

Struktur und Mechanismus der Sanguinarin-Reduktase,
ein Entgiftungsenzym aus *Eschscholzia californica*

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

Dipl.-Pharm. Matthias Vogel
geb. am 24.04.1977 in Magdeburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Roos
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß
3. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Melzig

verteidigt am 14.06.2011

Halle (Saale), 21.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Biologische Funktionen pflanzlicher Sekundärstoffe	5
1.2 Entgiftung pflanzlicher und mikrobieller Toxine	6
1.2.1 Kompartimentierung	6
1.2.2 Metabolisierung	7
1.3 Toxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide	10
1.4 Bisherige Erkenntnisse zur Sanguinarin-Reduktase	15
1.5 Zielstellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material und Methoden auf DNA-Ebene	19
2.1.1 Klonierung und heterologe Expression	19
2.1.1.1 Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)	19
2.1.1.2 Plasmide	19
2.1.1.3 Kultivierung der Bakterien	19
2.1.1.4 Herstellung kompetenter Zellen	20
2.1.1.5 Transformation von <i>E. coli</i>	20
2.1.1.5.1 Elektroporation	21
2.1.1.5.2 Hitzeschock	21
2.1.1.6 Heterologe Expression in Bakterien	21
2.1.1.6.1 Produktion im Erlenmeyerkolben	21
2.1.1.6.2 Produktion im Fermenter	22
2.1.1.7 Klonierung des Sanguinarin-Reduktase-Gens	23
2.1.1.8 Klonierung des Gens At5g02240 (Protein 1XQ6)	24
2.1.2 Präparation von DNA	24
2.1.2.1 Isolierung genomischer DNA	24
2.1.2.2 Isolierung von Plasmiden	24
2.1.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	25
2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	25

2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese	26
2.1.5 DNA-Sequenzierung	26
2.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.1.7 Oligonukleotide	27
2.1.8 cDNA-Bank-Screening	29
2.1.9 Mutagenese	30
2.2 Material und Methoden auf Proteinebene	32
2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.2.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.2.1.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode	32
2.2.2 Antikörper	32
2.2.2.1 Gewinnung spezifischer Antikörper	32
2.2.2.2 Primäre Antikörper	33
2.2.2.3 Sekundäre Antikörper	33
2.2.3 Chemilumineszenz-Detektion	34
2.2.4 Aufschluss des Bakterienpellets	34
2.2.5 FPLC-basierte Reinigung	34
2.2.6 SDS-PAGE	35
2.2.7 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	37
2.2.8 Western-Blot-Analyse	37
2.2.9 Teilsequenzierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins	40
2.3 Enzymassay	40
2.4 Hemmung durch Iodacetamid	41
2.5 Computer-Modellierung und 3D-Homologie-Modell	41
3. Ergebnisse	43
3.1 Das Gen und das Protein der Sanguinarin-Reduktase	43
3.1.1 Strukturaufklärung	43
3.1.2 Die Introns	45
3.1.3 Klonierung und heterologe Expression	45

3.2 Enzymatische Parameter der Sanguinarin-Reduktase und der Einfluss der Produkthemmung	47
3.3 Homologie-Modell der Raumstruktur der Sanguinarin-Reduktase	54
3.3.1 Pflanzliche Homologe	54
3.3.2 Homologe aus Bakterien und Mensch	57
3.4 Gerichtete Mutagenese im Sanguinarin-Reduktase-Protein	60
3.5 Immunologische Unterscheidung zwischen der Sanguinarin-Reduktase und dem Homologon 1XQ6	67
4. Diskussion	69
4.1 Sanguinarin-Reduktase und die Entgiftung von Benzophenanthridinen	69
4.2 Reaktionsmechanismus der Sanguinarin-Reduktase	70
4.3 Homologe der Sanguinarin-Reduktase	73
4.4 Evolution der Sanguinarin-Reduktase	73
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Abkürzungsverzeichnis	92
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	95
Anhang	97

1. Einleitung

1.1 Biologische Funktionen pflanzlicher Sekundärstoffe

Die Evolution hat eine Vielzahl von pflanzlichen Sekundärstoffen hervorgebracht. Der Aufwand für die Schaffung neuer Enzyme, der Verbrauch von Energie und Precursoren für die Produktion und Lagerung dieser Stoffe kann einen erheblichen Nachteil für die Fitness der Produzentenpflanze bedeuten. Dieser wird offenbar häufig durch Vorteile im Wettstreit des Lebens aufgewogen [Hadacek 2002, Wink 2003, Gniazdowska und Bogatek 2005]. Diese betreffen vor allem die Abwehr von Feinden und die Kommunikation mit anderen Organismen. So können Sekundärstoffe als Signal zwischen Pflanze und Tier z. B. zur Anlockung von Pollinatoren dienen [Teuscher 1984, Harborne 1995a, Raguso 2003, Dudareva *et al.* 2006]. Der ebenfalls zur Anlockung von Bestäubern dienende Nektar kann auch Sekundärstoffe enthalten wie z. B. in *Nicotiana attenuata*, wo durch Zusatz von Nicotin die verzehrte Nektarmenge pro Bestäuber reduziert und Nektarräuber fern gehalten werden [Kessler und Baldwin 2007]. Die Kommunikation durch Sekundärstoffe wird auch zwischen Pflanzen als Warnung vor Fraßfeinden genutzt. *Phaseolus lunatus* gibt nach Befall mit Herbivoren Duftstoffe ab, die nicht nur carnivore Arthropoden anlocken, sondern auch in Nachbarpflanzen die Sekretion von extrafloralem Nektar, welcher ebenfalls der Anlockung von carnivore Arthropoden dient, induzieren [Kost und Heil 2006]. Die Wirkung flüchtiger Signalstoffe wird häufig durch Luftverschmutzung beeinflusst oder stimuliert [Blande *et al.* 2010]. Zu den wichtigsten Selektionsfaktoren zählt der Nutzen von Sekundärstoffen zur Abwehr von Herbivoren und Mikroorganismen [Harborne 1995b,d,e, Harborne 1999, Karioti *et al.* 2002, Wink 2003, McNally *et al.* 2003, Pedras *et al.* 2008, Iriti und Faoro 2009, Lankau und Kliebenstein 2009, Bhattacharya *et al.* 2010]. Häufig führt der Kontakt mit diesen erst zur Bildung oder vermehrten Produktion von Sekundärstoffen, die dann Phytoalexine genannt werden. Sekundärstoffe sind oft wirksame Toxine, welche essentielle Enzyme, DNA-Bereiche oder Membranstrukturen angreifen und damit metabolische oder Entwicklungsprozesse hemmen. Damit können nicht nur Zellen potentieller Angreifer oder Konkurrenten, sondern auch analoge Strukturen in der produzierende Pflanze geschädigt. Um Selektionsnachteile zu vermeiden, ist es für die produzierende Pflanze notwendig, sich vor ihren eigenen Toxinen zu schützen. In der Evolution haben sich unterschiedliche Entgiftungsmechanismen entwickelt, einige auch in

Mikroorganismen und Herbivoren, um die Abwehr von Pflanzen zu umgehen und neue Nahrungsquellen zu erschließen [Sirikantaramas *et al.* 2007]. Diese Mechanismen beinhalten im Prinzip erstens die Kompartimentierung und zweitens die Metabolisierung der Toxine.

1.2 Entgiftung pflanzlicher und mikrobieller Toxine

1.2.1 Kompartimentierung

Die räumliche Trennung des Toxins vom lebenden Cytoplasma ist ein eng mit der Sekundärstoff-Bildung verbundenes Phänomen. Dabei kommt es entweder zur intrazellulären Kompartimentierung oder zur Exkretion des Toxins. Das Organell, welches am häufigsten zur Speicherung pflanzlicher Sekundärstoffe dient, ist die Vakuole. Hier werden einige hydrophile Verbindungen aus dem Bereich der Flavonoide, Saponine, cyanogene Glycoside und Alkaloide akkumuliert [Roos und Luckner 1986]. Vakuolär gespeicherte Alkaloide bilden zu diesem Zweck Komplexe mit Pflanzensäuren oder akkumulieren mittels der Ionenfalle, d. h. sie werden in der Vakuole zu nicht membranpermeablen Kationen protoniert [Matile 1976, Blom *et al.* 1991, Otani *et al.* 2005, Yazaki 2006, Shitan und Yazaki 2007, Klein und Roos 2009]. Beispiele dafür sind Ajmalicin in *Catharanthus roseus*, Berberin in *Coptis japonica* oder Chelidonin in *Chelidonium majus*.

Während Benzophenanthridin-Alkaloide im Schöllkraut als Chelidonsäure-Komplexe akkumulieren [Hauser und Wink 1990], liegen die meisten Opium-Alkaloide des Schlafmohns als Salze der Mekonsäure vor [Teuscher 1997]. Die Speicherung inaktiver Vorstufen toxischer Verbindungen ist eine weitere Möglichkeit wie Pflanzen sich vor ihren Toxinen schützen. Die in der Vakuole gespeicherten cyanogene Glycoside, Senfölglycoside oder Glycoside der o-Cumarsäure werden erst nach Verletzung des Tonoplasten durch cytosolische Glucosidasen in Verbindungen höherer Toxizität wie Blausäure, Isothiocyanate, Nitrile, Thiocyanate oder Cumarin umgewandelt [Oba *et al.* 1981, Morrissey und Osbourn 1999].

Die extrazelluläre Speicherung von Phytoalexinen benutzt meist aktive Transportmechanismen. Zellkulturen von *Taxus chinensis* schützen sich vor dem durch sie produzierten Mitosehemmstoff Paclitaxel durch dessen Exkretion [Wang *et al.* 2001], wobei der Mechanismus des Transports zur Zeit noch unbekannt ist [Vongpaseuth und Roberts 2007].

Nicotiana plumbaginifolia schützt sich vor Pilzbefall mit dem Terpenoid-Alkaloid Sclareolid, welches aktiv durch die ABC-Transporter der Plasmamembran, NpABC1 und SpTUR2, sezerniert wird [Jasinski *et al.* 2001, van den Brûle *et al.* 2002]. Das Ausschleusen von Toxinen durch MDR-Transportsysteme ist ein wichtiger Resistenzmechanismus in Bakterien. Hydrophobe Kationen, wie z. B. die Protoberberin-Alkaloide Berberin und Palmatin sind bevorzugte Substrate des NorA-MDR-Transporters von *Staphylococcus aureus* [Hsieh *et al.* 1998]. Durch gleichzeitige Produktion von 5'-Methoxyhydnocarpin, einem Hemmstoff dieses Transporters, umgehen *Berberis*-Arten den Schutz der Bakterien und potenzieren damit die toxische Wirkung von Berberin [Stermitz *et al.* 2000]. Auch Herbivoren nutzen für die Entgiftung pflanzlicher Sekundärstoffe Efflux-Transporter im Verdauungstrakt [Sorensen und Dearing 2006]. Auch die MATE (multidrug and toxic compound extrusion) Transport-Proteine, die in Eukarya, Archaea und Eubacteria vorkommen, sind häufig an der Entgiftung von Sekundärstoffen beteiligt. MATE-Transporter sind die am meisten konservierte und am weitesten verbreitete Transporter-Familie, aufgrund dessen könnten sie die Vorläufer für den Transport von metabolischen Abfallprodukten und Xenobiotika sein [Moriyama *et al.* 2008]. Der Transport wird dabei durch den elektrochemischen Gradienten von H⁺ oder Na⁺ getrieben. Die Akkumulation von Berberin in der Vakuole von *Coptis japonica* erfolgt durch einen H⁺-Antiporter, dessen pH-Abhängigkeit mit MATE-Transportern übereinstimmt [Omote *et al.* 2006]. In *Arabidopsis* transportiert der MATE-Transporter DTX1 in der Plasmamembran exogene toxische Verbindungen wie Tetraethylammonium (TEA) und Berberin. Alkaloide werden häufig in Milchsäfte sezerniert [Hauser und Wink 1990, Decker *et al.* 2000]. Durch die Speicherung von Toxinen in Milchsäften stehen diese weiterhin zur Abwehr bereit, ohne die produzierende Pflanze zu schädigen. Dies gilt u. a. für Chelidonin, Coptisin oder Protopin im Milchsaft von *Chelidonium majus* oder auch für Morphin, Codein oder Thebain im Milchsaft von *Papaver somniferum*. In *Catharanthus roseus* findet im Milchsaft auch ein Teil der Biosynthese der Indol-Alkaloide statt [Hagel *et al.* 2008]

1.2.2 Metabolisierung

Für relativ wenige pflanzliche Sekundärstoffe ist eine metabolische Entgiftungsreaktion in der produzierenden Pflanze bekannt, häufiger wurden solche Mechanismen in herbivoren Insekten oder in Pilzen untersucht. In *Coffea arabica* und *Camellia sinensis* wird Coffein über eine

Demethylierungsreaktion zu Theophyllin umgesetzt, welches weiter zu Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut werden kann [Ashihara *et al.* 1996, 1997]. Auch die aus cyanogenen Glycosiden gebildete Blausäure kann durch Metabolisierung entgiftet werden. Die beiden Enzyme Rhodanase und β -Cyanoalaninsynthase beschreiten dafür unterschiedliche Wege, allerdings kommen sie auch in Pflanzen vor, die keine cyanogenen Glycoside bilden [Miller und Conn 1980]. Die Möglichkeit Blausäure zu entgiften, ohne selbst cyanogene Glycoside zu produzieren, könnte Pflanzen vor den Toxinen benachbarter Pflanzen schützen. Da die Produktion cyanogener Glycoside ohne geeignete Entgiftungsmöglichkeiten nicht sinnvoll ist, wäre es auch denkbar, dass die Rhodanase und β -Cyanoalaninsynthase nur den Weg bereiten später selbst cyanogene Glycoside zu bilden. Eine Entgiftung von Benzophenanthridinen, welche fast ausschließlich in Papaveraceen und einigen Ranunculaceen vorkommen [Zenk 1994, Ziegler und Facchini 2008, Klein und Roos 2009], kann durch die Sanguinarin-Reduktase erfolgen [Weiß *et al.* 2006]. Dieses Enzym, welches in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* aufgefunden wurde, katalysiert die Reduktion dieser Alkaloide zu weniger toxischen Dihydrobenzophenanthridinen. Die Sanguinarin-Reduktase und das "Recycling" des Sanguinarins sind Gegenstand dieser Arbeit.

Die häufig aufgefundene Fähigkeit von Pilzen zur Entgiftung von Phytoalexinen ist wahrscheinlich eine Antwortreaktion auf die Pathogenabwehr der Zielpflanzen. So wurden in Phytopathogenen Pilzen Enzyme gefunden, die mit hoher Spezifität Phytoalexine aus ihren Nahrungspflanzen bzw. Ökosystemen umwandeln. Hierzu gehören die Avenacinase (Umwandlung des Avenacins aus Hafer), die Tomatinase (Umwandlung des Tomatins aus Tomate) oder die α -Chaconinase (Umwandlung des α -Chaconins aus Kartoffel), welche die Saponine durch Hydrolyse der Zuckerkette entgiften. Aber auch andere Mechanismen wie Addition von Wasser durch die Kieviton-Hydratase (Umwandlung des Kieviton aus *Phaseolus vulgaris*), Demethylierungs- oder Hydroxylierungsreaktionen werden genutzt. (Zusammenstellung bei Weiß 2004.)

Ein aktuelles Beispiel aus dem Bereich herbivorer Insekten ist *Ostrinia furnacalis*, eine Schmetterlingsart, deren Raupen Schädlinge in Maisfeldern sind. Die vom Mais gebildeten, für viele Herbivoren toxischen cyclischen Hydroxamsäuren werden enzymatisch im

Verdauungstrakt der Larven gespalten. Da hierfür UDP-Glucose als Cofaktor nötig ist, scheinen eine UDP-Glucosyltransferase oder andere UDP-Glucose-abhängige Enzyme beteiligt zu sein [Kojimaa *et al.* 2010].

Ein auf molekularer Ebene gut untersuchtes Beispiel für den Umgang mit dem eigenen Toxin ist die reduktive Entgiftung von Cercosporin [Daub *et al.* 1992]. Das von *Cercospora*-Arten produzierte lipophile Polyketid Cercosporin wirkt als Photosensitizer, indem es nach Lichtaktivierung mit molekularem Sauerstoff reagiert. Von den dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ist vor allem der Singulett-Sauerstoff für die toxischen Wirkungen verantwortlich [Daub und Ehrenshaft 2000]. Dieser schädigt die Plasmamembran durch Lipidperoxidation [Cavallini *et al.* 1979]. Die toxischen Wirkungen des Cercosporins konnten bei Mikroorganismen, Pflanzenzellen und menschlichen Tumorzellen nachgewiesen werden [Daub 1982, Daub 1987, Vandenbogaerde *et al.* 1998]. Cercosporin-produzierende und-resistente *Cercospora*-Arten schützen sich durch Reduktion des zunächst gebildeten Cercosporins; das gebildete Dihydrocercosporin produziert deutlich weniger Singulett-Sauerstoff [Daub *et al.* 2000]. Die plasmamembranschädigende Wirkung des Cercosporins wird von den resistenten *Cercospora*-Arten genutzt, um an die Nährstoffe ihrer Wirtspflanzen zu gelangen. Dazu wird aus den Hyphen Dihydrocercosporin freigesetzt, welches spontan zu Cercosporin oxidiert und durch Lichtaktivierung zu oben genannten Effekten führt [Daub *et al.* 1992, Daub *et al.* 2000]. Da auch Dihydrocercosporin Singulett-Sauerstoff bildet, sind für die volle Resistenz gegen Cercosporin weitere Abwehrmechanismen erforderlich, an denen Pyridoxin beteiligt sein könnte [Bilski *et al.* 2000]. Die Suche nach Genen, welche sich in resistenten und sensitiven *Cercospora*-Stämmen unterscheiden [Taylor *et al.* 2006], führte über den Transkriptionsfaktor CRG1, welcher die Resistenz reguliert [Chung *et al.* 1999, 2003, Herrero *et al.* 2007], zum ABC-Transporter ATR1, der als Effluxpumpe für Cercosporin wirkt [Amnuaykanjanasin und Daub 2009] und damit ebenfalls an der Entgiftung des Cercosporins beteiligt ist.

Eine Verknüpfung von Entgiftungsreaktionen mit Kompartimentierungs-Mechanismen stellt die Konjugation mit Glutathion dar [Coleman *et al.* 1997]. Diese wird durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert [Marrs 1996]. Für mehrere Sekundärstoffe, z. B. das Isoflavonoid Medicarpin, ist bekannt, dass die durch die Glutathion-S-Transferase gebildeten Glutathion-Konjugate nicht nur weniger toxisch sind, sondern auch durch Glutathion-Transportsysteme, hier eine Glutathion-S-Konjugat-Pumpe, in die Vakuole transportiert werden [Li *et al.* 1997].

Bei Untersuchungen zur endogenen Funktion von Glutathion-S-Transferasen zeigte sich, dass diese auch als Transporter für Sekundärstoffe dienen können [Dixon *et al.* 2010]. In *Petunia hybrida* ist AN9, eine Glutathion-S-Transferase, als Flavonoid-bindendes Protein am Transport von Anthocyaninen in die Vakuole beteiligt. Allerdings war die Bildung eines Anthocyanin-Glutathion-Konjugates nicht nachweisbar [Mueller *et al.* 2000].

1.3 Toxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus der Entgiftung von Benzophenanthridinen. Diese Alkaloide stellen außerordentlich wirksame Phytoalexine dar und haben wahrscheinlich die stärkste antimikrobielle Aktivität unter den bekannten pflanzlichen Sekundärstoffen [Slaninova *et al.* 2001]. Sie sind gekennzeichnet durch ein planares polycyclisches Ringsystem, welches ihnen hydrophobe Eigenschaften verleiht, und eine positive Ladung am quaternären Stickstoff, weshalb sie als Kationen wirken können. Sie liegen abhängig vom pH-Wert als Iminiumion oder in der Alkanolamin-Form vor (Abb. 1-1). Dadurch ergeben sich zahlreiche Wechselwirkungen mit zellulären Strukturen:

1. Die hydrophoben Kationen der Iminium-Form (Abb. 1-1) interkalieren in doppelsträngige DNA und RNA [Maiti *et al.* 2002], bevorzugt in GC-reiche Sequenzen [Bajaj *et al.* 1990, Faddeeva und Beliaeva 1997, Schmeller *et al.* 1997]. Dadurch kommt es zu Störungen der Transkription und Replikation sowie zur Hemmung der DNA-Polymerase [Schmeller *et al.* 1997].

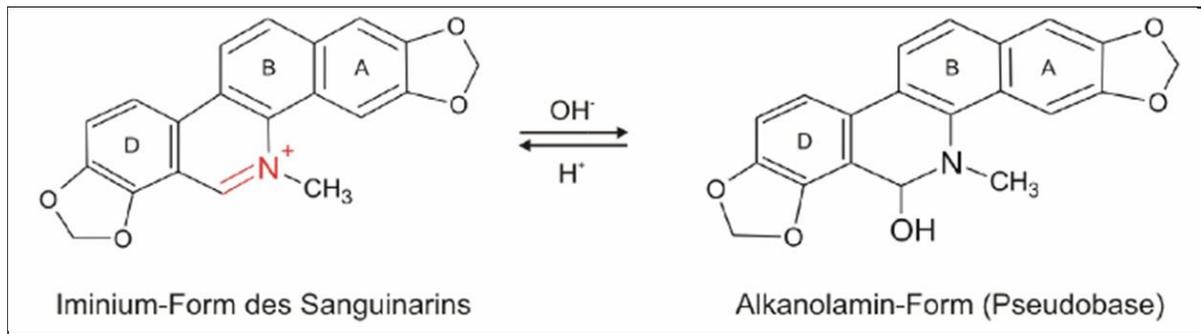


Abb. 1-1 Chemische Strukturen des Sanguinarins in der Iminium- und Alkanolamin-Form

Schema nach Bajaj *et al.* 1990

2. Benzophenanthridine weisen eine deutliche Membrantoxizität auf: Die hydrophobe, in der Membran lösliche Alkanolamin-Form wird dort aufgrund der negativ geladenen Innenseite der Membran bevorzugt in die kationische Form umgewandelt, welche sich durch diese Ladungsverteilung nach innen orientiert. In der Folge kommt es zu Störungen der Membranpermeabilität und zur Depolarisation [Ulrichová *et al.* 1984]. Benzophenanthridine wirken daher als Entkoppler der ATP-Synthese und Hemmstoffe von ATPasen [Vallejos 1973, Faddeeva und Beliaeva 1997]. Die Membrantoxizität von Sanguinarin und Chelerythrin konnte auch an isolierten Vakuolen von *Chelidonium majus* sowie *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden [Jans 1973]. Auch die Plasmamembran von Erythrocyten wird durch Sanguinarin destabilisiert [Schmeller *et al.* 1997].

3. Die positiven Ladung des quaternären Stickstoffs kann mit anionischen Zentren von Proteinen interagieren. Beispiele sind die Hemmung der Acetylcholinesterase [IC₅₀ Sang 35 µM, IC₅₀ Chel 9,4 µM Ulrichová *et al.* 1983a, IC₅₀ Sang 10,9 µM Schmeller *et al.* 1997] und der Butyrylcholinesterase [IC₅₀ Sang 24 µM, IC₅₀ Chel 14 µM Ulrichová *et al.* 1983b, IC₅₀ Sang 17,4 µM Schmeller *et al.* 1997].

4. Die Iminium-Form der Benzophenanthridine kann mit nucleophilen Gruppen, z. B. SH-Gruppen von Enzymen und anderen Proteinen, reagieren, welche dadurch gehemmt werden [Faddeeva und Beliaeva 1997]. Wie bereits erwähnt, betrifft diese Hemmung zum Beispiel ATPasen, wie die Na⁺/K⁺-ATPase aus Meerschweinchen-Myocard, welche durch Sanguinarin gehemmt wird [IC₅₀ 6-6,5 µM Seifen *et al.* 1979]. Auch die in transformierten Hefezellen exprimierte Säugetier-Na⁺/K⁺-ATPase wird durch Sanguinarinzusatz beeinflusst, was der Verlust cytosolischen Kaliums zeigt [EC₅₀ 29 µM Scheiner-Bobis 2001]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind Untersuchungen wichtig, die zeigten, dass Na⁺/K⁺-ATPasen mit Sanguinarin, aber nicht mit Dihydrosanguinarin interagieren [Janovska *et al.* 2010].

5. Antimitotische Effekte des Sanguinarins durch Hemmung der Tubulin-Polymerisation konnten bereits an Tumorzellen gezeigt werden [IC₅₀ Sang 13 µM, IC₅₀ Chel 37 µM Wolff und Knipling 1993]. Cytoskelett-ähnliche Strukturen, die für die Zellteilung nötig sind, wurden auch in Bakterien entdeckt [Bi und Lutkenhaus 1991] und stellen damit ebenfalls einen Angriffspunkt

für antimittotische Stoffe dar. Sanguinarin hemmt die Zellteilung in Bakterien durch Bindung des prokaryotischen Tubulins FtsZ, dessen GTPase Aktivität dabei gehemmt wird, und bietet somit für die Antibiotikaentwicklung einen neuen Ansatzpunkt [Beuria *et al.* 2005, Vollmer 2006].

Aufgrund der Vielfalt der molekularen Angriffspunkte überrascht es nicht, dass Benzophenanthridine eine hohe Toxizität sowohl gegen Mikroorganismen als auch Säugetierzellen besitzen.

Bakterizide Eigenschaften wurden sowohl gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien gefunden [Johnson *et al.* 1952, Vichkanova *et al.* 1969, Tolkachev und Vichkanova 1978]. Dzink und Socransky [1985] untersuchten die antimikrobielle Wirkung des Sanguinarins an oralen Bakterienstämmen (MIC 1-16 µg/ml). Untersuchungen zur Amerikanischen Faulbrut, einer Krankheit bei Bienen, zeigte eine gute antibakterielle Wirkung des Sanguinarins gegen das Bakterium *Paenibacillus larvae* [MIC 4µg/ml Flesar *et al.* 2010].

Fungizide Eigenschaften der Benzophenanthridine wurden ebenfalls untersucht [Vichkanova *et al.* 1969, Vichkanova und Adgina 1971, Tolkachev und Vichkanova 1978]. Cline und Coscia [1988] zeigten, dass Sanguinarin das Wachstum von Pflanzenpathogenen Pilzen hemmt (ED₅₀ 5-15µg/ml). Die antimikrobielle Wirkung von Sanguinarin auf mehrere orale *Candida* species konnte von Giuliana und Mitarbeitern [1999] gezeigt werden (MIC 0,81-1,95 µg/ml).

Die toxische Wirkung gegenüber zahlreichen Säugerzellkulturen bzw. Tumorzellen hat dazu geführt, dass Benzophenanthridine als Leitverbindungen zur Entwicklung von Tumorthapeutika dienen [Tang *et al.* 2003] bzw. direkt als solche genutzt werden [Kemeny-Beke *et al.* 2006, De Stefano *et al.* 2009].

Vavreckova und Mitarbeiter [1996] untersuchten die wachstumshemmende Wirkung des Sanguinarins an Keratinocyten (IC₅₀ Sang 0,2 µM). Auch an Ratten-Hepatocyten [Dvorak *et al.* 2006b, Choy *et al.* 2008] und humanen Fibroblasten [IC₅₀ Sang 1,3-1,6 µM Debiton *et al.* 2003] konnte eine Wachstumshemmung durch Sanguinarin gezeigt werden.

Die cytotoxische Wirkung mehrerer quarternärer Alkaloide wurde an Cervix-Karzinom-Zellen (HeLa) untersucht [IC₅₀ Sang 0,8 µg/ml, IC₅₀ Copt 2,6 µg/ml, IC₅₀ Chel 6,2 µg/ml, IC₅₀ Berb >10 µg/ml Slaninova *et al.* 2001]. Weitere Untersuchungen an diesen Zellen zeigten, dass

Sanguinarin und Chelerythrin an den Glucocorticoid-Rezeptor binden können, welcher dadurch im Kern akkumuliert [Dvorak *et al.* 2006a]. Slaninova und Mitarbeiter [2007] stellten in neueren Untersuchungen zur Toxizität von Benzophenanthridinen an verschiedenen Tumorzelllinien die höchste Toxizität für das Marcapin fest (IC_{50} 0,01-1,44 $\mu\text{g/ml}$). An Glioblastom-Zellen aus Ratten wurde festgestellt, dass Sanguinarin Apoptose durch Herunterregulierung von MAP-Kinasen und AKT, welche zur Modulation von Regulator-Proteinen der Bcl2-Familie und Aktivierung von Caspasen führt, induziert [Han *et al.* 2007]. Ein wesentlicher Mechanismus, welcher zur Hemmung des Zellwachstums führt, ist der Abfall des Glutathion-Gehaltes bei der Inkubation mit Sanguinarin [Debiton *et al.* 2003]. Auch in Mäusen wird die Konzentration an reduziertem Glutathion in der Leber durch intraperitoneale Applikation von Sanguinarin (10 mg/kg) signifikant gesenkt. Dabei verringerten sich ebenfalls die Aktivitäten von Cytochrom P450 Enzymen [Williams *et al.* 2000]. Ein nicht kovalenter Komplex von Sanguinarin mit SH-Verbindungen (Cystein, Mercaptoethanol, Albumin) wurde von Bartak und Mitarbeitern [2003] gefunden. Für die Reaktion von Glutathion mit Sanguinarin wurde ebenfalls ein nicht kovalenter Komplex gefunden, dessen Dissoziationskonstante 400 μM beträgt [H.H. Rüttinger, M. Vogel und W. Roos, unveröffentlicht].

Die Hemmung von Cytochrom P450 Enzymen als weitere Komponente der Cytotoxizität ist durch Modriansky und Mitarbeiter [2001] gezeigt worden (CYP 1A IC_{50} Sang 11 μM , IC_{50} Chel 16 μM ; CYP 3A4 IC_{50} Sang 25 μM , IC_{50} Chel 30 μM).

1.4 Bisherige Erkenntnisse zur Sanguinarin-Reduktase

Der Erkenntnisstand zu Beginn dieser Arbeit basiert auf folgenden Quellen: [Weiß 2004, Paczulla 2004, Weiß *et al.* 2006].

Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* tolerieren hohe Mengen von dem Medium zugesetztem Sanguinarin. Das Alkaloid wird rasch aufgenommen und erscheint in den Zellen als Dihydrosanguinarin. Zwischen Aufnahme und Reduktion konnte bisher kein Anstieg des intrazellulären Sanguinarins nachgewiesen werden, so dass eine enge Kopplung beider Vorgänge wahrscheinlich ist. Der Mechanismus der Aufnahme der Benzophenanthridine und dabei ggf. verwendete Transporter sind noch unbekannt.

Die aktuellen Daten zum Recycling des Sanguinarins lassen sich durch folgendes Modell am besten beschreiben (Abb. 1-2).

1. Das im Verlauf der Biosynthese der Benzophenanthridine gebildete Dihydrosanguinarin wird durch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase zu Sanguinarin oxidiert. Dieses Enzym befindet sich im Lumen von ER-abgeleiteten Vesikeln [Facchini und St-Pierre 2005]. Auch das Sanguinarin erscheint bei der Zellfraktionierung in einer Vesikelfraktion [M. Heinze und W. Roos, unveröffentlicht].

2. Sanguinarin wird nach Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran in die Zellwand ausgeschieden. Dort ist es an Zellulose oder ähnliches Material gebunden und gut nachweisbar [Viehweger *et al.* 2006, Weiß *et al.* 2006, Färber *et al.* 2003].

3. Extrazelluläres Sanguinarin wird durch die Plasmamembran aufgenommen und im Cytoplasma durch die Sanguinarin-Reduktase zu Dihydrosanguinarin reduziert. Dieser Vorgang lässt sich durch Zusatz von Sanguinarin leicht nachvollziehen (s.o.).

4. Das durch die Sanguinarin-Reduktase gebildete Dihydrosanguinarin wird wieder in die Biosynthese-Kette eingegliedert und zu Dihydrochelirubin und weiteren Dihydrobenzophenanthridinen metabolisiert. Diese erscheinen zum Teil nach erneuter Oxidation im Außenmedium.

Damit entsteht ein Recycling-Prozess, welcher die Präsentation des toxischen Sanguinarins als Phytoalexin an der Zelloberfläche erlaubt und zugleich dessen Akkumulation im Cytoplasma verhindert. Die Produzentenzelle ist so durch einen metabolischen Mechanismus vor einer Autointoxikation geschützt [Weiß *et al.* 2006].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der letzte Schritt der Bildung des Sanguinarins eng mit seiner Ausscheidung und die Bildung des Dihydrosanguinarins eng mit der Aufnahme des Sanguinarins verknüpft sind. Das im Cytosol nachweisbare Dihydrosanguinarin ist deutlich weniger toxisch als Sanguinarin [Janovska *et al.* 2010].

Das für die Reduktion des Sanguinarins verantwortliche Enzym, die Sanguinarin-Reduktase, konnte aus der Zellkultur von *Eschscholzia californica* isoliert und gereinigt werden.

Die Sanguinarin-Reduktase ist ein lösliches cytoplasmatisches Enzym, welches die Reduktion von Sanguinarin und ähnlicher Benzophenanthridine durch NADPH katalysiert. NADH wird als H-Donator akzeptiert, jedoch mit geringerer Affinität. Eine Rückreaktion von Dihydrosanguinarin mit NAD(P)⁺ wurde nicht beobachtet. Von den Alkaloid-Substraten wird Sanguinarin am schnellsten umgesetzt, gefolgt von Chelerythrin, Chelirubin und Macarpin.

Die Sanguinarin-Reduktase zeigt eine hohe Spezifität für das nicht substituierte Benzophenanthridin-Molekül. Folgende Substanzen sind keine Substrate des Enzyms: die Phenanthridine Ethidiumbromid und Propidiumjodid, das analoge Isochinolin-Alkaloid Berberin, die Substrate von Hydroxysteroid-Reduktasen wie Hydrocortison und Progesteron, Substrate von short-chain-Dehydrogenasen wie Tropinon, Pyridoxol, Pyridoxamin und Dehydroascorbinsäure, das Pilztoxin Cercosporin [Weiß 2004, Paczulla 2004].

Die Molekülmasse von ca. 30 kDa wurde durch Gelelektrophorese ermittelt und durch Massenspektrometrie (29432 Da) bestätigt. Durch Umsetzung der Sanguinarin-Reduktase mit Vinylpyridin und des damit verbundenen Anstiegs der Molekülmasse wurden zwei Cysteine im Protein nachgewiesen. Aktivitätsmessungen nach Umsetzung des Protein mit Iodacetamid zeigen, dass mindestens eines der Cysteine für die katalytische Aktivität notwendig ist .

Die Sequenzanalyse des Proteins nach Edman gelang nicht vollständig, da der N-Terminus blockiert war. Nach der Trypsinspaltung des Proteins konnten zwei Peptidbruchstücke der Sanguinarin-Reduktase nach Edman sequenziert werden. Sie dienten als Ausgangspunkt für die im Folgenden beschriebene Entdeckung des vollständigen Enzymproteins.

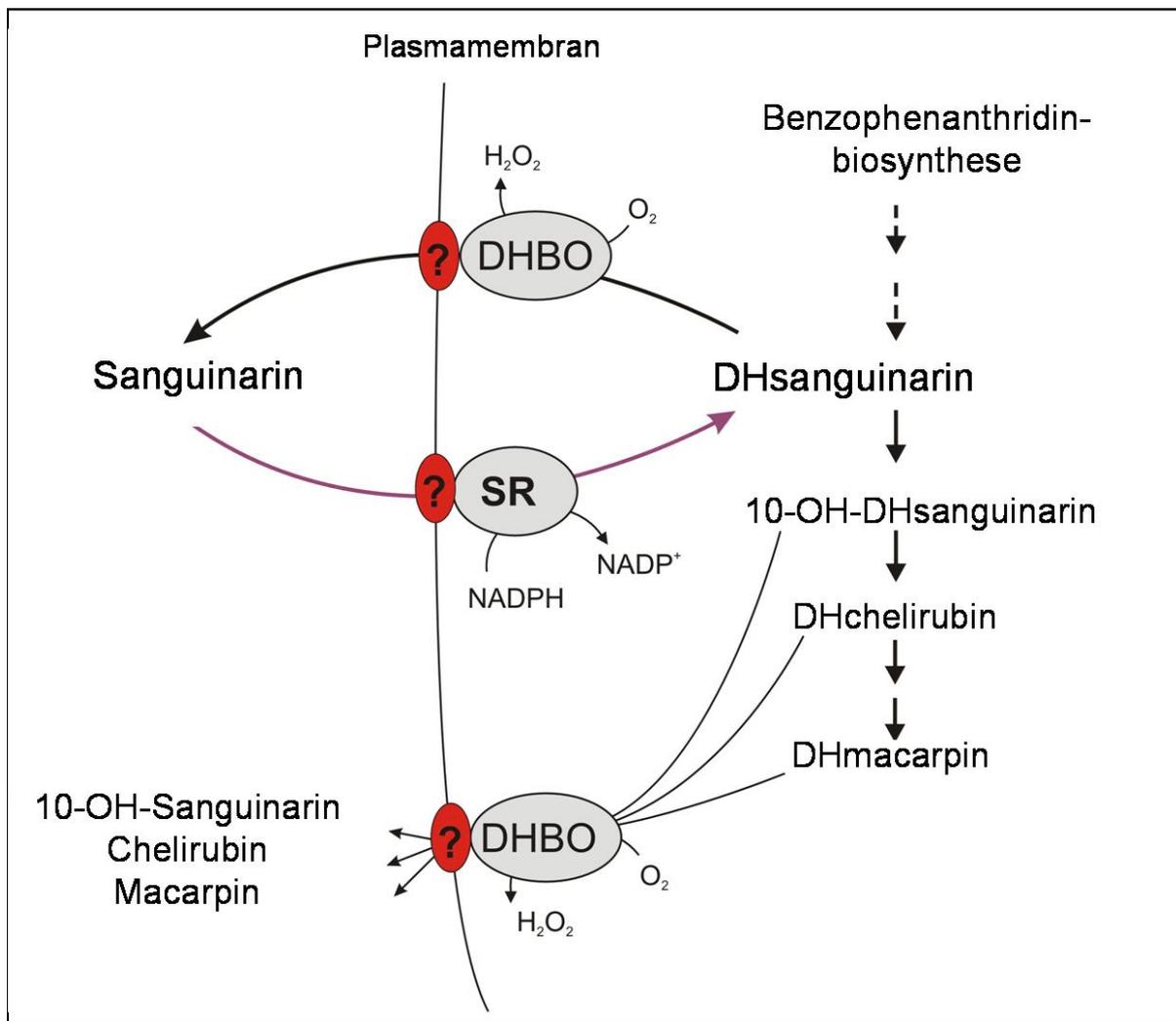


Abb. 1-2 “Recycling” des Sanguinarins in der Zellkultur von *Eschscholzia californica*

Schema nach Weiß *et al.* 2006

Dihydrosanguinarin aus der Biosynthese der Benzophenanthridine wird durch die Dihydrobenzophenanthridinoxidase (DHBO) zu Sanguinarin oxidiert und ausgeschieden. Extrazelluläres Sanguinarin wird aufgenommen und durch die Sanguinarin-Reduktase (SR) zu Dihydrosanguinarin reduziert, welches entsprechend der Biosynthese weiter metabolisiert wird.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ausgehend von dem noch unvollständigen Bild zur Struktur und Funktion der Sanguinarin-Reduktase sollten folgende Ziele erreicht werden:

- Aufklärung der Aminosäure- und Gensequenz der Sanguinarin-Reduktase
- Klonierung und heterologe Expression des Enzyms und Gewinnung spezifischer Antikörper
- Beiträge zur Aufklärung des Katalyse-Mechanismus durch gezielte Mutagenese
- Die aus diesen Daten gewonnen Erkenntnisse sollten als Ausgangspunkt für die Erstellung eines 3D-Homologie-Modells dienen (Kooperation AG Prof. W. Sippl).
- Mit Hilfe der abgeleiteten 3D-Struktur und der Sequenzdaten sollte eine Suche nach strukturähnlichen Proteinen in anderen Organismen gestartet werden.

2. Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *pro analysis*, von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Serva oder Roth verwendet.

2.1 Material und Methoden auf DNA-Ebene

2.1.1 Klonierung und heterologe Expression

2.1.1.1 Bakterienstämme (*E. coli*)

- ElectroMAX™ DH10B™ T1 (enthält cDNA-Bank)
F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ rpsL nupG tonA
- BL 21 (für Proteinexpression)
(DE3, pLysS) *BF⁻dcm ompT hsdS (r⁻mb⁻) gal y((DE3)(pLysS Cam1))*
- XL1-Blue (für Klonierung und DNA-Produktion)
RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F⁻proAB lacIqZδM15Tn10(Tet1))

2.1.1.2 Plasmide

- pDONR™222 (Invitrogen, Abb. A-1)
- pET-23d (Novagen, EMD4Biosciences, Abb. A-2)

2.1.1.3 Kultivierung der Bakterien

- LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 10 g NaCl, Aqua bidest. zu 1 l; autoklavieren)
- LB-Agar (1 l LB-Medium, 15 g Agar; autoklavieren)
- SOC-Medium (2 g Trypton, 0,5 g Hefe Extrakt, 50 mg NaCl, 18,63 mg KCl, 95,21 mg MgCl₂, Aqua bidest. zu 98 ml; autoklavieren 2 ml 1 M sterile Glucose-Lösung zugeben)
- Freezing-Medium (60 % SOC-Medium, 40 % Glycerol, autoklavieren)

Die Bakterien wurden in LB-Medium bei 37 °C auf einem Rundschtüttler (Novotron AK85,

Infors AG) bei 160 rpm über Nacht kultiviert. Zur Selektion wurden einerseits Kanamycin 50 µg/ml (im pDONRTM222 Vektor) und andererseits Ampicillin 100 µg/ml (im pET-23d Vektor) eingesetzt. Das Übertragen der Bakterien erfolgte mit sterilen Holzstäbchen oder durch Zugabe von Bakteriensuspensionen. Für Fest-Medien wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Agar zugesetzt. Petrischalen mit Festmedium wurden durch Ausspateln von 100 µl Bakteriensuspension beimpft. Aus der gewachsenen Bakteriensuspension wurden 100 µl in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Freezing-Medium gemischt und bei -80 °C eingefroren. Diese Suspension konnte zum Ansatz einer Vorkultur genutzt werden und wurde teilweise in mehreren Aliquots (bei häufigerem Bedarf) eingefroren.

2.1.1.4 Herstellung kompetenter Zellen

- CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, 10 mM PIPES-Puffer pH 7,0; autoklavieren)

Es wurden kompetente Zellen von den *E. coli* Stämmen XL1-Blue und BL 21 hergestellt. Für die Elektroporation wurden die Zellen folgendermaßen behandelt.

500 ml LB-Medium wurden bei 37 °C bis zur OD₆₀₀ 0,6 wachsen gelassen. Die Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt auf 4 °C. Danach wurden die Bakterienzellen für 15 min mit 3000 x g bei 4 °C zentrifugiert (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Rotor 12153), das Bakterienpellet mit 100 ml 4 °C kaltem, sterilem Aqua bidest. resuspendiert. Das Waschen wurde 3-mal wiederholt und schließlich das Bakterienpellet in 2 ml kalter, 10 %iger Glycerollösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Hitzeschocktransformation wurden die Zellen nach der CaCl₂-Methode behandelt.

Dazu wurde wie oben angegeben verfahren. Abweichend wurde das Bakterienpellet nicht in Aqua bidest., sondern in CaCl₂-Lösung resuspendiert und gewaschen. Nach 3-maligem Waschen wurde das Bakterienpellet in 10 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.1.1.5 Transformation von *E. coli*

- SOC-Medium (2 g Trypton, 0,5 g Hefe Extrakt, 50 mg NaCl, 18,63 mg KCl, 95,21 mg

MgCl₂, Aqua bidest. zu 98 ml; autoklavieren, 2 ml 1 M sterile Glucose-Lösung zugeben)

2.1.1.5.1 Elektroporation

Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation mit dem "BTX Electro Cell Manipulator 600" (V: 2,45 kV; T: 2,5 kV/Resistance; R: 129 Ohm). Dazu wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen XL1-Blue auf Eis mit 2 µl Ligationsansatz versetzt und danach in eine eisgekühlte 2-mm-Gap-Küvette überführt. Sofort nach dem Puls wurde 1 ml SOC-Medium zugesetzt und die gesamte Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C geschüttelt (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). Anschließend wurden 100 µl auf LB/Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

2.1.1.5.2 Hitzeschock

50 µl *E. coli*-Zellen XL1-Blue wurden mit 5 µl Reaktionsansatz gemischt und 20 min auf Eis equilibriert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 90 s. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 500 µl SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). 100 µl davon wurden anschließend auf LB/Amp-Agar (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen BL 21 wurde das Protokoll leicht abgewandelt. Es wurden 7 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis equilibriert, der Hitzeschock erfolgte nur für 30 s und es wurden nur 250 µl SOC-Medium zugegeben.

2.1.1.6 Heterologe Expression in Bakterien

2.1.1.6.1 Produktion im Erlenmeyerkolben

200 ml LB/Amp-Medium wurden mit 5 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C wachsen gelassen (2.1.1.3). Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zusatz von 1 mM IPTG und weitere Inkubation bei 37 °C für 3 h. Anschließend wurde das Bakterienpellet durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Rotor 11133) gewonnen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.1.6.2 Produktion im Fermenter (Biostat C-DCU, B.Braun biotech international)

- Glucoselösung (30 g Glucose in 250 ml Aqua bidest.; autoklavieren)
- Magnesiumsulfatlösung (4,08 g $MgSO_4$ in 250 ml Aqua bidest.; autoklavieren)
- Dikaliumhydrogenphosphatlösung (66 g K_2HPO_4 in 500 ml Aqua bidest.; spezielle Deckel mit Filter und Schläuchen verwenden; autoklavieren)
- Säure (10 % Phosphorsäure 500 ml; spezielle Deckel mit Filter und Schläuchen verwenden; autoklavieren)
- Base (10 % NaOH 500 ml; spezielle Deckel mit Filter und Schläuchen verwenden; autoklavieren)
- Feeding (in 2 Flaschen à 1 Liter jeweils 300 g Hefeextrakt in 600 ml Aqua bidest. lösen; Magnetrührer dazugeben; autoklavieren; 250 g Glucose allmählich in 400 ml erhitztem Aqua bidest. lösen, auf 800 ml auffüllen; autoklavieren; zu dem autoklavierten Hefeextrakt steril jeweils 400 ml autoklavierte Glucoselösung geben; für eine der Flaschen speziellen Deckel mit Filter und Schläuchen verwenden)
- Fermentationsmedium (300 g Hefeextrakt; 3 g NH_4Cl ; 1 ml Antifoam; in 5 Litern Aqua bidest. lösen; im Fermenter autoklavieren)

Die unter Anleitung von K. Schröder-Tittmann und U. Best durchgeführte Fermentation erfolgte bei 37 °C, konstantem pH-Wert und pO_2 von 30 %. Rührgeschwindigkeit und Luftzufuhr wurden über die Kaskaden-Einstellung automatisch geregelt.

Zum Animpfen des Fermenters dienten die bei 5000 x g zentrifugierten, in 120 ml neuem LB/Amp-Medium resuspendierten (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Rotor 11133) Bakterien, die über Nacht bei 37 °C in 2-mal 200 ml LB/Amp-Medium gewachsenen sind (2.1.1.3).

Zur Selektion wurde Ampicillin (200 µg/ml) verwendet. Während der Fermentation wurden stündlich die Parameter pH, pO_2 , Rührgeschwindigkeit, Luftzufuhr und Temperatur protokolliert. Zusätzlich wurde über eine Monovette mit Kanüle frontal am Fermenter eine Probe genommen und durch Bestimmung der OD_{600} das Bakterienwachstum verfolgt. Ab einer OD_{600} von 17,7 wurde das Feeding, langsame Zuführung neuer Nährstoffe aus der Feeding-Flasche in den Fermenter durch eine Schlauchpumpe, gestartet. Um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten, wurde ein weiteres Mal Ampicillin zugesetzt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 39,5 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zusatz von 1 mM IPTG und weitere

Fermentation für 3 h. Die aus dem Fermenter abgelassene Bakterienkultur wurde für 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Avanti J20, Rotor JLA 8.100, Beckman Coulter). Das Bakterienpellet in autoklavierbaren Beuteln als flache Platten bei -80 °C eingefroren.

2.1.1.7 Klonierung des Sanguinarin-Reduktase-Gens

Die Generierung der zu klonierenden DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR (2.1.6). Die Primer enthielten je eine Restriktions-Schnittstelle, welche nach Verdau mit Nco I und Xho I die Ligation in den Vektor pET-23d (2.1.1.2) ermöglichte. Als template diente der cDNA-Bank-Klon mit dem Gen der Sanguinarin-Reduktase.

Im Anschluss an die PCR erfolgte der Restriktionsverdau mit 2 µl Nco I, 2 µl Xho I, 7,1 µl Restriktase-Puffer und dem gesamten PCR-Ansatz. Der Vektor wurde parallel in folgendem Ansatz verdaut: 18 µl Vektor (27,5 ng/µl), 1 µl Nco I, 1 µl Xho I, 2,2 µl Restriktase-Puffer. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Danach wurden die Ansätze über ein 1 %iges Agarosegel (2.1.4) gereinigt und die Banden der geschnittenen Fragmente aus dem Gel extrahiert (2.1.2.3).

Die Ligation erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl Ligase-Puffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase, 25 ng Vektor und 28,3 ng einzufügendes Fragment. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Inaktivierung bei 65 °C über 10 min. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* Zellen XL1-Blue durch Elektroporation genutzt (2.1.1.5.1). Es wurden die Restriktasen und Ligase mit zugehörigen Puffern der Firma Fermentas genutzt.

Eine Auswahl der über Nacht auf dem Agar gewachsenen Klone wurde mit sterilen Hölzern in 3 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen (2.1.1.3). Nach Isolierung der Plasmide (2.1.2.2) wurde durch Sequenzierung des Inserts der korrekte Einbau der gewünschten Gene überprüft. Für die heterologe Expression der Proteine wurden die klonierten Gene in Form der isolierten Plasmide in den besser geeigneten Stamm BL 21 durch Hitzeschock-Transformation umklont (2.1.1.5.2).

Zwei gewachsene Klone wurden mit Hölzern in 5 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Diese 5 ml wurden als Vorkultur zur heterologen Expression der Proteine in Bakterien genutzt (2.1.1.6).

2.1.1.8 Klonierung des Gens At5g02240 (Protein 1XQ6)

Die Klonierung des Gens At5g02240 erfolgte analog zur Klonierung des Sanguinarin-Reduktase-Gens (2.1.1.7). Abweichend wurde im ersten Schritt der Klonierung, bei der PCR, das Plasmid mit dem At5g02240-Gen aus der TAIR-Datenbank (Stock-Nr. U13442) anstelle des cDNA-Bank-Klons mit dem Gen der Sanguinarin-Reduktase als template eingesetzt.

2.1.2 Präparation von DNA

2.1.2.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Präparation genomischer DNA wurde das “Nucleon phytopure plant DNA extraction Kit” der Firma Amersham™ verwendet.

300 mg Frischmasse wurden in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser gegeben und pulverisiert. Dieses Pulver wurde auf 2 vorgekühlte 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt, dazu wurden jeweils 600 µl Reagenz 1 gegeben und vermischt. Anschließend wurden 200 µl Reagenz 2 zugegeben und gemischt. Für 10 min wurde bei 65 °C unter Schütteln inkubiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne) und anschließend für 20 min auf Eis abkühlen gelassen. Danach wurden 500 µl auf -20 °C vorgekühltes Chloroform und 100 µl “Nucleon phytopure DNA extraction resin suspension” zugegeben. Nach 10 min, in denen die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur quer geschüttelt wurden, erfolgte die Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 1000 x g für 10 min (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Rotor 12153), die oberen Phase (über der braunen Grenzschicht) wurde abgenommen und wenn nötig durch eine weitere Zentrifugation geklärt. Zur Fällung der DNA wurde das gleiche Volumen kaltes Isopropanol (4 °C) zur Lösung zugegeben. Zum Pelletieren der DNA wurde bei 4000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen der DNA erfolgt die Aufnahme in 50 µl Nuclease-freiem Aqua bidest. Im Anschluss wurden die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (2.1.3). Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C.

2.1.2.2 Isolierung von Plasmiden

Die Extraktion der Plasmide erfolgte mit dem “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” der Firma Promega. Die Zentrifugationen erfolgten in der Centrifuge 5403 der Firma

Eppendorf.

5 ml Bakterienkultur wurden zur Gewinnung der Bakterienzellen für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Dieses Zellpellet wurde anschließend mit 250 µl "Cell Resuspension Solution" resuspendiert. Danach wurde die Suspension für 3 min mit 250 µl "Cell Lysis Solution" inkubiert und anschließend 10 µl "Alkaline Protease Solution" für 5 min zugesetzt. Nach Zugabe von 350 µl "Neutralization Solution" und gründlichem Mischen wurde für 10 min bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand in eine "Spin Column" überführt. Nach 1 min Zentrifugation bei 14000 x g wurden 750 µl "Column Wash Solution" zugesetzt und wieder 1 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 250 µl wiederholt und für 2 min bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der obere Teil der "Spin Column" auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 100 µl Nuclease-freies Aqua bidest. aufpipettiert und nach 2 min warten für 1 min bei 14000 x g zentrifugiert. Diese Plasmidlösung wurde dann bei -20 °C eingefroren.

2.1.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen erfolgte mit dem "QIAquick Gelextraction Kit" der Firma QIAGEN. Die Zentrifugationen erfolgten in der Centrifuge 5403 der Firma Eppendorf bei 17900 x g. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in Reaktionsgefäßen mit 300 µl "Buffer QG" je 100 mg Gel für 10 min bei 50 °C unter schütteln gelöst. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol je 100 mg Gel zugesetzt und gemischt. 800 µl dieser Mischung wurden auf eine "Spin Column" gegeben und 1 min zentrifugiert. Bei größeren Volumina wurde dieser Schritt mehrmals wiederholt. Nach dem Auftragen erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl "Buffer QG" und Zentrifugation für 1 min. Anschließend wurden 750 µl "Buffer PE" zugesetzt, 5 min gewartet und danach 1 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde nochmals 1 min zentrifugiert. Der obere Teil der "Spin Column" wurde auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 50 µl Nuclease-freies Aqua bidest. aufpipettiert und nach 1 min Warten für 1 min zentrifugiert. Die Konzentration der DNA im Eluat wurde anschließend photometrisch bestimmt (2.1.3). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei

260 nm (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech). Eine Absorption von 1 entspricht 50 µg/ml DNA. Als Reinheitsmerkmal der DNA-Präparation wird der Proteinindex (Quotient der Absorptionen bei 260 nm/280 nm) gebildet, welcher $\geq 1,8$ sein sollte.

2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

- TBE-Puffer (Tris 89,2 mM, Borsäure 89,2 mM, EDTA 2 mM)
- DNA-Probenpuffer (1 ml 10fach-TBE-Puffer, 0,5 ml Glycerol, 0,5 ml Aqua bidest., 100 µl 0,2 % Bromphenolblau-Lösung)

Es wurde ein 1 %iges Agarosegel mit TBE-Puffer und Ethidiumbromid (200 nM) verwendet. 16 µl DNA-Lösung wurden vor dem Auftragen aufs Gel mit 4 µl DNA-Probenpuffer gemischt. Zum Abschätzen der Länge der DNA-Fragmente wurden 5 µl eines Markers (SmartLadder, EUROGENTEC) mit aufgetragen. Es wurde eine Mini-Elektrophorese-Kammer der Firma Roth verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 V ca. 1 h durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht, die Dokumentation mittels einer Digitalkamera (CAMEDIA E-10, Olympus).

2.1.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach Sanger *et al.* 1977 und wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Als Sequenzier-Primer wurden im Fall von Plasmiden für den Vektor pDONRTM 222 die Primer M13 forward und M13 reverse, für den Vektor pET-23d der T7 und T7 terminator Primer verwendet. Die PCR-Produkte wurden jeweils mit dem zu ihrer Generierung genutzten Primer sequenziert.

2.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Generierung Sanguinarin-Reduktase-spezifischer Genabschnitte sowohl mit genomischer DNA als auch mit Plasmiden der cDNA-Bank genutzt. Die Hybridisierungs-Sonde wurde mittels PCR generiert und der Nachweis des Sanguinarin-Reduktase-Gens in verschiedenen cDNA-Bank Klonen erfolgte ebenfalls durch PCR. Zunächst wurde die PCR mit Kombinationen der Primer F5, F18, R22 und R31 durchgeführt. Durch Sequenzierung der gewonnenen Amplimere wurde ein Teil der DNA-Sequenz der Sanguinarin-Reduktase ermittelt und auf dieser Grundlage der Primer F12 abgeleitet, welcher zusammen mit dem Primer R22

das als Hybridisierungs-Sonde dienende Amplimer lieferte. Anschließend erfolgte eine Auftrennung über Agarosegele (2.1.4). Die als erster Schritt der Mutagenese dienende PCR wurde mit einer anderen Polymerase und verändertem Protokoll durchgeführt, weshalb sie dort genauer aufgeführt ist (2.1.9).

Der verwendete Reaktionsansatz von 50 µl enthielt:

- 200 µM dNTP (Firma Fermentas)
- 5 µl 10fach-Polymerase-Puffer (entsprechend zur Polymerase mitgeliefert)
- 1 U Taq-Polymerase (Firma segenetic)
- 60 pmol spezifischen Primer jeweils für beide Stränge (2.1.7)
- ca. 20 ng Plasmid-DNA oder 220 ng genomische DNA als template

Dieser Ansatz durchlief folgendes Programm im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf

1 Zyklus 2 min bei 95 °C

35 Zyklen 30 s bei 95 °C + 30 s bei 51 °C + 1 min bei 72 °C

1 Zyklus 5 min bei 72 °C

Verbleib bei 4 °C

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma biomers.net synthetisiert. Bei den Primern mit F im Namen handelt es sich um "Forward" Primer, während R für "Reverse" steht, und der Primer somit auf dem komplementären Strang bindet. Für die Primer zur Identifizierung des Sanguinarin-Reduktase-Gens wurde der Codon-usage von *Eschscholzia californica* zugrunde gelegt (Kazusa DNA Research Institute, Japan; <http://www.kazusa.or.jp/eng/index.html>), und teilweise degenerierte Primer verwendet.

Primer für die Identifizierung des Sanguinarin-Reduktase-Gens

F3	20bp	GAGGTTAGAGGTCTGGTTAG
F5	20bp	GAAGTTAGAGGTCTKGTTAG
F12	21bp	TATCCAGAACAAGTTGATTGG
F18	20bp	GTTGGTTCWATGGGTGGTTG
R22	20bp	TG TTCAGCCTTTCTCTTCCA

R30	20bp	AAAGGAGTAGTAACTTGAGA
R31	21bp	AAATGGAGTAGTAACTTGWGA

Primer für die Klonierung

F1 NcoI	19bp	GCACCATGGCAGATTCATC
R30 XhoI	24bp	CGTCTCGAGAAAAGGAGTAGTAAC
F1XQ6B NcoI	20bp	GTACCATGGCGAATCTTCCC
R1XQ6B XhoI	24bp	CGTCTCGAGAAAACGAGAGGTGAC

Primer für die Mutagenese

Cys¹⁵⁷-Ala

F MutaC: GATCTATGGGTGGAGCGGATCCTGATCACTTC

R MutaC: GAAGTGATCAGGATCCGCTCCACCCATAGATC

Phe¹⁶²-Pro

F MutaF: GGATGTGACCCTGACCACCCCTTGAATCATATG

R MutaF: CATATGATTCAAGGGGTGGTCAGGGTCACATCC

Deletion von SEDVIDASFSGPM (Δ 102-114)

F MutaSED: CCTGAATTTTATTATGATGAAG

R MutaSED: TCTTCCACCACTAATCATTTTC

Serin¹⁵³-Ala

F MutaS: TTGTTCTTGTTGGAGCCATGGGTGGATGTGAC

R MutaS: GTCACATCCACCCATGGCTCCAACAAGAACAA

Asp¹⁵⁸-Asn

F MutaD: CTATGGGTGGATGTAATCCGGATCACTTCTTG

R MutaD: CAAGAAGTGATCCGGATTACATCCACCCATAG

Met¹⁶⁶-Leu

F MutaM: CACTTCTTGAATCATCTGGGAAATGGAAATAT

R MutaM: ATATTTCCATTTCCCAGATGATTCAAGAAGTG

His¹⁶¹-Ala

F MutaH: GATGTGACCCTGACGCGTTCTTGAATCATATG

R MutaH: CATATGATTCAAGAACGCGTCAGGGTCACATC

2.1.8 cDNA-Bank-Screening

- Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH)
- Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,4)
- 2fach-SSPE (0,3 M NaCl; 20 mM NaH₂PO₄; 2 mM EDTA; pH 7,4)
- 2fach-SSC (0,3 M NaCl; 30 mM Trinatriumcitrat; pH 7,0)
- Waschpuffer 1 (2 M Harnstoff; 0,1 % SDS; 50 mM Na₃PO₄ pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 % “Blocking reagent”)
- Waschpuffer 2 (50 mM Tris pH 10,0; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂)

Zur Suche des Sanguinarin-Reduktase-Gens wurde eine bereits in der Arbeitsgruppe mit dem “CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit” von Invitrogen hergestellte cDNA-Bank genutzt.

Die als Sonde dienende DNA wurde mittels PCR (2.1.6) generiert und mit dem “AlkPhosDirect labelling Kit” von Amersham™ markiert. Dazu wurden 10 µl Sonden-DNA der Konzentration 10 ng/µl zur Denaturierung für 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt, auf Eis wieder abgekühlt und anschließend mit 10 µl “reactionbuffer”, 2 µl “labelling reagent” und 10 µl “crosslinker”-Verdünnung 1:5 für 30 min bei 37 °C inkubiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). Die so markierte DNA wurde bis zum Zusatz zur Hybridisierungslösung auf Eis gelagert.

Es wurden jeweils 250 µl einer 1:1000 Verdünnung der cDNA-Bank auf 6 Platten (12 x 12 cm) mit LB/Kan-Agar (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen (2.1.1.3). Die Übertragung der gewachsenen Kolonien auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham™ Hybond™-ECL) erfolgte bei Raumtemperatur, indem diese für 5 min auf die Platten aufgelegt wurde. Markierungen zum späteren Zuordnen von Signalen zu bestimmten Kolonien wurden angebracht und anschließend die Membran mit der Kolonieseite nach oben für 3 min auf einen mit 10 % SDS-Lösung getränkten Filterpapierstapel gelegt. Daran schlossen sich 5 min auf einem Stapel mit Denaturierungslösung und 5 min auf einem Stapel mit Neutralisierungslösung an. Als letztes wurden die Membranen 5 min auf 2fach-SSPE schwimmen gelassen und schließlich untergetaucht. Danach wurden die Membranen für 1 h zum Trocknen auf Filterpapier gelegt und anschließend erfolgte die Fixierung der DNA im Trockenschrank für 1 h

bei 80 °C. Die Agarplatten wurden zum teilweisen Nachwachsen der Kolonien für 7 h bei 37 °C inkubiert.

Die Membranen wurden nach dem Fixieren mit 2fach-SSC befeuchtet, Koloniereste vorsichtig mit 2fach-SSC getränktem Zellstoff entfernt. Es wurden jeweils 2 getränkte Membranen mit Gaze gerollt in eine Hybridisierungsröhre überführt und mit jeweils 30 ml Hybridisierungslösung aus oben genanntem Kit für 30 min bei 65 °C vorhybridisiert. Die markierte Sonde wurde anschließend in diese Lösung (5 ng/ml) pipettiert und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Nach der Entnahme der Hybridisierungslösung wurde jede Röhre mit 100 ml auf 65 °C vorgewärmtem Waschpuffer 1 gefüllt und die Membran 15 min bei dieser Temperatur gewaschen. Dieser Schritt wurde einmal mit frischem Waschpuffer 1 wiederholt. Anschließend wurden alle Membranen aus den Hybridisierungsröhren entnommen und bei Raumtemperatur in einer Schale mit 500 ml Waschpuffer 2 für 5 min gewaschen. Es wurde ein weiteres Mal in frischem Waschpuffer 2 gewaschen.

Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz (2.2.3) mit dem “CDP-Star”-Reagenz, welches im Kit enthalten ist. Das Substrat wurde nach 5 min mit Blotting-Papier abgesaugt. Die Belichtungszeit betrug 1 h. Die Markierungen der Membran zum Zuordnen der Signale wurden nach dem Trocknen des Films auf diesen übertragen und durch Vergleich mit den Agarplatten mögliche positive Klone bestimmt. Die Bestätigung erfolgte durch Anzucht dieser Klone in Reinkultur und PCR mit Sanguinarin-Reduktase-spezifischen Primern und den aus diesen Klonen gewonnenen Plasmiden.

2.1.9 Mutagenese

Die Generierung des mutierten DNA-Stranges erfolgte mittels PCR. Es wurde gegenüber der normalen PCR eine Polymerase mit Korrekturfähigkeit eingesetzt. Dadurch und weil das gesamte Plasmid amplifiziert werden sollte, erhöhte sich die für die Verlängerung der Primer benötigte Zeit deutlich. Im Falle der Deletionsmutante wurden phosphorylierte Primer vor und nach der gewünschten Deletionsstelle gewählt.

Der Reaktionsansatz zu 50 µl enthielt:

- 200 µM dNTP (Firma Fermentas)
- 5 µl 10fach-Polymerase-Puffer (entsprechend zur Polymerase mitgeliefert)
- 2,5 U Pfu-Polymerase (Promega)

- 2x 60 pmol Primer mit dem gewünschten Austausch (2.1.7)
- 20 ng Plasmid-DNA der Sanguinarin-Reduktase im pET-23d Vektor als template

Dieser Ansatz durchlief folgendes Programm im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf:

1 Zyklus 30 s bei 95 °C

16 Zyklen 30 s bei 95 °C + 30 s bei 55 °C + 9 min bei 72 °C

Verbleib bei 4 °C

Der gesamte Reaktionsansatz wurde dann mit 1 µl Dpn I unter Zusatz von 4,5 µl Reaktionspuffer 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Deaktivierung für 20 min auf 80 °C erhitzt (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). Zusätzlich erfolgte bei der Deletionsmutante eine Ligation mit 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl Ligase-Puffer und 17 µl des Reaktionsansatzes mit Dpn I. 5 µl des Reaktionsansatzes bzw. der Ligationsreaktion wurden zur Hitzeschocktransformation von *E. coli*-Zellen XL1-Blue verwendet (2.1.1.5.2). Es wurden die Restriktase und Ligase mit zugehörigen Puffern der Firma Fermentas genutzt.

Eine Auswahl der über Nacht auf dem Agar gewachsenen Klone wurde mit sterilen Hölzern in 3 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen (2.1.1.3). Nach Isolierung der Plasmide (2.1.2.2) wurden diese zur Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen BL 21 verwendet (2.1.1.5.2).

2 der gewachsenen Klone wurden mit Hölzern in 8 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Davon dienten 3 ml zur Extraktion der Plasmide, um durch Sequenzierung des Insert den korrekten Einbau der Mutation zu bestätigen. Die restlichen 5 ml wurden als Vorkultur zur heterologen Expression der Proteine in Bakterien genutzt (2.1.1.6).

2.2 Material und Methoden auf Proteinebene

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.2.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

- Bradford-Farbreagenz (10 mg Coomassie-Brilliantblau G-250 in 5 ml 95 % EtOH lösen, dazu 10 ml 85 % Phosphorsäure, auffüllen auf 100 ml mit Aqua bidest.)

Bei Raumtemperatur wurden 50 µl Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Farbreagenz gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert mit Aqua bidest. anstelle der Proteinlösung gemessen (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech). Eine Kalibriergerade wurde mit RSA erstellt.

2.2.1.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (BCA Protein Assay Kit, PIERCE)

Aus dem Kit wurde durch Verdünnen des "Reconstitution buffers" mit Aqua bidest. im Verhältnis 1+1 die Arbeitsverdünnung hergestellt, von welcher 1 ml zum Lösen der "CRS Substanz" eines Röhrchens diente. Dies ergab nach 30 s Mischen die "CRS stock solution". Das "Working Reagent" wurde durch Mischen von 50 Teilen "BCA Reagenz A" mit einem Teil "BCA Reagenz B" hergestellt. 25 µl Probenlösung wurden mit 25 µl "CRS stock solution" gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). Anschließend wurde 1 ml des hergestellten "Working Reagent" zugesetzt und nach dem Mischen nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben im Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bei 562 nm gegen Aqua bidest. vermessen und der Blindwert der proteinfreien Probe abgezogen. Eine Kalibriergerade wurde mit RSA erstellt.

2.2.2 Antikörper

2.2.2.1 Gewinnung spezifischer Antikörper

(Kooperation mit Dr. U. Conrad, Institut für Genetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben)

- PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Waschpuffer (1 Teil gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung + 1 Teil PBS-Puffer)

Jeweils 750 µg rekombinante Sanguinarin-Reduktase gelöst in 300 µl 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 wurden mit 300 µl komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt, und anschließend zwei Labor-Kaninchen intraperitoneal injiziert. Nach 4 und 5 Wochen wurde eine Booster-Injektion desselben Volumens aber mit 500 µg des Antigens sowie inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Auf die gleiche Weise wurde mit dem rekombinanten Protein 1XQ6 und zwei weiteren Kaninchen verfahren. Die Tiere wurden nach 6 Wochen getötet und aus ihrem Blut Serum gewonnen. Dieses wurde auf den gewünschten Antikörper durch kompetitiven ELISA mit dem für seine Herstellung verwendeten Antigen getestet. Zur Gewinnung der IgG-Fraktion wurde das Serum mit demselben Volumen gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gefällt und 1 h stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 20 min wurde der Niederschlag mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Waschpuffer gewaschen und 30 min später erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS-Puffer aufgenommen und bei mehrmaligem Pufferwechsel über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Antikörper-Lösungen wurden als Aliquots bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.2 Primäre Antikörper

- Anti-His-tag-monoklonaler-Antikörper aus Maus (NOVAGEN, EMD4Biosciences) in der Verdünnung 1:2000
- Anti- Sanguinarin-Reduktase-Antikörper aus Kaninchen (2.2.2.1) in der Verdünnung 1:5000
- Anti-1XQ6-Antikörper aus Kaninchen (2.2.2.1) in der Verdünnung 1:5000

2.2.2.3 Sekundäre Antikörper

- Alkalische-Phosphatase-markierter Anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen (SIGMA) in der Verdünnung 1: 5000
- Meerrettichperoxidase-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Rind (Santa Cruz Biotechnology) in der Verdünnung 1:3000

2.2.3 Chemilumineszenz-Detektion

Zur Detektion wurde eine chemische Reaktion genutzt, in welcher das jeweils gebundene Enzym ein Substrat unter Aussendung von Licht umsetzt. Dieses Licht führt zur Schwärzung eines Fotofilms. Die Nitrocellulose-Membran wurde aus der Schale entnommen und die Flüssigkeit abtropfen gelassen. Anschließend wurde die Membran mit der Seite, welche die Markierungsenzyme trägt (Kolonieseite bzw. Gelseite), nach oben auf eine Folie gelegt. Es wurde ein entsprechend zur Membranfläche passendes Volumen des Substrates gleichmäßig auf die Membran pipettiert und nach 1-5 min mit Blotting-Papier abgesaugt. Die Membran wurde luftblasenfrei in der Folie eingeschlagen und zusammen mit einer weiteren Membran in einer Autoradiografiekassette (Hypercassette™, Amersham™) fixiert. Das Auflegen, Entwickeln und Fixieren des Fotofilms (Hyperfilm™-ECL von Amersham™) erfolgte in der Dunkelkammer (Entwickler, Fixierer von KODAK). Die Belichtungszeit variierte je nach Substrat.

2.2.4 Aufschluss des Bakterienpellets

Das Bakterienpellet wurde in Tris/HCl Puffer 10 mM pH 7,0 mit 1 mM PMSF resuspendiert zu 4 ml Puffer je g Pellet oder 5 ml Puffer je Pellet aus 200 ml Kultur. 30 min nach Zugabe von Lysozym 100 µg/ml und RNase 25 µg/ml erfolgten 3 Zentrifugationen:

10 min bei 5000 x g (3K12, SIGMA Laborzentrifugen, Rotor 11133),

10 min bei 20000 x g,

1 h bei 100000 x g (Ultrazentrifuge OPTIMA LE-80K, Beckman Coulter, Rotor 70Ti).

Der gewonnene 100000xg-Überstand wurde über eine Ni²⁺-Säule gereinigt (2.2.5).

2.2.5 FPLC-basierte Reinigung (Äkta purifier 10, Amersham™)

FPLC-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,0; 10 % Glycerol; 1,7 mM β-Mercaptoethanol)

FPLC-Puffer mit Imidazol (FPLC-Puffer + 500 mM Imidazol)

Ni²⁺-Entferner (20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA)

Die Reinigung erfolgt über eine HisTrap®-Säule 1 ml von Amersham™, welche zwischen den verschiedenen Proben folgendermaßen regeneriert wurde:

Zunächst wurde 1 ml NaOH zum Entfernen von Probenresten über die Säule gegeben. Danach wurden die Ni²⁺-Ionen durch Zugabe von 5 ml Ni²⁺-Entferner von der Säule gewaschen. Durch

Waschen mit mindestens 5 ml Aqua bidest. wurde die EDTA-haltige Lösung entfernt, um die Säule erneut durch Auftragen von 0,5 ml 0,1 M NiSO₄-Lösung mit Ni²⁺-Ionen zu beladen. Nach weiteren 5 ml Aqua bidest., welches die nicht gebundenen Ni²⁺-Ionen wegwäscht, konnte die Säule mit FPLC-Puffer equilibriert werden.

Der Probenauftrag erfolgt mit 1 ml/min, nicht gebundene Proteine werden durch Waschen mit FPLC-Puffer entfernt. Der Durchlauf und die Waschfraktionen wurden gesammelt, für den Fall, dass die Bindung an die Säule ungenügend war.

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit einem gestuften Imidazol-Gradienten:

0-15 ml	0-100 mM Imidazol	0,4 ml Fraktionen
15-17 ml	100 mM Imidazol	0,4 ml Fraktionen
17-22 ml	100-500 mM Imidazol	2 ml Fraktionen
22-27 ml	500 mM Imidazol	2 ml Fraktionen

Der Elutionspeak wurde bei der Sanguinarin-Reduktase mit dem Enzymassay (2.3) auf Aktivität überprüft. Aufgrund der Ähnlichkeit der Elutionsdiagramme konnte später insbesondere bei den Mutanten auf die Aktivitätsbestimmung verzichtet werden. Die zur Elution benötigte Imidazol-Konzentration war sehr gering und lag bei ca. 20 mM (Abb. 2-1).

2.2.6 SDS-PAGE

- Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)
- Sammelgelpuffer (1,0 M Tris/HC pH 6,8)
- 4fach-Probenpuffer (0,2 M Tris/HCl pH 6,8; 8 % SDS; 4 % β-Mercaptoethanol; 40 % Glycerol; 0,08 % Bromphenolblau)
- 10fach-Laufpuffer (0,25 M Tris/HCl pH 8,3; 2,5 M Glycin; 1 % SDS)

Es wurde ein 12 %iges Acrylamidgel nachfolgender Zusammensetzung für die Auftrennung der Proteine verwendet. Die Menge reicht für 2 Gele.

Trenngel (6 ml Rotiphorese; 3,75 ml Trenngelpuffer; 5,1 ml Aqua bidest.; 18 µl TEMED; 80 µl 10 % APS)

Sammelgel (0,74 ml Rotiphorese; 0,5 ml Sammelgelpuffer; 2,76 ml Aqua bidest.; 8 µl TEMED; 20 µl 10 % APS)

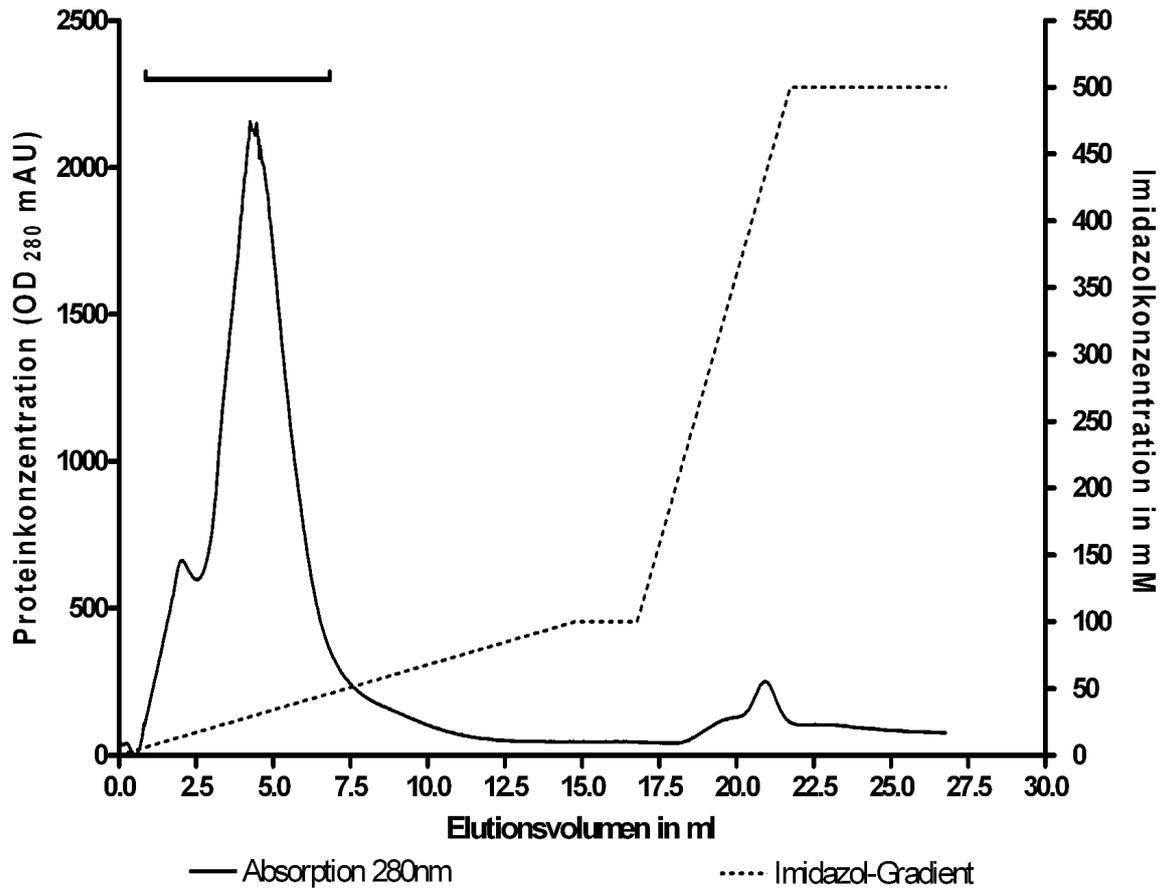


Abb. 2-1 FPLC-Reinigung der heterologen Sanguinarin-Reduktase mittels HisTrap[®]-Säule

Es wurden 70 ml 100000xg-Überstand des Bakterienaufschlusses verwendet (2.2.4). Nach Waschen mit 30 ml FPLC-Puffer erfolgte die Elution mit dem dargestellten Imidazol-Gradienten. Der Balken zeigt die zusammengefassten und für Experimente genutzten Volumina.

Zu 15 µl Proteinlösung wurden 5 µl Probenpuffer gegeben und durch Erhitzen für 5 min auf 95 °C denaturiert (PMC Digital Dry Block Heater, Barnstead/Thermolyne). Die Proteinmenge betrug 1 µg je Spur. Abweichungen davon sind angegeben. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum durchgeführt. Zunächst wurde eine Spannung von 120 V gewählt, die später auf 150 V erhöht wurde. Nach ca. 2,5 h wurde die Elektrophorese beendet. Es wurde die “miniVE vertical electrophoresis system”-Apparatur der Firma Amersham™ verwendet.

Der Molekulargewichts-Marker setzt sich zusammen aus Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), α-Lactalbumin (14,4 kDa).

2.2.7 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

- Entfärbelösung (10 % Essigsäure; 45 % (v/v) Methanol; 45 % Aqua bidest.)
- Färbelösung (Entfärbelösung; 0,2 % Coomassie-Brillant-Blau G250)

Zu färbende Gele wurden für 1 h in einer Schale mit Färbelösung auf einem Rundschüttler (KS 500, Janke & Kunkel IKA Labortechnik) behandelt. Das Entfärben erfolgte auf dem selben Rundschüttler unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis zum nächsten Morgen. Zur Dokumentation wurde eine Digitalkamera (CAMEDIA E-10, Olympus) verwendet.

2.2.8 Western-Blot-Analyse

- Puffer 1 (0,3 M Tris-HCl, pH 10,4; 20 % (v/v) MeOH)
- Puffer 2 (25 mM Tris-HCl, pH 10,4; 20 % (v/v) MeOH)
- Puffer 3 (Puffer 2 + 40 mM γ-Aminocapronsäure; 0,01 % SDS)
- Fast-Green-Färbelösung (0,01 % Fast-Green; 50 % (v/v) MeOH; 1 % Essigsäure)
- TBST (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 80)

Die getrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-blotting auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham™ Hybond™-ECL) übertragen. Dazu diente eine Blotting-Apparatur mit Graphit-Elektroden (25 x 25 cm) und Blotting-Papier der Firma WHATMAN®.

Der Transfer-Stapel setzte sich von unten (Kathode) nach oben (Anode) wie folgt zusammen:

- 9 Blotting-Papiere, getränkt in Puffer 3
- SDS-Gel, gewaschen in Puffer 3
- Nitocellulose-Membran (Amersham™ Hybond™-ECL), getränkt in Puffer 2
- 3 Blotting-Papiere, getränkt in Puffer 2
- 6 Blotting-Papiere, getränkt in Puffer 1

Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur mit $0,78 \text{ mA/cm}^2$ für 2 h. Danach erfolgte die Anfärbung der Membran mit Fast-Green zum Überprüfen des Transfers und der Markierung der Marker-Banden. Dazu wurde die Membran 5 min in Fast-Green-Färbelösung unter Schütteln inkubiert, anschließend mit Aqua bidest. gewaschen und nach dem Markieren der Marker-Banden mit NaOH 0,02 M entfärbt. Die Membran wurde dann über Nacht im Kühlraum mit Roti®-Block blockiert.

Die blockierte Membran wurde zunächst mit Aqua bidest. gespült und anschließend 2-mal 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran zunächst wieder mit Aqua bidest. gespült, um dann 2-mal 5 min und 2-mal 10 min mit TBST gewaschen zu werden. Die nachfolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Die Waschschriffe sind analog zu denen nach der Behandlung mit dem primären Antikörper. Als letztes wurde die Membran 3-mal in Aqua bidest. gespült.

Die Detektion der Chemilumineszenz (2.2.3) erfolgte mit dem "ECL Western blotting detection reagents and analysis system" vom Amersham™. Dazu mussten die zwei Lösungen "detection solution1" und "detection solution2" vorher zu gleichen Teilen gemischt werden. Das Substrat wurde nach 1 min abgesaugt und die Belichtungszeit betrug 10 s. Die Markierungen der Markerbanden wurden zur Zuordnung der Signale auf den Film übertragen.

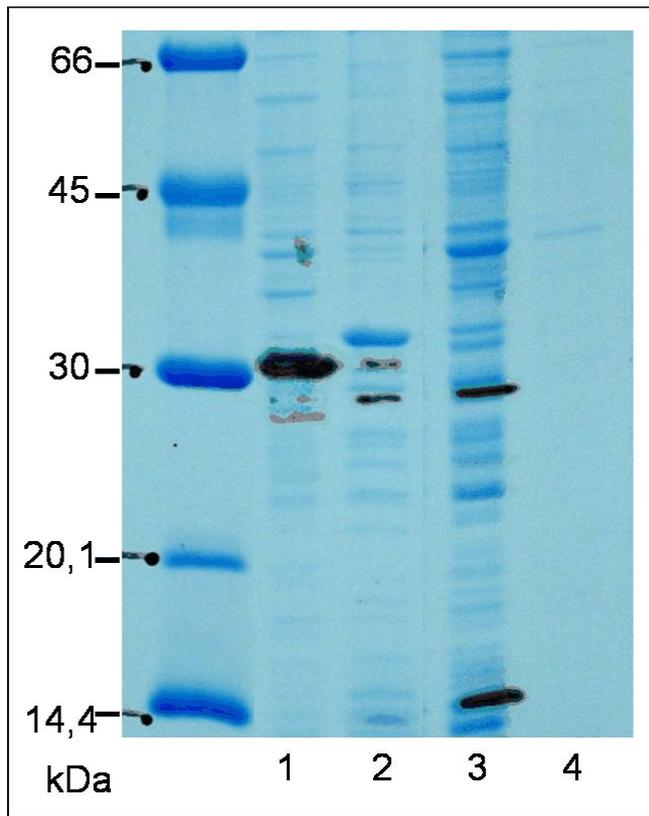


Abb. 2-2 SDS-PAGE und Western-Blot

Es wurde heterolog in Bakterien produziertes Protein aus zwei Bakterienkulturen gewonnen. Die eine Kultur enthielt ein Plasmid mit dem Sanguinarin-Reduktase-Gen (Spuren 1 und 2), die andere den leeren Vektor (Spuren 3 und 4). Die aus den Kulturen gewonnenen Proteine wurden durch Zentrifugation in den 100000xg-Überstand (Spuren 1 und 3) sowie das mikrosomale Pellet (Spuren 2 und 4) getrennt. Von diesen vier Proteinfractionen wurden jeweils 2-mal 15 μ l mit 7,5 μ g Protein auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (2.2.6). Nach der Elektrophorese wurde die eine Hälfte des Gels mit Coomassie gefärbt (2.2.7) und die andere Hälfte zur Western-Blot-Analyse auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (2.2.8). Als primärer Antikörper diente ein Anti-His-tag-Antikörper aus Maus, welcher durch einen mit Alkalischer-Phosphatase-markierten sekundären Antikörper detektiert wurde. Über das Bild des Coomassie-gefärbten Gels (blau) wurde das Bild des Western-Blots (schwarz) gelegt.

2.2.9 Teilsequenzierung des Sanguinarin-Reduktase-Proteins

(Kooperation mit Dr. K.-P. Rücknagel und Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle)

5 µg Sanguinarin-Reduktase gelöst in 100 µl 1 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer pH 8,0 wurden mit 10 mM DTE reduziert und anschließend mit 2 % 4-Vinylpyridin alkyliert. Durch Ultrafiltration erfolgte das Umpuffern in frischem 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer pH 8,0. 50 µl Lösung mit 1 µg Protein wurden mit 200 ng Trypsin verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden über HPLC getrennt und mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (REFLEX II, Bruker Daltonik) analysiert. Acht der Peptide konnten identifiziert und nach Edman sequenziert werden.

2.3 Enzymassay

NADPH-generierendes System (1 mM Glucose-6-phosphat; 20 µM NADP^+ ; 10 mU/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

Die Umsatzrate der Sanguinarin-Reduktase und der Mutanten wurde über den Anstieg an gebildetem Dihydrosanguinarin ermittelt. Dieser konnte aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften des Produktes mit einem Fluoreszenzreader (Fluorolite™ 1000, Dynatech Laboratories) als Fluoreszenzanstieg gemessen werden. Die für die Messung des Dihydrosanguinarins optimale Anregungswellenlänge von $\text{Ex } 365 \pm 25 \text{ nm}$ und Emissionswellenlänge von $\text{Em } 450 \pm 65 \text{ nm}$ wurde bereits in früheren Arbeiten ermittelt [Weiß 2004]. Der Einfluss der Fluoreszenz des Sanguinarins ist unter diesen Bedingungen vernachlässigbar. Es wurde eine Lampenspannung von 12,0 V gewählt. Die Messung erfolgte in einer 96-well-Mikrotiterplatte als 8fache Bestimmung. Dazu wurden je well 200 µl 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 mit Cosubstrat und Enzymlösung vorgelegt, dann die Reaktion durch Zugabe von 70 µl Sanguinarinlösung gestartet und nach 10 s die Reaktion durch Zugabe von 30 µl 1 M HCl gestoppt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich daher auf die Endkonzentration im Assay. Das Cosubstrat NADPH wurde durch ein generierendes System gebildet, welches 10 min vorher gemischt wurde. Die Sanguinarinlösung wurde im Bereich von 0 bis 5 µM als Substrat verwendet. Wenn angegeben erfolgte der Zusatz der 2 mM Glutathion 10 min vorher direkt zur Sanguinarinlösung. In den Fällen eines Zusatzes von Dihydrosanguinarin wurde dieses 10 min

vorher zur Enzymlösung gegeben. Um Initialbedingungen widerzuspiegeln, wurde die Proteinmenge so angepasst, dass höchstens 10 % des Substrats umgesetzt wurden. Über eine Kalibrierkurve erfolgte die Umrechnung der Fluoreszenzen in Dihydrosanguinarin-Konzentrationen. Von diesen wurde die geringe Konzentration nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins abgezogen. Durch Einbeziehung der Proteinkonzentration im Assay konnte die Umsatzrate je mg Protein angegeben werden.

2.4 Hemmung durch Iodacetamid

In Tris-Puffer 50 mM pH 7,0 wurden 0,5 ml Iodacetamid 20 nM für 30 min mit Sanguinarin-Reduktase 125 ng inkubiert. Danach wurde 1 mM Glutathion zugegeben und weitere 10 min inkubiert. In einer weiteren Probe wurde zunächst die Sanguinarin-Reduktase für 10 min mit Glutathion inkubiert und anschließend erfolgte der Zusatz von Iodacetamid für 30 min. Als Kontrollen dienten eine Probe nur mit Glutathion und Sanguinarin-Reduktase, sowie eine weitere Probe nur mit der Sanguinarin-Reduktase. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität durch Zugabe von NADH 20 μ M und Sanguinarin 7 μ M und Abstoppen der Reaktion mit MeOH/HCl (18 mM HCl) nach 10 min. Es wurde der Fluoreszenzabfalls (Ex 485 ± 20 nm und Em 580 ± 50 nm) zwischen den Proben t_{10} (Abstoppen nach 10 min) und t_0 (Abstoppen nach 0 min) gemessen, und daraus über eine Kalibriergerade der Abfall der Sanguinarinkonzentration bestimmt.

2.5 Computer-Modellierung und 3D-Homologie-Modell

(Kooperation mit M. Lawson und Prof. W. Sippl, Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität, Halle)

Die Berechnungen wurden auf einem Pentium IV 2,2 GHz Linux-Cluster mit dem Modellierungsprogramm MOE 2008.10 (Chemical Computing Group) durchgeführt. Die Sequenz der Sanguinarin-Reduktase wurde an der Röntgenstruktur des Proteins 1XQ6 (chain A) mithilfe der BLOSUM35 Ersetzungsmatrix ausgerichtet. Die generierten Strukturen wurden dann mit dem AMBER99-Kraftfeld unter Berücksichtigung des Born-Solvatations-Modells energieminimiert. Die stereochemische Qualität wurde mit der PROCHEK Software überprüft und alle Parameter für eine gute Qualität wurden erfüllt (88,4 % in bevorzugten Bereichen,

10,7 % in zusätzlich erlaubten Bereichen sowie 0,9 % in generell erlaubten Bereichen, keine Ausreißer). Die separate Überprüfung, der in der Sanguinarin-Reduktase zusätzlich enthaltenen Schleife mit PROCHEK, zeigte bis auf die Aminosäuren Val¹⁰⁵ und Tyr¹¹⁹ alle Aminosäuren in bevorzugten oder erlaubten Bereichen. Die Konformation des NADPH wurde durch Überlagerung des Protein-Rückgrates vom Modell der Sanguinarin-Reduktase und der template-Struktur des 1XQ6-Proteins übernommen und energieoptimiert. Das Sanguinarin wurde in der Alkanolamin-Form in die Substrat-Bindungstasche mit der GOLD Software (Cambridge Crystallographic Data Centre) mit Standardparametern des Programms gedockt. Von den erzeugten Docking-Lösungen wurde die mit erwarteter Ausrichtung zu NADPH und zum aktiven Serin¹⁵³ zur nachfolgenden Energieoptimierung ausgewählt, um die während des Docking als starr betrachtete Substrat-Bindungstasche an das Substrat anzupassen. Die visuelle Überprüfung des Dockings wurden mit der MOE 2008.10 Software (Chemical Computing Group) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Das Gen und das Protein der Sanguinarin-Reduktase

3.1.1 Strukturaufklärung

Das Protein der Sanguinarin-Reduktase wurde aus einer Zellkultur von *Eschscholzia californica* isoliert [Weiß *et al.* 2006]. Aus dem nativen, gereinigten Protein wurden durch Trypsin-Spaltung erste Peptidfragmente gewonnen, welche nach Edman sequenziert wurden [Weiß 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die vollständige Strukturaufklärung. Dazu wurden insgesamt acht Peptidfragmente nach Edman sequenziert (2.2.9) und aus den Aminosäuresequenzen degenerierte PCR-Primer abgeleitet (2.1.7). Mit mehreren Primer-Kombinationen wurden PCR-Reaktionen am DNA-temple einer cDNA-Bank von *Eschscholzia californica* durchgeführt [angelegt von W. Schwartze, Viehweger *et al.* 2006]. Aus den erhaltenen Amplimeren wurde eine Hybridisierungs-Sonde von 170 bp abgeleitet (Abb. 3-1), welche synthetisiert und zum Screening derselben cDNA-Bank verwendet wurde. Unter den gefundenen ca. zehn Klonen war mindestens ein cDNA-Klon, dessen Gen-Sequenz mit der Sequenz der Peptidbruchstücke korrelierte und mit der aus dem bekannten Molekulargewicht der Sanguinarin-Reduktase [Weiß *et al.* 2006] abgeschätzten Aminosäure-Anzahl übereinstimmte. Dieser wurde auch in der EST-Datenbank von *Eschscholzia californica* (Floral Genome Network, Cornell University) identifiziert. Die Expression dieser cDNA als His-tag-Protein in Bakterien lieferte eine funktionelle Sanguinarin-Reduktase (3.1.3). Die codierende DNA und die Aminosäure-Sequenz wurden damit der Sanguinarin-Reduktase zugeordnet (Abb. 3-1).

3.1.2 Die Introns

Die Suche nach dem Gen der Sanguinarin-Reduktase wurde sowohl mit der cDNA-Bank als auch mit genomischer DNA durchgeführt. Die aus genomischer DNA erhaltenen PCR-Produkte wiesen gegenüber der cDNA-Bank eine große Anzahl zusätzlicher Basenpaare auf. Durch Vergleich der Sequenzen dieser PCR-Produkte wurden drei Introns ermittelt (Abb. 3-2). Das vollständige Gen und die Aminosäure-Sequenz der Sanguinarin-Reduktase wurden in die NCBI-nr-Datenbank eingestellt und sind unter GU338458 auffindbar.

3.1.3 Klonierung und heterologe Expression

Um größere Mengen des Sanguinarin-Reduktase Proteins zur Verfügung zu stellen, wurde dieses rekombinant hergestellt. Zur PCR-basierten Amplifizierung des Gens wurde als template das Plasmid der cDNA-Bank benutzt, welches den ORF der Sanguinarin-Reduktase enthält. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pET-23d (Abb. A-2) ausgewählt, das sich für heterologe Expression von Proteinen aus *Eschscholzia californica* in *E. coli* (BL 21) bewährt hatte [Schwartz 2007]. Auf diese Weise wurde am C-terminalen Ende des exprimierten Proteins ein 6-His-tag angefügt, wodurch die übliche Reinigung an einer Ni²⁺-Matrix möglich wurde. Die heterolog exprimierte Sanguinarin-Reduktase wurde im 100000xg-Überstand der Bakterienkultur nachgewiesen (Abb. 2-2) und aus dieser Fraktion gewonnen. Die FPLC-basierten Isolierung (2.2.5), lieferte eine Proteinfraction, die ohne weitere Reinigung für enzymatische Experimente verwendet werden konnte.

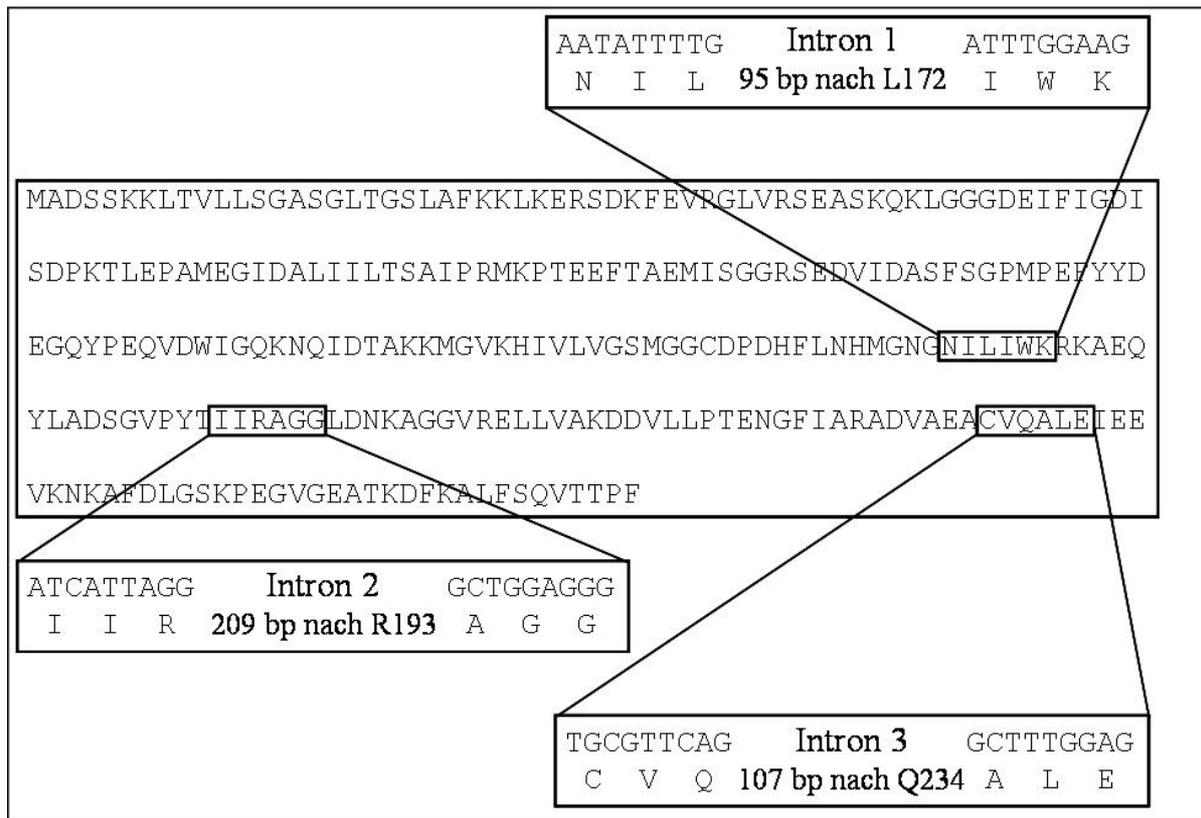


Abb. 3-2 Das vollständige Gen der Sanguinarin-Reduktase

Sequenz der Introns:

Intron 1 GTGAGTTTTTTTTTAATCTGACTCGTCTTACTTAAATAGATCCAAGACCTG
 CCAAATATTGATTATTTAGATTAATCAAACATCATTGAAATGCAG

Intron 2 TAAAATGAGTTTTCTTTTACTTTTAAACCCATACAGTAAAATTTGAACTC
 TGGTCTCTACTGGAAAAACACAAAACTATCTTAGGACTTCACTATAG
 TAGAGTAGACTAATCAGCTATTGAGTGTTGTTTTTAGGGTTTAAAGAATGG
 TTCATTTGGTGAGATCTGTAGCAACCCCCTTATCTAATTGATGTATTGGG
 TGAAACAGG

Intron3 GTACATCTATCTTGCATTTATGGCATTATGCAACCACACCTCGGTATTC
 TGAAATCTGAATCGAAATCTGAATCTAAATCGCTTACTGTCGTCGTGATC
 ATGACAG

3.2 Enzymatische Parameter der Sanguinarin-Reduktase und der Einfluss der Produkthemmung

Die enzymatische Charakterisierung der genuinen und der rekombinanten Sanguinarin-Reduktase erfolgte über die Bestimmung von Initialraten der Produktbildung. Dafür wurde die Rate der Dihydrosanguinarin-Entstehung bei verschiedenen Sanguinarinkonzentrationen fluorimetrisch quantifiziert. Die sehr ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften von Dihydrosanguinarin und dem gleichzeitig anwesenden Cosubstrat NADP/NADPH machten eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz des Produktes unmöglich. Deshalb wurde ein Endpunkt-Verfahren entwickelt, welches die Fluoreszenz der Cosubstrate durch Zusatz von HCl ausschaltete und zugleich die Reaktion abstoppte. Die Abhängigkeit der so ermittelten Initialrate von der Substratkonzentration ist in Abb. 3-3 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die Umsatzrate im Bereich $< 0,5 \mu\text{M}$ zunächst ansteigt, oberhalb von $0,5 \mu\text{M}$ Sanguinarin jedoch stagniert bzw. abfällt, besonders beim genuinen Enzym. Da aus früheren Experimenten bereits Hinweise auf eine Produkthemmung existierten, wurde der Einfluss des Produkts auf die Umsatzrate im Folgenden näher untersucht. Abb. 3-4A zeigt, dass bereits geringe Konzentrationen von Dihydrosanguinarin die Umsatzrate von Sanguinarin drastisch verringern, ohne dass diese Hemmung durch steigende Substratkonzentrationen aufgehoben werden kann. In Gegenwart von $0,15 \mu\text{M}$ Dihydrosanguinarin führt offenbar die Bildung von weiterem Dihydrosanguinarin (z. B. aus $2 \mu\text{M}$ Sanguinarin) zu einer vollständigen Blockade der enzymatischen Umsetzung. Diese Daten weisen auf eine nicht-kompetitive Hemmung der Sanguinarin-Reduktase durch ihr Produkt Dihydrosanguinarin hin und bestätigen frühere Ergebnisse [Weiß *et al.* 2006], wo ein Absinken der Umsatzrate bei steigenden Substratkonzentrationen $> 5 \mu\text{M}$ gezeigt wurde. Der Austausch des Cosubstrats NADPH gegen NADH führte zu einer starken Verlangsamung der Reaktion und zur Aufhebung oder Verminderung dieser Hemmung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der Zusatz von 2 mM Glutathion ebenfalls zu einer drastischen Verringerung der Umsatzrate der Sanguinarin-Reduktase führt. Diese Glutathionkonzentration ist auch in der intakten Zelle zu erwarten (s. u.). Sanguinarin bildet einen nichtkovalenten Komplex mit Glutathion [Paczulla 2004] dessen Dissoziationskonstante mit $400 \mu\text{M}$ durch Kapillarelektrophorese bestimmt wurde [H. H. Rüttinger, M. Vogel, W. Roos unveröffentlicht].

Auch in diesem Fall wird die Produkthemmung fast vollständig aufgehoben: Wie aus Abb. 3-4B hervorgeht, bewirkt z. B. 0,1 μM Dihydrosanguinarin keine Verringerung der Umsetzung des Sanguinarins. Offenbar fungiert der Sanguinarin-GSH-Komplex als Reservoir an freiem Sanguinarin, welches geringe Substratkonzentrationen freisetzt (ca. 1/6 des eingesetzten Sanguinarins) und damit zu kleineren Produktbildungsraten führt. Allerdings ist die gemessene Umsatzrate nicht allein durch die aus der Dissoziation des Komplexes resultierende Gleichgewichtskonzentration an freiem Sanguinarin erklärbar. Wie aus Abb. 3-4A hervorgeht, erlauben 0,5 μM Sanguinarin eine Umsatzrate von ca. 300 nKat/mg Protein. Dieselbe Konzentration sollte als freies Sanguinarin im Dissoziationsgleichgewicht des Sanguinarin-GSH-Komplexes ($K_d = 400 \mu\text{M}$) vorliegen, wenn 3 μM Sanguinarin und 2 mM Glutathion angeboten werden. Unter diesen Bedingungen wird jedoch eine Umsatzrate von nur ca. 60 nKat/mg Protein gemessen (Abb. 3-4B).

Es ist daher die Annahme naheliegend, dass die Freisetzung des Sanguinarins aus dem Sanguinarin-GSH-Komplex langsamer erfolgt als der Verbrauch am Enzym und deshalb die verfügbare Substratkonzentration rasch unter die Konzentration aus dem Dissoziationsgleichgewicht absinkt. Damit wird die Produktbildung verlangsamt. Die alternative Erklärung, d. h. ein direkter Hemmeffekt des Glutathions auf das Enzym, ist wenig wahrscheinlich, da bei einer vergleichsweise langen Reaktionszeit (die zur Umsetzung von ca. 86 % des Substrats führt) Glutathion keine wesentliche Verringerung der Umsetzung bewirkt (Abb. 3-5 Säulen C und D). Auch wenn also die langsame Substratfreisetzung aus dem Sanguinarin-GSH-Komplex die initiale Umsatzrate limitiert, kann über längere Zeit eine Nachlieferung des Substrats und der Austausch gegen das Produkt erfolgen und damit der katalytische Prozess weiterlaufen.

Die Daten aus Abb. 3-5 (Säule B) zeigen, dass bei einer Verlangsamung der Substratumsetzung Produktkonzentrationen gebildet werden können, welche bei direktem Zusatz die Umsetzung stoppen. Während in Gegenwart von Glutathion ca. 0,27 μM Dihydrosanguinarin gebildet werden können, wird ohne Glutathion die Reaktion bereits durch 0,15 μM Dihydrosanguinarin vollständig gehemmt (Abb. 3-4A).

Übereinstimmend mit den (weniger präzisen) Messungen der Umsatzrate aus früheren Arbeiten [Weiß *et al.* 2006, Weiß 2004] lässt sich feststellen, dass die Hemmung der Sanguinarin-Reduktase durch ihr Produkt Dihydrosanguinarin immer dann abnimmt, wenn die Produktbildungsrate verlangsamt ist. Dies stimmt mit dem Wesen einer Produkthemmung

überein, welches in einer zu langsamen Ablösung des Produkts vom aktiven Zentrum, verglichen mit der Geschwindigkeit der Bindung neuer Substratmoleküle besteht.

Aus den genannten Gründen erfolgte der Vergleich kinetischer Parameter zwischen verschiedenen Formen der Sanguinarin-Reduktase (genuin, rekombinant, mutiert) im Rahmen dieser Arbeit stets in Gegenwart von 2 mM Glutathion. Auch wenn dabei die maximale Umsatzrate des Enzyms nicht bestimmt werden konnte, erlauben die geringen Produktbildungsraten in Gegenwart von Glutathion eine Sättigungskinetik und damit einen Vergleich von Initialraten bei verschiedenen Substratkonzentrationen, d. h. eine Abschätzung der Substrataffinität der Sanguinarin-Reduktase (K_m 0,19-0,31 μM , Abb. 3-6).

Vieles spricht dafür, dass die Produkthemmung der Sanguinarin-Reduktase nur *in vitro* auftritt und unter den Bedingungen der intakten Zelle keine wesentliche Rolle spielt:

- Bei der im Cytoplasma zu erwartenden durchschnittlichen Konzentration an Glutathion von > 2 mM [Herrmann 2003] sollte die Konzentration des freien Sanguinarins nicht mehr als 1/6 der Gesamtkonzentration betragen. Wie oben dargestellt, spielt unter diesen Bedingungen die Produkthemmung keine wesentliche Rolle.
- Mit großer Wahrscheinlichkeit findet in der Zelle keine Anreicherung von Dihydrosanguinarin statt, sondern die Umwandlung dieser Verbindung in Dihydrochelirubin, Dihydromacarpin und weitere Dihydroalkaloide. Deren Oxidationsprodukte haben eine geringe Affinität zur Sanguinarin-Reduktase, sind weniger toxisch und verlassen außerdem wieder die Zelle [Weiß *et al.* 2006]. Für diese Umwandlung des primär gebildeten Dihydrosanguinarins spricht auch, dass die Reduktion selbst hoher Konzentrationen (10-500 μM) von extern angebotenen Sanguinarin nicht gestoppt wird, sondern praktisch zur vollständigen Umsetzung führt [Weiß *et al.* 2006].

Aus Abb. 3-6 geht hervor, dass unter dieser Bedingung, trotz relativ hoher Schwankungsbreite der Umsatzraten des genuinen Enzyms, die kinetischen Daten der genuinen und der rekombinanten 6-His-Sanguinarin-Reduktase statistisch nicht unterscheidbar sind.

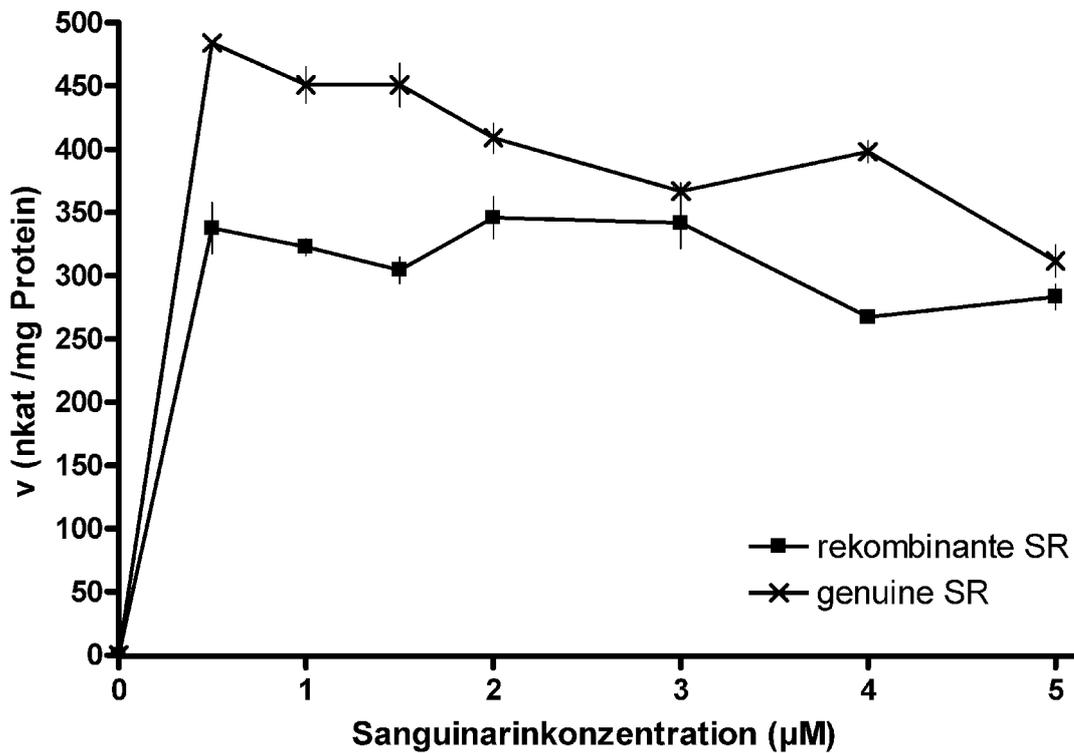


Abb. 3-3 Umsatzraten der Sanguinarin-Reduktase

Die Messung der initialen Umsatzraten erfolgte nach 2.3 und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 8$). Es wurden 15,3 ng/ml genuine und 14 ng/ml rekombinante 6-His-Sanguinarin-Reduktase eingesetzt.

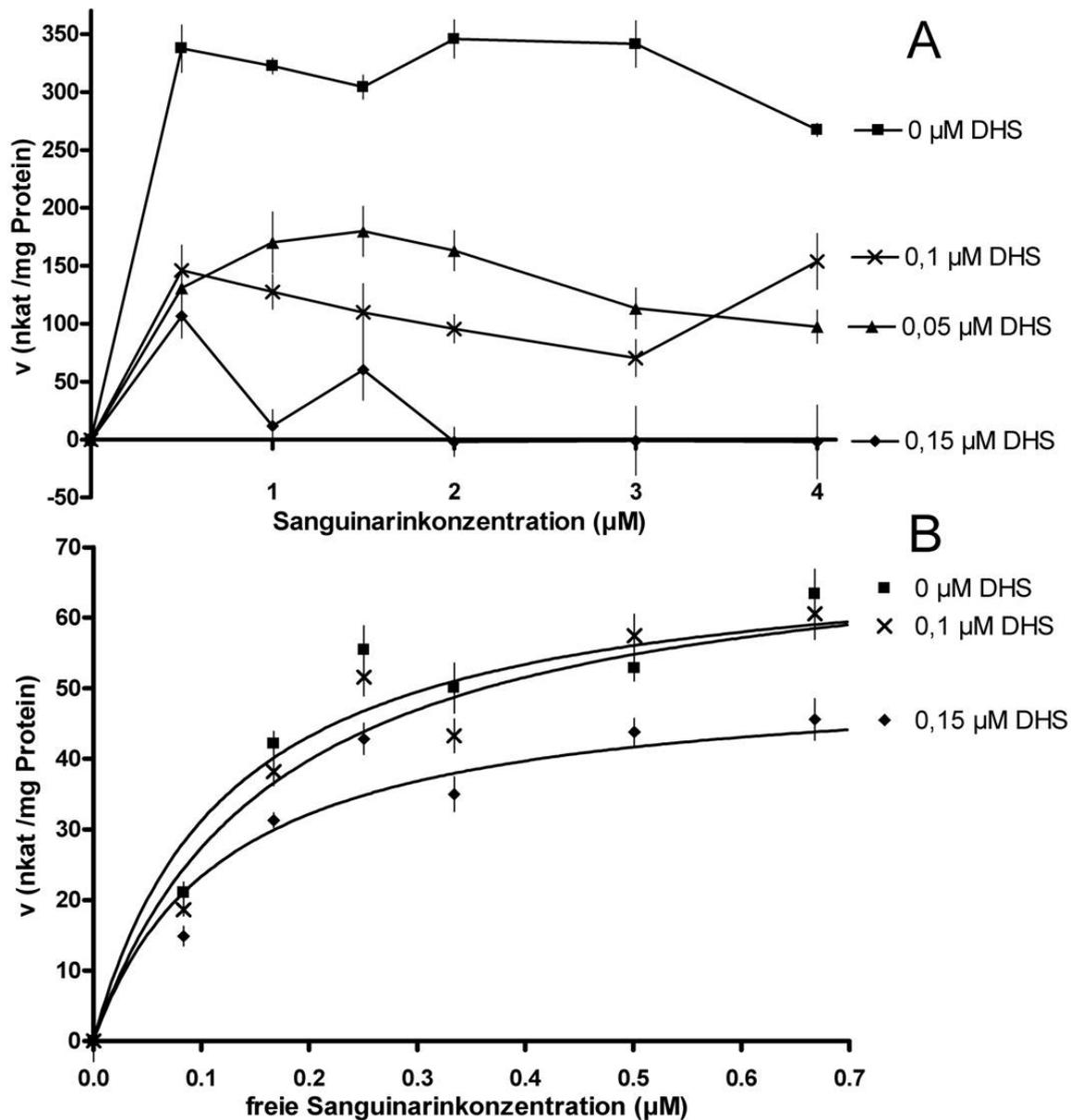


Abb. 3-4 Enzymaktivität von 6-His-Sanguinarin-Reduktase, Einfluss von Dihydrosanguinarin

Die Messung der initialen Umsatzraten erfolgte nach 2.3 und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Die X-Achse im Teil B zeigt die aus der Dissoziation des Sanguinarin-GSH-Komplexes (2 mM GSH, $K_D = 400 \mu\text{M}$), resultierenden Gleichgewichtskonzentrationen an freiem Sanguinarin. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 8$). Es wurden folgende Konzentrationen der 6-His-Sanguinarin-Reduktase eingesetzt.

A) 14 ng/ml in Abwesenheit von Glutathion

B) 336,3 ng/ml in Gegenwart von 2mM Glutathion

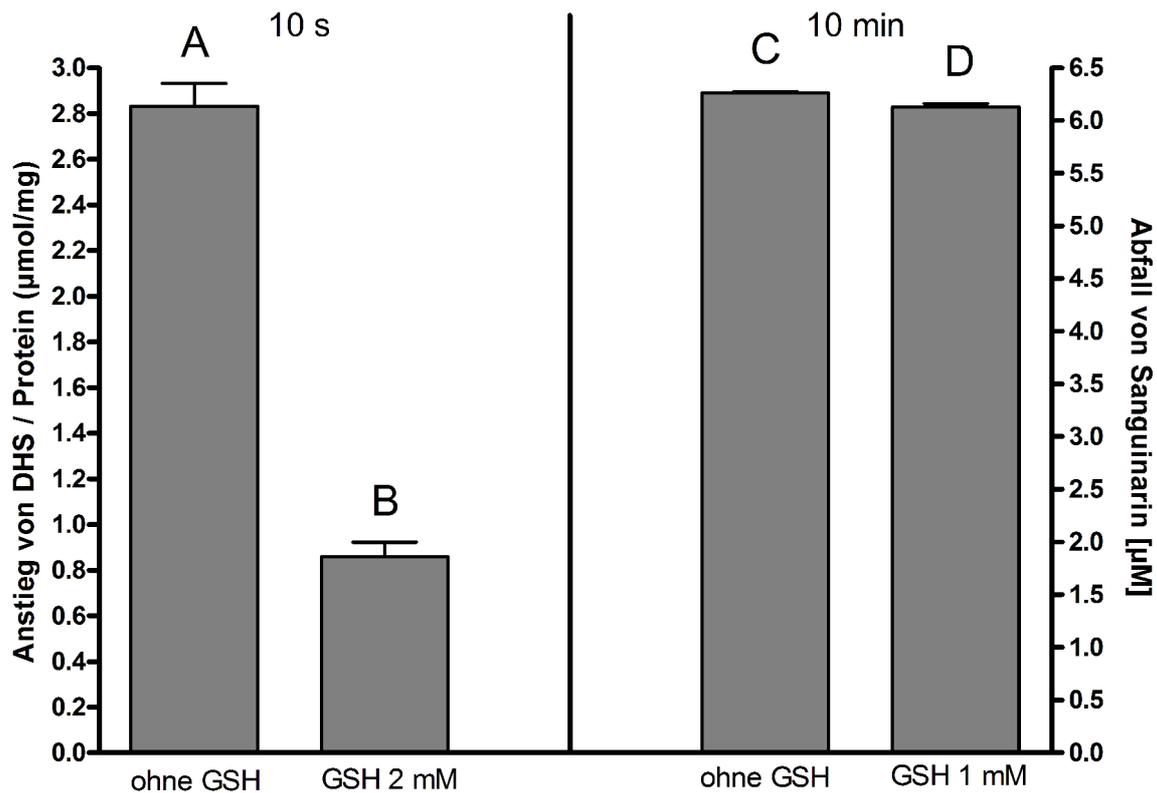


Abb. 3-5 Einfluss des Glutathions auf die Sanguinarin-Reduktase-Aktivität, Vergleich der Messung nach 10 s und 10 min

Säulen A und B: Die Messung der initialen Umsatzraten (10 s Messung) erfolgte nach 2.3 und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Es wurden 5 µM Sanguinarin zugesetzt und maximal 10 % davon umgesetzt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD (n = 8). Es wurden folgende Konzentrationen der 6-His-Sanguinarin-Reduktase eingesetzt.

A) 0,014 mg/l in Abwesenheit von Glutathion

B) 0,3363 mg/l in Gegenwart von 2 mM Glutathion (gebildetes DHS 0,27 µM)

Säulen C und D : Die Enzymaktivität wurde über die Abnahme der Sanguinarin-Konzentration nach 2.4 bestimmt. 7 µM Sanguinarin wurden durch 0,5 mg/l genuine Sanguinarin-Reduktase in 10 min zu ca. 86 % umgesetzt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD (n = 4) von Fluoreszenzmessungen derselben Probe.

C) Abwesenheit von Glutathion

D) 1 mM Glutathion

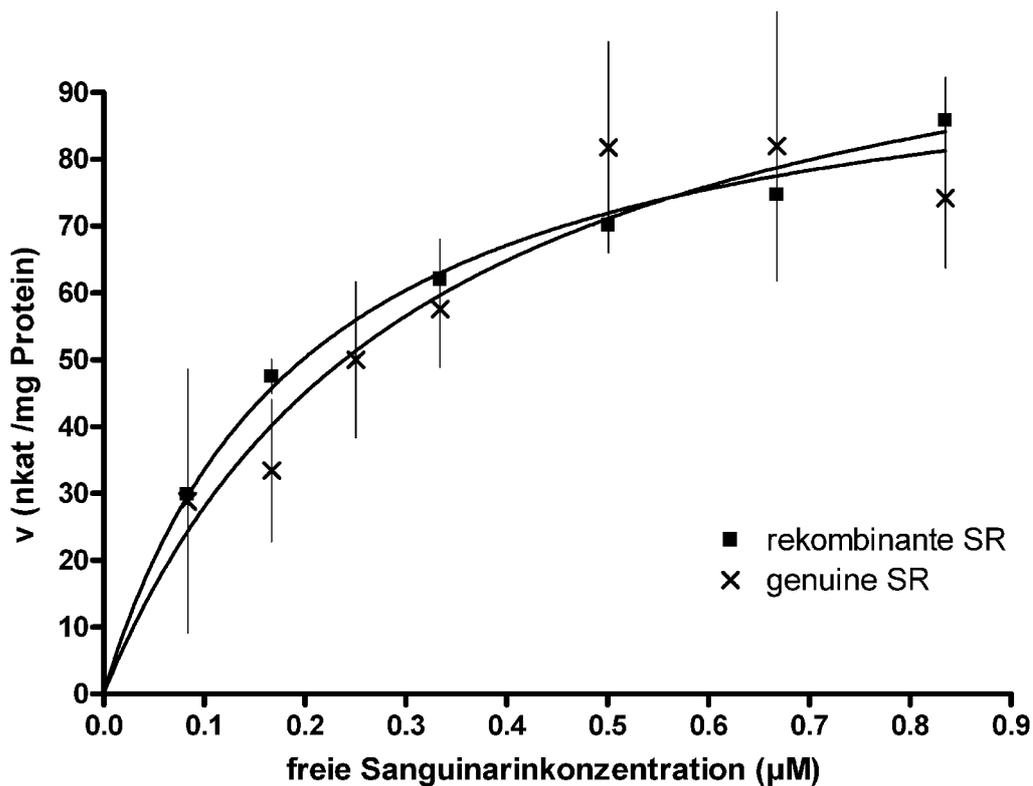


Abb. 3-6 Vergleich der Umsatzraten von rekombinantem und genuinem Enzym

Die Messung der initialen Umsatzraten erfolgte nach 2.3 und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Die X-Achse zeigt die aus der Dissoziation des Sanguinarin-GSH-Komplexes (2 mM GSH, $K_D = 400 \mu\text{M}$), resultierenden Gleichgewichtskonzentrationen an freiem Sanguinarin. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 8$). Es wurden 43,82 ng/ml genuine und 336,3 ng/ml rekombinante 6-His-Sanguinarin-Reduktase eingesetzt. Die Regression der Kurven als Michaelis-Menten-Kinetik ergab folgende kinetische Konstanten:

genuine Sanguinarin-Reduktase (K_m $0,31 \pm 0,21 \mu\text{M}$, V_{max} $115,7 \pm 31,9 \text{ nKat/mg}$)

rekombinante Sanguinarin-Reduktase (K_m $0,19 \pm 0,04 \mu\text{M}$, V_{max} $100 \pm 6,4 \text{ nKat/mg}$)

3.3 Homologie-Modell der Raumstruktur der Sanguinarin-Reduktase

3.3.1 Pflanzliche Homologe

Als Ausgangspunkt für ein breiteres Verständnis der biologischen Funktion der Sanguinarin-Reduktase wurde eine Suche nach homologen Proteinen in Pflanzen unternommen. Dabei wurden zahlreiche Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit gefunden (Abb. 3-7). Alle Homologen gehören zur Großfamilie der “Rossmann fold NAD(P)H/NAD(P)⁺ binding proteins”. Die größte Ähnlichkeit unter den annotierten Proteinen besteht zu Nukleosid-Epimerasen/Dehydratasen und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Reis, Arabidopsis und Mais. Für diese in den Datenbanken dominierenden Pflanzenspezies ist keine Sanguinarin-Reduktase-Aktivität bekannt. Wegen der relativ geringen Präsenz von Proteinen anderer Spezies in den zugänglichen Datenbanken ist die Auffindung von weiteren Homologen bzw. Proteinen mit Sanguinarin-Reduktase-Aktivität nicht sehr wahrscheinlich. Allerdings zeigte die Progesteron-5 β -Reduktase aus *Digitalis* (dankenswerterweise von Dr. Müller-Uri, Universität Erlangen zur Verfügung gestellt), eine geringe Sanguinarin reduzierende Aktivität (ca. 0,2 % der rekombinanten Sanguinarin-Reduktase, Müller und Roos, persönliche Mitteilung).

Für ein Protein mit hoher Sequenzähnlichkeit zur Sanguinarin-Reduktase, 1XQ6, das Produkt des Gens At5g02240, sind Röntgen-Strukturdaten zugänglich (DOI:10.2210/pdp1XQ6/pdb), die als Ausgangspunkt für die Erstellung eines Homologie-Modells dienen konnten. Dieses Modell, welches in Kooperation mit der AG Prof. W. Sippl erstellt wurde, ist in Abb. 3-8 dargestellt. Neben typischen Merkmalen von “Rossmann fold NAD(P)H/NAD(P)⁺ binding proteins” (u. a. die GX(X)GXXG-Bindedomäne für NAD(P)H benachbart zu einer α -Helix) findet sich in der Sanguinarin-Reduktase eine Bindungstasche, welche in der Lage ist, das Sanguinarin-Molekül in der Alkanolamin-Form aufzunehmen. Dies wurde durch Docking-Studien bestätigt (Vogel *et al.* 2010).

Von allen untersuchten pflanzlichen Homologen unterscheidet sich die Sanguinarin-Reduktase vor allem durch folgende Merkmale:

- zwei Inserts von 4 und 13 Aminosäuren (Insert 94-97, AEMI und Insert 102-114, SEDVIDASFSGPM) und
- den Austausch einzelner Aminosäuren, u.a. Cys¹⁵⁷, Asp¹⁵⁸, Phe¹⁶², Met¹⁶⁶. Dabei sind die Unterschiede in der Nähe des putativen aktiven Zentrums von besonderer Bedeutung (3.4.).

Abb. 3-7 Vergleich der Aminosäuresequenz der Sanguinarin-Reduktase und ihrer nächsten Sequenz-Homologen

Die Suche in der NCBI-pr-Datenbank wurde mit der vollständigen Peptid-Sequenz der Sanguinarin-Reduktase unter Benutzung des BLASTp Algorithmus und der BLOSUM 62 Matrix durchgeführt. Identische Aminosäuren sind rot markiert. Weitere Informationen zu den Proteinen enthält die Tab. A-1 im Anhang.

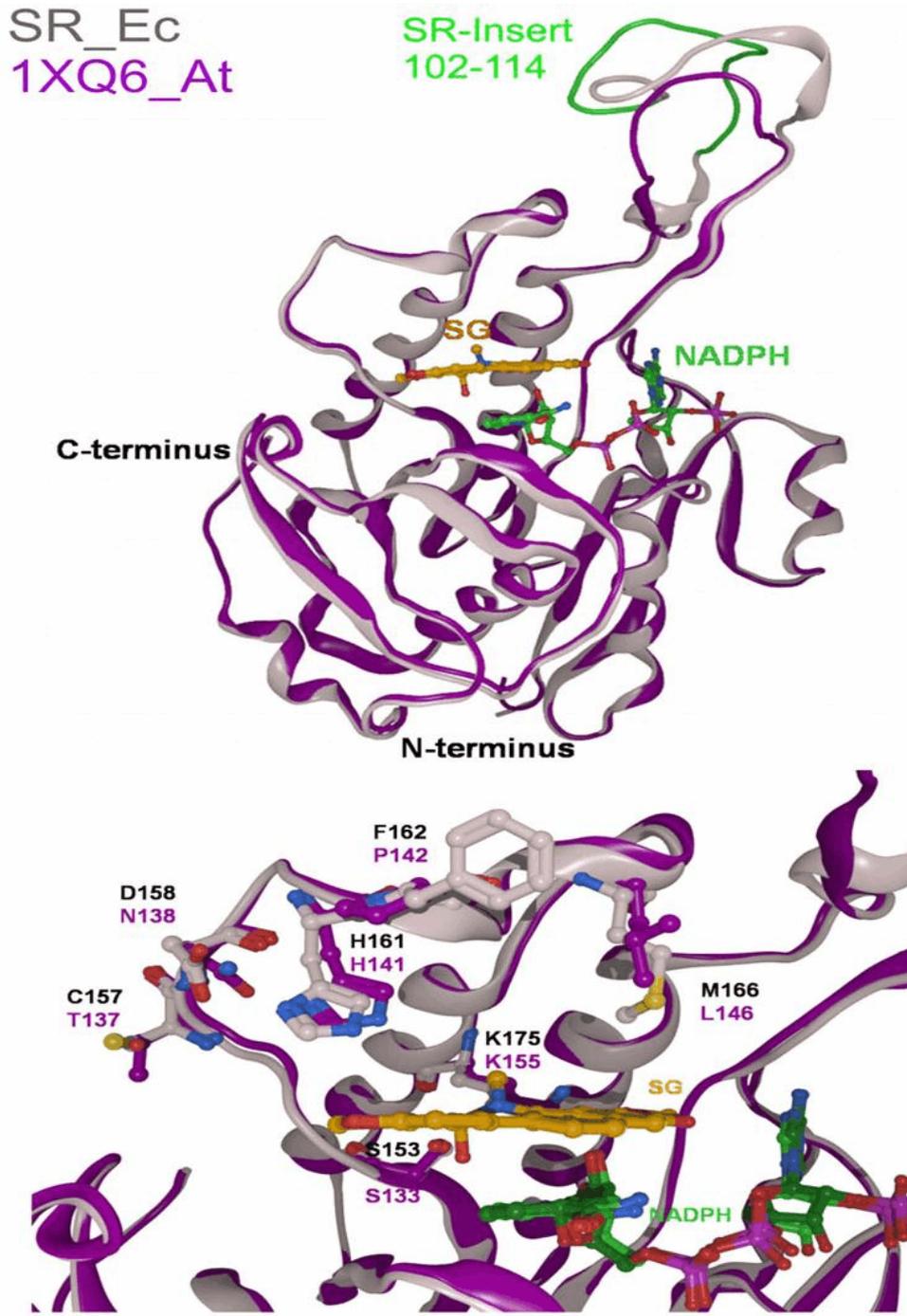


Abb. 3-8 3D-Homologie-Modell der Sanguinarin-Reduktase

Die Sanguinarin-Reduktase (grau) sowie die als Referenz dienende Kristallstruktur des Proteins 1XQ6 (violett) sind überlagert und zusammen mit dem gedocktem Substrat Sanguinarin und Cosubstrat NADPH dargestellt. Der obere Teil zeigt das Rückgrat der Proteine sowie den Loop des Inserts 102-114, im unteren Teil ist der Bereich des aktiven Zentrums vergrößert dargestellt.

3.3.2 Homologe aus Bakterien und Mensch

Nach Erstellung des 3D-Modells konnte in Proteindatenbanken nach Proteinen ähnlicher Raumstruktur gesucht werden, welche nicht bereits als sequenzhomologe Proteine erfasst waren (Abb. 3-7). Überraschender Weise wurden Proteine mit ähnlicher 3D-Struktur unter bakteriellen und Humanproteinen entdeckt. Die drei Proteine, deren Raumstruktur am besten mit dem Modell übereinstimmt, sind in Abb. 3-9 dargestellt. Es handelt sich dabei um eine NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase aus *Bacillus halodurans* (NED-Bh), die humane Biliverdin-IX- β -Reduktase (BVRB-Hs) und eine humane 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 8 (17 HSD-Hs). Diese Proteine zeigen eine hohe Strukturähnlichkeit zum Modell der Sanguinarin-Reduktase bzw. zum Protein 1XQ6, obwohl die Aminosäure-Sequenzen erheblich voneinander abweichen (Abb. 3-10). Für keines dieser Proteine ist eine Sanguinarin-Reduktase-Aktivität bekannt.

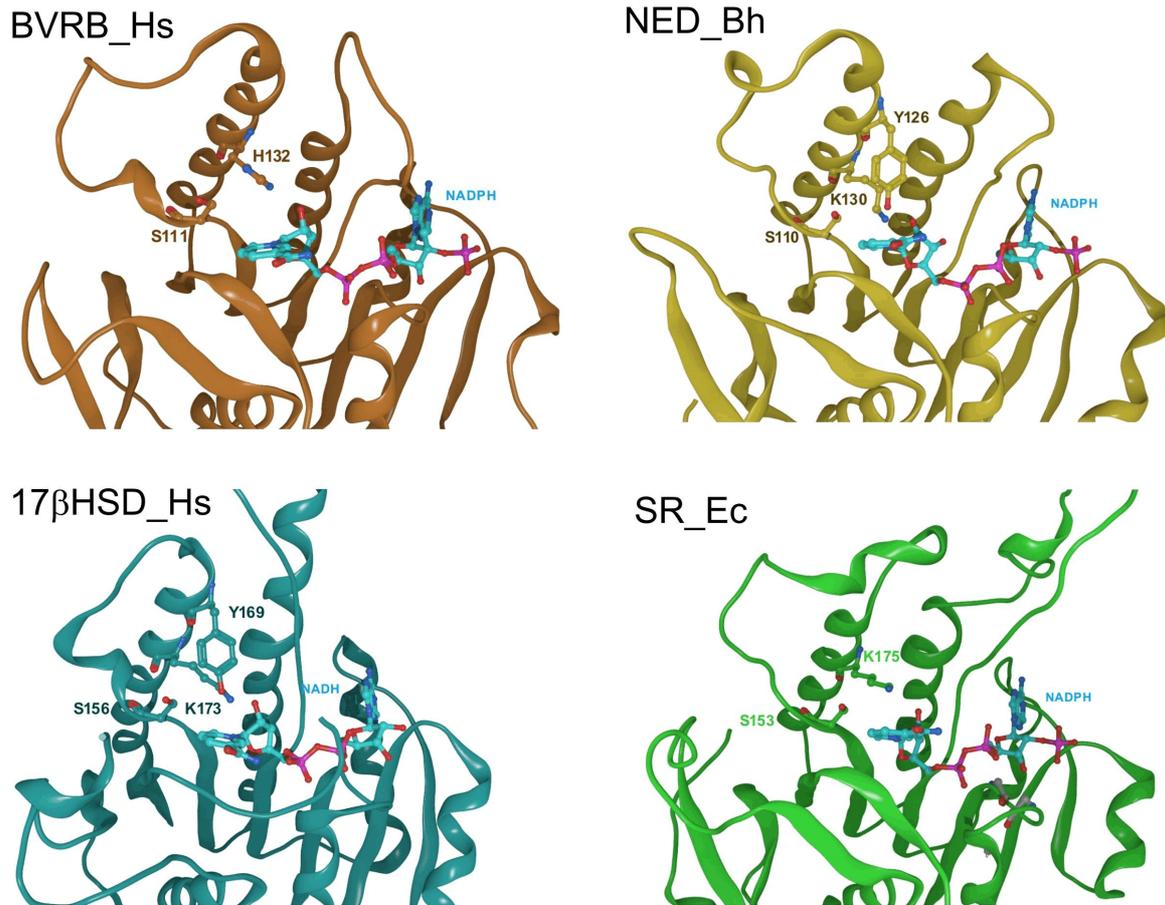


Abb. 3-9 3D-Struktur der Strukturhomologen

Mit dem FATCAT Web server und der Kristallstruktur des 1XQ6-Proteins wurde die Uniprot_kb Datenbank durchsucht. Strukturen mit einer mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) unter 2.5 Å wurden ausgewählt. Aminosäuren der Substrat-Bindungsregion sind gekennzeichnet.

SR_Ec, Sanguinarin-Reduktase, *Eschscholzia californica*

NED_Bh, NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, *Bacillus halodurans*

BVRB_Hs, Biliverdin-IX-β-Reduktase, *Homo sapiens*

17βHSD_Hs, 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 8, *Homo sapiens*

SR_Ec	MADSSK-KIT	VLLSGASGL-	TGSLAFKLLK	ERSDKFVVRG	LVRSEASKOK	L-----	49
NED_Bh	-----MR	VLVVGANKK-	VARYLLSELK	NKGH--EPVA	MVRNEEQGPE	L-----	40
BVRB_Hs	MAVK-----K	IAIFGATGQ-	TGLTTLAQAV	QAGYEVTMLV	RDSSRLPS--	-----	42
17SHSD_Hs	MASQLQNRIR	SATLALVTGAG	SGIGRAVSVR	LAGEGATVAA	CDLDRFAACE	TVRLLGGPGS	60
SR_Ec	--G--GGDEI	FIGDISDPKT	LEPAMEGIDA	LIIITSALFR	MKPT-----	----EETAE	95
NED_Bh	--RERASDI	VVANLEED--	FSHAFASIDA	VVFAAGSGPH	T-----	-----	77
BVRB_Hs	-EGP-RPAHV	VVGDVLQAAD	VDKTVAQDA	VIVLLGTRND	LSPTTVMSEG	A---RNIVAA	97
17SHSD_Hs	KECPPRFNHA	AF-----QAD	VSEARAAR-C	LLEQVQACFS	RPPSVVVSCA	GITQDEHLLH	114
SR_Ec	MISGCRSEDV	IDASFGPMP	EFYYDEGQYP	EQVDWIGQKN	QIDTAKIMGV	KHIVLVGSMG	155
NED_Bh	----GADKTI	L-----	-----	--IDLWCAIK	TIQEAEKRCI	KRFIMVSSVG	112
BVRB_Hs	MKAHGVDKVV	ACT--SAFL-	-----	-LWDPTKVPP	RLQAVTDDHI	RMHKVLRRESG	143
17SHSD_Hs	MSEDDWDKVI	AVNLKGTFL-	-----	-VTQAAACAL	VSNGCRGSII	NISSIVCKVG	162
SR_Ec	GCDPDHFLNH	MGNGNIIWK	RKAEQYLADS	GVPYTIIRAG	GLDNK-AGGV	RELLVAKDDV	214
NED_Bh	TVDDPQ--GP	MNMRHYLVAK	RLADDEIKRS	SLDYTIIVRPG	PLSNE-ESTG	KVTVSPHFSE	169
BVRB_Hs	----LKYVAV	M--PPHIG--	-----	----DQPLTG	AYTVTLDRG	PSRVISKHD-	180
17SHSD_Hs	NVGQTNYAAS	K--AGVIGLT	QTAARELGRH	GIRCNSVLPG	FIATPMTQKV	PQKVVDKITE	220
SR_Ec	LLPTENGFLA	RADVAEACVQ	ALEIEEVKNK	AFDLGSKPEG	VGEATKDFKA	LFSQVTTPF	273
NED_Bh	ITRS-----IT	RHDVAKVIAE	LVDQQHTIGK	TFEVLNGDTP	IAKVVEQL--	-----	213
BVRB_Hs	---LGH-E--	-----MLRC	LTTDEYDGHS	TYPHQYQ--	-----	-----	206
17SHSD_Hs	MIPMGH-LGD	PEDVADVAVF	LASED-SGYI	TGTSVEVTGG	LFM-----	-----	261

Abb. 3-10 Vergleich der Aminosäuresequenz der Sanguinarin-Reduktase und ihrer bekannten 3D-Homologen

Aminosäuresequenzen der in Abb. 3-9 dargestellten Proteine mit hoher struktureller Ähnlichkeit zum 3D-Modell der Sanguinarin-Reduktase. Identische Aminosäuren sind rot markiert. Weitere Informationen zu den Proteinen enthält die Tab. A-2 im Anhang.

3.4 Gerichtete Mutagenese im Sanguinarin-Reduktase-Protein

Das als template für das 3D-Modell der Sanguinarin-Reduktase gewählte Protein 1XQ6 wurde kloniert und heterolog exprimiert. Das gereinigte 6-His-Protein zeigte keine Reduktion von Sanguinarin (Abb. 3-12). Für die in Abb. 3-7 gezeigten Homologen der Sanguinarin-Reduktase ist ebenfalls keine solche Aktivität bekannt. Zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Sanguinarin-Reduktase wurde deshalb die Rolle typischer, nur in der Sanguinarin-Reduktase, vorkommender Aminosäuren untersucht, für die das 3D-Modell in Abb. 3-8 eine Funktion im Katalysemechanismus voraussagte. Zu diesem Zweck wurde eine Serie gerichteter Mutationen durchgeführt. Als Ausgangspunkt diente das im pET-23d Vektor bereits klonierte Gen der Sanguinarin-Reduktase. Das Einbringen der Mutationen erfolgte mittels PCR (2.1.9); anschließend wurde die als template dienende unveränderte (methylierte) DNA durch die Restriktase Dpn I entfernt [Weiner *et al.* 1994].

Zusätzlich zum Austausch der gewünschten Aminosäure wurde in die Mutanten-DNA eine neue Restriktase-Schnittstelle eingefügt oder entfernt, um eine rasche Überprüfung der mutierten DNA-Sequenz durch Restriktionsverdau zu ermöglichen. Außerdem erfolgte eine Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung der Plasmide. Die Expression und Reinigung der Mutanten-Proteine erfolgte analog zur Sanguinarin-Reduktase. Eine Bestätigung der Aminosäure-Austausche erfolgte durch Isolierung der Mutanten-Enzyme (SDS-PAGE) und MS-basierte Sequenzierung.

Im Folgenden werden die Veränderungen im Molekül der Sanguinarin-Reduktase und die Konsequenzen für die Enzymaktivität dargestellt. Alle Messungen wurden in Gegenwart von Glutathion ausgeführt, um die Produkthemmung durch Dihydrosanguinarin gering zu halten (3.2). Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Sanguinarinkonzentration ist in Abb. 3-11 dargestellt. Die dabei ermittelten kinetischen Konstanten sind in Tab. 3-1 zusammengefasst. Sie erlauben erstmals Aussagen zur Bedeutung distinkter Peptide und Aminosäuren für die katalytische Aktivität des Enzyms.

1. Deletion des Inserts 102-114 (Δ 102-114-Mutante)

Dieses Insert stellt eine Besonderheit der Sanguinarin-Reduktase dar, da es in keinem der Homologen vorhanden ist. Seine Deletion führt zu einem drastischen Abfall der katalytischen Aktivität dieses Enzyms. Da im 3D-Modell diese Peptidkette weit von der Substrat-Bindetasche

entfernt ist, muss ein allosterischer Effekt auf das aktive Zentrum angenommen werden, welcher die Raumstruktur auch in den vom Insert entfernten Regionen verändert.

2. Austausch von Serin¹⁵³ gegen Alanin (Ser¹⁵³-Ala-Mutante)

Ser¹⁵³ ist in allen Homologen vorhanden und zusammen mit einer basischen Aminosäure an der Interaktion mit den jeweiligen Substraten beteiligt. Sehr wahrscheinlich fixiert Ser¹⁵³ die 6-OH-Gruppe des Sanguinarins in Analogie zum Mechanismus der Biliverdin-IX- β -Reduktase des Menschen [Pereira *et al.* 2001, Maines 2005]. Der Verlust der OH-Gruppe des Ser¹⁵³ führt zu der erwarteten drastischen Reduzierung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität.

3. Austausch von Cystein¹⁵⁷ gegen Alanin (Cys¹⁵⁷-Ala-Mutante),

Austausch von Asparaginsäure¹⁵⁸ gegen Asparagin (Asp¹⁵⁸-Asn-Mutante),

Austausch von Histidin¹⁶¹ gegen Alanin (His¹⁶¹-Ala-Mutante)

Das 3D-Modell legt eine Triade aus Cys¹⁵⁷ über Asp¹⁵⁸ und His¹⁶¹ nahe, welche über drei Wasserstoffbrücken einen Dioxolan-Ring des Sanguinarins fixiert und damit erheblich zur spezifischen Substratbindung beiträgt. Der deutliche Verlust an Enzymaktivität sowohl der Cys¹⁵⁷-Ala-Mutante als auch der His¹⁶¹-Ala-Mutante unterstützen diese Vorstellung. Der Austausch von Asp¹⁵⁸ gegen Asn hat nur einen geringen Einfluss auf die Enzymaktivität. Dies legt nahe, dass für die Ausbildung der Triade die Carbonylkomponente der Asparaginsäure, nicht aber die OH-Gruppe essentiell ist. Die vom Modell geforderte Bindung des Substrates durch das His¹⁶¹ wird durch den hohen K_m -Wert der His¹⁶¹-Ala-Mutante unterstützt, was für eine verschlechtere Substratbindung spricht. Erwartungsgemäß liegt dann der Effekt der Cys¹⁵⁷-Ala-Mutation nicht primär in einer Veränderung der Affinität (K_m) sondern der katalytischen Effizienz. Die Restaktivität der His¹⁶¹-Ala- und Cys¹⁵⁷-Ala-Mutante könnte durch Wassermoleküle erklärt werden, welche (weniger effiziente) Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils verbleibenden Aminosäuren bilden.

Die neu gefundene Rolle von Cys¹⁵⁷ für die katalytische Aktivität wird durch biochemische Experimente unterstützt: die Reaktion des Sanguinarin-Reduktase-Proteins mit Iodacetamid im Verhältnis 2 nmol ICH₂-CONH₂ zu 1 nmol Protein führte zur fast vollständigen Blockade der Enzymaktivität (Abb. 3-13). Da die Sanguinarin-Reduktase nur zwei Cysteine enthält, wovon Cys²³² konserviert ist und in fast allen Homologen (also ohne Sanguinarin-Reduktase-Aktivität) ebenfalls vorkommt, sollte Cys¹⁵⁷ für die Aktivität der Sanguinarin-Reduktase essentiell sein.

4. Austausch von Phenylalanin¹⁶² gegen Prolin (Phe¹⁶²-Pro-Mutante)

Phe¹⁶² befindet sich in der Nähe des katalytischen Zentrums, ist jedoch im Protein 1XQ6 durch Prolin ersetzt. Aufgrund seiner Ringstruktur bildet Prolin starre Bereiche im Proteingerüst und hat damit einen starken Einfluss auf die Raumstruktur. Im Vergleich zu den unter 1. bis 3. genannten Mutationen führt der Austausch von Phe¹⁶² gegen Pro zu einer geringeren (aber signifikanten) Änderung der Enzymaktivität. Die "Versteifung" des Proteingerüsts durch Prolin könnte sich negativ auf den unter 1. erwähnten allosterischen Effekt des Inserts 102-114 auswirken und dadurch die Enzymkatalyse beeinflussen.

5. Austausch von Methionin¹⁶⁶ gegen Leucin (Met¹⁶⁶-Leu-Mutante)

Met¹⁶⁶ wurde ausgewählt, da es aufgrund der Voraussage des 3D-Modells am Rande der potentiellen Bindungstasche liegt und deren Form beeinflussen könnte. Dieser Austausch hat keinen Einfluss auf die Substrataffinität der Sanguinarin-Reduktase, wie der unveränderte K_m -Wert zeigt. Er führt jedoch zu einer messbaren Verschlechterung der katalytischen Effizienz, was mit der oben genannten Vermutung vereinbar ist. Veränderungen der Substratspezifität konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da außer Sanguinarin andere Benzophenanthridine nicht in ausreichender Reinheit zur Verfügung standen.

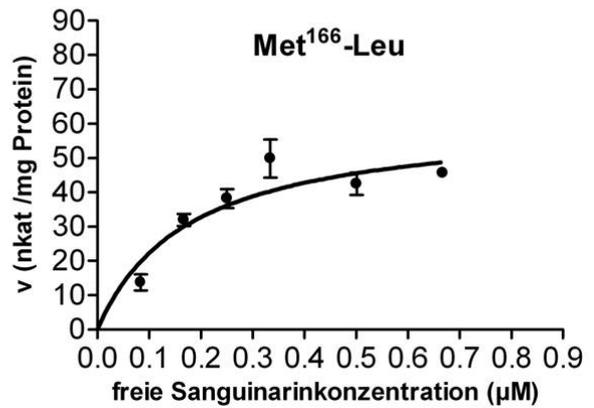
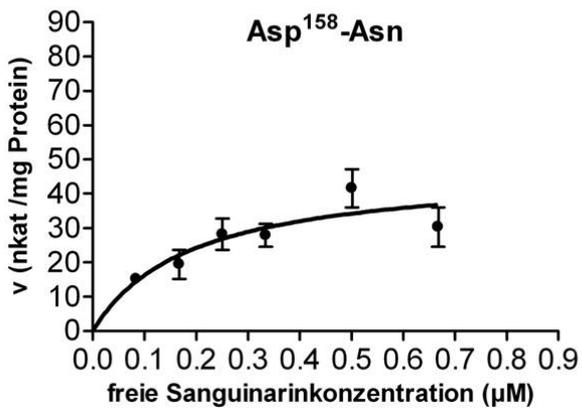
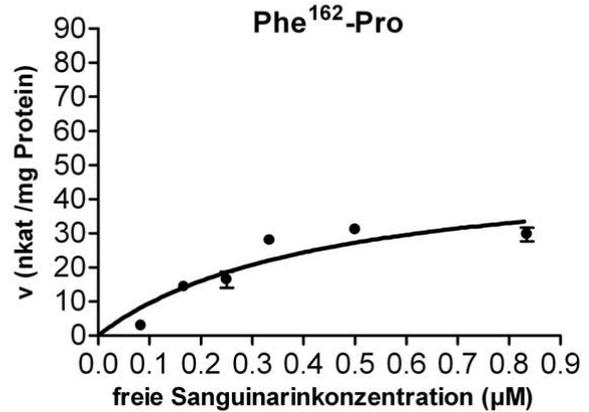
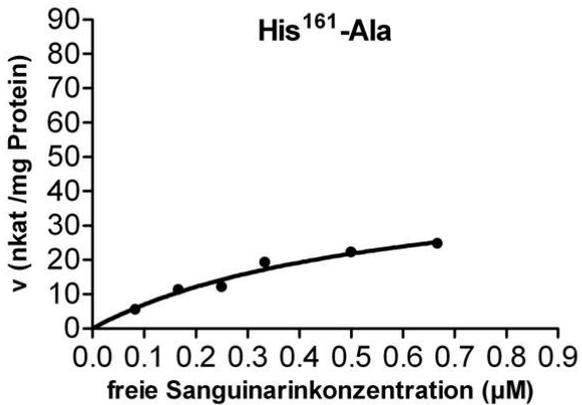
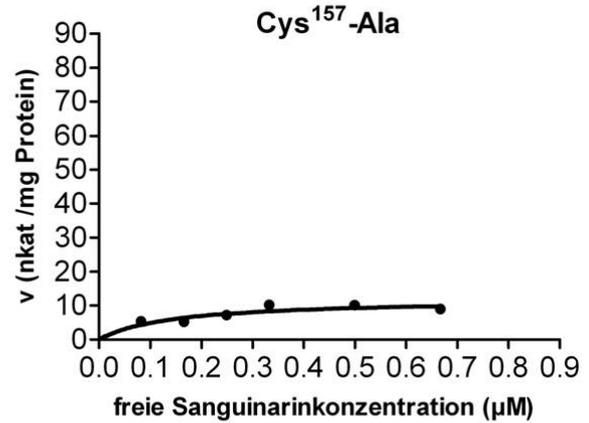
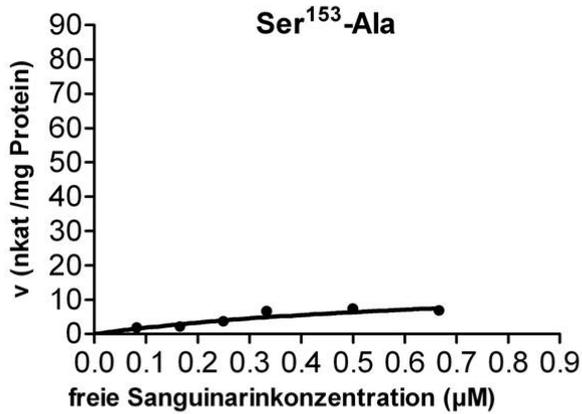
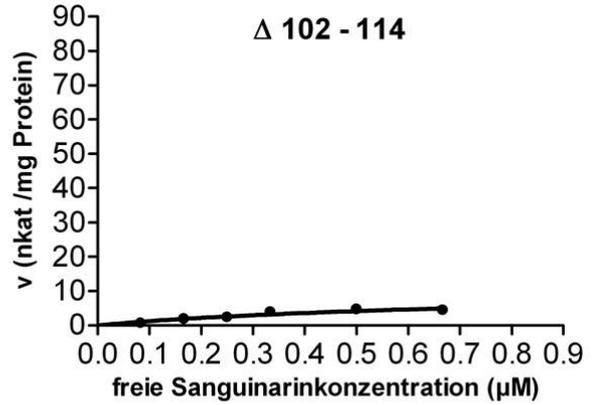
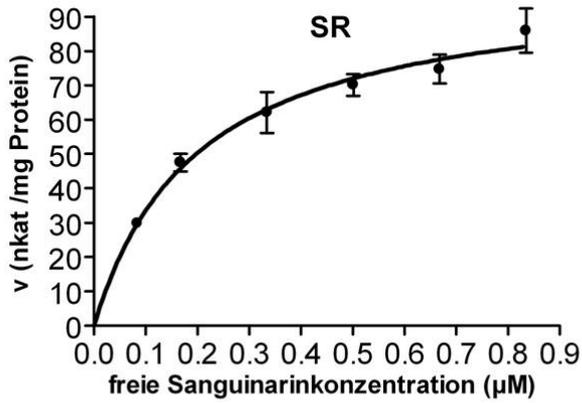


Abb. 3-11 Umsatzraten der Sanguinarin-Reduktase und experimentell erzeugter Mutanten

Die Messung der initialen Umsatzraten erfolgte nach 2.3, und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Die X-Achsen zeigen die aus der Dissoziation des Sanguinarin-GSH-Komplexes (2 mM GSH, $K_D = 400 \mu\text{M}$), resultierenden Gleichgewichtskonzentrationen an freiem Sanguinarin. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD (n = 8).

Es wurden folgende Proteinkonzentrationen eingesetzt:

6-His-Sanguinarin-Reduktase 336,3 ng/ml

Δ 102-114-Mutante 1369,38 ng/ml

Ser¹⁵³-Ala-Mutante 886 ng/ml

Cys¹⁵⁷-Ala-Mutante 503,94 ng/ml

His¹⁶¹-Ala-Mutante 156,31 ng/ml

Phe¹⁶²-Pro-Mutante 555,56 ng/ml

Asp¹⁵⁸-Asn-Mutante 70,05 ng/ml

Met¹⁶⁶-Leu-Mutante 185,19 ng/ml

Tab. 3-1 Kinetische Parameter der Sanguinarin-Reduktase und experimentell erzeugter Mutanten

Die Daten basieren auf der Michaelis-Menten-Regression der Kurven aus Abb. 3-11 und stellen Mittelwerte \pm SD (n = 8) dar. Für V_{\max}/K_m ist die Summe der relativen Standardabweichung aus V_{\max} und K_m angegeben.

Enzyme (As Nr. , Austausch)	V_{\max} (nKat/mg)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m	V_{\max}/K_m (%)
SR	100 \pm 6,4	0,19 \pm 0,04	531 \pm 145	100
Δ 102-114-Mutante	10,7 \pm 3,6	0,78 \pm 0,41	13,7 \pm 11,8	2,5
Ser ¹⁵³ -Ala-Mutante	16,0 \pm 6,3	0,75 \pm 0,46	21,3 \pm 21,1	4,0
Cys ¹⁵⁷ -Ala-Mutante	12,0 \pm 1,6	0,15 \pm 0,06	80,0 \pm 42,7	15,1
His ¹⁶¹ -Ala-Mutante	47,9 \pm 8,2	0,58 \pm 0,17	82,6 \pm 38,0	15,6
Phe ¹⁶² -Pro-Mutante	51,2 \pm 7,1	0,44 \pm 0,12	116 \pm 47,7	22,0
Asp ¹⁵⁸ -Asn-Mutante	46,8 \pm 8,1	0,19 \pm 0,10	250 \pm 174	47,1
Met ¹⁶⁶ -Leu-Mutante	61,5 \pm 6,2	0,18 \pm 0,05	342 \pm 129	64,5

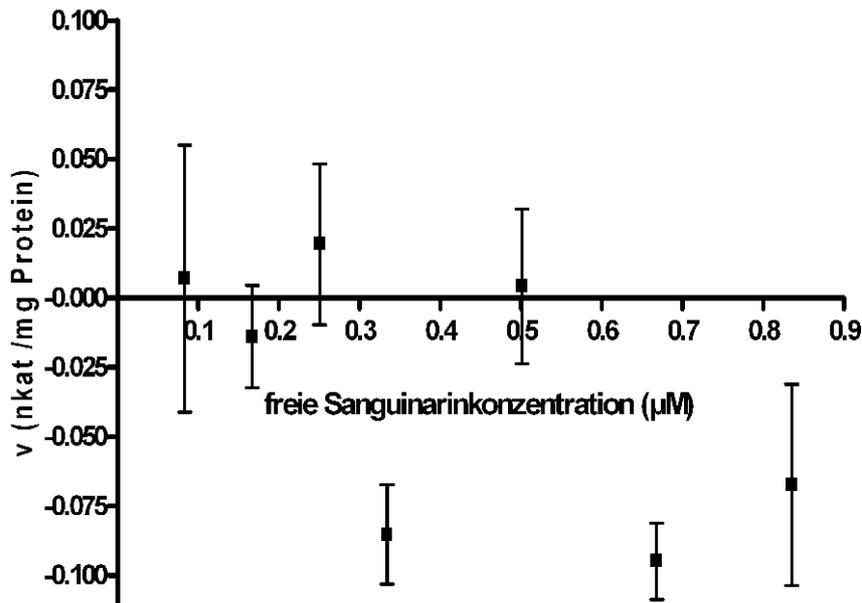


Abb. 3-12 Aktivitätsmessung des 1XQ6-Proteins

Das vom Gen At5g02240 codierte Protein 1XQ6 wurde analog zur Sanguinarin-Reduktase kloniert und heterolog exprimiert (2.1.1.8). Die Sequenz wurde aus der TAIR-Datenbank, (Stock-Nr. U13442) erhalten.

Die Messung der initialen Umsatzraten erfolgte nach 2.3, und wurde bereits um den geringen Anteil des nicht enzymatisch gebildeten Dihydrosanguinarins korrigiert. Die X-Achse zeigt die aus der Dissoziation des Sanguinarin-GSH-Komplexes (2 mM GSH, $K_D = 400 \mu\text{M}$), resultierenden Gleichgewichtskonzentrationen an freiem Sanguinarin. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 8$). Es wurden 14815 ng/ml rekombinantes 6-His-1XQ6-Protein eingesetzt.

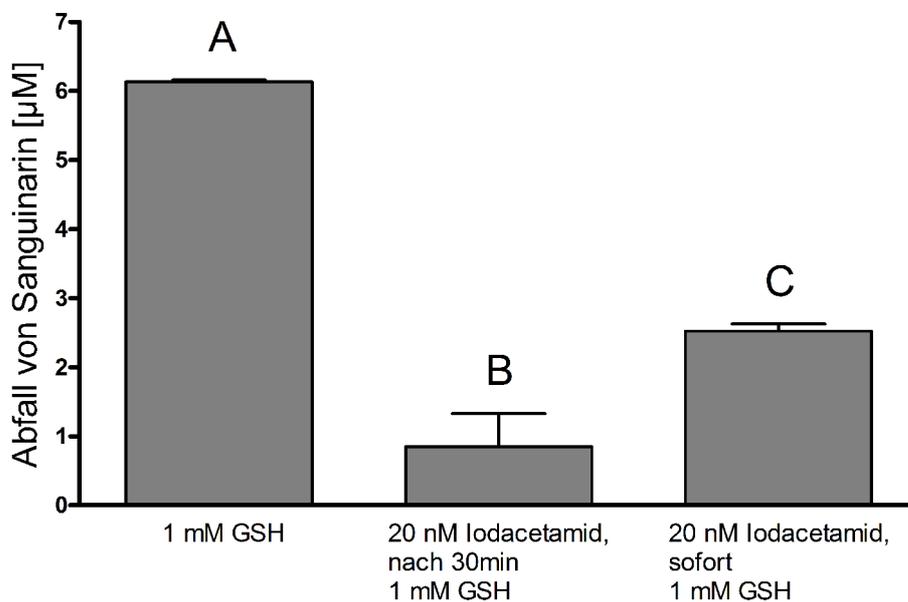


Abb. 3-13 Hemmung der Sanguinarin-Reduktase durch Iodacetamid

Die Enzymaktivität wurde über die Abnahme der Sanguinarin-Konzentration gemessen. Der Zusatz des Iodacetamid und die Messung der Sanguinarin-Reduktase erfolgten wie unter Methoden (2.4) beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 4$) von Fluoreszenzmessungen derselben Probe.

A) Zur Sanguinarin-Reduktase wurde Glutathion zugesetzt, nach 40 min erfolgte die Aktivitätsbestimmung.

B) Die Sanguinarin-Reduktase reagierte 30 min mit Iodacetamid, anschließend wurde Glutathion zugesetzt, nach 10 min erfolgte die Aktivitätsbestimmung.

C) Zur Sanguinarin-Reduktase wurde Glutathion zugesetzt, nach 10 min erfolgte die Zugabe von Iodacetamid, nach 30 min erfolgte die Aktivitätsbestimmung.

3.5 Immunologische Unterscheidung zwischen der Sanguinarin-Reduktase und dem Homologon 1XQ6

Die kinetischen Eigenschaften der Mutanten zeigten den stärksten Effekt bei der Deletion des Inserts 102-114. Die Struktur dieses Inserts konnte im 3D-Modell nicht detailliert erfasst werden, da eine homologe Struktur in allen bisher untersuchten Proteinen mit Ähnlichkeit zur Sanguinarin-Reduktase nicht enthalten ist. Das Homologie-Modell legt jedoch nahe, dass sich dieses Insert als Loop an der Oberfläche des Proteins befindet. Deshalb wurde versucht, mithilfe selektiver Antikörper diesen Strukturunterschied nachzuweisen. Dazu wurden sowohl die heterolog exprimierte Sanguinarin-Reduktase als auch das 1XQ6-Protein zur Provokation polyklonaler Antikörper genutzt. Für die Herstellung der Antikörper wurden größere Mengen der beiden rekombinanten Proteine benötigt, weshalb die Produktion im Fermenter (2.1.1.6.2) durchgeführt wurde. Die Reinigung erfolgte analog dem bisher benutztem Verfahren (2.2.5). Die Immunisierung von Kaninchen und Herstellung von Antiseren wurde in der AG Dr. U. Conrad, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben durchgeführt. Die anschließende Isolation der Immunglobuline erfolgte nach 2.2.2.1.

Aus den Western-Blots in Abb. 3-14 geht hervor, dass die gegen die Sanguinarin-Reduktase und gegen das 1XQ6-Protein hergestellten Antikörper tatsächlich unterschiedliche Bindespezifität besitzen. Während der anti-1XQ6-Antikörper beide Antigene detektiert, reagiert der anti-SR-Antikörper mit dem Protein der Sanguinarin-Reduktase, nicht aber mit 1XQ6. Da sich beide Proteine in ihrer 3D-Struktur im wesentlichen nur durch das Insert 102-114 unterscheiden (vgl. Abb. 3-8), ist es wahrscheinlich, dass der anti-SR-Antikörper spezifisch dieses Epitop bindet.

In Zellhomogenaten aus *Eschscholzia californica* können beide Antikörper die Sanguinarin-Reduktase detektieren, während im Zellhomogenat von *Arabidopsis thaliana* kein Protein detektierbar ist. Für 1XQ6 ist dies zunächst überraschend, da es sich um ein Protein aus *Arabidopsis thaliana* handelt. In der hier verwendeten Zellkultur ist es jedoch nicht vorhanden. Die erfolgreiche Etablierung der Antikörper bietet eine Möglichkeit zur immunologischen Differenzierung der Sanguinarin-Reduktase von ihren Homologen. Dies kann die Suche nach den evolutionären Vorläufern dieses Enzyms wesentlich erleichtern.

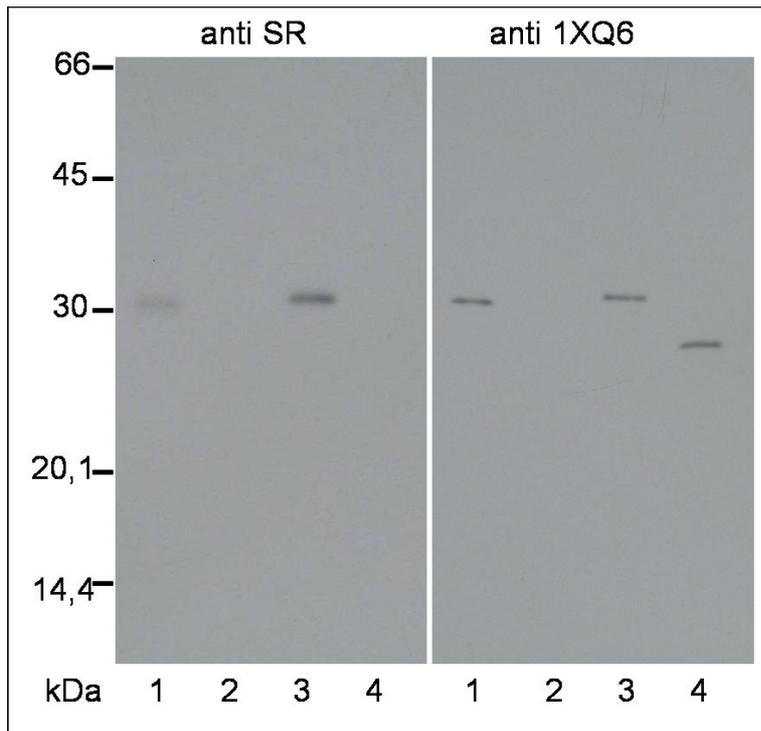


Abb. 3-14 Western-Blot zum Vergleich der Antikörper gegen die Sanguinarin-Reduktase und das 1XQ6-Protein

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Blotten zerschnitten und ein Teil mit dem Antikörper gegen die Sanguinarin-Reduktase in der Verdünnung 1:5000 behandelt. Für den zweiten Teil wurde der Antikörper gegen das 1XQ6-Protein in der Verdünnung 1:5000 benutzt. Als sekundärer Antikörper diente für beide Teile ein mit Meerrettichperoxidase markierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Rind in der Verdünnung 1: 3000.

Folgende Proteine wurden jeweils doppelt aufgetragen:

Spur 1 Zellhomogenat *Eschscholzia californica* 2 µg

Spur 2 Zellhomogenat *Arabidopsis thaliana* 2 µg

Spur 3 6-His-Sanguinarin-Reduktase 5 ng

Spur 4 6-His-1XQ6 Protein 5 ng

4. Diskussion

4.1 Sanguinarin-Reduktase und die Entgiftung von Benzophenanthridinen

Ausgehend von der hohen Cytotoxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide und der deutlich geringeren Cytotoxizität der Dihydroalkaloide [Dvorak *et al.* 2006a , Janovska *et al.* 2010, Kap. 1.3], kann die Sanguinarin-Reduktase als Entgiftungsenzym betrachtet werden, welches dem Schutz der Zellen von *Eschscholzia californica* vor dem selbst produzierten Toxin dient.

Das genuine Enzym ist in intakten Zellen zur Umwandlung enormer Alkaloid-Konzentrationen in der Lage, wie aus der Reduktionskapazität intakter Zellen hervorgeht: 500 μM Sanguinarin wird mit einer Rate von ca.5 nmol/min/Mio. Zellen umgewandelt [Weiß *et al.* 2006]. Das isolierte Enzym zeigt dagegen besonders bei hohen Alkaloidkonzentrationen eine weit geringere Kapazität, weil es nach kurzer Zeit durch sein Produkt Dihydrosanguinarin gehemmt wird (3.2), [Weiß *et al.* 2006].

Dieser Unterschied kommt sehr wahrscheinlich durch zwei wichtige Eigenschaften der Produzentenzelle zustande: Das in den Zellen vorhandene Glutathion verringert infolge der Komplexbildung mit Sanguinarin die Rate der Produktbildung und die Anhäufung von Dihydrosanguinarin wird durch seine Umsetzung zu höher substituierten Alkaloiden verhindert. Die zelluläre Schutzfunktion der Sanguinarin-Reduktase kann also nur zusammen mit ihrer Einbettung in die Biosynthese und der Komplexbildung des Sanguinarins mit Glutathion zum Tragen kommen. Die Existenz eines Zyklus aus Aufnahme, Reduktion, Metabolisierung und Wiederausscheidung (1.4) dient deshalb nicht nur der gefahrlosen Nutzung des Sanguinarins als Phytoalexin, sondern auch der Aufrechterhaltung der Sanguinarin-Reduktase-Aktivität, das heißt der Verhinderung der Produkthemmung. Deshalb erschien es sinnvoll, die in dieser Arbeit vorgenommenen Aktivitätsmessungen in Gegenwart der im Cytoplasma gemessenen Glutathion-Konzentration durchzuführen.

Der molekulare Mechanismus der Hemmwirkung des Dihydrosanguinarins auf die Umsetzung des Sanguinarins ist bisher unklar. Allerdings sprechen mehrere Beobachtungen dafür, dass die Hemmung auf einer zu langsamen Freisetzung der Produkte im Vergleich zur Substratbindung beruht.

- Bei einer Verlangsamung der Substratumsetzung können Produktkonzentrationen gebildet werden, welche bei direktem Zusatz die Umsetzung stoppen. Wie aus Abb. 3-5 hervorgeht, werden in Gegenwart von Glutathion 0,27 μM des Produktes gebildet;

dagegen wird bei direktem Zusatz ohne Glutathion die Reaktion bereits durch 0,15 μM Dihydrosanguinarin vollständig gehemmt (Abb. 3-4A).

- Wenn anstelle von NADPH das weniger geeignete Cosubstrat NADH verwendet wird, läuft die Reaktion deutlich langsamer ab, es wird jedoch keine Produkthemmung beobachtet [Weiß *et al.* 2006].

Damit ist die nicht-kompetitive Hemmung der Substratbindung durch das am Enzym verbleibende Produkt im Augenblick die wahrscheinlichste Erklärung für das Verhalten des isolierten Enzyms.

4.2 Reaktionsmechanismus der Sanguinarin-Reduktase

Die unter 3.4 dargestellten Effekte der gezielten Mutagenese auf die Enzymaktivität weisen besonders auf die Bedeutung der Aminosäuren Ser¹⁵³, Cys¹⁵⁷ und His¹⁶¹ hin.

In Analogie zu dem strukturhomologen Enzym Biliverdin-IX- β -Reduktase des Menschen [Pereira *et al.* 2001, Maines 2005] ist daher folgender Ablauf der Katalyse wahrscheinlich (Abb. 4-1):

- Das Sanguinarin wird in eine hydrophobe Bindungstasche eingepasst, die u.a. durch Met¹⁶⁶ begrenzt wird. Die Fixierung des Substrats erfolgt durch das Ser¹⁵³. An dieser Position befindet sich diese Aminosäure auch in allen homologen Enzymen. Im Falle der Sanguinarin-Reduktase wird die Spezifität der Bindung u.a. durch die Triade Cys¹⁵⁷/Asp¹⁵⁸/His¹⁶¹ gewährleistet, welche eine Wasserstoffbrücke zum Dioxolanring am Ring D des Benzophenanthridins ausbildet. Der zweite Dioxolanring (am Ring A) wird durch die Seitenkette des Lys¹⁷⁵ fixiert.
- Der Angriff des Hydrid-Ions des NAD(P)H erfolgt auf das C6 der Alkanolaminform des Sanguinarins. Die Abspaltung der dortigen OH-Gruppe ermöglicht die folgende Wasserbildung mit einem Proton des Ser¹⁵³. Das entstehende Anion wird durch das in der Nähe befindliche Kation des Lys¹⁷⁵ stabilisiert.

Die Sanguinarin-Reduktase nutzt also sehr wahrscheinlich den Basis-Reaktionsmodus einer großen Gruppe der "Rossmann fold"-NAD(P)H-abhängigen Reduktasen [Vogel *et al.* 2010].

Mindestens zwei vom aktiven Zentrum entfernte Strukturen haben einen allosterischen Einfluss auf die Proteinkonformation: das Insert 102-114 und das Phe¹⁶², welches ein Prolin ersetzt und damit eine höhere Flexibilität ermöglicht. Der Einfluss dieses Inserts (und eventuell des Inserts

94-97) kann durch das erstellte Homologie-Modell nicht abgebildet werden, da beide im template-Protein 1XQ6 nicht vorkommen.

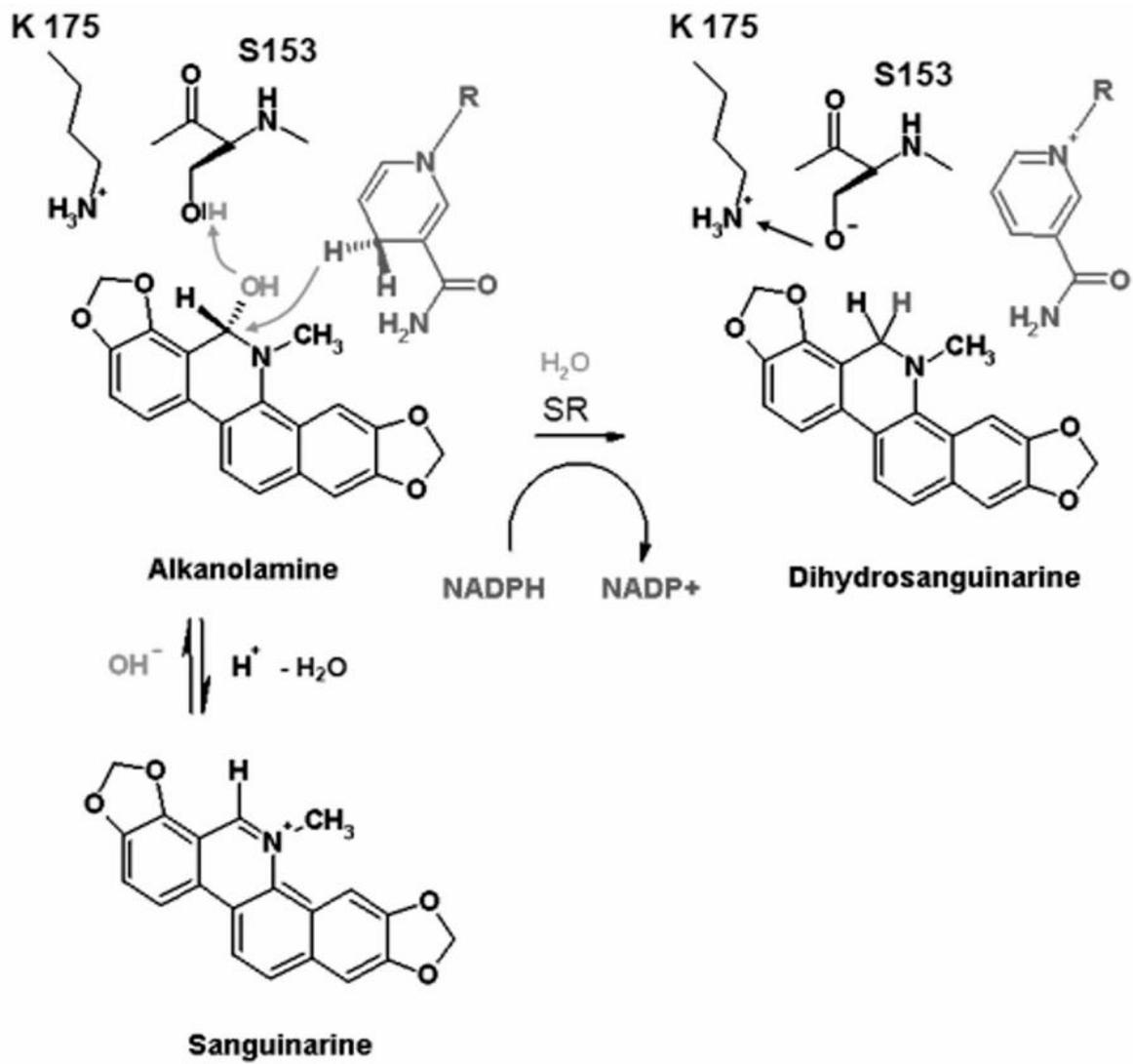


Abb. 4-1 Schema des postulierten Mechanismus der Enzymkatalyse

4.3 Homologe der Sanguinarin-Reduktase

Die hohe Sequenzhomologie mit zahlreichen pflanzlichen Enzymen aus der Gruppe der "Rossmann fold NAD(P)H/NAD(P)⁺ binding proteins" und die Anwesenheit der typischen Sequenzmotive (Bindestelle für NAD(P)H: GX(X)GXXG-Motiv, Bindungsstelle für das zu reduzierende Substrat: Serin mit Histidin oder Lysin [Pereira *et al.* 2001, Lukacik *et al.* 2006, Smith *et al.* 2008, Chen *et al.* 2009]) zeigt die Zugehörigkeit der Sanguinarin-Reduktase zu dieser Protein-Großfamilie. Eine besonders weitgehende Ähnlichkeit existiert mit NAD-abhängigen Epimerasen/Dehydratase oder Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Roos zur Verbreitung der Sanguinarin-Reduktase zeigen sowohl typische Sequenzen des Sanguinarin-Reduktase-Gens als auch die Aktivität des Enzyms in weiteren Pflanzen, welche zur Bildung von Benzophenanthridinen in der Lage sind [H. Müller, W. Roos unveröffentlicht].

Die vorhandenen 3D-Daten für ein vermutlich "funktionsloses" Protein dieser Familie (1XQ6) erlaubten die Erstellung eines 3D-Modells, das seinerseits zur Suche nach Proteinen mit homologen Raumstrukturen verwendet werden konnte. Solche Strukturanaloga sind bisher nicht als pflanzliche Proteine in zugänglichen Datenbanken erfasst, aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit mit 1XQ6 ist jedoch eine ähnliche 3D-Struktur für die in Abb. 3-7 und Tab. A-1 aufgeführten Homologe zu erwarten.

Die Suche nach Strukturhomologen der Sanguinarin-Reduktase führte jedoch auch zu Proteinen, deren Aminosäuresequenzen nur wenig mit der Sanguinarin-Reduktase übereinstimmen, trotz einer hohen Strukturähnlichkeit. Diese Proteine stammen aus Datenbanken für bakterielle und Humanproteine und zeigen meist ähnliche Enzymaktivität und -spezifität, d. h. als NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase oder Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Das Sequenzmotiv der für die Aktivität wichtige Triade aus Cys¹⁵⁷/Asp¹⁵⁸/His¹⁶¹ wurde ebenfalls in Bakterien aufgefunden [Zeidler 2008]. Offenbar können die für die katalytische Aktivität wesentlichen Strukturmerkmale durch Protein-Domänen mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz gebildet werden.

4.4 Evolution der Sanguinarin-Reduktase

Obwohl die Suche nach Homologen des Sanguinarin-Reduktase Proteins wesentlich durch den Bestand der verfügbaren Datenbanken bestimmt wird, lässt sie doch den Schluss zu, dass die

Evolution von Proteinen mit hoher struktureller Ähnlichkeit zur Sanguinarin-Reduktase von mindestens zwei verschiedenen Vorläuferproteinen ausgegangen ist.

Auf der einen Seite stehen Proteine aus heutigen Pflanzen, die eine hohe Sequenzidentität aufweisen und mit relativ wenigen Mutationen (etwa Insert 102-114, Cys¹⁵⁷, Phe¹⁶²) die Enzymaktivität der Sanguinarin-Reduktase erwerben können, wie am Beispiel von 1XQ6 gezeigt wurde. Die hohe Sequenzähnlichkeit dieser pflanzlichen Homologen legt einen gemeinsamen Vorläufer nahe. Dieser könnte bereits unter den Cyanobakterien, den evolutionären Vorläufern der rezenten Chloroplasten, entstanden sein. Die in den Protein-Datenbanken gefundenen Sequenzhomologen schließen sowohl Proteine aus Pflanzen als auch Cyanobakterien ein und wurden in zahlreiche Arten gefunden (Proteine aus 43 Arten zeigen e-Werte $\leq 1e^{-15}$). Es scheint sich daher bei dem Vorläufer der pflanzlichen "Rossmann fold"-Proteine um ein evolutionär sehr altes Protein zu handeln, das in rezenten Arten weit verbreitet ist. Auf der anderen Seite stehen Enzyme ähnlicher Raumstruktur, die offenbar aus Proteinen anderer Aminosäuresequenzen hervorgegangen sind. Diese Proteine stammen aus Organismen mit großer genetischer Distanz untereinander und zu Pflanzen.

5. Zusammenfassung

1. Die Sanguinarin-Reduktase katalysiert die Reduktion der cytotoxischen Benzophenanthridin-Alkaloide, bevorzugt des Sanguinarins, zu den entsprechenden Dihydro-Alkaloiden. Das Enzym ist ein lösliches cytoplasmatisches Protein und erlaubt die Wiederaufnahme und das Recycling der in die Zellwand der Produzentenzelle ausgeschiedenen Benzophenanthridine.

2. Ausgehend vom isolierten Enzymprotein wurde die codierende DNA der Sanguinarin-Reduktase in einer cDNA-Bank von *Eschscholzia californica* isoliert, kloniert und in Bakterien heterolog exprimiert. Nach Identifizierung des vollständigen Gens aus der genomischen DNA dieser Pflanze konnten auch die Introns der Sanguinarin-Reduktase bestimmt werden. Die Sequenzen des gesamten Gens, der cDNA und des Proteins der Sanguinarin-Reduktase wurden in die NCBI-nr-Datenbank eingestellt (GU338458).

3. Zur Aktivitätsbestimmung der Sanguinarin-Reduktase wurde ein auf der Fluoreszenz des Produkts (Dihydrosanguinarin) basierendes Endpunkt-Verfahren entwickelt. Die isolierte Sanguinarin-Reduktase wird erheblich durch ihr Produkt Dihydrosanguinarin gehemmt. Diese Hemmung spielt in der intakten Zelle keine wesentliche Rolle, u. a. weil das im Cytoplasma anwesende Glutathion einen Komplex mit Sanguinarin bildet. Höchstwahrscheinlich kontrolliert die Geschwindigkeit der Freisetzung von Sanguinarin aus dem GSH-Komplex die Umsatzrate und vermindert damit eine Anhäufung des hemmenden Produkts am Enzym.

Die katalytischen Parameter wurden daher in Anwesenheit von überschüssigem Glutathion ermittelt. Unter diesen Bedingungen zeigen das heterolog exprimierte, mit His-tag versehene Enzym und die native, aus *Eschscholzia californica* isolierte, Sanguinarin-Reduktase nahezu identische Umsatzraten und kinetische Parameter.

4. Die Sanguinarin-Reduktase gehört aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit zur Großfamilie der "Rossmann fold NAD(P)H/NAD(P)⁺ binding proteins". Unter den pflanzlichen Homologen ist das Protein 1XQ6, für welches Röntgenstrukturdaten verfügbar sind. Diese erlaubten die Aufstellung eines 3D-Homologie-Modells und Docking-Studien mit Sanguinarin (Kooperation mit AG Prof. Sippl). Dieses Modell führte zur Auffindung weiterer Homologe aus Bakterien und dem Menschen, welche eine hohe Ähnlichkeit der 3D-Struktur, aber geringe

Sequenzhomologie mit der Sanguinarin-Reduktase zeigen. Immunologische Versuche ermöglichen die Unterscheidung zwischen der Sanguinarin-Reduktase und homologen Proteinen wie z. B. 1XQ6. Diese Ergebnisse sprechen für eine Evolution von strukturellen Homologen der Sanguinarin-Reduktase aus verschiedenen Vorläufer-Proteinen.

5. Die sich aus dem 3D-Modell ergebenden Vorhersagen zur Substratbindung und zum katalytischen Mechanismus der Sanguinarin-Reduktase wurden durch eine Serie gerichteter Mutationen überprüft. Der weitgehende Verlust der katalytischen Effizienz nach Austausch eines konservierten Serin und weiterer, nur im aktiven Zentrum der Sanguinarin-Reduktase vorkommender Aminosäuren bestätigte einen katalytischen Mechanismus der Umsetzung von Sanguinarin mit NAD(P)H, welcher u.a. analog zur Biliverdin-Reduktase des Menschen abläuft. Den stärksten Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat die Deletion eines nur in der Sanguinarin-Reduktase vorhandenen Inserts von 13 Aminosäuren, welches offenbar einen starken allosterischen Effekt auf die Struktur und Funktion des aktiven Zentrums ausübt.

6. Literaturverzeichnis

Amnuaykanjanasin, A.; Daub, M. E. (2009) The ABC transporter ATR1 is necessary for efflux of the toxin cercosporin in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 146-158

Ashihara, H.; Monteiro, A. M.; Moritz, T.; Gillies, F. M.; Crozier, A. (1996) Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198, 334-339

Ashihara, H.; Gillies, F. M.; Crozier, A. (1997) Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Cell Physiol.* 38, 413-419

Bajaj, N. P. S.; McLean, M. J.; Waring, M. J.; Smekal, E. (1990) Sequence-selective, pH-dependent binding to DNA of benzophenanthridine alkaloids. *J. Mol. Recognit.* 3, 48-54

Barták, P.; Šimánek, V.; Vlčková, M.; Ulrichová, J.; Vespalec, R. (2003) Interactions of sanguinarine and chelerythrine with molecules containing a mercapto group. *Journal of Physical Organic Chemistry* 16, 803-810

Beuria, T. K.; Santra, M. K.; Panda, D. (2005) Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry* 44, 16584-16593

Bhattacharya, A.; Sood, P.; Citovsky, V. (2010) The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology* 11, 705-719

Bi, E.; Lutkenhaus, J. (1991) FTSZ ring structure associated with division in *Escherichia Coli*. *Nature* 354, 161-164

Bilski, P.; Li, M.Y.; Ehrenshaft, M.; Daub, M. E.; Chignell, C. F. (2000) Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* 71, 129-134 Literaturverzeichnis 96

Blande, J. D.; Holopainen, J. K.; Li, T. (2010) Air pollution impedes plant-to-plant communication by volatiles. *Ecology Letters* 13, 1172-1181

Blom, T. J. M.; Sierra, M.; Vanvliet, T. B.; Frankevandijk, M. E. I.; Dekoning, P.; Vani Ren, F.; Verpoorte, R.; Libbenga, K. R. (1991) Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured-cells of *Catharanthus-roseus* (L) G don and its conversion into serpentine. *Planta* 183, 170-177

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Cavallini, L.; Bindoli, A.; Macri, F.; Vianello, A. (1979) Lipid peroxidation induced by cercosporin as a possible determinant of its toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 28, 139-146

Chen, Z.; Kastaniotis, A. J.; Miinalainen, I. J.; Rajaram, V.; Wierenga, R. K.; Hiltunen, J. K. (2009) 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS. *FASEB Journal* 23, 3682-3691

Choy, C.-S.; Cheah, K.-P.; Chiou, H.-Y.; Li, J.-S.; Liu, Y.-H.; Yong, S.-F.; Chiu, W.-T.; Liao, J.-W.; Hu, C.-M. (2008) Induction of hepatotoxicity by sanguinarine is associated with oxidation of protein thiols and disturbance of mitochondrial respiration. *Journal of Applied Toxicology* 28, 945-956

Chung, K.-R.; Jenns, A. E.; Ehrenshaft, M.; Daub, M. E. (1999) A novel gene required for cercosporin toxin resistance in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 382-389

Chung, K.-R.; Daub, M. E.; Kuchler, K.; Schüller, C. (2003) The *CRG1* gene required for resistance to the singlet oxygen-generating cercosporin toxin in *Cercospora nicotianae* encodes a putative fungal transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 302-310

Cline, S. D. und Coscia, C. J. (1988) Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiol.* 86, 161-165

Coleman, J. O. D.; Randall, R.; Blake Kalff, M. M. A. (1997) Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: A fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell and Environment* 20, 449-460

Daub, M. E. (1982) Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* 72, 370-374

Daub, M. E. (1987) Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. *Phytopathology* 77, 1515-1520

Daub, M. E.; Leisman, G. B.; Clark, R. A.; Bowden, E. F. (1992) Reductive detoxification as a mechanism of fungal resistance to singlet oxygen-generating photosensitizers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9588-9592

Daub, M. E. und Ehrenshaft, M. (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 461-490
Literaturverzeichnis 98

Daub, M. E.; Li, M.; Bilski, P.; Chignell, C. F. (2000) Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in *Cercospora*. *Photochem. Photobiol.* 71, 135-140

Debiton, E.; Madelmont, J.-C.; Legault, J.; Barthomeuf, C. (2003) Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 474-482

Decker, G.; Wanner, G.; Zenk, M. H.; Lottspeich, F. (2000) Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* 21, 3500-3516

De Stefano, I.; Raspaglio, G.; Zannoni, G. F.; Travaglia, D.; Prisco, M. G.; Mosca, M.; Ferlini, C.; Scambia, G.; Gallo, D. (2009) Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochemical Pharmacology* 78, 1374-1381

Dixon, D. P.; Skipsey, M.; Edwards, R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338-350

Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D. A.; Orlova, I. (2006) Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 417-440

Dvořák, Z.; Vrzal, R.; Maurel, P.; Ulrichová, J. (2006a) Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF-kappa B in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions* 159, 117-128

Dvořák, Z.; Zdarilová, A.; Sperliková, L.; Anzenbacherová, E.; Šimánek, V.; Ulrichová, J. (2006b) Cytotoxicity of sanguinarine in primary rat hepatocytes is attenuated by dioxin and phenobarbital. *Toxicology Letters* 165, 282-288

Dzink, J. L. und Socransky, S. S. (1985) Comparative *in vitro* activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 663-665

Facchini, P. J. und St-Pierre, B. (2005) Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 657-666

Faddeeva, M. D. und Beliaeva, T. N. (1997) Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologija* 39, 181-208

Färber, K.; Schumann, B.; Miersch, O.; Roos, W. (2003) Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* 62, 491-500

Flesar, J.; Havlik, J.; Kloucek, P.; Rada, V.; Titera, D.; Bednar, M.; Stropnický, M.; Kokoska, L. (2010) In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology* 145, 129-133

Giuliana, G.; Pizzo, G.; Milici, M. E.; Giangreco, R. (1999) In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surgery oral Medicine oral Pathology oral Radiology and Endodontics* 87, 44-49

Gniazdowska, A.; Bogatek, R. (2005) Allelopathic interaction between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27, 395-407

Hadacek F. (2002) Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 273-322

Hagel, J. M.; Yeung, E. C.; Facchini, P. J. (2008) Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Sciences* 13, 631-639

Han, M. H.; Kim, S. O.; Kim, G. Y.; Kwon, T. K.; Choi, B. T.; Lee, W. H.; Choi, Y. H. (2007) Induction of apoptosis by sanguinarine in C6 rat glioblastoma cells is associated with the modulation of the Bcl-2 family and activation of caspases through downregulation of extracellular signal-regulated kinase and Akt. *Anti-Cancer Drugs* 18, 913-921

Harborne, J. B. (1995a) Die Biochemie der Bestäubung. 42-82; **(1995b)** Pflanzengifte und ihre Auswirkungen auf Tiere. 83-122; **(1995c)** Hormonelle Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren. 123-149; **(1995d)** Nahrungspräferenzen von Insekten. 150-190; **(1995e)** Nahrungspräferenzen von Wirbeltieren einschließlich des Menschen. 191-220; **(1995f)** Wechselbeziehungen zwischen höheren und niederen Pflanzen: Phytoalexine und Phytotoxine. 314-353. In: Harborne, J. B. (Hrsg.) Ökologische Biochemie. Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Harborne, J. B. (1999) The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 335-367

Hauser, M.-T. und Wink, M. (1990) Uptake of alkaloids by latex vesicles and isolated mesophyll vacuoles of *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Z. Naturforsch.* 45c, 949-957

Herrero, S.; Amnuaykanjanasin, A.; Daub, M. E. (2007) Identification of genes differentially expressed in the phytopathogenic fungus *Cercospora nicotianae* between cercosporin toxin-resistant and -susceptible strains. *Fems Microbiology Letters* 275, 326-337

Herrmann, S. (2003) Nachweis der GSH-Abhängigkeit der Aktivität von Phospholipase A₂ in *E.californica* durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Diplomarbeit, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Hsieh, P.-C.; Siegel, S. A.; Rogers, B.; Davis, D.; Lewis, K. (1998) Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6602- 6606

Iriti, M.; Faoro, F. (2009) Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3371-3399

Janovska, M.; Kubala, M.; Šimánek, V., Ulrichová, J. (2010) Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with the Na⁺/K⁺-ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicology Letters* 196, 56-59

Jans, B. P. (1973) Untersuchungen am Milchsaft des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 83, 306-344

Jasiński, M.; Stukkens, Y.; Degand, H.; Purnelle, B.; Marchand-Brynaert, J.; Boutry, M. (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13, 1095-1107

Johnson, C. C.; Johnson, G.; Poe, C. F. (1952) Toxicity of alkaloids to certain bacteria. II. Berberine, physostigmine, and sanguinarine. *Acta pharmacol. et toxicol.* 8, 71-78

Karioti, A.; Skaltsa, H.; Lazari, D.; Sokovic, M.; Garcia, B.; Harvala, C. (2002) Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* 57c, 75-80

Kemeny-Beke, A.; Aradi, J.; Damjanovich, J.; Beck, Z.; Facsko, A.; Berta, A.; Bodnar, A. (2006) Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Letters* 237, 67-75

Kessler, D.; Baldwin, I. T. (2007) Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* 49, 840-854

Klein, M.; Roos, W. (2009) Handling Dangerous Molecules: Transport and Compartmentation of Plant Natural Products. In: Osbourn, A. E.; Lanzotti, V.; (eds) *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function and Application*, Springer Science + Business Media, New York, 229-269

Kojima, W.; Fujii, T.; Suwa, M.; Miyazawa, M.; Ishikawa, Y. (2010) Physiological adaptation of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* to chemical defenses of its host plant, maize. *Journal of Insect Physiology* 56, 1349-1355

Kost, C.; Heil, M.. (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology* 94, 619-628

Lankau, R. A.; Kliebenstein, D. J. (2009) Competition, herbivory and genetics interact to determine the accumulation and fitness consequences of a defence metabolite. *Journal of Ecology* 97, 78-88

Leisman, G. B. und Daub, M. E. (1992) Singlet oxygen yields, optical properties, and phototoxicity of reduced derivatives of the photosensitizer cercosporin. *Photochem. Photobiol.* 55, 373-379

Li, Z.-S.; Alfenito, M.; Rea, P. A.; Walbot, V.; Dixon, R. A. (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45, 689-693

Lukacik, P.; Kavanagh, K. L.; Oppermann, U. (2006) Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248, 61-71

Maines, M. D. (2005) New Insights into Biliverdin Reductase Functions: Linking Heme Metabolism to Cell Signaling. *Physiology* 20, 382-389

Maiti, M.; Das, S.; Sen, A.; Das, A.; Kumar, G. S.; Nandi, R. (2002) Influence of DNA structures on the conversion of sanguinarine alkanolamine form to iminium form. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20, 455-464

Marrs, K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158

Matile, P. (1976) Localization of alkaloids and mechanism of their accumulation in vacuoles of *Chelidonium majus* laticifers. In: Luckner, M.; Mothes, K.; Nover, L. (Hrsg.) Secondary metabolism and coevolution. *Nova Acta Leopoldina* , Suppl. 7, 139-156

McNally, D. J.; Wurms, K. V.; Labbe, C.; Belanger, R. R. (2003) Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63, 293-303

Miller, J. M. und Conn, E. E. (1980) Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant physiol.* 65, 1199-1202

Modriansky, M.; Kosina, P.; Kesselova, M.; Walterová, D.; Šimánek, V.; Ulrichová, J. (2001) Interaction of sanguinarine and chelerythrine with selected human cytochrome P450 isoforms. FYS320;
<http://congres.igh.cnrs.fr/P450-Grande-Motte/abstractp450.pl?action=visu&fys=all>

Moriyama, Y.; Hiasa, M.; Matsumoto, T.; Omote, H. (2008) Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 38, 1107-1118

Morrissey, J. P. und Osbourn, A. E. (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 708-724 Literaturverzeichnis 104

Mueller, L. A.; Goodman, C. D.; Silady, R. A.; Walbot, V. (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561-1570

Oba, K.; Conn, E. E.; Canut, H.; Boudet, A. M. (1981) Subcellular localization of 2-(β -D-glucosyloxy)- cinnamic acids and the related β -glucosidase in leaves of *Melilotus alba* Desr. *Plant Physiol.* 68, 1359-1363

Omote, H.; Hiasa, M.; Matsumoto, T.; Otsuka, M.; Moriyama, Y. (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 587-593

Otani, M.; Shitan, N.; Sakai, K.; Martinoia, E.; Sato, F.; Yazaki, K. (2005) Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138, 1939-1946

Paczulla, M. (2004) Die Sanguinarin-Reduktase-Reaktion und ihre Beziehung zur Komplexbildung von Sanguinarin und Glutathion. Diplomarbeit, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Pedras, M. S. C.; Zheng, Q. A.; Strelkov, S. (2008) Metabolic Changes in Roots of the Oilseed Canola Infected with the Biotroph *Plasmodiophora brassicae*: Phytoalexins and Phytoanticipins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9949-9961

Pereira, P. J. B.; Macedo-Ribeiro, S.; P á rraga, A.; Pérez-Luque, R.; Cunningham, O.; Darcy, K.; Mantle, T. J.; Coll, M. (2001) Structure of human biliverdin IX beta reductase, an early fetal bilirubin IX beta producing enzyme. *Nature Structural Biology* 8, 215-220

Raguso, R. A. (2003) Olfactory landscapes and deceptive pollination: signal, noise and convergent evolution in floral scent. In: Blomquist, G. und Vogt, R. (Hrsg.) *Insect pheromone. Biochemistry and molecular biology*. Elsevier Academic Press, London, 631-650

Roos, W. und Luckner, M. (1986) The spatial organization of secondary metabolism in microbial and plant cells. In: Subramanian, T.A.V. (Hrsg.) *Cell metabolism: growth and environment*. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 45-73

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467

Scheiner-Bobis, G. (2001) Sanguinarine induces K⁺ outflow from yeast cells expressing mammalian sodium pumps. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 363, 203-208

Schmeller, T.; Latz-Brüning, B.; Wink, M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44, 257-266

Schwartz, W. (2007) Die zelluläre Kontrolle der PLA₂ -Aktivität - ein Element des Signaltransfers zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in *Eschscholzia californica*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seifen, E.; Adams, R. J.; Riemer, R. K. (1979) Sanguinarine: a positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na⁺,K⁺-ATPase. *Eur. J. Pharmacol.* 60, 373-377 Literaturverzeichnis 107

Shitan, N.; Yazaki, K. (2007) Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 8, 244-252

Sirikantaramas, S.; Yamazaki, M.; Saito, K. (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews* 7, 467-477

Slaninova, I.; Taborska, E.; Bochorakova, H.; Slanina, J. (2001) Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. *Cell Biology and Toxicology* 17, 51-63

Slaninova, I.; Slunska, Z.; Sinkora, J.; Vlkova, M.; Taborska, E. (2007) Screening of minor benzo(c)phenanthridine alkaloids for antiproliferative and apoptotic activities. *Pharmaceutical Biology* 45, 131-139

Smith, L. J.; Browne, S.; Mulholland, A. J.; Mantle, T. J. (2008) Computational and experimental studies on the catalytic mechanism of biliverdin-IX β reductase. *Biochemical Journal* 411, 475-484

Sorensen, J. S.; Dearing, M. D. (2006) Efflux transporters as a novel herbivore countermechanism to plant chemical defenses. *Journal of Chemical Ecology* 32, 1181-1196

Stermitz, F. R.; Lorenz, P.; Tawara, J. N.; Zenewicz, L. A.; Lewis, K. (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1433-1437

Tang, W. C.; Hemm, I.; Bertram, B. (2003) Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines; Part I. Low molecular compounds. *Planta medica* 69, 97-108

Taylor, T. V.; Mitchell, T. K.; Daub, M. E. (2006) An oxidoreductase is involved in cercosporin degradation by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6070-6078

Teuscher, E. (1984) Zur möglichen Funktion von Sekundärstoffen in biologischen Systemen. In: Czygan, F.-C. (Hrsg.) Biogene Arzneistoffe. Entwicklungen auf dem Gebiet der Pharmazeutischen Biologie, Phytochemie und Phytotherapie. Vieweg, Braunschweig, 61-83

Teuscher, E. (1997) Alkaloide. In: Teuscher, E. (Hrsg.) Biogene Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 5. Auflage, 313-377

Tolkachev, O. N. und Vichkanova, S. A. (1978) Dependence of antimicrobial activity on the structure and reactivity of natural quaternary heteroaromatic compounds and their analogues. *Farmacija* 27, 38-41

Ulrichová, J.; Walterová, D.; Preininger, V.; Slavík, J.; Lenfeld, J.; Cushman, M.; Šimánek, V. (1983a) Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 111-115

Ulrichová, J.; Walterová, D.; Preininger, V.; Šimánek, V. (1983b) Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 174-177

Ulrichová, J.; Walterová, D.; Šimánek, V. (1984) Molecular mechanisms of the biological activity of quaternary benzophenanthridine and protoberberine alkaloids. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.* 106, 31-38

Vallejos, R. H. (1973) Uncoupling of photosynthetic phosphorylation by benzophenanthridine alkaloids. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 193-196

Vandenbogaerde, A. L.; Delaey, E. M.; Vantieghem, A. M.; Himpens, B. E.; Merlevede, W. J.; de Witte, P. A. (1998) Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 67, 119-125

van den Brûle, S.; Müller, A.; Fleming, A. J.; Smart, C. C. (2002) The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J.* 30, 649-662

Vavreckova, C.; Gawlik, I.; Mueller, K. (1996) Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus* . 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.* 62, 491-494

Vichkanova, S. A.; Rubinchik, M. A.; Adgina, V. V.; Fedorchenko, T. S. (1969) A study into chemotherapeutic action of sanguinarine. *Farmakol. toksikol.* 32, 325-328

Vichkanova, S. A. und Adgina, V. V. (1971) Antifungal properties of sanguinarine [!]. *Antibiotiki* 16, 609-612

Viehweger, K.; Schwartze, W.; Schumann, B.; Lein, W.; Roos, W. (2006) The G alpha protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* 18, 1510-1523

Vogel, M.; Lawson, M.; Sippl, W.; Conrad, U.; Roos, W. (2010) Structure and Mechanism of Sanguinarine Reductase, an Enzyme of Alkaloid Detoxification. *J. Biol. Chemistry* 285, 18397-18406

Vollmer W. (2006) The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 37-47

Vongpaseuth, K.; Roberts, S. C. (2007) Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 8, 219-236

Wang, C.; Wu, J.; Mei, X. (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 404-410

Weiner, M. P.; Costa, G. L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J. C. (1994) Site-directed Mutagenesis of double-stranded DNA by the Polymerase Chain-Reaction. *Gene* 151, 119-123

Weiß, D. (2004) Die Sanguinarin-Reduktase - ein neues Redoxenzym mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung der Benzophenanthridine in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*. Dissertation, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Weiß, D.; Baumert, A.; Vogel, M.; Roos, W. (2006) Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell and Environment* 29, 291-302

Williams, M. K.; Dalvi, S.; Dalvi, R. R. (2000) Influence of 3-Methylcholanthrene pretreatment on sanguinarine toxicity in mice. *Vet. Human Toxicol.* 42, 196-198

Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19

Wolff, J. und Knipling, L. (1993) Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry* 32, 13334-13339

Yazaki, K. (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters* 580, 1183-1191

Zeidler, S. (2008) Analyse phylogenetisch konservierter Regionen in DNA und Protein von Alkaloidkonvertierenden Enzymen von Pharmazeutischer Bedeutung. Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Institut für Informatik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zenk, M. H. (1994) The Formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 2023-2028

Ziegler, J.; Facchini, P. J. (2008) Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59, 735-769

7. Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AG	Arbeitsgruppe
AKT	auch PKB Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonsäure
Berb	Berberin
bidest.	zweifachdestilliert
bp	Basenpaare
cDNA	copy-DNA
Chel	Chelerythrin
Copt	Coptisin
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DH...	Dihydro...
DHS	Dihydrosanguinarin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTE	Dithioerythritol
EC ₅₀	effective concentration 50 %
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	enzym linked immuno sorbent assay
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
Ex	Exzitation

FPLC	fast protein liquid chromatography
x g	relative Zentrifugalkraft
GSH	Glutathion
GTPase	Guanosintriphosphat Hydrolase
HPLC	high performance liquid chromatography
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IC ₅₀	inhibitory concentration 50 %
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- α -D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
MAP-Kinasen	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MIC	minimal inhibitory concentration
MDR	multidrug resistance
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NED	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase
OD ₆₀₀	optische Dichte (Absorption) bei 600 nm
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIPES	Piperazin-1,4-bis-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
RSA	Rinderserumalbumin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute

Sang	Sanguinarin
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SR	Sanguinarin-Reduktase
Tab.	Tabelle
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TBST	tris buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Nukleinsäuren

A Adenin C Cytosin G Guanin T Thymin

Aminosäuren

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

Alle weiteren im Text verwendeten Abkürzungen werden direkt erklärt oder als bekannt vorausgesetzt.

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb.1-1	Chemische Strukturen des Sanguinarins in der Iminium- und Alkanolamin-Form	11
Abb. 1-2	“Recycling” des Sanguinarins in der Zellkultur von <i>Eschscholzia californica</i>	17
Abb. 2-1	FPLC-Reinigung der heterologen Sanguinarin-Reduktase mittels HisTrap®-Säule	36
Abb. 2-2	SDS-PAGE und Western-Blot	39
Abb. 3-1	Sequenz von Gen und Protein der Sanguinarin-Reduktase	44
Abb. 3-2	Das vollständige Gen der Sanguinarin-Reduktase	46
Abb. 3-3	Umsatzraten der Sanguinarin-Reduktase	50
Abb. 3-4	Enzymaktivität von 6-His-Sanguinarin-Reduktase, Einfluss von Dihydrosanguinarin	51
Abb. 3-5	Einfluss des Glutathions auf die Sanguinarin-Reduktase-Aktivität, Vergleich der Messung nach 10 s und 10 min	52
Abb. 3-6	Vergleich der Umsatzraten von rekombinantem und genuinem Enzym ...	53
Abb. 3-7	Vergleich der Aminosäuresequenz der Sanguinarin-Reduktase und ihrer nächsten Sequenz-Homologen	55
Abb. 3-8	3D-Homologie-Modell der Sanguinarin-Reduktase	56
Abb. 3-9	3D-Struktur der Strukturhomologen	58
Abb. 3-10	Vergleich der Aminosäuresequenz der Sanguinarin-Reduktase und ihrer bekannten 3D-Homologen	59
Abb. 3-11	Umsatzraten der Sanguinarin-Reduktase und experimentell erzeugter Mutanten	63
Abb. 3-12	Aktivitätsmessung des 1XQ6-Proteins	65
Abb. 3-13	Hemmung der Sanguinarin-Reduktase durch Iodacetamid	66
Abb. 3-14	Western-Blot zum Vergleich der Antikörper gegen die Sanguinarin-Reduktase und das 1XQ6-Protein	68
Abb. 4-1	Schema des postulierten Mechanismus der Enzymkatalyse	72
Abb. A-1	pDONR™222 Vektorkarte	99
Abb. A-2	pET-23d Vektorkarte	100
		95

Tab. 3-1	Kinetische Parameter der Sanguinarin-Reduktase und experimentell erzeugter Mutanten	64
Tab. A-1	Sequenzhomologe Proteine zur Sanguinarin-Reduktase	97
Tab. A-2	Strukturhomologe Proteine zur Sanguinarin-Reduktase	98

Anhang

Tab. A-1 Sequenzhomologe Proteine zur Sanguinarin-Reduktase

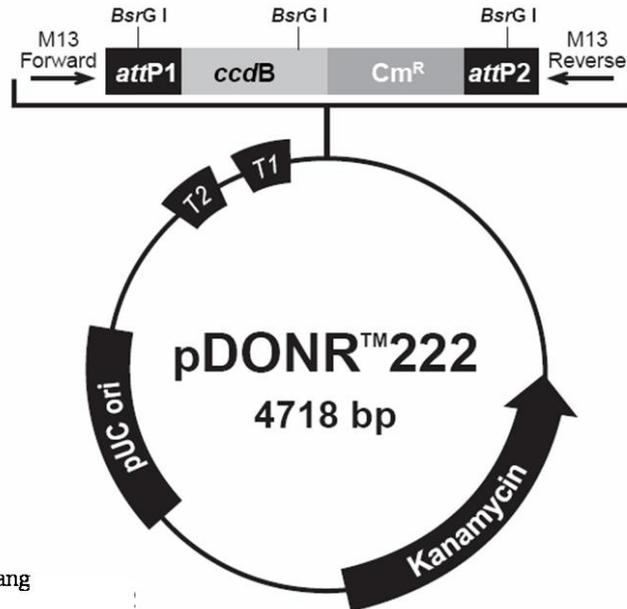
At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Al, *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*; Mt, *Medicago truncatula*; Zm, *Zea mays*; Vv, *Vitis vinifera*; Sb, *Sorghum bicolor*; Rc, *Ricinus communis*; Pt, *Populus trichocarpa*; Ps, *Picea sitchensis*; Cs, *Cyanothece sp.*

Proteinname	Gene ID	gi code	As-zahl	Ident (%)
1XQ6-A, At	At5g02240	gi 5655464	253	66
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Os	Os03g0822200	gi 115456265	257	66
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Al	9307033	gi 297806159	253	65
unbekanntes Protein, Mt		gi 217072336	255	65
Chloroplasten Protein, putative 3 β -HSD, At	At2g37660	gi 18404496	325	64
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Zm	100282579	gi 226499246	257	64
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Zm	100194029	gi 212722290	298	64
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Vv	100247687	gi 225440390	253	64
putative 3 β -HSD, Sb	8068663	gi 242086601	299	64
hypothetisches Protein, Rc	8260244	gi 255580317	323	64
hypothetisches Protein, Pt	7487262	gi 224090705	251	64
putative 3 β -HSD, Os	Os05g0110300	gi 115461679	293	63
unbekanntes Protein, Ps		gi 116782559	254	63
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Cs	YP_002372110 PCC8801	gi 218246739	257	54

Tab. A-2 Strukturhomologe Proteine zur Sanguinarin-ReduktaseBh, *Bacillus halodurans*; Hs, *Homo sapiens*

Proteinname	Nr. Ident uniprot	Gene ID	gi code	As-zahl	Ident (%)
NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, Bh	Q9KCP9 (3E8X)	890529	gi 197725368	213	19
Biliverdin IX β -Reduktase, Hs	P30043 (1HDO)	BLVRB	gi 1339967	206	11
17 β -HSD 8, Hs	Q92506 (2PD6)	HSD17B8	sp Q92506	261	10

rrnB T2: Basen 58-85 (c)
rrnB T1: Basen 217-260 (c)
 M13 Forward: Basen 327-342
attP1: Basen 360-591
BsrG I: Basen 442, 1232, 2689
ccdB: Basen 987-1292 (c)
 Chloramphenicol: Basen 1612-2295 (c)
attP2: Basen 2543-2774 (c)
 M13 Reverse: Basen 2816-2832
 Kanamycin: Basen 2899-3714 (c)
 pUC origin: Basen 4045-4718
 (c) = liegt auf dem komplementären Strang



M13 Forward (-20)
 312 GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT TTATTTTGAC
 AGCCCGGGGT TTATTACTAA AATAAACTG

381 TGATAGTGAC CTGTTTCGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATG CCA ACT
 ACTATCACTG GACAAGCAAC GTTGTTTAAAC TACTCGTTAC GAAAAAATAT TAC GGT TCA

BsrG I **attL1** **BsrG I**
 440 TTG TAC AAA AAA GTT GGN --- cDNA --- NAC CCA ACT TTC TTG TAC AAA
 AAC ATG TTT TTT CGT CCN --- NTG GGT TGA AAG AAC ATG TTT

2696 GTT GGC ATT ATAAGAAAGC ATTGCTTATC AATTTGTTGC AACGAACAGG TCACTATCAG
 CAA CCG TAA TATTCTTTTCG TAACGAATAG TAAACAACG TTGCTTGTCCTC AGTGATAGTC

attL2
 2755 TCAAAATAAA ATCATTATTT GCCATCCAGC TGATATCCCC TATAGTGAGT CGTATTACAT
 AGTTTTATTT TAGTAATAAA CGGTAGGTCG

M13 Reverse
 2815 GGTCATAGCT GTTTCCTGGC AGCTCTGGCC CGTGTCTCAA AATCTCTGAT GTTACATTGC

Abb. A-1 pDONRTM222 Vektorkarte

T1, T2 Sequenz zum Beenden der Transkription

M13 Forward, M13 Reverse Primer-Bindungsstelle

Chloramphenicol, Kanamycin Resistenz-Gene zur Selektion

ccdB Gen kodiert für ein die bakterielle Gyrase inhibierendes Protein

attP1, *attP2*, *attL1*, *attL2* Bereiche aus der DNA des λ - Phagen zur Rekombinations-
klonierung (Gateway[®] Technology)

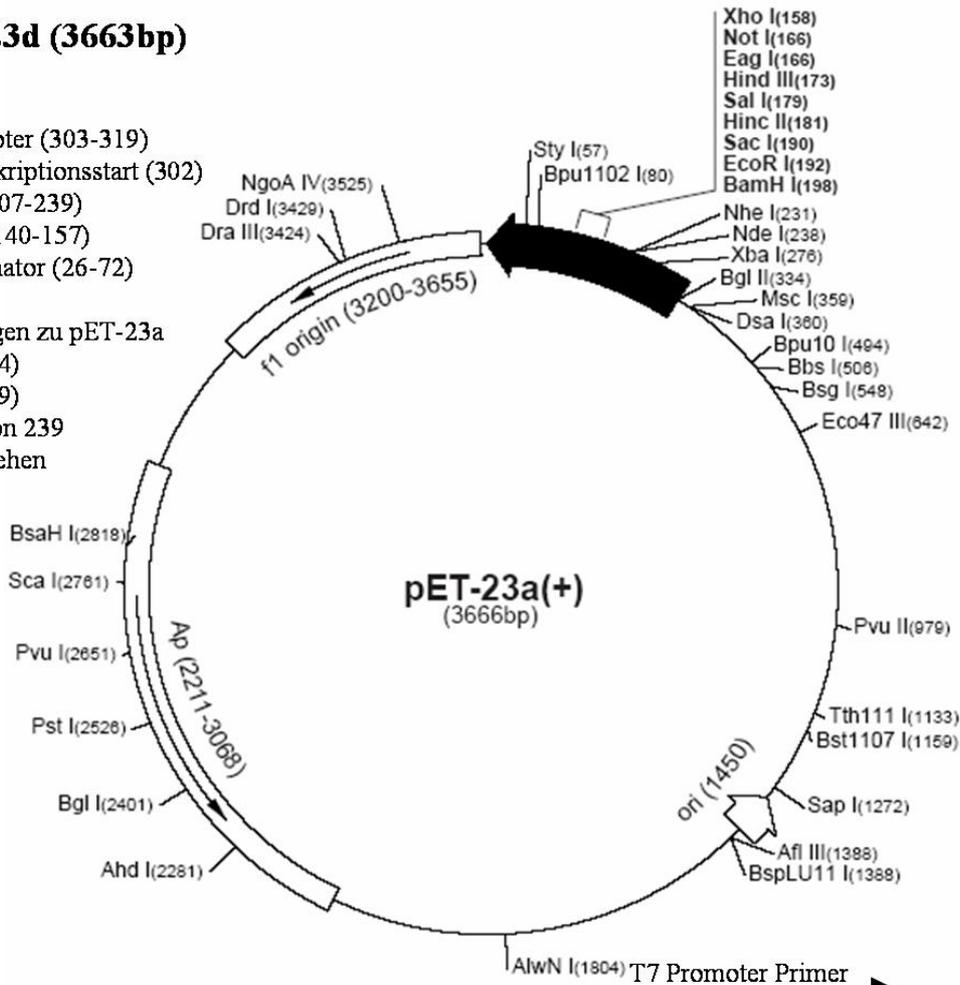
pUC origin Replikationsursprung zur Plasmidvermehrung

Die in den Vektor klonierte cDNA mit *att*-Bereichen ist hellblau markiert.

pET-23d (3663bp)

T7 Promoter (303-319)
 T7 Transkriptionsstart (302)
 T7-tag (207-239)
 His-tag (140-157)
 T7 terminator (26-72)

Änderungen zu pET-23a
Nco I (234)
Nhe I (229)
 ab Position 239
 3 bp abziehen



336

Bgl II T7 Promoter Primer
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAGACCAC

289

Xba I rbs *Nco* I *Nhe* I
 AACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCTAGCATGAC

223

T7-tag *Bam*HI *Eco*R I *Sac* I *Sal* I *Hinc* II *Hind* III *Not* I *Eag* I *Xho* I
 TGGTGGACAGCAAATGGGTCCGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACATAGCTTGCGGCCGCACTCGAG

157

His-tag
 CACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCT

91

*Bpu*1102 I T7 terminator
 GCCACCGGTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
 T7 terminator Primer

Abb. A-2 pET-23d Vektorkarte

Ampicillin Resistenz-Gen zur Selektion

pBR322 origin Replikationsursprung zur Plasmidvermehrung

Die Abbildung des pET-23a Vektors wurde um die geringen Änderungen gegenüber dem pET-23d Vektor ergänzt. Durch die Nutzung der Restriktionsschnittstellen Nco I und Xho I entfiel der T7-tag und der His-tag wurde an den C-terminus des Proteins angefügt.

Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Professor Dr. W. Roos, möchte ich für seine Ideen und Unterstützung bei dieser Arbeit herzlich danken.

Für die Erstellung des 3D-Homologie-Modells und die Suche der Strukturhomologen danke ich Herrn M. Lawson und Herrn Professor Dr. W. Sippl, Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität, Halle.

Mein Dank für die Sequenzierung der Peptide der Sanguinarin-Reduktase geht an Herrn Dr. K.-P. Rücknagel und Frau Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle. Frau Dr. A. Schierhorn bestätigte auch die Aminosäuresequenz der Mutanten und das Molekulargewicht der Sanguinarin-Reduktase mittels Massenspektrometrie.

Herrn Dr. U. Conrad, Institut für Genetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, danke ich für das Impfen der Kaninchen und den ELISA-Tests der Antikörper.

Für ihre Hilfe bei der Fermentation danke ich Frau K. Schröder-Tittmann und Frau U. Best, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität, Halle.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für zahlreiche Tipps, Hilfestellungen und interessante Diskussionen.

Halle (Saale), 21.06.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), 21.06.2011

Lebenslauf

Matthias Vogel
Reilstr.15
06114 Halle (Saale)

Tel.: 0345/9590835
Mobil: 0176/21839976
e-mail: matthias.vogel@pharmazie.uni-halle.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -Ort: 24.04.1977, Magdeburg
Geburtsname: Paczulla
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: BRD

Schulbildung

09/1983-08/1991 Polytechnische Oberschule Victor-Jara, Magdeburg
09/1991-06/1995 Werner-von-Siemens-Gymnasium, Magdeburg

Berufsausbildung/Studium

09/1995-03/1998 Ausbildung zum Pharmazeutisch technischem Assistenten an der Berufsbildenden Schule VIII Magdeburg
10/1999-09/2003 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06.12.2004 Approbation als Apotheker
10/2003-03/2004 Diplomarbeit am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema: Die Sanguinarin-Reduktase-Reaktion und ihre Beziehung zur Komplexbildung von Sanguinarin und Glutathion.
21.12.2004 Erlangung des Diploms

Wehrdienst

09/1998-08/1999 Sanitätsregiment 1, Regionale Sanitätsmaterial Ausgabestelle, Hildesheim

Praktika

09/1997-03/1998 PTA-Praktikant in der Klosterhof-Apotheke, Magdeburg

04/2004-09/2004 Pharmaziepraktikant in der Ring-Apotheke, Halle

Beruflicher Werdegang

03/1998-08/1998 Anstellung als Pharmazeutisch technischer Assistent in der
und Klosterhof-Apotheke, Magdeburg
09/1999

10/2004-03/2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische
Biologie und Pharmakologie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

03/2009-05/2010 Anstellung als Apotheker in der König-Heinrich-Apotheke, Merseburg

08/2010-01/2011 Elternzeit

Halle (Saale), 21.06.2011

Matthias Vogel