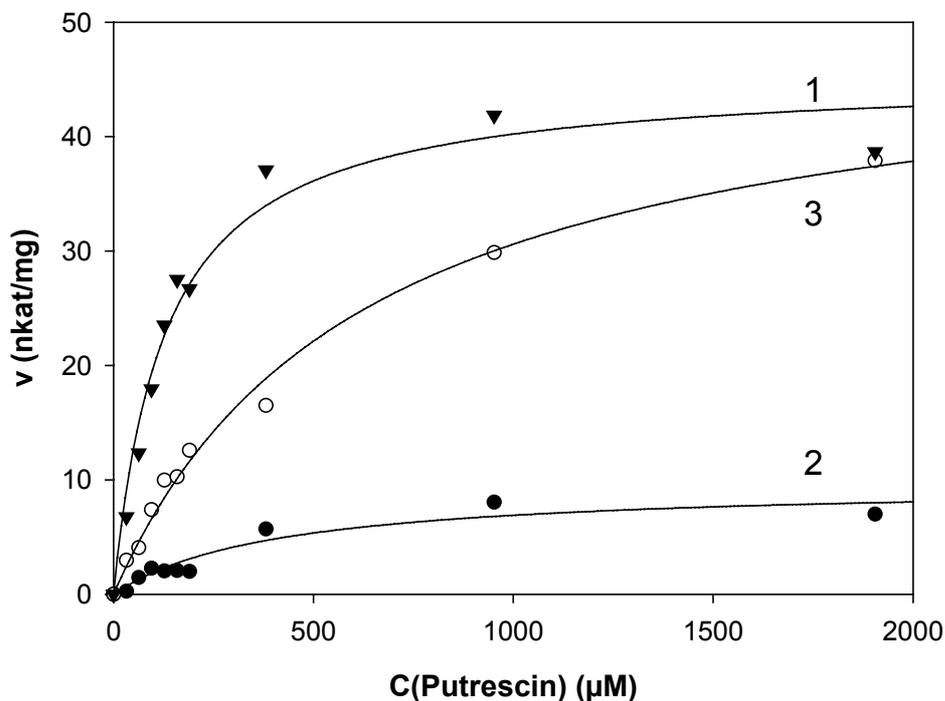


Abb. 12 Vergleich der PMT-Aktivitäten mit HPLC und dem enzymgekoppelten Test.

Kurve 1 (▼), enzymgekoppelter PMT-Test. Kurve 2 (●), PMT-Test mit HPLC-Analyse von *N*-Methylputrescin. Kurve 3 (○), PMT-Test mit HPLC-Analyse von *N*-Methylputrescin unter Zusatz SAH abbauender Enzyme MTAN und LuxS. In allen Tests betrug die SAM-Konzentration 127 μM und die Reaktionszeit 3 min.

SAH ist ein kompetitiver Inhibitor des Co-Substrats SAM und ein nichtkompetitiver Inhibitor gegenüber Putrescin (Hibi *et al.*, 1992; Walton *et al.*, 1994). Somit sind höhere Maximalgeschwindigkeit und niedrigere K_m -Werte für SAM und Putrescin verglichen mit Messungen ohne SAH-Entfernung erklärbar (Tab. 33). Allerdings ist die Bestimmung von Homocystein mit DTNB sauerstoffempfindlich, und freie Thiole als Reduktionsmittel (DTT) in Puffern und an Proteinen (Cysteinreste) stören die Messung (Riddles *et al.*, 1983).

3.3 Aufklärung der Inhomogenität von DsPMT-C-his

DsPMT-C-his sollte zur Kristallstrukturbestimmung in hoher Reinheit hergestellt werden, zeigte jedoch auch nach wiederholter Reinigung mit IMAC eine stets sichtbare Doppelbande in der SDS-PAGE (Abb. 11 A). Der Größenunterschied zwischen der oberen (stärkeren) und der unteren (schwächeren) Bande betrug ca. 2 kDa. Die Identität der Banden sollte mithilfe von Massenspektrometrie geklärt werden. Die hohe Empfindlichkeit dieses Verfahrens erforderte die weitgehende Entfernung von Fremdproteinen. Hierzu wurde die PMT mit Gelfiltration weitergereinigt, wobei die Doppelbande wegen des geringen Größenunterschiedes nicht aufgelöst werden konnte. Die Reinigung wurde auf HiLoad™ 16/60 Superdex 200 pg und Superdex 75 pg versucht. Von beiden Säulen eluierte das Enzym als nahezu symmetrischer Peak. Die K_{av} -Werte betragen näherungsweise 3,9 bzw. 1,0. Die vom Hersteller bereitgestellten Selektivitätskurven der Säulen ließen die Vermutung zu, dass DsPMT-C-his als Dimer eluierte. Nach der Gelfiltration war das Protein aktiv (Abb. 13).

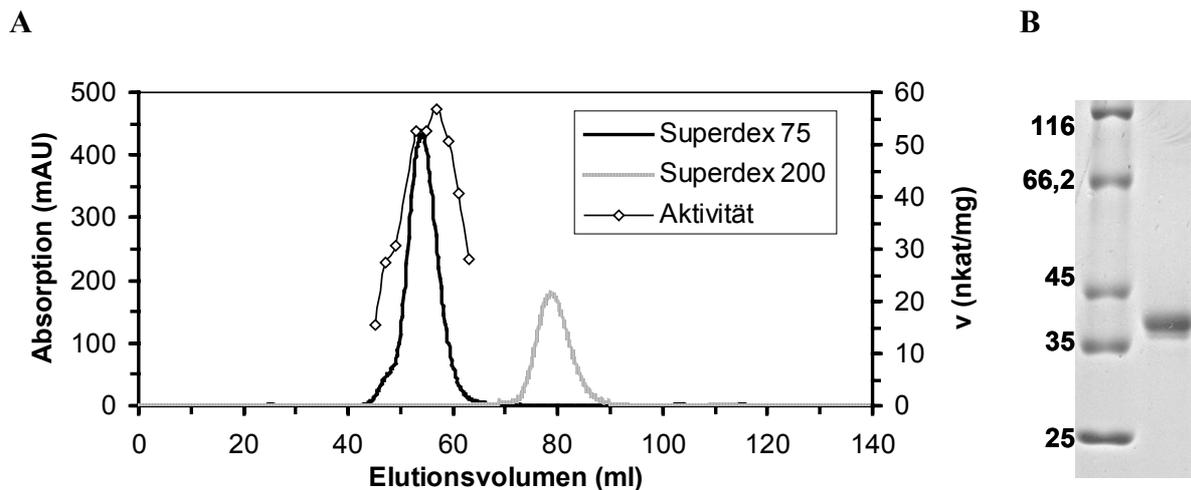
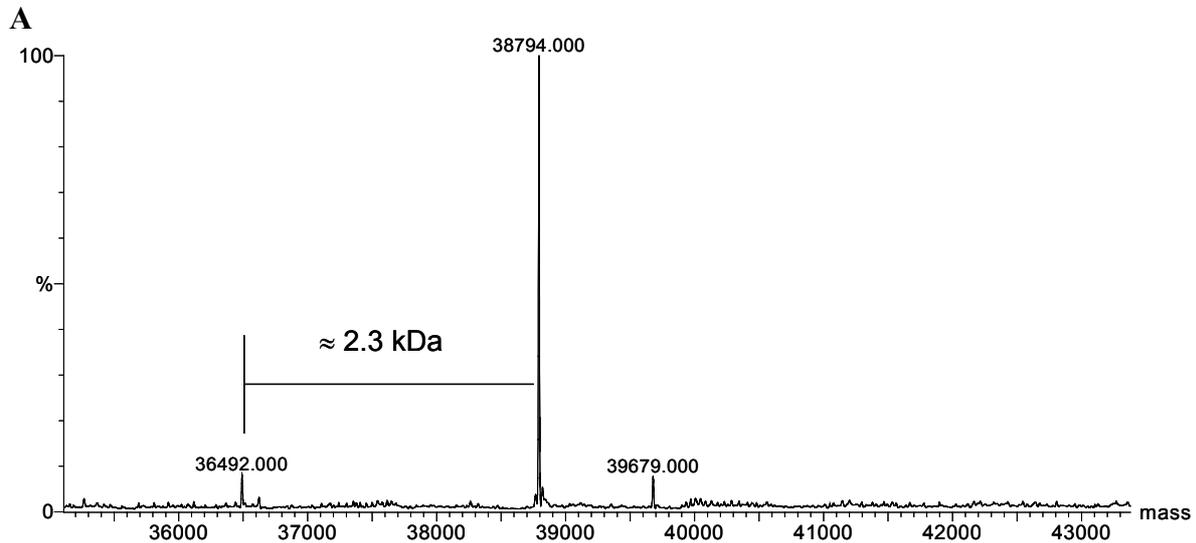


Abb. 13 Reinigung von DsPMT-C-his mit präparativer Superdex-Gelfiltration.

A Elutionsprofile. **B** SDS-PAGE von inhomogenem PMT-Protein (rechts) mit Doppelbande, das bei ca. 55 ml von Superdex 75 eluierte. Die Doppelbande ist hier nicht so gut aufgelöst wie in Abb. 11 A. Links: Markerproteine (Größe in kDa).

Eine Lösung von inhomogenem PMT-Protein (Abb. 13 B) wurde mit ESI-Q-TOF Massenspektrometrie analysiert und ergab das in Abb. 14 A gezeigte Massenspektrum. Die mit ESI-Q-TOF gefundenen Peptidfragmente belegen, dass es sich bei der oberen Bande um PMT-Ganzlängenprotein handelt (Abb. 14 B). Die untere Bande besteht demnach aus N-terminal verkürztem PMT-Protein (Abb. 14 C). Die Peptidwiederfindung betrug 37 bzw. 42 % der Gesamtsequenz und lag im üblichen Rahmen der Messmethode. Die teilweise Verkürzung des Proteins könnte möglicherweise schon während der Synthese in *E. coli* durch bakterielle

Proteasen verursacht werden (Gottesman, 1996; Gottesman, 2003). Proteolytischer Abbau bei der Bakterienlyse (2.3.1.3) wurde durch den Zusatz von Proteasehemmern zum Lysepuffer verhindert. Die Variation von Induktionstemperatur und -zeit hatte keinen Einfluss auf die Qualität des gereinigten Proteins.

**B**

MEVLSSTHTN GSSLLKNGVI TMNGHHNGNS DHRNGGTTVH ENGRKLLGNS NSIKPGWFSE
 FSALWPGEAF SLKIEKLLFQ **GKSDYQDVML FESATYGKVL** TLDGAIQTE NGGFPTYEMI
 VHLPLGSIPN **PKKVLIIIGG** IGFTLFEVLR YPTVEKIDIV **EIDDVVDVS RKFFPYLAAN**
FNDPRVTLVL GDGAAVFKAA QAGYDAIIV DSSDPIGPAK DLFERPFEEA VAKALRPGGV
 VCTQAESIWL HMHIKQIIA NCRQVFKGSV NYAWTTVPTY PTGVIGYMLC STEGPEVDFK
NPVNPIDKDE THANSKLGPL KFYNTDIHKA AFILPSFARS MIESLEHHHH HH

C

MEVLSSTHTN GSSLLKNGVI TMNGHHNGNS DHRNGGTTVH ENGRKLLGNS NSIKPGWFSE
 FSALWPGEAF SLKIEKLLFQ **GKSDYQDVML FESATYGKVL** TLDGAIQTE NGGFPTYEMI
VHLPLGSIPN **PKKVLIIIGG** IGFTLFEVLR YPTVEKIDIV **EIDDVVDVS RKFFPYLAAN**
FNDPRVTLVL GDGAAVFKAA QAGYDAIIV DSSDPIGPAK DLFERPFEEA VAKALRPGGV
 VCTQAESIWL HMHIKQIIA NCRQVFKGSV NYAWTTVPTY PTGVIGYMLC STEGPEVDFK
NPVNPIDKDE THANSKLGPL KFYNTDIHKA AFILPSFARS MIESLEHHHH HH

Abb. 14 ESI-Q-TOF Spektrum von DsPMT-C-his.

A Spektrum der Lösung von DsPMT-C-his. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 38792,2 Da. Das Signal bei 36492,0 Da entspricht einem Protein, dem die ersten 22 Aminosäuren des N-Terminus von PMT fehlen: MEVLSSTHTNGSSLLKNGVITM. Der Peak bei 39679,0 Da könnte von unspezifischer Adsorption von Kationen aus dem Puffer herrühren. **B** Gefundene Peptidfragmente (fett) nach Verdau der oberen PMT-Bande. **C** Gefundene Peptidfragmente (fett) nach Verdau der unteren PMT-Bande. In der Gesamtsequenz (mager) sind die fehlenden 22 Aminosäuren des N-Terminus unterstrichen.

3.4 Reinigung von DsPMT-N-his

Mit einem His-Tag am N-Terminus sollte die Abtrennung von N-terminal verkürztem PMT-Protein als Nebenprodukt der heterologen Synthese in *E. coli* vereinfacht werden, denn von PMT-Protein, das durch N-terminalen Abbau seinen His-Tag verlor, konnte auch keine Bindung an Nickel-Sepharose mehr erwartet werden. Das *pmt*-Gen wurde hierzu in einen pQE-30-Vektor kloniert (Vektorkarte von *pmt*-pQE-30 in Tab. 25), mit dem *E. coli* M15[pREP4] Zellen transformiert wurden. Die Induktionszeit wurde auf 4 h bei 37 °C festgelegt. Um die Exposition des PMT-Proteins gegen Imidazol zu minimieren, wurden für die Affinitätschromatographie nur noch 1 ml-Nickelsepharose-Säulen anstelle von 5 ml-Säulen verwendet. Der Imidazolgradient von 20 bis 500 mM Imidazol in 30 Säulenvolumen hatte einen geringen Anstieg. Das PMT-Protein erschien unerwartet nach der ersten Affinitätschromatographie wieder als Doppelbande in der SDS-PAGE. Das der kleineren Bande entsprechende Protein war jedoch innerhalb der ersten beiden Fraktionen des eluierenden Proteins angereichert (Abb. 15 A, Bahnen 1 und 2). Die nachfolgenden Fraktionen enthielten nahezu homogenes PMT-Protein. Es ließ sich durch insgesamt dreimalige Nickel-Affinitätschromatographie unter jeweiligem Verwerfen der ersten beiden Fraktionen und abschließende Gelfiltration vollständig homogen darstellen (Abb. 15 B und C, Abb. 16). Der Reinigungsprozess ist in Tab. 27 dokumentiert. Das Protein wurde nach der Gelfiltration auf ca. 15 mg/ml aufkonzentriert und stand für die Kristallisation zur Verfügung.

Tab. 27 Reinigungstabelle für DsPMT-N-his.

Schritt	Gesamtes lösliches Protein (mg) pro Liter Kultur	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (nkat)	Spezifische Aktivität (nkat/mg) ^a	Reinigungsfaktor (n-fach)
Lysat	171,6	100	2797	16,3	-
1. IMAC	62,6	36	8245	131,8	8,1
2. IMAC	48,6	28	2586	53,2	3,3
3. IMAC	34,1	20	n.b.	n.b.	n.b.
Gel-filtration	28,3	17	n.b.	n.b.	n.b.

^a Die Abnahme an Aktivität während wiederholter Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC) wird wahrscheinlich durch die Einwirkung von Imidazol auf das Protein hervorgerufen.

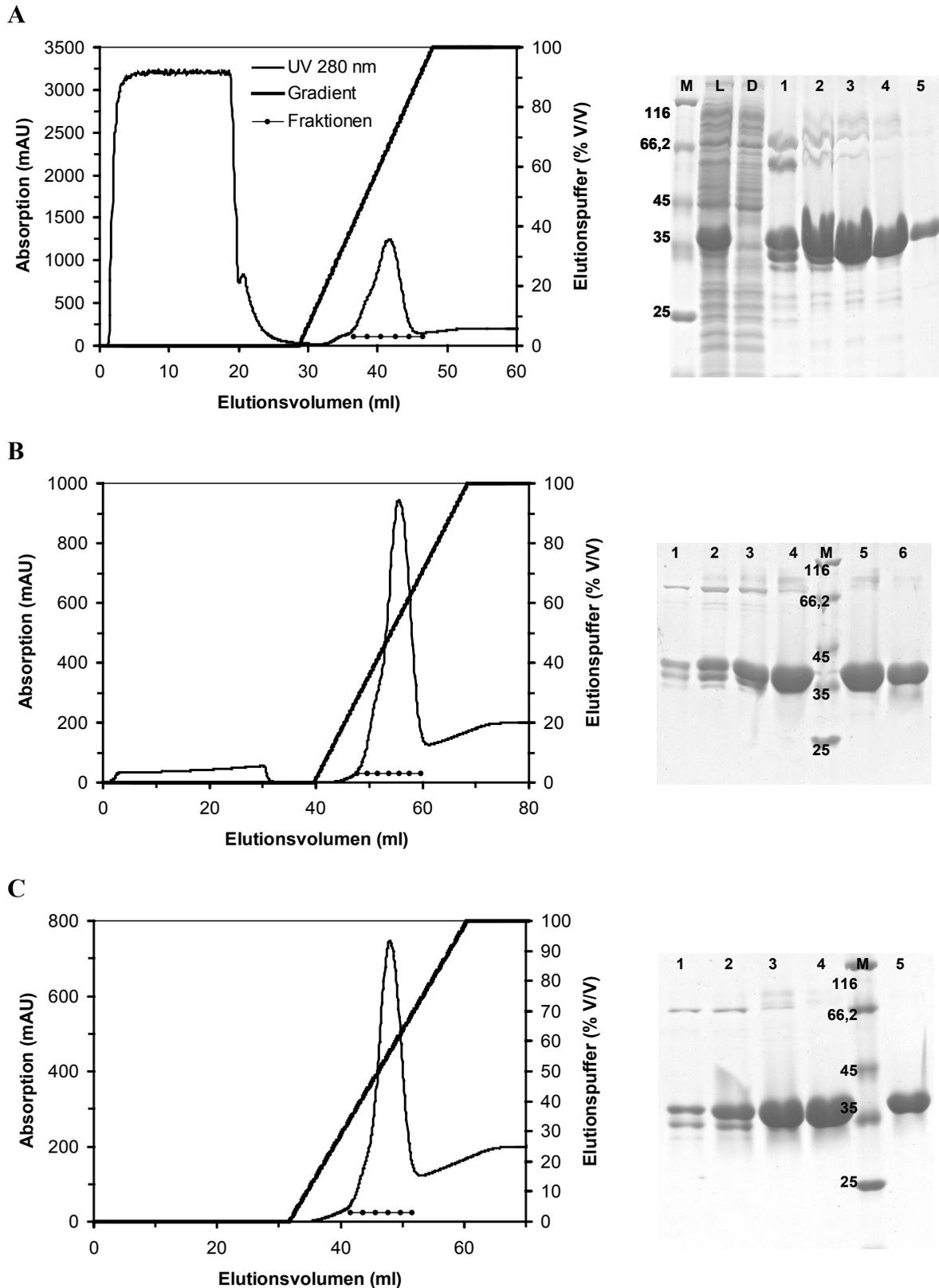


Abb. 15 Reinigung von DsPMT-N-his mit Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC).

A 1. IMAC, L, Bakterienlysat, D, ungebundene *E. coli*-Proteine, Fraktionen 1 bis 5 gesammelt.

B 2. IMAC, Fraktionen 1 und 2 verworfen, Fraktionen 3 bis 6 gesammelt. **C** 3. IMAC, Fraktionen

1 und 2 verworfen, Fraktionen 3 bis 6 gesammelt und mit Gelfiltration gereinigt. Fraktionsvolumen 2 ml, M, Markerproteine (Größe in kDa).

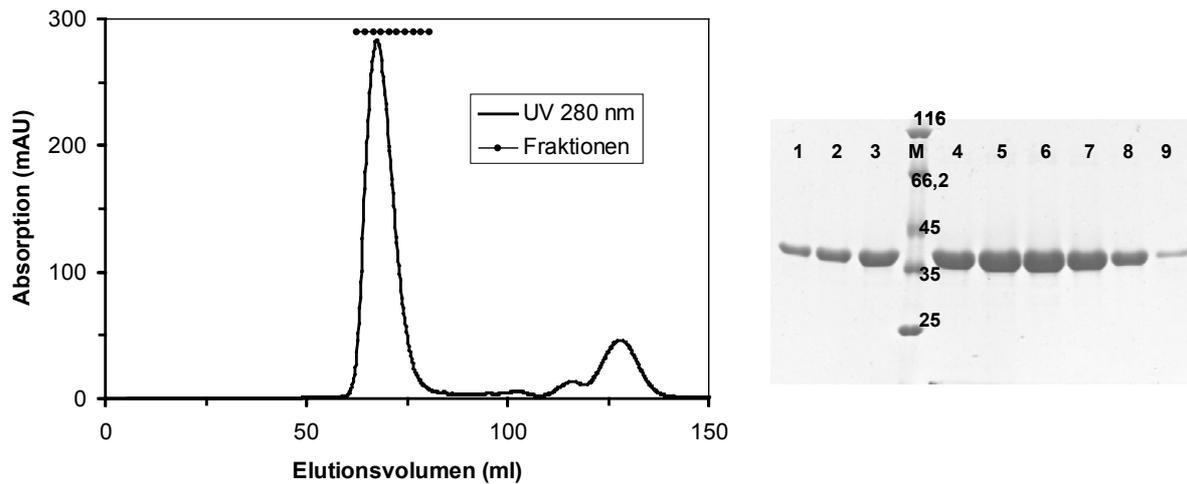


Abb. 16 Reinigung von DsPMT-N-his mit Sephacryl-Gelfiltration.

Fractionen 1 bis 9 DsPMT-N-his, Fraktionsvolumen 2 ml; M, Markerproteine (Größe in kDa).

3.5 Dimerisation von *D. stramonium* PMT

Die Beobachtung, dass sowohl vollständiges als auch N-terminal verkürztes PMT-Protein trotz Einsatz eines N-terminalen His-Tags an Nickel-Sepharose binden konnte, forderte zu Untersuchungen hinsichtlich der Oligomerisation von DsPMT auf. PMT, die aus den Wurzeln von *D. stramonium* gereinigt worden war, wurde als monomeres Enzym beschrieben. Dies stützte sich auf die Ähnlichkeit der Molekulargewichte, die aus Gelfiltration (40 kDa) und nachfolgender SDS-PAGE (36 kDa) abgeleitet wurden (Walton *et al.*, 1994). Für die PMT aus einer Wurzelkultur von *Hyoscyamus albus* wurden hingegen 62,1 kDa mit Gelfiltration ermittelt, aber keine Aussagen zur Oligomerisation getroffen (Hibi *et al.*, 1992). Die in Abschnitt 3.4 beschriebene schrittweise Reinigung von DsPMT-N-his zur Homogenität konnte auf eine Einschnitt-Reinigung reduziert werden. Dies war nützlich, um schädigende Einflüsse von Imidazol auf das Protein zu minimieren. Allerdings mussten enorme Verluste an Protein in Kauf genommen werden, da hierbei nur die in Abb. 15 A gezeigte Fraktion 5 weiterverwendet wurde. Dieses Protein besaß jedoch hohe PMT-Aktivität (Tab. 27) und eignete sich somit für enzymkinetische Messungen und analytische Gelfiltration zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts (2.3.5.4).

3.5.1 Enzymkinetische Messungen mit DsPMT-N-his

Für Messungen mit dem enzymgekoppelten PMT-Test (2.3.9.3) wurden 0,4 µg Protein eingesetzt. Es ergab sich ein K_m -Wert von $205 \pm 17 \mu\text{M}$ für Putrescin ($n = 2$, Standardfehler aus nichtlinearer Regression, $R^2 = 0,996$) und ein K_m -Wert von $56 \pm 15 \mu\text{M}$ für SAM ($n = 2$,

Standardfehler aus nichtlinearer Regression, $R^2 = 0,940$). v_{\max} betrug 132 nkat/mg, $k_{\text{cat}} = 5,14 \text{ s}^{-1}$.

3.5.2 Analytische Gelfiltration von DsPMT-N-his

Das Gesamtvolumen (V_t) der Säule (XK16/70 mit Sephacryl S-200 HR, Tab. 16) betrug 119 ml, das Ausschlussvolumen (V_o) betrug 49,9 ml (mit Dextranblau). Alle Standardproteine (2.3.5.4) und DsPMT-N-his eluierten als einzelne symmetrische Peaks.

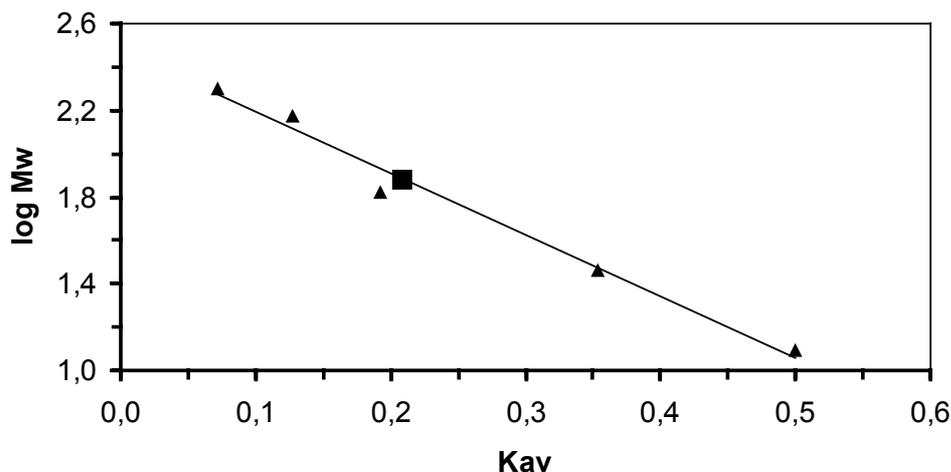


Abb. 17 Auswertung der analytischen Gelfiltration von DsPMT-N-his.

Die Geradengleichung lautet $\log Mw = -2,8263 Kav + 2,4745$; $R^2 = 0,9817$. ▲ Markerproteine; ■ DsPMT-N-his.

Aus der Regressionsgerade ergab sich für die PMT ein natives Molekulargewicht von 76,4 kDa. Das Monomer besaß ein Molekulargewicht von 39,0 kDa (Tab. 25). Zudem beeinträchtigte die Gelfiltration die Aktivität von PMT nicht (Abb. 13). Somit konnte gezeigt werden, dass PMT unter nativen Bedingungen dimerisiert. Die Fähigkeit der PMT zur Dimerisation erklärte auch das chromatographische Verhalten des Proteins an Nickel-Sepharose (Abb. 18). Die Beobachtung von monomerer PMT (Walton *et al.*, 1994) ist möglicherweise auf einen leichten Zerfall von PMT-Dimeren während der nativen Reinigung aus *D. stramonium* Wurzeln zurückzuführen, wobei die Monomere noch PMT-Aktivität behielten. Dies setzt jedoch eine gewisse Entfernung des aktiven Zentrums von der Kontaktfläche beider Monomere voraus.

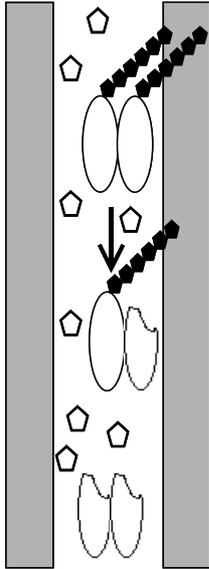


Abb. 18 Trennung von PMT-N-his-Dimeren an Nickel-Sepharose.

Drei Spezies von PMT-Dimeren lassen sich durch unterschiedliche Bindungsstärke an Nickel-Säulen trennen. Dimere ohne His-Tag (beide Untereinheiten N-terminal verkürzt) eluieren im Durchfluss. Mit steigender Imidazolkonzentration eluieren bevorzugt Dimere mit nur einem His-Tag, da sie schwächer binden als Dimere mit zwei His-Tags. Vollständige Dimere eluieren zuletzt. Offene Fünfecke: Imidazol im Eluenten, Ellipsen: PMT komplett oder N-terminal verkürzt, geschlossene Fünfecke: His-Tag am N-Terminus. Der Pfeil zeigt die Fließrichtung des Eluenten an.

3.6 Homologie-Modell der PMT

Die komparative Modellierung von DsPMT basierte weitgehend auf den Kristallstrukturen von *A. thaliana* SPDS1 (PDB 1XJ5) und *Homo sapiens* SPDS (PDB 2O06), die sich durch Sequenzidentitäten von 68 % bzw. 46 % zu DsPMT auszeichneten. Die Besonderheit bestand jedoch in der separaten Modellierung von 43 Aminosäuren der N-terminalen Domäne, für die sich kein brauchbares Alignment mit einem SPDS-Protein aus der PDB ergab (2.4.1.5). Hier kam das Programm SPRO (Cheng *et al.*, 2005) zum Einsatz, das eine *ab initio* Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstruktur für Proteine ohne geeignete Modellierungsvorlagen (Templates) erlaubte. Diese Vorhersage war weniger zuverlässig als die komparative Modellierung und daher Methode der zweiten Wahl. Die Analyse des kompletten PMT-Modells mit PROSA II ergab (2.4.1.4), dass die Energien fast aller Aminosäurereste im negativen Bereich des PROSA-Plots lagen, was eine gute lokale Modellqualität anzeigte. Die hohe Gesamtqualität des PMT-Modells wurde mit einem z-Score von -9.85 belegt, der im erwarteten Bereich eines Proteins mit 355 Aminosäuren und nativer Faltung lag. SAM ließ sich manuell in das aktive Zentrum modellieren, während Putrescin automatisch mit dem Programm GOLD (2.4.2) gedockt wurde.

Das DsPMT-Modell (Abb. 19) zeigt ein Homodimer mit leicht gegeneinander gedrehten Kontaktflächen der Untereinheiten. Die N-terminale Domäne jeder Untereinheit (M1 bis H108) setzt sich aus einem auffälligen, ungeordneten Bereich (M1 bis K73) und einem geordneten Bereich (I74 bis H108) mit vier antiparallelen β -Faltblättern zusammen. Ersterer besteht aus

zahlreichen Schlaufen (Loops) und sechs sehr kurzen Faltblättern, die nur je zwei bis drei Aminosäurereste umfassen. Die kompakte C-terminale Domäne (T109 bis S291) besteht aus sieben β -Faltblättern, die von sechs α -Helices umgeben sind. Diese Grundstruktur ist auch in zahlreichen anderen SAM-abhängigen Methyltransferasen (Schluckebier *et al.*, 1995) und in SPDS (Martin & McMillan, 2002) zu finden. Der C-Terminus endet mit zwei weiteren α -Helices. Die beiden aktiven Zentren des DsPMT-Dimers befinden sich zwischen den C- und N-terminalen Domänen, von deren Faltblättern sie bedeckt werden, reichen jedoch nicht an die Kontaktfläche der beiden PMT-Monomere heran.

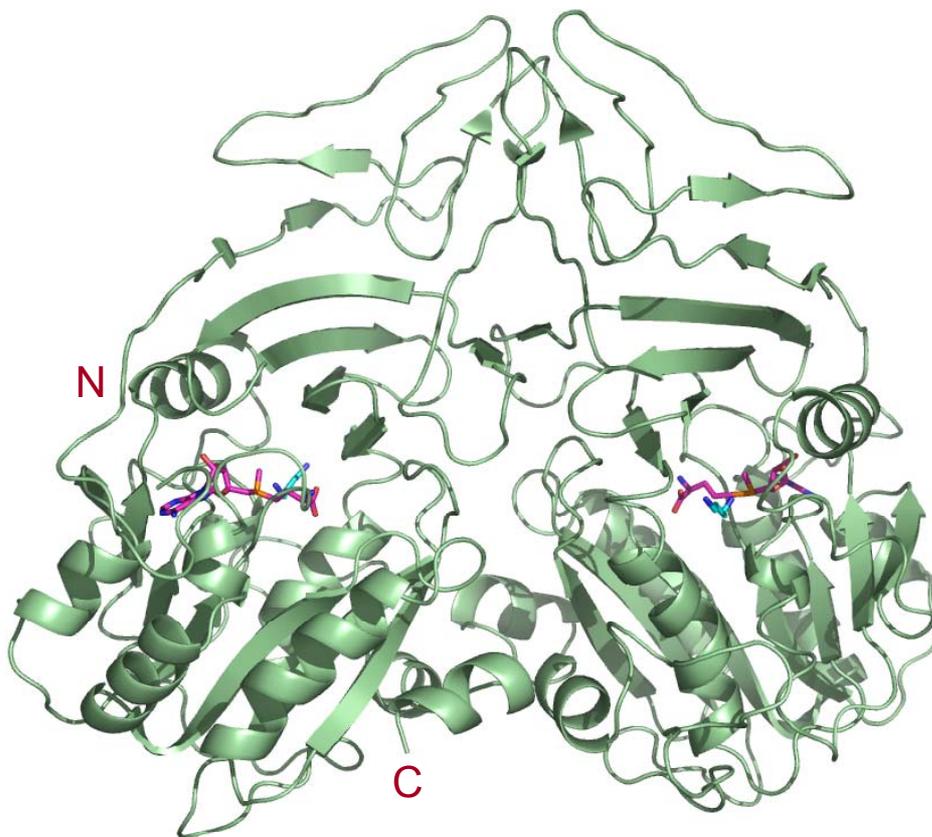


Abb. 19 Vollständiges Homologie-Modell der *D. stramonium* PMT.

Das Protein ist als Dimer dargestellt. N-Terminus (N) und C-Terminus (C) der linken Untereinheit sind markiert. Das aktive Zentrum enthält SAM (purpurrot) und Putrescin (blaugrün).

3.7 Eigenschaften des N-Terminus von PMT

Im N-Terminus von DsPMT ist die Aminosäuresequenz NGH HNGNSDHR (Reste 23 bis 33) enthalten. Sie ähnelt einer Konsensussequenz hydrophiler Aminosäurereste (NGHQNGTSEHQ), die in tandemartiger Wiederholung in den N-Termini von PMTs aus *Nicotiana*-Arten vorkommt und maßgeblich zu deren Sequenzvariabilität beiträgt (Hashimoto *et al.*, 1998b). Die Hydropathie-Analyse (Kyte & Doolittle, 1982) von *N. tabacum* PMT4

zeigte einen außerordentlich hydrophilen N-Terminus an (Abb. 20 A). Der N-Terminus von DsPMT ist mit Ausnahme der ersten 20 Aminosäuren hydrophil (GRAVY der Reste 1 bis 100: $-0,471$). Im kompakten, zentralen Teil des Proteins nimmt die Hydrophilie ab (GRAVY der Reste 101 bis 200: $+0,354$), während sie am C-Terminus wieder zunimmt (GRAVY der Reste 201 bis 344: $-0,076$, Abb. 20 B). DsSPDS mit nur 308 Aminosäuren besitzt keinen hydrophilen N-Terminus. Hydrophile und hydrophobe Regionen wechseln sich im Protein mehr oder weniger regelmäßig ab (GRAVY der Reste 1 bis 100: $-0,100$; 101 bis 200: $-0,027$; 201 bis 308: $-0,083$; 1 bis 308: $-0,070$; Abb. 20 C). Einige pflanzliche SPDS-Proteine (z. B. *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* und *Arabidopsis thaliana*) besitzen einen ähnlich hydrophilen N-Terminus wie DsPMT. *Plasmodium falciparum* SPDS besitzt einen sehr hydrophoben N-Terminus (Abb. 20 D). Die erfolgreiche Synthese löslichen Enzyms in *E. coli* war erst nach Entfernung von 29 bzw. 39 N-terminalen Aminosäuren möglich (Dufe *et al.*, 2007). Es lag die Vermutung nahe, dass hydrophile N-Termini die Löslichkeit von PMT-Proteinen begünstigen. Die N-terminalen Verkürzungsmutanten -22-N-PMT und -54-N-PMT waren unter diesen Umständen auch für Kristallisationsversuche von Bedeutung.

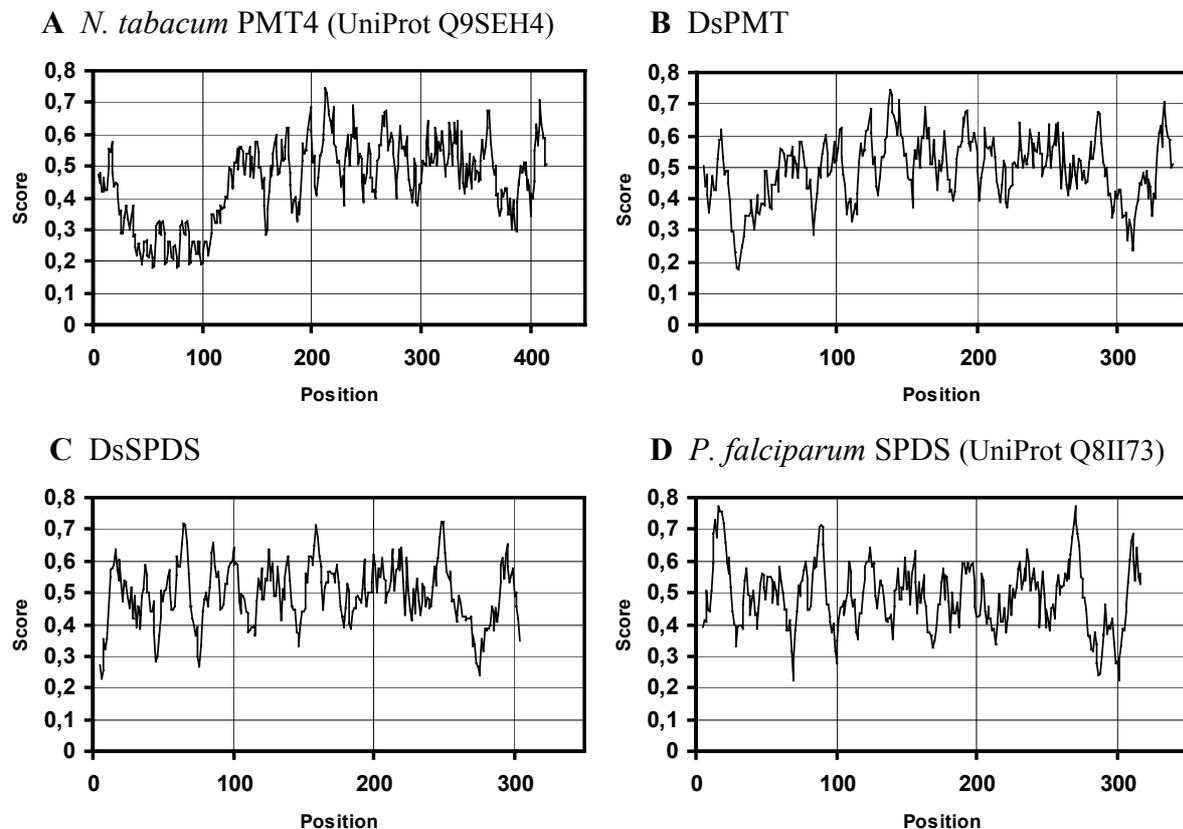


Abb. 20 Normalisierte Hydrophathieprofile von PMT und SPDS.

Hohe Score-Werte zeigen hydrophobe Bereiche an. Berechnet mit ExPASy ProtScale, Intervall: 9 Aminosäurereste, relative Gewichtung der Intervallgrenzen im Vergleich zur Intervallmitte: 100 %.

3.7.1 Mutante -22-N-PMT

Das Protein -22-N-PMT (Tab. 25) wurde in *E. coli* M15[pREP4] mit einer Induktionszeit von 4 h bei 37 °C synthetisiert. Die Reinigung bis zur Homogenität gelang mit zweifacher Nickel-Affinitätschromatographie (2.3.5.1) über HisTrap™ HP 1 ml und Sephacryl-Gelfiltration in 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0 (2.3.5.3). Nach dem ersten Reinigungsschritt betrug die Ausbeute 5,5 mg lösliches Protein pro Liter Bakterienkultur. Das entsprach lediglich 8,7 % des löslichen Proteins verglichen mit dem Ganzlängenprotein DsPMT-N-his unter identischen Synthese- und Reinigungsbedingungen (3.4). Ein großer Teil von -22-N-PMT wurde mit SDS-PAGE im unlöslichen Rückstand nach der Bakterienlyse (2.3.1.3) gefunden. Das gereinigte Protein zeigte nach Sephacryl-Gelfiltration Aktivität im enzymgekoppelten PMT-Test (2.3.9.3). Die spezifische Aktivität betrug 64 nkat/mg. Der K_m -Wert für Putrescin betrug $192 \pm 11 \mu\text{M}$ (Standardfehler für $n = 2$, $R^2 = 0,998$) und lag in der gleichen Größenordnung wie bei DsPMT-N-his (3.5.1). Die Wechselzahl k_{cat} betrug $2,36 \text{ s}^{-1}$. Insgesamt 1,9 mg -22-N-PMT wurden in 100 μl 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0 konzentriert und kristallisiert.

3.7.2 Mutante -54-N-PMT

Das Protein -54-N-PMT (Tab. 25) wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RP mit einer Induktionszeit von 5½ h bei 37 °C synthetisiert. Mit Nickel-Affinitätschromatographie (2.3.5.1) über HisTrap™ HP 1 ml gelang die Aufreinigung von 5,3 mg -54-N-PMT pro Liter Bakterienkultur. Das entsprach lediglich 12,9 % des löslichen Proteins verglichen mit dem Ganzlängenprotein DsPMT-C-his bei ähnlichen Synthesebedingungen (pET-System, Novagen) und Reinigungsverfahren (3.2.5). Wie bei -22-N-PMT (3.7.1) verblieb die Hauptmenge an -54-N-PMT nach der Bakterienlyse im unlöslichen Rückstand. Das lösliche Protein wurde in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, mit HRV 3C Protease (Tab. 6) vom His-Tag befreit (16 h, 4 °C, 1 U Protease pro 50 μg -54-N-PMT) und mit Sephacryl-Gelfiltration in 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0 gereinigt (2.3.5.3). Die Auswertung mit SDS-PAGE zeigte, dass die Abspaltung des His-Tags im Gegensatz zu einem Vorversuch mit 12 und 25 μg -54-N-PMT nicht vollständig war. Insgesamt wurden 1,56 mg -54-N-PMT in 100 μl 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0 konzentriert und kristallisiert. Das Protein zeigte nach der Gelfiltration Aktivität im enzymgekoppelten PMT-Test (2.3.9.3). Die spezifische Aktivität betrug 96 nkat/mg. Der K_m -Wert für Putrescin betrug $170 \pm 34 \mu\text{M}$ (Standardfehler für $n = 2$, $R^2 = 0,971$) und lag in der gleichen Größenordnung wie bei DsPMT-N-his (3.5.1). Die Wechselzahl k_{cat} betrug $3,09 \text{ s}^{-1}$.

Die Entfernung von bis zu 54 Aminosäuren des N-Terminus von DsPMT führte nicht zu einem Verlust der katalytischen Aktivität. Die Verkürzungsmutanten zeigten vielmehr ähnliche kinetische Eigenschaften wie der DsPMT-Wildtyp. Allerdings beeinträchtigten die N-terminalen Verkürzungen um 22 bzw. 54 Aminosäuren die Löslichkeit der Mutanten unter identischen (-22-N-PMT) bzw. sehr ähnlichen (-54-N-PMT) Synthesebedingungen verglichen mit dem DsPMT-Wildtyp. Hiermit wurde die Bedeutung des hydrophilen N-Terminus von DsPMT für die Löslichkeit des Gesamtproteins bekräftigt. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere PMT-Proteine bleibt jedoch fraglich. Vergleichbare Angaben zur Ausbeute an löslichem Protein nach N-terminaler Verkürzung von *N. tabacum* PMT1 um 81 Aminosäuren fehlen (Hashimoto *et al.*, 1998b).

3.8 Suche nach Protein-Komplexen mit *Solanum lycopersicum* PMT

Untersuchungen an zellfreien Proteinextrakten aus Wurzeln von *Nicotiana tabacum* erbrachten Hinweise, dass Diaminoxidase (Methylputrescinoxidase) und SAH-Hydrolase Komponenten eines größeren Multienzymkomplexes sind, der *in planta* als „metabolisches Fließband“ an der Synthese von Nicotin beteiligt ist (Heim & Jelesko, 2004). Da auch die katalytische Effizienz von PMT durch den Abbau des PMT-Inhibitors SAH gesteigert wird, liegt die Beteiligung von PMT an einem solchen Komplex nahe (Biastoff *et al.*, 2006). Dies setzt Protein-Protein-Wechselwirkungen voraus, die vielleicht auch vom N-Terminus der PMT ausgehen könnten. Die Aminosäuresequenzen von zwei Methylputrescinoxidasen aus *N. tabacum* (Kato *et al.*, 2007) und das Fragment einer Aminoxidase aus *Solanum lycopersicum* (UniProt Q5F306) waren verfügbar. Aus dem Proteinextrakt von 100 g *S. lycopersicum* Wurzeln (2.1.5) wurden durchschnittlich 17,3 mg Gesamtprotein zwischen 30 % und 65 % Ammoniumsulfatsättigung ausgefällt und wieder solubilisiert (2.3.4). Die Synthese von *S. lycopersicum* PMT richtete sich nach Vorgaben (Teuber *et al.*, 2007). Das 348 Aminosäuren lange Protein wurde in Rosetta-gami (DE3) Zellen mit einer Induktionszeit von 5 h bei 37 °C synthetisiert. Der Aufbau des Synthesevektors entsprach exakt dem Vektor *pmt*-pET-21d (Tab. 25) mit dem Leserahmen von *S. lycopersicum pmt* zwischen den Schnittstellen NcoI und XhoI. Das Protein wurde mit einem C-terminalen His-Tag synthetisiert und hatte ein Molekulargewicht von 38576,0 Da. Die Ausbeute an Protein betrug lediglich 0,8 mg aus 1,5 Litern Bakterienkultur. Diese Proteinmenge wurde komplett an einer HisTrap HP 1 ml Säule immobilisiert und mit dem solubilisierten Proteinextrakt aus *S. lycopersicum* durchströmt (10 ml, 0,5 ml/min). Nach dem Waschen mit Bindepuffer IMAC pH 7,8 (mit 20 mM Imida-

zol) wurde gebundenes Protein im Imidazolgradienten von 20 bis 500 mM eluiert und die Proteinfractionen mit TCA präzipitiert. Die massenspektrometrische Analyse nach SDS-PAGE und Trypsin-Verdau (2.3.8) identifizierte keine spezifischen Proteinliganden oder Oligomerisationspartner für *S. lycopersicum* PMT. Peptidfragmente mit Ähnlichkeit zu Aminoxidasen oder SAH-Hydrolasen wurden nicht gefunden. Das Ergebnis wurde mit einem Blindversuch an einer unbeladenen HisTrap Säule abgesichert. Die Vollständigkeit der Elution wurde durch das Waschen der Säule mit EDTA-Puffer (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM EDTA, pH 7,8) sichergestellt. Da die Auswahl des Tags zur Proteinimmobilisation am Säulenmaterial, die Zusammensetzung der Puffer (Ionenstärke) und die Unversehrtheit des immobilisierten Proteins Einfluss auf die Bindung weiterer Proteinliganden haben können, bieten sich zur Aufklärung des mutmaßlichen Multienzymkomplexes alternative Methoden wie Co-Immunpräzipitation und Blaue Native PAGE (BNP) an (Miernyk & Thelen, 2008).

3.9 Kristallisation von *Datura stramonium* PMT

Nach der ersten Kristallstruktur einer SPDS aus *Thermotoga maritima* (Korolev *et al.*, 2002) folgten zahlreiche SPDS-Kristallstrukturen, z. B. aus *Caenorhabditis elegans* (Dufe *et al.*, 2005), *Helicobacter pylori* (Lu *et al.*, 2007), *Plasmodium falciparum* (Dufe *et al.*, 2007) und Mensch (Wu *et al.*, 2007). Die hohe Sequenzähnlichkeit von PMT zu SPDS (Stenzel *et al.*, 2006) sowie die gute Ausbeute an DsPMT nach Synthese in *E. coli* und Reinigung über Nickel-Sepharose (3.2.5 und 3.4) erschienen als gute Ausgangsbedingungen für die Bestimmung der PMT-Kristallstruktur und die Bestätigung des PMT-Homologie-Modells (Abb. 19). Die anfängliche Suche geeigneter Pufferbedingungen in 96-well-Mikroplatten (2.3.7.1) war für DsPMT-C-his und DsPMT-N-his erfolgreich. Hingegen verlief sie für die Mutanten -22-N-PMT und -54-N-PMT ergebnislos und ergab nur Proteinaggregat (Trübung) in allen getesteten Pufferbedingungen.

3.9.1 Kristallisation von DsPMT-C-his

DsPMT-C-his war für Kristallisationsversuche sowohl mit Gelfiltration (Abb. 13) als auch mit Ionenaustauschchromatographie (2.3.5.2) gereinigt worden. In beiden Fällen ergab die Pufferbedingung 1 M Li₂SO₄, 0,5 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Natriumcitrat, pH 5,6 reproduzierbares Kristallwachstum nach einer Woche bei 13 °C. Diese Bedingung wurde daher systematisch variiert (2.3.7.2). Die Kristalle in Abb. 21 A-C wuchsen innerhalb von ein bis zwei

Wochen. Niedrigere Lithiumkonzentrationen (0,8-0,9 M Li_2SO_4) und niedrigere Proteinkonzentrationen (1,5-7 mg/ml) führten zu größeren Kristallen, während jeweils höhere Konzentrationen zu unregelmäßigem Wachstum oder sogar irreversibler Proteinaggregation führten. Röntgenbeugung war bei keinem der Kristalle nachweisbar. Aufgrund der hohen Kristallfragilität und dem Fehlen jeglicher Röntgenbeugung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Salzkristalle handelte. Der Zusatz von Putrescin und SAM verbesserte die Kristallstabilität nicht. Die nachträgliche proteolytische Entfernung des His-Tags von synthetisierter DsPMT führte zu einer Verschlechterung der Kristallisierbarkeit (Lätsch, 2009).

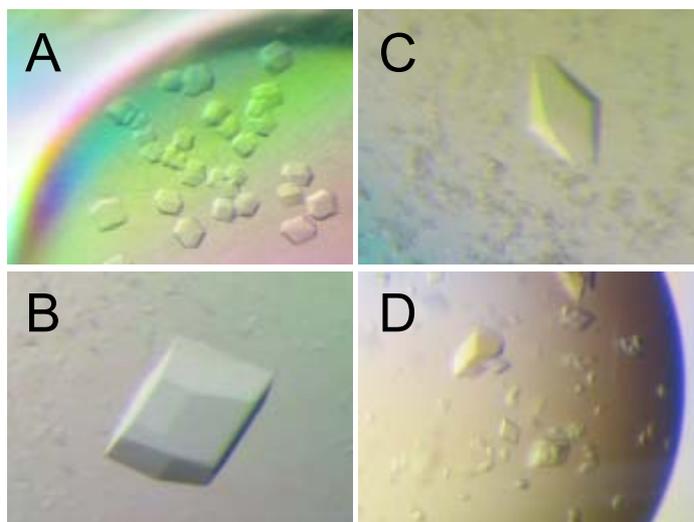


Abb. 21 PMT-Proteinkristalle.

A 0,8 M Li_2SO_4 , 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Natriumcitrat pH 4,7, 7 mg/ml Protein mit SAH und Putrescin. **B** 0,8 M Li_2SO_4 , 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 1,5 mg/ml Protein mit SAM und Putrescin, Kristalllänge 0,5 mm. **C** 0,9 M Li_2SO_4 , 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Natriumcitrat pH 6,5, 2,5 mg/ml Protein mit SAM und Putrescin, Kristalllänge 0,34 mm. **D** 100 mM HEPES-Na pH 7,5, 0,8 M NaH_2PO_4 , 0,8 M KH_2PO_4 , 7 Tage bei 13 °C, 15 mg/ml Protein, molares Verhältnis SAM : PMT 2 : 1, kein Putrescin-Zusatz.

3.9.2 Kristallisation von DsPMT-N-his

Die Reinigung von DsPMT-C-his ergab stets inhomogenes PMT-Protein durch die Kontamination mit N-terminal verkürzter PMT (Abb. 11, Abb. 13). Die Reinigung von DsPMT-N-his mit dreistufiger Nickel-Affinitätschromatographie und Gelfiltration führte hingegen zu homogenem PMT-Protein (Abb. 16). Für eine optimale Molekülpackung im Kristall erschien dies von großem Vorteil. Aber auch mit DsPMT-N-his konnten keine Röntgenstrahlung beugenden Kristalle erzeugt werden. Kristalle wuchsen in 0,1 M HEPES-Na, 0,8 M NaH_2PO_4 , 0,8 M Na_2HPO_4 , pH 7,5 (Abb. 21 D). Dieses Wachstum konnte nicht vom 96-well-Format auf CombiClover-Platten übertragen werden. Ein entsprechender pH-, Additiv- und Detergenzien-Screen (2.3.7.3) führte nicht zu Kristallwachstum.

3.9.3 Probleme bei der Diffraktionsmessung

Im Gegensatz zu DsPMT-N-his verlief die Kristallisation von DsPMT-C-his reproduzierbar. Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde von einem Pipettierroboter mit hohem Probendurchsatz bei geringem Proteinverbrauch erleichtert (Walter *et al.*, 2003). Wie bei der Kristallisation von SPDS aus *Caenorhabditis elegans*, *Plasmodium falciparum* (Dufe *et al.*, 2005; Dufe *et al.*, 2007) und *Trypanosoma cruzi* führte die Methode des „Sitzenden Tropfen“ mit Dampfdiffusion zu DsPMT-Kristallen. Lithiumsulfat diente als Präzipitant zur Kristallisation von *C. elegans* SPDS (Dufe *et al.*, 2005), und auch DsPMT-C-his ergab in Lithiumsulfat-Lösungen zahlreiche Kristalle (Abb. 21 A-C).

Die stetige Schwierigkeit der Kristallisation von DsPMT bestand nicht in mangelnder Kristallisationsneigung des Proteins, sondern in unzureichender Stabilität und fehlender Röntgenbeugung aller gewachsenen Kristalle. Maßnahmen zur Verbesserung der Kristallqualität wie Synthese von DsPMT mit N-terminalem His-Tag und Reinigung bis zur elektrophoretischen Homogenität, Entfernung des His-Tags (Waugh, 2005) oder Zusatz von Additiven bzw. Detergenzien zu den Kristallisationsansätzen führten nicht zu verbesserter Kristallqualität, sondern verschlechterten sie oder verhinderten die Kristallisation ganz. Die Störwirkung des His-Tags wird in der Proteinkristallographie unterschiedlich bewertet. Eine neuere Arbeit negierte den Einfluss von His-Tags auf die Proteinstruktur in Kristallen völlig (Carson *et al.*, 2007). Die Verkürzung von DsPMT um 22 bzw. 54 Aminosäuren führte nicht zu Röntgenstrahlung beugenden Kristallen. Hier erschwerten vor allem verringerte Proteinlöslichkeit und damit verbundene niedrige Proteinausbeute größere Screeningversuche. Das Einfrieren der PMT-Kristalle im Stickstoffstrom zur Diffraktionsmessung erforderte deren vorherige Imprägnierung mit Kristallisationspuffer, dem 10 bis 25 % Glycerol, PEG oder Ethylenglycol als Frostschutz zugesetzt waren. Die Zusätze schädigten die Kristalle und führten zu deren Abrundung oder Auflösung. In diesem Fall könnte z. B. ein Goniometeraufsatz für Diffraktionsmessungen bei Raumtemperatur (Kalinin *et al.*, 2005) Vorteile bringen. Auch der Luftzutritt beim Entnehmen der Kristalle aus den Kristallisationsplatten führte mitunter zu ihrer Wiederauflösung.

Röntgendiffraktion setzt die regelmäßige und repetitive Anordnung zahlreicher Einzelmoleküle im Kristallgitter voraus. Der durch Modellierung vorgeschlagene ungeordnete N-Terminus von PMT-Proteinen (Abb. 19) steht dieser Kristallisationsvoraussetzung entgegen. Kristallisationsversuche sollten daher mit PMT-Proteinen fortgesetzt werden, die eine

möglichst kurze N-terminale Domäne aufweisen, z. B. *Atropa belladonna* PMT1 oder *A. belladonna* PMT2.

3.10 Homologiemodell der DsSPDS

Das DsSPDS-Modell (Abb. 22) zeigt ein Homodimer mit SPDS-typischem Aufbau der Untereinheiten, wie er auch in humaner SPDS (Wu *et al.*, 2007) oder in *Caenorhabditis elegans* SPDS (Dufe *et al.*, 2005) vorkommt. Jede Untereinheit besteht aus der sechs β -Faltblätter umfassenden N-terminalen Domäne, von denen die ersten beiden β -Faltblätter eine Haarnadel bilden. Die zentrale katalytische Domäne besteht aus sieben β -Faltblättern, die von sechs α -Helices umgeben sind.

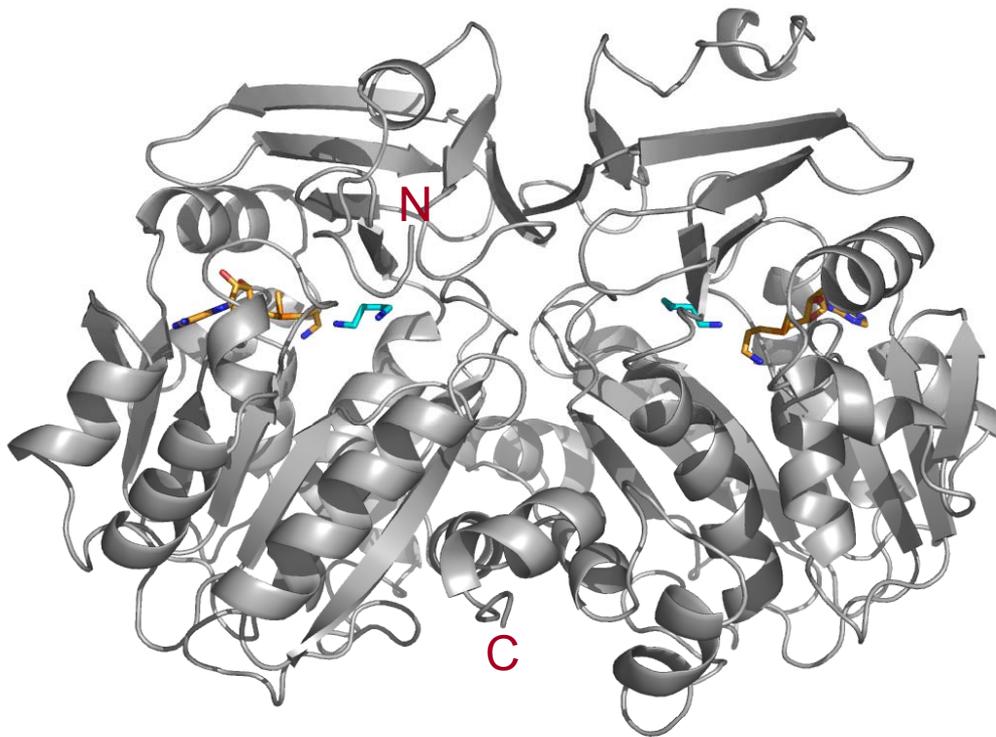


Abb. 22 Vollständiges Homologiemodell der *D. stramonium* Spermidinsynthase 1.

Das Protein ist als Dimer dargestellt. N-Terminus (N) und C-Terminus (C) der linken Untereinheit sind markiert. Das aktive Zentrum enthält dcSAM (goldgelb) und Putrescin (blaugrün).

Der C-Terminus endet mit drei weiteren α -Helices. Im Gegensatz zu DsPMT (Abb. 19) ist die N-terminale Domäne des Proteins kleiner und somit vollständig geordnet. Die Modellierung von DsSPDS als Dimer folgte den Resultaten der analytischen Gelfiltration mit rekombinantem DsSPDS-Protein (3.13.5). Das Homologiemodell der DsSPDS (Abb. 22) wies im Ramachandran-Diagramm 87 % der Aminosäuren in bevorzugten Bereichen und keine

Aminosäuren in unerlaubten Bereichen auf (2.4.1.3). Die Energien aller Aminosäurereste lagen im negativen Bereich eines PROSA-Plots und ergaben einen kombinierten z-Score von $-9,21$, was für ein Protein mit 308 Aminosäuren eine native Faltung anzeigt (2.4.1.4).

3.11 Vergleich der aktiven Zentren von DsSPDS und DsPMT

Der Hauptunterschied der Modelle von DsSPDS und DsPMT zeigte sich bei der Optimierung der Lage von SAM im aktiven Zentrum der DsPMT. Im Vergleich mit dcSAM in DsSPDS (Abb. 23 A) war die Lage des Adenosylrests praktisch unverändert, während die Aminopropylcarboxygruppe von SAM eine Kavität besetzte, die in SPDS zur Bindung von Putrescin diente (Abb. 23 B). Die Bindungsposition von Putrescin in SPDS ist durch Co-Kristallisation mit Putrescin bzw. dem Inhibitor 4-Methylcyclohexylamin gut definiert [PDB 2006 (Wu *et al.*, 2007) bzw. PDB 2PT9 (Dufe *et al.*, 2007)]. Die Positionierung von Putrescin in DsPMT gelang mit GOLD-Docking (2.4.2) dort, wo in DsSPDS die Aminopropylgruppe von dcSAM gebunden wird.

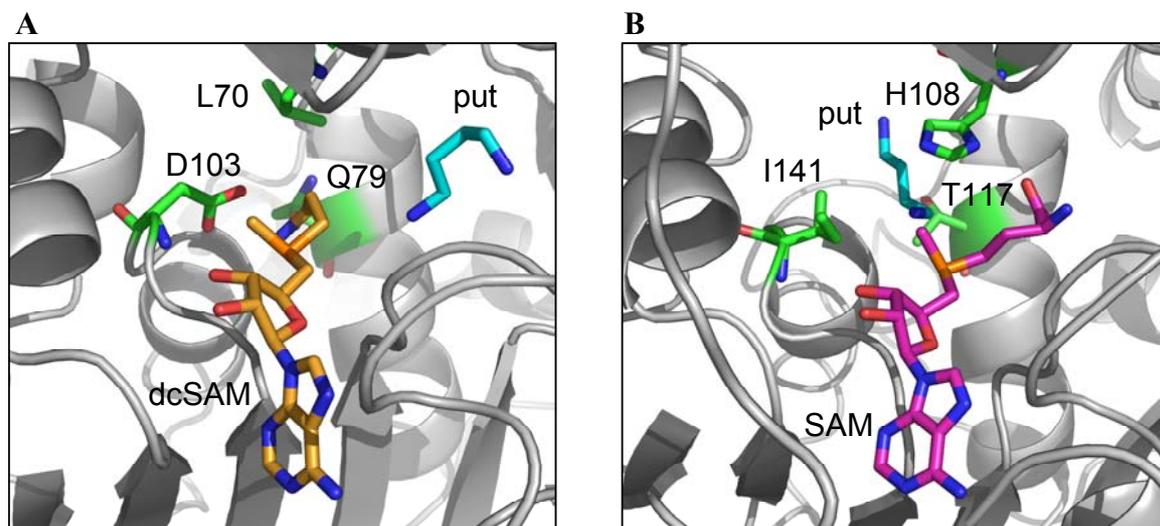


Abb. 23 Modelle der aktive Zentren von DsSPDS und DsPMT.

A DsSPDS mit dcSAM (goldgelb) und Putrescin (put, blaugrün). **B** DsPMT mit SAM (purpurrot) und Putrescin (put, blaugrün). Grau: Strukturelemente, grün: relevante Aminosäurereste für die ortsgerichtete Mutagenese.

Die Bindung von dcSAM in SPDS ist durch Kristallstrukturen gut belegt [PDB 200L (Wu *et al.*, 2007) bzw. PDB 2PT6 und 2PT9 (Dufe *et al.*, 2007)]. Im Bereich der einen Bindungsstelle für die Aminopropylgruppe des dcSAM (in SPDS) bzw. des Putrescins (in PMT) unterscheiden sich beide Proteine systematisch voneinander (L70 bis Q79 und D103 bis R108 in DsSPDS, Abb. 24). Die Reste L70, Q79 und D103, die an der Bindung der Aminopropyl-

gruppe von dcSAM in SPDS (Abb. 23 A) beteiligt sind, boten sich somit als Ausgangspunkte für die ortsgerichtete Mutagenese von DsSPDS an. Ein Aspartatrest (D103 in DsSPDS), der in den Spermidinsynthasen streng konserviert ist, wurde als entscheidend für die Co-Substratspezifität von SPDS hinsichtlich dcSAM angesehen, indem er SAM durch die Abstoßung von dessen Carboxylgruppe an der Bindung in SPDS hindert. Hingegen wird die Bindung von dcSAM durch eine Salzbrücke des Aspartats mit der Propylamin-Funktion des Co-Substrats stabilisiert (Ikeguchi *et al.*, 2006; Korolev *et al.*, 2002). In DsPMT liegt an korrespondierender Position zu D103 ein Isoleucin-Rest (I141), der sich als essenziell für die Aktivität von DsPMT erwies (Teuber *et al.*, 2007).

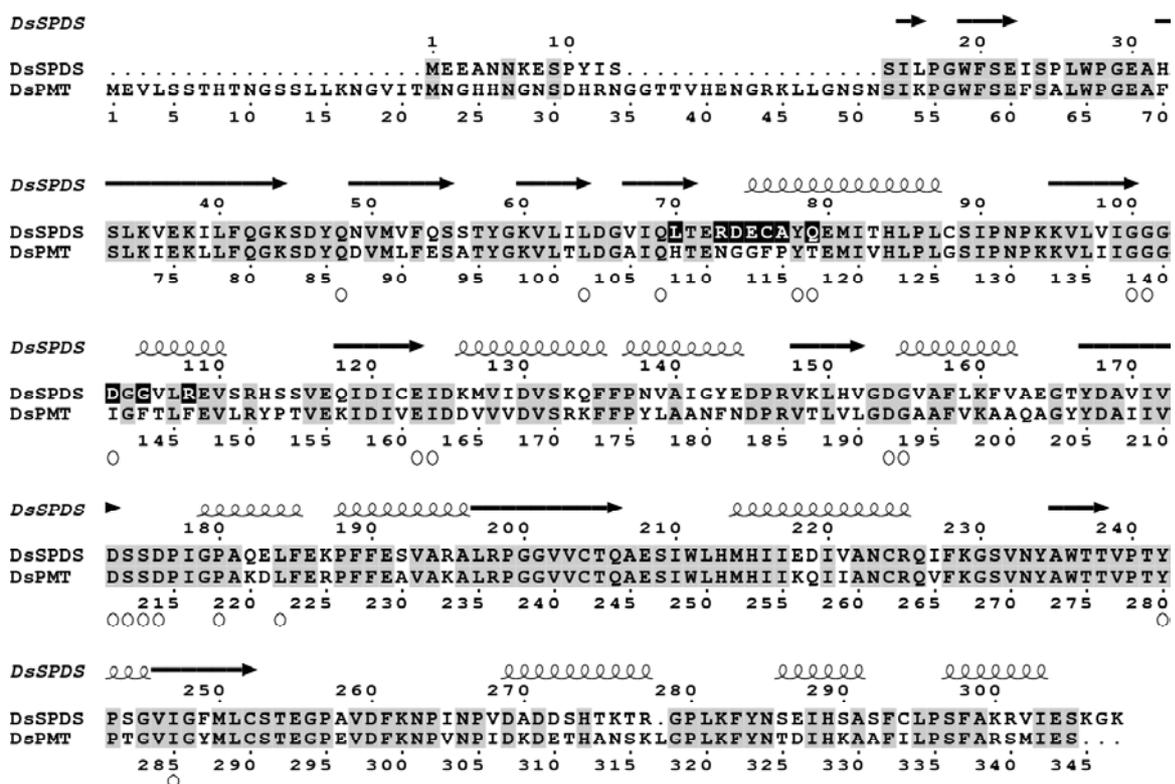


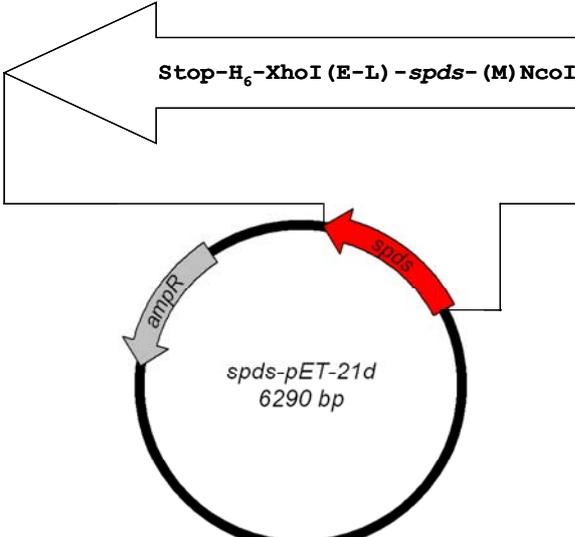
Abb. 24 Sequenzalignment von DsSPDS und DsPMT.

Grau unterlegt: identische Aminosäuren, schwarz unterlegt: 10 Aminosäurereste für die kumulative Mutagenese. o: Reste für die Bindung des Übergangszustand-Analogons AdoDATO in *Thermotoga maritima* SPDS (Korolev *et al.*, 2002). Die Sekundärstruktur des DsSPDS-Modells ist mit Pfeilen (β -Faltblätter) und Spiralen (α -Helices) angedeutet.

3.12 Synthesevektor für DsSPDS und deren Punktmutanten

Der Vektor *spds*-pET-21d (Tab. 28) ermöglichte die Synthese von DsSPDS mit C-terminalem His-Tag. Er war gleichzeitig die Matrize für die ortsgerichtete Mutagenese des *spds1*-Gens (Einzelmutationen). Die mutierten Vektoren dienten ihrerseits als Matrizen zur Erzeugung kumulativer Mutationen (Tab. 3).

Tab. 28 Synthesevektor für DsSPDS und deren Punktmutanten.

Vektor ^a	Proteineigenschaften ^b
<p><i>spds</i>-pET-21d</p> 	<p>Name: DsSPDS</p> <p>Stamm: BL21(DE3)</p> <p>Länge des Proteins: 316 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, C-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 35098,0</p> <p>Die erste Aminosäure (M) des Leserahmens wird von der Schnittstelle NcoI kodiert.</p>

^a Die Vektorkarte ist in der vom Hersteller angegebenen Orientierung gezeichnet. ^b Proteinlänge und Molekulargewicht beziehen sich auf das gesamte kodierte Fusionsprotein.

3.13 Charakterisierung des DsSPDS-Wildtyps

Die proteinchemische Charakterisierung des DsSPDS-Wildtyps ermöglichte die zuverlässige Beurteilung der DsSPDS-Mutanten im Hinblick auf den Verlust bzw. den Wechsel ihrer katalytischen Aktivität.

3.13.1 Reinigung und Stabilität

DsSPDS (Tab. 28) wurde mit einer Induktionszeit von 5,5 bis 6 h bei 37 °C in BL21(DE3) Zellen synthetisiert. Das Protein wurde in einem Schritt mit Nickel-Affinitätschromatographie (2.3.5.1) gereinigt. Das Vorgehen entsprach hierbei dem ersten Schritt der Reinigung von DsPMT-N-his (3.4), wodurch 12,5 mg homogenes Protein aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen wurden. Der Lagerungspuffer des Proteins (20 mM HEPES pH 8,0) wurde mit 2 mM DTT und 1 mM Ascorbinsäure versetzt, da *Senecio vernalis* SPDS (Graser & Hartmann, 2000) und *Arabidopsis thaliana* SPDS1 (Reinhardt, 2008) als oxidationsempfindlich beschrieben wurden. Die Stabilität von DsSPDS wurde durch den Reduktionsmittelzusatz verbessert, dennoch verlor das Protein 23 % seiner Aktivität während der Lagerung über zwei Wochen bei 4 °C. Wenn der Lagerungspuffer keine Reduktionsmittel enthielt, war das Protein nach der Reinigung sofort inaktiv. Die Aktivität von DsPMT wird durch längere Einwir-

kungszeiten von Imidazol beeinträchtigt (Tab. 27), aber im Gegensatz zu DsSPDS nicht vom Fehlen von Reduktionsmitteln im Lagerungspuffer. Die strukturelle Grundlage für die unterschiedliche Oxidationsempfindlichkeit von SPDS und PMT könnte in deren unterschiedlichen Cysteingehalten liegen (Abb. 25).

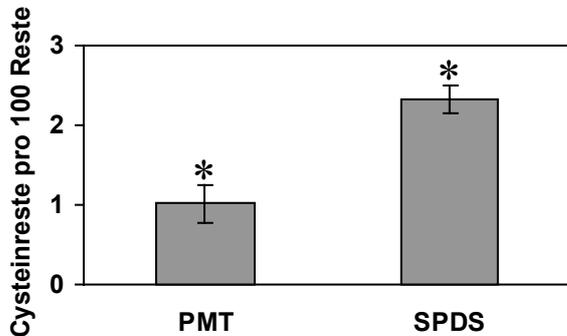


Abb. 25 Mittlerer Cysteingehalt in PMT und pflanzlichen SPDS.

Balken bezeichnen die Standardabweichungen, Sterne zeigen ein Signifikanzniveau von 1 % an, das mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt wurde (PMT: n = 27; SPDS: n = 13).

3.13.2 Aktivitätsbestimmung mit HPLC

Die Aktivität von DsSPDS wurde mit HPLC-Messungen des Reaktionsprodukts Spermidin nach Dansylierung bestimmt (2.3.10). Gleichzeitig wurde das Protein auf Nebenaktivitäten wie die Bildung von *N*-Methylputrescin (PMT-Aktivität) und Spermin (SPMS-Aktivität) geprüft. Die Aktivität von DsSPDS war an die Gegenwart von Reduktionsmitteln im Lagerungspuffer gebunden, welche aber die Farbreaktion (Abb. 5) des enzymgekoppelten PMT-Tests durch Reduktion von Ellman's Reagenz störten. Deshalb wurde PMT-Aktivität in DsSPDS-Wildtyp und DsSPDS-Mutanten sowie in den chimären Proteinen aus PMT und SPDS (Tab. 28, Tab. 30) stets mit HPLC untersucht. Die Quantifizierung der Produkte wurde mit Kalibrierkurven externer Polyamin-Standards ermöglicht (siehe Anhang, 6.1), wobei auch die Robustheit des Dansylierungsverfahrens mit Polyaminlösungen in verschiedenen Puffern und Stopplösungen für Enzymtests untersucht wurde (2.3.10.4).

100 mM Glycin pH 8,0 als Reaktionspuffer sowie 17 N NaOH als Stopplösung (Teuber *et al.*, 2007) verringerten die Wiederfindung von Spermidin stark. Die Wiederfindung von *N*-Methylputrescin wurde vor allem mit 17 N NaOH beeinträchtigt (Abb. 26). Anwesende Reaktionspuffer stumpften die Basizität ab und ermöglichten eine Wiederfindung von 4,5 bis 7 % *N*-Methylputrescin (ohne Abbildung). Als Erklärung für die niedrigen Wiederfindungen

kommen Störungen der Dansylierungsreaktion infrage. So könnte der vielfache molare Überschuss von Glycin mit $pI = 6,06$ (Liu *et al.*, 2004) und einer unprotonierten Aminogruppe bei pH 8-9 die Vollständigkeit der Dansylierung von Spermidin herabsetzen, während 17 N NaOH den hydrolytischen Abbau von Dansylchlorid beschleunigt. Als Konsequenz hieraus wurden alle enzymkinetischen Messungen mit DsSPDS-Wildtyp und DsSPDS-Mutanten sowie den chimären Proteinen aus PMT und SPDS in 20 mM HEPES pH 8,0 angesetzt. Die Enzymtests wurden anschließend mit einem gleichen Volumen an gesättigter Natriumcarbonatlösung gestoppt und dansyliert (2.3.10.2 und 2.3.10.3).

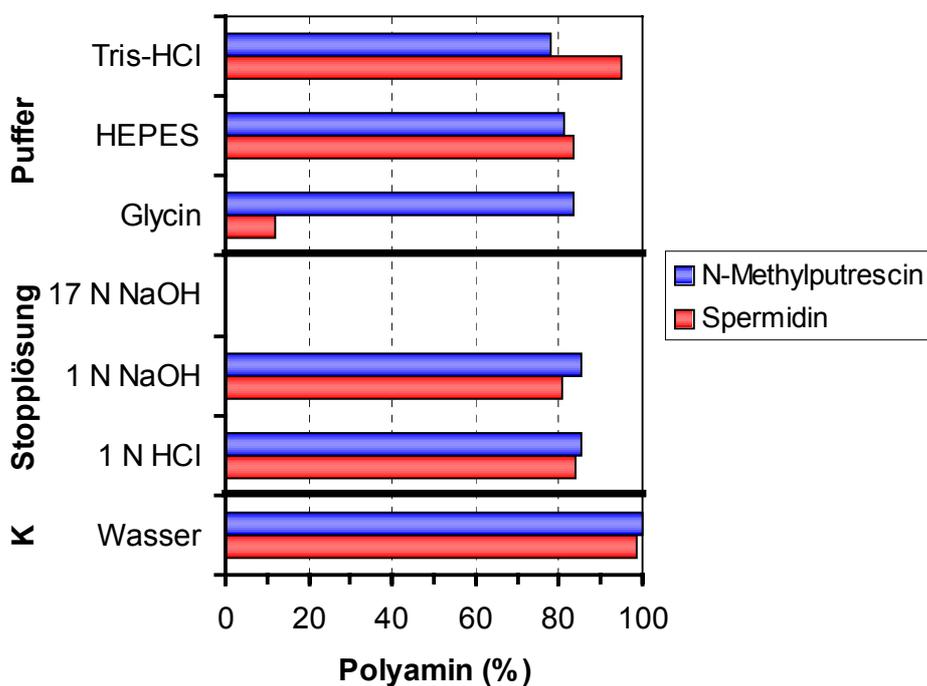


Abb. 26 Detektion von Polyaminen in Enzymtests.

Puffer: Die Konzentration des Puffers betrug jeweils 100 mM mit Wasser als Stopplösung.

Stopplösung: Wässrige Polyaminlösung im Gemisch mit der angegebenen Stopplösung.

K: Kontrolle mit Wasser.

3.13.3 Kinetische Eigenschaften von DsSPDS

Die Maximalaktivität des Enzyms betrug 12,5 nkat/mg. Die Wechselzahl k_{cat} betrug $0,44 \text{ s}^{-1}$. Das Protein zeigte keine PMT-Aktivität bei der Inkubation mit Putrescin und SAM und auch keine SPMS-Aktivität mit dcSAM und Spermidin. Die K_m -Werte (Abb. 27) liegen für Putrescin mit $33,1 \mu\text{M}$ und für dcSAM mit $64,2 \mu\text{M}$ in der Größenordnung anderer SPDS-Proteine (Tab. 33). Die Linearität der Produktbildung wurde für $1 \mu\text{g}$ Protein über 10 min gesichert (ohne Abbildung).

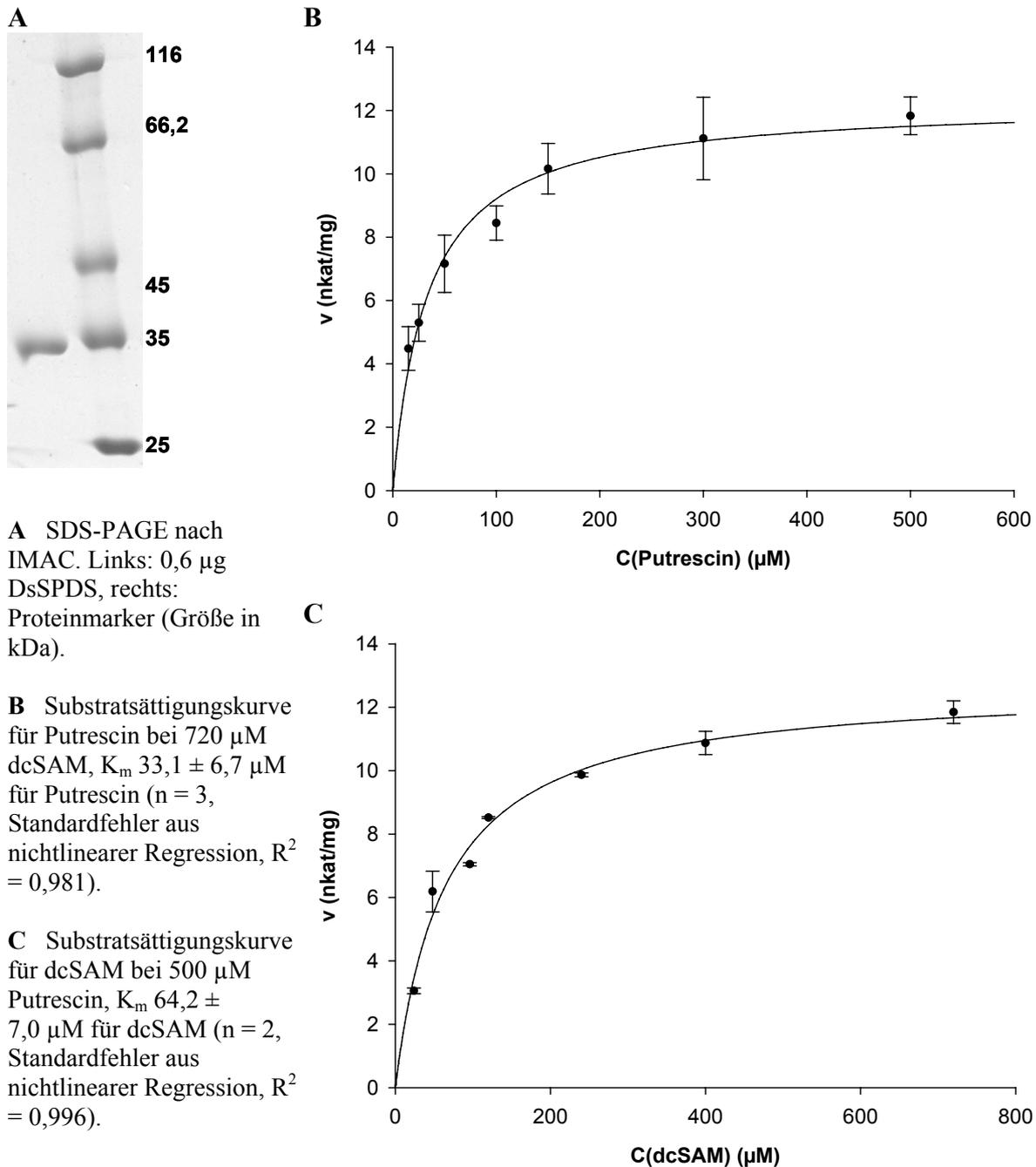


Abb. 27 Kinetische Charakterisierung von DsSPDS.

3.13.4 pH-Optimum

Das pH-Optimum von DsSPDS liegt bei pH 10 (Abb. 28). Ähnlich hohe pH-Werte sind auch für andere SPDS-Proteine gemessen worden (Samejima & Yamanoha, 1982; Bowman *et al.*, 1973).

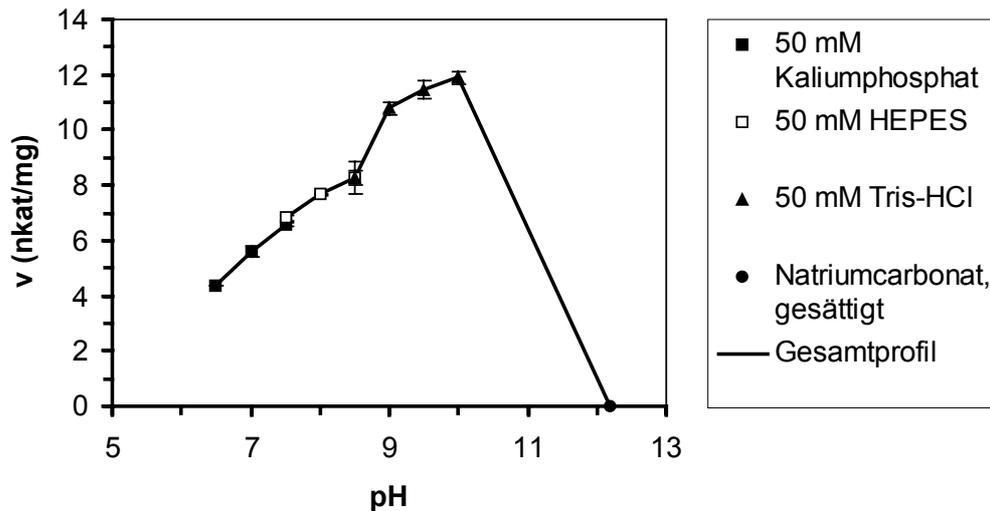


Abb. 28 pH-Abhängigkeit der Aktivität von DsSPDS.

Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung für $n = 2$.

3.13.5 Analytische Gelfiltration von DsSPDS

Gereinigtes, rekombinantes DsSPDS-Protein (Abb. 27 A) wurde zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts mit analytischer Gelfiltration (2.3.5.4) untersucht. Das Gesamtvolumen (V_t) der Säule (XK16/70 mit Sephacryl S-200 HR, Tab. 16) betrug 119 ml, das Ausschlussvolumen (V_o) betrug 49,9 ml (mit Dextranblau). Alle Standardproteine und DsSPDS eluierten als einzelne symmetrische Peaks.

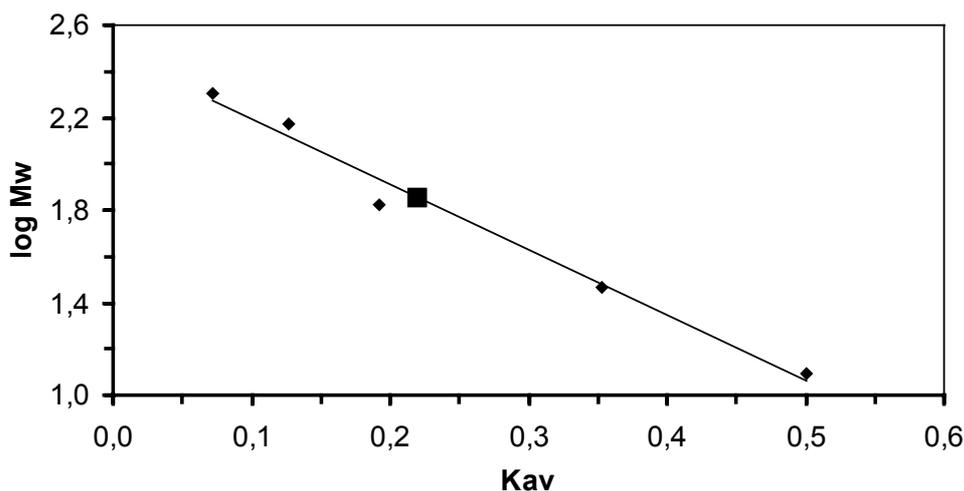


Abb. 29 Auswertung der analytischen Gelfiltration von DsSPDS.

Die Geradengleichung lautet $\log Mw = -2,8263 Kav + 2,4745$; $R^2 = 0,9817$. ◆ Markerproteine; ■ DsSPDS.

Aus der Regressionsgerade (Abb. 29) ergab sich für DsSPDS ein natives Molekulargewicht von 71,6 kDa. Das Monomer besaß ein Molekulargewicht von 35,1 kDa (Tab. 28). Somit

konnte gezeigt werden, dass DsSPDS unter nativen Bedingungen wie DsPMT als Dimer vorliegt. Dies fand Berücksichtigung im Homologiemodell von DsSPDS (Abb. 22).

3.14 Eigenschaften der Punktmutanten von DsSPDS

3.14.1 Einzelmutanten

Die Einzelmutanten 1a bis 1c (Tab. 3 und Abb. 30) wurden in BL21(DE3) Zellen mit einer Induktionszeit von 5,5 h bei 37 °C synthetisiert und in einem Schritt mit Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine wurden danach in den SPDS-Lagerungspuffer (3.13.1) umgepuffert.

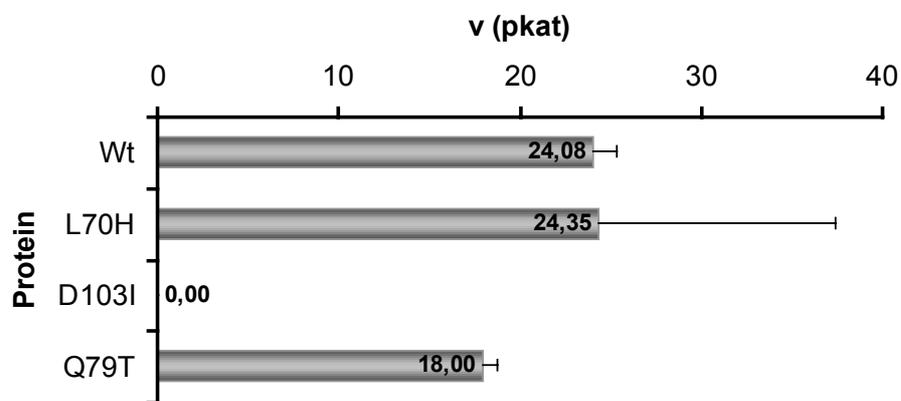


Abb. 30 Charakterisierung der drei Einzelmutanten von DsSPDS.

Die SPDS-Aktivität wurde mit je 10 µg Protein bestimmt. Wt = DsSPDS-Wildtyp.

Die Mutanten L70H und Q79T besaßen ca. 100 % bzw. 75 % der Aktivität des DsSPDS-Wildtyps. Hingegen zerstörte der umgekehrte Austausch T117Q in DsPMT die PMT-Enzymaktivität (Teuber *et al.*, 2007). Die Mutation D103I in DsSPDS führte zum Verlust der SPDS-Aktivität. Die entsprechende Mutation D101I in *Thermotoga maritima* SPDS führte ebenso zu einem fast inaktiven Enzym (Wu *et al.*, 2007). PMT-Aktivität wurde bei keiner Mutante festgestellt.

3.14.2 Mehrfachmutanten

Die kumulative Mutagenese ging von der DsSPDS-Einzelmutante 1c (= Q79T; 3.14.1) aus und umfasste insgesamt 10 Aminosäureaustausche (Abb. 24). Alle 10 Reste sind Teil der Putrescinbinderegion, die durch das Substrat-Docking in DsPMT ermittelt wurde (Abb. 23 B). Die PMT-typischen Aminosäuren wurden schrittweise in DsSPDS eingebaut. Die Mutanten

(Nummerierung nach Tab. 3) wurden in BL21(DE3) oder BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RP Zellen mit einer Induktionszeit von 5,5 h bei 37 °C synthetisiert. Sie wurden in einem Schritt mit Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und in den SPDS-Lagerungspuffer (3.13.1) umgepuffert. Die Ausbeuten an löslichem Protein sind in Tab. 29 zusammengefasst. Die Mutation D103I (Nr. 2) führte zum Verlust der SPDS-Aktivität in allen folgenden Mutanten. PMT-Aktivität wurde in keiner der DsSPDS-Mutanten nachgewiesen. Mit der Mutation R73N (Nr. 6) sank die Ausbeute an löslichem Protein drastisch (Tab. 29). Das in SPDS konservierte R73 (selten ersetzt von Lysin) ist vermutlich für die Erhaltung der Löslichkeit von SPDS von Bedeutung. Dennoch reichte die Menge an synthetisiertem Protein stets aus, um SPDS- und PMT-Aktivität im Enzymtest (2.3.10) zuverlässig zu überprüfen.

Tab. 29 Ausbeuten und GRAVY-Werte von DsSPDS-Mutanten.

Mutante Nr.	Lösliches Protein (mg) pro Liter Kultur nach IMAC	GRAVY^a mit His-Tag	GRAVY^a ohne His-Tag
DsSPDS Wildtyp	12,5	-0,128	-0,070
1c	17,4	-0,120	-0,061
3	27,4	-0,116	-0,058
4	15,0	-0,107	-0,048
5	19,0	-0,097	-0,038
6	2,8	-0,094	-0,035
9	2,4	-0,093	-0,034
10	1,2	-0,070	-0,011

^a GRAVY = grand average of hydropathy (Kyte & Doolittle, 1982).

Das DsSPDS-Modell (3.10) wurde entsprechend der kumulativen Mutagenese in 10 Aminosäureresten modifiziert, mit Putrescin und SAM gedockt und nochmals mit dem DsPMT-Modell (3.6) verglichen. Abb. 31 zeigt Ausschnitte beider Modelle in gleicher Orientierung der postulierten Putrescinbinderegionen. Die Aminosäuren sind sehr ähnlich angeordnet, jedoch ergeben sich leichte Unterschiede in der Lage einzelner Reste und in der Größe der Putrescin-Bindetasche. Diese ist in der 10-fach mutierten DsSPDS (Abb. 31 A und B) etwas enger als in der DsPMT (Abb. 31 C und D). Der Austausch von nur 6 Aminosäuren des aktiven Zentrums von SPDS war als ausreichend für die Änderung der katalytischen Aktivität von Amino-propyl- zu Methyltransfer prognostiziert worden (Ikeguchi *et al.*, 2006).

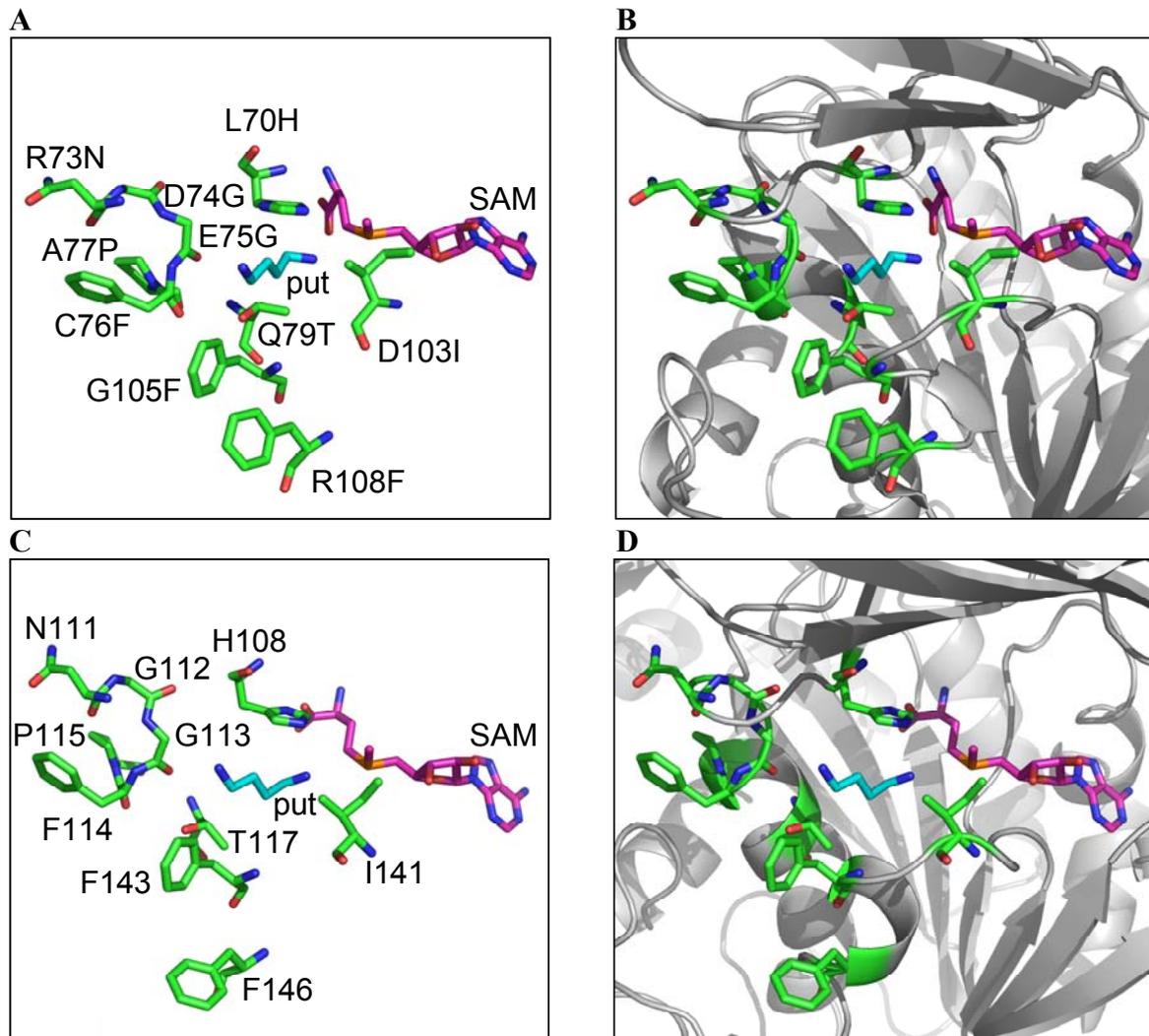


Abb. 31 Strukturvergleich von 10-fach mutierter DsSPDS mit DsPMT.

A Putrescinebinderegion von 10-fach mutierter DsSPDS mit SAM (purpurrot) und Putrescin (put, blaugrün). **B** Wie **A** mit unterlegter Proteinstruktur (grau). **C** Putrescinebinderegion von DsPMT mit SAM (purpurrot) und Putrescin (put, blaugrün). **D** Wie **C** mit unterlegter Proteinstruktur (grau).

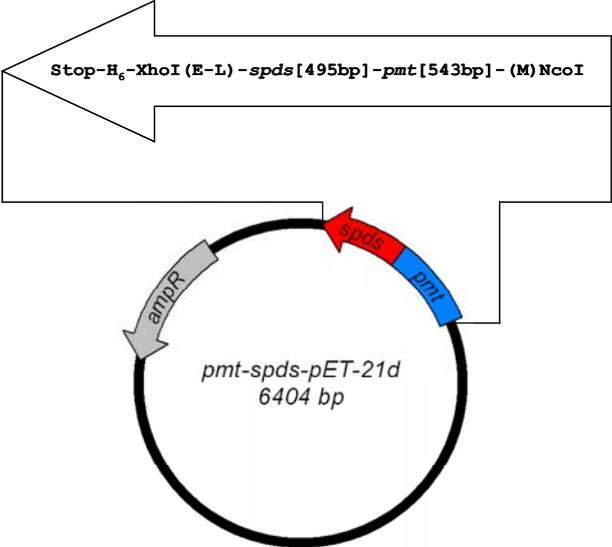
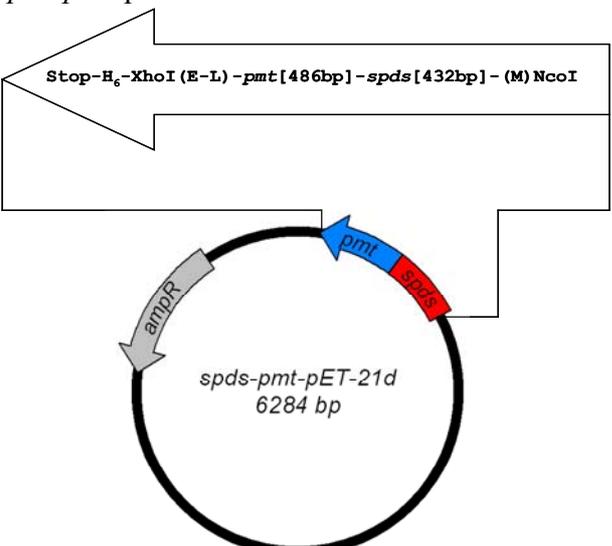
Stattdessen brachten diese sowie vier weitere Mutationen keine PMT-Aktivität *in vitro* hervor. Vermutlich waren auf dem Weg der Evolution von SPDS zu PMT noch umfangreichere Änderungen im aktiven Zentrum und im Proteingerüst erforderlich. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden Proteindomänen zwischen DsPMT und DsSPDS ausgetauscht.

3.15 Synthesevektoren für die chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT

Der Leserahmen von *D. stramonium spds1* enthielt eine natürliche Schnittstelle für BamHI, die sich über drei Triplets erstreckte (5'-GAG GAT CCC-3'). Die korrespondierende Sequenz in *D. stramonium pmt* lautete 5'-AAT GAT CCT-3'. Der Vektor *pmt*-pET-21d (Tab.

25) wurde mutiert, um durch den Austausch von AAT gegen GAG auch im *pmt*-Gen eine Schnittstelle für BamHI einzufügen (Primerpaar N182E, Tab. 3). Der anschließende Doppelverdau mit NcoI und BamHI (2.2.3) sowie separate Kreuzligationen (2.2.6) führten zu den beiden chimären Vektoren *pmt-spds*-pET-21d und *spds-pmt*-pET-21d (Tab. 30).

Tab. 30 Synthesevektoren für die chimären Proteine aus DsSPDS und DsPMT.

Vektor ^a	Proteineigenschaften ^b
<p><i>pmt-spds</i>-pET-21d</p>  <p>Stop-H₆-XhoI (E-L) - <i>spds</i> [495bp] - <i>pmt</i> [543bp] - (M) NcoI</p> <p><i>pmt-spds</i>-pET-21d 6404 bp</p>	<p>Name: DsPMT-SPDS</p> <p>Stamm: BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RP</p> <p>Länge des Proteins: 354 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, C-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 39034,3</p> <p>Die erste Aminosäure (M) des Leserahmens wird von der Schnittstelle NcoI kodiert.</p>
<p><i>spds-pmt</i>-pET-21d</p>  <p>Stop-H₆-XhoI (E-L) - <i>pmt</i> [486bp] - <i>spds</i> [432bp] - (M) NcoI</p> <p><i>spds-pmt</i>-pET-21d 6284 bp</p>	<p>Name: DsSPDS-PMT</p> <p>Stamm: BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RP</p> <p>Länge des Proteins: 314 Aminosäuren</p> <p>His-Tag: 6x His, C-terminal</p> <p>Molekulargewicht (Da): 34870,9</p> <p>Die erste Aminosäure (M) des Leserahmens wird von der Schnittstelle NcoI kodiert.</p>

^a Die Vektorkarten sind in der vom Hersteller angegebenen Orientierung gezeichnet. ^b Proteinlänge und Molekulargewicht beziehen sich auf das gesamte kodierte Fusionsprotein.

3.16 Charakterisierung der chimären Proteine aus DsPMT und DsSPDS

3.16.1 Reinigung und Stabilität

DsPMT-SPDS und DsSPDS-PMT (Tab. 30) wurden mit einer Induktionszeit von 5,5 h bei 37 °C in BL21-CodonPlus® (DE3)-RP Zellen synthetisiert. Die Proteine wurden in einem Schritt mit Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und in den SPDS-Lagerungspuffer (3.13.1) umgepuffert. Aus einem Liter Bakterienkultur ließen sich unter diesen Bedingungen 5,0 mg DsPMT-SPDS bzw. 7,1 mg DsSPDS-PMT als jeweils lösliche Proteine gewinnen. Beide Proteine behielten ihre Aktivität über ca. eine Woche bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C.

3.16.2 Charakterisierung von DsPMT-SPDS

3.16.2.1 Produktnachweis mit HPLC

10 µg Protein wurden mit 500 µM Putrescin und 400 µM SAM im Standardtest (2.3.10.1) inkubiert. Die HPLC-Analyse des dansylierten Enzymtests ergab das in Abb. 32 gezeigte HPLC-Chromatogramm (grüne Kurve).

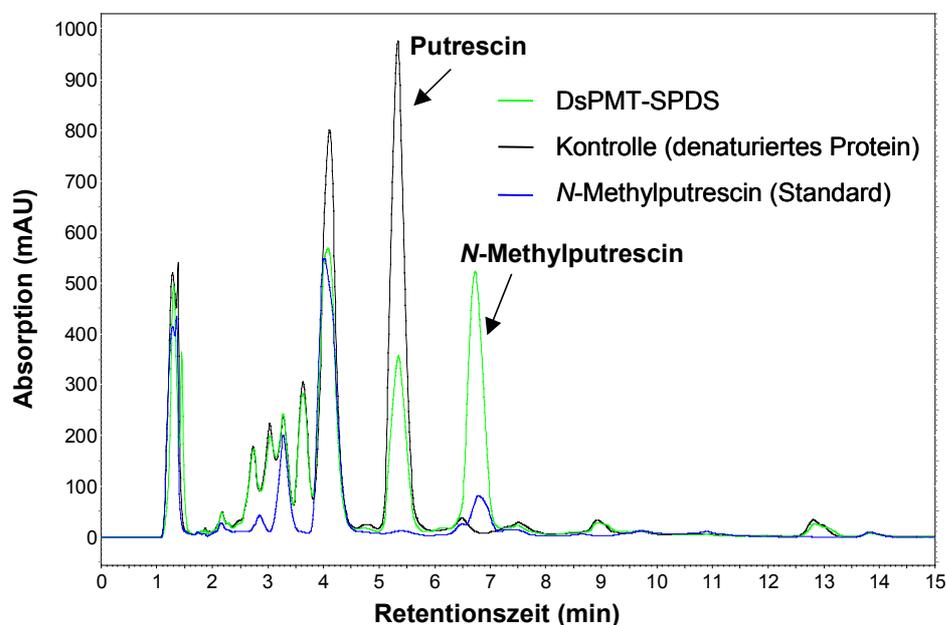


Abb. 32 Produktnachweis für DsPMT-SPDS mit HPLC.

Denaturiertes Protein wurde durch Erhitzen (15 min, 95 °C) gewonnen. Alle Peaks mit einer Retentionszeit unter 5 min sind unspezifische Produkte aus der Dansylierung. Die Elution der dansylierten Polyamine war bei 15 min Retentionszeit abgeschlossen.

Dansyliertes *N*-Methylputrescin (Abb. 32, blaue Kurve) ermöglichte die Identifizierung des Reaktionsprodukts anhand gleicher Retentionszeiten. In der Kontrolle mit denaturiertem Protein (Abb. 32, schwarze Kurve) fand sich kein *N*-Methylputrescin. Nach der Inkubation des Proteins mit Putrescin und dcSAM anstelle von SAM wurden weder Spermidin noch Spermin gefunden (Chromatogramme nicht gezeigt). Das chimäre Protein DsPMT-SPDS erwies sich somit als lösliche und aktive PMT.

3.16.2.2 Kinetische Eigenschaften

Die Maximalaktivität des Enzyms betrug 17,6 nkat/mg, $k_{\text{cat}} = 0,69 \text{ s}^{-1}$. Die Linearität der Produktbildung wurde für 1 μg Protein über 15 min gesichert (ohne Abbildung). Die Bestimmung der K_{m} -Werte illustriert Abb. 33.

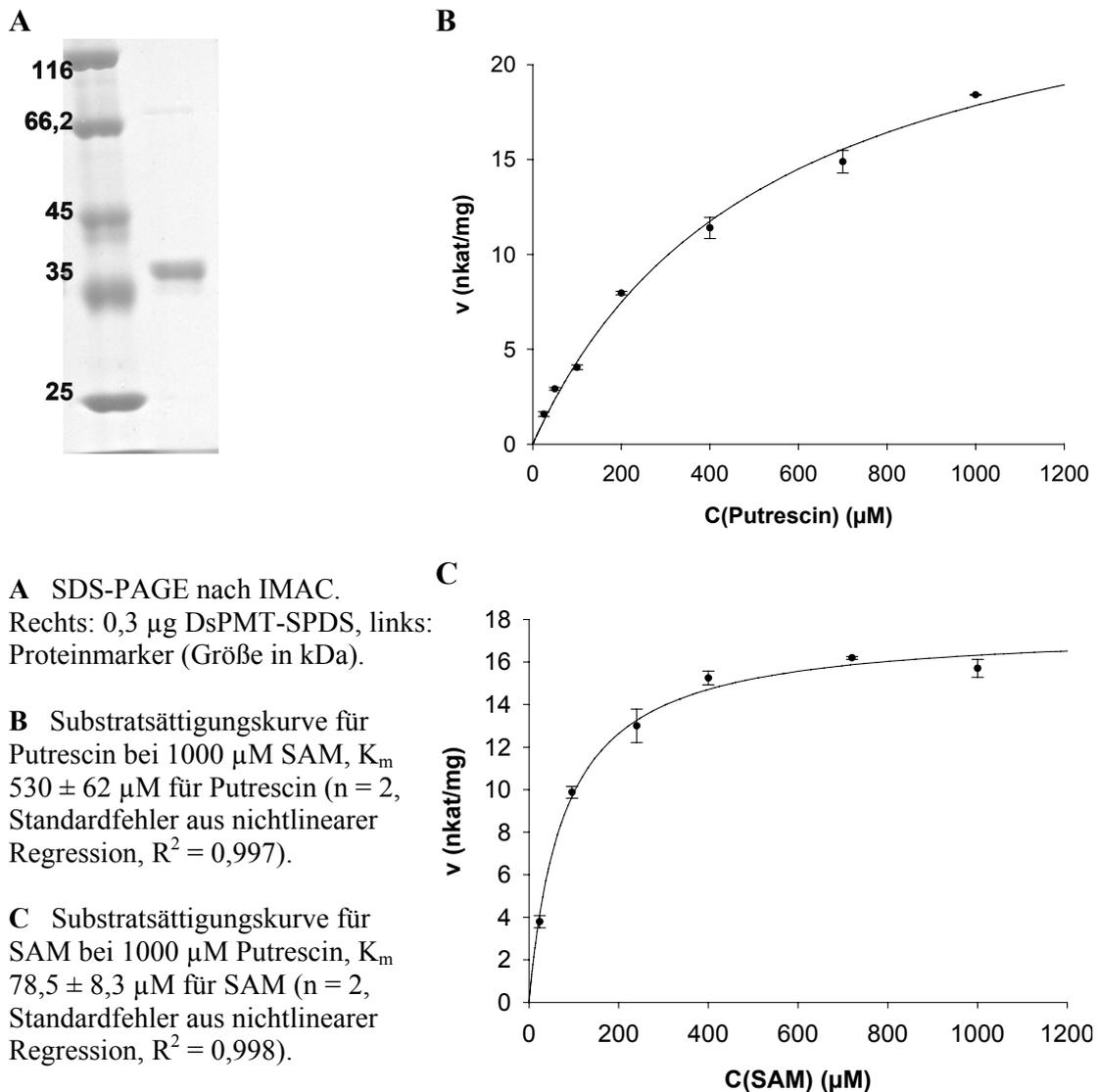


Abb. 33 Kinetische Charakterisierung des chimären Proteins DsPMT-SPDS.

Aus der Substratsättigungskurve für Putrescin (Abb. 33 B) ergab sich ein unerwartet hoher K_m -Wert für Putrescin mit $530 \mu\text{M}$. Der K_m -Wert für SAM liegt mit $79 \mu\text{M}$ hingegen in der Größenordnung von dcSAM bei DsSPDS ($62 \mu\text{M}$) und von SAM bei DsPMT ($42 \mu\text{M}$ [C-his] bzw. $56 \mu\text{M}$ [N-his]).

3.16.2.3 pH-Optimum

Das pH-Optimum von DsPMT-SPDS liegt bei etwa pH 8,0 (Abb. 34) und unterscheidet sich somit stark vom pH-Optimum von DsSPDS (pH 10, Abb. 28). Es liegt jedoch in dem für PMT-Proteine optimalen Bereich von pH 8 bis 9 (Mizusaki *et al.*, 1971; Walton *et al.*, 1994; Teuber *et al.*, 2007).

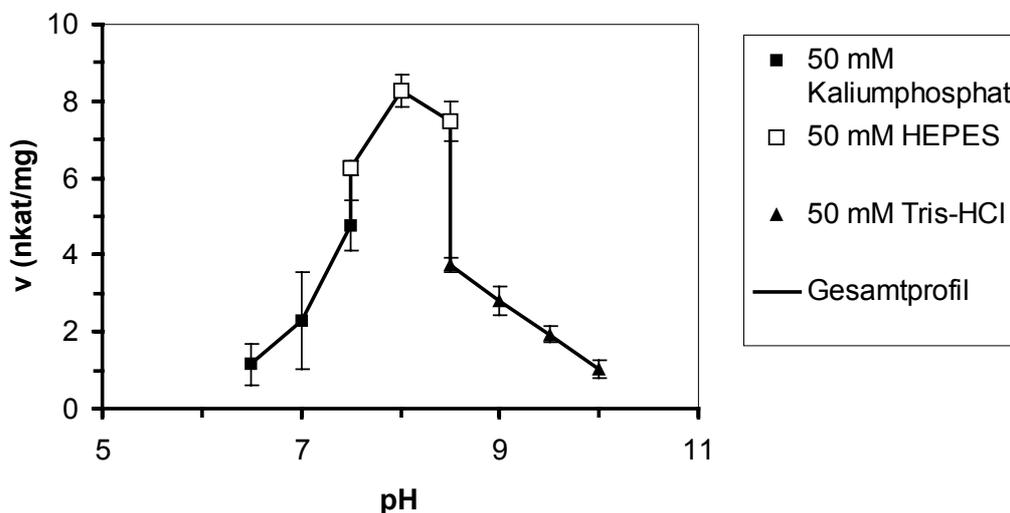


Abb. 34 pH-Abhängigkeit von DsPMT-SPDS.

Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung für $n = 2$.

3.16.3 Charakterisierung von DsSPDS-PMT

3.16.3.1 Produktnachweis mit HPLC

$10 \mu\text{g}$ Protein wurden mit $500 \mu\text{M}$ Putrescin und $400 \mu\text{M}$ dcSAM im Standardtest (2.3.10.1) inkubiert. Die HPLC-Analyse des dansylierten Enzymtests ergab das in Abb. 35 gezeigte HPLC-Chromatogramm (grüne Kurve). Dansyliertes Spermidin (Abb. 35, rote Kurve) ermöglichte die Identifizierung des Reaktionsprodukts anhand gleicher Retentionszeiten. In der Kontrolle mit denaturiertem Protein (Abb. 35, schwarze Kurve) fand sich kein Spermidin. Nach der Inkubation des Proteins mit Putrescin und SAM anstelle von dcSAM wurde kein N-

Methylputrescin gefunden (Chromatogramme nicht gezeigt). Das chimäre Protein DsSPDS-PMT erwies sich somit als lösliche und aktive Spermidinsynthase.

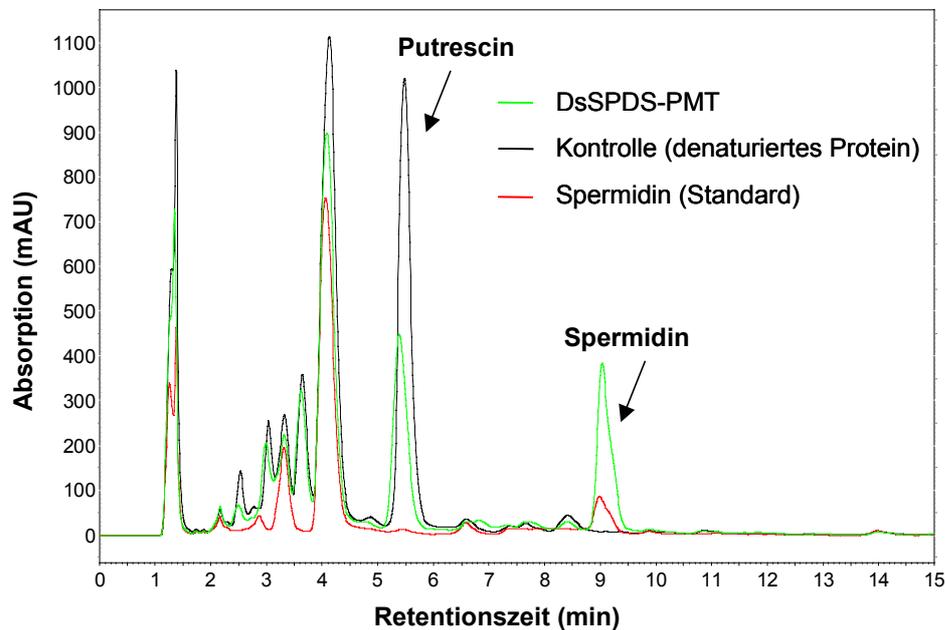


Abb. 35 Produktnachweis für DsSPDS-PMT mit HPLC.

Denaturiertes Protein wurde durch Erhitzen (15 min, 95 °C) gewonnen. Alle Peaks mit einer Retentionszeit unter 5 min sind unspezifische Produkte aus der Dansylierung. Die Elution der dansylierten Polyamine war bei 15 min Retentionszeit abgeschlossen.

3.16.3.2 Kinetische Eigenschaften

Die Maximalaktivität des Enzyms betrug 11,6 nkat/mg, $k_{\text{cat}} = 0,40 \text{ s}^{-1}$. Die Linearität der Produktbildung wurde für 1 μg Protein über 10 min gesichert (ohne Abbildung). Die Bestimmung der K_m -Werte illustriert Abb. 36. Aus der Substratsättigungskurve für dcSAM ergab sich eine schwache Substrathemmung mit $K_i = 1,4 \text{ mM}$, die jedoch nicht beim DsSPDS-Wildtyp beobachtet wurde. Aufgrund der ansonsten mit DsSPDS vergleichbaren kinetischen Eigenschaften wurde auf die Bestimmung des pH-Optimums für DsSPDS-PMT verzichtet.

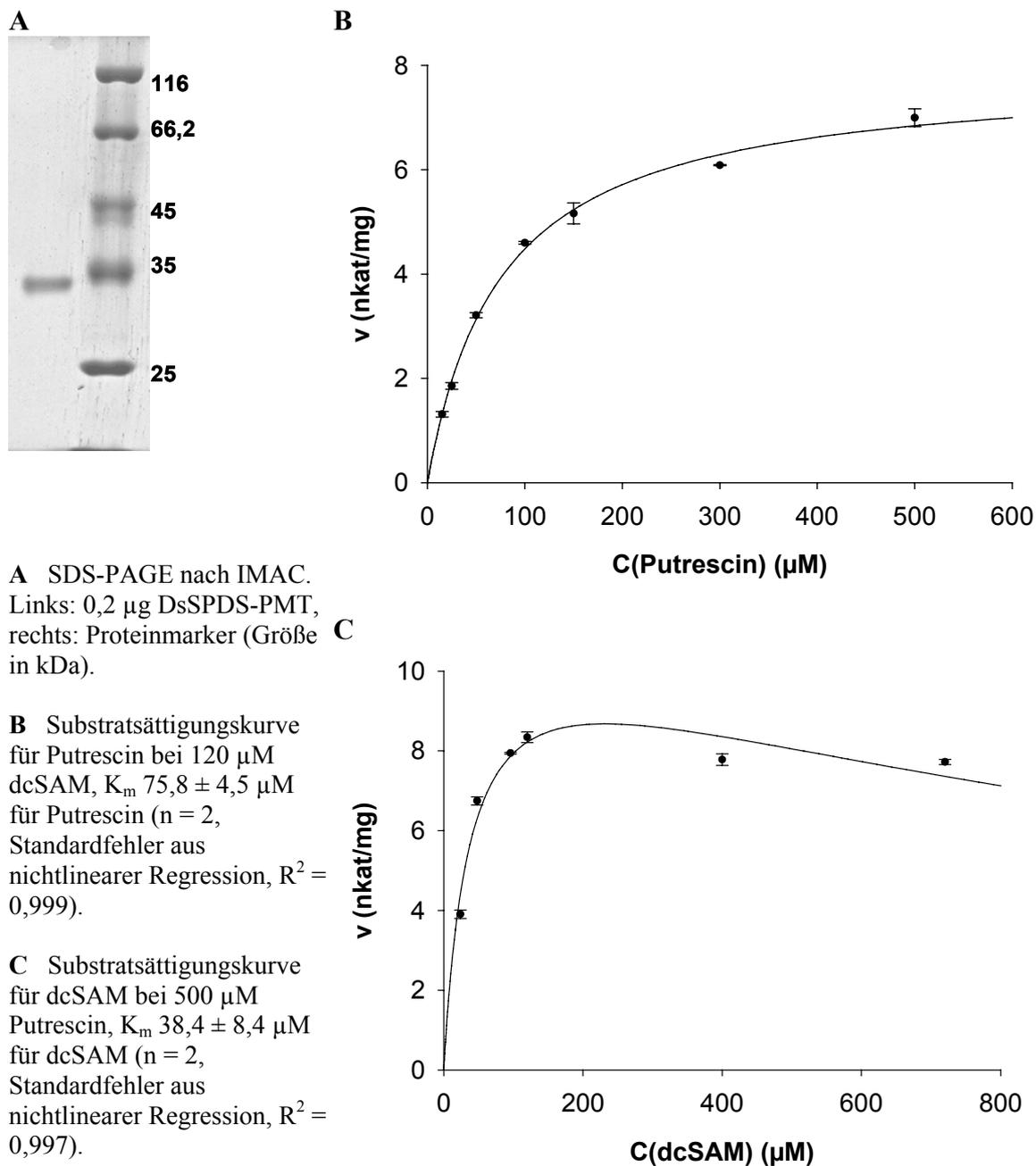


Abb. 36 Kinetische Charakterisierung des chimären Proteins DsSPDS-PMT.

3.17 Homologiemodelle der chimären Proteine DsPMT-SPDS und DsSPDS-PMT

Die Modelle beider chimären Proteine (Abb. 37) wurden erstellt, um die Substrat- und Co-Substrat-Bindung zu analysieren und mit den Wildtyp-Proteinen zu vergleichen (siehe 4.1 und 4.2). Die Überprüfung der Modelle mit PROCHECK (2.4.1.3) und PROSA II (2.4.1.4) ergab eine hohe stereochemische Qualität und eine native Faltung. Auf die Rekonstruktion des PMT-typischen N-Terminus in DsPMT-SPDS (Abb. 37 A) wurde jedoch verzichtet.

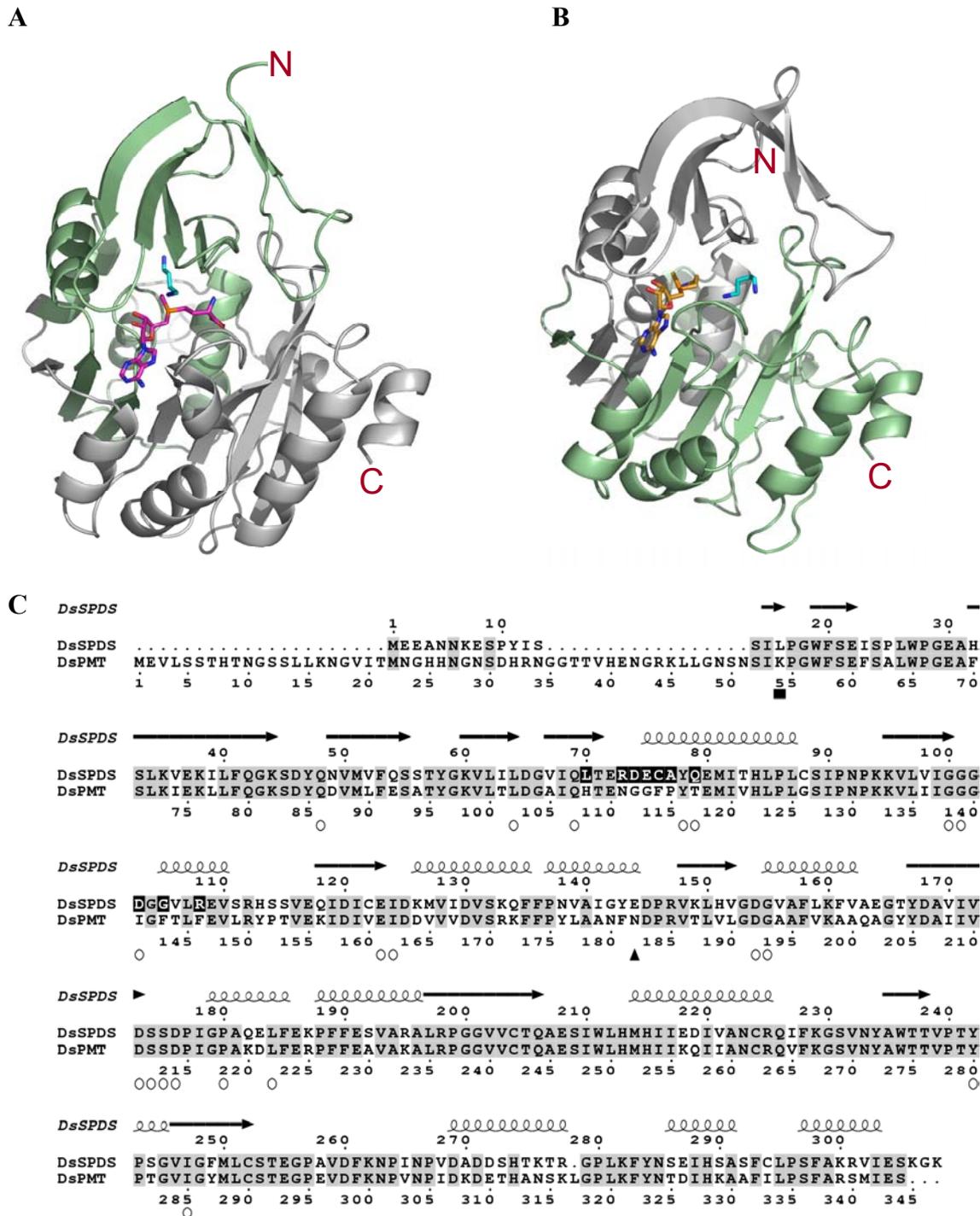


Abb. 37 Homologie-Modelle von DsPMT-SPDS und DsSPDS-PMT.

A Untereinheit des chimären Proteins DsPMT-SPDS. **B** Untereinheit des chimären Proteins DsSPDS-PMT. In **A** wurden 54 N-terminale Aminosäuren und in **B** 13 N-terminale Aminosäuren der Übersichtlichkeit wegen fortgelassen. Grün: PMT-Domänen, grau: SPDS-Domänen, blaugrün: Putrescin, purpurrot: SAM, goldgelb: dcSAM. N-Termini (N) und C-Termini (C) wurden markiert. **C** Sequenzalignment. Grau unterlegt: identische Aminosäuren, schwarz unterlegt: 10 Aminosäurereste für die kumulative Mutagenese. o: Reste für die Bindung des Übergangszustand-Analogons AdoDATO in *Thermotoga maritima* (Korolev *et al.*, 2002). Die Sekundärstruktur des DsSPDS-Modells ist mit Pfeilen (β -Faltblätter) und Spiralen (α -Helices) angedeutet. \blacktriangle : Schnittstelle für die Konstruktion der chimären Proteine, \blacksquare : 54 N-terminale Reste, die bei der Modellierung der DsPMT-SPDS-Chimäre nicht rekonstruiert wurden.

4 Diskussion

4.1 Bindung von SAM in PMT

Es wurde vermutet, dass sich die Evolution von PMT aus SPDS lediglich durch Mutationen in der Binderegion für das Co-Substrat vollzog, denn SAM besitzt im Unterschied zu dcSAM eine Carboxylgruppe (Korolev *et al.*, 2002; Ikeguchi *et al.*, 2006). Vergleicht man jedoch die in dieser Arbeit vorgestellten Homologiemodelle von DsSPDS, DsPMT und ihrer Chimären, so ergibt sich ein weitaus diffizileres Bild: SAM und Putrescin besetzen im aktiven Zentrum des DsPMT-Wildtyps (Abb. 23 B) eine ganz ähnliche Position im Vergleich zum Modell des chimären Proteins DsPMT-SPDS (Abb. 37 A), welches PMT-Aktivität zeigte. Stets besetzt die Methionin-Funktion des SAM mit der Carboxylgruppe die für Putrescin typische Binderegion der SPDS (Abb. 37 A). Putrescin liegt in PMT in der Nähe von I141 (Zählung nach DsPMT). Ein saurer Rest an dieser Stelle, wie D103 in DsSPDS, verhindert nicht die Bindung von SAM, sondern würde die Lage von Putrescin derart verändern, dass ein Methyltransfer unmöglich ist (Teuber *et al.*, 2007).

Die im PMT-Modell (Abb. 23 B) beschriebene Positionierung von SAM wurde auch in Proteinstrukturen von humaner SPDS (PDB 1ZDZ) und *Trypanosoma cruzi* SPDS (PDB 3BWC) gefunden, die mit SAM co-kristallisiert wurden. Demzufolge können SPDS-Proteine SAM in einer Orientierung binden, die vermutlich für die Evolution von PMT sehr vorteilhaft war. Abb. 38 macht deutlich, welche Aminosäuren jeweils an der Fixierung der Aminoalkylreste von dcSAM und SAM in humaner SPDS beteiligt sind. Die Bindung der Aminopropylgruppe von dcSAM wird vor allem von D104 (D103 in DsSPDS) übernommen. Für die Bindung der Carboxylgruppe von SAM ist hingegen die phenolische Hydroxylgruppe von Y241 verantwortlich, das in SPDS und PMT stark konserviert ist.

In DsPMT wird die Carboxylgruppe des SAM durch Y280 (entspricht Y241 in humaner SPDS) stabilisiert, während der Amidsauerstoff von Q107 (konserviert in SPDS und PMT) die Aminogruppe bindet. Hierauf wird noch näher in Abschnitt 4.3 eingegangen.

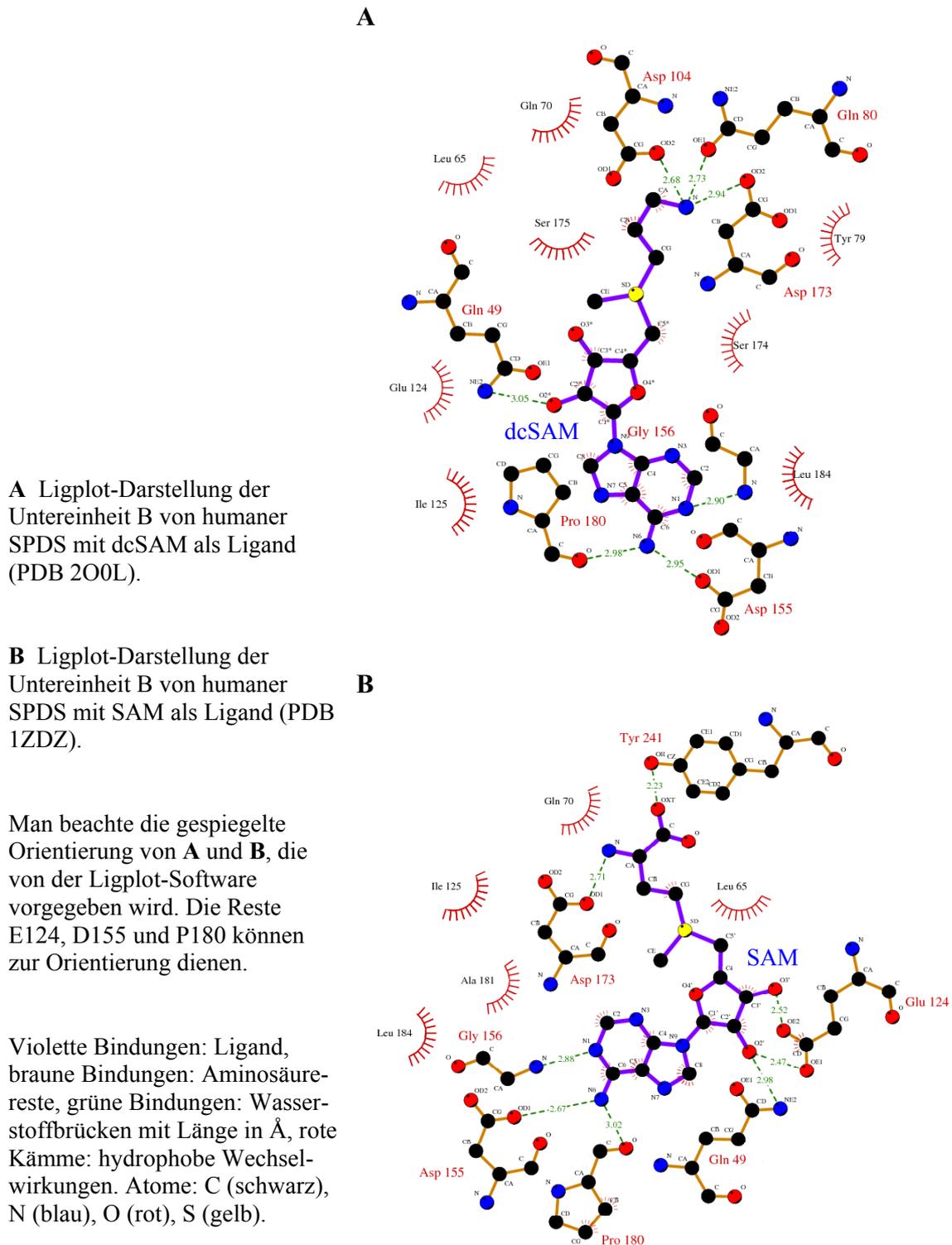


Abb. 38 Bindung von dcSAM und SAM in humaner SPDS.

Hinsichtlich der Fixierung von SAM bzw. dcSAM wird beim Vergleich von Methyltransferasen der Klasse I, deren Prototyp die Catechol *O*-Methyltransferase darstellt (Martin & McMillan, 2002; Schubert *et al.*, 2003b), mit SPDS und PMT eine evolutionäre Entwicklungslinie deutlich (Abb. 39). Die Kaffeesäure *O*-Methyltransferase aus *Medicago sativa* (Zubieta *et al.*, 2002) besitzt als pflanzlicher Vertreter der Klasse I-Methyltransferasen ein

glycinreiches Sequenzmotiv, das als Motiv I bezeichnet wird (Malone *et al.*, 1995). Der saure Rest **D206** ist stark konserviert in allen Klasse I-Methyltransferasen, wobei man neben Aspartat vielfach Glutamat vorfindet (Kozbial & Mushegian, 2005). Deren Carboxylgruppe kann ein Wassermolekül binden, das über eine Wasserstoffbrücke den Methionin-Rest des SAM fixiert (Schluckebier *et al.*, 1995; Bugl *et al.*, 2000; Zubieta *et al.*, 2002). SPDS und PMT enthalten auch ein glycinreiches Motiv, das dem beschriebenen Motiv I stark ähnelt (Korolev *et al.*, 2002). An die korrespondierende Stelle von **D206** traten jedoch in allen SPDS Valin oder Isoleucin, während das stark konservierte Aspartat (**D103**) die Bindung der Aminopropylgruppe von dcSAM übernahm (Korolev *et al.*, 2002). PMT besitzt innerhalb des Methyltransferasemotivs I keinen dissoziierbaren Rest, der mit dem Methionin-Rest von SAM interagieren könnte.

DsPMT	V L I I G G G I G	142
DsSPDS	V L V I G G G D G	104
MsCAOMT	L V D V G G G T G	212

Abb. 39 Variation des glycinreichen Methyltransferase-Motivs I.

MsCAOMT (Kaffeensäure *O*-Methyltransferase) aus *Medicago sativa* (Zubieta *et al.*, 2002) als Beispiel für eine pflanzliche Klasse I-Methyltransferase. Die Kristallstruktur 1KYW des Enzyms zeigt die Beteiligung des Restes **D206** an der Bindung der Carboxylgruppe von SAH bzw. SAM. Ein Aspartatrest (**D103**) bindet die Aminopropylgruppe von dcSAM in SPDS.

Mit der postulierten „atypischen“ Konformation von SAM stellt PMT einen Sonderfall innerhalb der SAM-abhängigen Methyltransferasen dar. Kürzlich wurde jedoch eine ähnliche Konformation von SAM in RNA-Methyltransferasen der SPOUT-Familie nachgewiesen (Kurowski *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009). In einem Proteinmodell von *N. tabacum* PMT (Minguet *et al.*, 2008) wurde SAM in eine Position ähnlich zu dcSAM in SPDS gezwungen, wodurch keine Position für Putrescin zu finden war, in der Methyltransfer stattfinden kann. Hierfür ist zum einen die Chiralität des Sulfoniumions (*S*-Konfiguration) im SAM-Molekül verantwortlich. Weiterhin ist die Stabilisierung der positiven Ladung des Sulfoniumions durch einen negativ geladenen Aspartatrest (D173 in DsSPDS bzw. D211 in DsPMT) notwendig.

4.2 Bindung von Putrescin in PMT

Die Herausbildung eines von SPDS-Enzymen abweichenden Putrescinbindebereichs war vermutlich der langwierigste Schritt während der Evolution von PMT (4.5). Aus den Ergebnissen der Mutagenese von DsSPDS (3.14) bzw. DsPMT (Teuber *et al.*, 2007) wurde die zentrale Bedeutung der Mutation D103I bzw. I141D im glycinreichen Sequenzmotiv I (Abb. 39) deutlich. Die Aminosäurereste H108, E110 und I141 erscheinen als essenziell für die Bildung des Putrescinbindebereichs in DsPMT (Abb. 23 B, Abb. 41). Die drei Reste sind in allen bekannten PMTs (Abb. 42) ausnahmslos konserviert. Der Austausch T117Q in DsPMT führte zu einem inaktiven Protein (Teuber *et al.*, 2007), vermutlich durch sterische Hinderung der Putrescin-Bindung. Der Threoninrest ist in allen PMTs konserviert bis auf die putative *Scopolia parviflora* PMT mit Isoleucin an dieser Stelle. Ein variabler Rest mit vergleichbarer Größe zu Threonin ist vermutlich unschädlich für die PMT-Aktivität. In DsSPDS hatte die entsprechende Mutation Q79T nur geringen Einfluss auf die Höhe der SPDS-Aktivität (Abb. 30), was eine unterschiedliche Bindeposition für Putrescin in PMT und SPDS zusätzlich belegt. Ein kritischer Parameter für die Umsetzung von Putrescin und einigen Substratanaloga sowie für die Inhibitorwirkung von Aminen auf PMT ist die Größe und Form des Bindebereichs für Putrescin. Unterschiede im Inhibitor- und Substratspektrum von SPDS und PMT (Tab. 31) erlauben weitere Rückschlüsse auf die ganz unterschiedliche Lokalisation und Gestaltung der Putrescinbinderegionen in SPDS- und PMT-Proteinen, die aus der komparativen Modellierung der Proteingerüste DsPMT und DsSPDS deutlich wurden.

Tab. 31 Vergleich des Inhibitor- und Substratspektrums von PMT und SPDS.

Substanz ^a	PMT ^b		SPDS ^c	
	Inhibition	Umsetzung	Inhibition	Umsetzung
Monoamine				
n-Propylamin	79 %, K _i 80 µM (k) (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	IC ₅₀ 35 µM	?
n-Butylamin	95 %, K _i 11 µM (k) (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	4 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	IC ₅₀ 3,8 µM	?
n-Pentylamin	63%, K _i 120 µM (k) (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	IC ₅₀ 3,6 µM	?
n-Hexylamin	3 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	IC ₅₀ 104 µM	?
Cyclopentylamin	93 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 19 µM	?
Cyclohexylamin	97 %, K _i 9,1 µM (k) (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	IC ₅₀ 8,1 µM	?
2-Methylcyclohexylamin	55 %	≤ 5 %	37 %	?

Substanz ^a	PMT ^b		SPDS ^c	
	Inhibition	Umsetzung	Inhibition	Umsetzung
3-Methylcyclohexylamin	35 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 300 μM	?
4-Methylcyclohexylamin	93 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 430 μM (<i>cis</i>) IC ₅₀ 1,7 μM (<i>trans</i>)	?
<i>N</i> -Methylcyclohexylamin	84 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 103 μM	?
Cycloheptylamin	83 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 30 μM	?
<i>exo</i> -2-Aminonorbornan	95 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 5,5 μM	?
<i>endo</i> -2-Aminonorbornan	67 %	≤ 5 %	IC ₅₀ 107 μM	?
Anilin	2 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	?	29,1 %	?
Diamine				
Putrescin	-	100 %	-	100 %
<i>N</i> -Methylputrescin	K _i 150 μM (k)	-	?	18 %
1,3-Diaminopropan	10 %	1 %	34 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)	< 0,4 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)
1,5-Diaminopentan (Cadaverin)	84 %	1 %	39 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)	6 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)
1,6-Diaminohexan	12 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	30 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)	1 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)
<i>trans</i> -1,4-Diaminocyclohexan	78 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	74 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	?	11,6 %
4-Aminomethylpiperidin	?	18 %	?	2,7 %
1-Aminopiperidin	9 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	?	?	< 1 %
Tri- und Tetramine				
1,4-Diaminopiperazin	1 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	?	< 1 %
Spermidin	7,3 % (Stenzel <i>et al.</i> , 2006) 5 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	0 % (Stenzel <i>et al.</i> , 2006) 29 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	81 % (Graser & Hartmann, 2000)	< 0,4 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)
Spermin	7 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	24 % (Hibi <i>et al.</i> , 1992)	1 % (Graser & Hartmann, 2000)	0 % (Raina <i>et al.</i> , 1984)

^a Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die ausgewählten Substanzen wurden an PMT- und SPDS-Proteinen untersucht und erlauben so einen direkten Vergleich zwischen beiden Enzymgruppen. ^b Alle Werte, für die keine Referenz angegeben ist, wurden der Arbeit von Walton und Kollegen (Walton *et al.*, 1994) entnommen. ^c Alle Werte, für die keine Referenz angegeben ist, wurden der Arbeit von Shirahata und Kollegen (Shirahata *et al.*, 1991) entnommen.

Die Messwerte für Inhibition sind ausgedrückt als:

(a) Hemmkonstante K_i, wobei der Hemmtyp kompetitiv (k) in Bezug auf Putrescin vermerkt ist.

(b) IC₅₀, die Inhibitorkonzentration, welche die Aktivität bei gegebener Substratkonzentration um 50 % reduziert.

(c) relative prozentuale Hemmung bezogen auf die Aktivität im gleichen Test ohne Inhibitor (= 100 %)

Die Messwerte für Umsetzung sind ausgedrückt als relative prozentuale Umsetzung bezogen auf die Aktivität mit der gleichen Konzentration an Putrescin (= 100 %).

?: nicht getestet bzw. nicht bekannt.

Testbedingungen: SPDS aus Wurzelkultur von *Senecio vulgaris*, Inhibitorstudie: 0,1 mM Inhibitor, 0,06 mM [1,4-¹⁴C]Putrescin, 20 µM dcSAM (Graser & Hartmann, 2000). PMT aus Wurzelkultur von *Hyoscyamus albus*, Substratspezifität: 2 mM Substrat, 1 mM [Methyl-³H]SAM. Inhibitorstudie: 1 mM Inhibitor, 1 mM Putrescin, 1 mM [Methyl-³H]SAM (Hibi *et al.*, 1992). SPDS aus Hirn von *Bos taurus* (Rind), Substratspezifität: 1 mM Substrat, 15 µM dc[Methyl-¹⁴C]SAM. Inhibitorstudie: 1 mM Inhibitor, 0,1 mM Putrescin, 25 µM radioaktiv markiertes dcSAM (Raina *et al.*, 1984). SPDS aus Leber von *Sus scrofa* (Schwein), Substratspezifität: 1 mM Substrat, 10 µM dcSAM. Inhibitorstudie: 0 bis 1 mM Inhibitor, 1 mM Putrescin, 10 µM dcSAM (Shirahata *et al.*, 1991). Rekombinante *Solanum tuberosum* PMT, Substratspezifität: 2 mM Substrat, 1 mM SAM. Inhibitorstudie: 2 mM Inhibitor, 2 mM Putrescin, 1 mM SAM (Stenzel *et al.*, 2006). PMT aus transformierter Wurzelkultur von *Datura stramonium*, Substratspezifität: 2 mM Substrat, 100 µM SAM. Inhibitorstudie: 2 mM Inhibitor, 2 mM Putrescin, 100 µM SAM (Walton *et al.*, 1994).

Das Substratprofil von PMT ist begrenzt auf aliphatische und alicyclische Diamine, von denen Putrescin das effizienteste und natürliche Substrat darstellt (Walton *et al.*, 1994). Die Inhibitorprofile von PMT und SPDS (Tab. 31) ähneln sich, was nicht verwundert, da sie Putrescin als gemeinsames Substrat haben. Jedoch ergibt sich eine Reihe von Indizien, die für eine unterschiedliche Form der Putrescinbinderegion in PMT und SPDS sprechen. Zunächst betrifft dies die mutmaßliche Länge des Bindebereiches. Von den Homologen des Putrescins ist 1,5-Diaminopentan mit 84 % Inhibition der stärkste Hemmstoff für PMT (Walton *et al.*, 1994), während 1,3-Diaminopropan, 1,5-Diaminopentan und 1,6-Diaminohexan die SPDS-Aktivität gleichermaßen um ca. 30-40 % hemmen (Raina *et al.*, 1984). Unter den Monoaminen ist n-Butylamin für PMT der stärkste Hemmstoff, während SPDS von n-Butylamin und n-Pentylamin gleichermaßen gehemmt wird. Auch n-Hexylamin hemmt SPDS, kaum jedoch PMT. Die Putrescin-Bindetasche ist in PMT vermutlich etwas kürzer als in SPDS. Die Kristallstruktur PDB 2PT9 der *Plasmodium falciparum* SPDS mit dcSAM und dem SPDS-Inhibitor 4-Methylcyclohexylamin (4MCHA) zeigte, dass sich 4MCHA mit dem Alkyl-Ende voran in das aktive Zentrum von SPDS einlagert. Die zur Proteinoberfläche weisende Aminogruppe wird von zwei Wassermolekülen gehalten, die ihrerseits an die sauren Reste E46 und E231 (Zählung *P. falciparum* SPDS) gebunden sind (Dufe *et al.*, 2007). Langkettige SPDS-Inhibitoren wie n-Hexylamin könnten möglicherweise direkt an E46 und E231 binden, wodurch ein gewisser Spielraum erreicht wird. Auch N-Methylputrescin wird in geringem Maß von SPDS aminopropyliert (Shirahata *et al.*, 1991), während es kein PMT-Substrat, sondern Produktinhibitor mit etwa kompetitivem Hemmmechanismus zu Putrescin darstellt (Walton *et al.*, 1994). Spermidin ist ein SPDS-Produktinhibitor, während es PMT kaum hemmt (Stenzel

et al., 2006; Graser & Hartmann, 2000). Das aromatische und somit planare Anilin hemmt SPDS zehnfach besser als PMT, was auch für eine größere Flexibilität der Putrescinbinde-region in SPDS spricht (Hibi *et al.*, 1992; Shirahata *et al.*, 1991).

4.2.1 Bindung von Diamin-Inhibitoren der PMT

Die strukturellen Grundlagen der Inhibitorwirkungen von *N*-Methylputrescin, 1,3-Diaminopropan und *N*-Methyl-1,3-diaminopropan ließen sich mit einer vergleichenden Dockingstudie (2.4.2) am Homologie-Modell der PMT demonstrieren, wobei die optimale Lage der Inhibitoren im aktiven Zentrum sichtbar wird. Es wurde angenommen, dass die Diamin-Inhibitoren nur an der äußeren Aminogruppe protoniert sind, was in Einklang mit der postulierten Einfachprotonierung des Substrats Putrescin im aktiven Zentrum steht (4.3). Die höchsten Fitness-Scores ergaben sich für Putrescin und *N*-Methylputrescin (Tab. 32). 1,3-Diaminopropan und *N*-Methyl-1,3-diaminopropan, die Homologen von Putrescin bzw. *N*-Methylputrescin, haben eine geringere Affinität zum Protein. Verglichen mit Putrescin liegt *N*-Methylputrescin weiter entfernt von der Methylgruppe des SAM und versperrt das aktive Zentrum durch die Interaktion seiner Methylgruppe mit den benachbarten Phenylalaninresten F143 und F114 (Abb. 40 A). 1,3-Diaminopropan wird mit seiner äußeren Ammoniumgruppe ebenso wie Putrescin an E110 über eine Salzbrücke gebunden, ist aber zu kurz, um mit seiner inneren Aminogruppe die Methylgruppe des SAM wirksam anzugreifen (Abb. 40 B).

Tab. 32 Vergleichendes Docking von PMT-Inhibitoren und Putrescin.

Fitness	Ligandename ^a	Distanz ^b (Å)	Docking- Vorhersage	Experimentelles Ergebnis	Lit.
36,9	<i>N</i> -Methylputrescin	7,8	Inhibitor	Inhibitor, K _i = 150 µM	(Walton <i>et al.</i> , 1994)
36,8	Putrescin	3,7	Substrat		
30,5	<i>N</i> -Methyl-1,3-diaminopropan	7,4	Inhibitor	Inhibitor und schwaches Substrat	(Hibi <i>et al.</i> , 1992)
28,5	1,3-Diaminopropan	6,4	Inhibitor	Inhibitor, 10 % Inhibition	(Walton <i>et al.</i> , 1994)

^a Alle Liganden wurden gedockt mit GOLD (Genetic Optimized Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre) (Jones *et al.*, 1997; Verdonk *et al.*, 2003). Für jeden Liganden wurden 30 Dockingpositionen berechnet. ^b Die Distanzen von dem inneren Stickstoff des jeweiligen Liganden zum Methyl-Kohlenstoffatom des SAM wurden in Å angegeben.

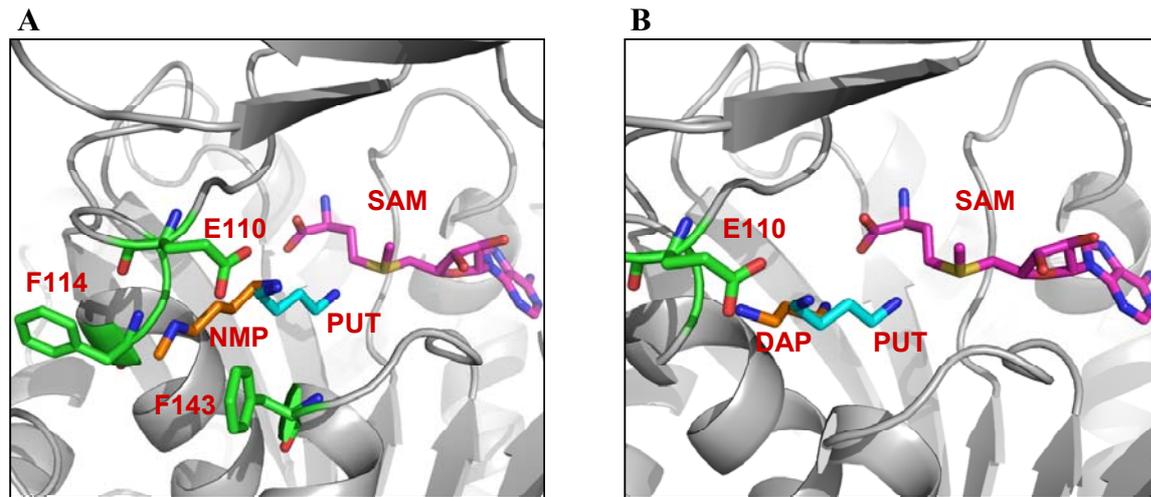


Abb. 40 Vergleichendes Docking von PMT-Inhibitoren und Putrescin.

A Überlagerung von Putrescin (PUT, blaugrün) mit seinem Inhibitor *N*-Methylputrescin (NMP, ocker) im aktiven Zentrum von DsPMT mit SAM (purpurrot). **B** Überlagerung von Putrescin (PUT, blaugrün) mit seinem Inhibitor 1,3-Diaminopropan (DAP, ocker) im aktiven Zentrum von DsPMT mit SAM (purpurrot). Relevante Reste mit Einfluss auf die Positionierung der Liganden in **A** und **B** sind grün gezeichnet.

Die Bindepotion von *N*-Methyl-1,3-diaminopropan ähnelt der von 1,3-Diaminopropan, liegt aber etwas weiter weg von SAM (nicht gezeigt). Unter den vier gedockten Liganden wurde nur Putrescin als Substrat vom Programm GOLD vorgeschlagen. GOLD ist besonders zum Docking hydrophiler Liganden geeignet, was für Diamine zutrifft (Jones *et al.*, 1997). Die in der Literatur gefundenen Abweichungen von der Docking-Vorhersage beruhen möglicherweise auf *Species*-abhängigen Unterschieden der verwendeten PMT-Präparationen (siehe Fußnote zu Tab. 31).

4.3 Katalytischer Mechanismus von PMT

Enzymkinetische Messungen an PMT aus Wurzeln von *Hyoscyamus albus* (Hibi *et al.*, 1992) und *Datura stramonium* (Walton *et al.*, 1994) legten einen geordneten bi-bi-Mechanismus für PMT nahe. Dies beinhaltet die direkte Übertragung der Methylgruppe von SAM auf den Putrescin-Stickstoff. Auch andere *O*- und *N*-Methyltransferasen, z. B. die Salicylsäure Carboxyl-methyltransferase aus *Clarkia breweri* (Zubieta *et al.*, 2003) oder die humane Phenylethanolamin *N*-methyltransferase (Wu *et al.*, 2005) katalysieren den direkten Methylgruppen-transfer ohne ein methyliertes Enzym-Intermediat. Das aktive Zentrum von DsPMT (Abb. 23 B) erlaubt dementsprechend die gleichzeitige Anwesenheit von Putrescin und SAM. SAM bindet zuerst, dann folgt Putrescin. Nach der Methylgruppenübertragung wird zuerst *N*-Methylputrescin und dann SAH freigesetzt, was einem geordneten bi-bi-Mechanismus

entspricht (Hibi *et al.*, 1992). Im Fall von SPDS wurde die Abfolge von Substrat- und Co-Substratbindung sowie die Existenz einer aminopropylierten Enzym-Zwischenstufe (Ping-Pong-Mechanismus) kontrovers diskutiert (Zappia *et al.*, 1980; Orr *et al.*, 1988; Yoon *et al.*, 2000). Mehrere Kristallstrukturen der humanen SPDS bestätigten jedoch den direkten Transfer der Aminopropylgruppe im Sinn einer geordneten bi-bi-Reaktion ohne aminopropylierte Enzym-Zwischenstufe (Wu *et al.*, 2007).

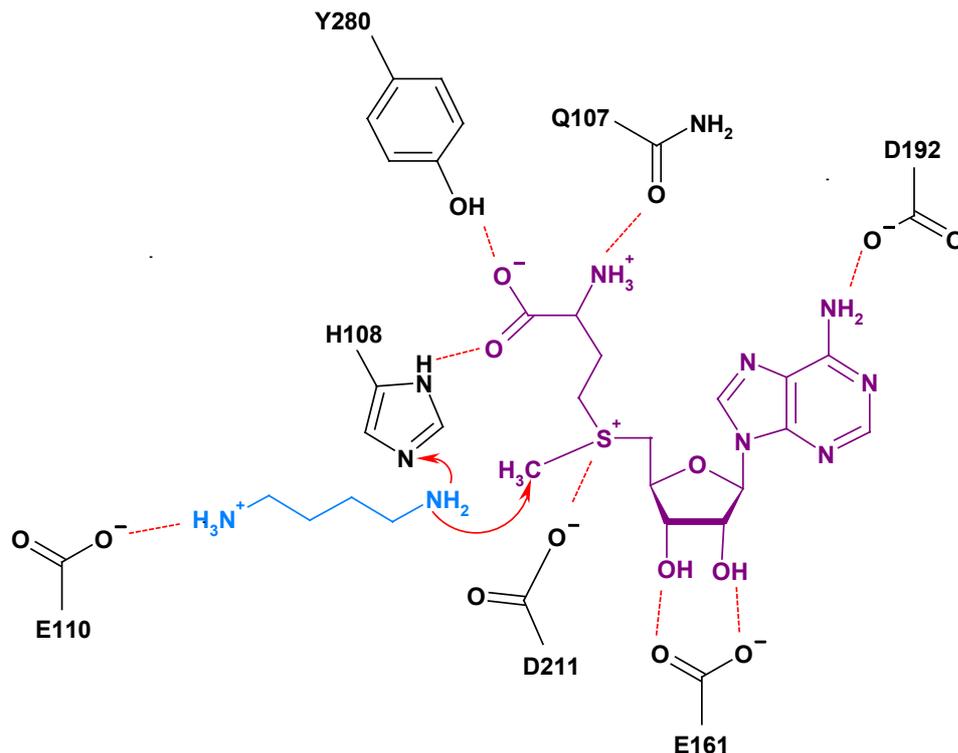


Abb. 41 Möglicher Katalysemechanismus der PMT.

Zählung der Aminosäurereste (schwarz) nach DsPMT, Putrescin (hellblau), SAM (purpurrot). Rote Pfeile kennzeichnen den nukleophilen Angriff des Stickstoffs an der Methylgruppe von SAM nach Deprotonierung der Aminogruppe durch H108. Rote Linien: Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken.

Das pH-Optimum von PMT liegt etwa bei pH 8-9 (Mizusaki *et al.*, 1971; Walton *et al.*, 1994), weshalb vermutet wurde, dass Putrescin in einfach protonierter Form in das aktive Zentrum gelangt. Auch das pH-Optimum des chimären Proteins DsPMT-SPDS beträgt pH 8 (Abb. 34). Der lokale pKa-Wert der äußeren, d. h., zur Proteinoberfläche weisenden Aminogruppe des Putrescins wurde mit 10,1 berechnet, während der inneren, d. h., zum SAM weisenden Aminogruppe ein Wert von 7,64 zugeordnet wurde. Demnach liegt der äußere Stickstoff des Putrescins in der Ammonium-Form vor und kann vom Rest E110 (Abb. 41) über eine Salzbrücke fixiert werden. Die innere Aminogruppe ist bei pH 7 nahezu im Gleichgewicht zwischen protonierter (einfach positiv geladener) und nicht protonierter (ungeladener) Form, aber bei höheren pH-Werten eher ungeladen (Teuber *et al.*, 2007).

Unter Beachtung dieser Prämissen ergibt sich ein plausibler katalytischer Mechanismus der PMT (Abb. 41): Die Carboxylgruppe von E161 bindet beide Hydroxylgruppen des Ribose-Teils von SAM, und die Reste Y280 und Q107 fixieren dessen Methionin-Rest. Die Aminogruppe des Adeninrings wird von D192 gehalten. Der Imidazolylrest von H108 befindet sich in enger Nachbarschaft zur Carboxylgruppe von SAM und zur angreifenden Aminogruppe des Putrescins. Diese wird formal zum Amid-Ion deprotoniert, wodurch gleichzeitig der nukleophile Angriff des freien Elektronenpaares des Stickstoffs an der Methylgruppe des SAM möglich wird. Als unmittelbarer Protonenakzeptor kommt vor allem das in PMT absolut konservierte H108 infrage. Der Austausch L70H wurde deshalb in die kumulative Mutagenese von DsSPDS eingeschlossen (3.14.2 und Tab. 3). Die Reste E110, E161, D192, D211, Y280 und Q107 (Abb. 41) stimmen in DsPMT und DsSPDS überein und boten somit keine Ziele der ortsgerichteten Mutagenese.

In SPDS wird das frei werdende Proton vermutlich auf den Rest D173 (Zählung DsSPDS) übertragen, der sowohl in SPDS als auch in PMT stark konserviert ist. Von D173 kann es auf ein benachbartes, an der Koordinierung von Putrescin beteiligtes Wassermolekül übertragen werden und schließlich das aktive Zentrum verlassen (Korolev *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007). Das PMT-Modell (3.6) weist dem zu D173 korrespondierenden Rest D211 jedoch die Aufgabe zu, die positive Ladung des Schwefels zu stabilisieren und somit zur korrekten Positionierung von SAM beizutragen. Von der angreifenden Aminogruppe des Putrescins ist D211 weiter entfernt als H108.

In PMT könnte das Reaktionsprodukt SAH an seiner Carboxylatgruppe von H108 protoniert werden. Die pKa-Werte von SAH betragen $2,22 \pm 0,10$ und $9,47 \pm 0,13$ (berechnet durch Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 für Solaris; Chemical Abstracts), wodurch bei pH 8-9 die zwitterionische Form bevorzugt wird. Eine transiente Protonierung der Carboxylatgruppe kann zumindest deren Wasserstoffbrücke zu Y280 destabilisieren. Nach Verlassen des aktiven Zentrums würde SAH wieder in die zwitterionische Form dissoziieren und das Proton an das umgebende Lösungsmittel abgeben.

Eine alternative Freisetzung des Protons könnte durch einfache Rückübertragung von H108 auf die Methylaminogruppe des *N*-Methylputrescins geschehen, sodass zweifach positiv geladenes *N*-Methylputrescins das aktive Zentrum verlässt. Auch die Übertragung des Protons von H108 auf ein Wassermolekül ist denkbar. Unwahrscheinlich ist hingegen die *N*-Methylierung ohne vorherige Abstraktion eines Protons vom Substrat wie in PrmC/HemK, einer Glutamin *N*⁵-methyltransferase, da in diesem Fall eine besonders starke Fixierung der Amidgruppe des Glutamins nötig ist, die in PMT für Putrescin nicht gegeben ist (Schubert *et al.*, 2003a).

4.4 Kinetischer Vergleich von PMT und SPDS

Für die PMT aus *Datura stramonium* ist eine Reihe von enzymkinetischen Parametern dokumentiert, wobei Gewinnung des Proteins (genuin gereinigt oder heterolog synthetisiert) und Messmethoden variierten (Feth *et al.*, 1985; Walton *et al.*, 1994; Biastoff *et al.*, 2006; Teuber *et al.*, 2007).

Tab. 33 Kinetische Parameter von SPDS und PMT-Proteinen.

Protein	K _m Putrescin (μM)	K _m dcSAM (μM)	K _m SAM (μM)	v _{max} (nkat/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	Lit.
PMT						
<i>Datura stramonium</i>	880	-	150	k.A.	-	(Feth <i>et al.</i> , 1985)
<i>Datura stramonium</i>	310	-	100	k.A.	-	(Walton <i>et al.</i> , 1994)
DsPMT-C- his ^a	281	-	k.A.	10	0,39	(Teuber <i>et al.</i> , 2007)
DsPMT-C- his ^b	108	-	42	45	1,73	(Biastoff <i>et al.</i> , 2006)
DsPMT-N- his ^b	205	-	56	132	5,14	
-22-N-PMT ^b	192	-	n.b.	64	2,36	
-54-N-PMT ^b	170	-	n.b.	96	3,09	
DsPMT- SPDS Chim.	530	-	79	17,6	0,69	
<i>Hyoscyamus albus</i>	277	-	203	k.A.	-	(Hibi <i>et al.</i> , 1992)
<i>Nicotiana tabacum</i>	400	-	110	k.A.	-	(Mizusaki <i>et al.</i> , 1971)

Protein	K _m Putrescin (μ M)	K _m dcSAM (μ M)	K _m SAM (μ M)	v _{max} (nkat/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	Lit.
SPDS						
<i>Brassica pekinensis</i>	32	6,7	-	k.A.	-	(Sindhu & Cohen, 1984)
DsSPDS	33,1	64,2	-	12,5	0,44	
DsSPDS- PMT Chim.	75,8	38,4	-	11,6	0,40	
<i>Homo sapiens</i>	20	0,9	-	56,2	1,90	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Plasmodium falciparum</i>	52	35	-	13,1	0,48	(Haider <i>et al.</i> , 2005)
<i>Senecio vulgaris</i>	21	4	-	k.A.	-	(Graser & Hartmann, 2000)

^a HPLC-Bestimmung von dansyliertem *N*-Methylputrescin, ^b Colorimetrische Bestimmung unter Abbau von SAH (Blastoff *et al.*, 2006).

Daneben wurden nativ gereinigte PMT aus *Nicotiana tabacum* und *Hyoscyamus albus* kinetisch charakterisiert (Mizusaki *et al.*, 1971; Hibi *et al.*, 1992). Kinetische Parameter von DsPMT und DsSPDS, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, sowie von weiteren PMT- und SPDS-Proteinen sind in Tab. 33 gegenübergestellt. Es fällt auf, dass die K_m-Werte von Putrescin in PMT etwa eine Zehnerpotenz höher als in SPDS liegen. Möglicherweise wird auf diese Weise ein zu großer Abfluss von Putrescin aus dem Primärstoffwechsel in den Alkaloidstoffwechsel verhindert. Obwohl intrazelluläre Polyaminkonzentrationen von 10 bis 100 μ M als physiologisch ausreichend gelten, um zum Beispiel die Winterruhe von *Helianthus tuberosus*-Knollen zu unterbrechen, werden durch Transport und Speicherung in der Vakuole jedoch Polyaminkonzentrationen von bis zu 1 mM erreicht (Pistocchi *et al.*, 1988). SPDS und PMT sind sehr wahrscheinlich cytosolisch lokalisiert, da Transit-Signalpeptide bisher nicht nachgewiesen wurden (Hashimoto *et al.*, 1998a). Im Hinblick auf übliche cytosolische Putrescinkonzentrationen wäre die erreichbare SPDS-Aktivität stets höher als die PMT-Aktivität.

Auch zu dcSAM hat eine Reihe von pflanzlichen SPDS eine 10 bis 200-fach höhere Affinität als PMT-Proteine zu ihrem Co-Substrat SAM. Die intrazelluläre Konzentration von SAM in Pflanzen wird mit weniger als 100 μ M angegeben (Moffatt & Weretilnyk, 2001). SAM wird von PMT durch Demethylierung in SAH umgewandelt, das einen kompetitiven Produkt-

inhibitor der PMT ($K_i = 110 \mu\text{M}$) in Bezug auf SAM darstellt (Hibi *et al.*, 1992). Mit dem colorimetrischen PMT-Test unter Entfernung von SAH (Biastoff *et al.*, 2006) wurden für DsPMT K_m -Werte von 42 bzw. 56 μM SAM ermittelt (Tab. 33). Diese liegen in der Größenordnung von DsSPDS und *Plasmodium falciparum* SPDS, jedoch immer noch etwa eine Zehnerpotenz höher als bei *Senecio vulgaris* SPDS oder *Brassica pekinensis* SPDS. Die intrazelluläre dcSAM-Konzentration ist normalerweise niedriger als die SAM-Konzentration. In Rattenleber betrug der Gehalt an dcSAM etwa 2-4 % des gleichzeitig gemessenen SAM-Gehaltes (Hibasami *et al.*, 1980). dcSAM kann jedoch bei Verarmung der Zelle an Putrescin rapide ansteigen und die SAM-Konzentration übertreffen (Pegg *et al.*, 1982). Es ist schwer abzuschätzen, ob die höhere Affinität von SPDS zu dcSAM als von PMT zu SAM *in vitro* tatsächlich zu erhöhter SPDS-Aktivität *in vivo* führt.

Die K_m -Werte der Proteinchimären DsPMT-SPDS für SAM bzw. DsSPDS-PMT für dcSAM ähneln sich stark, während sich die Affinitäten für Putrescin deutlich unterscheiden. Die K_m -Werte für Putrescin von DsPMT-SPDS (530 μM) und DsSPDS-PMT (75,8 μM) liegen ca. eine Zehnerpotenz auseinander und sind verglichen mit den jeweiligen Wildtyp-Proteinen erhöht. Eine unterschiedliche und darüber hinaus nicht optimale Bindung von Putrescin in den aktiven Zentren der chimären Proteine wird somit evident.

4.5 Phylogenetische Entwicklung der PMT

Grundsätzliche strukturelle Unterschiede wie z. B. die Gestalt der aktiven Zentren (Abb. 23), Länge und Hydrophilie der N-Termini (Abb. 20) sowie die Cysteingehalte (Abb. 25) tragen zur evolutionären Distanz (Sequenzunterschiedlichkeit) der heutigen (rezenten) PMT- und SPDS-Proteine bei. Der resultierende phylogenetische Baum (2.4.3, Abb. 42) zeigt eine klare Trennung der PMT-Proteinsequenzen von den SPDS-Proteinsequenzen. Nicht direkt als PMT annotierte Sequenzen (aus *Capsicum annuum*, *Ipomoea batatas* und *Scopolia parviflora*), die jeweils alle vier PMT-spezifischen Aminosäuremotive (Teuber *et al.*, 2007) enthielten, waren dem PMT-Hauptast zugeordnet. Somit erscheint es möglich, PMT und SPDS zumindest innerhalb der Ordnung Solanales durch eine phylogenetische Analyse sicher zu unterscheiden. Übereinstimmend hiermit ist das Vorkommen von Calysteginen, das PMT-Aktivität als Startpunkt der Biosynthese (Biastoff & Dräger, 2007) voraussetzt, in *C. annuum* (Asano *et al.*, 1997), *I. batatas* (Schimming *et al.*, 1998) und in *Scopolia*-Arten (Dräger *et al.*, 1995) belegt.

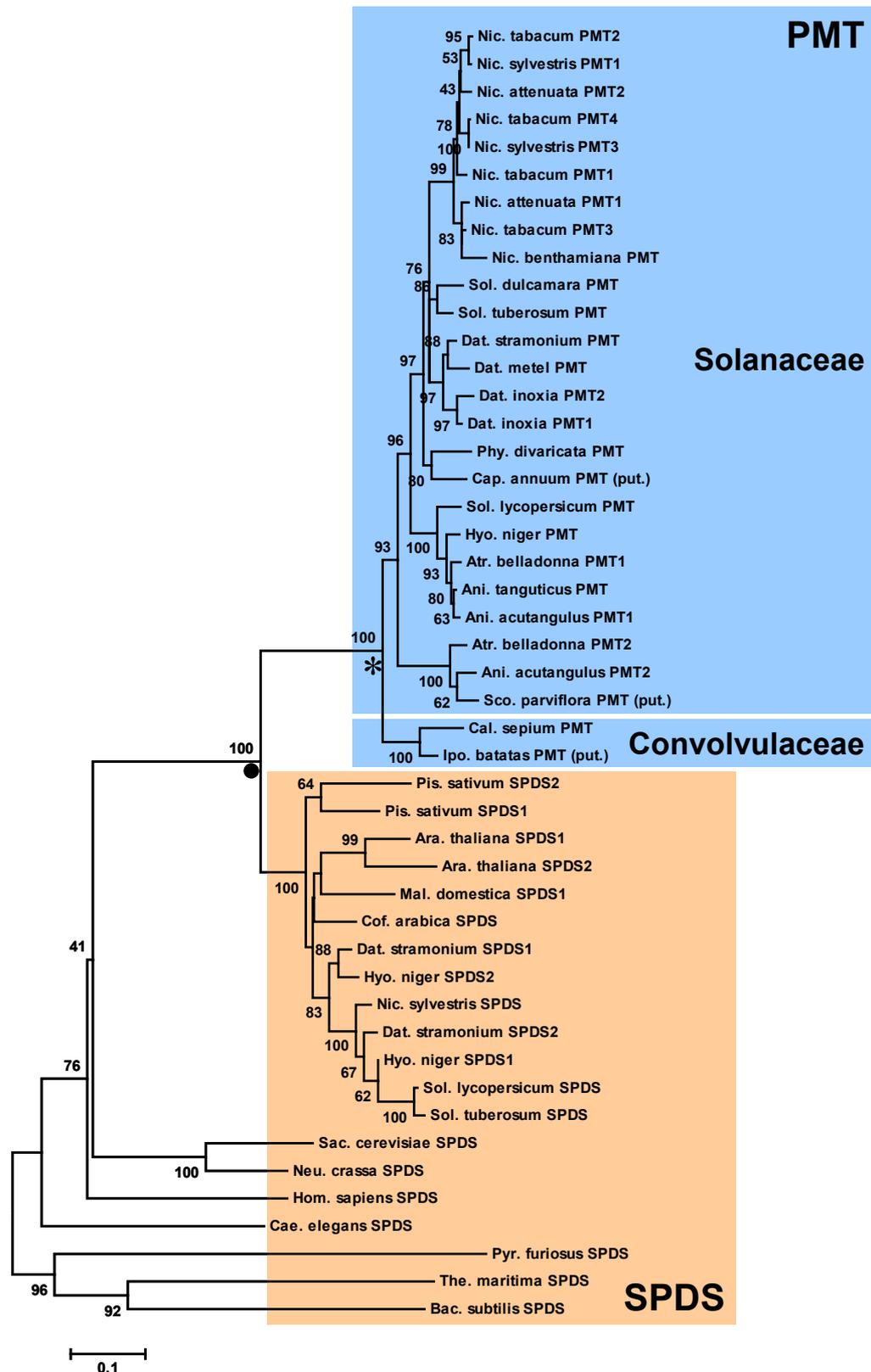


Abb. 42 Phylogenetischer Baum der PMT- und SPDS-Proteine.

Zur Berechnung siehe Abschnitt 2.4.3. Bootstrap-Werte über 40 % (1000 Wiederholungen) sind neben den Knoten angegeben. ●: letzter gemeinsamer Vorfahre von PMT und SPDS. *: Verzweigungspunkt von PMT aus Solanaceae und Convolvulaceae. Die Proteinsequenzen und das Multiple Sequenzalignment sind im Anhang verzeichnet.

Der zentrale Knoten des Baumes (●) stellt den letzten gemeinsamen Vorfahren von pflanzlichen SPDS und PMT dar. Duplikation und Funktionswechsel dieses *spds*-Gens ermöglichten vermutlich die Evolution eines *pmt*-Gens (Minguet *et al.*, 2008). Dafür spricht neben der Sequenzidentität von ca. 65 % auf der Ebene der Aminosäuren die ähnliche Intron-Exon-Struktur von *spds*- und *pmt*-Genen (Minguet *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 1998b). Die Überlebensfähigkeit und Stresstoleranz der Pflanzen war wegen vorhergehender Duplizierung des *spds*-Vorläufers nicht beeinträchtigt. Genduplikation wird als Hauptprozess für die Entstehung von Genen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels angesehen, weil es eine enorme Vielfalt von Sekundärmetaboliten gibt, die Anzahl der grundlegenden enzymatischen Reaktionsmechanismen jedoch begrenzt ist (Pichersky & Gang, 2000; Ober, 2005). Der PMT-Hauptast zweigt ab, bevor sich die einzelnen pflanzlichen SPDS differenzieren. Dies zeigt eine frühe Evolution von PMT innerhalb der Angiospermen an, die sich vermutlich vor ca. 385 Millionen Jahren von den Gymnospermen trennten (Zimmer *et al.*, 2007). PMT könnte jedoch auch noch älter sein, da Derivate des *N*-Methylpyrrolinium-Ions wie Hygrin auch in *Picea*-Arten (Pinaceae) gefunden wurden (Schneider *et al.*, 1995). Allerdings ist deren Biosynthese noch völlig ungeklärt.

PMT-Sequenzdaten sind derzeit nur von Solanaceae und Convolvulaceae verfügbar, die zusammen die Ordnung Solanales bilden. In weiteren Pflanzenfamilien mit Vorkommen von Tropanalkaloiden bzw. Calysteginen wurden bisher keine *pmt*-Gene nachgewiesen (Biastoff & Dräger, 2007). Das Vorkommen von Cochlearin und Calysteginen (hauptsächlich A₅, daneben B₂ und B₃) in *Cochlearia officinalis* (Liebisch *et al.*, 1973; Brock *et al.*, 2006) ließen hier PMT-Aktivität vermuten. Die Suche im Genom von *Arabidopsis thaliana*, die allerdings keine Calystegine bildet, mithilfe von TAIR, The Arabidopsis Information Resource (Swarbreck *et al.*, 2008), erbrachte keine Hinweise auf die Existenz eines *pmt*-Gens in Brassicaceae. Ebenso ließ sich aus der EST-Datenbank von *Bruguiera gymnorrhiza* (Miyama *et al.*, 2006) lediglich ein *spds*-Fragment isolieren, obwohl in *Crossostylis*-Arten, die wie *Bruguiera* zur Familie der Rhizophoraceae gehören, auch Hygrin und Tropanalkaloide nachgewiesen wurden (Gnecco Medina *et al.*, 1983; Biastoff & Dräger, 2007). Innerhalb der Solanales erscheint PMT monophyletisch, und ihre Evolution aus SPDS ist möglicherweise eine Besonderheit dieser Ordnung. Die Übereinstimmung von phylogenetischer Einordnung und biosynthetischer Funktion kann für Polyamine metabolisierende Enzyme nicht verallgemeinert werden. So entwickelte sich die Homospermidinsynthese, die den ersten Schritt der Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden katalysiert, innerhalb der Asteraceae wiederholt aus

Desoxyhypusinsynthase. Beide Enzymgruppen lassen sich daher nur durch biochemische Charakterisierung voneinander unterscheiden (Reimann *et al.*, 2004).

Die erste Verzweigung des PMT-Hauptastes (*) markiert die Trennung der Solanaceae-PMT von den Convolvulaceae-PMT, die entsprechend der Trennung beider Familien mindestens 62 Millionen Jahre zurückliegen muss (Paape *et al.*, 2008). Die Abspaltung der PMT der Gattung *Nicotiana* (Nicotianeae) von den Solanoideae-PMTs stimmt mit einer phylogenetischen Ordnung der Solanaceae basierend auf der Kartierung von Chloroplasten-DNA überein (Olmstead & Palmer, 1992). Auffällig ist die große Distanz vom letzten gemeinsamen Vorfahren von SPDS und PMT bis zu den rezenten PMT-Proteinen, was ein Mutationsgeschehen mit zahlreichen Zwischenstufen nahelegt. Wegen der *S*-Konfiguration des Sulfonium-Ions in der biologisch aktiven Form von SAM war die eher geringfügige Anpassung der Binderegion für das Co-Substrat SAM (4.1) nicht das entscheidende Ereignis während der Evolution von PMT. Vermutlich führten die meisten Mutationen auf dem Weg von SPDS zu PMT nur zu inaktiven Proteinen, aber die entsprechenden Gene wurden nicht aus den Genomen entfernt, sondern behielten sogar die ererbte *spds*-typische Intron-Exon-Struktur. Schließlich ergab sich durch vielfache Mutagenese die PMT-typische Bindeposition für Putrescin innerhalb eines Proteingerüsts, das Methyltransfer von SAM auf Putrescin sterisch erlaubte. Vor ca. 30 bis 40 Millionen Jahren entwickelte sich innerhalb der Solanaceae die Gattung *Nicotiana* (Paape *et al.*, 2008). Die besonders für *Nicotiana*-PMT typischen N-terminalen Tandem-Motive ließen sich vom Protein ohne Änderung seiner katalytischen Eigenschaften entfernen (Hashimoto *et al.*, 1998b). In DsPMT wurde nach entsprechender Verkürzung bei ebenso unveränderter Aktivität die Proteinlöslichkeit erniedrigt (3.7). Die jüngste Phase der PMT-Evolution könnte vor allem die Erweiterungen der N-terminalen Domäne hervorgebracht haben, wodurch die Gestalt der rezenten PMT-Proteine erreicht wurde.

4.6 PMT – ein evolutionärer Vorteil?

Mutationen in Chromosomensätzen, Chromosomen oder einzelnen Genen geschehen nie mit Absicht und verfolgen keinen materiellen Zweck. Sie sind von den Lebewesen, die sie treffen, nicht abwendbar und nicht lenkbar. Mit einer Keimbahnmutation wird ein bestimmtes Merkmal an die Nachkommenschaft weitergegeben, und unter ganz bestimmten Umweltbedingungen bietet es dieser entweder Überlebensvorteile oder -nachteile. Ein mit dem Überlebensvorteil verbundener Reproduktionserfolg selektiert schließlich die Merkmalsträger und

hebt sie von ihrer ursprünglichen Population ab. Betrachtet man das Vermögen zur Expression von PMT als Merkmal, ergibt sich beim Stichwort „Evolution“ sofort die Frage nach dessen Nutzen. PMT-Aktivität ist eine notwendige, aber längst nicht hinreichende Bedingung zur Biosynthese unterschiedlicher Alkaloide wie Nicotin und Hyoscyamin (Abb. 2). Auch ist nicht bekannt, in welcher zeitlichen Reihenfolge die daran beteiligten biosynthetischen Enzyme entstanden. Es wurden jedoch Hinweise gefunden, dass Nicotin und Tropanalkaloide als Endprodukte von Biosynthesewegen, deren Ausgangspunkt PMT darstellt, einen Überlebensvorteil für Pflanzen bieten.

Das Abwehrpotenzial von Nicotin gegen Tabakschädlinge wie z. B. *Manduca sexta* (Lepidoptera) wurde intensiv untersucht (Baldwin, 2001; Voelckel *et al.*, 2001). Die wundinduzierte Biosynthese dieses Stoffes in *Nicotiana*-Arten geht zunächst mit hohen „Aufwendungen“ wie Stickstoffeinbau und Glucoseverbrauch einher, erlaubt aber bei Schädlingsbefall längeres Überleben und größere Samenproduktion (Baldwin *et al.*, 1994; Baldwin, 1998). Larven des Pflanzenschädling *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) wurden mit Blättern von *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) gefüttert, die Scopolamin als Hauptalkaloid akkumulieren. Die Tiere zeigten erhöhte Sterblichkeit und verlängerte Entwicklungszeiten (Alves *et al.*, 2007). Schadinsekten sollen auch für die Aufrechterhaltung eines mittleren Hyoscyamingehaltes im Sinn einer stabilisierenden Selektion in *D. stramonium* verantwortlich sein (Shonle & Bergelson, 2000). Nicotin, Hyoscyamin und Scopolamin besetzen verschiedene Acetylcholinrezeptoren und können so alle Lebewesen schädigen, die Acetylcholin als Neurotransmitter nutzen.

Polyhydroxylierte Nortropanalkaloide mit zuckerähnlicher Struktur wirken hingegen als Hemmstoffe verschiedener Glycosidasen (Biastoff & Dräger, 2007). Individuen von *Acherontia atropos* (Lepidoptera), deren Raupen *Atropa belladonna* befallen, nehmen die in der Pflanze vorkommenden Calystegine A₃ und B₂ auf und speichern sie. Es wurde vermutet, dass diese Insekten für Vögel unverdaulich und damit als Beute weniger attraktiv sind (Nash *et al.*, 1993; Nash & Watson, 1995). Calystegine kommen auch in zahlreichen Gemüsepflanzen vor, die für die menschliche Ernährung von Bedeutung sind. Dazu zählen Paprika-Arten (*Capsicum spec.*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Aubergine (*Solanum melogena*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Physalis-Früchte (*Physalis spec.*) und Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*). Für die enthaltenen Calystegine wurde die Hemmung verschiedener menschlicher Leber-Glycosidasen *in vitro* gezeigt (Asano *et al.*, 1997). Allerdings ist die

orale Resorbierbarkeit der stark hydrophilen Verbindungen beim Menschen bislang ungeklärt. Der evolutionäre Nutzen, den Pflanzen aus der Bildung von Calysteginen beziehen, muss noch ermittelt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Putrescin *N*-methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) katalysiert die *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methylierung des Diamins Putrescin. *N*-Methylputrescin ist der erste spezifische Metabolit der Biosynthese von Nicotin, Tropanalkaloiden und Nortropanen. PMT hat nur geringe Ähnlichkeit mit anderen Methyltransferasen und entwickelte sich vermutlich aus dem in allen Lebewesen vorkommenden Enzym Spermidinsynthase (SPDS, EC 2.5.1.16). Die Enzyme PMT und SPDS1 aus *Datura stramonium* (Gemeiner Stechapfel, Solanaceae) wurden aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität von 67 % auf Aminosäureniveau für vergleichende Untersuchungen zu ihrer Proteinstruktur ausgewählt.

D. stramonium PMT wurde in *E. coli* synthetisiert und bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt, wobei die PMT-Aktivität mit einem colorimetrischen, enzymgekoppelten PMT-Test gemessen wurde (Biastoff *et al.*, 2006). Im Test wurde das aus SAM entstehende SAH abgebaut und als Homocystein quantifiziert. Aus der Entfernung des PMT-Produktinhibitors SAH resultierten niedrigere K_m -Werte für SAM und Putrescin sowie eine höhere Wechselzahl.

D. stramonium PMT wurde reproduzierbar zur Kristallisation gebracht, aber die Kristalle zeigten auch nach vielfacher Optimierung der Kristallisationsbedingungen keine Röntgendiffraktion.

Es gelang in der Weiterführung der Arbeiten von Teuber und Kollegen (Teuber *et al.*, 2007), vollständige Homologiemodelle von *D. stramonium* PMT und SPDS1 zu erstellen. Die beiden Modelle zeigen eine übereinstimmende Proteinfaltung an, wie sie für SAM bzw. dcSAM bindende Enzyme typisch ist (Martin & McMillan, 2002). Die rekombinanten Enzyme verhielten sich in der analytischen Gelfiltration als Dimere und wurden deshalb entsprechend modelliert. Die Anlagerung (Docking) der jeweiligen Co-Substrate und des Substrates Putrescin zeigte eine ganz unterschiedliche Bindeposition für Putrescin in den aktiven Zentren von SPDS und PMT.

Der im Unterschied zu SPDS verlängerte N-Terminus von PMT erscheint nicht geordnet in Helices oder Falblätter, kann ohne Verlust oder Änderung der Aktivität entfernt werden und trägt vermutlich aufgrund seiner Hydrophilie zur Gesamtlöslichkeit des PMT-Proteins bei.

Nach erfolgreicher heterologer Synthese und biochemischer Charakterisierung des *D. stramonium* SPDS1-Wildtyps (K_m für Putrescin: 33,1 μM ; K_m für dcSAM: 64,2 μM ; k_{cat} : 0,44 s^{-1}) wurde mit ortsgerichteter Mutagenese versucht, PMT-Aktivität in DsSPDS zu erzeugen und damit eine Route der evolutionären Entwicklung von SPDS zu PMT nachzuvollziehen. Der Austausch D103I zerstörte SPDS-Aktivität, während PMT-Aktivität auch nach Einführung von insgesamt zehn kumulativen Mutationen nicht erreicht wurde.

Proteinchimären aus *D. stramonium* SPDS1 und PMT wurden konstruiert und waren als lösliche Enzyme nach Synthese in *E. coli* charakterisierbar. Der N-terminale Proteinteil bestimmte die katalytische Aktivität (Abb. 43). Die K_m -Werte für Putrescin waren gegenüber den Wildtyp-Enzymen erhöht.

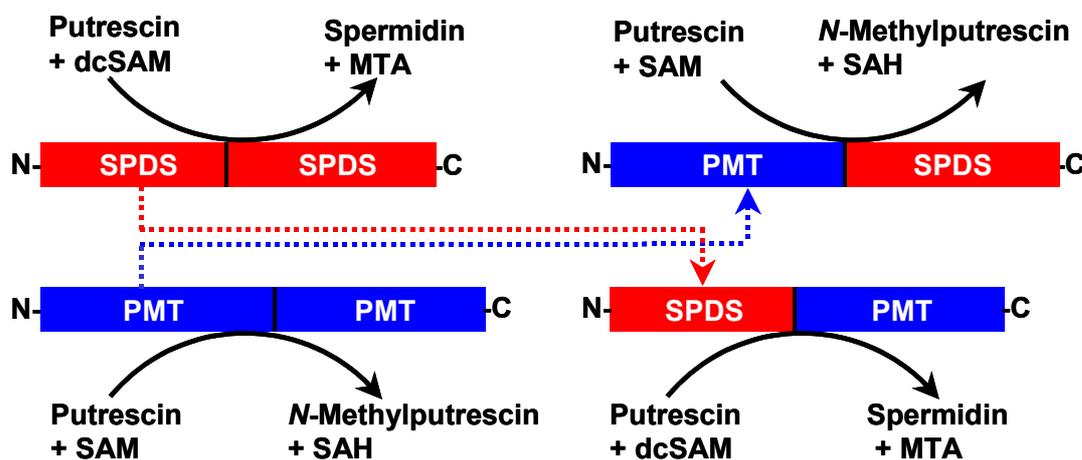


Abb. 43 Katalytische Aktivitäten der Proteinchimären aus DsPMT und DsSPDS.

Homologiemodellierung der chimären Proteine ergab eine unterschiedliche Bindung von Putrescin in den aktiven Zentren, die den Wildtyp-Enzymen mit der gleichen Aktivität entsprach, jedoch wurde eine grundsätzlich übereinstimmende Proteinfaltung von SPDS- und PMT-Proteinen evident.

Ein phylogenetischer Baum aus allen verfügbaren PMT-Proteinsequenzen und ausgewählten SPDS-Proteinsequenzen wurde entwickelt. Er belegt mit einer tiefen Verzweigung die frühzeitige Abspaltung von PMT von pflanzlichen SPDS-Proteinen während der Evolution der Angiospermen. Die Evolution von PMT begann vermutlich mit der Duplikation eines *spds*-Gens, woran sich die Ausbildung eines PMT-spezifischen Bindebereichs für Putrescin

anschluss, der mit dem Funktionswechsel von Aminopropyltransfer zu Methyltransfer verbunden war. Nach Erreichen von PMT-Aktivität entstanden die hydrophilen N-terminalen Verlängerungen, die sich ohne Veränderung der katalytischen Parameter entfernen lassen, und *pmt*-Gene wurden selbst Gegenstand von Duplikationsereignissen.

Der simultane Nachweis von *pmt*-Genen und Alkaloiden, zu deren Aufbau *N*-Methylputrescin als Vorstufe dient, sowie die monophyletische Evolution der PMT ist bisher nur innerhalb der Ordnung Solanales gesichert. Die Suche nach PMT-Proteinen außerhalb dieser Ordnung verlief bisher ergebnislos. Dabei sind Tropanalkaloide und ähnliche Verbindungen im gesamten Pflanzenreich zu finden. Pharmakologisch sehr bedeutsame Tropanalkaloide wie Cocain finden sich in *Erythroxylum coca* und *Erythroxylum novogranatense* (Erythroxylaceae). Weniger bekannt ist, dass unterschiedliche Tropanalkaloide auch in den Familien Euphorbiaceae, Rhizophoraceae und Brassicaceae vorkommen (Griffin & Lin, 2000; Brock *et al.*, 2006; Biastoff & Dräger, 2007). Obwohl eine Tropinonreduktase in *Cochlearia officinalis* (Brassicaceae) gefunden wurde und sich auf dieser Ebene eine Analogie zur Tropanalkaloidbiosynthese in Solanaceae zeigte (Brock *et al.*, 2008), scheint eine für Solanaceae typische PMT in dieser Pflanze nicht vorzukommen (Brock und Dräger, unveröffentlicht). Eine SPDS aus *Cochlearia officinalis* (Brassicaceae) zeigte wie erwartet keine PMT-Aktivität (Reinhardt, 2008). Die Erstellung eines Metabolitenprofils könnte in *C. officinalis* zunächst das Vorkommen von *N*-Methylputrescin sichern. Bei Solanaceae wurde *pmt*-Expression vielfach in den Wurzeln nachgewiesen (Hashimoto *et al.*, 1998a; Suzuki *et al.*, 1999; Teuber *et al.*, 2007). Daher sollten sowohl Wurzelkulturen als auch Ganzpflanzen gewebespezifisch untersucht werden. Eine Akkumulation von *N*-Methylputrescin kann durch spezifische Hemmung des Enzyms Diaminoxidase/Methylputrescinoxidase erreicht werden, das kürzlich erstmals aus *N. tabacum* kloniert wurde (Kato *et al.*, 2007). Erst dann wäre der Versuch einer genuinen Reinigung von PMT-Aktivität aus *Cochlearia* sinnvoll.

Erfolg versprechend ist die Weiterführung der in dieser Arbeit demonstrierten funktionellen Charakterisierung von chimären Proteinen aus PMT und SPDS. Die minimal notwendigen Strukturelemente für PMT- oder SPDS-Aktivität lassen sich so weiter eingrenzen. Kristallisationsversuche mit löslichen Proteinchimären und mit PMT-Proteinen aus anderen Pflanzenspezies könnten fortgesetzt werden. Die daraus gewonnenen Ergebnisse werden helfen, die Evolution von PMT noch besser zu verstehen.

6 Anhang

6.1 Quantifizierung der Polyaminstandards

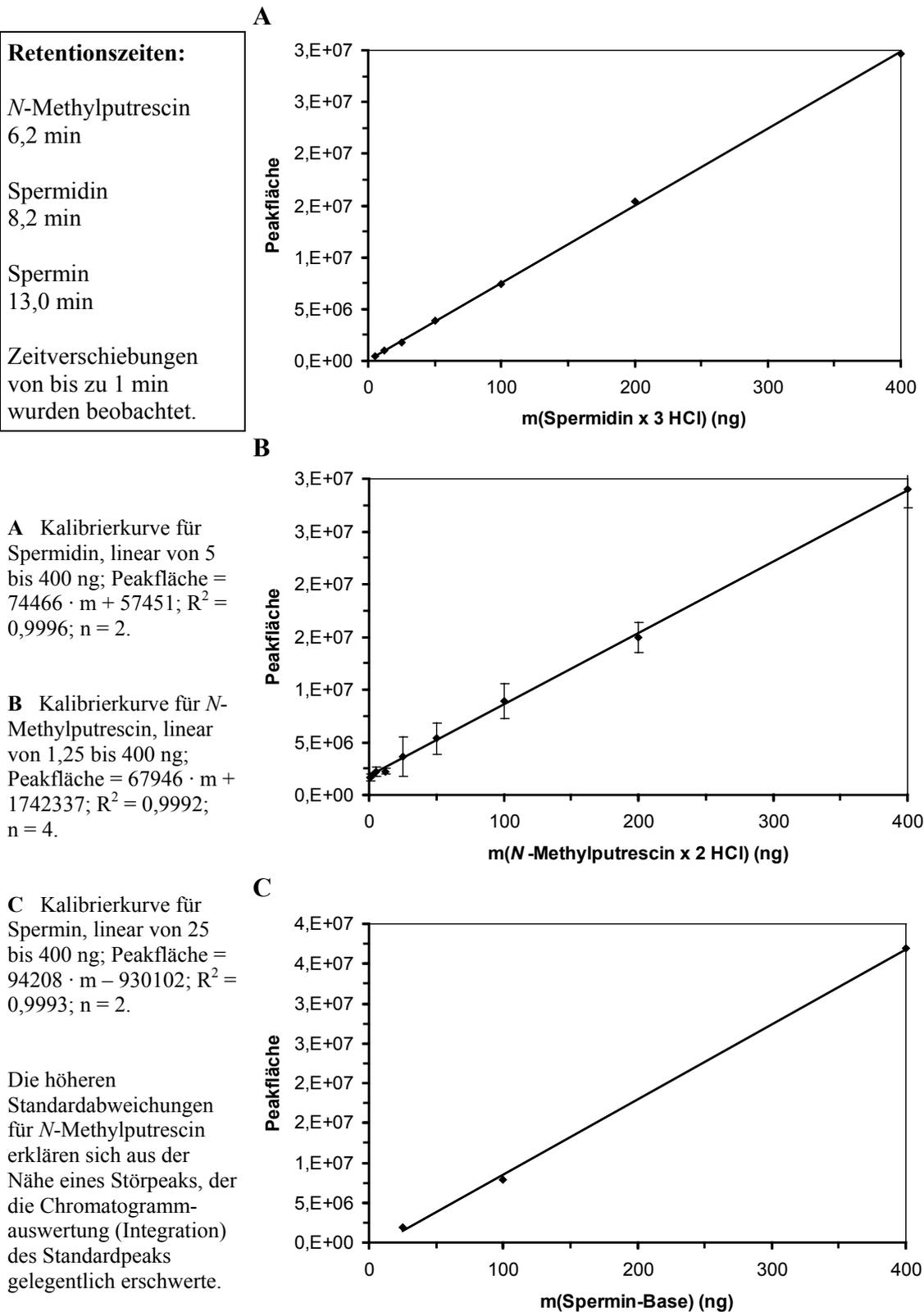


Abb. 44 Kalibrierkurven der Polyaminstandards.

6.2 Sequenzdaten

Tab. 34 Datenbankeinträge von PMT- und SPDS-Proteinen.

Protein	Eintrag ^a
PMT	
<i>Anisodus acutangulus</i> PMT1	B4YSH2
<i>Anisodus acutangulus</i> PMT2	B4YSH3
<i>Anisodus tanguticus</i> PMT	Q68HB1
<i>Atropa belladonna</i> PMT1	Q9S7W8
<i>Atropa belladonna</i> PMT2	Q9XJ42
<i>Calystegia sepium</i> PMT	Q2KTH3
<i>Capsicum annuum</i> PMT (put.)	CA518000; A518369; CA518560; A520943
<i>Datura inoxia</i> PMT1	Q2KTH2
<i>Datura inoxia</i> PMT2	Q2KTH1
<i>Datura metel</i> PMT	A0PFY1
<i>Datura stramonium</i> PMT	Q70EW6
<i>Hyoscyamus niger</i> PMT	Q9XJ41
<i>Ipomoea batatas</i> PMT (put.)	DV038077; E876509
<i>Nicotiana attenuata</i> PMT1	Q93XQ5
<i>Nicotiana attenuata</i> PMT2	Q93XQ4
<i>Nicotiana benthamiana</i> PMT	B1NYI5
<i>Nicotiana sylvestris</i> PMT1	Q9ZWT9
<i>Nicotiana sylvestris</i> PMT3	Q9ZWT7
<i>Nicotiana tabacum</i> PMT1	Q42963
<i>Nicotiana tabacum</i> PMT2	Q9SEH7
<i>Nicotiana tabacum</i> PMT3	Q9SEH5
<i>Nicotiana tabacum</i> PMT4	Q9SEH4
<i>Physalis divaricata</i> PMT	Q2KTH0
<i>Scopolia parviflora</i> PMT (put.)	Q4VQ73
<i>Solanum dulcamara</i> PMT	B1VK31
<i>Solanum lycopersicum</i> PMT	Q2KTH4
<i>Solanum tuberosum</i> PMT	Q70AR0
SPDS	
<i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS1	Q9ZUB3
<i>Arabidopsis thaliana</i> SPDS2	O48661
<i>Coffea arabica</i> SPDS	O82147
<i>Datura stramonium</i> SPDS1	Q96556
<i>Datura stramonium</i> SPDS2	Q96557
<i>Hyoscyamus niger</i> SPDS1	O48658
<i>Hyoscyamus niger</i> SPDS2	O48659

Protein	Eintrag ^a
<i>Malus domestica</i> SPDS1	Q8GTQ6
<i>Nicotiana sylvestris</i> SPDS	O48660
<i>Pisum sativum</i> SPDS1	Q9ZTR1
<i>Pisum sativum</i> SPDS2	Q9ZTR0
<i>Solanum lycopersicum</i> SPDS	Q9ZS45
<i>Solanum tuberosum</i> SPDS	Q93X16
<i>Thermotoga maritima</i> SPDS	Q9WZC2
<i>Bacillus subtilis</i> SPDS	P70998
<i>Homo sapiens</i> SPDS	P19623
<i>Caenorhabditis elegans</i> SPDS	Q9U2F0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SPDS	Q12074
<i>Neurospora crassa</i> SPDS	Q9Y8H7
<i>Pyrococcus furiosus</i> SPDS	Q8U4G1

^a UniProt-Einträge bzw. EST-Einträge in GenBank für *C. annuum* und *I. batatas*.

```

atggaagtcatgtcacctacccacacaaaatggctctgccctccttaaaaaatgtacaaat
M E V M S P T H T N G S A L L K N S T N
ggccaccacatgaatggcaattccgattacctgaacggcgccacagctcatgacaatggc
G H H M N G N S D Y L N G A T A H D N G
agaaaaatattagggagctccaactctgttaagcctgggttggttttcagaatttagctcg
R K I L G S S N S V K P G W F S E F S S
ttatggccagggtgaagcattctcactgaaaatagagaagttgctatttcaggggaagtct
L W P G E A F S L K I E K L L F Q G K S
gattatcaagatgtcatgctctttgagtcagcaacttatgggaaggtactgacattagat
D Y Q D V M L F E S A T Y G K V L T L D
ggagcaattcaacatacagagaatgggtggatttccatatactgaaatgattgttcatctc
G A I Q H T E N G G F P Y T E M I V H L
ccacttggttccattccaaaccccaaaaaagggtgttgatcattgggtggaggtattggatt
P L G S I P N P K K V L I I G G G I G F
acattattcgaagtgtctcgttatcctaccattgaaaaaatagacattgttgagattgat
T L F E V L R Y P T I E K I D I V E I D
gatgtgggtggtcgatgtgtctacaaaatttttcccctacctagcagcaggatttgatgat
D V V V V D S T K F F P Y L A A G F D D
cctagagtaacccttgttatggcgatggagctgcatttgtgaaagctgctcaacctgga
P R V T L V M G D G A A F V K A A Q P G
tactatgatgccattattgttgactcttctgatcctatcggtccagcaaaagacttgctc
Y Y D A I I V D S S D P I G P A K D L F
gaaaggccattcttcgaggcagtgggcgaagcgctaaggccaggaggagtaatgtgtacg
E R P F F E A V A K A L R P G G V M C T
caagcagagagcatttggcttccatgcatataattaagcaaatcattgcaaattgtcgc
Q A E S I W L H M H I I K Q I I A N C R
caagtgtctaagggttctgtcaattatgcatggactacagtcctacttaccctactgggt
Q V S K G S V N Y A W T T V P T Y P T G
gtaattggttacatgctctgctccaccgagggggcagaagtcgacttcaagaatccgggtg
V I G Y M L C S T E G A E V D F K N P V
aatccaattgacaagatgcaactcacgtcaaatccaaattaggacctctcaagttttac
N P I D K D A T H V K S K L G P L K F Y
aatactgatattcataaagcagctttcattttgccatcttttccagaagtttgattgag
N T D I H K A A F I L P S F A R S L I E
tcttga
S -

```

Abb. 45 Protein- und cDNA-Sequenz der putativen *Capsicum annuum* PMT.

Die überlappenden EST-Einträge CA518000; A518369; CA518560; A520943 wurden zusammengefügt und mit dem ExpASY Translate tool in die Proteinsequenz übersetzt.

```

atggagggtcatggctgctcacaccaatggcgtcgtcaccaaccaccagaatggcaccgcc
M E V M A A H T N G V V T N H Q N G T A
agccaccacaacgcccaccgccaaccaccacaacgggactgctcatgacaacgcccgcaaa
S H H N A T A N H H N G T A H D N A A K
gacttgggctgcattaaacccggctggttttctgagtttagccaaatgtggcccggcgaa
D L G C I K P G W F S E F S Q M W P G E
gcattttcactgaagatagagaagctactattccaagaaagtctgattaccaagatggt
A F S L K I E K L L F Q G K S D Y Q D V
atgctgtttgagtcagctagatattgggaaggtgctgacattggatggagcaatccaacac
M L F E S A R Y G K V L T L D G A I Q H
acagagaatggaggatttcctacactgagatgattgtccatctcccacttggctccata
T E N G G F P Y T E M I V H L P L G S I
cctaacccaaagaaggtcttgattattgggggaggtatcggtttcactttaatggaggtg
P N P K K V L I I G G G I G F T L M E V
tcccgttaccctacaatgaaaaatagacatcgttgaatagataaaatggtagtggat
S R Y P T I E K I D I V E I D K M V V D
gtatctagacaatttttccctaccttgctgcaggcttcgaggatcctcgtgtaacgctc
V S R Q F F P Y L A A G F E D P R V T L
cacattggagatgagctgattcgtgaaggctgccagaaggatattatgatgcaatt
H I G D G A A F V K A A Q K G Y Y D A I
attgtagattcctctgatcccataggtccagcaaaagacttgtttgagaggccattcttt
I V D S S D P I G P A K D L F E R P F F
gaagcagtagcgaaggtctaagagcagagggggttgtgtgcaccaagcagaagcata
E A V A K G L R A G G V V C T Q A E S I
tggcttcacatgcacctattaacagatcatcgcaaatgtcgtcaggttttcaaaggc
W L H M H L I K Q I I A N C R Q V F K G
tctgtcaactatgcttgaccaccgtaccaactatcccagtggggtgattggttacatg
S V N Y A W T T V P T Y P S G V I G Y M
ttgtgctctactgaaggccggcagttgacttcaagaatccgggtcaaccctatcgacaaa
L C S T E G P A V D F K N P V N P I D K
gataccaccatgcaaatcgaaggaccctcaagttctataactctgagattcataaa
D T T H V K S K G P L K F Y N S E I H K
gcggctttcactctaccgtcatttgctcaaaagttggtgagtag
A A F T L P S F A Q K L L E -

```

Abb. 46 Protein- und cDNA-Sequenz der putativen *Ipomoea batatas* PMT.

Die überlappenden EST-Einträge DV038077; E876509 wurden zusammengefügt und mit dem ExpASy Translate tool in die Proteinsequenz übersetzt.

6.3 Multiples Sequenzalignment

Das Multiple Sequenzalignment wurde mit dem Clustal W Algorithmus der MEGA 4.0 Software berechnet. Folgende Parameter wurden hierfür vorgegeben: GONNET-Matrix, Gap Open Penalty: 10, Gap Extension Penalty: 0,2. Das Alignment wurde mit GeneDoc (Tab. 23) grafisch bearbeitet. Die Färbung gibt den Grad der Konservierung der Aminosäurereste an: 100 % (weiß auf schwarz); mehr als 80 %, aber weniger als 100 % (weiß auf grau); mehr als 60 %, aber weniger als 80 % (schwarz auf grau), bis 60 % (schwarz auf weiß).

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
NtPMT1 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGHQNGT SEHLNGYQNGT SKHQHG----- : 45
NtPMT2 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKSGAI PMNGHH-----NGT SKHQHG----- : 33
NtPMT3 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGYQNGT SKHQHGQNGT SEHRNGHQHG----- : 49
NtPMT4 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGHQSGT SKHLNGYQNGT SKHQHGHHNGT SEHRNGHQNGI SEHQNGHQNGT SEHRNGHQNG--- : 81
NaPMT2 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGHQ-----NGT SKHQNGTS----- : 36
NaPMT1 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGYQNGT SKHQHGQNGT SEHRNGHQHG----- : 49
NbPMT : --MEVIS--TNKNGSN-----IFKNGAI PMNGYKNGT SKHQHGQNGT SEHRTGHQHG----- : 49
NsPMT1 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKSGAI PMNGHQ-----NGT SKHQHG----- : 33
NsPMT3 : --MEVIS--TNTNGST-----IFKNGAI PMNGHQSGT SKHLNGYQNGT SKHQHGHHNGT SEHRNGHQNGI SEHQNGHQNGT SEHRNGHQNGTS : 84
SdPMT : --MEVIS--NHTNGSV-----ITING---H--HHT-----NGKSDHRNG----- : 30
StPMT : --MEVIS--THTNGST-----ITITT---NGHHN-----NGKSDHRNG----- : 31
SlPMT : --MEVIMNHNNGTINTN-----TKIIHKNGSIC--NGN-----VNGVSHHTHN----- : 41
DsPMT : --MEVLSSTHTNGSS-----LLKNGVITMNGHHN-----GNSDHRNG----- : 35
DiPMT2 : --MEVIS--TQTNGSA-----IIMN---YSHHN-----GNSDHRNG----- : 29
DiPMT1 : --MEVIS--TQTNGSA-----IIMN---YSHHN-----GNSDHRNG----- : 29
DmPMT : --MEVIS--TNTNGSS-----LLKNGVITMNGHHN-----GNSDHRNG----- : 34
HnPMT : --MEVIS--HNNGST-----TKIILKNGSIC--NGN-----VNGVSHSNEK----- : 36
AbPMT2 : --MAFRNGS-----TTTTITINHPN-----DASII PKNG----- : 28
AbPMT1 : --MEVN---HNNGST-----TKIILKNGSIC--NGD-----VNGVSHHKK----- : 34
PdPMT : --MEVMTSTHTNGSA-----LLKSSAITNGYH-----NGNSNHRKG----- : 35
AtaPMT : --MEVIS--HNNGST-----TKIILKNGSIC--NGN-----VNGVSHSHEK----- : 36
AaPMT1 : --MEVIS--HNNGST-----TKIILKNGSIR--NGN-----VNGVSHSHEK----- : 36
AaPMT2 : --MAFRNGSI-----TTTTSTINHLN-----GASII PKNGNNTIA----- : 33
CsPMT : --MEVMA--AHNGFT-----NHQNGTTNHQNGTTN-----HHNGTANHQNGN----- : 41
SpPMT : --MAFRNGSTNTTINHLNGASTI PKNGSTTTINHLN-----GASII PKNG----- : 44
CaPMT : --MEVMSPTHTNGSA-----LLKN---STNGHHM-----GNSDYLANG----- : 33
IbPMT : --MEVMA--AHTN-----GVVTHNQGTAS-----HHNATSHHNG----- : 32
SlSPDS : MADECAAFMKGTPL-----VKRPREEEAETEME-----AANNSSNN----- : 36
DsSPDS2 : -----ME-----VANHNHNNN----- : 11
DsSPDS1 : -----ME-----BAN--NK----- : 7
HnSPDS2 : -----ME-----BQG--NN----- : 7
HnSPDS1 : -----ME-----VTNQSNG----- : 9
NsSPDS : -----ME-----AANHNHN----- : 9
AtSPDS1 : --MDAKETSATDL-----KRPREEDDNGGAA-----TMEEND----- : 32
AtSPDS2 : --MSSTQASVTDLP-----VKRPREAEDNNGG-----AMETENGEGG----- : 36
CaSPDS : --MADAVNSKKEEA-----AQLPD----- : 18
MdSPDS1 : --MADESAGSADFP-----VKRPREEEENGSA-----AASAVSMEP----- : 36
PsSPDS2 : --MAAESTVLESMSK-----BHRDDDEKSNF SV-----SAVMDVEG----- : 37
PsSPDS1 : --MAAEPNTLHSTDSP-----LKRQREDEVNGVSD-----TIS----- : 33
StSPDS : MADECAAFVKGTEPL-----VKRPREEEAETEME-----AANNSSNNN----- : 38
TmSPDS : ----- : -
BsSPDS : ----- : -
HsSPDS : -----M-----EPGPD-----GPAAS----- : 11
CsSPDS : -----MNKLKKGWFT-----EPSPDLEKMGASDE----- : 26
ScSPDS : -----MAQEI----- : 5
NcSPDS : -----MSEI----- : 4
PfSPDS : ----- : -

```

```

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200
NtPMT1 : -----HQNGTFEHRNGHQGT SEQNGTISHDNGN---ELLGSSDIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 126
NtPMT2 : -----GHKNGTSEQNGTISHDNGN---ELLGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 104
NtPMT3 : -----ISEHQNGHQGT SEHQNGHQHG-----TISHDNGNELQLLGSNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 132
NtPMT4 : -----GISEHQNGHQGT SEHQNGHQGT SEQNGTISHDNGN---ELLGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 170
NaPMT2 : -----BHPNGHQGT SEHQNGHQGT SEQNGTISHDNGN---KLVGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 122
NaPMT1 : -----ISEHQNGHQGT SEHQNGHQGT SEQNGTISHDNGNELQLLGSNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 139
NbPMT : -----ISEHQNDHQGT SEHQNDHNGRSEQNGTISHDNGNELQLLGSNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 139
NsPMT1 : -----GHKNGTSEQNGTISHDNGN---ELLGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 104
NsPMT3 : EHRNGHQNGI SEHQNGHQGT SEHQNGHQGT SEQNGTISHDNGN---ELLGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 181
SdPMT : -----GVAHDNGN--KLSLGSYNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSVKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 91
StPMT : -----G-TIHDNGN--KLLGNSNCKPGWFSEBSA-LWPGEARSVKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 91
SlPMT : -----NENKLVETNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 95
DsPMT : -----GTTVHE--NGRKLGNNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 95
DiPMT2 : -----GATAHDHDNGRKLGNNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 91
DiPMT1 : -----GATAHDHDNGRKLGNNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 91
DmPMT : -----GTTAHD--NGRKLGNNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 94
HnPMT : -----TENKLVETNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 90
AbPMT2 : -----TNITITLLKNGSTNEFGCHKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 89
AbPMT1 : -----TENKLVETNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 88
PdPMT : -----VTAHDNGR--KLLGSSNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 95
AtaPMT : -----TENKLVETNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 90
AaPMT1 : -----TENKLVETNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 90
AaPMT2 : -----TTRNIATTLKNGSTHEFGCHKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 96
CsPMT : -----GTAHDG---KDFGCHKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 97
SpPMT : -----NNITITLLKNGSPHEFGCHKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 105
CaPMT : -----ATAHDNGR--KIL--GSSNSIKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 92
IbPMT : -----KDLGCHKPGWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAR : 87
SlSPDS : -----GC---EKEESSFYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 92
DsSPDS2 : -----GCT---NDKESPCISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 67
DsSPDS1 : -----ESFYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 57
HnSPDS2 : -----ESAYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 57
HnSPDS1 : -----CS--NNEKESFYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 65
NsSPDS : -----GCT---NESFYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 63
AtSPDS1 : -----QK---KEPA--CFSTVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 85
AtSPDS2 : -----EI---KEPS--CMSSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 89
CaSPDS : -----GVSSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 65
MdSPDS1 : -----SVSAVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 90
PsSPDS2 : -----GD---KDPGNGVSSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKIEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 92
PsSPDS1 : -----KEPQNGLSSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 84
StSPDS : -----GCSTNEKEEPSFYISSVLPWFSEBSA-LWPGEARSLKVEKLLPQKSDYQVVLFPSSAT : 97
TmSPDS : -----MRTLKELERELQPRHLWYDEYTG---NNVGLFMKMNRTVMSQSDIQRIIDIFPNPD : 55
BsSPDS : -----MSELWYTEKQ---KNFGLIMVNTLHTRQTFEQIDHBMVTEB : 41
HsSPDS : -----GPAAREGRTFCB-LWPGOALSQVQLLHRRHSRQIIVFRSKU : 58
CsSPDS : -----EPTKVLKSDCGMGG--AWPGOALSQVQLLHRRHSRQIIVFRSKU : 73
ScSPDS : -----THPTVDCWFRISDTMWPGOALSQVQLLHRRHSRQIIVFRSKU : 53
NcSPDS : -----AHPHQDQWFRISDN--MWPGOALSQVQLLHRRHSRQIIVFRSKU : 51
PfSPDS : -----MERARIEWYF---RQYGVAFIKKIKMLKLSRYQRIWYETEG : 40

```



```

*          420          *          440          *          460
NtPMT1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 375
NtPMT2 : LCSTEGEVIDFKNEVNEIDK-ETAQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 353
NtPMT3 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 381
NtPMT4 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 419
NaPMT2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 371
NaPMT1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 388
NbPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 388
NsPMT1 : LCSTEGEVIDFKNEVNEIDK-ETAQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 353
NsPMT3 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ETTQVKS KLAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 430
SdPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DSTHVKS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
StPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTHVKS KLEPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
SlPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK---YVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
DsPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DETHANS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 344
DiPMT2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-KLDETHVNS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 341
DiPMT1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DETHANS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
DmPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DETHANS ELGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 343
HnPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 338
AbPMT2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-KTSHIKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
AbPMT1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTSHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 336
PdPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-ATAHKS ELGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 344
AtaPMT : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTSHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 338
AaPMT1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTSHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 338
AaPMT2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-KPSHKS K-APLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 347
CsPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTSHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 344
SpPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-KPSHKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 359
CaPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DATHVKS KLGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 341
IbPMT  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK-DTHVKS K-GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 334
SlSPDS : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-SPAKS IEPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 342
DsSPDS2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-SHGQTI GPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 317
DsSPDS1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--DDSHTK TRGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 308
HnSPDS2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--DDSHTK TRGPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 308
HnSPDS1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-SGPKT IAPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 315
NsSPDS  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--DASHNKT LGLPMKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 314
AtSPDS1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-SSSKS NGLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 334
AtSPDS2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--DESSIKS HCKPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 340
CaSPDS  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--NDGRS KTMKPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 316
MdSPDS1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-ESKR PLRFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 335
PsSPDS2 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--QKDCQK SVRPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 342
PsSPDS1 : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--ENDSQQA ARPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 334
StSPDS  : LCSTEGEVDVDFKNEVNEIDK--E-SPVKTI EPLKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 347
TmSPDS  : FASKGIDPDKDFDEE-----KVRKFNK ELKYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 296
BsSPDS  : LSKKYDPLAVEDS-----RFFDIET KYTKDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 276
HsSPDS  : LSKN-ESTNEQBEVQELTQ-----QVACMQ LKYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 302
CsSPDS  : ICAKN-AMRQVTTARTATA-----EQIKALN RFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 314
ScSPDS  : VCSKD-KTCVVKKPREISD-----EKEAEL -YRITNKKLHE-SVLEPFAKEDN----- : 293
NcSPDS  : VCSKD-ENAVVVEVRSWSQ-----EEEEKL -CRYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 291
PfSPDS  : VGVKGDIDPDKIDRE-----RAKKLQ LKFEYNSDIHKAAEFLPSFARSMIBS----- : 281
cs  egg  f  p  d          p  5y  6H  a  F  6P  5a

```

6.4 Literatur

- Alabadi D, Carbonell J. 1999. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Molecular Biology* 39: 933-943.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Alves MN, Sartoratto A, Trigo JR. 2007. Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): Defense, allocation, costs, and induced response. *Journal of Chemical Ecology* 33: 297-309.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Asano N, Kato A, Matsui K, Watson AA, Nash RJ, Molyneux RJ, Hackett L, Topping J, Winchester B. 1997. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* 7: 1085-1088.
- Bagni N, Tassoni A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.

- Bairoch A, Bougueleret L, Altairac S, Amendolia V, Auchincloss A, Puy GA, Axelsen K, Baratin D, Blatter MC, Boeckmann B, Bollondi L, Boutet E, Quintaje SB, Breuza L, Bridge A, Saux VBL, deCastro E, Ciampina L, Coral D, Coudert E, *et al.* 2008. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 36: D190-D195.
- Baldwin IT. 2001. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology* 127: 1449-1458.
- Baldwin IT, Karb MJ, Ohnmeiss TE. 1994. Allocation of ^{15}N from Nitrate to Nicotine - Production and Turnover of A Damage-Induced Mobile Defense. *Ecology* 75: 1703-1713.
- Baldwin IT. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *PNAS* 95: 8113-8118.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research* 36: D25-D30.
- Biastoff S, Teuber M, Zhou ZS, Dräger B. 2006. Colorimetric Activity Measurement of a Recombinant Putrescine *N*-Methyltransferase from *Datura stramonium*. *Planta Medica* 72: 1136-1141.
- Biastoff S, Dräger B. 2007. Calystegines. In: Cordell GA (Ed.), *The Alkaloids* vol. 64, Academic Press, New York, pp. 49-102.
- Bowman WH, Tabor CW, Tabor H. 1973. Spermidine Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 248: 2480-2486.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brock A, Brandt W, Dräger B. 2008. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant Journal* 54: 388-401.
- Brock A, Herzfeld T, Paschke R, Koch M, Dräger B. 2006. Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry* 67: 2050-2057.
- Bugl H, Fauman EB, Staker BL, Zheng FH, Kushner SR, Saper MA, Bardwell JCA, Jakob U. 2000. RNA methylation under heat shock control. *Molecular Cell* 6: 349-360.
- Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, DeLucas LJ. 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 63: 295-301.
- Chang A, Scheer M, Grote A, Schomburg I, Schomburg D. 2009. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research* 37: D588-D592.
- Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P. 2005. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research* 33: W72-W76.
- Cornell KA, Riscoe MK. 1998. Cloning and expression of *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/*S*-adenosylhomocysteine nucleosidase: identification of the *pfs* gene product. *Biochimica et Biophysica Acta* 1396: 8-14.

- Cornell KA, Swarts WE, Barry RD, Riscoe MK. 1996. Characterization of recombinant *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: Analysis of enzymatic activity and substrate specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228: 724-732.
- Dräger B. 2004. Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports* 21: 211-223.
- Dräger B, van Almsick A, Mrachatz G. 1995. Distribution of calystegines in several Solanaceae. *Planta Medica* 61: 577-579.
- Duerre JA. 1962. A Hydrolytic Nucleosidase Acting on S-Adenosylhomocysteine and on 5'-Methylthioadenosine. *Journal of Biological Chemistry* 237: 3737-3741.
- Dufe VT, Qiu W, Muller IB, Hui R, Walter RD, Al Karadaghi S. 2007. Crystal structure of *Plasmodium falciparum* spermidine synthase in complex with the substrate decarboxylated S-adenosylmethionine and the potent inhibitors 4MCHA and AdoDATO. *Journal of Molecular Biology* 373: 167-177.
- Dufe VD, Lüersen K, Eschbach M-L, Haider N, Karlberg T, Walter RD, Al-Karadaghi S. 2005. Cloning, expression, characterisation and three-dimensional structure determination of *Caenorhabditis elegans* spermidine synthase. *FEBS Letters* 579: 6037-6043.
- Dutta S, Burkhardt K, Young J, Swaminathan GJ, Matsuura T, Henrick K, Nakamura H, Berman HM. 2009. Data Deposition and Annotation at the Worldwide Protein Data Bank. *Molecular Biotechnology* 42: 1-13.
- Felsenstein J. 1985. Confidence-Limits on Phylogenies - An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Feth F, Arfmann HA, Wray V, Wagner KG. 1985. Determination of putrescine N-methyltransferase by high performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 24: 921-923.
- Follmann H, Kuntz I, Zacharias W. 1975. Adenine nucleosides in solution: circular dichroism studies and base conformation. *European Journal of Biochemistry* 58: 31-41.
- Franceschetti M, Fornale S, Tassoni A, Zuccherelli K, Mayer MJ, Bagnia N. 2004. Effects of spermidine synthase overexpression on polyamine biosynthetic pathway in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 989-1001.
- Freydank AC, Brandt W, Dräger B. 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 72: 173-183.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31: 3784-3788.

- Gnecco Medina DH, Pusset M, Pusset J, Husson HP. 1983. Tropane alkaloids from *Crossostylis* sp. *Journal of Natural Products* 46: 398-400.
- Gottesman S. 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 30: 465-506.
- Gottesman S. 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 565-587.
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305-308.
- Graser G, Hartmann T. 2000. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 211: 239-245.
- Griffin WJ, Lin GD. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53: 623-637.
- Haider N, Eschbach ML, Dias SD, Gilberger TW, Walter RD, Luersen K. 2005. The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology* 142: 224-236.
- Hanzawa Y, Imai A, Michael AJ, Komeda Y, Takahashi T. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 527: 176-180.
- Hashimoto T, Mitani A, Yamada Y. 1990. Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: Its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiology* 93: 216-221.
- Hashimoto T, Tamaki K, Suzuki K, Yamada Y. 1998a. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology* 39: 73-79.
- Hashimoto T, Shoji T, Mihara T, Oguri H, Tamaki K, Suzuki Ki, Yamada Y. 1998b. Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana* putrescine *N*-methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 37: 25-37.
- Hashimoto T, Yukimune Y, Yamada Y. 1989a. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. I. Biochemical studies. *Planta* 178: 123-130.
- Hashimoto T, Yukimune Y, Yamada Y. 1989b. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. II. Incorporation of labeled precursors. *Planta* 178: 131-137.
- Heim WG, Jelesko JG. 2004. Association of diamine oxidase and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase in *Nicotiana tabacum* extracts. *Plant Molecular Biology* 56: 299-308.
- Hendricks CL, Ross JR, Pichersky E, Noel JP, Zhou ZS. 2004. An enzyme-coupled colorimetric assay for *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Analytical Biochemistry* 326: 100-105.

- Hibasami H, Hoffman JL, Pegg AE. 1980. Decarboxylated *S*-Adenosylmethionine in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 255: 6675-6678.
- Hibi N, Fujita T, Hatano M, Hashimoto T, Yamada Y. 1992. Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: *n*-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both in vitro and in vivo. *Plant Physiology* 100: 826-835.
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Yamada Y. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735.
- Hilgers MT, Ludwig ML. 2001. Crystal structure of the quorum-sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site. *PNAS* 98: 11169-11174.
- Hoffman JL. 1986. Chromatographic Analysis of the Chiral and Covalent Instability of *S*-Adenosyl-L-Methionine. *Biochemistry* 25: 4444-4449.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuche BA, De Castro E, Lachaize C, Langendijk-Genevaux PS, Sigrist CJA. 2008. The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Research* 36: D245-D249.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJA. 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Research* 34: D227-D230.
- Ikeguchi Y, Bewley MC, Pegg AE. 2006. Aminopropyltransferases: Function, structure and genetics. *Journal of Biochemistry* 139: 1-9.
- Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology* 267: 727-748.
- Joshi CP, Chiang VL. 1998. Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 37: 663-674.
- Kai GY, Zhang Y, Chen JF, Li L, Yan XM, Zhang R, Liao P, Lu X, Wang W, Zhou GY. 2009. Molecular characterization and expression analysis of two distinct putrescine *N*-methyltransferases from roots of *Anisodus acutangulus*. *Physiologia Plantarum* 135: 121-129.
- Kalinin Y, Kmetko J, Bartnik A, Stewart A, Gillilan R, Lobkovsky E, Thorne R. 2005. A new sample mounting technique for room-temperature macromolecular crystallography. *Journal of Applied Crystallography* 38: 333-339.
- Katoh A, Shoji T, Hashimoto T. 2007. Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant and Cell Physiology* 48: 550-554.
- Keiner R, Dräger B. 2000. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science* 150: 171-179.
- Kim DJ, Kim HS, Lee SJ, Suh SW. 2009. Crystal structure of *Thermotoga maritima* SPOUT superfamily RNA methyltransferase Tm1570 in complex with *S*-adenosyl-L-methionine. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 74: 245-249.
- Knoop V, Müller K. 2006. Gene und Stammbäume. Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München.

- Korolev S, Ikeguchi Y, Skarina T, Beasley S, Arrowsmith C, Edwards A, Joachimiak A, Pegg AE, Savchenko A. 2002. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature Structural Biology* 9: 27-31.
- Kozbial PZ, Mushegian AR. 2005. Natural history of *S*-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC structural biology* 5: 1-26.
- Kurowski MA, Sasin JM, Feder M, Debski J, Bujnicki JM. 2003. Characterization of the cofactor-binding site in the SPOUT-fold methyltransferases by computational docking of *S*-adenosylmethionine to three crystal structures. *BMC Bioinformatics* 4: 9
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of A Protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lätsch L. 2009. Heterolog synthetisierte *Datura stramonium* Putrescin *N*-Methyltransferase: Abspaltung des His-Tags mit HRV-3C-Protease. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26: 283-291.
- Liebisch HW, Bernasch H, Schuette HR. 1973. Biosynthesis of tropane alkaloids. 12. Biosynthesis of cochlearine. *Zeitschrift für Chemie* 13: 372-373.
- Liu HX, Zhang RS, Yao XJ, Liu MC, Hu ZD, Fan BT. 2004. Prediction of the isoelectric point of an amino acid based on GA-PLS and SVMs. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 44: 161-167.
- Liu T, Zhu P, Cheng KD, Meng C, Zhu HX. 2005. Molecular cloning and expression of putrescine *N*-methyltransferase from the hairy roots of *Anisodus tanguticus*. *Planta Medica* 71: 987-989.
- Lu PK, Tsai JY, Chien HY, Huang HM, Chu CH, Sun YJ. 2007. Crystal structure of *Helicobacter pylori* spermidine synthase: A Rossmann-like fold with a distinct active site. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 67: 743-754.
- MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher WE, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* 102: 3586-3616.

- Malone T, Blumenthal RM, Cheng X. 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *Journal of Molecular Biology* 253: 618-632.
- Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF. 1995. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B Biomedical Applications* 666: 329-335.
- Martin JL, McMillan FM. 2002. SAM (dependent) I AM: the *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 783-793.
- McLauchlan WR, Mckee RA, Evans DM. 1993. The purification and immunocharacterisation of *N*-methylputrescine oxidase from transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* L. cv SC58. *Planta* 191: 440-445.
- Miernyk JA, Thelen JJ. 2008. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant Journal* 53: 597-609.
- Minguet EG, Vera-Sirera F, Marina A, Carbonell J, Blazquez MA. 2008. Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2119-2128.
- Miyama M, Shimizu H, Sugiyama M, Hanagata N. 2006. Sequencing and analysis of 14,842 expressed sequence tags of burma mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Science* 171: 234-241.
- Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M, Tamaki E. 1971. Phytochemical studies on tobacco alkaloids. XIV. Occurrence and properties of putrescine *N*-methyltransferase in tobacco roots. *Plant and Cell Physiology* 12: 633-640.
- Moffatt BA, Weretilnyk EA. 2001. Sustaining *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiologia Plantarum* 113: 435-442.
- Murashige T, Skoog F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nash RJ, Watson AA. 1995. Inhibition of glycosidases by Lepidoptera; roles in the insects and leads to novel compounds? *Chemoecology* 5/6: 167.
- Nash RJ, Rothschild M, Porter EA, Watson AA, Waigh RD, Waterman PG. 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropos*). *Phytochemistry* 34: 1281-1283.
- Ober D. 2005. Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* 10: 444-449.
- Olmstead RG, Palmer JD. 1992. A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 346-360.
- Orr GR, Danz DW, Pontoni G, Prabhakaran PC, Gould SJ, Coward JK. 1988. Synthesis of chirally deuteriated (*S*-adenosyl-*S*-methylsulfonio)propylamines and spermidines.

- Elucidation of the stereochemical course of putrescine aminopropyltransferase (spermidine synthase). *Journal of the American Chemical Society* 110: 5791-5799.
- Paape T, Igic B, Smith SD, Olmstead R, Bohs L, Kohn JR. 2008. A 15-Myr-old genetic bottleneck. *Molecular Biology and Evolution* 25: 655-663.
- Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcazar R, Blazquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF. 2002. A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2539-2551.
- Pegg AE, Poso H, Shuttleworth K, Bennett RA. 1982. Effect of Inhibition of Polyamine Synthesis on the Content of Decarboxylated *S*-Adenosylmethionine. *Biochemical Journal* 202: 519-526.
- Pei D, Zhu J. 2004. Mechanism of action of *S*-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 492-497.
- Pellegrini E, Field MJ. 2002. A generalized-born solvation model for macromolecular hybrid-potential calculations. *Journal of Physical Chemistry A* 106: 1316-1326.
- Pichersky E, Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5: 439-445.
- Pistocchi R, Keller F, Bagni N, Matile P. 1988. Transport and Subcellular Localization of Polyamines in Carrot Protoplasts and Vacuoles. *Plant Physiology* 87: 514-518.
- Raina A, Hyvonen T, Eloranta T, Voutilainen M, Samejima K, Yamanoha B. 1984. Polyamine Synthesis in Mammalian Tissues - Isolation and Characterization of Spermidine Synthase from Bovine Brain. *Biochemical Journal* 219: 991-1000.
- Reimann A, Nurhayati N, Backenkoehler A, Ober D. 2004. Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* 16: 2772-2784.
- Reinhardt N. 2008. Vergleichende Untersuchung der Spermidinsynthese aus *Cochlearia officinalis* L. mit der Spermidinsynthese 1 aus *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. und der Putrescin *N*-methyltransferase aus *Datura stramonium* L. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. 2007. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11: 685-703.
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. 1983. Reassessment of Ellman's Reagent. *Methods in Enzymology* 91: 49-60.
- Riechers DE, Timko MP. 1999. Structure and expression of the gene family encoding putrescine *N*-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: New clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Molecular Biology* 41: 387-401.
- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method - A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

- Samejima K, Yamanoha B. 1982. Purification of Spermidine Synthase from Rat Ventral Prostate by Affinity-Chromatography on Immobilized *S*-Adenosyl(5')-3-Thiopropylamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 216: 213-222.
- Schimming T, Tofern B, Mann P, Richter A, Jenett-Siems K, Dräger B, Asano N, Gupta MP, Correa MD, Eich E. 1998. Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae. 6. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* 49: 1989-1995.
- Schluckebier G, O'Gara M, Saenger W, Cheng X. 1995. Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 247: 16-20.
- Schneider MJ, Brendze S, Montali JA. 1995. Alkaloids of *Picea breweriana*. *Phytochemistry* 39: 1387-1390.
- Scholl Y, Höke D, Dräger B. 2001. Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* 58: 883-889.
- Schubert HL, Phillips JD, Hill CP. 2003a. Structures along the catalytic pathway of PrmC/HemK, an N^5 -glutamine AdoMet-dependent methyltransferase. *Biochemistry* 42: 5592-5599.
- Schubert HL, Blumenthal RM, Cheng X. 2003b. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 329-335.
- Seiler N. 1971. Identification and Quantitation of Amines by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography* 63: 97-112.
- Shirahata A, Morohohi T, Fukai M, Akatsu S, Samejima K. 1991. Putrescine or spermidine binding site of aminopropyltransferases and competitive inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 41: 205-212.
- Shonle I, Bergelson J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778-788.
- Sindhu RK, Cohen SS. 1984. Propylamine Transferases in Chinese Cabbage Leaves. *Plant Physiology* 74: 645-649.
- Sippl MJ. 1990. Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force - An Approach to the Knowledge-Based Prediction of Local Structures in Globular-Proteins. *Journal of Molecular Biology* 213: 859-883.
- Sippl MJ. 1993. Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 7: 473-501.
- Smith MA, Davies PJ. 1985. Separation and Quantitation of Polyamines in Plant Tissue by High Performance Liquid Chromatography of Their Dansyl Derivatives. *Plant Physiology* 78: 89-91.
- Stenzel O, Teuber M, Dräger B. 2006. Putrescine *N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* 223: 200-212.

- Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T. 1999. Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant and Cell Physiology* 40: 289-297.
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang P, Huala E. 2008. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* 36: D1009-D1014.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tepfer D, Goldmann A, Pamboukdjian N, Maille M, Lepingle A, Chevalier D, Denarie J, Rosenberg C. 1988. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal of Bacteriology* 170: 1153-1161.
- Teuber M. 2008. Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen an Putrescin-*N*-Methyltransferasen zur Charakterisierung und Differenzierung. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Teuber M, Azemi ME, Namjoyan F, Meier AC, Wodak A, Brandt W, Draeger B. 2007. Putrescine *N*-methyltransferases - a structure-function analysis. *Plant Molecular Biology* 63: 787-801.
- Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. 2003. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52: 609-623.
- Voelckel C, Krugel T, Gase K, Heidrich N, Van Dam NM, Winz R, Baldwin IT. 2001. Anti-sense expression of putrescine *N*-methyltransferase confirms defensive role of nicotine in *Nicotiana sylvestris* against *Manduca sexta*. *Chemoecology* 11: 121-126.
- Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. 1995. Ligplot - A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions. *Protein Engineering* 8: 127-134.
- Walter TS, Diprose J, Brown J, Pickford M, Owens RJ, Stuart DI, Harlos K. 2003. A procedure for setting up high-throughput nanolitre crystallization experiments. I. Protocol design and validation. *Journal of Applied Crystallography* 36: 308-314.
- Walton NJ, Peerless A-CJ, Robins RJ, Rhodes M-JC, Boswell HD, Robins DJ. 1994. Purification and properties of putrescine *N*-methyltransferase from transformed roots of *Datura stramonium* L. *Planta* 193: 9-15.
- Walton NJ, Robins RJ, Peerless A-CJ. 1990. Enzymes of *N*-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*. *Planta* 182: 136-141.
- Waugh DS. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* 23: 316-320.
- Wu H, Min JR, Ikeguchi Y, Zeng H, Dong AP, Loppnau P, Pegg AE, Plotnikov AN. 2007. Structure and mechanism of spermidine synthases. *Biochemistry* 46: 8331-8339.
- Wu H, Min JR, Zeng H, McCloskey DE, Ikeguchi Y, Loppnau P, Michael AJ, Pegg AE, Plotnikov AN. 2008. Crystal structure of human spermine synthase - Implications of

- substrate binding and catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 283: 16135-16146.
- Wu Q, Gee CL, Lin F, Tyndall JD, Martin JL, Grunewald GL, McLeish MJ. 2005. Structural, Mutagenic, and Kinetic Analysis of the Binding of Substrates and Inhibitors of Human Phenylethanolamine *N*-Methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 7243-7252.
- Yoon SO, Lee YS, Lee SH, Cho YD. 2000. Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1475: 17-26.
- Zappia V, Cacciapuoti G, Pontoni G, Oliva A. 1980. Mechanism of propylamine-transfer reactions. Kinetic and inhibition studies on spermidine synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 255: 7276-7280.
- Zhang JZ. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 292-298.
- Zhu JG, Dizin E, Hu XB, Wavreille AS, Park J, Pei DH. 2003. *S*-ribosylhomocysteinase (LuxS) is a mononuclear iron protein. *Biochemistry* 42: 4717-4726.
- Zimmer A, Lang D, Richardt S, Frank W, Reski R, Rensing SA. 2007. Dating the early evolution of plants: detection and molecular clock analyses of orthologs. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 393-402.
- Zubieta C, He XZ, Dixon RA, Noel JP. 2001. Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. *Nature Structural Biology* 8: 271-279.
- Zubieta C, Kota P, Ferrer J-L, Dixon RA, Noel JP. 2002. Structural Basis for the Modulation of Lignin Monomer Methylation by Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-*O*-Methyltransferase. *Plant Cell* 14: 1265-1277.
- Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, Noel JP. 2003. Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell* 15: 1704-1716.
- Zuckermandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins*. Bryson V, Vogel HJ (Eds.), Academic Press, New York, pp. 97-166.

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Biastoff S, Teuber M, Zhou ZS, Dräger B. 2006. Colorimetric Activity Measurement of a Recombinant Putrescine *N*-Methyltransferase from *Datura stramonium*. *Planta Medica* 72: 1136-1141.

Biastoff S, Dräger B. 2007. Calystegines. In: Cordell GA (Ed.), *The Alkaloids* vol. 64, Academic Press, New York, pp. 49-102.

Biastoff S, Brandt W, Dräger B. 2009. Putrescine *N*-methyltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry* 70: 1708-1718.

Biastoff S, Reinhardt N, Reva V, Brandt W, Dräger B. 2009. Evolution of putrescine *N*-methyltransferase from spermidine synthase demanded alterations in substrate binding. *FEBS Letters* 583: 3367-3374.

Vorträge

Biastoff S, Brandt W, Stubbs MT, Dräger B. 2006. Putrescine *N*-methyltransferase: crystallization experiments and site directed mutagenesis. DFG Priority Program 1152 “Evolution of Metabolic Diversity” 5th Colloquium, Halle (Saale).

Biastoff S, Dräger B. 2008. Evolution of structure and function of putrescine *N*-methyltransferases. DFG Priority Program 1152 “Evolution of Metabolic Diversity” 7th Colloquium, Halle (Saale).

Biastoff S, Brandt W, Dräger B. 2009. Putrescine *N*-methyltransferase – The start for alkaloids. DFG Priority Program 1152 “Evolution of Metabolic Diversity” Final Colloquium, Freising.

Biastoff S, Brandt W, Dräger B. 2009. Putrescine *N*-methyltransferase – The start for alkaloids. Botanikertagung – Plants for the Future, Leipzig.

Poster

Biastoff S, Dräger B. 2007. Evolution of structure and function of putrescine *N*-methyltransferases. DFG Priority Program 1152 “Evolution of Metabolic Diversity” 6th Colloquium, Halle (Saale).

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Juli 2005 bis Juni 2009 am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Birgit Dräger. Ihr danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die rege Anteilnahme am Fortschritt der Arbeit und die damit verbundene stetige Diskussionsbereitschaft. Die fachliche und persönliche Unterstützung, die ich während der gesamten Zeit in ihrer Arbeitsgruppe erhielt, möchte ich besonders würdigen.

Herr Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Brandt, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, trug durch die kontinuierliche Zusammenarbeit bei der Homologiemodellierung und seine stete Diskussionsbereitschaft viel zum Gelingen der Arbeit bei. Herr Prof. Dr. Milton Stubbs und seine Arbeitsgruppe, Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität, ermöglichten die proteinkristallographischen Arbeiten.

Gedankt sei den Organisatoren und Teilnehmern des DFG-Schwerpunktprogramms 1152 „Evolution metabolischer Diversität“ für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und den regen Gedankenaustausch innerhalb der jährlichen Tagungen.

Für seine Mithilfe bei der Proteinchromatographie möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Veaceslav Reva, Universität Chisinau, Moldawien, bedanken. Frau Dr. A. Schierhorn vom Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität danke ich für alle massenspektrometrischen Analysen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Pharm. Nicole Reinhardt und Frau Dipl.-Pharm. Lisanne Lätsch sowie Frau Kathrin Klimpel und Frau Ulrike Mönch, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ebenso danke ich den Mitgliedern der AG Biogene Arzneistoffe, Dr. Yvonne Sichhart, die auch das Lektorat dieser Arbeit übernahm, Dr. Elke Aehle, Dr. Anna-Carolin Freydank, Dr. Ute Richter, Anne Junker, Ulrike Müller und Nebojsa Jockovic für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Pharmazeutischen Instituts am Hohen Weg für die kollegiale Zusammenarbeit, namentlich an Dr. Bettina Rahfeld, Ursula Ködel, Brigitte Marx, Beate Schöne, Dorothea Watzka, Anja Wodak und Dr. Peter Lindemann.

Gedankt sei für die freundschaftliche Zusammenarbeit auch der AG Biophysik, unseren mehrjährigen „Mitbewohnern“ am Hohen Weg, mit Prof. Dr. Jochen Balbach, Dr. Christian Löw, Mohanraj Gopalswamy, Caroline Haupt, Michael Kovermann, Rolf Sachs und Ulrich Weininger.

Die vorliegende Arbeit ist nicht zuletzt auch Ergebnis einer langjährigen, intensiven Auseinandersetzung mit dem Fach Pharmazeutische Biologie. Daher sei schließlich den Personen gedankt, die durch ihre Lehrtätigkeit an der Philipps-Universität Marburg den Weg bereitet haben, dass es zu meiner wissenschaftlichen Heimat wurde: Prof. Dr. Hanns Häberlein, Prof. Dr. Ulrich Matern und Prof. Dr. Maike Petersen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Biographische Angaben

10. Dezember 1977	Geboren in Schmalkalden/Thüringen
1996	Abitur
1996-1997	Zivildienst
1998-2002	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg
2002-2003	Praktisches Jahr, Rosen-Apotheke Marburg und Diplomand am Fachbereich Pharmazie der Philipps- Universität Marburg
2003	Approbation als Apotheker
2003-2005	Apotheker, St. Georg Klinikum Eisenach gGmbH
2004	Diplom-Pharmazeut, „Biochemische Charakterisierung der heterolog exprimierten Tyrosin Aminotransferase aus <i>Coleus blumei</i> Benth.“
2005-2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms 1152 „Evolution metabolischer Diversität“
seit 2009	Apotheker, Klinikum Dorothea Christiane Erxleben Quedlinburg GmbH