

# Struktur-Funktionsbeziehungen der Serin-Carboxypeptidase-ähnlichen Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grads  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

**Felix-Oliver Stehle**

geboren am 19. Januar 1977 in Darmstadt

Gutachter:

1. Professor Dr. Milton T. Stubbs
2. Professor Dr. Dieter Strack
3. Professor Dr. Dietrich Ober

Halle, August 2008

*Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht,  
sondern weil wir es nicht wagen, ist es schwer.*

LUCIUS ANNAEUS SENECA (1-65 n. Chr)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels .....	1
1.2	Sinapoyltransferasen der <i>Brassicaceen</i> .....	4
1.3	Serin-Carboxypeptidasen .....	9
1.4	Evolution pflanzlicher Acyltransferasen .....	14
1.5	Zielstellung der Arbeit .....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Plasmide .....	20
2.1.2	Zellen .....	21
2.1.3	Pflanzen .....	21
2.1.3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
2.1.3.2	<i>Brassica napus</i> .....	22
2.1.3.3	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	22
2.1.4	Oligonukleotide .....	22
2.1.5	Chemikalien und Enzyme .....	22
2.1.6	Antikörper .....	22
2.2	Geräte .....	23
2.3	Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen .....	23
2.3.1	<i>Escherichia coli</i> .....	23
2.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.3.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
2.4	Kultivierung, Transformation und Selektion von Insektenzellen .....	24
2.4.1	<i>Spodoptera frugiperda</i> Sf 9 .....	24
2.5	Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen .....	24
2.5.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
2.5.2	<i>Brassica napus</i> .....	25
2.5.3	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	25
2.6	Molekularbiologische Methoden .....	25
2.6.1	Isolierung von DNA .....	26
2.6.2	Isolierung von RNA .....	26
2.6.3	Auftrennung von Nukleinsäuren .....	27
2.6.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	28
2.6.5	Reinigung von DNA .....	28
2.7	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	28
2.7.1	Restriktionsanalyse .....	28
2.7.2	Ligation .....	28
2.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29
2.7.4	RT-PCR .....	29
2.7.5	Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen .....	30

2.8	Biochemische Methoden .....	30
2.8.1	Proteinextraktion .....	30
2.8.1.1	Extraktion aus <i>E. coli</i> .....	30
2.8.1.2	Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.8.1.3	Extraktion aus <i>N. tabacum</i> , <i>A. thaliana</i> & <i>B. napus</i> .....	31
2.8.1.4	Extraktion aus <i>S. frugiperda</i> .....	31
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	31
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.8.4	Western Blot-Analyse.....	32
2.8.5	SMT-Aktivitätstest.....	33
2.8.6	Hemmversuche mit Serin-Carboxypeptidase spezifischen Inhibitoren.....	33
2.8.7	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die SMT-Reaktion .....	34
2.8.8	Extraktion der Sinapatester .....	34
2.8.9	Analytische HPLC/UPLC.....	34
2.8.10	Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS).....	35
2.9	Heterologe Expression.....	35
2.9.1	Expression der AtSMT in <i>E. coli</i> .....	35
2.9.1.1	Solubilisierung und <i>in vitro</i> Rückfaltung .....	36
2.9.2	Expression der AtSMT in <i>N. tabacum</i> .....	36
2.9.3	Expression der AtSMT in <i>S. frugiperda</i> .....	36
2.9.4	Expression der AtSMT in <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.9.5	Fermentation AtSMT-exprimierender <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	38
2.10	Proteinreinigung aus Hefe Rohextrakt .....	39
2.11	Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur .....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
3.1	Heterologe Expression der AtSMT.....	42
3.1.1	Expression der AtSMT in verschiedenen Wirtsorganismen .....	42
3.2	Optimierung der AtSMT Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	44
3.2.1	Sequenz-Optimierung .....	44
3.2.2	Signalpeptide.....	44
3.2.3	Kopienzahl des Vektors .....	47
3.2.4	5'Untranslatierte Region (5'UTR) .....	48
3.2.5	Hefezellen.....	48
3.3	Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur .....	49
3.3.1	Auswahl von Matrizen für die Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur .....	50
3.3.2	Struktur-Modell der AtSMT .....	51
3.3.3	Das katalytische Zentrum der AtSMT.....	53
3.3.4	Molekulare Grundlagen der AtSMT-Substratspezifität.....	54
3.4	Enzymkinetische Charakterisierung .....	58
3.4.1	Enzympräparation .....	58
3.4.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	60
3.4.3	Der Reaktionsmechanismus der AtSMT.....	60
3.4.4	Akzeptor-Spezifität der AtSMT .....	63
3.4.5	Weitere enzymatische Aktivitäten der AtSMT .....	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
4.1	Optimierung eines heterologen Expressionssystems für die AtSMT .....	69
4.2	Struktur-Funktionsbeziehungen der AtSMT .....	72
4.3	Der Reaktionsmechanismus der AtSMT .....	76

---

4.3.1	Enzymkinetische Charakterisierung der AtSMT.....	76
4.3.2	Nebenaktivitäten der AtSMT .....	79
4.3.3	Acylenzym-Intermediat.....	80
4.4	Evolution der SCPL-Acyltransferasen .....	82
4.5	Weiterführende Arbeiten.....	85
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>110</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>116</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 Transacylierungen von $\beta$ -Acetalestern durch Glucoseester-abhängige Acyltransferasen .....	3
Abb. 1.2 Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel .....	5
Abb. 1.3 Metabolismus der Sinapatester in <i>Brassicaceen</i> .....	7
Abb. 1.4 Identifizierte Sinapatester aus Samen von <i>B. napus</i> .....	8
Abb. 1.5 Reaktionsmechanismus der Serin-Carboxypeptidasen .....	11
Abb. 1.6 Topologisches Diagramm des als $\alpha/\beta$ -hydrolase fold definierten Strukturelements. ....	13
Abb. 1.7 Phylogenetischer Baum der 51 Arabidopsis SCPL Proteine.....	15
Abb. 1.8 Gencluster der SCPL-Acyltransferasen auf Chromosom 2 von <i>A. thaliana</i> .....	16
Abb. 3.1 Optimierung der Expression von <i>AtSMT</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	46
Abb. 3.2 Komplementation der Leucin-Auxotrophie von <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	48
Abb. 3.3 Optimierung der PEP4-ySMT-Expressionskassette in <i>S. cerevisiae</i> .....	49
Abb. 3.4 Protein-Alignment von SCPL Acyltransferasen und Serin-Carboxypeptidasen.....	50
Abb. 3.5 Ramachandran-Plot der <i>AtSMT</i> -Modellstruktur.....	52
Abb. 3.6 Modellierter $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung der <i>AtSMT</i> .....	53
Abb. 3.7 Expression von <i>AtSMT</i> -Sequenzvarianten.....	54
Abb. 3.8 Stereoabbildungen ausgewählter Aminosäurereste im aktiven Zentrum der <i>AtSMT</i> .....	56
Abb. 3.9 (A) Temperaturstabilität der rekombinanten <i>AtSMT</i> (B) SDS-PAGE-Gel.....	59
Abb. 3.10 v/s-Plots der SMT Reaktion und Lineweaver-Burk-Plots.....	61
Abb. 3.11 Bestimmung der Dissoziationskonstanten und Ternär-Komplex-Dissoziationskonstanten.....	62
Abb. 3.12 HPLC-Analyse der SMT-Nebenaktivitäten .....	65
Abb. 3.13 Reaktionen, die durch die <i>AtSMT</i> katalysiert werden.....	66
Abb. 3.14 Stereoabbildungen ausgewählter Aminosäurereste im aktiven Zentrum der <i>AtSMT</i> (Disproportionierungsreaktion).....	67
Abb. 4.1 Multiples Alignment der Arabidopsis SCPL-Acyltransferasen auf Chromosom 2 .....	75
Abb. 4.2 Reaktionsschema der SMT.....	77
Abb. 4.3 Alternative Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen .....	81
Abb. A1 Sequenzvergleich der Arabidopsis <i>SMT</i> -cDNA und der <i>codon usage</i> optimierten cDNA ( <i>ySMT</i> ) ....	112
Abb. A2 Bi-phasige v/s-Plots der SMT Reaktion .....	113
Abb. A3 ESI-CID Massenspektren .....	114
Abb. A4 Lineweaver-Burk-Plots der SMT Reaktion (Enzymkinetik-Tool der SigmaPlot Software) .....	115

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1 Vektoren .....	20
Tab. 2.2 Stämme.....	21
Tab. 2.3 Programm zur Durchführung der PCR .....	29
Tab. 2.4 Programm zur Durchführung der PCR für ortsgerichtete Mutagenesen .....	29
Tab. 3.1 SMT-Aktivität in den getesteten Expressionssystemen in pkat pro Liter Kultur. ....	43
Tab. 3.2 Berechnete Interaktionsenergien der verschiedenen Liganden mit der AtSMT .....	55
Tab. 3.3 Reinigungsschema der rekombinanten AtSMT.....	59
Tab. 3.4 Kinetische Konstanten der rekombinanten AtSMT.....	63
Tab. 3.5 Kompetitive Hemmversuche mit potenziellen Inhibitoren der AtSMT .....	64
Tab. 3.6 SMT-Aktivitäten für die Bildung von Sinapoylmalat, Sinapat und 1,2-Disinapoylglucose.....	65
Tab. A1 verwendete Oligonukleotide .....	110

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bn	<i>Brassica napus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
kDa	Kilodalton
DFP	Diisopropylfluorophosphat
1,2-Disinapoylglucose	1,2-Di- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i> ( <a href="http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/">http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/</a> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<i>g</i>	Einheit der Erdbeschleunigung
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-Thio- $\beta$ -Galactopyranosid
kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i> (komplexes Nährmedium)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
p <i>K</i> <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid



RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:Anthocyanin-Sinapoyltransferase
SCPs	Serin-Carboxypeptidasen
SCT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SCE	Sinapinesterase
SGT	UDP-Glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase
Sinapin	<i>O</i> -Sinapoylcholin
Sinapoylglucose (SinGlc)	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose
Sinapoylmalat	2- <i>O</i> -Sinapoyl-L-Malat
SMT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase
SST	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -Glucose Sinapoyltransferase
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
$T_m$	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton-X100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% (v/v) Tween-20
U	Unit (Enzymmenge, die 1 $\mu$ Mol Substrat pro Minute umsetzt)
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumeneinheiten
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid

Aminosäuren mit Positionsbezeichnung werden im Drei- bzw. Einbuchstabencode angegeben. Im Text verwendete Anglizismen und lateinische Begriffe sind kursiv kenntlich gemacht.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels

Pflanzen synthetisieren eine Vielzahl chemischer Verbindungen, die für die Aufrechterhaltung der zentralen Lebensprozesse nicht essentiell sind und deshalb als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet werden (Hartmann, 1996; Sachs, 1873). Diese ausgeprägte Synthesekapazität gilt aus ökologischer Sicht als Anpassung an die sessile Lebensweise, die den Pflanzen die biochemische Adaptation an wechselnde biotische und abiotische Umweltfaktoren ermöglicht. Bislang sind mehr als 200.000 verschiedene pflanzliche Sekundärmetabolite bekannt (Hartmann und Ober, 2002), wobei u.a. die Grundgerüste der Phenylpropanoide, Terpenoide, Alkaloide oder Polyketide durch die Enzyme des Sekundärstoffwechsels modifiziert werden, die in allen taxonomischen Gruppen des Pflanzenreichs vorkommen (Croteau *et al.*, 2000). Phenolische Verbindungen wie Flavonoide, Lignine oder Hydroxyzimtsäure-Konjugate werden über den pflanzlichen Phenylpropanstoffwechsel gebildet, der von den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin oder L-Tyrosin ausgeht. Verschiedene Stoffwechselprodukte dieses Stoffwechselwegs spielen als Phytoalexine in der Pathogenabwehr (Dixon, 2001) oder als Locksubstanzen für Insekten eine Schlüsselrolle (Dixon und Steele, 1999). Andere phenolische Verbindungen wirken als Antioxidantien oder UV-Schutz-Pigmente (Hahlbrock und Scheel, 1989). Zudem konnte für Hydroxyzimtsäuren und Hydroxycumarine die Beteiligung regulatorischer Prozesse des Pflanzenwachstums durch Inhibierung der Samenkeimung und des Wurzelwachstums gezeigt werden (Burghardt *et al.*, 1994).

Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe werden zunächst durch Oxidation, Zyklisierung oder Ligation aus den Produkte des Primärstoffwechsels gebildet. Die vielfältige chemische Diversität der pflanzlichen Sekundärmetabolite wird dann im Wesentlichen durch Modifizierung der Grundgerüste, wie Glycosylierung, Prenylierung, Methylierung oder Acylierung erreicht. Acyltransferasen (EC 2.3.1.x) katalysieren die Übertragung einer Acylgruppe von einem Donormolekül auf die Hydroxyl-, Amino-, oder Thiolgruppe eines Akzeptormoleküls unter Bildung eines Acylkonjugats, wobei entweder CoA-Thioester oder 1-*O*-Glucoseester als energiereicher Acyldonor akzeptiert werden. Zudem sind bisher zwei Enzyme aus Tomate und Kartoffel beschrieben, die weder CoA-

Thioester noch 1-*O*-Glucoseester als Acyldonatoren verwenden. Hier dient Kaffeoylchinasäure (Chlorogensäure) als Acyldonor für die beiden Kaffeoyltransferasen, wobei Kaffeoylglutarsäure bzw. Kaffeoylgalactarsäure (Strack und Gross, 1990; Strack *et al.*, 1987a) oder 3,5-Di-*O*-Kaffeoylchlorogensäure (Kojima und Kondo, 1985; Villegas *et al.*, 1987) gebildet werden. Bislang sind diese beiden Kaffeoyltransferasen jedoch die einzigen Beispiele für Chlorogensäureester-akzeptierende Acyltransferasen.

Hydroxyzimtsäure-CoA-Thioester wurden erstmals bei Transacylierungsreaktionen mit Chlorogensäure beschrieben (Stöckigt und Zenk, 1974). Seither wurden eine Vielzahl von Acyltransferasen gefunden, die CoA-Thioester-aktivierte Acyldonatoren akzeptieren und die Bildung von *O*-Ethern mit Chinasäure (Lamb, 1977; Ulbrich *et al.*, 1976), Shikimisäure (Ulbrich und Zenk, 1980), Isocitrat (Strack *et al.*, 1987b), verschiedenen Zuckern (Strack *et al.*, 1987a), aber auch mit Flavonolglucosiden (Saylor und Mansell, 1977) oder Anthocyanen (Kamsteeg *et al.*, 1980) katalysieren.

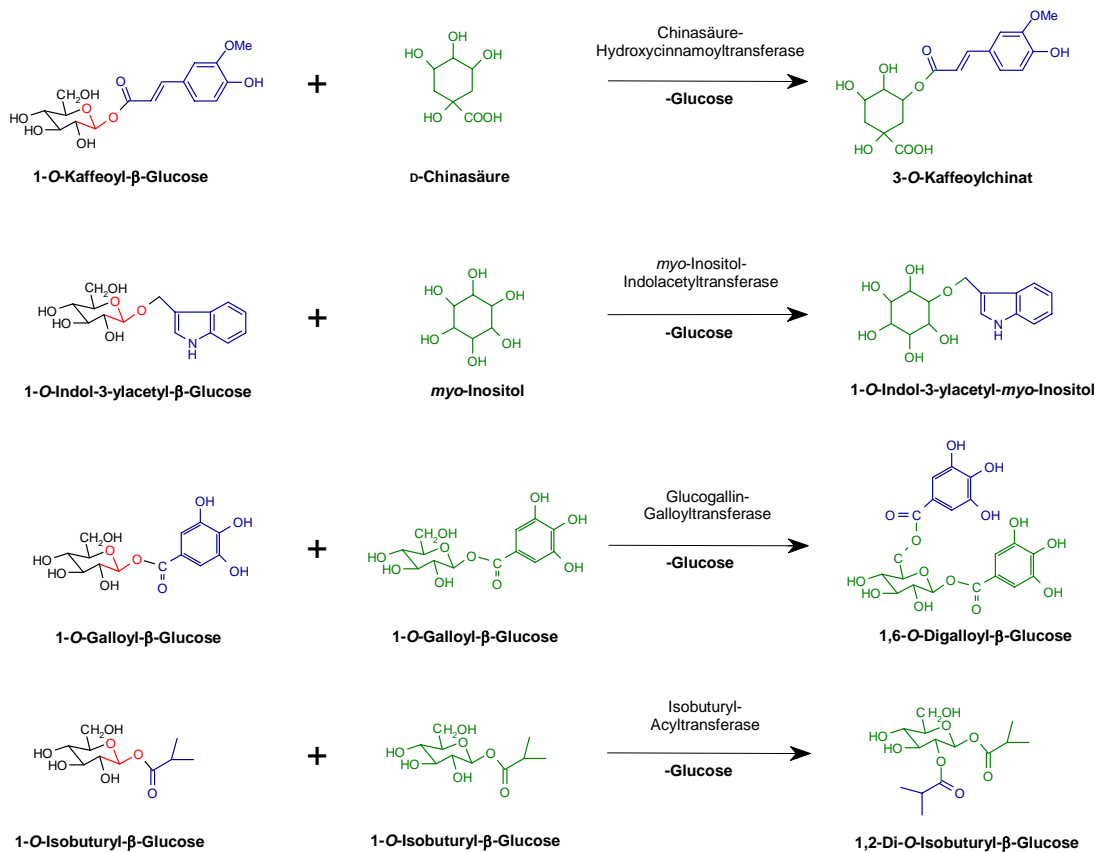
Neben diesem weit verbreiteten CoA-abhängigen Acyltransferasetyp existieren Enzyme, die das hohe Gruppenübertragungspotential von 1-*O*-Glucoseestern der Hydroxyzimtsäuren ( $-35,7 \text{ kJ}\cdot\text{Mol}^{-1}$ ) für den Acyltransfer nutzen (Mock und Strack, 1993). Im Jahr 1972 wurde erstmals postuliert, dass aktiviertere Glucoseester als Acyldonatoren im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel bei der Biosynthese von Chlorogensäure (3-*O*-Kaffeoylchinat) aus Kaffeoylglucose und Chinasäure eine Rolle spielen könnten (Kojima und Uritani, 1972). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Chinasäure-Hydroxycinnamoyltransferase wurde aber erst 13 Jahre später beschrieben (Kojima und Kondo, 1985; Abb. 1.1).

Mittlerweile konnte für eine Reihe pflanzlicher Metabolite aus unterschiedlichsten Stoffwechselwegen gezeigt werden, dass sie aus der Transacylierung von 1-*O*-Glucoseestern ( $\beta$ -Acetalestern) hervorgehen:



So wird in *Brassicaceen* (Kreuzblütlern) der aktivierte Sinapinsäure-Glucoseester (1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose) durch Transacylierung in Sinapoyl-L-Malat (Sinapoylmalat) oder Sinapoylcholin (Sinapin) überführt (Dahlbender und Strack 1986; Gräwe *et al.* 1992). In Wurzeln der Süßkartoffel (*Ipomea batatas*) katalysiert die 1-*O*-Hydroxycinnamoyl- $\beta$ -Glucose:Chinasäure-Hydroxycinnamoyltransferase (Villegas und Kojima, 1986) die Übertragung des Hydroxyzimtsäurerests aus 1-*O*-Cumaroylglucose und 1-*O*-Kaffeoylglucose auf Chinasäure (Abb. 1.1) unter Bildung von 3-*O*-Cumaroylchinat bzw. 3-*O*-Kaffeoylchinat (Chlorogensäure). Weitere Beispiele sind acylierte Betacyane, die durch Umesterung der entsprechenden Hydroxyzimtsäure-

Glucoseester in Pflanzen der Ordnung Caryophyllales synthetisiert werden (Bokern *et al.*, 1991a; Bokern und Strack, 1988), oder die Übertragung eines Hydroxyzimtsäurerests aus 1-*O*-Cumaroylglucose oder 1-*O*-Kaffeoylglucose auf Glucarsäure in jungen Blättern des Hammerstrauchs (*Cestrum elegans*) beschrieben (Strack *et al.*, 1988).



**Abb. 1.1** Ausgewählte Transacylierungen von  $\beta$ -Acetalestern durch Glucoseester-abhängige Acyltransferasen. Rot: Acetalstruktur; blau: Acylgruppe des Donormoleküls; grün: Acylakzeptor

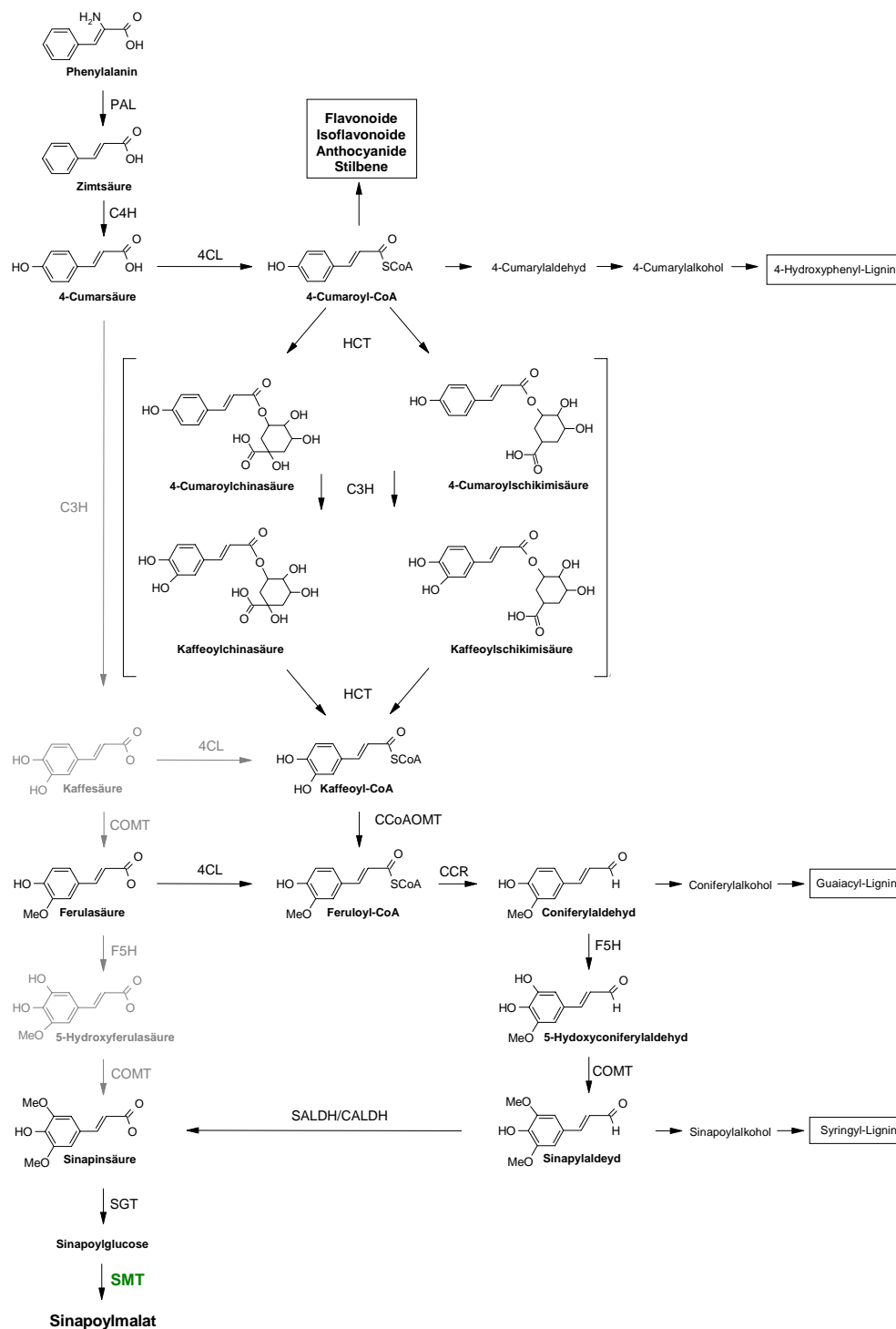
In *Raphanus sativus* (Radieschen) kann auch ein zweites Molekül Sinapoylglucose (Dahlbender und Strack, 1986) als Acylakzeptor dienen, wobei das Produkt 1,2-Di-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose (1,2-Disinapoylglucose) einer solchen Disproportionierungsreaktion kürzlich auch für Raps (Baumert *et al.*, 2005) und Arabidopsis (Fraser *et al.*, 2007) detektiert wurde. In der Gattung *Spinacia* (Spinat) dient Tartarsäure als Acylakzeptor, und es entsteht durch Umesterung 2-Acetyl-3-(4-Cumaroyl)-*meso*-Tartarsäure (Strack *et al.*, 1987b). Aber auch im Hormonstoffwechsel von *Zea mays* katalysieren Glucoseester-abhängige Acyltransferasen im flüssigen Endosperm die Synthese von Indol-3-ylacetat (Abb. 1.1), wobei die aktivierte 1-*O*-Indol-3-ylacetylglucose, mit *myo*-Inositol verestert wird (Kesy und Bandurski, 1990). Ebenfalls konnte in Blättern der Eiche (*Quercus robur*) die Transacylierung ausgehend von einem Glucoseester gezeigt werden. Die  $\beta$ -Glucogallin: $\beta$ -Glucogallin-6-*O*-Galloyltransferase bildet 1,6-Digalloylglucose (Abb. 1.1)

durch Übertragung eines Galloylrests (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) auf ein zweites Molekül  $\beta$ -Glucogallin, wobei der Glucoseester sowohl Donor als auch Akzeptor für den Galloylrest darstellt (Schmidt *et al.*, 1986).

## 1.2 Sinapoyltransferasen der *Brassicaceen*

Hydroxyzimtsäuren stellen die zentralen Produkte des phenolischen Stoffwechsels dar. Sie akkumulieren in vielen Pflanzen in Form verschiedener Konjugate als Endprodukte (Strack und Mock, 1993). Dabei ist das Vorkommen der unterschiedlichen Verbindungen zumeist auf eine begrenzte Anzahl von Arten beschränkt. So werden z.B. in die Zellwände von *Solanum tuberosum* (Kartoffel) Amide verschiedener Hydroxyzimtsäuren mit Tyramin eingelagert (Schmidt *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1998). Im Phenylpropanstoffwechsel der *Brassicaceen* akkumulieren Sinapoylglucose als Zwischenprodukt sowie die beiden Endprodukte Sinapin im Samen (Bouchereau *et al.*, 1991; Regenbrecht und Strack, 1985) und Sinapoylmalat in den oberen, epidermalen Schichten der Keimblätter (Strack und Sharma, 1985).

Die Biosynthese der meisten pflanzlichen Phenole beginnt mit der Desaminierung der Aminosäure L-Phenylalanin durch das Enzym Phenylalaninammoniak-Lyase zur trans-Zimtsäure (Herrmann und Weaver, 1999; Weaver und Herrmann, 1997; Abb. 1.2), die nachfolgend hydroxyliert und zum aktivierten CoA-Thioester umgewandelt wird. Das Produkt 4-Cumaroyl-CoA ist Ausgangspunkt für die Synthese der diversen Gruppen der Flavonoide, Isoflavonoide, Anthocyane und Stilbene, aber auch Vorläufer des 4-Hydroxyphenyllignins. Entgegen früherer Annahmen, dass eine weitere Hydroxylierung in *meta*-Position an der freien 4-Cumarsäure stattfindet, zeigten neuere Untersuchungen (Heller und Kuhn, 1985; Hoffmann *et al.*, 2003; Schoch *et al.*, 2001) die bevorzugte Umsetzung von Konjugaten der Chinasäure und Schikimisäure zu den jeweiligen Kaffeesäureestern. (Franke *et al.*, 2002a; Franke *et al.*, 2002b). Anschließend wird der Kaffeoylthioester in *meta*-Position methyliert und zum Coniferylaldehyd, einer Vorstufe des Guaiacyl-Lignins (Humphreys und Chapple, 2002), reduziert. Auf der Stufe des Aldehyds (Goujon *et al.*, 2003; Humphreys *et al.*, 1999) wird die Hydroxyzimtsäure an der C5-Position hydroxyliert und methyliert, so dass Sinapylaldehyd entsteht. Dieser Metabolit dient einerseits als Ausgangsverbindung für das Syringyllignin (Humphreys und Chapple, 2002), andererseits kann durch Oxidation Sinapinsäure entstehen (Nair *et al.*, 2004).



**Abb. 1.2** Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel (*A. thaliana*). Grau hinterlegte Strukturen und Enzyme stellen alternative Biosynthesewege dar, die bisher experimentell noch nicht nachgewiesen werden konnten (modifiziert nach Hoffmann *et al.*, 2004 und Boudet, 2007). 4CL, 4-Cumarat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.12; Lindl *et al.*, 1973); C3H, 4-Cumarsäure-3-Hydroxylase (EC 1.14.18.1; Omura und Sato, 1964); C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase (EC 1.14.13.11; Russell und Conn, 1967); CCR, Cinnamoyl-CoA-Reduktase (EC 1.2.1.44; Gross und Kreiten, 1975); CCoAOMT, Kaffeoyl-CoA-*O*-Methyltransferase (EC 2.1.1.104; Pakusch *et al.*, 1989); COMT, Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase (EC 2.1.1.68; Shimada *et al.*, 1973); F5H, Ferulasäure-5-Hydroxylase (EC 1.14.-.-; Grand, 1984); HCT, Hydroxycinnamoyltransferase (EC 2.3.1.133; Strack *et al.*, 1987a); PAL, Phenylalaninammoniak-Lyase (EC 4.3.1.5; Koukol und Conn, 1961); SALDH/CALDH, Sinapylaldehyd-Dehydrogenase/Coniferylaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.68; Nair *et al.*, 2004); SGT, UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120; Strack, 1980); SMT, Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.192; Tkotz und Strack, 1980).

Diese wird nachfolgend durch die UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT; Milkowski *et al.*, 2000a; Nurmman und Strack, 1981; Strack, 1980; Wang und Ellis, 1998) zu dem energiereichen Glucoseester 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose (Sinapoylglucose) umgesetzt.

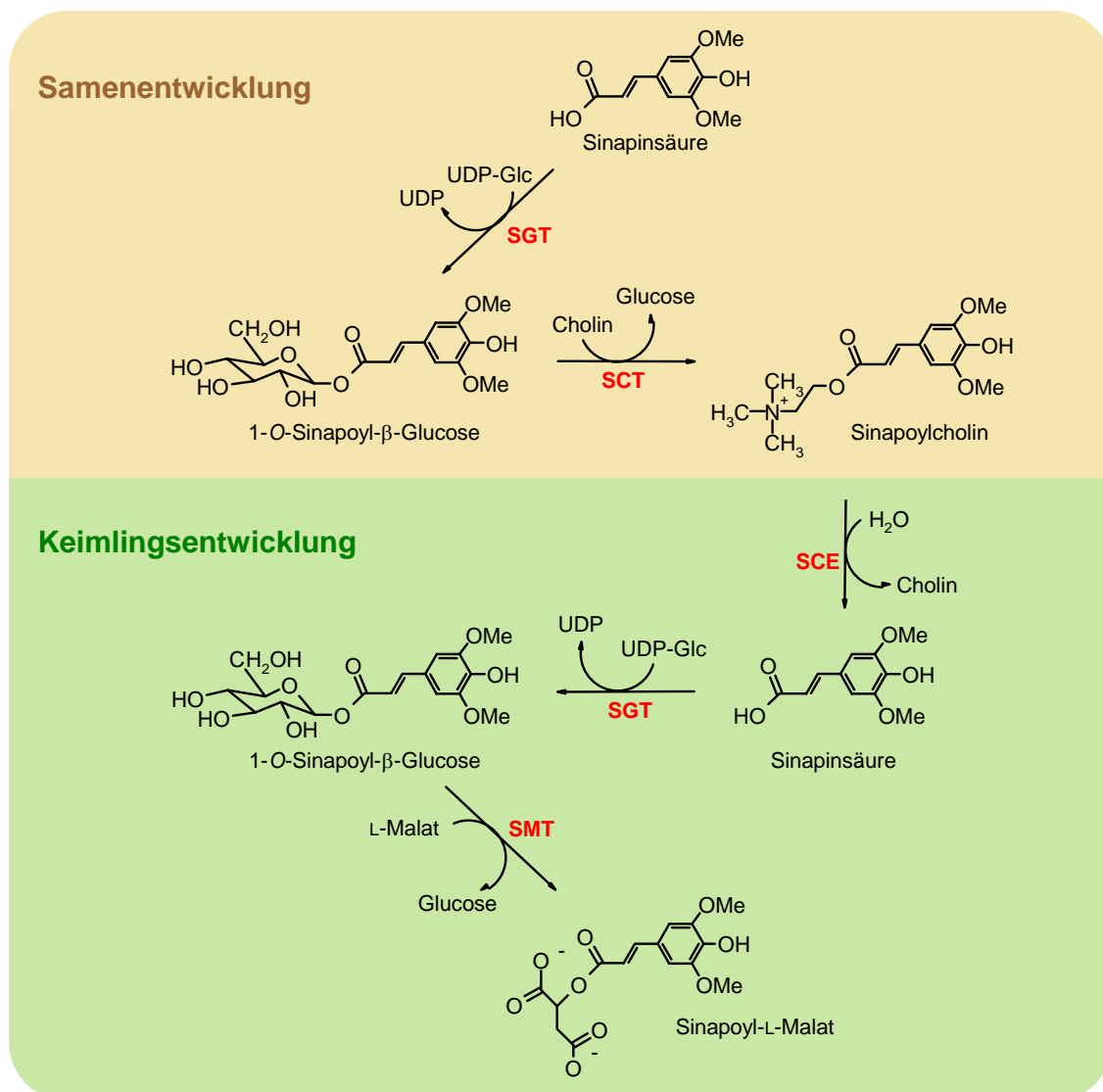
Auch die anderen im pflanzlichen Sekundärmetabolismus abundanten Hydroxyzimtsäuren (4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure) können durch unterschiedliche Glucosyltransferasen (Lim *et al.*, 2001a) zu den entsprechenden energiereichen Glucoseestern umgesetzt werden. Hydroxyzimtsäuren sind unter anderem Bestandteile pflanzlicher Zellwände (Mathew und Abraham, 2004; Meißner *et al.*, 2008; Wallace und Fry, 1994), wobei die entsprechenden Hydroxyzimtsäureglucoseester als Acyl-Donatoren für Acyltransferasen dienen und mittels Umesterung in die Zellwände eingebaut werden könnten (Bokern *et al.*, 1991b; Iiyama *et al.*, 1994).

Während der Samenentwicklung von *Brassicaceen* wird Sinapoylglucose durch die Acyltransferase 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT; Gräwe und Strack, 1986; Milkowski *et al.*, 2004; Shirley *et al.*, 2001; Strack *et al.*, 1983; Vogt *et al.*, 1993; Weier *et al.*, 2008) zu Sinapin verestert (Abb. 1.3), das im embryonalen Gewebe akkumuliert. Während der Keimung wird das gespeicherte Sinapin durch die Sinapinesterase (SCE; Clauß *et al.*, 2008; Nurmman und Strack, 1979; Strack *et al.*, 1980; Tzagoloff, 1963a; 1963b) hydrolysiert (Abb. 1.3).

Das freigesetzte Cholin geht zu etwa 50% in die Synthese von Phosphatidylcholin ein (Nurmman und Strack, 1981; Strack, 1981), während aus der Sinapinsäure durch die SGT erneut Sinapoylglucose entsteht. In der frühen Phase der Keimlingsentwicklung findet keine *de novo*-Synthese der Sinapinsäure statt. Dieser Stoffwechselbereich wird ausschließlich durch die Freisetzung der Sinapinsäure aus Sinapin durch die SCE abgedeckt. Die *de novo*-Synthese setzt erst mit der Entwicklung der Folgeblätter ein (Strack *et al.*, 1978).

In den Vakuolen der Blattepidermis und des Mesophylls wird Sinapoylglucose mit L-Malat zu Sinapoylmalat verestert (Hause *et al.*, 2002; Sharma und Strack, 1985; Strack und Sharma, 1985). Diese Reaktion wird durch die Acyltransferase 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT; EC 2.3.1.92; Gräwe *et al.*, 1992; Lehfeldt *et al.*, 2000; Mock *et al.*, 1992; Strack, 1982; Tkotz und Strack, 1980) katalysiert. Die Aktivität der SMT und die Akkumulation des Produkts Sinapoylmalat sind abhängig von der Lichtmenge und der verfügbaren Menge an Nitrat und korrelieren mit dem Gehalt an L-Malat in den Keimblättern. Zudem zeigte sich bei der Anzucht von *Raphanus*-Keimlingen im Dunkeln bzw. der Anwesenheit von Ammonium als einzige Stickstoffquelle eine herabgesetzte SMT-Aktivität, sowie ein geringer Sinapoylmalat- und L-Malat-Gehalt (Dahlbender und Strack, 1984; Strack *et al.*, 1986). Neben Sinapoylmalat

werden aber auch die Ester von L-Malat mit der 4-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure gebildet (Brandl *et al.*, 1984; Nielsen *et al.*, 1984).



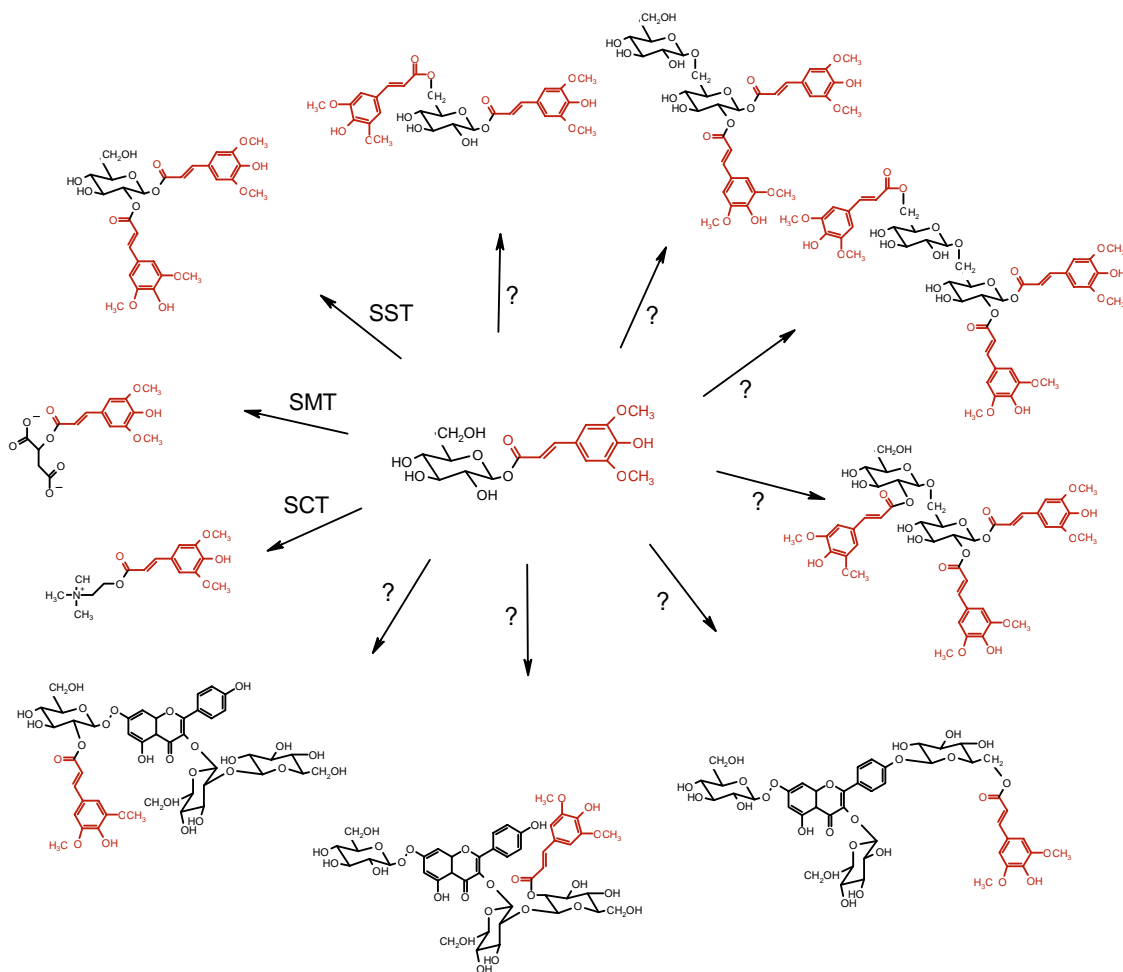
**Abb. 1.3** Metabolismus der Sinapatester in *Brassicaceen* (modifiziert nach Milkowski *et al.*, 2004). SCE, Sinapinesterase (EC 3.1.1.49; Tzagoloff, 1963a; 1963b); SCT, Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91; Strack *et al.*, 1983); SGT, UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120; Strack, 1980); SMT, Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92; Tkotz und Strack, 1980).

Es wird diskutiert, dass Sinapoylmalat die Pflanze vor UV-B Strahlung schützt (Landry *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1993; Sheahan, 1996). Dies wurde durch eine erhöhte Schädigung der Arabidopsis-Mutante *fah1* (*ferulic acid-5-hydroxylase*) nach UV-B-Bestrahlung untermauert, da in dieser Mutante durch das Fehlen der Ferulasäure-5-Hydroxylase keine Sinapatester mehr gebildet werden (Booij-James *et al.*, 2000).

Durch eine Metabolitenanalyse von *Brassica napus*-Samen konnte neben den bekannten Verbindungen Sinapoylmalat, Sinapin bzw. 1,2-Di-O-Sinapoyl-β-Glucose (1,2-Disinapoylglucose) eine Vielzahl weiterer Sinapinsäureester identifiziert werden (Baumert *et al.*,



2005; Abb. 1.4). Durch dsRNAi-vermittelte samenspezifische Suppression des *BnSGT*-Gens (*UGT84A9*; Nomenklatur nach: Mackenzie *et al.*, 1997) in *B. napus* konnte gezeigt werden, dass die Absenkung des Gehalts an Sinapoylglucose ein Verschwinden bzw. eine starke Reduktion aller sinapoylierten Verbindungen zur Folge hatte. Dementsprechend sollte auch die Bildung dieser Metabolite in Raps von Sinapoylglucose abhängig sind und legt die Vermutung nahe, dass Glucoseester-abhängige Acyltransferasen die Sinapoyltransfer-Reaktionen katalysieren, die zur Akkumulation der in Abb. 1.4 aufgeführten Sinapatester führen (Baumert *et al.*, 2005).



**Abb. 1.4** Identifizierte Sinapatester aus Samen von *B. napus*, die Sinapoylglucose-abhängig gebildet werden (nach Baumert *et al.*, 2005). Die Pfeile symbolisieren Acyltransferase-Aktivitäten. SCT, Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91; Strack *et al.*, 1983); SMT, Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92; Tkotz und Strack, 1980); SST, Sinapoylglucose:Sinapoylglucose-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.103; Dahlbender und Strack, 1986; Fraser *et al.*, 2007); ?, putative SCPL-Acyltransferase-Aktivitäten

In den letzten Jahren konnten einige Gene, die für Sinapatester-modifizierende Enzyme kodieren, identifiziert werden. Mit Hilfe der reversen Genetik wurden cDNAs isoliert, die für die SGT aus *B. napus* (Milkowski *et al.*, 2000a) und *A. thaliana* (Milkowski *et al.*, 2000b; Lim *et al.*, 2001b) kodieren. Die Identifizierung und Klonierung der Gene für die

Acyltransferasen SMT und SCT gelang durch das *screening* von chemisch mutagenisierten (EMS) *A. thaliana*-Pflanzen.

Dabei wurden mittels Dünnschichtchromatographie Extrakte von Mutanten analysiert und so Linien identifiziert, die in ihren Blättern anstelle von Sinapoylmalat ausschließlich Sinapoylglucose akkumulieren (Lorenzen *et al.*, 1996). Aus der genetischen Analyse dieser Mutanten ging hervor, dass das Allel ein singuläres, rezessiv vererbtes Gen von Arabidopsis ist. So konnte das Gen der SMT *SINAPOYLGLUCOSE ACCUMULATOR 1 (SNG1)* durch inverse PCR ausgehend von einer T-DNA-Insertionsmutante mit dem oben beschriebenen Phänotyp kloniert werden (Lehfeldt *et al.*, 2000). Aufgrund hoher Sequenzidentität zu Serin-Carboxypeptidasen wurde die SMT in die Klasse der SCPL-Proteine (*serine carboxypeptidase like*) eingeordnet (vgl. 1.3).

Die Analysen methanolischer Extrakte aus Samen führte zur Identifizierung einer Arabidopsis-Mutante, die im Samen Sinapoylglucose anstelle von Sinapin akkumuliert. Das verantwortliche Gen der SCT *SINAPOYLGLUCOSE ACCUMULATOR 2 (SNG2)* wurde mit Hilfe von kartengestützter Klonierung (*map-based cloning*) und Kandidatengen-Analyse kloniert (Shirley *et al.*, 2001). Wenig später konnte, ausgehend von einem cDNA-Fragment, das Sequenzähnlichkeit zu Acyltransferase-Genen aufwies, die SCT-cDNA (BnSCT) aus *B. napus* isoliert werden (Milkowski *et al.*, 2004). Die SCT wurde ebenfalls als SCPL-Protein klassifiziert.

Das Gen für die Sinapinesterase (SCE) wurde erst kürzlich identifiziert (Clauß *et al.*, 2008). Ein RT-PCR Ansatz mit degenerierten Primern, abgeleitet von Peptidsequenzen, lieferte eine Teilsequenz der SCE aus *B. napus*. Anschließend gelang die Klonierung des vollständigen Leserahmens der *BnSCE* mit Hilfe der RACE-Technologie, wobei die katalytische Aktivität des entsprechenden Proteins *in vitro* bestätigt werden konnte. Sequenzvergleiche offenbarten anstatt der Zugehörigkeit zur SCPL-Proteinfamilie Ähnlichkeiten zur Familie der GDSL-Lipasen (Clauß *et al.*, 2008).

### 1.3 Serin-Carboxypeptidasen

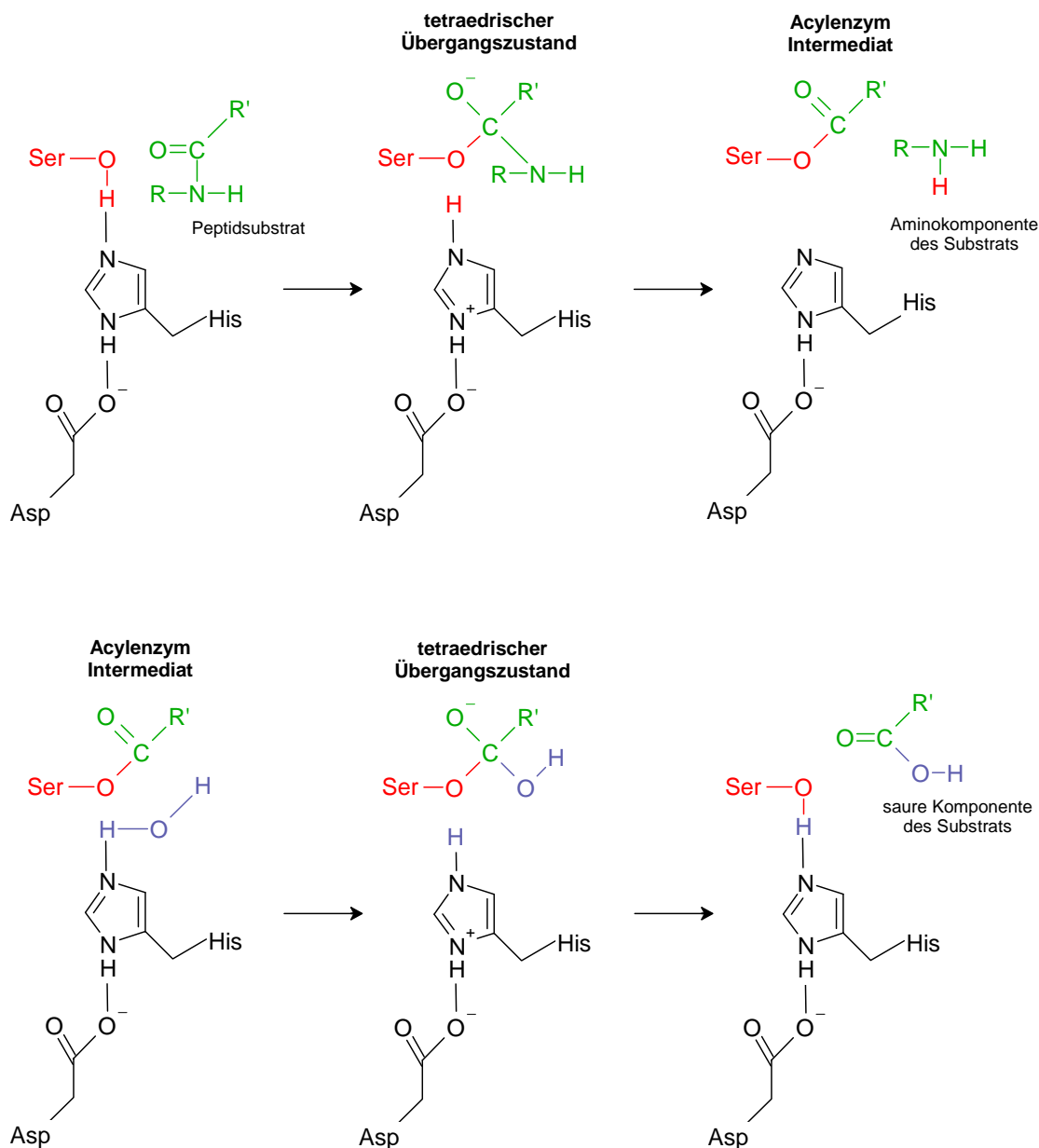
Proteolytische Enzyme werden nach ihrem Katalysemechanismus in fünf Klassen unterteilt: Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Threonin- und Serin-Peptidasen. Bislang sind etwa 66.000 Peptidase-Sequenzen bekannt (MEROPS *release* 7.90), darunter etwa 26.000 Serin-Peptidasen, die in 13 *clans* eingeordnet werden, bei denen man aufgrund von ähnlicher Tertiärstruktur oder Anordnung der Aminosäuren im katalytischen Zentrum eine gemeinsame Herkunft annimmt (Barrett und Rawlings, 1995; Barrett *et al.*, 1998). Die Klasse der Serin-Peptidasen wurde ursprünglich unterschieden durch die

Anordnung der Aminosäurereste der katalytischen Triade bestehend aus den Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat. Diese wird in vier unterschiedlichen strukturellen Kontexten gefunden. Das weist darauf hin, dass die katalytische Einheit mindestens vier mal unabhängig voneinander entstanden sein muss. Diese vier *clans* der Serin-Peptidasen werden durch Chymotrypsin (*clan* PA; His-Asp-Ser), Subtilisin (*clan* SB; Asp-His-Ser), Carboxypeptidase Y (*clan* SC; Ser-Asp-His) und der C1p Peptidase (*clan* SK; Ser-His-Asp) repräsentiert. Durch Fortschritte in der Klonierungstechnik und der Analyse dreidimensionaler Strukturen wurde eine Vielzahl von Serin-Peptidasen gefunden, die nicht in eine der vier *clans* eingeordnet werden konnten und sich hinsichtlich der Zusammensetzung der katalytischen Triade unterscheiden (Ser-His-Glu, His-Ser-His) bzw. eine Diade (Ser-Lys/His), oder ein N-terminales katalytisches Serin besitzen (Hedstrom, 2002).

Die Existenz einer katalytischen Triade wurde erstmals durch Untersuchungen mit dem Serin-bindenden Nervengas Diisopropylfluorophosphat (DFP, Jensen *et al.*, 1949; Oosterbaan *et al.*, 1958; Schaffer *et al.*, 1953) und durch Inaktivierung des Histidins mittels Tyrosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon (TPCK, Schoellmann und Shaw, 1963) vermutet. Diese Hypothese konnte durch chemische Modifizierung wie das Entfernen der Hydroxylgruppe des Serins (Weiner *et al.*, 1966) oder die Methylierung der Nε2-Position des Histidins (Henderson, 1971), was je eine Reduktion der Aktivität um den Faktor 10<sup>4</sup> zur Folge hatte, verifiziert werden. Zudem untermauerten ortsgerichtete Mutagenesen, in denen das katalytische Serin und Histidin durch Alanin substituiert wurden (Corey und Craik, 1992), das Vorkommen einer katalytischen Triade.

Erste Studien zum Katalysemechanismus klassischer Serin-Peptidasen wurden mittels kinetischer Untersuchungen an Chymotrypsin durchgeführt (Polgar und Bender, 1969), wobei die detaillierte Aufklärung des Mechanismus erst 8 Jahre später mit Hilfe der dreidimensionalen Struktur gelang (Matthews *et al.*, 1977). Die katalytische Aktivität der Serin-Carboxypeptidasen basiert auf einem *charge relay*-System, das durch ein Wasserstoffbrückennetz aufgebaut wird. Es umfasst die katalytische Triade aus einem Nukleophil (Serin), einem Elektrophil (Aspartat) und einer Base (Histidin; Bech und Breddam, 1989; Blow *et al.*, 1969; Dodson und Wlodawer, 1998; Hayashi *et al.*, 1975; Hayashi *et al.*, 1973). Dabei wird der nukleophile Angriff des Alkoxidions der Serin-Hydroxylgruppe auf den Carbonylkohlenstoff des Peptidsubstrats durch die Imidazolgruppe des Histidins als generelle Base katalysiert. Dies führt zur Ausbildung eines tetraedrischen Intermediats sowie eines Imidazolium-Ions (Additionsreaktion). Das tetraedrische Intermediat zerfällt durch eine generelle Säurekatalyse zu einem Acylenzym, einer Imidazol-Base und der Aminokomponente des Substrats (Eliminierungsreaktion), wobei während des Acylierungsschritts die Imidazolgruppe ein

Proton der Seryl-Hydroxylgruppe auf die Aminokomponente des Substrats überträgt (Abb. 1.5 oben). Das Acylenzym wird anschließend deacyliert, indem die Rückreaktion der Acylierung durchlaufen wird. Dabei wird während der zweiten Additions-Eliminierungs-Reaktion Wasser als Nukleophil attackiert, welches anschließend das mit der sauren Komponente des Substrats veresterte Serin nukleophil angreift. Nach der erneuten Ausbildung eines tetraedrischen Intermediats wird die saure Komponente abgespalten und als zweites Produkt freigesetzt (Abb. 1.5 unten).



**Abb. 1.5** Reaktionsmechanismus der Serin-Carboxypeptidasen. Oben: Acylierung. Ein tetraedrischer Übergangszustand wird ausgebildet. Infolgedessen wird die Peptidbindung des Substrats gespalten. Die Aminokomponente wird freigesetzt und ein Acylenzym-Intermediat entsteht. Unten: Deacylierung. Das Acylenzym-Intermediat wird durch Wasser gespalten. Dabei wird die Rückreaktion der Acylierung durchlaufen.

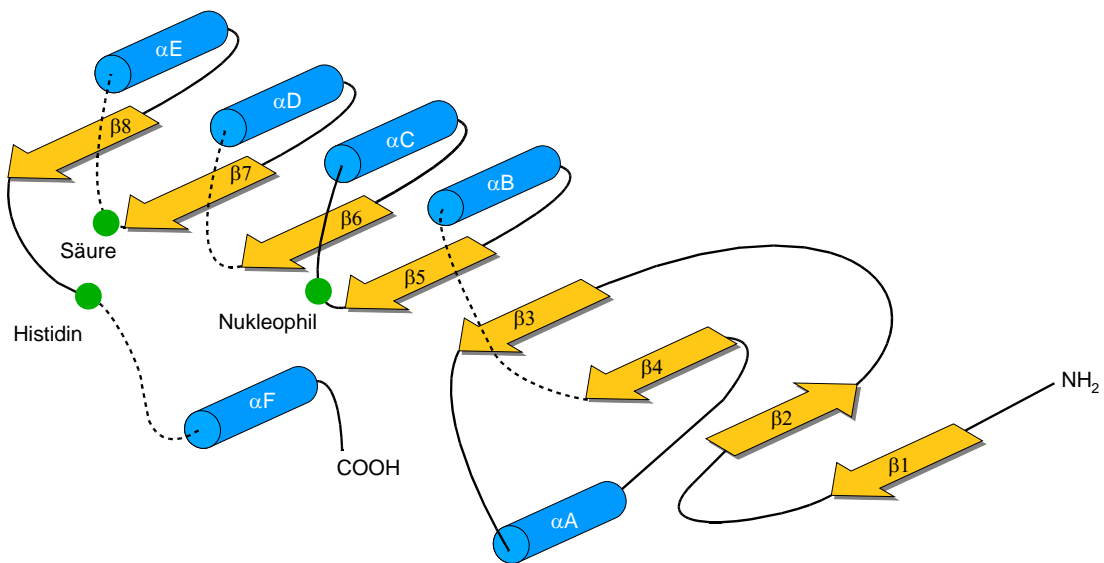
Für den Katalysemechanismus wurde zunächst die Existenz eines Zwei-Protonen-Transfers beschrieben, bei dem das Histidin das Proton des Serins auf Aspartat überträgt (Blow *et al.*, 1969). Diese anfängliche Hypothese wurde jedoch mittels NMR-Studien (Bachovchin, 1985; Jordan und Polgar, 1981; Robillard und Shulman, 1972; 1974) widerlegt. Das Histidin bleibt protoniert und das Aspartat liegt deprotoniert vor. Ferner spielt die Interaktion des negativ geladenen Aspartats mit dem protonierten Histidin während der Ausbildung des tetraedrischen Intermediats eine größere Rolle, als die Interaktion während des Grundzustands (Jordan und Polgar, 1981; Kossiakoff und Spencer, 1981). Zudem bestätigten Mutagenesestudien außerdem die Proton-Wechselwirkung zwischen dem katalytischen Serin und dem Histidin (Jung *et al.*, 1998). Somit wird die Ein-Proton-Transfer-Hypothese favorisiert, wobei das protonierte Histidin durch die Interaktion mit dem negativ geladenen Aspartat durch elektrostatische Interaktionen stabilisiert wird.

Die Enzymkatalyse erfolgt letztendlich durch die Stabilisierung des Übergangszustands. In Serin-Peptidasen wird die Stabilisierung der negativen Ladung im tetraedrischen Übergangszustand ( $6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; Hedstrom, 2002) mit zwei NH-Gruppen des Proteinrückgrats, in der sogenannten Oxyaniontasche (*oxyanion hole*) erreicht. Neben dieser Stabilisierung bewerkstelligt die „Tasche“ zudem noch die Aktivierung des Substrats, damit dieses nukleophil attackiert werden kann. Erstmals wurde die Existenz der Oxyaniontasche von Henderson (1970) beschrieben und konnte mittlerweile durch eine Vielzahl von Kristallstrukturen mit Übergangszustand-Analoga bestätigt werden (u.a. Bone *et al.*, 1989; Bone *et al.*, 1991; Brady *et al.*, 1990).

Die Klasse der Serin-Carboxypeptidasen (*clan* SC) ist ubiquitär verbreitet und wurde in Bakterien, Archaea, Protozoa, Pilzen, Pflanzen und Tieren gefunden. Sie gehört zur übergeordneten Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (Nardini und Dijkstra, 1999; Ollis *et al.*, 1992), die aufgrund struktureller Homologien definiert und in der ESTHER-Datenbank (*ESTerases,  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Enzymes and Relatives*; Cousin *et al.*, 1996; Hotelier *et al.*, 2004; <http://bioweb.enscm.inra.fr/esther>) zusammengefasst wurde.

Enzyme dieser Gruppe setzen die unterschiedlichsten Substrate mit völlig verschiedenen physikochemischen Eigenschaften um und agieren in den unterschiedlichsten Stoffwechselbereichen. Auch die Molekularmassen der einzelnen Proteine unterscheiden sich beträchtlich und umfassen einen Bereich von etwa 25-65 kDa. Allen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gemeinsam ist ein  $\beta$ -Faltblattkern von 5-8 Strängen, der durch  $\alpha$ -Helices verbunden ist, die die Ausbildung eines Alpha/Beta/Alpha-Sandwichs erlaubt (Abb. 1.6). In den meisten Familien sind die  $\beta$ -Faltblätter parallel angeordnet. Die Mitglieder der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Familie stammen wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorläufer ab (Liao *et al.*,

1992; Matthews, 1977) und haben sich in eine Vielzahl verschiedener hydrolytischer Enzyme mit breiten Substratspezifitäten aufgespalten.



**Abb. 1.6** Topologisches Diagramm des als  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold definierten Strukturelements mit  $\alpha$ -Helices (Zylinder) und  $\beta$ -Faltblättern (Pfeile) nach Ollis *et al.*, (1992). Die Positionen der Aminosäurereste, die die katalytische Triade definieren, sind mit Nukleophil, Histidin und Säure (grüne Punkte) markiert. Gestrichelte Linien kennzeichnen variable Regionen, an denen der allgemeine Strukturaufbau Unterschiede aufweisen kann.

Neben den Serin-Carboxypeptidasen (Liao und Remington, 1990) gehören auch Prolyl-Oligopeptidasen (Fulop *et al.*, 1998), Lipasen (Lang *et al.*, 1998; Nardini *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 1990), Hydroxynitril-Lyasen (Lauble *et al.*, 2001; Wajant *et al.*, 1994), Thioesterasen (Bellizzi *et al.*, 2000; Devedjiev *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000), Esterasen (Bourne *et al.*, 2000) sowie die erst kürzlich beschriebenen Peptidzyklisierenden-Thioesterasen (Bruner *et al.*, 2002) zur Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen. Diese Enzyme besitzen eine katalytische Triade, bestehend aus einem Nukleophil-Histidin-Elektrophil, wobei nur das Histidin konserviert ist. Als Nukleophil können die Aminosäurereste Serin, Cystein oder Aspartat fungieren, während das Elektrophil durch Aspartat und Glutamat vertreten wird. Die Besonderheit dieses Faltungstyps besteht darin, dass sämtliche Aminosäurereste der katalytischen Triade in *loop*-Regionen lokalisiert sind, wobei das Nukleophil zentraler Bestandteil eines Pentapeptid-Motivs mit der konservierten Konsensussequenz Gly-X-Nukleophil-X-Gly ist. Dieses Sequenzmotiv bildet das charakteristische Strukturelement  $\beta$ -turn Typ II aus, das im Falle der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen als „nukleophiler Ellenbogen“ bezeichnet wird. Ein weiteres Charakteristikum dieser Hydrolase-Gruppe ist ebenfalls die Ausbildung einer Oxyaniontasche (Whiting und Peticolas, 1994).

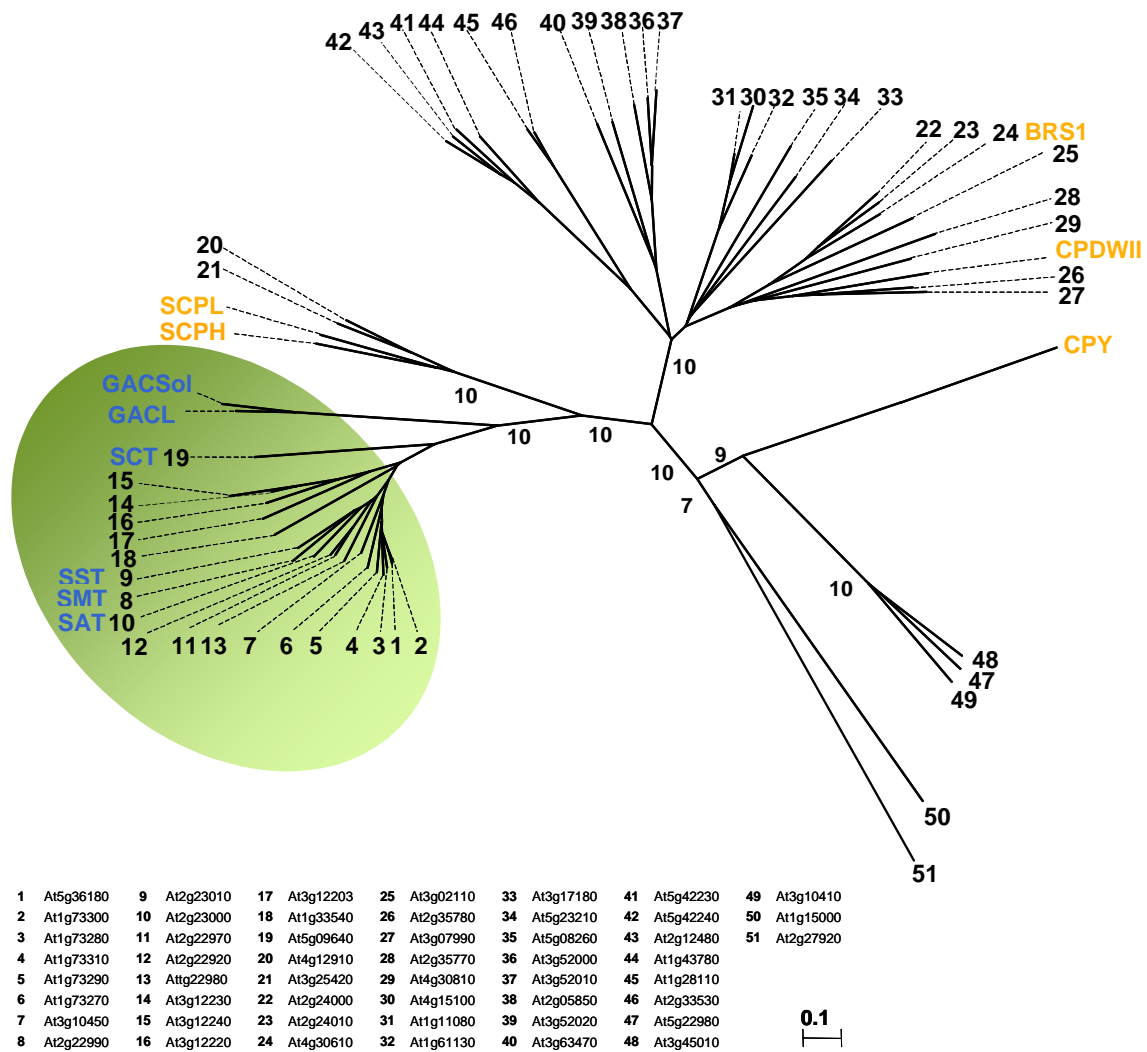
## 1.4 Evolution pflanzlicher Acyltransferasen

Die Klonierung der Gene für eine Isobutyryltransferase aus Tomate (*Solanum lycopersicum*; Abb. 1.1; Li *et al.*, 1999; Li und Steffens, 2000), für die SMT (Lehfeldt *et al.*, 2000) und SCT (Shirley und Chapple, 2003; Shirley *et al.*, 2001) aus Arabidopsis sowie die SCT (Milkowski *et al.*, 2004; Weier *et al.*, 2008) aus Raps lieferten erste Sequenzinformationen, die es ermöglichten, diese Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen als SCPL-Proteine zu klassifizieren (Peptidase Familie S10; Rawlings *et al.*, 2008; [www.merops.ac.uk](http://www.merops.ac.uk)). Anhand von Sequenzidentitäten konnten 51 SCPLs aus *A. thaliana* identifiziert werden, davon 19 potenzielle Glucoseester-abhängige Acyltransferasen (Fraser *et al.*, 2005; Milkowski und Strack, 2004; Abb. 1.7).

Im Primärstoffwechsel entstehen neue Gene meist durch Genduplikationen (Ohno, 1970). Somit verfügt der Organismus dann über zwei identische Genkopien, wobei eine Kopie zunächst nicht dem natürlichen Selektionsdruck unterliegt und so Mutationen ansammeln kann. Meist werden diese Kopien dadurch entweder wieder eliminiert oder inaktiviert (Pseudogene). In seltenen Fällen kann aber mit den Mutationen eine Subfunktionalisierung bzw. Neufunktionalisierung einhergehen und durch den damit auftretenden Selektionsdruck wird diese Kopie anschließend in der Population gehalten (Lynch und Conery, 2003; Ober, 2005; Pichersky, 1990; Pichersky und Gang, 2000). Neben Genduplikationen kann aber auch der Austausch einzelner Domänen für die Entstehung neuer Gene verantwortlich sein (*domain swapping*; Lynch und Conery, 2003). Im Sekundärstoffwechsel ist es zudem theoretisch möglich, dass neue Gene ohne vorangegangene Genduplikation entstehen, indem sich zwei Allele funktionell aufzweigen (Lynch und Conery, 2003). Um die Häufigkeit solcher Ereignisse aber im Einzelnen aufzuklären, müssten jedoch orthologe Loci verwandter Spezies, bei denen die Funktion der einzelnen Gene bekannt sind, miteinander verglichen werden. Allerdings sind zur Zeit entsprechende Datenbanken noch nicht etabliert.

Für Arabidopsis wurde die Entstehung von durchschnittlich 0,002 neuen Genen innerhalb einer Million Jahren kalkuliert, wobei eine relativ kurze Lebensdauer von nur etwa 4 Millionen Jahren berechnet wurde (Lynch und Conery, 2003). Demnach werden die meisten Genkopien durch Mutationen zu Pseudogenen oder verschwinden wieder aus dem Genom.

Bei der Genduplikation können die Gene des Primärstoffwechsels als Pool angesehen werden, aus denen ständig neue Gene für den Sekundärstoffwechsel entstehen können, wobei Genkopien mit einer neu erworbenen Funktion ebenfalls wieder als Vorlage neuer Gene dienen (Lynch und Conery, 2003).



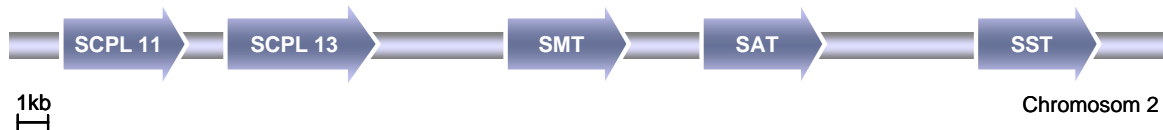
**Abb. 1.7** Phylogenetischer Baum der 51 Arabidopsis SCPL Proteine mit funktionell charakterisierten Acyltransferasen (blau) und SCPs (orange). Der phylogenetische Baum wurde mit PROTDIST der PHYLIP-Software erstellt. Die N-terminalen Signalpeptide wurden nicht berücksichtigt. Die SCPL-Proteine sind durchnummeriert und die entsprechenden GenBank-Accessionnummern sind mit aufgeführt. Proteine die mit bekannten Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen gruppieren sind grün hinterlegt. GACSolb, putative Glucose-Acyltransferase aus *S. berthaultii* (GenBank Accession AF006078; Li und Steffens, 2000); GACLp, Isobutyryl-Acyltransferase aus *L. penellii* (SwissProt Accession Q9LKY6; Li und Steffens, 2000); SST, Sinapoylglucose:Sinapoylglucose Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.103; Dahlbender und Strack, 1986; Fraser *et al.*, 2007); SMT, Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92; Tkotz und Strack, 1980); SCT, Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91; Strack *et al.*, 1983); BRS1, Serin-Carboxypeptidase II aus *A. thaliana* (EC 3.4.16.5; Q9M099; Zhou und Li, 2005); CPY, Serin-Carboxypeptidase aus *S. cerevisiae* (EC 3.4.16.5; P00729; Svendsen *et al.*, 1982); CPDWII, Serin-Carboxypeptidase II aus *T. aestivum* (EC 3.4.16.5; P008819; Breddam *et al.*, 1987); SCPLe, Serin-Carboxypeptidase I aus *S. lycopersicum* (EC 3.4.16.5; Q9M513; Moura *et al.*, 2001); SCPHv, Serin-Carboxypeptidase I aus *Hordeum vulgare* (EC 3.4.16.5; P07519; Doan und Fincher, 1988).

Schätzungsweise handelt es sich bei durchschnittlich 2-4% aller Gen-Produkte um proteolytische Enzyme (Puente *et al.*, 2005). Damit repräsentieren diese einen Gen-Pool, dessen Größe für die Rekrutierung neuer Gene, unter anderem für den Sekundärstoffwechsel, geeignet erscheint. Genduplikate liegen oft in Tandemanordnung im Genom vor und bilden mit unter große Genfamilien, wie beispielsweise



Terpenoidsynthasen (AtTPS; Aubourg et al., 2002) oder Glycosyltransferasen der Familie 1 (UGTs; Paquette et al., 2003) in *A. thaliana*.

Auch das Gen für die SMT von Arabidopsis ist in ein multiples Tandemcluster aus fünf SCPL-Acyltransferasen auf Chromosom 2 eingebettet. Fraser et al. (2007) konnten kürzlich durch die Analyse von Arabidopsis-Mutanten für drei dieser potenziellen Acyltransferasen mögliche Reaktionen angeben. So wurde für das Gen At2g23010 vorgeschlagen, dass es für die 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose-Sinapoyltransferase (SST) kodiert, die die Disproportionierung von zwei Sinapoylglucose-Molekülen katalysiert. Das Gen At2g23000 könnte für eine 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:Anthocyanin-Sinapoyltransferase (SAT) kodieren, die in Arabidopsis die Sinapoylierung von Anthocyanen bewerkstelligt. Ferner wurde für das Protein, das durch das Gen At2g22980 kodiert wird, eine SST Aktivität postuliert, wobei bislang die Hauptreaktion dieses Proteins unklar ist. Die Analyse einer transgenen Arabidopsis Mutante wies für die SMT auf eine geringe katalytische Nebenaktivität der Disproportionierung von zwei Sinapoylglucose-Molekülen hin (Fraser et al., 2007). Somit zeigen vermutlich drei Acyltransferasen des multiplen Tandemclusters von Chromosom 2 überlappende Substratspezifitäten und legen somit die Vermutung nahe, dass diese Gene aus Duplikationsereignissen hervorgegangen sind.



**Abb. 1.8** Gencluster der SCPL-Acyltransferasen auf Chromosom 2 von *A. thaliana*. SCPL 11, At2g22970; SCPL 13, At2g22980; SMT, Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92; Tkotz und Strack, 1980); SAT, Sinapoylglucose:Anthocyanin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.-; Fraser *et al.*, 2007); SST, Sinapoylglucose:Sinapoylglucose-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.103; Fraser *et al.*, 2007).

Im Genom von Reis (*Oryza sativa*) wurden 71 Gene identifiziert, die für SCPL-Proteine kodieren (Feng und Xue, 2006; Tripathi und Sowdhamini, 2006). Keine dieser Sequenzen konnte jedoch der Gruppe potenzieller Glucoseester-abhängiger Acyltransferasen zugeordnet werden. Datenbank-Recherchen ergaben, dass auch in den bisher bekannten Genomen von Algen keine potenziellen Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen zu finden sind (pers. Mitteilung Dr. Carsten Milkowski). Somit scheint das Vorkommen der Klasse der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen auf Landpflanzen beschränkt zu sein.

Sequenzvergleiche zwischen den bereits klonierten Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen und den Primärstoffwechsellenzymen Carboxypeptidase I und II aus Gerste (Sorensen *et al.*, 1986; Sørensen *et al.*, 1987), der Serin-Carboxypeptidase II aus Weizen (CPDWII; Breddam *et al.*, 1987; Liao und Remington, 1990), der

Carboxypeptidase Y (CPY; Endrizzi *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1973; Svendsen *et al.*, 1982) und der Serin-Carboxypeptidase II (Kex1p; Shilton *et al.*, 1996) aus Hefe, sowie dem *human protective protein* (HPP; Rudenko *et al.*, 1995) zeigten, dass in den Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen die Aminosäuren der für die Peptidasen charakteristischen katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat, in homologer Sequenzposition konserviert sind. Erste Hinweise auf ein katalytisch aktives Serin in diesen Acyltransferasen lieferten Hemmversuche mit den Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), die kovalent an Serylreste binden (Lehfeldt *et al.*, 2000; Li und Steffens, 2000). Ferner sind in den Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen die für die Ausbildung der Oxyaniontasche verantwortlichen Aminosäurereste konserviert. Interessanterweise zeigte der Sequenzvergleich in der Nähe des N-Terminus einen relativ großen konservierten Bereich, der bei den Serin-Carboxypeptidasen an der Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks (*hydrogen bond network*) für die Erkennung der C-terminalen Carboxylgruppe des Substrats beteiligt ist (Mortensen *et al.*, 1994a; Mortensen *et al.*, 1994b).

Alle bisher bekannten SCPL-Acyltransferasen besitzen im Gegensatz zu den CoA-abhängigen Acyltransferasen eine N-terminale Signalsequenz für die co-translationale Translokation des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (ER) und anschließendem Transport in die Vakuole. Entsprechende Studien bestätigten für die SMT die Lokalisierung in der Vakuole (Hause *et al.*, 2002; Sharma und Strack, 1985; Strack und Sharma, 1985). Die CoA-abhängigen Acyltransferasen des Sekundärstoffwechsels operieren hingegen im Cytoplasma, woraus folgt, dass die unterschiedlichen Acyltransferreaktionen in der Zelle gegeneinander kompartimentiert sind.

Möglicherweise bildet die 1,2,3,6-Tetra-*O*-Galloylglucose-4-*O*-Galloyltransferase aus Eiche (*Quercus robur* L.) die bislang einzige bekannte Ausnahme hinsichtlich der Glucoseester-abhängigen Acyltransferase-Familie. Erste Peptidsequenzierungen lassen vermuten, dass es sich bei diesem Enzym nicht um ein SCPL-Protein handelt. Die Sequenzen zeigen eine Verwandtschaft zu Glucosidhydrolasen der Familie I, insbesondere zu  $\beta$ -Glucosidasen (Kehl, 2007). Allerdings konnte bisher der vollständige Leserahmen des entsprechenden Gens nicht kloniert werden, so dass der experimentelle Beweis einer Transacylierungsreaktion mit dem rekombinanten Protein noch aussteht.

Die CoA-abhängigen Acyltransferasen des Sekundärstoffwechsels gehören zur Familie der BAHD-Acyltransferasen. Sie wurden nach den Anfangsbuchstaben der ersten vier isolierten pflanzlichen Gene benannt [BEAT (Benzylalkohl *O*-Acetyltransferase; Dudareva *et al.*, 1998), AHCT (Anthocyanin-*O*-Hydroxycinnamoyl-Transferase; Fujiwara *et al.*, 1998), HCBT (*N*-Hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase; Yang *et al.*, 1997) und

**DAT** (Deacetylvinololin-4-*O*-Acetyltransferase; St-Pierre *et al.*, 1998)]. Die Acyltransferasen dieser Klasse weisen eine geringe Sequenzidentität von 25-34% innerhalb der Familie auf (St-Pierre und De Luca, 2000), wobei jedoch einzelne Gene untereinander eine Identität von 90% zeigen können (Boatright *et al.*, 2004). Insgesamt sind 19 Aminosäurereste innerhalb der Familie konserviert (Ma *et al.*, 2005), die alle innerhalb der CoA-Bindungsdomäne zu finden sind. Die zweite Domäne ist innerhalb der Familie sehr variabel und vermittelt die Substratbindung. Zu den konservierten Aminosäureresten gehören zwei charakteristische Sequenzmotive. Zum einen das His-X-X-X-Asp-Motiv (St-Pierre und De Luca, 2000), wobei das Histidin als generelle Base das Substrat deprotoniert, das dann den CoA-Ester angreift (Ma *et al.*, 2005; Unno *et al.*, 2007). Das Aspartat ist nicht in den Katalysemechanismus involviert, beeinflusst aber durch die Ausbildung einer Salzbrücke zu einem konservierten Arginin die Geometrie des aktiven Zentrums entscheidend (Ma *et al.*, 2005). Zum anderen ist in allen BAHD-Acyltransferasen das Asp-Phe-Gly-Trp-Gly-Motiv zu finden (St-Pierre und De Luca, 2000). Es spielt ebenfalls keine Rolle bei der Katalyse oder Substratbindung, scheint aber für den Erhalt einer einheitlichen Konformation der Enzymstruktur eine entscheidende Bedeutung zu besitzen (Ma *et al.*, 2005). Neben den bisher 88 postulierten BAHD-Acyltransferasen in *Arabidopsis* (Luo *et al.*, 2007) und 119 in *O. sativa* (D'Auria, 2006), konnten bislang nur in eukaryotischen Pilzen homologe Acyltransferasen gefunden werden (St-Pierre und De Luca, 2000). Aufgrund der hoch konservierten Reste wurde postuliert, dass die Enzyme der BAHD-Acyltransferase-Familien durch divergente Evolution aus einem einzigen Vorläufergen hervorgegangen sind (St-Pierre und De Luca, 2000).

Vor kurzem konnte die erste Sequenz eines Vertreters der Klasse der Chlorogensäure-abhängigen Acyltransferasen identifiziert werden. Es gelang, die Sequenz der Chlorogensäure:Glutarsäure-Kaffeoyltransferase der Tomate (*Solanum lycopersicum*) zu klonieren. Sequenzvergleiche zeigten eine Homologie zu GDSL-Lipasen mit konservierten Resten einer katalytischen Triade bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat. Ferner besitzt dieses Enzym ein Signalpeptid für den sekretorischen Signalweg (pers. Mitteilung Jenny Teutschbein, IPB Halle). Somit gehört dieses Enzym nicht zur Klasse der SCPL-Acyltransferasen, könnte aber ebenfalls durch die Rekrutierung eines hydrolytischen Primärstoffwechsellenzym (GDSL-Lipasen) entstanden sein.

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Glucoseester-abhängige Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels sind homolog zu den hydrolytischen Serin-Carboxypeptidasen. Die molekularen Mechanismen, die den Funktionswechsel dieser Enzyme von Hydrolyse zum Acyltransfer bewirkten, sind bislang nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es am Beispiel der Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (SMT) aus Arabidopsis durch Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehungen Einblicke in die molekulare Veränderung dieser Enzyme, die während der evolutionären Entwicklung auftraten, zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass die Tertiärstruktur eines Proteins seine Funktion unmittelbar beeinflusst, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine erste Vorstellung zur 3D-Struktur der SMT entwickelt werden. Mögliche Unterschiede in der Protein-Struktur von Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen und Serin-Carboxypeptidasen sollten Aufschluss über die molekularen Ursachen der verschiedenen katalytischen Aktivitäten geben. Neben der Struktur ist die Bestimmung des Katalysemechanismus von entscheidender Bedeutung, um Unterschiede dieser beiden Enzymklassen aufzuzeigen. Für eine detaillierte Charakterisierung des Katalysemechanismus, sowie die Durchführung von gerichteten Mutageneseexperimenten zur Verifizierung des 3D-Strukturmodells, ist ein robustes heterologes Expressionssystem notwendig. Die Etablierung eines effizienten Expressionssystems, das die Gewinnung ausreichender Proteinmengen für eine biochemische Charakterisierung und spätere Kristallisation der SMT ermöglicht, stellte einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit dar. Aus dem Proteinstrukturmodell und der Charakterisierung des Katalysemechanismus sowie der Untersuchung der Substratspezifität der SMT sollten neue Aspekte für das Verständnis der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen gewonnen werden.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Plasmide

**Tab. 2.1** Vektoren

Bezeichnung	Hersteller	Selektion	Verwendung	Besonderheiten
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Promega (Mannheim)	Ampicillin	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	Komplementation auf X-Gal-Medien
pET-28a(+)	Novagen (Darmstadt)	Kanamycin	heterologe rekombinante Proteinexpression ( <i>E. coli</i> )	
pYES2	Invitrogen (Karlsruhe)	<i>E. coli</i> : Ampicillin; <i>S. cerevisiae</i> : <i>ura-3</i>	heterologe rekombinante Proteinexpression ( <i>S. cerevisiae</i> )	induzierbarer GAL1-Promotor
pDIONYSOS	pYES2-Abkömmling	<i>E. coli</i> : Ampicillin; <i>S. cerevisiae</i> : <i>ura-3</i> und <i>leu2-d</i>	heterologe rekombinante Proteinexpression ( <i>S. cerevisiae</i> )	pYES2-Vektor mit zusätzlichem <i>leu2d</i> - Marker; <i>high copy</i> Vektor
pImpact1.1	Plant Research International (Wageningen, NL)	Ampicillin	Subklonierung	lichtregulierter Promoter (RbcS1)
pBINPLUS	Plant Research International	Kanamycin	binärer Vektor für die Pflanzentransformation	Integration der Expressionskassette aus pImpact1.1
pVL1393	BD Bioscience (San Jose, CA, USA)	Ampicillin	heterologe rekombinante Proteinexpression ( <i>S. frugiperda</i> )	

## 2.1.2 Zellen

**Tab. 2.2** Stämme

Stamm	Hersteller	Verwendung	Genotyp
XL1-Blue ( <i>E. coli</i> )	Stratagene (La Jolla, CA, USA)	allgemeine Klonierungsarbeiten	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 eIA1lac</i> [F' <i>proABlacIq<sup>z</sup></i> ΔM15 Tn 10 (Tetr <sup>r</sup> )]
BL21-CodonPlus(D3)-RIL ( <i>E. coli</i> )	Stratagene	Heterologe Expression	<i>F ampT hsdS(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galλ (D3) endA Hte</i> [argU proL leuW CamI]
GV2260 ( <i>A. tumefaciens</i> )	McBride und Summerfelt, 1990	Transformation von Tabak	pTiB6S3ΔT-DNA in C58C1; Rif <sup>r</sup> , Carb <sup>r</sup>
INVSc1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Invitrogen	Heterologe Expression	MATa <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i> /MATα <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>
BY4741 ( <i>Δgal1</i> ) ( <i>S. cerevisiae</i> )	Euroscarf (Frankfurt)	Heterologe Expression	MATa <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBR020w::kanMX4</i>
Sf9 Insekten Zellen ( <i>S. frugiperda</i> )	BD Biosciences	Heterologe Expression	Wildtyp

## 2.1.3 Pflanzen

### 2.1.3.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Ökotyp Columbia (Col) wurde vom Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC; Columbus, OH, USA) bezogen. Die Deletionsmutante *sng1-6* (*sinapoylglucose accumulator 1*; *A. thaliana* (Col); Lehfelddt *et al.*, 2000) wurde freundlicherweise von Prof. C. Chapple (Department of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) zur Verfügung gestellt. Die Mutante SALK 110545.18.25.x, die eine Insertion im Gen *At2g22970* trägt (*A. thaliana* L. Heynh. (Col); Scholl *et al.*, 2000) wurde vom European Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, England) bezogen.

### 2.1.3.2 *Brassica napus*

Die Sommerrapssorte *Brassica napus* L. var. *napus* cv. Drakkar wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ Lembke, Hohenlieth) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.3.3 *Nicotiana tabacum*

Die Untersuchungen zur heterologen Expression wurden in der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun; Vereinigte Saatzuchten eG; <http://www.vs-ebstorf.de>) durchgeführt.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Bis auf die beiden Oligonukleotide BspHI-leu2d-marker-rv und leu2d-marker-BspHI-rv, die von der Firma Thermo Electron (Ulm) synthetisiert wurden, wurden alle Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. In Tab. A1 (Appendix) sind die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

### 2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, Enzyme von Roche (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Stratagene (LaJolla CA, USA) verwendet. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt entsalztem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

### 2.1.6 Antikörper

Für Western Blot-Analysen wurde als primärer Antikörper ein monoklonaler Anti-SMT-Antikörper aus Kaninchen eingesetzt (Hause *et al.*, 2002). Der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG war für die enzymatisch-colorimetrische Detektion mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Die FAB-spezifischen Anti-Maus-IgG AP-Konjugate wurden von der Firma Sigma bezogen.

## 2.2 Geräte

Folgende Geräte wurden in der vorliegenden Arbeit benutzt:

Zentrifugen:	5417R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Sorvall Super T21 (DuPont, Bad Homburg) 810R-Tischzentrifuge (Eppendorf)
Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf)
Thermomixer:	Eppendorf comfort (Eppendorf)
Geldokumentation:	BioDocAnalyze (Whatmann Biometra, Göttingen)
Elektrophorese-System:	Mini-PROTEAN II (BioRAD, München) XCell SureLock R Mini-Cell (Invitrogen)
Spektrophotometer:	Beckman DU 640
Bead Beater:	Biospec. Products, Bartelsville, OK, USA
HPLC/UPLC-Gerät:	Waters™ Millipore System (Waters, Eschborn)
FPLC-Gerät:	ÄKTA explorer (GE Healthcare Life Sciences, München)
pH-Meter:	inoLab pH Level 1 (WTW)
Reagenzglasschüttler:	Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Boston, MA, USA)
Stromversorgungsgerät:	Power Supply EPS 301 (GE Healthcare Life Sciences)
Ultraschallgerät:	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Elektroporator:	Micropulser™ (BioRad)
Klimaschrank:	Percival (CLF, Emmersacker)
Vakuumzentrifuge:	Concentrator 5301 (Eppendorf)

## 2.3 Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen

### 2.3.1 *Escherichia coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf *lysogeny broth*-Agarplatten (LB) oder in LB-Flüssig-Medien unter Schütteln (180-200 rpm) bei 37°C. Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit folgenden Endkonzentrationen: 100 µg·ml<sup>-1</sup> Carbenicillin, 50 µg·ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol, 50 µg·ml<sup>-1</sup> Kanamycin, 100 µg·ml<sup>-1</sup> Spectinomycin und 12,5 µg·ml<sup>-1</sup> Tetracyclin. Die Transformation mit Plasmiden erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode (Sambrook *et al.*, 1989). Die Herstellung der kompetenten Zellen und Transformation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.



### 2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte auf YPD, Uracil-, Leucin-Mangelmedium bei 30°C. Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte mit dem EasyComp Kit (Invitrogen) und wurden entsprechend der Angaben transformiert.

YPD:	Mangelmedien:
2% (w/v) Pepton (Roth)	<i>drop-out</i> Medium ohne Leucin bzw. Uracil (Sigma)
1% (w/v) Hefeextrakt (Roth)	6,7 g·l <sup>-1</sup> synthetischer Hefeextrakt ohne AS (Sigma)
2% (w/v) Glucose	2% (w/v) Glucose bei Agar-Platten
2% (w/v) Agar für Platten	bzw. 4% (w/v) Raffinose, Galactose oder Fructose in Flüssigkulturen
	2% (w/v) Agar für Platten

### 2.3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in LB-Medium bei 28°C. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

## 2.4 Kultivierung, Transformation und Selektion von Insektenzellen

### 2.4.1 *Spodoptera frugiperda* Sf9

Sf9 Zellkulturen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen angesetzt und alle 2-3 Tage 50% konfluent in 5 ml TC-100 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) umgesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 27°C. Für Suspensionskulturen wurden 5 ml einer konfluenten Kultur in einem 200 ml Kolben zu 50 ml Medium (TC-100; 10% FCS, 0,1% Pluronic) gegeben und bei 175 rpm für 3 Tage geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur alle zwei Tage mit neuem Medium auf die Zelldichte von  $0,5 \cdot 10^6$  eingestellt (1:2-1:3 Verdünnung).

## 2.5 Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen

### 2.5.1 *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte im Klimaschrank bei 24°C, 70% relativer Luftfeuchte und einer Lichtstärke von ca.  $130 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  unter Langtagbedingungen

(16 h Licht und 8 h Dunkelheit). Die Samen wurden auf einem Erde/Vermiculit (2-3 mm Körnung) Gemisch ausgelegt. Nach ca. zwei Wochen wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert.

### 2.5.2 *Brassica napus*

Zur Anzucht der Pflanzen wurden Samen von *B. napus* auf Erde ausgelegt und bei 20°C für 5 Tage im Dauerlicht inkubiert. Nach ca. zwei Wochen wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert und wuchsen im Gewächshaus bei 12-18°C unter natürlichen Lichtbedingungen.

### 2.5.3 *Nicotiana tabacum*

*N. tabacum* wurde im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen angezogen. Die Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation erfolgte durch Infiltration etwa 10 Wochen alter Blätter mit plasmidhaltigen Zellen des Stamms GV2260 (McBride und Summerfelt, 1990) nach einem modifizierten Protokoll von Kapila *et al.* (1997). Dafür wurden 5 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer Agrobacterium Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES (pH 5,6) zugegeben und die Agrobakterien für weitere 24 h inkubiert. Für die Infiltration wurde die Kultur ( $OD_{600} \sim 3$ ) mit 2 x Infiltrationsmedium und Wasser auf eine  $OD_{600}$  von 1 verdünnt. Nach der Zugabe von 200 µl Acetosyringon erfolgte die Infiltration auf der Unterseite der Blätter durch die Spaltöffnungen mit Hilfe einer 1 ml Spritze. Die infizierten Pflanzen wurden für einige Stunden dunkel gestellt und anschließend für drei weitere Tage unter natürlichen Lichtbedingungen inkubiert. Die infizierten Bereiche der Blätter konnten optisch von den nichtinfizierten Bereichen unterschieden werden und wurden für weitere Analysen ausgeschnitten.

YEB:	2 x Infiltrationsmedium:
20% (w/v) Hefeextrakt	10% (w/v) Saccharose
0,5% (w/v) Fleischextrakt	20 mM Glucose
0,5% (w/v) Pepton	8,6 g·l <sup>-1</sup> MS (pH 5,6)
0,5% (w/v) Saccharose	
2 mM MgSO <sub>4</sub>	
pH 7,0	

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von DNA

Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen (*E. coli* und *A. tumefaciens*) erfolgte durch selektive Adsorption an eine Anionenaustauscher-Matrix mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus 2 ml Bakterien-Übernachtskulturen.

### 2.6.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen erfolgte entweder mit dem RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen unter Durchführung eines DNA-Verdaus mit RNase-freier DNase (Qiagen) nach den Herstellerangaben oder nach einem modifizierten Protokoll von Vicient und Delseny (1999).

- ◆ Mechanischer Zellaufschluss von 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff
- ◆ Überführen des gemörserten Pflanzenmaterials in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 550 µl Extraktionspuffer mit anschließender Inkubation für 5 min auf Eis
- ◆ Zugabe von 550 µl Phenolchloroform:Isoamylalkohl (25:24:1), mischen (15 sec vortexen) und anschließender Zentrifugation (14.000 x *g*, 3 min, RT)
- ◆ Überführen der farblosen wässrigen Phase (oberste Phase; ca. 550 µl) in ein neues Reaktionsgefäß
- ◆ Zugabe von 1 Vol (ca. 550 µl) Chloroform:Isoamylalkohl (24:1), mischen (15 sec vortexen) und anschließender Zentrifugation (14.000 x *g*, 3 min, RT)
- ◆ Überführen der farblosen wässrigen Phase (oberste Phase; ca. 400 µl) in neues Reaktionsgefäß, Zugabe von ¼ Volumen LiCl (10 M), mischen (invertieren) und anschließender Inkubation für 30-60 min auf Eis.
- ◆ Zentrifugation (14.000 x *g*, 20 min, 4°C) zur Pelletierung der gefällten Nukleinsäuren
- ◆ Überstand verwerfen und das Nukleinsäure-Pellet in 100 µl RNase-freiem Wasser lösen
- ◆ Zugabe von 2,5 Volumen 100% (v/v) EtOH und <sup>1</sup>/<sub>10</sub> Volumen 3 M Na-Acetat zum Fällern der RNA für 30-60 min bei -20°C mit anschließender Zentrifugation (14.000 x *g*, 30 min, 4°C)
- ◆ Überstand verwerfen, Pellet mit eiskaltem 75% (v/v) EtOH waschen (nicht vortexen) und anschließender Trocknung des Pellets für mind. 30 min

- ◆ Lösen des getrockneten RNA-Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser auf Eis

Um Polysaccharide zu fällen wurde die gelöste RNA für 5 min bei 65°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation von 5 min auf Eis. Die präzipitierten Polysaccharide wurden durch Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde anschließend mit dem RNA Cleanup Protokoll aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt, wobei ein DNA-Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### Extraktionspuffer:

200 mM Tris/HCl (pH 8,0)  
 400 mM LiCl  
 25 mM EDTA  
 1% (w/v) SDS

### 2.6.3 Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in 1% (w/v) Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer. Zur Visualisierung wurden 0,1 µg·ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-120 V. Zusätzlich wurden Agarose-Fertiggele (E-Gel *single comb*; Invitrogen) verwendet, wobei die Auftrennung mit der E-Gel PowerBase v.4 (Invitrogen) innerhalb von 15 min erfolgte. Als Größenstandard wurde die SmartLadder (Eurogentec; Seraing, Belgien) verwendet. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Geldokumentations-system BiodocAnalyse (Whatmann Biometra).

#### 1 x TBE:

0,45 M Tris/HCl (pH 8,0)  
 0,45 M Borsäure  
 10 mM EDTA

#### 10 x DNA-Ladepuffer:

20% (v/v) Glycerin  
 0,1 M EDTA  
 1% (w/v) SDS  
 0,2% (w/v) Bromphenolblau  
 0,2% (w/v) Xylencyanol FF

## 2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Elektrophorese-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Fragmente bis 4 kb) bzw. des QIAquick Gel Extraction Kit (Fragmente über 4 kb) der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert.

## 2.6.5 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen oder Polymerase-Kettenreaktionen erfolgte, durch selektive Adsorption an eine Anionenaustauscher-Matrix, mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

## 2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

### 2.7.1 Restriktionsanalyse

Für Restriktionsanalysen zur Kontrolle der Insertgrößen nach Klonierungen wurden ca. 0,2 bis 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 10 µl für 90 min bei optimaler Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms inkubiert. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden 2-5 µg DNA eingesetzt.

### 2.7.2 Ligation

Amplifizierte PCR-Fragmente mit 3'-A-Überhang wurden in den T-Überhang-Vektor pGEM<sup>®</sup>T-Easy (Promega) nach Herstellerangaben subkloniert. DNA-Fragmente mit korrekter Sequenz wurden durch Restriktion aus dem pGEM<sup>®</sup>T-Easy-Vektor gewonnen (siehe 2.7.1 & 2.6.4) und in den entsprechend geschnittenen Zielvektor ligiert (Quick Ligation<sup>™</sup> Kit; New England Biolabs). 1 µl der Ligationsansätze wurde in chemokompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte mit Hilfe der durch den rekombinanten Vektor vermittelten Antibiotikaresistenz. Die Plasmidkonstrukte wurden aus der Bakterienkultur isoliert und durch Restriktionsanalyse auf ihre Identität überprüft (siehe 2.6.1 & 2.7.1).

### 2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986). Für präparative PCR-Reaktionen wurde der Platinum PCR SuperMix High Fidelity der Firma Invitrogen verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die Programmierung der Thermocycler.

**Tab. 2.3** Programm zur Durchführung der PCR mit dem PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen)

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1. initiale Denaturierung	2 min	94
2. Denaturierung	30 sec	94
3. Annealing	30 sec	55
4. Elongation	1 min/kb	68
5. finale Elongation	10 min	68

Die Schritte 2.-4. wurden 35-mal wiederholt

Für ortsgerichtete Mutagenesen wurde der Accuprime *pfx*-SuperMix der Firma Invitrogen verwendet. Hierfür wurden Primer mit einer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von mindestens 75°C abgeleitet, die in der Mitte die entsprechend geänderten Basenpaare trugen. Nach der PCR wurden dem Ansatz 1 µl der Restriktase *DpnI* zugesetzt, um den methylierten Mutterstrang zu verdauen. Anschließend wurde 1 µl des PCR-Ansatzes in chemokompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert (siehe 2.3.1).

**Tab. 2.4** Programm zur Durchführung der PCR für ortsgerichtete Mutagenesen mit dem Accuprime *pfx*-SuperMix (Invitrogen)

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1. initiale Denaturierung	5 min	95
2. Denaturierung	15 sec	95
3. Annealing	30 sec	55
4. Elongation	1 min/kb	68
5. finale Elongation	10 min	68

Die Schritte 2.-4. wurden 15-mal wiederholt

### 2.7.4 RT-PCR

1-2 µg total-RNA wurden durch Reverse-Transkriptase nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und amplifiziert (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq High Fidelity Kit; Invitrogen). Die Amplifikate wurden anschließend mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese analysiert und die Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die cDNA-Fragmente wurden eluiert (siehe 2.6.4) und in den Plasmidvektor pGEM®T-Easy subkloniert (siehe 2.7.2).

## 2.7.5 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierung erfolgte extern durch die Firmen MWG Biotech und die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager Suite (Sci Ed Software, Durham, NC, USA) analysiert.

Datenbankabfragen wurden über die Internetseite von GenBank1 mit den Standardeinstellungen des BLAST Programms vorgenommen.

Die Vorhersage möglicher Transitpeptide und potenzieller N-Glycosilierungsstellen erfolgte mit den Programmen SignalP 3.0 und NetNGlyc 1.0 des CBS Prediction Servers2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

## 2.8 Biochemische Methoden

### 2.8.1 Proteinextraktion

#### 2.8.1.1 Extraktion aus *E. coli*

Zur Isolierung löslicher Proteine wurden frisch geerntete Bakterienkulturen in Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:100 (v/v; bezogen auf das Originalvolumen der Bakterienkultur) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mit 100 µg·ml<sup>-1</sup> Lysozym (Roth, Karlsruhe) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mittels Ultraschall (3 x 45 sec 60% Duty 65% Power) auf Eis lysiert. Der durch Zentrifugation (23.000 x *g*, 20 min, 4°C) gewonnene Überstand wurde als Rohextrakt löslicher Proteine verwendet.

Die Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Rudolph und Lilie (1996), bei dem durch die Zugabe eines Salz-haltigen Puffers mit Triton-X 100 die Co-Präzipitation der Zelltrümmer verhindert wird.

#### Extraktionspuffer:

100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0)  
300 mM NaCl

#### 2.8.1.2 Extraktion aus *S. cerevisiae*

Die geernteten und durch Zentrifugation (3.000 x *g*, 10 min, 4°C) pelletierten Hefezellen wurden in Extraktionspuffer resuspendiert (<sup>1</sup>/<sub>100</sub> des Kulturvolumens). Die Lyse der Zellen erfolgte durch starkes Schütteln (10 mal 1 min) in Anwesenheit von Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm; Roth, Karlsruhe) auf einem Reagenzglasschüttler (Scientific

Industries). Nach Zentrifugation (3.000 x *g*, 5 min, 4°C) wurde der Überstand als lösliche Proteinfraction verwendet.

Der Aufschluss größerer Zellpellets erfolgte durch starkes Rühren (10 mal 1 min) in Anwesenheit von Glasperlen in einer Kugelmühle (Biospec Products).

#### **Extraktionspuffer:**

---

100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0)

150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,1% (v/v) Triton X-100

1 mM EDTA

1 mM DTT

### **2.8.1.3 Extraktion aus *N. tabacum*, *A. thaliana* & *B. napus***

Die Proteinextraktion aus Pflanzengewebe erfolgte durch mechanischen Aufschluss des Gewebes in 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0) mit Hilfe eines Glashomogenisators (VWR International). Die Zellrümpfer wurden durch Zentrifugation (3.000 x *g*, 5 min, 4°C) pelletiert und der Überstand über eine PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences) nach den Herstellerangaben entsalzt.

### **2.8.1.4 Extraktion aus *S. frugiperda***

Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1,5 ml eiskalten Phosphatpuffer (100 mM Na-Phosphatpuffer; pH 6,0) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mechanisch homogenisiert (Glashomogenisator; VWR International). Nach Zentrifugation (14.000 x *g*, 10 min, 4°C) wurde der Überstand als lösliche Proteinfraction für Aktivitätsmessungen verwendet.

## **2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierfür wurde die zu bestimmende Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve für Rinderserumalbumin (BSA) konnte die Konzentration des untersuchten Proteins abgeschätzt werden.

#### **Bradford Reagenz:**

---

0,065% (w/v) Coomassie G-250 in 5% (v/v) Methanol

10% (v/v) Phosphorsäure



### 2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris-Fertiggele (Invitrogen) verwendet, wobei die Auftrennung bei 200 V und 100 mA pro Gel erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder für den Western-Blot weiter verwendet (siehe 2.8.4) oder nach Überführen in Coomassie-Lösung durch Kochen für 2-3 min in der Mikrowelle gefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrunds durch mehrmaliges Aufkochen in Entfärbelösung wurden die Gele im Geldokumentationssystem BioDocAnalyse (Whatmann Biometra) unter Weißlicht fotografiert oder mit einem Scanner (HP ScanJet 3970) eingelesen.

<u>Coomassie-Lösung:</u>	<u>Entfärbelösung:</u>
0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	10% (v/v) Essigsäure,
10% (v/v) Essigsäure	40% (v/v) Methanol
40% (v/v) Methanol	

### 2.8.4 Western Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch ein Nass-Blotverfahren mit Hilfe des XCell II Blot-Moduls aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Invitrogen) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 30 V. Nach Ende des Transfers wurde die Membran kurz in TBS gespült und anschließend für 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Der primäre Antikörper (1:1000 in Blockierungslösung) wurde zugesetzt und die Membran über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS entfernt. Danach wurde die Membran mit TBS für 3 x 5 min gewaschen und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundäantikörper (Anti-IgG1-Konjugat mit alkalischer Phosphatase (AP; Verdünnung 1:1000) in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TTBS für 3 x 5 min wurde die Membran für 5 min in TBS (pH 9,5) inkubiert und anschließend mit AP-Substratpuffer äquilibriert. Die Farbreaktion zur Detektion der AP wurde durch Zugabe von 0,16 mg·ml<sup>-1</sup> 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und 0,32 mg·ml<sup>-1</sup> *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in TE-Puffer gestoppt. Die entwickelte Membran wurde zur Dokumentation mit einem Scanner (HP ScanJet 3970) eingelesen.

<b>TBS:</b>	<b>TTBS:</b>
100 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl	TBS (pH 7,5) mit 0,05% (v/v) Tween-20
<b>TE-Puffer:</b>	<b>Blockierungslösung:</b>
10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA	5% (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS
<b>AP-Substratpuffer:</b>	
TBS (pH 9,5) 50 mM MgCl <sub>2</sub>	

### 2.8.5 SMT-Aktivitätstest

Um die Enzymaktivität der pflanzlichen bzw. rekombinanten SMT zu bestimmen, wurde das Protein in Standardassays 1 mM Sinapoylglucose und 10 mM L-Malat in 100 mM MES Puffer (pH 6,0) bzw. 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0) in einem Endvolumen von 100 µl (30°C; 300 rpm) inkubiert. Die Sinapoylglucose wurde von Dr. A. Baumert (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Trifluoressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand mittels HPLC auf die enzymatische Bildung von Sinapoylmalat, Sinapinsäure bzw. anderer Sinapatester analysiert (vgl. 2.8.9).

### 2.8.6 Hemmversuche mit Serin-Carboxypeptidase spezifischen Inhibitoren

Zur Untersuchung, in wieweit die beiden Serin-Carboxypeptidase spezifischen Inhibitoren PMSF (Fahrney und Gold, 1963) und DFP (Jensen *et al.*, 1949) die SMT-Aktivität hemmen können, wurden PMSF zu einer Endkonzentration von 10 mM bzw. DFP zu einer Endkonzentration von 1 mM mit entsalzten Proteinrohextrakten (vgl. 2.8.1.3) aus *A. thaliana* und *B. napus* Blättern 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mM Sinapoylglucose und 10 mM L-Malat und eine erneute Inkubation für 30 min. Die Analyse des gebildeten Sinapoylmalats erfolgte wie in 2.8.9 beschrieben.

### 2.8.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten für die SMT-Reaktion

Zur Bestimmung der enzymatischen Parameter  $K_M$  (Michaelis-Konstante) und  $k_{cat}$  (Umsatzzahl bei Substratsättigung) unter Bedingungen des Fließgleichgewichts (*steady-state*) wurde die Enzymlösung mit den Substraten Sinapoylglucose (0,1 mM bis 1,0 mM) und L-Malat (0,75 mM bis 10 mM) in 100 mM MES Puffer (pH 6,0) mit 5% (v/v) DMSO in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SMT-Protein gestartet. Alle 2 min wurde eine Probe von 50  $\mu$ l aus dem Reaktionsgemisch entnommen und durch Zugabe von 50  $\mu$ l 100% (v/v) Methanol abgestoppt. Die Sinapoylmalat-Bildung wurde mittels UPLC analysiert (siehe 2.8.9) und die SMT-Aktivität aus dem Anstieg der Sinapoylmalat-Produktpeakfläche gegen die jeweilige Reaktionszeit (2, 4, 6 min) ermittelt. Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Auftragungen nach Michaelis und Menten sowie nach Lineweaver und Burk (Segel, 1975) bestimmt. Die Dissoziationskonstanten ( $K_{A(SinGlc)}$  und  $\alpha K_{B(Mal)}$ ) wurden nach der Auftragung von Florini und Vestling (1957) ermittelt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Ternärkomplexes ( $\alpha K_{A(SinGlc)}$  und  $\alpha K_{B(Mal)}$ ) erfolgte aus der Auftragung der reziproken apparenten Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max\ app}^{-1}$ ) gegen die reziproke Substratkonzentration (Segel, 1975)

### 2.8.8 Extraktion der Sinapatester

Das Pflanzenmaterial wurde in 80% (v/v) wässrigem Methanol mit Hilfe eines Glashomogenisators (VWR International) mechanisch aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, RT) wurde ein Aliquot des Überstands mittels HPLC (siehe 2.8.9) hinsichtlich der Sinapatester analysiert und quantifiziert.

### 2.8.9 Analytische HPLC/UPLC

Zur HPLC-Analyse wurde ein System der Firma Waters verwendet. Die Chromatographie erfolgte an einer 5  $\mu$ m Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die Flussrate betrug 1 ml·min<sup>-1</sup>. Dabei wurde ein 20-minütiger linearer Gradient von 10 bis 50% Acetonitril in 1,5% (v/v) Phosphorsäure in Wasser eingesetzt. Die Detektion der Substanzen erfolgte im Photodioden-Array-Detektor (PDA) bei einer Wellenlänge von 330 nm.

Für die enzymkinetische Charakterisierung wurde eine ACQUITY UPLC (Waters) mit einer 1,7  $\mu$ m ACQUITY UPLC C18-Säule verwendet. Die Elution erfolgte in einem

2-minütigen linearen Gradienten von 0 bis 30% Acetonitril in 1,5% (v/v) Phosphorsäure in Wasser. Die Flussrate betrug 1 ml·min<sup>-1</sup>.

Sinapoylmalat wurde mit Hilfe von Sinapoylglucose als Standard quantifiziert.

## 2.8.10 Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)

Die negativen Ionen ESI-Massenspektren von Sinapat, Sinapoylglucose und 1,2-Disinapoylglucose wurden auf einem Finnigan MAT TSQ Quantum Ultra AM System generiert, welches mit einer heißen ESI Quelle ausgestattet ist (HESI, Electrospray Spannung 3,0 kV, Schutzgas: Stickstoff; Zerstäubertemperatur: 50°C; Kapillarentemperatur: 250°C). Das MS-System ist an eine Surveyor Plus micro-HPLC (Thermo Electron) gekoppelt (Ultrasep ES RP18E Säule (5 mm, 1 x 100 mm, SepServ). Die HPLC Trennung erfolgte mit einem 15-minütigen linearen Gradienten von 10 bis 95% Acetonitril in 0,2% Essigsäure mit einer Flussrate von 50 µl·min<sup>-1</sup>. Anschließend wurde der Fluss 15 min bei 95% Acetonitril gehalten. Die kollisionsinduzierten Dissoziationsmassenspektren (CID) von Sinapat und Sinapoylglucose wurden während des HPLC-Laufes mit einer Kollisionsenergie von 15 eV für die [M-H]<sup>-</sup>-Ionen mit m/z 223 (Sinapat) und 385 (Sinapoylglucose) aufgenommen. Dabei wurde eine *skimmer* Spannung von 25 eV verwendet. Für 1,2-Disinapoylglucose wurde eine Kollisionsenergie von 20 eV benutzt (Kollisionsgas: Argon; Kollisionsdruck: 1,5 mTorr).

## 2.9 Heterologe Expression

### 2.9.1 Expression der AtSMT in *E. coli*

Für die bakterielle Expression von AtSMT wurde das pET28a(+)-Vektorsystem benutzt. Dazu wurde die Sequenz der AtSMT-cDNA ohne Signalpeptid durch PCR mit der Primerkombination *Xba*I-AtSMT-fw/AtSMT-*Xho*I-rv amplifiziert und nach Subklonierung in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor sequenziert. Anschließend erfolgte die Klonierung in pET28a(+) über die in der PCR angefügten Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Xho*I. Das Expressionskonstrukt wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert.

Für die Expression wurden 5 ml LB-Kanamycin-Medium mit einer Bakterienkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) über Nacht inkubiert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> von 0,6) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen wurden bei 20°C bzw. 37°C für weitere 4 h

inkubiert und nachfolgend durch Zentrifugation (10.000 x *g* 10 min, 4°C,) pelletiert. Die Proteinextraktion erfolgte wie in Abschnitt 2.8.1.2 beschrieben.

### 2.9.1.1 Solubilisierung und *in vitro* Rückfaltung

Die Isolation und Solubilisierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). Als Renaturierungspuffer wurden 100 mM Tris-HCl (pH 6, 7 und 8) mit 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG verwendet. Alternativ wurden 500 mM L-Arginin, 500 mM Ammoniumsulfat, 20 mM CHAPS, 10% (v/v) Glycerin, 15% (v/v) Glycerin + 0,01% (v/v) Tween-20, 1 M NaCl + 0,9 M Ammoniumsulfat + 0,7 M Natriumsulfat bzw. 10 mM L-Malat zugesetzt. Zur Rückfaltung wurden die solubilisierten *inclusion bodies* unter schnellem Rühren dem auf 15°C vortemperierten Renaturierungspuffer langsam bis zu einer Endkonzentration von 20 µg·ml<sup>-1</sup> zugesetzt und für 36 h bei 15°C inkubiert (Rudolph und Lilie, 1996). Anschließend wurden die Ansätze auf SMT-Aktivität untersucht.

### 2.9.2 Expression der AtSMT in *N. tabacum*

Die heterologe Expression der AtSMT in *N. tabacum* L. cv. Samsun erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen Rubisco Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum* (Outchkourov *et al.*, 2003). Für das Expressionskonstrukt wurde der Leserahmen der AtSMT, einschließlich der ersten 10 Nukleotide der 5'UTR, unter Anfügung der Restriktionsschnittstellen *Afl*III und *Not*I über PCR amplifiziert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy subkloniert und sequenziert. Die korrekte Sequenz wurde als *Afl*III-*Not*I-Fragment in pImpact1.1 subkloniert. Anschließend wurde die gesamte Expressionskassette als *Asd*-*Pad*-Fragment in den Vektor pBINPLUS integriert und das resultierende Konstrukt in *A. tumefaciens* GV2260 transformiert. Agrobakterien mit dem Fusionskonstrukt pBINPLUS:*AtSMT* wurden zur Infiltration von Blätter in etwa 10 Wochen alter *N. tabacum*-Pflanzen verwendet (vgl. 2.5.3).

### 2.9.3 Expression der AtSMT in *S. frugiperda*

Für die Expression der AtSMT in Insektenzellen *Sf9* *S. frugiperda* wurde das BD BaculoGold™ Baculovirus Expression Vektor System (BD Bioscience) benutzt. Dazu wurde der Leserahmen der AtSMT mit 10 Nukleotiden der 5'UTR unter Anfügung der

Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Not*I über PCR amplifiziert, in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) kloniert. Anschließend erfolgte die Insertion als *Xba*I-*Not*I-Fragment in den Vektor pVL1393. Zur Co-Transfektion wurden in Zellkulturplatten Zellen für eine Konfluenz von 50-70% für minimal 2 h adaptiert. Die Zellen wurden zweimal mit TC-100 Medium gewaschen und das Medium anschließend durch 1 ml des Transfektionspuffers A ersetzt. BaculoGold Baculovirus DNA (0,05 µg) wurde mit 2 µg des pVL1393-Konstruktes unter sterilen Bedingungen gemischt und nach 5 min mit 1 ml Transfektionspuffer B versetzt. Die Mischung wurde jetzt tropfenweise unter leichten Schütteln zu den Zellen in Puffer A gegeben, wobei sich der Zellüberstand leicht eintrübte. Nach 4 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 2 ml Kompletmedium (10% FCS / TC-100) versorgt. Nach 5 Tagen wurden 500 µl des Überstandes zu einer neuen Kulturflasche mit 50-70% konfluenten Zellen gegeben. Während dieser zweiten Amplifikation ließen sich erste Infektionsanzeichen, wie Wachstumsinhibierung, Vergrößerung der Zellen und Zellyse, erkennen. Zur Gewinnung einer Virenstammlösung wurde die Amplifikation zweimal in 5 ml Zellkulturschalen (+ 1 ml Virenlösung) und einmal in 50 ml Suspensionskultur (+ 5 ml Virenlösung) wiederholt und der durch Zentrifugation (2.500 x g, 5 min; RT) erhaltene Kulturüberstand bei 4°C gelagert. Die *AtSMT*-Expression erfolgte in einer 50 ml Suspensionskultur. Bei einer Zelldichte von ca. 2·10<sup>6</sup> wurde die Kultur abzentrifugiert (450 x g, 5 min; RT) und die Zellen in neuem Medium (50 ml TC-100, 10% FCS, 0,1% Pluronic; bei erwarteter Proteinsekretion ohne FCS) aufgenommen und anschließend mit 5 ml der Virusstammlösung versetzt und für ca. 72 h inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (450 x g, 5 min; RT).

<b>Transfektionspuffer A:</b>	<b>Transfektionspuffer B:</b>
Grace's Medium (Invitrogen)	25 mM HEPES (pH 7,1)
10% (w/v) FCS	125 mM CaCl <sub>2</sub>
	140 mM NaCl

#### 2.9.4 Expression der *AtSMT* in *S. cerevisiae*

Die heterologe Expression der *AtSMT* in *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des Vektorsystems pYES2 (Invitrogen) bzw. pDIONYSOS (Stehle *et al.*, 2008b). Dazu wurde die *SMT* unter Fusion der Restriktionsschnittstellen für *Hind*III und *Xba*I durch PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy subkloniert. Nach Sequenzierung erfolgte die Klonierung als *Hind*III-*Xba*I-Fragment in den Vektor pYES2 und nachfolgende Transformation in *S. cerevisiae* INVSc1 bzw. BY4741. Die verschiedenen Signalpeptide

wurden durch *forward-primer* mit entsprechenden Sequenzüberhängen in PCR-Ansätzen an die *SMT*-cDNA fusioniert. Analog wurde die Kozak-Sequenz (Kozak, 1983), sowie die 5'UTR-Konsensus Sequenz hoch exprimierter *S. cerevisiae*-Gene (Hamilton *et al.*, 1987) angefügt. Ebenfalls über *PCR-primer* wurde ein C-terminaler His-tag fusioniert. Die Codon-angepasste Sequenz für eine Expression in *S. cerevisiae* wurde von GeneArt (Regensburg) optimiert und synthetisiert.

Für die Expression wurde eine 50 ml Mangelmedium-Vorkultur ohne Uracil bzw. ohne Leucin, mit 4% (w/v) Raffinose bzw. 4% (w/v) Fructose als Kohlenstoffquelle, mit dem jeweiligen rekombinanten Hefestamm beimpft und für 48 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend durch Zentrifugation (1.500 x *g*, 5 min, RT) pelletiert und anschließend in dem entsprechenden Induktionsmedium resuspendiert, wobei eine OD<sub>600</sub> von 1,5 eingestellt wurde. Die Zellen wurden für weitere 36 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert und die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000 x *g* bei 4°C für 15 min.

#### **Vorkulturmedien (VK):**

---

*drop-out* Medium ohne Leucin bzw. Uracil (Sigma)  
6,7 g·l<sup>-1</sup> synthetischer Hefeextrakt ohne AS (Sigma)  
4% (w/v) Raffinose bzw. Fructose

#### **Induktionsmedien nach VK ohne Uracil:**

---

*drop-out* Medium ohne Uracil (Sigma)  
6,7 g·l<sup>-1</sup> synthetischer Hefeextrakt ohne AS (Sigma)  
4% (w/v) Galactose bzw. Fructose mit 0,5% (w/v) Galactose

#### **Induktionsmedien nach VK ohne Leucin:**

---

2% (w/v) Pepton (Roth)  
1% (w/v) Hefeextrakt (Roth)  
4% (w/v) Galactose bzw. Fructose mit 0,5% (w/v) Galactose

### **2.9.5 Fermentation AtSMT-exprimierender *S. cerevisiae* Zellen**

Für die rekombinante SMT-Produktion wurden *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen mit dem pDIONYSOS:*PEP4-ySMT* Expressionsplasmid in einem 10 l Biostat ED Fermenter (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany) bei 30°C und pH 5,0 in einem Glucose-limitierten Medium (Verduyn *et al.*, 1992) kultiviert. Während der Kultivierung wurde der gelöste Sauerstoffgehalt gemessen und automatisch durch Anpassen der Rührergeschwindigkeit oder Luftzugabe konstant über 50% gehalten. Die kontinuierliche Glucosezugabe wurde einer Stunde nach Kultivierungsbeginn gestartet. Um den Crabtree-Effekt (Crabtree, 1929; De Deken, 1966), der in der Reduktion von

Pyruvat zu Ethanol unter aeroben Bedingungen besteht, zu verhindern, wurde die Konzentration des Zuckers im Medium unter  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  gehalten. Nachdem eine Zelldichte von  $\text{OD}_{600}$  35 erreicht war, wurde die Glucosezugabe gestoppt und die Expression durch Galactosezugabe induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ( $8.000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) geerntet, nachdem die Kultur eine Zelldichte von  $\text{OD}_{600}$  45 erreicht hatte. Das Zellpellet wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.10 Proteinreinigung aus Hefe Rohextrakt

Alle chromatographischen Trennschritte wurden mit einer *ÄKTAexplorer* FPLC-Anlage bei  $10^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur und die Dimensionen der Säulen sind in Klammern angegeben (mm/cm). Alle Proben wurden vor den chromatographischen Trennungen zentrifugiert ( $10.000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) und die Säulen mit den entsprechenden Elutionspuffern äquilibriert. Dies Reinigungsprotokoll umfasste folgende Schritte:

- ♦ Mechanischer Zellaufschluss mittels Glasperlen ( $\varnothing$  0,25-0,5 mm) in einer Kugelmühle in Aufschlusspuffer (100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0), 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA und 1 mM DTT) 10 x 1 min unter Eiskühlung
- ♦ Zentrifugation der lysierten Zellen zur Abtrennung von Zelltrümmern ( $10.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min)
- ♦ Nukleinsäurefällung aus dem Überstand mit 0,05% (w/v) Protaminsulfat unter ständigem Rühren für 20 min (RT)
- ♦ Zentrifugation zur Abtrennung präzipitierter Nukleinsäuren ( $10.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min)
- ♦ Inkubation des Überstandes bei  $55^\circ\text{C}$  für 10 min und anschließender Zentrifugation ( $10.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min)
- ♦ Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,3 M
- ♦ Hydrophobe Interaktionschromatographie Butyl Sepharose FF Säule (40 ml Säulenvolumen; GE Healthcare Bio-Sciences)  
linearer Gradient mit Puffer A (20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0), 1,3 M Ammoniumsulfat) und Puffer B (20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0) von 0 bis 100% B; Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- ♦ Aktive Fraktionen wurden vereinigt und die Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt (85% Sättigung; 30 min bei  $4^\circ\text{C}$ )
- ♦ Zentrifugation ( $10.000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) zur Pelletierung der gefällten Proteine



- ◆ Aufnahme des Pellets in 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0)
- ◆ Gelfiltration an Superdex 200 (26/60) (GE Healthcare Bio-Sciences)  
20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0); Flussrate 1 ml·min<sup>-1</sup>
- ◆ Inkubation der aktiven Fraktionen bei 55°C für 10 min und anschließende Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4°C) zur Pelletierung denaturierter Proteine
- ◆ Anionenaustauschchromatographie des Überstandes an Q-Sepharose (16/10) (GE Healthcare Bio-Sciences)  
linearer Gradient mit Puffer A (20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0) und Puffer B (20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0, 0,5 M NaCl) von 0 bis 100% B; Flussrate: 1 ml·min<sup>-1</sup>
- ◆ 2-malige Dialyse der aktiven Fraktionen gegen je 1 l 100 mM MES Puffer, pH 6,0

## 2.11 Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur

Die Modellierung beruhte auf experimentell ermittelten Strukturen AtSMT-homologer Proteine (*homology modelling*). Die Strukturmodellierung wurde unter Verwendung des Programms Modeller8v1 (Sali und Blundell, 1993) an Silicon-Graphics Workstations in Kooperation mit Dr. W. Brandt (IPB, Halle) durchgeführt. Homologe Proteine mit bekannter 3D-Struktur wurden in der Proteindatenbank mittels einer BLAST-Suche ermittelt, wobei multiple Sequenzvergleiche mit dem Programm CLUSTAL W unter Verwendung der Blossum30-Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992; 1993) erfolgten. Das Refinement der Struktur erfolgte mit dem Programm Charmm force field (MacKerell Jr. *et al.*, 1998) mit *born approximation* für effektive elektrostatische Ladungen in Lösungen (Onufriev *et al.*, 2000) welches in das Programm MOE® (Molecular Operating Environment) eingebettet ist.

Die stereochemische Qualität des Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Dieses Programm gibt Auskunft darüber, ob Aminosäuren unzulässige Geometrien in Torsionswinkeln, Bindungslängen oder -winkeln aufweisen. Der Ramachandran-Plot wurde verwendet, um die zentrale Peptidkette hinsichtlich der dihedralen Winkel aller Aminosäuren zu überprüfen. Die Qualität der Faltung wurde mit dem Programm PROSA (Sippl, 1990b) untersucht. Dies erlaubt die Analyse experimentell bestimmter 3D-Proteinstrukturen, hinsichtlich der Kräfte, die zur Stabilisierung nativ gefalteter Proteine beitragen. PROSA berechnet die Konformationsenergie der verschiedenen Modellstrukturen mit Liganden, wobei Werte mit positiver Energie auf nicht nativ gefaltete Bereiche im Proteinstrukturmodell hinweisen. Negative Werte korrelieren hingegen mit stabilen Bereichen.

Docking Studien mit Protein-Ligand-Interaktionen wurden mit der automatischen Dockingfunktion des Programms GOLD<sup>®</sup> (GGOLD<sup>®</sup>, 1998) durchgeführt. Für jeden Liganden wurden 6 unterschiedliche Docking-Arrangements generiert, wobei das mit dem besten Anpassungswert für die weitere Optimierung verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurde das vollständige Modell mit den eingepassten Substraten mit Hilfe des Programms TRIPOS force field (Clark *et al.*, 1989) und dem Programm Gasteiger charges (Gasteiger und Marsili, 1980), die in das SYBYL<sup>®</sup> molecular modeling package (SYBYL<sup>®</sup>, 1996) eingebettet sind, optimiert.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Heterologe Expression der AtSMT

Die molekularen Mechanismen, die den Funktionswechsel von Hydrolyse zum Acyltransfer der Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase (SMT) aus Arabidopsis bewirkten, sollten mittels eines Proteinstrukturmodells, der Charakterisierung des Katalysemehanismus und Untersuchungen zur Substratspezifität untersucht werden, um neue Aspekte für das Verständnis der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen zu gewinnen. Hierfür war die Etablierung eines effizienten Expressionssystems, das die Gewinnung ausreichender Proteinmengen gewährleistet, notwendig.

#### 3.1.1 Expression der AtSMT in verschiedenen Wirtsorganismen

Die Expression einer funktionellen AtSMT wurde zunächst wie von Lehfeldt *et al.*, (2000) beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde das Expressionsplasmid pET28a-*AtSMT* (Lehfeldt *et al.*, 2000) in *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 (DE3) transformiert. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 18°C angezogen und nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von 0,6) erfolgte die Induktion der *SMT*-Expression für 48 h durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,8 mM). Nach dem Zellaufschluss (siehe 2.8.1.1) wurde die lösliche Proteinfraction auf SMT-Aktivität untersucht, jedoch konnte keine Aktivität detektiert werden. In einem zweiten Versuch wurde der *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus (DE3)-RIL verwendet. Die Induktion erfolgte bei verschiedenen IPTG Konzentrationen (0,2 / 0,5 / 1 mM), jedoch konnte wiederum keine Aktivität in der löslichen Proteinfraction detektiert werden. Die SMT befand sich ausschließlich in Form von *inclusion bodies* in der unlöslichen Proteinfraction. In anschließenden Renaturierungsversuchen (2.9.1.1) konnte ebenfalls keine Aktivität detektiert werden (Tab. 3.1).

Die funktionelle heterologe Expression eukaryotischer Enzyme stellt hohe Ansprüche an die Translationsmaschinerie der Wirtszelle. Korrekte posttranslationale Modifikationen des Zielproteins werden nur von eukaryotischen Zellen durchgeführt. Da die Expression in *E. coli* wie von Lehfeldt *et al.* (2000) beschrieben nicht reproduzierbar war, wurde in einem alternativen Ansatz versucht, die AtSMT in einem pflanzlichen System zu

exprimieren. Dabei wurde eine transiente Expression in Blättern von *Nicotiana tabacum* gewählt, wobei das *AtSMT*-Gen unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen Rubisco-Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum* stand (siehe 2.9.2). Nach dem Zellaufschluss der transformierten Blattbereiche und einem anschließendem Aktivitätstest konnte wiederum keine SMT-Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 3.1).

Deshalb wurde die Expression des *AtSMT*-Gens in Zellen von *Spodoptera frugiperda Sf9*-Insektenzellen versucht. Hierfür wurde der vollständige Leserahmen des *AtSMT*-Gens mit 10 bp der 5'UTR in den Vektor pVL1393 kloniert, der anschließend zusammen mit BaculoGold Baculovirus-DNA in *Sf9*-Insektenzellen co-transfiziert wurde.

Nach einer Inkubation von 72 h wurden das Kultivierungsmedium und die Zellen auf SMT-Aktivität untersucht. Im Medium konnte eine Aktivität von 220 pkat pro Liter Kultur nachgewiesen werden, wohingegen die intrazelluläre Aktivität lediglich 6 pkat pro Liter Kultur betrug (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1** SMT-Aktivität in den getesteten Expressionssystemen in pkat pro Liter Kultur (n.d., nicht detektierbar; -, nicht gemessen).

Expressionsorganismus	Vektor	löslich		unlöslich ( <i>refolded</i> )
		intrazellulär	extrazellulär	
<i>Escherichia coli</i>	pET28a (+)	n.d.	-	n.d.
<i>Nicotiana tabacum</i>	pBINPLUS	n.d.	-	-
<i>Spodoptera frugiperda</i>	pVL1393	6	220	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pYES2	20	-	-

Die trotz der erfolgreichen Expression in löslicher Form recht geringe Aktivität der SMT erforderte jedoch eine weitere Optimierung. Da für Hefezellen sowohl diverse Techniken zu Optimierung der Kultivierungsbedingungen als auch zur Erhöhung der Vektorkopienzahl zur Verfügung stehen, wurde die Expression der *AtSMT* in *S. cerevisiae* in Anlehnung an Li und Steffens (2000) und Shirley und Chapple (2003) versucht. Hierfür wurde die *AtSMT*-cDNA in den episomalen 2 µ-Vektor pYES2 Vektor kloniert und in *S. cerevisiae* INVSc1 Zellen transformiert. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des Galactose-induzierbaren *GAL1*-Promotors. Aufgrund einer nicht detektierbaren Aktivität wurde das Sequenzmotiv ATGAGT in der Nähe des Translationsstartcodons (ATG) entsprechend der Kozak-Consensussequenz (Kozak, 1984; 1986) zu ATAATGGGT verändert. Dies hatte einen Austausch in der Aminosäuresequenz der SMT von Ser1 zu Gly1 zur Folge. Dieses Konstrukt lieferte in *S. cerevisiae* eine SMT-Aktivität von 20 pkat pro Liter Kultur (Tab. 3.1).

Aufgrund der besseren Optimierungsmöglichkeiten des Hefesystems wurde im folgenden die Expression in *S. cerevisiae* optimiert (siehe 3.2), obwohl die Ausbeute an enzymatisch aktiver AtSMT aus Insektenzellen größer war.

## 3.2 Optimierung der AtSMT Expression in *S. cerevisiae*

### 3.2.1 Sequenz-Optimierung

Die Expression kann durch Faltungsstrukturen im 5'-Bereich der mRNA, sowie durch deren Stabilität im Expressionsorganismus beeinflusst werden. Zusätzlich kann die Translationseffizienz bei nicht optimalem Codon-Gebrauch (*codon usage*) herabgesetzt werden (Gustafsson *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 1984). Beispielsweise konnten Herrick *et al.* (1990) zeigen, dass selten benutzte Codons die Halbwertszeit der RNA in *S. cerevisiae* herabsetzt. Der Vergleich des Codon-Gebrauchs zwischen *S. cerevisiae* und dem AtSMT-Gen ergab nur einen *codon adaptation index* (CAI) von 75%. Der CAI ist ein Maß für die Anpassung einer gegebenen Sequenz an den optimalen Codon-Gebrauch stark exprimierter Gene eines Referenzorganismus (Sharp *et al.*, 1988; Sharp und Li, 1987). Aus diesem Grund wurde eine optimierte SMT-Sequenz synthetisiert (GeneOptimizer Software, GENART, Regensburg), die einen CAI-Wert von 97% aufwies. Zusätzlich wurden noch weitere Sequenzmotive, die sich möglicherweise negativ auf die Expression auswirken können, wie potenzielle Polyadenylierungs-Signale, *cryptic-splice-donor-sites* und prokaryotische Inhibierungsmotive, entfernt (*ySMT*; siehe Appendix Abb. A1). Zur extrazellulären Expression wurde SMT-cDNA als Fusionskonstrukt mit dem  $\alpha$ -*mating*-Faktor synthetisiert (siehe 3.2.2.). Zum Erhalt der optimierten vollständigen SMT-cDNA-Sequenz wurde das Codon-Gebrauch optimierte AtSMT-Signalpeptid mittels PCR an die *ySMT* fusioniert (*ySMT-ySMT*).

Diese Sequenz wurde anschließend in pYES2 kloniert und das resultierende Konstrukt in INVSc1-Zellen transformiert. Die Expression dieses Konstrukts ergab eine intrazelluläre SMT-Aktivität von 65 pkat pro Liter Kultur, was einer Erhöhung von über 300% gegenüber der Expression der nicht optimierten Sequenz (*AtSMT*) entspricht.

### 3.2.2 Signalpeptide

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die SMT in der Zentralvakuole von Arabidopsis-Blattmesophyllzellen lokalisiert ist (Hause *et al.*, 2002; Sharma und Strack, 1985; Strack und Sharma, 1985). Alle Proteine die für das ER, den Golgi-Apparat, die Vakuolen oder die für die Sekretion in den extrazellulären Raum vorgesehen sind, besitzen ein N-terminales-Signalpeptid für die Translokation in das ER. In der AtSMT-

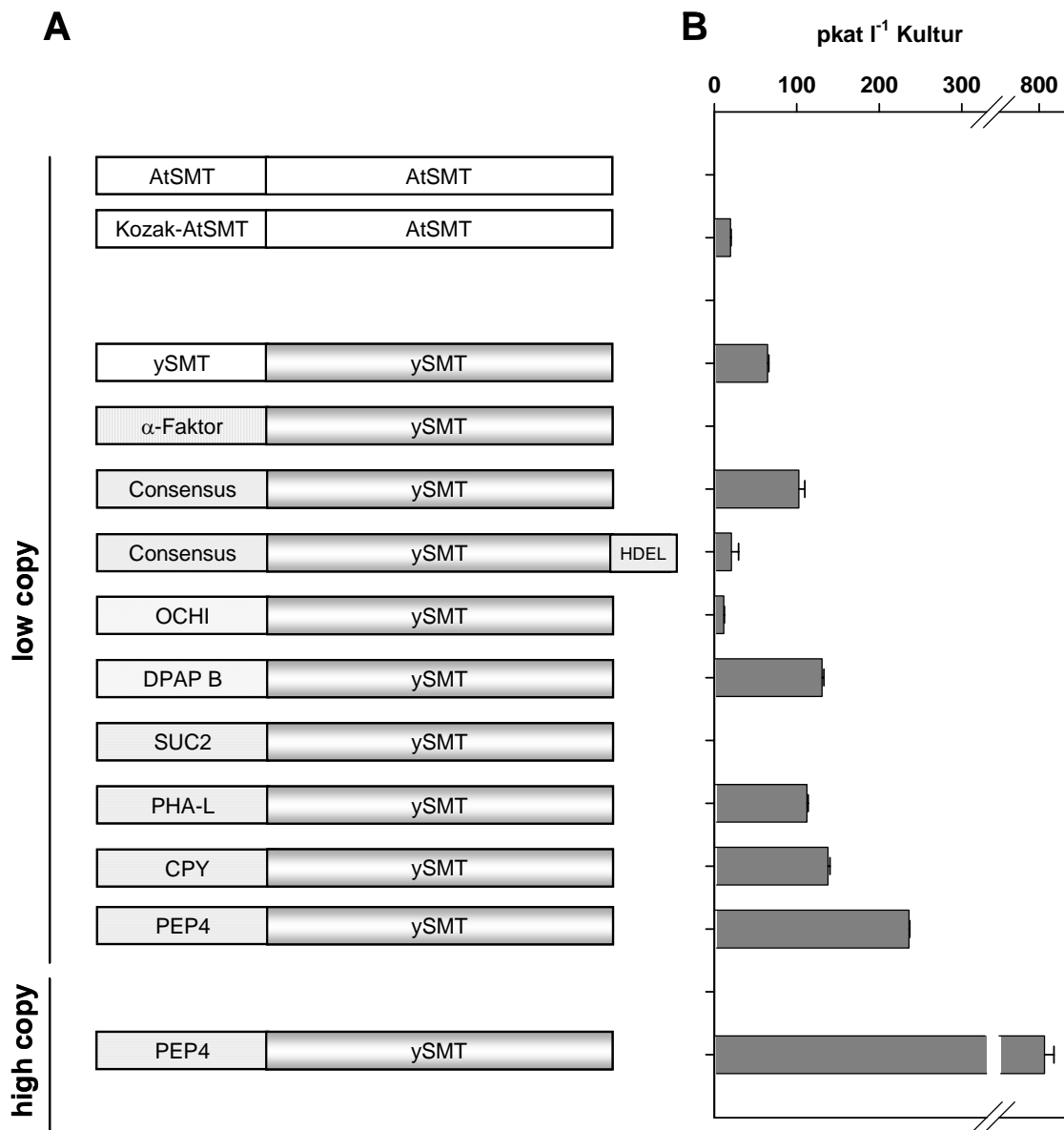
Sequenz umfasst das ER-Translokationssignal 19 Aminosäuren und trägt die charakteristischen Merkmale eines *signal recognition particle* abhängigen Signalpeptids (Ng *et al.*, 1996). Die SMT wird im homologen Wirt somit vermutlich durch co-translationale Translokation ins ER geschleust. Da das pflanzliche Signalpeptid vom *S. cerevisiae*-Expressionsstamm möglicherweise schlechter erkannt wird und somit eine Ursache für die schwache Expression (siehe 3.1.1) sein könnte, wurden verschiedene Signalpeptide, mit deren Fusion bereits effiziente heterologe Expressionen beschrieben wurden, mit der SMT fusioniert und die entsprechenden Sequenzen in pYES2 kloniert sowie in INVSc1 Zellen transformiert (Abb. 3.1).

Wie bereits in 3.2.1 beschrieben, wurde die SMT mit den 89 Aminosäuren des  $\alpha$ -*mating*-Faktors, bestehend aus Signalpeptid, Pro-Segment und dem ersten *spacer*-Peptid (Bitter *et al.*, 1984; Zsebo *et al.*, 1986) fusioniert, um das Protein ins Medium zu sekretieren. Allerdings konnte mit diesem Fusionskonstrukt keine SMT-Aktivität im Medium nachgewiesen werden.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, durch die Fusion mit einem 19 Aminosäuren umfassenden artifiziellen Consensus-Signalpeptid, den Transport der SMT ins ER zu verbessern (Abb. 3.1). Dieses Signalpeptid wurde bereits mit hEGF (*human epidermal growth factor*) fusioniert und erfolgreich in Hefen exprimiert (Clements *et al.*, 1991). Die Expression des *Consensus-ySMT* Konstrukts lieferte eine Aktivität von etwa 100 pkat pro Liter Medium, was einer Aktivitätserhöhung um den Faktor 1,5 verglichen mit dem Referenzkonstrukt (*ySMT-ySMT*) entspricht.

Zur Anreicherung der SMT im ER, wurde das *Consensus-ySMT* Konstrukt zusätzlich mit dem C-terminalen ER-Retentionssignal HDEL versehen (Monnat *et al.*, 2000; Munro und Pelham, 1987; Pelham *et al.*, 1988), wobei die Expression dieses Konstruktes zu einer SMT-Aktivitätsminderung von 80% führte.

Des Weiteren wurde die SMT mit Membranankern fusioniert. Zur Integration in die Golgi-Vesikelmembran wurde die *ySMT* mit dem *leader* der Initiationspezifischen  $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferase (OCH1; AS 1-30) aus *S. cerevisiae* verbunden (Graham und Krasnov, 1995). Für die Verankerung in die Vakuolenmembran wurde ein Fusionskonstrukt mit einer Teilsequenz der Dipeptidyl Aminopeptidase B (DPAP B, AS 26-40) aus *S. cerevisiae* hergestellt (Roberts *et al.*, 1992). Die weitere Anwendung dieser beiden Konstrukte scheitern jedoch an der geringen Expression, die für *OCH1-ySMT* eine Aktivität von 12 pkat pro Liter Kultur und für *DPAP B-ySMT* 130 pkat pro Liter Kultur lieferte.



**Abb. 3.1** Optimierung der Expression von *AtSMT* in *S. cerevisiae*. Schematische Darstellung der Primärstruktur von exprimierten SMT Varianten (A). Die SMT-Expression wurde bei einer OD600 von 1,5 durch Galactosezugabe gestartet. Nach 36 h Induktion wurde die Kultur geerntet. Die erzielte Expression (B) ist angegeben in SMT-Aktivität pro Liter Kulturmedium. Die Daten zeigen die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von drei unabhängigen Expressionen. AtSMT, cDNA aus *A. thaliana*; ySMT, Codon-Gebrauch optimierte cDNA; Kozak, Kozak-Consensus Sequenz (Kozak, 1983);  $\alpha$ -Faktor, *mating*-Faktor (AS 1-89; Bitter *et al.*, 1984); Consensus, artifizielles Consensus-Signalpeptid (AS 1-19; Clements *et al.*, 1991); HDEL, ER-Retentionssignal (Monnat *et al.*, 2000); OCH1, Initiationspezifische  $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferase (AS 1-30; Graham und Krasnov, 1995); SUC2, Invertase 2 (AS 1-19; Chang *et al.*, 1986); DPAP B, Dipeptidyl Aminopeptidase B (ATG + AS 26-40; Roberts *et al.*, 1992); PHA-L, Phytohemagglutinin L (AS 1-63; Tague *et al.*, 1990); CPY, Serin-Carboxypeptidase Y (AS 1-20; Jung *et al.*, 1999); PEP4, Proteinase A (AS 1-21; Ammerer *et al.*, 1986).

Zusätzlich wurden drei Signalpeptide von den Hefeproteinen Invertase 2 (SUC2; AS 1-19; Chang *et al.*, 1986), Proteinase A (PEP4; AS 1-21; Ammerer *et al.*, 1986) und Carboxypeptidase Y (CPY; AS 1-19; Jung *et al.*, 1999) getestet, die den Transport der reifen SMT in das Lumen der Vakuolen gewährleisten sollen. Alternativ wurde eine Signalsequenz pflanzlicher Herkunft eingesetzt. Dafür wurde die *ySMT* mit der Pre-Pro

Sequenz des Phytohemagglutinin L (PHA L; AS 1-63), einem Samen-Lectin aus *Phaseolus vulgaris*, fusioniert (Tague und Chrispeels, 1987; Tague *et al.*, 1990). Für das Konstrukt *SUC2-ySMT* konnte keine SMT-Aktivität gemessen werden, während mit den *leader*-Sequenzen von CPY und PHA-L Aktivitäten von 110 bzw. 140 pkat pro Liter Medium erreicht wurden. Die höchste Aktivität konnte mit dem Fusionskonstrukt *PEP4-ySMT* erzielt werden. Hier wurde eine Aktivität von 240 pkat pro Liter Medium gemessen, was einer Steigerung von 400% entspricht.

Die zusätzliche Fusion mit einem C-terminalen Histidin Tag (6xHis), zur effizienteren Aufreinigung der SMT reduzierte die SMT-Aktivität um 90%.

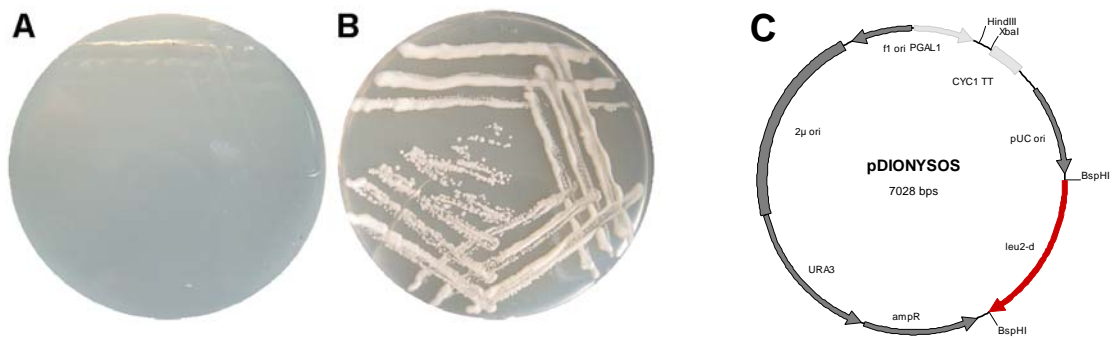
### 3.2.3 Kopienzahl des Vektors

Die Möglichkeit einer Steigerung der *AtSMT*-Expression über den Gen-Dosis-Effekt wurde durch den Einsatz eines *high-copy* Expressionsvektor überprüft. Da für *S. cerevisiae* kein solcher Vektor kommerziell verfügbar war, wurde das *leu2-d*-Gen (Erhart und Hollenberg, 1983) vom Plasmid p72UG (Nielsen *et al.*, 1990) amplifiziert und als *Bsp*HI-Fragment in den Vektor pYES2 kloniert und das resultierende Plasmid wurde pDIONYSOS genannt. Die hohe Kopienzahl von *leu2-d*-Plasmiden in *leu2*-defizienten Hefestämmen hat ihre Ursache in der schwachen Expression des *leu2-d*-Gens. Hervorgerufen durch eine Deletion im Promotorbereich erreicht *leu2-d* weniger als 5% der Expression des Wildtyp-Allels *LEU2* (Erhart und Hollenberg, 1983). Zur Kompensation erhöhen *leu2*-defiziente-Stämme die Plasmidkopienzahl in Kulturmedien ohne Leucin. Das Plasmid pDIONYSOS (Abb. 3.2) war in der Lage, die Leucin-Auxotrophie des *leu2* defizienten Hefestamms *S. cerevisiae* INVSc1 zu komplementieren, was ein Indiz für die hohe Kopienzahl des Plasmids pDIONYSOS darstellt (Abb. 3.2).

Die effizienteste Expressionskassette *PEP4-ySMT* wurde in pDIONYSOS kloniert und das resultierende *high copy-AtSMT*-Expressionsplasmid in *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen transformiert. Die Zellen wurden in synthetischem Medium ohne Leucin kultiviert und die *AtSMT*-Expression mit Galactose induziert. Im Proteinrohextrakt konnte eine SMT-Aktivität von etwa 800 pkat pro Liter Medium nachgewiesen werden. Dies entspricht einer 4-fach höheren Ausbeute verglichen mit der Expression von pYES2:*PEP4-ySMT*.

Das pDIONYSOS:*PEP4-ySMT*-Konstrukt wurde nachfolgend zur Gewinnung von SMT-Protein für die Durchführung von Mutagenesestudien und der Charakterisierung des Katalysemechanismus der *AtSMT* verwendet (siehe 3.4).





**Abb. 3.2** Komplementation der Leucin-Auxotrophie von *S. cerevisiae* INVSc1. Die Zellen wurden mit pYES2 (A) oder mit dem *leu2-d*-Plasmid pDIONYSOS (B) transformiert und auf synthetischem Mangelmedium ohne Leucin ausgestrichen. Das Wachstum der Hefezellen mit pDIONYSOS ist ein Indiz für eine hohe Anzahl an *leu2-d*-Gen durch eine erhöhte Plasmid-Kopienzahl (Erhart und Hollenberg, 1983). (C) Plasmidkarte von pDIONYSOS. Die Insertion der SMT cDNA erfolgte über die Restriktionsorte *Hind*III-*Xba*I. *GAL1*-Promotor (nt 1-451); *CYC1*-Transkriptionsterminator (nt 475-494); pUC-*origin* (nt 138-1711); *leu2-d*-Marker (nt 1756-2928); Ampizillin-Resistenzgen (nt 3028-3888, komplementärer Strang); *URA3*-Marker (nt 3906-5013, k); 2  $\mu$ -*origin* (nt 5017-6488); *f1-ori* (nt 6556-7011, k).

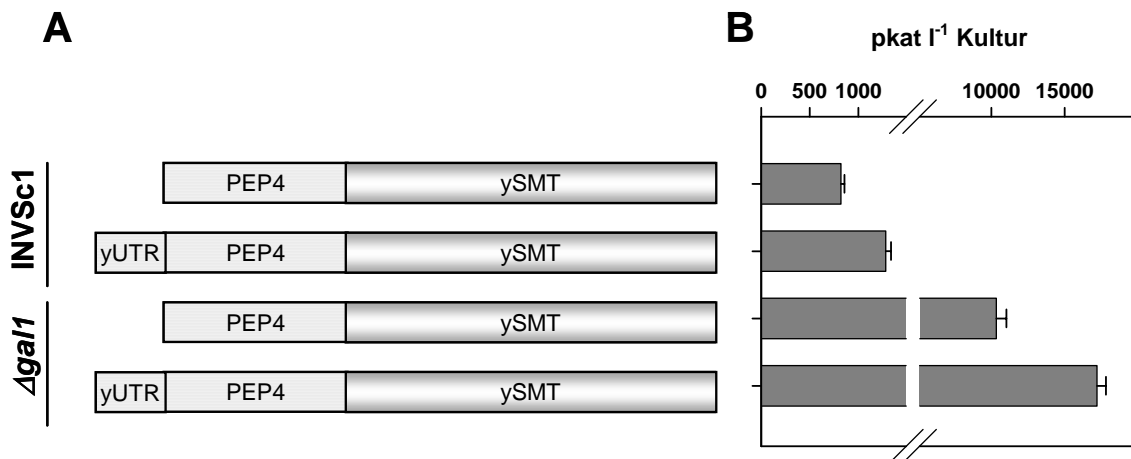
### 3.2.4 5'Untranslatierte Region (5'UTR)

Flankierenden Nukleotide spielen bei der Translation zur Erkennung des Initiationscodon (ATG) durch die 40S-Untereinheit des Ribosoms eine wichtige Rolle. Für Säugerzellen konnte durch Sequenzvergleiche eine Consensussequenz um das Initiationscodon definiert werden (Kozak, 1981; 1986). Die entsprechend dieser Sequenz optimierte AtSMT lieferte jedoch nur eine geringe Erhöhung der Expressionsrate (vgl. 3.1.1). Hamilton *et al.* (1987) zeigten jedoch, dass sich der Sequenzkontext um das ATG-Initiationscodon für hoch exprimierte Gene in *S. cerevisiae* von dem der Säugerzellen unterscheidet. Die beschriebene Consensussequenz für *S. cerevisiae* lautet: AAA AAA ATG TCT, weshalb die Sequenz der *PEP4-ySMT* entsprechend modifiziert wurde. Dies hatte keinen Austausch in der ersten Aminosäureposition der SMT zur Folge. Die Expression des resultierenden Konstrukts ergab eine um den Faktor 1,6 erhöhte SMT-Aktivität verglichen mit dem nicht optimierten *PEP4-ySMT*-Konstrukt (Abb. 3.3).

### 3.2.5 Hefezellen

Zur weiteren Steigerung der SMT-Expression, wurden *S. cerevisiae* Zellen des Stamms BY4741 (Euroscarf) eingesetzt, die eine Mutation im *GAL1*-Gen tragen und somit nicht in der Lage sind den Induktor Galactose zu metabolisieren. Stagoj *et al.*, (2006) konnten zeigen, dass die Expression des *green fluorescent protein* (GFP) in diesen Zellen um den Faktor 3 gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Die Expression des Konstrukts *PEP4-ySMT* in *GAL1*-defizienten Zellen ( $\Delta gal1$ ) des Stamms BY4741 lieferte eine Aktivität von etwa 10.000 pkat pro Liter Kulturmedium. Dies entspricht einer

Erhöhung gegenüber der Expression des selben Konstrukts in den INVSc1 Zellen um den Faktor 12,5. Die Verwendung des 5'UTR optimierten *yUTR-PEP4-ySMT* Konstruktes in BY4741 bewirkte eine nochmalige Steigerung der Ausbeute an aktiver AtSMT um weitere 70%. Das entspricht einer Aktivität von 17.000 pkat pro Liter Kulturmedium.



**Abb. 3.3** Optimierung der PEP4-ySMT-Expressionskassette in *S. cerevisiae*. Schematische Darstellung der Primärstruktur exprimierter SMT-Varianten (A) und die erzielte Expressionsstärke in SMT-Aktivität pro Liter Kulturmedium (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von drei unabhängigen Expressionen. ySMT, Codon-Gebrauch optimierte cDNA; PEP4, Proteinase A (AS 1-21); yUTR, Consensus 5'UTR Sequenz für *S. cerevisiae* (Hamilton *et al.*, 1987); INVSc1-Zellen (Invitorgen),  $\Delta gal1$ : BY4741-Zellen (Euroscarf).

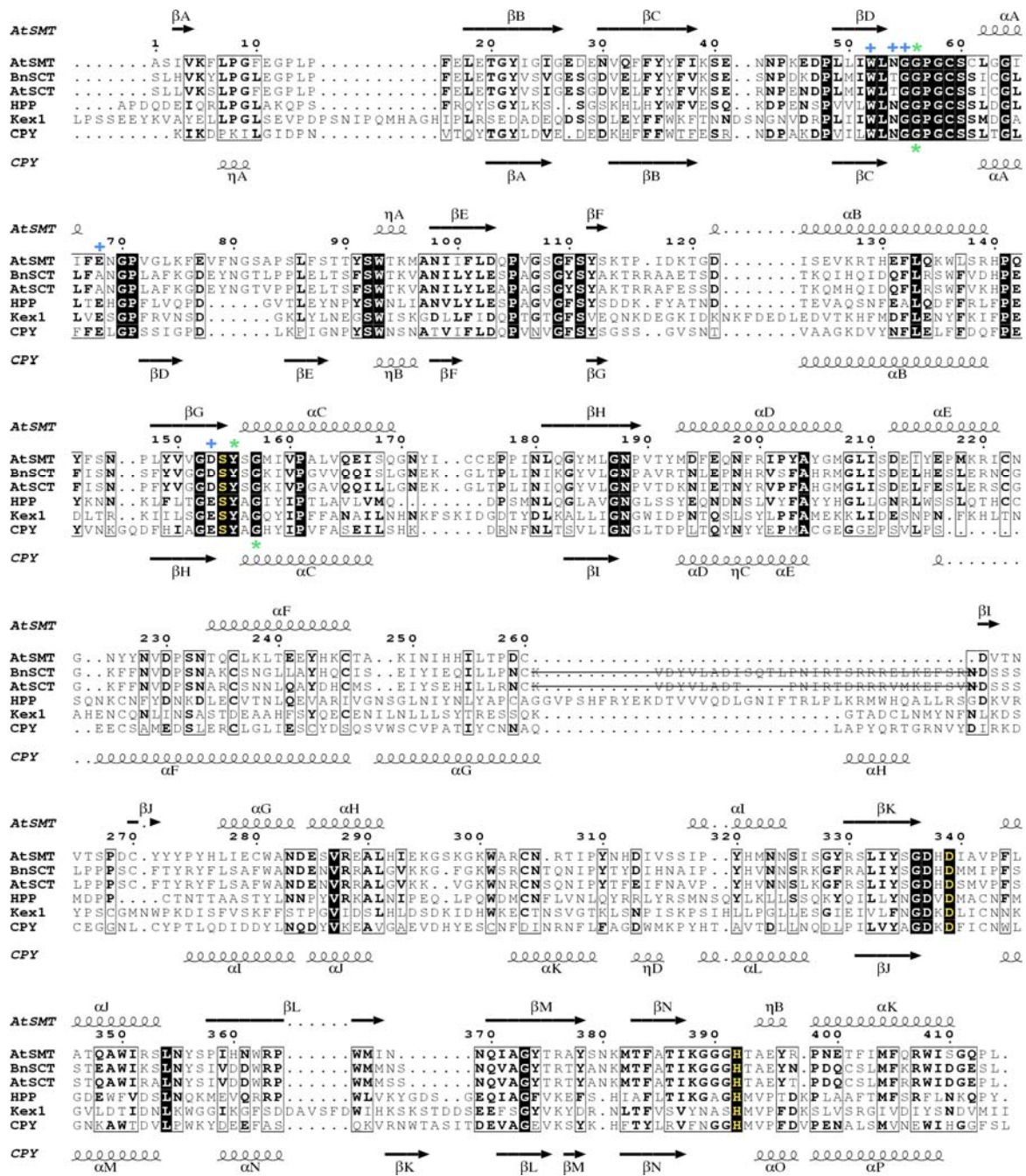
Die Optimierung der *AtSMT*-Expression in *S. cerevisiae* brachte so im Ergebnis eine Steigerung der Ausbeute an aktiver AtSMT um den Faktor 850. Diese optimierte Expression erlaubt nun die Durchführung von Kristallisationsexperimenten. Allerdings konnte dies aus zeitlichen Gründen in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

### 3.3 Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur

Im Sinne der Aufgabenstellung dieser Arbeit galt es, den Reaktionsmechanismus der SMT aufzuklären und damit die zur Evolution von Acyltransferasen aus hydrolytischen Enzymen notwendigen molekularen Voraussetzungen zu benennen. Allerdings scheiterten mögliche Kristallisationsversuche an der zunächst geringen Proteinausbeute. Jedoch gelang in Zusammenarbeit mit Dr. W. Brandt (IPB, Halle) die Modellierung der SMT-Proteinstruktur für eine erste Struktur-Funktionsanalyse.

### 3.3.1 Auswahl von Matrizen für die Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur

Unter Verwendung der Programme blastp (Altschul *et al.*, 1990) und 3D-PSSM (Fischer *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2000) konnten drei Kandidaten konnten als mögliche Matrizen für die Modellierung der AtSMT-Proteinstruktur identifiziert werden (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4** Protein-Alignment von SCPL Acyltransferasen (AtSMT, AtSCT, BnSCT) und Serin-Carboxypeptidasen, (HPP, Kex1, CPY), die als Matrizen für die Strukturmodellierung der AtSMT verwendet wurden. Signalpeptide wurden entfernt. Vollständig konservierte Sequenzpositionen sind schwarz hinterlegt. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind gelb hinterlegt. Aminosäurereste, die das Wasserstoffbrückennetzwerk zur Substraterkennung bilden, sind mit blauen Kreuzen markiert. Die an der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligten Aminosäurereste (*Oxyaniontasche*) sind mit grünen Sternen (AtSMT über und CPY unter den Sequenzen) gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht

sich auf die AtSMT-Sequenz ohne Signalpeptid. Sekundärstrukturelemente sind für die AtSMT und die CPY gezeigt (erstellt auf <http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/index.php>). Endopeptide, die vermutlich während der post-translationalen Reifung der SCT-Enzyme herausgespalten werden, sind durchgestrichen. Der multiple Sequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW unter Verwendung der BLOSUM62 Matrix erstellt. AtSMT, *A. thaliana* SMT (Genbank Accession AF275313); BnSCT, *B. napus* SCT (AY383718); AtSCT, *A. thaliana* SCT (AY033947); HPP, *human protective protein* (NM000308.1); Kex1p, *S. cerevisiae* Serin-Carboxypeptidase II (NC001139.7); CPY, *S. cerevisiae* Carboxypeptidase Y (NC001145.2).

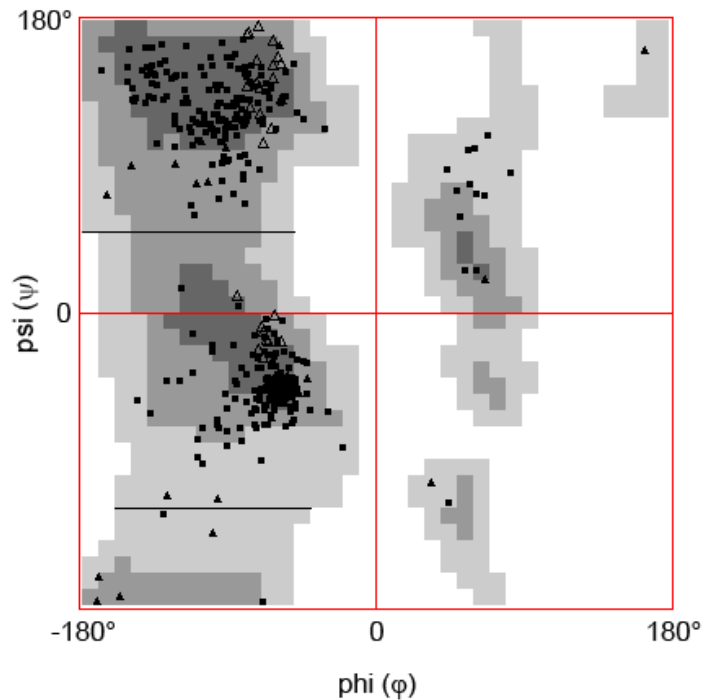
Dazu zählte das *human protective protein* (HPP; pdb-Code 1ivy; Rudenko *et al.*, 1995) mit einer Aminosäuresequenzidentität zur AtSMT von 28% (*e-value*: 1E-105), die Serin-Carboxypeptidase Y aus *S. cerevisiae* (CPY; pdb-Code 1ysc; 25% AS-Sequenzidentität; *e-value*: 2E-98; Endrizzi *et al.*, 1994) sowie, ebenfalls aus Hefe, die Serin-Carboxypeptidase II (Kex1p; pdb-Code 1ac5; 19% AS-Sequenzidentität; *e-value*: 2E-77; Shilton *et al.*, 1996).

Die vergleichende Sequenzanalyse zeigte, dass die Sequenzelemente für die katalytische Triade, die Oxyaniontasche sowie für das Wasserstoffbrückennetzwerk (*hydrogen bond network*) zur Erkennung der C-terminalen Carboxylgruppe des Peptidsubstrats durch die Peptidasen (Mortensen *et al.*, 1994a; Mortensen *et al.*, 1994b) in der SMT konserviert sind.

### 3.3.2 Struktur-Modell der AtSMT

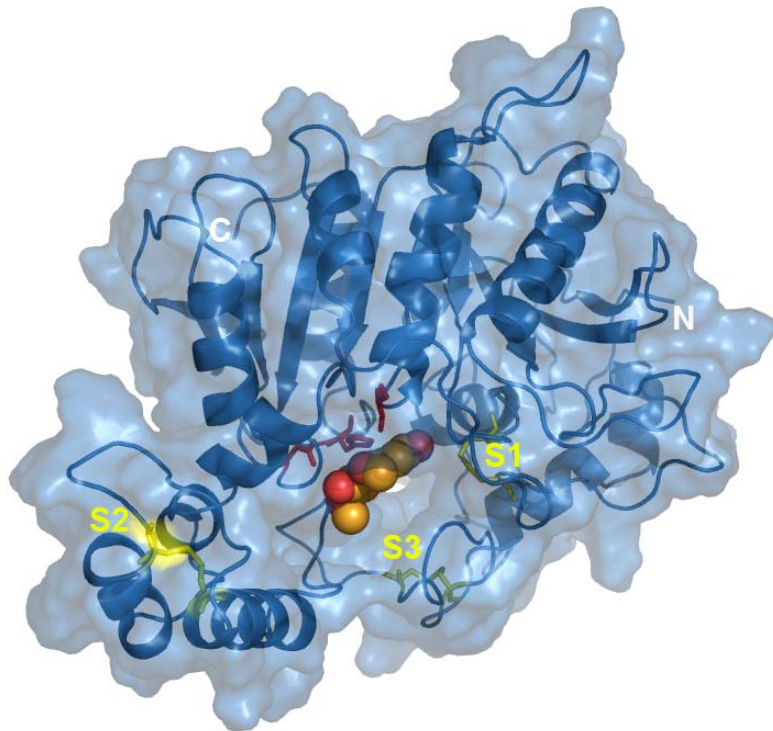
Das Strukturmodell der AtSMT (Abb. 3.6) wurde mit dem Programm MODELLER erstellt (siehe 2.11) und ist mit dem pdb-Code 2drf in der Protein-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) hinterlegt. Der Ramachandran-Plot zeigt (Abb. 3.5), dass innerhalb dieses Modells 81,5% der Torsionswinkel ( $\varphi$  und  $\psi$ ) der Aminosäurehauptkette in den am meisten bevorzugten Bereichen, 16,4% in zusätzlich erlaubten Bereichen und nur 2,1% in generell erlaubten Bereichen liegen. Alle weiteren stereochemischen Parameter befinden sich in einem Bereich, der für eine Struktur mit einer Auflösung von 2,0 Å zu erwarten wäre.

Einen weiteren Hinweis für die Korrektheit des aufgestellten Strukturmodells bezüglich der Proteinfaltung lieferte der Vergleich der berechneten Energiestruktur mit der Struktur homologer Proteine (Prosa Plot; Sippl, 1990a; Daten nicht gezeigt), wobei sich keine signifikanten energetischen Unterschiede im Vergleich zu den verwendeten Matrizen-Strukturen ergab.



**Abb. 3.5** Ramachandran-Plot der AtSMT-Modellstruktur. (■), am meisten bevorzugte Bereiche; (■), zusätzlich erlaubte Bereiche; (■), generell erlaubte Bereiche; (□), nicht erlaubte Bereiche; (▲), Glycinreste; (△), Prolinreste, (●), alle anderen Reste. Prolin- und Glycinreste in den nicht erlaubten Bereichen sind nicht dargestellt. Die Abbildung wurde auf <http://dicsoft1.physics.iisc.ernet.in/rp/servlet/phipsichain> erstellt.

Ein zusätzlicher Indikator für die allgemeine Gültigkeit von modellierten Proteinfaltungen ist die Position konservierter Disulfidbrücken. Die Modellstruktur der AtSMT weist drei Disulfidbrücken auf (S1, S2 und S3; Abb. 3.6). Die Anzahl der Disulfidbrücken in den verwendeten Matrizenproteinen variiert von drei (Kex1p) über vier (HPP) bis fünf (CPY). Dabei ist die mit S1 bezeichnete Disulfidbrücke, die in der AtSMT zwischen Cys78 und Cys323 ausgebildet wird, in allen Matrizenproteinen konserviert. Die Disulfidbrücke S3 zwischen Cys279 und Cys298 kann in allen Matrizenproteinen gefunden werden, wobei die Position im Sequenzalignment nicht strikt konserviert ist. Die Disulfidbrücke S2 wird in der AtSMT zwischen den Cysteinen 241 und 255 gebildet und ist ähnlich konserviert wie S3, wohingegen die Positionen in den jeweiligen dreidimensionalen Strukturen unterschiedlich sind. Wie zu erwarten, zeigt die AtSMT den allgemeinen Aufbau einer  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Faltung (Ollis *et al.*, 1992) und somit ein ideales Gerüst für die Ausbildung einer katalytischen Triade.



**Abb. 3.6** Modellierter  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung der AtSMT mit dem Liganden Sinapoylglucose (Kalottenmodell). Disulfidbrücken sind als S1-S3 markiert. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind rot eingefärbt (*sticks*). Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).

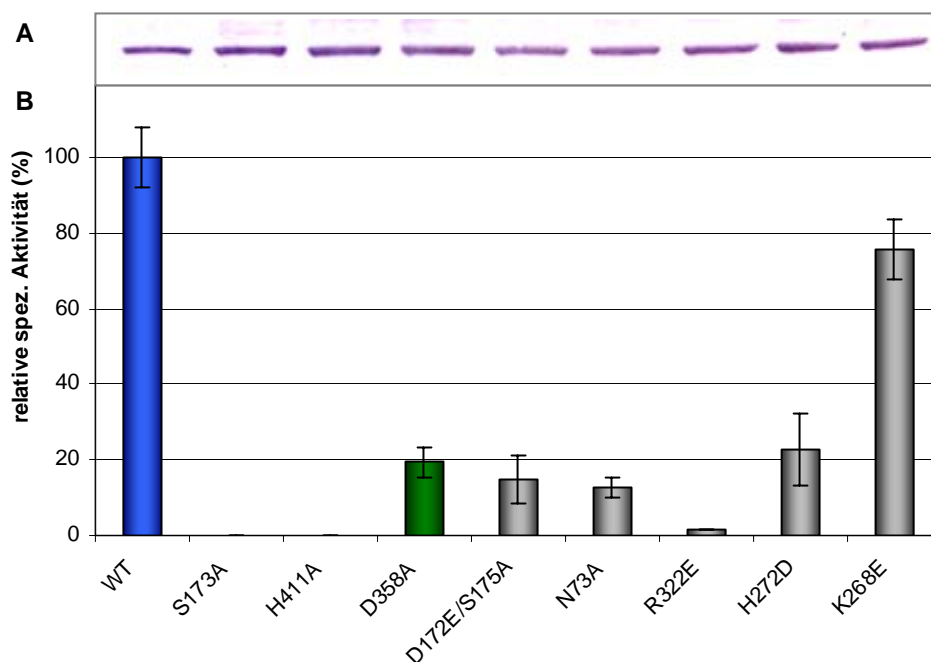
### 3.3.3 Das katalytische Zentrum der AtSMT

Sequenzvergleiche der SCPL-Acyltransferasen mit den SCPs zeigten, dass die Aminosäurereste der katalytischen Triade sowie deren unmittelbar benachbarte Sequenzpositionen hoch konserviert sind. Dies legte die Vermutung nahe, dass die AtSMT zur Katalyse des Acyltransfers ein *charge relay*-System aus Ser173, His411 und Asp358 verwendet. Zudem ließen bereits frühere Studien bei anderen SCPL-Acyltransferasen mit den Inhibitoren DFP oder PMSF die Beteiligung einer derartigen katalytischen Triade auch an der SMT-Reaktion erwarten (Li und Steffens, 2000; Shirley und Chapple, 2003).

Zur Bestätigung dieser Hypothese, wurden die Proteinextrakte aus *A. thaliana* und *B. napus* vor einer Aktivitätsbestimmung mit 10 mM PSMF inkubiert, was in einer Reduktion der katalytischen Aktivität um 30% resultierte. Analog durchgeführte Hemmversuche mit 1 mM DFP führten sogar zu einer Verminderung um 95%. Diese Ergebnisse weisen in Übereinstimmung mit den Sequenzanalysen auf die maßgebliche Beteiligung des Ser173 an der Acyltransferase-Aktivität hin.

Durch Mutagenesestudien sollte der Einfluss der einzelnen Aminosäurereste der putativen katalytischen Triade auf die SMT-Aktivität bestimmen werden. Hierfür, wurden

die Varianten Ser173Ala, His411Ala und Asp358Ala hergestellt und als PEP4-Fusionsproteine nach Insertion in pDIONYSOS in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Induktion mit Galactose erfolgte für 36 bzw. 48 h. Die Verhältnisse der relativen Aktivitäten zwischen dem Wildtypenzym und den verschiedenen AtSMT-Varianten (außer für die inaktiven Varianten S173A und H411A; weitere Varianten siehe 3.3.4) war zu beiden Erntezeitpunkten identisch, was darauf hindeutet, dass die verschiedenen *SMT*-cDNAs in etwa gleich exprimiert worden waren (nicht gezeigt). Dies konnte zusätzlich durch Western Blot-Analysen mit anti-SMT-Antikörpern bestätigt werden (Abb. 3.7 A). Für die Varianten Ser173Ala und His411Ala konnte keine SMT-Aktivität gemessen werden. Für die AtSMT-Variante Asp358Ala wurde eine Restaktivität von 20% des Wildtypproteins bestimmt (Abb. 3.7 B).



**Abb. 3.7** Expression von AtSMT-Sequenzvarianten. (A) Western Blot-Analyse von Proteinrohextrakten mit einem polyklonalen monospezifischen anti-SMT-Antikörper aus Kaninchen (Hause *et al.*, 2002). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Proteinrohextrakt aus transformierten Hefezellen aufgetragen. (B) Mittelwerte der relativen spezifischen Aktivitäten ( $\pm$  Standardabweichung) aus je drei unabhängigen Expressionsexperimenten (100% = 14  $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  Protein). WT, AtSMT-Wildtyp-Sequenz (PEP4-ySMT); S173A, H411A, D358A, D172E/S175N, N73A, R322E, H272D und K288E, mutierte Sequenzvarianten der AtSMT.

### 3.3.4 Molekulare Grundlagen der AtSMT-Substratspezifität

Das Strukturmodell der AtSMT lieferte erste Hinweise auf die an der Substraterkennung beteiligten Aminosäurereste (Abb. 3.8). Entsprechend des Modells spielen Glu215 und Arg219 eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Positionierung des AtSMT-Substrats Sinapoylglucose, wobei Glu215 vermutlich mit der

Hydroxylgruppe am C4 des aromatischen Rings von Sinapoylglucose eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Die Position des Arg219 innerhalb des Modells legt die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu der benachbarten Methoxygruppe des Substrats nahe. Davon ausgehend wurde die sterische Kompatibilität von 1-*O*-Feruloyl-, -Kaffeoyl- sowie -4-Cumaroylglucose getestet, die von der SMT als alternative Acyldonatoren akzeptiert werden (Gräwe *et al.*, 1992). Mit Hilfe des Programms GOLD (GGOLD®, 1998) wurden die verschiedenen Interaktionsenergien jedes einzelnen dieser Liganden mit der SMT berechnet (Tab. 3.2). Die berechneten Interaktionsenergien spiegeln die experimentell ermittelten Spezifitäten für die jeweiligen Substrate wieder (Gräwe *et al.*, 1992), wobei Sinapoylglucose das bevorzugte Substrat für die AtSMT darstellt (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2** Berechnete Interaktionsenergien der verschiedenen Liganden mit der AtSMT verglichen mit den Substratspezifitäten der gereinigten SMT aus *Raphanus sativus* (Gräwe *et al.*, 1992).

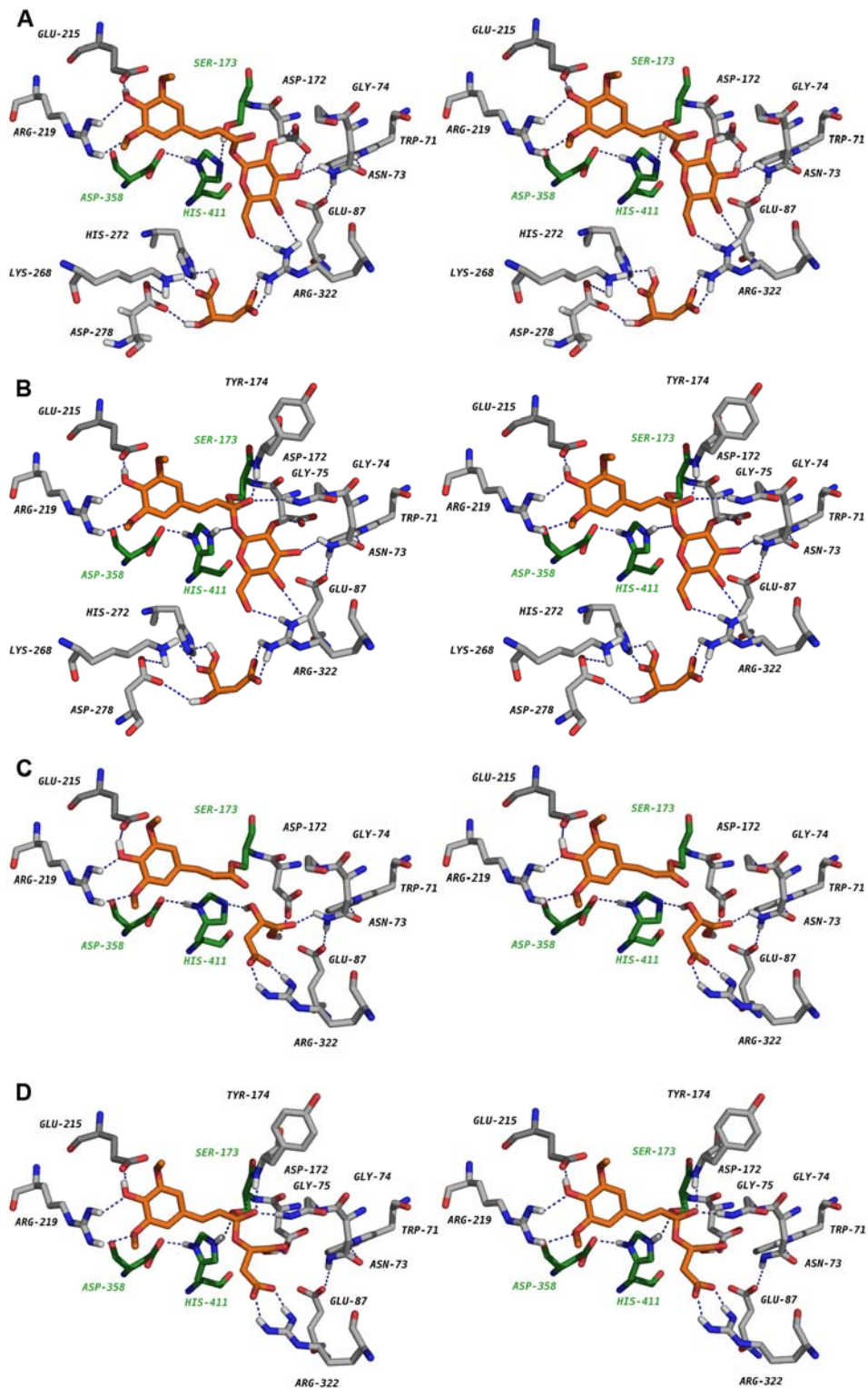
Acyldonor	Ligand (kJ·mol <sup>-1</sup> )	SMT/ Ligand (kJ·mol <sup>-1</sup> )	Interaktionsenergie <sup>a</sup> (kJ·mol <sup>-1</sup> )	rel. Aktivität <sup>b</sup> (%)
Sinapoylglucose	56,8	1.272	-164,3	100
Feruloylglucose	46,4	1.264	-162,6	85
Caffeoylglucose	43,1	1.264	-158,8	45
4-Cumaroylglucose	38,9	1.265	-153,8	2,4

<sup>a</sup> Interaktionsenergie = Energie des Enzym-Liganden Komplexes - Energie des optimierten isolierten Liganden + Energie der freien AtSMT (1.380 kJ mol<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup> Substratspezifitäten nach Gräwe *et al.* (1992).

Außerdem zeigt der Sequenzvergleich (Abb. 3.4), dass die Aminosäurereste, die in der CPY für die Erkennung der C-terminalen Carboxylgruppe des Peptidsubstrats essentiell sind (Trp49, Asn51, Gly52, Glu65, Glu145), in den SCPL-Acyltransferasen eine hohe Konservierung aufweisen, mit Ausnahme von Asn51, das in den SCT-Enzymen durch Threonin ersetzt ist und Glu145, an dessen Position sich in den SCPL-Acyltransferasen das chemisch sehr ähnliche Aspartat befindet. Das Strukturmodell der AtSMT stützt somit die Hypothese, dass diese Aminosäuren ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, das bei der Substraterkennung eine entscheidende Rolle spielt.





**Abb. 3.8** Stereoabbildungen ausgewählter Aminosäurereste, die an der Substratbindung im aktiven Zentrum der AtSMT beteiligt sein könnten. Die Reste der katalytischen Triade (Ser173, His411, Asp358) sind grün markiert. Die Substrate Sinapoylglucose und L-Malat sind orange eingefärbt. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. (A) Aktives Zentrum mit den gebundenen Substraten Sinapoylglucose und L-Malat. (B) Modell des Übergangszustandes. Die negative Ladung des Carbonylkohlenstoffs wird durch die Amino-Gruppen der Hauptkette von Gly75 und Tyr174 stabilisiert. (C) Acylenzym-Komplex; das zweite Substrat L-Malat kann durch die Abstraktion eines Protons durch His411 aktiviert werden. (D) Modell des zweiten Übergangszustandes. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).

So kann das Asn73 der SMT (homolog zu Asn51 in der CPY) eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe am C3-Atom des Glucoserests der Sinapoylglucose ausbilden (Abb. 3.8 A & B). Weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen am C2- und C3-Atom des Glucoserests und der Carboxylgruppe von Asp172 der AtSMT wären denkbar. Im Gegensatz zum Gly52 der CPY spielt der homologe Rest Gly74 (SMT) höchstwahrscheinlich keine Rolle in diesem Netzwerk.

Das AtSMT-Strukturmodell lässt weiterhin vermuten, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Glucoserests spielt, sondern auch an der Positionierung des zweiten Substrats L-Malat, nachdem der Glucoserest abgespalten wurde. Dabei kommt es zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten von Asn73 und Asp172 und der protonierten Carboxylgruppe des L-Malats (Abb. 3.8 C & D). Dieser molekulare Mechanismus liegt auch der Erkennung der Peptidcarboxylgruppe in den SCPs zugrunde (Mortensen *et al.*, 1994a). Die SMT-Variante Asn73Ala in der dieses Netzwerk nicht mehr ausgebildet werden kann (Mortensen *et al.*, 1994b), zeigt lediglich eine Restaktivität von 13% (Abb. 3.7).

Eine Schlüsselrolle bei der Substraterkennung und -stabilisierung weist das Strukturmodell dem Aminosäurerest Arg322 zu (Abb. 3.8). Arg322 bildet demnach Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zum Glucoserest der Sinapoylglucose aus, als auch zur Carboxylgruppe des Acylakzeptors L-Malat. Nach Abspaltung der Glucose, könnte Arg322 das L-Malat durch Konformationsänderungen in eine Position bringen, in der es für die Abstraktion eines Protons durch das katalytische His411 zugänglich wird. Dabei könnten die beiden Reste Asn73 und Asp172 das L-Malat zusätzlich stabilisieren. Durch diese relativ feste Fixierung ist das durch die Protonen-Abstraktion aktivierte L-Malat dann in einer günstigen Position, um den Acylenzym-Komplex nukleophil angreifen zu können, wodurch Sinapoylmalat als Produkt freigesetzt werden kann. Die große Bedeutung des Aminosäurerests Arg322 wird durch die Arg322Glu-Variante der AtSMT untermauert, die enzymatisch nahezu inaktiv ist (Abb. 3.7).

Zwei weitere Aminosäurereste (His272 und Lys268), könnten bei der primären Erkennung des L-Malats beteiligt sein (Abb. 3.8 A & B). Dies konnten experimentelle Arbeiten bestätigen, die für die AtSMT-Variante His272Glu eine Verminderung der enzymatischen Aktivität um 78% und für die AtSMT-Variante Lys268Glu eine Reduktion um 25% zeigen (Abb. 3.7).

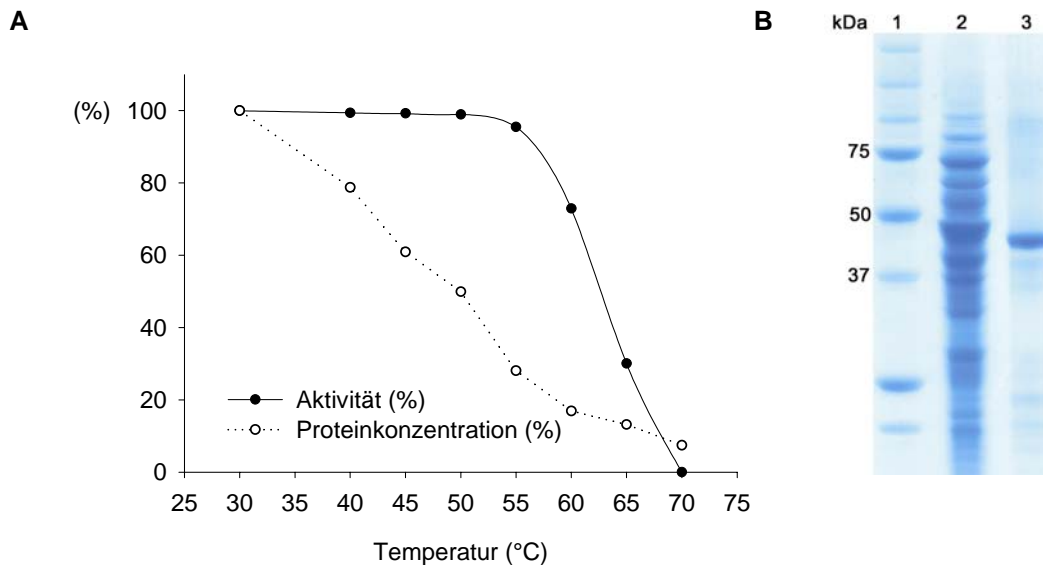
Ein charakteristisches Merkmal von SCP-Enzymen ist die Ausbildung der Oxyaniontasche, die eine Stabilisierung der negativen Ladung des Carbonylkohlenstoffs im Übergangszustand vermittelt (vgl. 1.3). In der CPY wird dies durch Wasserstoffbrückenbindungen der Amidprotonen der Hauptkette von Gly53 und Gly149

realisiert. In der AtSMT wird die Stabilisierung der negativen Ladung höchstwahrscheinlich durch die Hauptkettenamide Gly75 und Tyr174 gewährleistet (Abb. 3.8 B & D), wobei Gly75 den homologen Rest zu Gly53 der CPY darstellt. Der zweite Partner Tyr174, der in der AtSMT an der Ausbildung der Oxyaniontasche beteiligt ist, befindet sich, verglichen mit der CPY, um zwei Sequenzpositionen näher am katalytisch aktiven Serin. In SCP-Enzymen ist der katalytische Serylrest Bestandteil eines hochkonservierten Peptidmotivs Gly-Glu-Ser-Tyr-Ala (Derewenda *et al.*, 1992). Für SCPL-Acyltransferasen ist in diesem Motiv die Substitution des Glutamylrests durch einen Aspartylrest sowie der Austausch des Alanylrests durch einen Serylrest charakteristisch (Milkowski und Strack, 2004). Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieser Substitutionen für den Glucoseester-abhängigen Acyltransfer, wurde die AtSMT-Sequenzvariante Asp172Glu/Ser175Ala hergestellt, in der das charakteristische Hydrolasemotiv rekonstruiert wurde. Diese Doppelvariante zeigte eine Restaktivität von lediglich 15% (Abb. 3.7) und gibt somit die experimentelle Bestätigung für die Relevanz dieser beiden Aminosäuren für einen effizienten Acyltransfer.

### 3.4 Enzymkinetische Charakterisierung

#### 3.4.1 Enzympräparation

Für die enzymkinetischen Messungen war es notwendig, das heterolog exprimierte AtSMT-Protein ohne Verlust der enzymatischen Aktivität möglichst bis zur Homogenität aus den Hefezellen aufzureinigen. Da es nicht möglich war, die AtSMT unter Erhalt der Funktionalität mit einem His-tag zu fusionieren, musste für die Gewinnung des aktiven Proteins ein klassisches Reinigungsschema etabliert werden. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass das rekombinante AtSMT-Protein relativ hitzebeständig war und bis einer Temperatur von 55°C waren keine Aktivitätsverluste zu verzeichnen, wohingegen bereits mehr als 50% der Hefe-Wirtsproteine denaturierten (Abb. 3.9 A). Deshalb wurde nach dem Zellaufschluss der lösliche Überstand zunächst für 10 min bei 55°C hitzebehandelt, was zur Verdopplung der spezifischen Aktivität führte. Anschließend folgten chromatographische Fraktionierungen, beginnend mit einer hydrophoben Interaktionschromatographie, gefolgt von einer Größenauftrennung mittels Gelfiltration. Die aktive Fraktion der Gelfiltration wurde erneut für 10 min bei 55°C inkubiert. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt. Insgesamt konnte aus 7 l Hefekultur 0,3 mg gereinigte SMT gewonnen werden (Tab. 3.3).



**Abb. 3.9 (A)** Temperaturstabilität der rekombinanten AtSMT im Vergleich zu den Hefeproteinen. Der Protein-Rohextrakt aus *S. cerevisiae* wurde für 10 min bei Temperaturen von 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 und 70°C inkubiert und anschließend auf SMT-Aktivität getestet. Die enzymatische Aktivität wurde anhand der Sinapoylmalat-Bildung mittels HPLC quantifiziert (100% = 0,1 nkat·mg<sup>-1</sup>). Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) mit BSA als Standard bestimmt. **(B)** Enzympräparation. Die Proteine wurden über ein 12% Bis-Tris NuPAGE Gel (Invitrogen) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. 1: Molekulargewichts-Marker; 2: Protein-Rohextrakt aus *S. cerevisiae*; 3: gereinigtes rekombinantes AtSMT-Protein

Das isolierte Protein wurde mittels SDS-PAGE (Abb. 3.9 B) auf seine Reinheit überprüft und für alle nachfolgenden kinetischen Charakterisierungen verwendet (siehe 3.4.3 bis 3.4.5).

Tab. 3.3 Reinigungsschema der rekombinanten AtSMT

Reinigungsschritt	Ges. Protein (mg)	Ges. Aktivität (nkat)	Spez. Aktivität (nkat·mg <sup>-1</sup> )	Anreicherung (fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	5.700	523	0,1	1	100
Hitzebehandlung	2.565	470	0,2	2	90
Butyl FF	360	163	0,5	5	31
Sephadex 200	123	89	0,7	7	17
Hitzebehandlung	37	80	2,2	22	15
Q-Sepharose	0,3	47	157	1.570	9

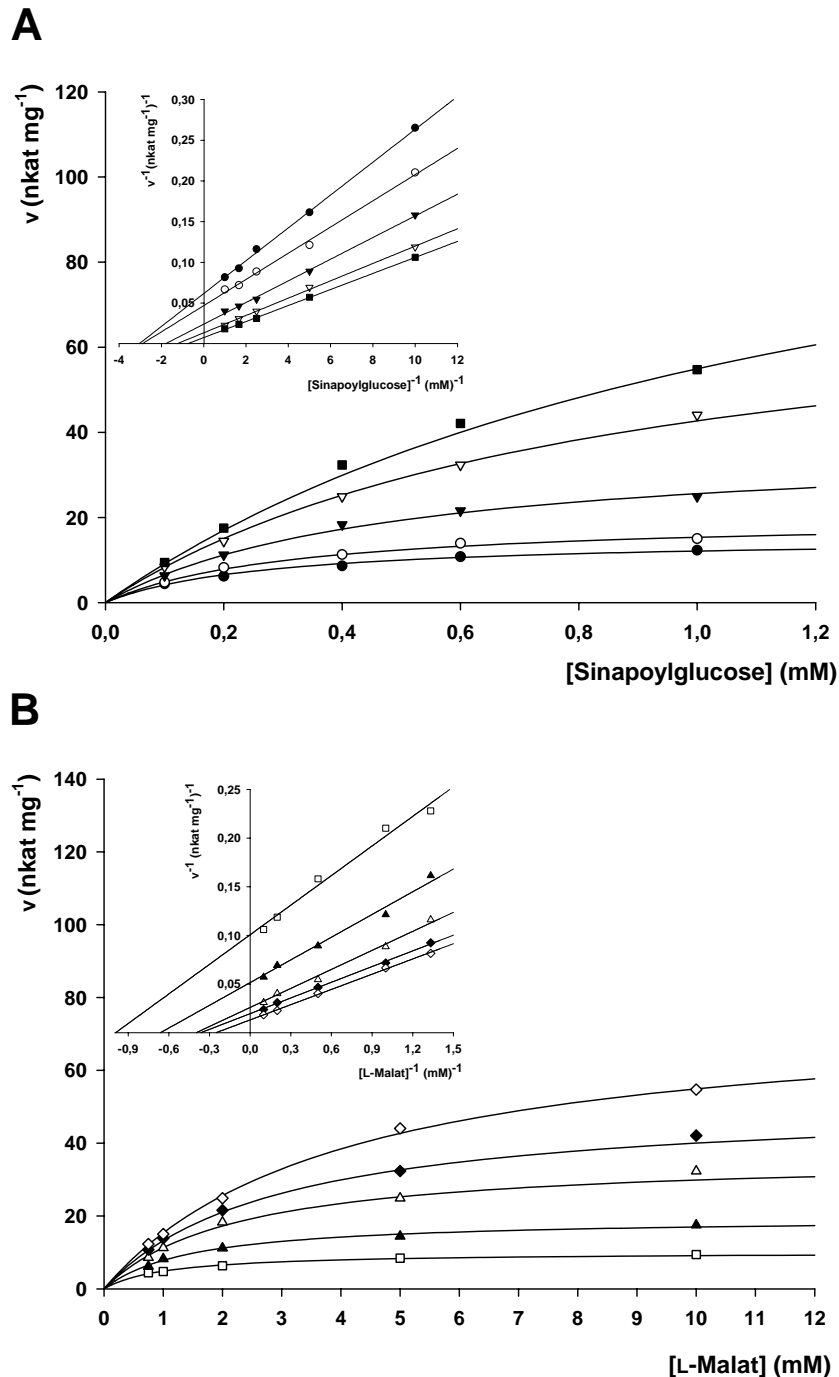
### 3.4.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die *in vitro*-Kinetiken der AtSMT wurden zunächst wie von Gräwe *et al.* (1992) beschrieben in Gegenwart der beiden Substrate Sinapoylglucose und L-Malat bei 30°C in einem Phosphat-Puffer (pH 6,0) gemessen. Die Produktbildung wurde mittels HPLC analysiert und quantifiziert. Allerdings konnten unter diesen Bedingungen keine Michaelis-Menten-Kinetiken über den gesamten Konzentrationsbereich der Substrate aufgenommen werden, da die *v/s*-Kurven einen bi-phasischen Charakter aufwiesen (siehe Appendix Abb. A2). Untersuchungen ergaben, dass für den Erhalt einer Michaelis-Menten-Kinetik der Wechsel zu einem MES-Puffer-System (pH 6,0) notwendig war (Abb. 3.10). Zusätzlich wurde in dem Reaktionsgemisch eine DMSO-Konzentration von 5% (v/v) eingestellt, um die Präzipitation des Substrats Sinapoylglucose bzw. des Produkts Sinapoylmalat zu verhindern. Vorversuche hatten ergeben, dass in einem Assay mit 1mM Sinapoylglucose und 10 mM L-Malat sowie 0, 1, 3, 5 und 8% (v/v) DMSO die SMT-Aktivität bei allen getesteten DMSO-Konzentration identisch war und keinen Einfluss auf die Aktivität der SMT besaß. Um *steady state*-Bedingungen zu gewährleisten, wurde die Reaktion nach zwei, vier und sechs Minuten abgestoppt. Versuche zur Produkthemmung mit Glucose und Sinapoylmalat zeigten, dass eine Hemmung vernachlässigbar war, wenn die beiden Substrate in Sättigung vorlagen. Ein sehr geringer Aktivitätsrückgang (< 5%) konnte beobachtet werden, wenn beide Substrate in Konzentrationen der entsprechenden  $K_M$ -Bereiche vorlagen (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen war die Hemmung jedoch zu gering, um einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Zeitlinearität der Produktbildung in dem gemessenen Zeitintervall auszuüben.

### 3.4.3 Der Reaktionsmechanismus der AtSMT

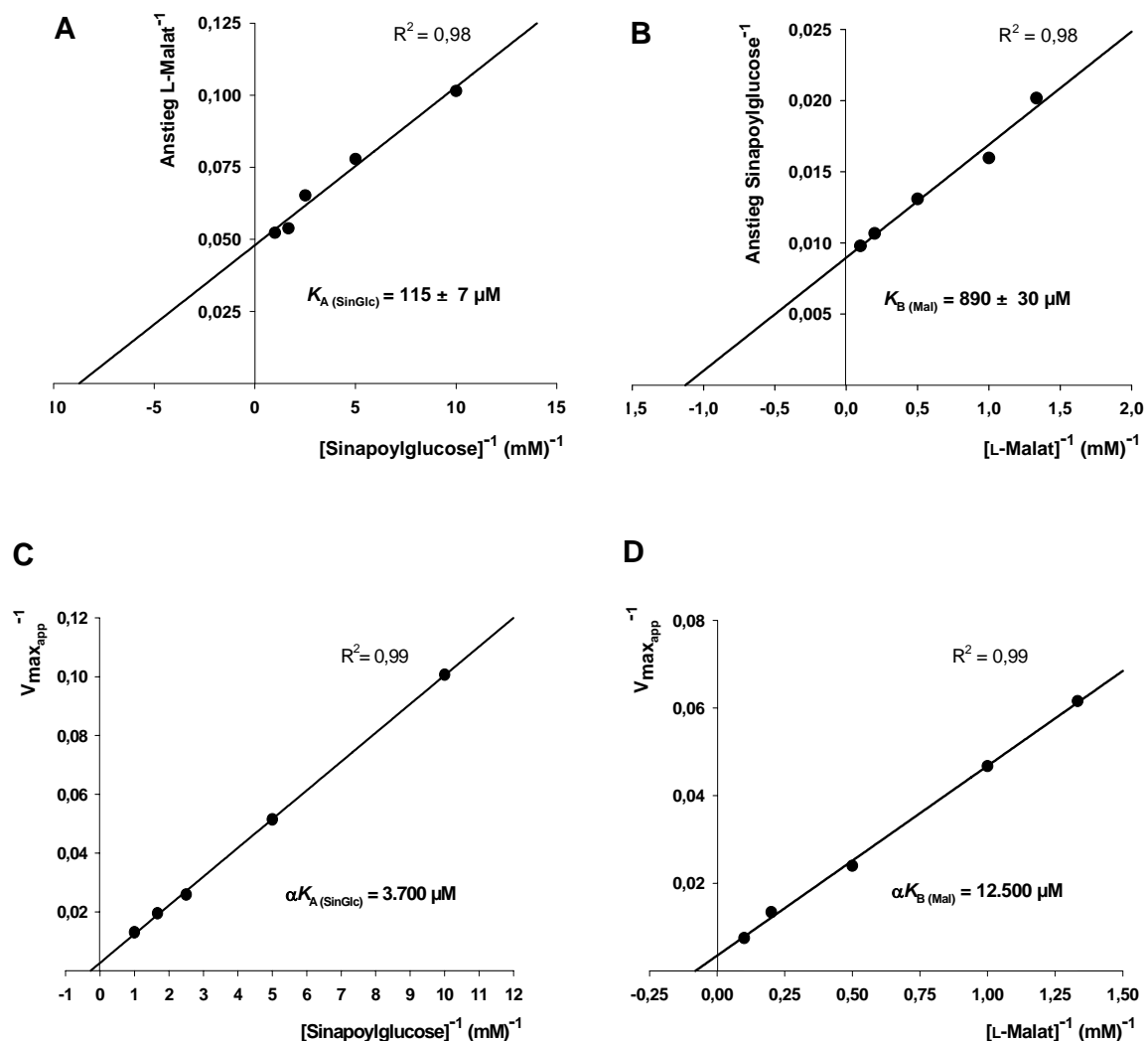
Zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten der AtSMT-Reaktion wurde die Bildung von Sinapoylmalat in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen quantifiziert. Dies erfolgte bei fünf verschiedenen Konzentrationen, wobei die Konzentration des jeweiligen zweiten Substrats konstant gehalten wurde (Abb. 3.10). In der Auftragung nach Lineweaver und Burk (Abb. 3.10 Einfügungen) ist ersichtlich, dass sich die Graphen schneiden und nicht parallel sind. Der Schnittpunkt der Graphen liegt nicht auf der Ordinate und daraus folgt, dass die Maximalgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen nicht konstant ist. Somit weisen die Daten auf einen sequenziellen Zufallsmechanismus (*random sequential bi-bi*) hin (Schellenberger, 1989). Die Dissoziationskonstanten  $K_{A(\text{Singlc})}$  und  $K_{B(\text{Mal})}$  konnten mit Hilfe der Auftragung

nach Florini und Vestling (1957) bestimmt werden. Sie betragen für Sinapoylglucose  $115 \pm 7 \mu\text{M}$  und für L-Malat  $890 \pm 30 \mu\text{M}$  (Abb. 3.11 A & B). Die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}$ ) beträgt  $2 \text{ s}^{-1}$ .



**Abb. 3.10** v/s-Plots der SMT Reaktion und Lineweaver-Burk-Plots (Einfügung). Enzymaktivität in Abhängigkeit der Sinapoylglucose-Konzentration in Gegenwart von 0,75mM (●), 1mM (○), 2mM (▼), 5mM (▽) und 10mM (■) L-Malat in (A) und in Abhängigkeit der L-Malat-Konzentration in Gegenwart von 0,1mM (□), 0,2mM (▲), 0,4mM (△), 0,6mM (◆) und 1mM (◇) Sinapoylglucose in (B).

Die Konstanten für die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes  $\alpha K$  wurden durch Berechnung des Schnittpunkts der Abszisse der reziproken Auftragung aus den apparenten Maximalgeschwindigkeiten gegen die reziproken Substratkonzentrationen ermittelt. Sie betragen für die Dissoziation der Sinapoylglucose ( $\alpha K_{A(\text{SinGlc})}$ )  $3.700 \mu\text{M}$  und für L-Malat ( $\alpha K_{B(\text{Mal})}$ )  $12.500 \mu\text{M}$  (Abb. 3.11 C & D). Alle bestimmten kinetischen Konstanten sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Diese Werte sind mit denen der SMT aus *R. sativus* vergleichbar (Gräwe *et al.*, 1992). Allerdings konnte im Gegensatz zur SMT aus *R. sativus* für die AtSMT, selbst bei L-Malat-Konzentrationen größer als der 100-fache  $K_M$ -Wert, keine Substratüberschusshemmung gefunden werden.



**Abb. 3.11** Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_{A(\text{SinGlc})}$  für Sinapoylglucose (A) und  $K_{B(\text{Mal})}$  für L-Malat (B) mittels Florini-Vestling-Plots. Die Bestimmung der Ternär-Komplex-Dissoziationskonstanten  $\alpha K_{A(\text{SinGlc})}$  für Sinapoylglucose (C) und  $\alpha K_{B(\text{Mal})}$  für L-Malat (D) erfolgte mittels der reziproken Auftragung der apparenten Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\text{max,app}}$ ) gegen die reziproke Substratkonzentration.

**Tab. 3.4** Kinetische Konstanten der rekombinanten AtSMT mit den Substraten Sinapoylglucose und L-Malat

Substrat	$K$ ( $\mu\text{M}$ )	$\alpha K$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}/K$ ( $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
Sinapoylglucose	$115 \pm 7$	$3.700^{\text{a}}$	3.200	15
L-Malat	$890 \pm 30$	$12.500^{\text{a}}$	420	2

<sup>a</sup>Standardabweichung <  $\pm 1\%$

### 3.4.4 Akzeptor-Spezifität der AtSMT

Bisherige Untersuchungen zur Substratspezifität der SMT konzentrierten sich hauptsächlich auf die Donorspezifität (Gräwe *et al.*, 1992). Aus den Analysen der verschiedenen SMT-Sequenzvarianten (vgl. 3.3.4) geht hervor, dass Aminosäurereste, die an der Erkennung der Carboxylgruppen des L-Malats beteiligt sind, für die SMT-Aktivität eine entscheidende Rolle spielen. Um den Einfluss der Carboxylgruppen des Acylakzeptors genauer zu untersuchen, wurde die AtSMT-Aktivität gegenüber (*S*)-2-Hydroxybutyrat sowie (*R*)-3-Hydroxybutyrat getestet. Im Vergleich zu L-Malat besitzen diese Verbindungen nur eine Carboxylgruppe, wobei die Konformation der reaktiven Hydroxylgruppe unverändert ist (Tab. 3.5). Es konnte für diese beiden L-Malat strukturverwandten Verbindungen, selbst bei einer Inkubationszeit von 1 h, keine SMT-Aktivität nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass beide Strukturen keine geeigneten Acylakzeptoren darstellen. Weiterhin wurden Inhibitionsversuche mit verschiedenen Verbindungen, die eine Strukturähnlichkeit zu L-Malat aufweisen, durchgeführt.

Dazu wurden dem Standardreaktionsgemisch für den SMT-Assay (1 mM Sinapoylglucose, 10 mM L-Malat) potenzielle Inhibitoren in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt (Tab. 3.5). Die Anwesenheit der beiden L-Malat strukturverwandten Verbindungen (*S*)-2-Hydroxybutyrat und (*R*)-3-Hydroxybutyrat reduzierten die SMT-Aktivität lediglich um etwa 12%. Dies deutet darauf hin, dass beide Substanzen die SMT-Aktivität höchstwahrscheinlich kompetitiv hemmen, obwohl sie nicht als Acylakzeptor fungieren können. Einen ähnlichen Einfluss auf die SMT-Aktivität hatte Glutarat, das im Vergleich zu L-Malat eine um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe verlängerte Kohlenstoffkette besitzt, jedoch keine reaktive Hydroxylgruppe trägt. Die stärkste Reduktion der SMT-Aktivität wurde mit 21% durch Succinat hervorgerufen, das sich von L-Malat nur durch das Fehlen der Hydroxylgruppe unterscheidet.

Ein Vorversuch zeigte, dass die AtSMT, wie auch die SMT aus *R. sativus* (Gräwe *et al.*, 1992), das D-Malat-Isomer nicht als Acylakzeptor verwendet (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise ist die AtSMT-Aktivitätshemmung des Isomers mit einer Reduktion von 7% am geringsten (Tab. 3.5).



**Tab. 3.5** Kompetitive Hemmversuche mit potenziellen Inhibitoren der AtSMT. Die relativen SMT-Aktivitäten sind in % ( $\pm$  Standardabweichung) angegeben und beziehen sich auf die Kontrollreaktion ohne Inhibitor (100% = 54,7 nkat·mg<sup>-1</sup>).

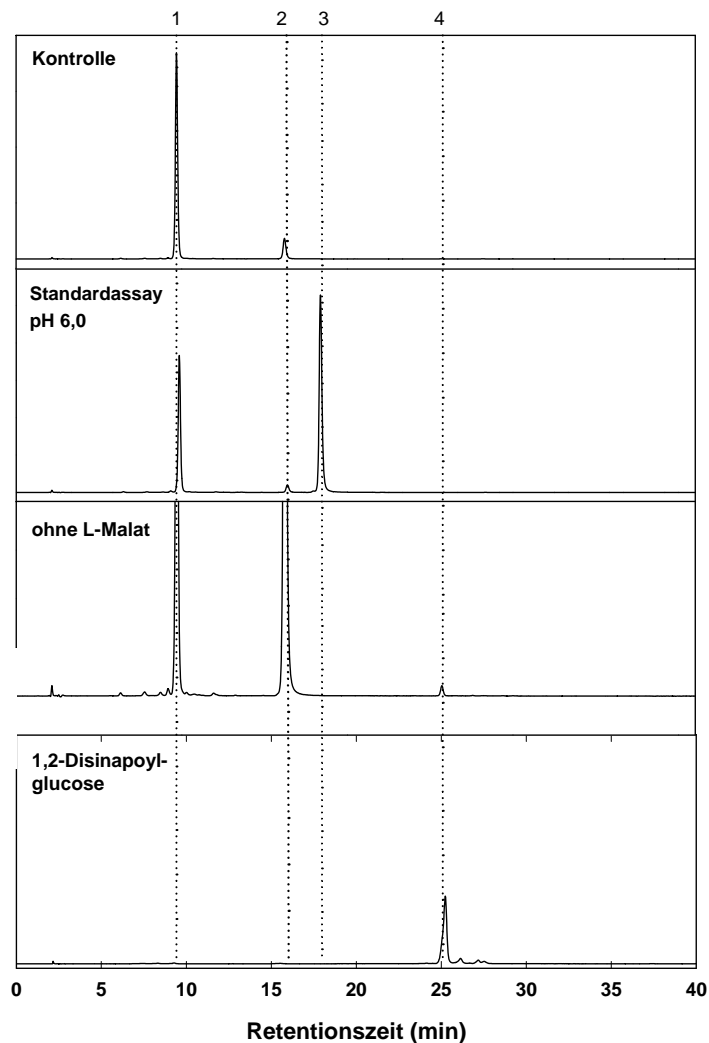
Substrat	Inhibitor		Aktivität (%)
	D-(+)-Malat		93 $\pm$ 2
L-(-)-Malat	( <i>S</i> )-2-Hydroxybutyrat		88 $\pm$ 0,1
	( <i>R</i> )-3-Hydroxybutyrat		87 $\pm$ 1
	Succinat		79 $\pm$ 0,2
	Glutarat		85 $\pm$ 0,5

### 3.4.5 Weitere enzymatische Aktivitäten der AtSMT

In SMT-Assays, in denen lediglich Sinapoylglucose als Substrat vorlag, konnte mittels HPLC ein weniger polares Produkt als Sinapoylmalat detektiert werden, das die charakteristischen Absorptionseigenschaften von Sinapinsäure-Konjugaten aufwies. Die Co-Chromatographie mit entsprechenden Standards der Sinapinsäureester (Baumert *et al.*, 2005) lieferte einen ersten Hinweis, dass es sich bei dieser Verbindung um 1,2-Disinapoylglucose handeln könnte. LC-ESI MS/MS Analysen des Reaktionsgemischs bestätigten diese Annahme (Appendix Abb. A3). Das negative Ionen ESI Massespektrum von Sinapat zeigte ein [M-H]<sup>-</sup> Ion bei einer Massezahl von  $m/z$  223, sowie Schlüsselionen bei  $m/z$  208 ([M-H-Me]<sup>-</sup>), 193 ([M-H-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>), 179 ([M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>) als auch das Basispeakion bei  $m/z$  164 ([M-H-CO<sub>2</sub>-Me]<sup>-</sup>). Während Sinapoylglucose ([M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  385) einen Verlust von 162 Masseinheiten aufzeigt (Hexoserest) und somit ein Ion bei  $m/z$  223 ([Sinapat-H]<sup>-</sup>) und das Basispeakion bei  $m/z$  205, ist das ESI-CID Massespektrum von 1,2-Disinapoylglucose ([M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  591) charakteristisch für die Schlüsselionen bei  $m/z$  367 ([M-H-Sinapat]<sup>-</sup>) und 223.

Somit ist die SMT in der Lage, die Disproportionierung zweier Sinapoylglucose Moleküle in Abwesenheit anderer Acylakzeptoren mit einer Aktivität von 30 pkat·mg<sup>-1</sup> zu katalysieren (Tab. 3.6). Neben der Entstehung von 1,2-Disinapoylglucose konnte in denselben Assays eine deutlich erhöhte Bildung von Sinapinsäure beobachtet werden (Abb. 3.12 & Abb. 3.13), was einer Hydrolyseaktivität der SMT von etwa

2.300 pkat·mg<sup>-1</sup> entspricht (Abb. 3.12). In Kontrollreaktionen mit hitzedenaturierter SMT konnte die Bildung von 1,2-Disinapoylglucose nicht beobachtet werden.

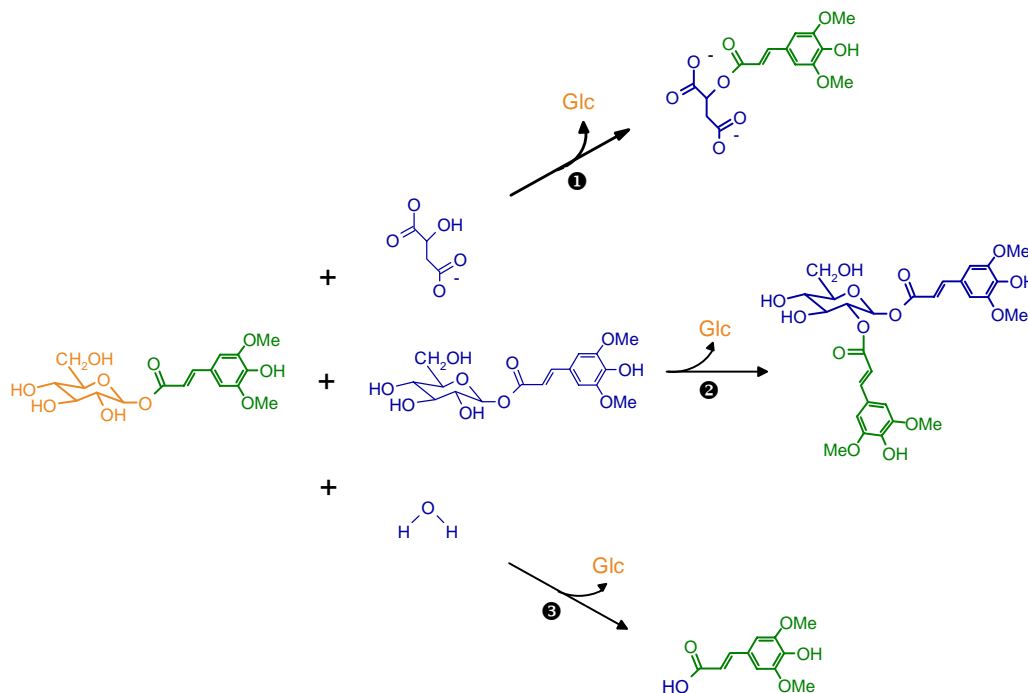


**Abb. 3.12** HPLC-Analyse der SMT-Aktivitäten zur Bildung von Sinapat (2), Sinapoylmalat (3) und 1,2-Disinapoylglucose (4) in Assays mit 1mM Sinapoylglucose (1) in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM L-Malat bei pH 6,0. In der Kontrollreaktion wurde die SMT 10 min bei 95°C inaktiviert. Die Standardsubstanz 1,2-Disinapoylglucose wurde von Dr. A. Baumert isoliert (Baumert *et al.*, 2005).

**Tab. 3.6** SMT-Aktivitäten für die Bildung von Sinapoylmalat, Sinapat und 1,2-Disinapoylglucose (nkat·mg<sup>-1</sup>) bei pH 6,0 und 8,0.

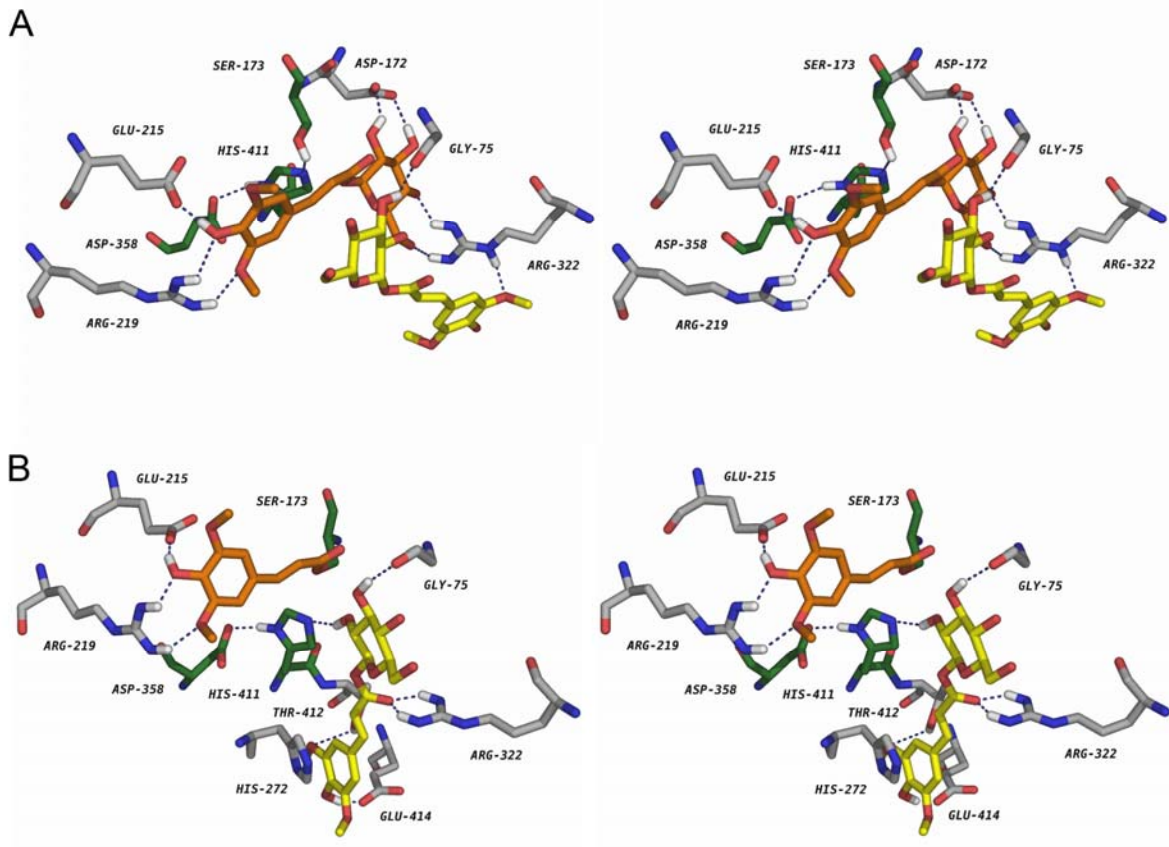
Substrat		Produkt		
Sinapoylglucose	L-Malat	Sinapoylmalat	Sinapinsäure	1,2-Disinapoylglucose
(pH 6,0)				
+	+	23.000 ± 130	190 ± 40	n.d.
+	-	-	2.300 ± 20	30 ± 4
(pH 8,0)				
+	+	190 ± 10	1.900 ± 5	170 ± 4
+	-	-	1.900 ± 40	190 ± 1

Darüber hinaus wurde ein Assay bei pH 8,0 durchgeführt, das pH-Optimum der SST aus *Raphanus sativus* (Dahlbender und Strack, 1986). Die HPLC-Analyse dieses Reaktionsgemischs ergab gegenüber dem bei pH 6,0 eine um den Faktor 130 verringerte Konzentration von Sinapoylmalat, während die Bildung von Sinapinsäure und 1,2-Disinapoylglucose gefördert war. Die Hydrolyseaktivität der AtSMT war bei pH 8,0 um den Faktor 10 auf  $1.900 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  angestiegen, während die Disproportionierungsreaktion bei  $170 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  lag. Bei pH 8,0 war für die Anwesenheit von L-Malat im Reaktionsgemisch kein Einfluss auf die Disproportionierung oder die Hydrolyse zu beobachten (Tab. 3.6).



**Abb. 3.13** Reaktionen, die durch die AtSMT katalysiert werden. Die Primäraktivität der AtSMT unter Standardbedingungen ist die Bildung von Sinapoylmalat (❶). In Abwesenheit von L-Malat oder unter alkalischen Bedingungen katalysiert die AtSMT die Bildung von 1,2-Disinapoylglucose (❷) und hydrolysiert Sinapoylglucose zu Sinapinsäure (❸). Grün: Acyldonor; Blau: Acylakzeptor; Orange: Glucose des Acyldonors.

Aufgrund der unerwarteten Bildung von 1,2-Disinapoylglucose wurden mit dem erarbeiteten AtSMT-Strukturmodell weitere Liganden-Docking-Studien durchgeführt. Dabei wurde der Acylakzeptor L-Malat durch ein weiteres Molekül Sinapoylglucose im aktiven Zentrum der AtSMT ersetzt (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14** Stereoabbildungen ausgewählter Aminosäurereste, die an der Substratbindung bei der Disproportionierungsreaktion beteiligt sind. Die Reste der katalytischen Triade (Ser173, His411, Asp358) sind grün markiert. Sinapoylglucose als Acyldonator ist orange, als Acylakzeptor gelb eingefärbt. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. (A) Aktives Zentrum mit den beiden gebundenen Sinapoylglucose-Molekülen. (B) Acylenzym-Komplex; das zweite Molekül Sinapoylglucose (gelb) wird durch die Abstraktion eines Protons durch His411 aktiviert und greift daraufhin das Sinapoylseryl-Enzym an, wobei das Produkt 1,2-Disinapoylglucose entsteht. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).

Überraschenderweise waren durch die Bindung eines weiteren Moleküls Sinapoylglucose keine merklichen Unterschiede im Vergleich zur Enzymstruktur mit L-Malat festzustellen. Die Bindung des Acyldonors scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Eine Stabilisierung des Akzeptormoleküls Sinapoylglucose ist durch Wasserstoffbrücken zwischen Gly75 und der C3-Hydroxylgruppe des Glucoserests sowie zwischen Arg322 und der C3-Methoxygruppe des Sinapoylrests möglich. Nach der Bildung des Acylenzym-Komplexes kann das zweite Molekül Sinapoylglucose aufgrund des freigewordenen Raums leicht seine Position ändern und eine Stabilisierung durch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen zwischen dem hydrophoben Benzyl- und dem Imidazolring von His272 ermöglicht werden. Des Weiteren sind Wasserstoffbrücken zwischen der Methoxygruppe und der Hydroxylgruppe des Sinapoylrests und Thr412 sowie zwischen dem Carbonylkohlenstoff und Arg322 möglich. Der Glucoserest kann durch eine Wasserstoffbrücke mit Gly75 fixiert werden, wobei diese Ausrichtung es dem katalytischen His411 gestattet, ein

Proton von der C2-Hydroxylgruppe zu abstrahieren. Somit ist das aktivierte Akzeptor-Molekül Sinapoylglucose in einer perfekten Position, um den Acylenzym-Komplex (Sinapoylseryl-SMT) anzugreifen und die Bildung des Produkts 1,2-Disinapoylglucose zu ermöglichen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Optimierung eines heterologen Expressionssystems für die AtSMT

Die Expression der AtSMT in der Pflanze ist im Vergleich zu einem heterologen Expressionssystem gering und somit die Reinigung der SMT bis zur Homogenität mit großen Verlusten an SMT-Protein verbunden. Um eine umfangreiche Charakterisierung der AtSMT zu ermöglichen, sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit ein heterologes Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter AtSMT verwendet werden. Die von Lehfeldt *et al.* (2000) beschriebene Expression der *AtSMT* als lösliches Protein in *E. coli* konnte allerdings nicht reproduziert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die im Strukturmodell der AtSMT vorausgesagten drei Disulfidbrücken sein, die in zytosolischer Expression in dem prokaryotischen Wirt nicht ausgebildet werden können. Die AtSMT wird in Arabidopsis durch co-translationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum geschleust. Nach Abspaltung der Signalsequenz, sowie der korrekten Proteinfaltung und Ausbildung der Disulfidbrücken wird die SMT in die Zentralvakuole weitertransportiert. Das Vorkommen der AtSMT in der Vakuole konnte in früheren Arbeiten immunohistochemisch belegt werden (Hause *et al.*, 2002). Somit benötigt die Expression der *AtSMT* ein eukaryotisches Expressionssystem, um posttranslationale Protein-Prozessierungen, wie die Ausbildung von Disulfidbrücken, zu gewährleisten.

Die Expression in Sf9 Insektenzellen lieferte zwar enzymatisch aktives AtSMT-Protein, allerdings ist das Übertragen auf größere Ansätze nur bedingt möglich. Aus diesem Grund wurde ein Expressionssystem in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zur Herstellung der AtSMT optimiert. Frühere Untersuchungen demonstrierten, dass sich *S. cerevisiae* als Wirtsorganismus für die Herstellung Serin-Carboxypeptidase-ähnlicher Enzyme sehr gut eignet (Li und Steffens, 2000; Nielsen *et al.*, 1990; Shirley und Chapple, 2003). Der Vorteil von *S. cerevisiae* gegenüber anderen Hefe-Expressionssystemen wie z. B. *Pichia pastoris* ist, dass episomale Expressionsplasmide wie der pYES2-Vektor (Invitrogen) zur Verfügung stehen, die im Vergleich zu Insertionsplasmiden eine höhere Gendosis für das zu exprimierende Protein ermöglichen und darüber hinaus die Expression einer größeren Anzahl mutierter Proteinvarianten erleichtern. Zudem kann die heterologe Genexpression in *S. cerevisiae* über nicht-toxische Induktoren wie Galactose

angeschaltet werden. Darüber hinaus sind viele verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme verfügbar, was die Anpassung dieses Wirtssystems an spezifische Erfordernisse erleichtert. Shirley und Chapple (2003) verwendeten die *S. cerevisiae*-Mutante *vp11* (Rothman und Stevens, 1986) für die Expression der verwandten SCT. Diese Mutante sekretiert große Mengen der homologen Serin-Carboxypeptidase Y in das Kulturmedium (Nielsen *et al.*, 1990). Allerdings lieferte die Expression mit nachfolgender Akkumulation des Proteins im Medium nur sehr geringe Mengen an enzymatisch aktiver SCT (Shirley und Chapple, 2003). Um die Schwierigkeiten der Proteinanreicherung aus dem Kulturmedium zu umgehen, wurde die intrazelluläre Akkumulation der AtSMT in *S. cerevisiae* optimiert.

Die anfänglich sehr geringe Expression der AtSMT in *S. cerevisiae* erforderte jedoch die Optimierung einer Vielzahl verschiedener Parameter, wobei durchschnittlich je eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität um den Faktor 3-4 erreicht wurde. So lieferte die Anpassung des Codon-Gebrauchs (*codon usage*) der *SMT*-cDNA eine um den Faktor drei erhöhte SMT-Aktivität und entspricht somit der von Geneart (Regensburg) angegebenen durchschnittlichen Expressionserhöhung um den Faktor zwei bis drei ([http://www.geneart.com/fileadmin/user\\_upload/pdfs/yeast\\_expression.pdf](http://www.geneart.com/fileadmin/user_upload/pdfs/yeast_expression.pdf)).

Die Erhöhung der Kopienzahl des Expressionsvektors gelang mit der Insertion des *leu2-d*-Gens (Beggs, 1978) in das episomale pYES2-Plasmid, welches in den Zellen über einen 2  $\mu$ -Replikationsursprung (*origin*) vermehrt wird und nur etwa 4-8 Kopien je Zelle erreicht (Erhart und Hollenberg, 1983). Leucin-auxotrophe *S. cerevisiae*-Zellen die den konstruierten pDIONYSOS-Vektor tragen, kompensieren unter Leucin-Mangel die geringe *leu2-d*-Expressionsrate durch die Erhöhung der Vektorkopienzahl auf etwa 35 Kopien pro Zelle (Erhart und Hollenberg, 1983), was im Ergebnis zu einer um den Faktor 3,5 verbesserten Expression führte.

Das für die Expression der AtSMT am besten geeignete Signalpeptid, musste empirisch ermittelt werden. Die höchste Aktivität konnte mit der Fusion des Proteinase A-Signalpeptids (PEP4) erzielt werden, gefolgt von der Fusion mit dem Signalpeptid der Dipeptidyl Aminopeptidase B (DPAP B). Diese beiden Signalpeptidfusionen lieferten eine um den Faktor vier bzw. zwei erhöhte Aktivität, verglichen mit dem Konstrukt des Codon-optimierten AtSMT-Signalpeptids. Diese Signalsequenzen sind durch das Vorkommen stark hydrophober Bereiche charakterisiert, die denen des originalen AtSMT-Signalpeptids ähneln. Derartige ausgeprägt hydrophobe Bereiche korrelieren mit einer *signal recognition particle* (SRP) abhängigen Translokation in das ER (Ng *et al.*, 1996). Daraus lässt sich vermuten, dass der SRP-abhängige Transport die AtSMT Expression in *S. cerevisiae* unterstützt. Andererseits lieferte die Expression des Fusionskonstruktes mit dem ebenfalls SRP-abhängigen Signalpeptid der Invertase (SUC2;

Rothe und Lehle, 1998) keine SMT-Aktivität, wohingegen die SRP-unabhängige Signalsequenz der Carboxypeptidase Y (CPY) die funktionelle Expression der AtSMT in ähnlichem Maße förderte wie das DPAP B-Signalpeptid. Diese Befunde weisen darauf hin, dass es in den Signalpeptiden weitere Sequenzinformationen geben muss, die einen Einfluss auf die Expression besitzen.

Eine C-terminale Verlängerung sowohl durch einen 6xHis-tag als auch durch das Anfügen des ER-*retention* Signals HDEL (Monnat *et al.*, 2000) führte zu einer drastisch reduzierten SMT-Aktivität. Der C-Terminus der AtSMT ist nur 22 Aminosäurereste vom katalytisch aktiven Histidin entfernt und so könnte seine Verlängerung durch Wechselwirkungen der zusätzlichen Aminosäuren mit der Proteinoberfläche eine Verschiebung des katalytisch aktiven Histidins zur Folge haben. Dies würde dazu führen, dass der Imidazolring des Histidylrests nicht mehr optimal ausgerichtet ist, um durch Protonenabstraktion das katalytisch aktive Serin bzw. L-Malat zu aktivieren.

Die weitere Anpassung der Sequenz um das Translationsstart-Codon für *S. cerevisiae* (Hamilton *et al.*, 1987) brachte nur eine geringe Erhöhung der SMT-Aktivität um den Faktor 1,6. Dies zeigt jedoch, dass der Sequenzkontext um das Translationsstart-Codon für die Erkennung durch die 40S-Untereinheit des Ribosoms einen Einfluss auf die Expression besitzt.

Die mit Abstand größte Steigerung der Expression, mit einem Faktor von 13, konnte durch die Verwendung des *GAL1*-defizienten Hefestamms erreicht werden. Dieser *S. cerevisiae*-Stamm ist nicht mehr in der Lage den Induktor Galactose zu metabolisieren. Eine Expression von GFP in den selben Zellen lieferte nur eine Steigerung um den Faktor 3 (Stagoj *et al.*, 2006). Somit verdeutlicht diese starke Expressionserhöhung, dass durch die vorgenommenen Optimierungen höchstwahrscheinlich keine Limitationen hinsichtlich der Translation, Faltung bzw. Transport der SMT in das Lumen der Vakuole zu verzeichnen sind. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass durch die weitere Optimierung der Wachstums- und Induktionsbedingungen die Ausbeute an SMT-Protein nochmals gesteigert werden kann. Dies eröffnet für die Zukunft die Möglichkeit, mittels Fermentation ausreichend SMT zu erzeugen und so die Durchführung von Kristallisationsexperimenten zu gestatten, was im Rahmen dieser Arbeit aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war.



## 4.2 Struktur-Funktionsbeziehungen der AtSMT

Ein Modell der AtSMT-Proteinstruktur wurde erstellt, um erste Einblicke in die molekularen Mechanismen zu erhalten, die den evolutionären Funktionswechsel von der hydrolytischen Aktivität der Serin-Carboxypeptidasen zur Acyltransferaseaktivität der SCPL-Acyltransferasen ermöglicht haben. Aufgrund der relativ geringen Sequenzidentität mit der AtSMT wurden die Röntgenkristallstrukturen der AtSMT-homologen Proteine Kex1p (19% Sequenzidentität; Serin-Carboxypeptidase II; Shilton *et al.*, 1996), CPY (25%; Carboxypeptidase Y; Endrizzi *et al.*, 1994) und HPP (28% ; *human protective protein*; Rudenko *et al.*, 1995) als Matrizen für die Modellierung verwendet.

Die Qualität, Stereochemie und Faltung der Modellstruktur wurde mit den Programmen PROCHECK und PROSA II überprüft. Alle getesteten Parameter lagen in den für eine native Faltung erwarteten Bereichen und sind somit ein erstes Indiz für die Richtigkeit der modellierten Proteinstruktur.

Die Modellstruktur der AtSMT zeigt den allgemeinen Aufbau einer  $\alpha/\beta$ -Hydrolase, deren Grundgerüst die Ausbildung einer katalytischen Triade ermöglicht. Die konservierten Aminosäure-Reste der postulierten katalytischen Triade, Ser173, His411 und Asp358, wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese auf ihre katalytische Funktion in der AtSMT überprüft. Die Mutantenvarianten Ser173Ala und His411Ala waren beide inaktiv, wohingegen für die Variante Asp358Ala eine Restaktivität von 20% gefunden wurde. Das fehlende Aspartat hat zwar eine Verringerung des nukleophilen Charakters des His411 zur Folge, dennoch ist das His411 weiterhin in der Lage, ein Proton des Ser173 bzw. L-Malats zu abstrahieren. Ein ähnlicher Effekt wurde für eine entsprechende CPY Mutantenvariante beschrieben (Craik *et al.*, 1987). Zusammen mit dem Befund, dass die Inhibitoren PMSF und DFP, die über kovalente Modifizierung Serylreste inaktivieren, die Aktivität der AtSMT hemmen, weisen diese Ergebnisse eindeutig darauf hin, dass die Aminosäurereste Ser73, His411 und Asp358 das aktive Zentrum in der AtSMT bilden und als katalytische Triade wirken. Da in allen 19 putativen SCPL Acyltransferasen aus Arabidopsis diese Aminosäurereste hinsichtlich ihrer Identität und ihrer Position konserviert sind (Fraser *et al.*, 2005; Milkowski und Strack, 2004), gilt es als sehr wahrscheinlich, dass die Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen das *charge relay*-System der SCPs übernommen haben um damit den Acyltransfer zu katalysieren.

In den SCPs wird die C-terminale Carboxylgruppe durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken (*hydrogen bond network*) erkannt und stabilisiert. In der AtSMT sind vier der fünf Aminosäurereste, die an der Ausbildung dieses Netzwerks beteiligt sind, konserviert. Lediglich das Glutamat in der Sequenzposition unmittelbar vor dem

katalytischen Serin ist in der AtSMT durch ein Aspartat ausgetauscht. Die Modellstruktur offenbart, dass dieses Netzwerk von Wasserstoffbrücken in der AtSMT in Analogie zu den SCPs an der Erkennung der Carboxylgruppe des Substrats, in diesem Fall am C1-Atom von L-Malat, beteiligt ist. In der AtSMT scheint nur das Gly74 nicht an der Ausbildung dieses Netzwerkes beteiligt zu sein. Zusätzlich stabilisieren die Aminosäuren des Wasserstoffbrücken-Netzwerks den Glucoserest des Acyldonors Sinapoylglucose mit drei Wasserstoffbrückenbindungen. Die Mutantenvariante Asn73Ala, in der das Netzwerk nicht mehr ausgebildet werden kann, zeigte eine Restaktivität von 13% im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Die entsprechende Variante des CPY-Enzyms zeigte eine vergleichbare Aktivitätsminderung (Mortensen *et al.*, 1994b), was als ein weiteres Indiz für die Ausbildung eines funktionellen Netzwerks in der AtSMT gewertet werden kann. Auffällig ist in fast allen SCPL-Acyltransferasen die Substitution des Glutamylrests (SCPs) in der Sequenzposition unmittelbar vor dem katalytisch aktiven Serin durch einen Aspartylrest, sowie der Substitution des Alanylrests durch einen Serylrest zwei Aminosäurepositionen nach dem katalytisch aktiven Serin. Somit ist das charakteristische Serin-Peptidasemotiv Gly-Glu-Ser-Tyr-Ala (Derewenda *et al.*, 1992) in den SCPL-Acyltransferasen zu Gly-Asp-Ser-Tyr-Ser verändert (Milkowski und Strack, 2004). Der Aminosäureaustausch zu dem kleineren Aspartat ermöglicht den SCPL-Acyltransferasen wahrscheinlich die Interaktion mit dem größeren Glucoserest des Acyldonors Sinapoylglucose, im Vergleich zu der C-terminalen Carboxylgruppe eines Peptidsubstrats. Um den Einfluss der veränderten Aminosäuren des Serin-Peptidasemotivs auf die SMT-Aktivität zu testen, wurde die Doppelvariante Asp172Glu/Ser175Ala hergestellt. Sie wies nur noch eine Restaktivität von 15% auf. Dies lässt darauf schließen, dass das Aspartat in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem katalytisch aktiven Serylrest ein wesentliches Kennzeichen der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen darstellt (Stehle *et al.*, 2006).

Die Modellstruktur lieferte zudem Hinweise, dass die beiden Reste Glu215 und Arg219 eine wichtige Rolle bei der Erkennung des Acyldonors Sinapoylglucose spielen, indem sie Wasserstoffbrücken zum Sinapoylrest ausbilden können. Um diese Aussage zu verifizieren, wurden die alternativen Acyldonatoren 1-*O*-Feruloyl-, -Kaffeoyl- und -4-Cumaroylglucose (Gräwe *et al.*, 1992) mit Hilfe des Programms GOLD in das aktive Zentrum eingepasst. Die berechneten Interaktionsenergien zeigten eine starke Präferenz hinsichtlich des nativen Substrats Sinapoylglucose und die berechneten Enzym-Ligand Interaktionen der alternativen Acyldonatoren weisen die selbe Reihenfolge wie die experimentell bestimmten Spezifitäten auf (Gräwe *et al.*, 1992). Die Modellstruktur offenbarte, dass die alternativen Hydroxycimtsäure-Donatoren hinsichtlich der Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung zu den Resten Glu215 und Arg219, im Vergleich zu

Sinapoylglucose, deutlich benachteiligt sind. Zudem ist die Übereinstimmung der berechneten Interaktionsenergien der verschiedenen Acyldonatoren mit den gemessenen Substratspezifitäten ein gutes Indiz, dass die beiden identifizierten Aminosäurereste an der Erkennung des Sinapoylrests beteiligt sind.

Weiterhin weisen die Ergebnisse der Modellierung dem Aminosäurerest Arg322 der AtSMT eine Schlüsselrolle bei der Substraterkennung zu. Dieser Rest ermöglicht zwei Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zum Glucoserest des Acyldonors Sinapoylglucose als auch zur C1 Carboxylgruppe des Acylakzeptors L-Malat. Nachdem die Glucose abgespalten ist und das aktive Zentrum verlassen hat, kann durch eine Konformationsänderung des Arg322 das L-Malat zusätzlich durch Wasserstoffbrücken des Asn73 und Asp172 stabilisiert werden. Dies stellt eine Ausrichtung dar, die eine Protonenabstraktion von der C2-Hydroxylgruppe durch das katalytische Histidin favorisiert. Das aktivierte L-Malat kann daraufhin den Acylenzym-Komplex angreifen und spalten. Die große Bedeutung von Arg322 konnte mittels der Mutantenvariante Arg322Glu bestätigt werden. Sie weist nur noch eine enzymatische Restaktivität von 1% auf.

Das Strukturmodell der AtSMT zeigt weiterhin, dass die zwei Aminosäuren His272, Lys268 an der primären Erkennung des Acylakzeptors beteiligt sein könnten. Die Mutantenvarianten His272Glu und Lys268Glu wiesen beide eine verminderte SMT-Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym auf. Die Variante His272Glu zeigte eine um 78% reduzierte Aktivität. Ferner ist die homologe Aminosäureposition von His272 in der CPY (Tyr256) Teil der S2' Bindetasche (Endrizzi *et al.*, 1994), was die Bedeutung dieses Aminosäurerests weiter unterstützt. Lys268 scheint bei der Erkennung von L-Malat eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der Austausch dieses Aminosäurerests durch Glutamat die SMT-Aktivität nur um ein Viertel reduzierte.

Kristallstrukturanalysen offenbarten, dass die Ausbildung der Oxyaniontasche eine wichtige Eigenschaft der SCPs ist, die negative Ladung des Übergangszustandes zu stabilisieren (Whiting und Peticolos, 1994). In der CPY wird die Oxyaniontasche von den Amino-Gruppen der Hauptkette der Aminosäurereste Gly53 und Gly149 ausgebildet (Endrizzi *et al.*, 1994). Aus dem Strukturmodell der AtSMT geht hervor, dass die Oxyaniontasche in diesem Enzym wahrscheinlich durch die Hauptkettenamide von Gly75 und Tyr174 gebildet wird. Ein Sequenzvergleich verdeutlicht, dass Gly75 der AtSMT homolog zu dem Aminosäurerest Gly53 der CPY ist. Der zweite Interaktionspartner, Tyr174, ist jedoch, im Vergleich zur CPY, um zwei Aminosäurepositionen in Richtung des katalytisch aktiven Ser173 verschoben.

Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese und Berechnungen der Interaktionsenergien konnte eine funktionelle Bedeutung der Aminosäurereste bestätigt werden, die durch die Modellstruktur als bedeutend für Substraterkennung und Stabilisierung identifiziert worden waren. Somit wurden erste Einblicke gewonnen, die zum Verständnis der molekularen Abläufe im aktiven Zentrum der AtSMT beitragen. Einen weiteren Hinweis für die funktionelle Bedeutung der identifizierten Aminosäurereste lieferte ein Sequenzvergleich der AtSMT mit den beiden Acyltransferasen 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose-Sinapoyltransferase (SST) und 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -Glucose:Anthocyan-Sinapoyltransferase (SAT), die im Genom von *A. thaliana* mit der SMT in einem Gencluster auf Chromosom 2 lokalisiert sind und ebenfalls Sinapoylglucose als Acyldonor verwenden (Fraser *et al.*, 2007).

At2g22990 (SMT)	20	ASIVKFLPGFEGPLPFELETGYIGIGEEENVQFFYYFIKSENNPKEDPLLIIWLNCGPGCSLGGIIIFENG
At2g23000 (SAT)	22	AAIVKSLPGLEGRLEPFELETGYIGIGEEEDIQFFYYFIKSENNPKEDPLLIIWLNCGPGCSLGGIIIFENG
At2g23010 (SST)	22	GSIVKFLPGFEGPLPFELETGYIGIGEEENVQFFYYFIKSDKNPQEDPLLIIWLNCGPGCSLGGIIIFENG
At2g22970	23	-SIVKFLPGFEGPLPFELETGYIGIGEEENVQFFYYFIKSERNNPKEDPLLIIWLNCGPGCSLGGIIIFENG
At2g22980	23	GSIVKFLPGFEGPLPFELETGYIGIGEEENVQFFYYFIKSEKNPEEDPLLIIWLNCGPGCSLGGIIIFENG
At2g22990 (SMT)	90	PVGLKFEVYNGSAPSLFSTTYSWTKMANIIFLDQPVGSGFSYSKTF-IDKTCGLI SEVKRIHEFLQKWLRSR
At2g23000 (SAT)	92	PVALKSAVYNGSNPSLSTTYSWTKMANIIFLDQPVGSGFSYSRTP-IDKSSDTSEVKRIHEFLQKWLRSR
At2g23010 (SST)	92	PVALKKNKYNGSVPSLVSTTYSWTKMANIIFLDQPVGSGFSYSKTF-IEERTSDTSEVKRIHEFLQKWLRSR
At2g22970	92	PVALKSEVYNGSVP SLVSTTYSWTKMANIIFLDQPVGAGFSYSRAFLIDTPTDTSEVKRIHEFLQKWLRSR
At2g22980	93	PVALKFEVYNGSVP SLVSTTYSWTKMANIIFLDQPVGSGFSYSRTPFLVDKISDTSEVKRIHEFLQKWLRSR
At2g22990 (SMT)	159	HPQYFSNPLVYVGD SYSGMIVPALVQEISQGNVYICCNPPINLQGYVLGNPVTYMDFEQNFRIPIYAHGMSL
At2g23000 (SAT)	161	HPQFFSNPFYVTCDSYSGMIVPALVQEISKGNVYICCKHILNLOQYVVLGNPITYAEHEKRNRIPIFSHGMSL
At2g23010 (SST)	161	HPQFLSNPFYVVGDSYSGMIVPALVHEISKGNVYICCNPPINLQGYVVLGNPITHEFEQNFRIPIYAHGMSL
At2g22970	162	HPQFSSNHFYAGGDSYSGMIVPALVQEISKGNVYICCNPPINLQGYVVLGNPITHEDEDENYRIPFSHGMSL
At2g22980	163	HPQFFSNPFYVVGDSYSGMIVPALVQEISKGNVYICCNPPINLQGYVVLGNPITDTSEQNYQIPYAHGMSL
At2g22990 (SMT)	229	ISDELYEPMKRICNGNYINVDPSNTQCLKLIIEYHKCTAKINIIHHILIPDCDVINVT--SPDCYYYPIYHL
At2g23000 (SAT)	231	ISDELYESLKRICKGNVENVDPNRTKCVRLVEEYHKCTDKINTQCHILIPDCDKKGHGITSPDCYYYPIYFL
At2g23010 (SST)	231	ISDELYESLKRICKGNVFSVDPNKKCKLKLVEEYHKCTDINSHETLIANCDSDNTQHSPPDCYYYPIYHL
At2g22970	231	ISDELYESIREACKGNVENVDPNRTKCLKLVEEYHKCTDKLNEFHILSPDCDT-----ASPCYLYEYFL
At2g22980	228	ISDELYKSMERICGNVENVDSNRTKCVKLIKLYCKGITHKLNKMHILIPDCDI-----TSPDCFLYRYTL
At2g22990 (SMT)	297	IECWANDES VREALHIEKGSKGWARCNRITIPYNEIDIVSSIPYHMNNSISGYRSLIYSGDHDIVPFLA
At2g23000 (SAT)	301	IECWANNERVREALHIVTKGKQWRCNWTIPYDNNIISVVPYHMDNSINGYRSLIYSGDHDITIPFQA
At2g23010 (SST)	301	IECWANNESVREALHVDKGSIGELIRDRGIPYKSDIRSSIPYHMNNSINGYRSLIYSGDHDITIPFQA
At2g22970	296	ISFWANDESVRDALHVNRKRSIGKWERCNVLSKPYNKDIKSSVPHMNSISGYRSLIYSGDHDIVPFLA
At2g22980	293	ITFWANNKSVREALQVKNKGSIGKVVQCNVKNISYNYDIKSSVAVHMNSIDGYRSLIYNGDHDMMVPFLA
At2g22990 (SMT)	366	TQAWIRSLNYSIPIHNRWPWMINQIAGYTRYSNKMTFATIKGGCHTAEYRPNETIFIMFORWISGQPL
At2g23000 (SAT)	370	TQAWIKSLNYSIIDDWRPWIINDQIAGYTRYSNKMTFATVKGGCHTAEYLPNESSIMFORWISGQPL
At2g23010 (SST)	370	TQAWIKSLNYSIIDDWRPWIKQIAGYTRYSNKMTFATVKGGCHTAEYLPNESSIMFORWISGQPL
At2g22970	366	TQAWIKSLNYSIIDDWRPWIIRDQITGYTRYSNKMTFATVKGSCHTAENKPESEFIMFRRWINGQPL
At2g22980	363	TQAWIRSLNYSIIDDWRPWIINDQIAGYTRYSNKMTFATIKGSCHTAEYKKEETISIMFKRWISAQPL

**Abb. 4.1** Multiples Alignment von Aminosäure-Sequenzen des Arabidopsis SCPL-Acyltransferasen-Clusters auf Chromosom 2. Der Sequenzvergleich der AtSMT mit den Sequenzen der SAT und SST (Fraser *et al.*, 2007), sowie der beiden putativen Acyltransferasen, kodiert durch At2g22970 und At2g22980, wurde mittels CLUSTALW unter Verwendung der BLOSUM62 Matrix erstellt (Henikoff und Henikoff, 1992; 1993). Die N-terminalen Signalsequenzen wurden entfernt. Aminosäuren, die in allen Proteinen konserviert vorliegen, sind schwarz hinterlegt, die grau hinterlegten weisen eine Konservierung von mindestens 50% Ähnlichkeit auf. Aminosäurereste, die mit unterschiedlichen Farben hervorgehoben sind, spielen in der Substraterkennung und -stabilisierung der AtSMT eine Rolle: rot, katalytische Triade; grün, Oxyaniontasche; blau, Erkennung des Sinapoylrestes; gelb, Netzwerk aus Wasserstoffbrücken; magenta, primäre L-Malat-Erkennung.

Die identifizierten Aminosäurereste, die die katalytische Triade und das Wasserstoffbrückennetz sowie die Oxyaniontasche ausbilden, sind weitgehend konserviert (Stehle *et al.*, 2008a). Die Reste, die in der SMT für die Erkennung des Acylakzeptors L-Malat verantwortlich sind, unterscheiden sich jedoch in den drei Proteinen am stärksten voneinander (Abb. 4.1). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die anhand des Strukturmodells identifizierten Aminosäurereste eine wesentliche Rolle bei der Katalyse spielen und die Anordnung dieser Reste im aktiven Zentrum der SMT richtig vorhergesagt wurden.

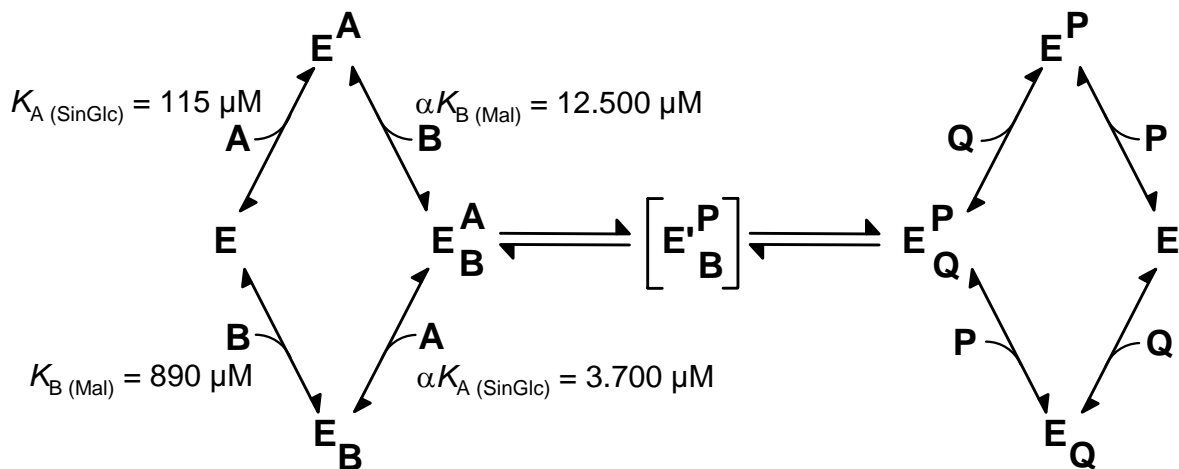
### 4.3 Der Reaktionsmechanismus der AtSMT

#### 4.3.1 Enzymkinetische Charakterisierung der AtSMT

In Serin-Carboxypeptidasen erfolgt die Spaltung der Peptidsubstrate nach einem Ping-Pong-Mechanismus. Kinetische Untersuchungen der SCT von *B. napus* (Vogt *et al.*, 1993) und *A. thaliana* (Shirley und Chapple, 2003) legten die Vermutung nahe, dass diese Enzyme den Reaktionsmechanismus der SCPs übernommen haben. Im Gegensatz hierzu wurde für die SMT aus *R. sativus* ein sequenzieller Zufallsmechanismus vorgeschlagen (Gräwe *et al.*, 1992). Der Ping-Pong-Mechanismus der SCT setzt die Bildung eines Acylenzym-Komplexes voraus, der daraufhin durch den Acylakzeptor Cholin gespalten wird. Dieser Mechanismus erfordert den Ausschluss von Wasser im aktiven Zentrum, um den Acylenzym-Komplex vor hydrolytischer Spaltung zu schützen. Die bisherigen Untersuchungen lieferten jedoch keine Erklärung, die den molekularen Mechanismus für den Ausschluss von Wasser erklären könnten. Aufschluss über die Mechanismen wie die sinapoylierte-SCT den Angriff eines Moleküls Wasser verhindert kann letzten Endes nur die Röntgenkristallstruktur der SCT liefern.

Voruntersuchungen ergaben, dass das verwendete Puffersystem für den Verlauf einer Michaelis-Menten Kinetik essentiell war. In einem Phosphatpuffer-basierenden Assay, wie von Gräwe *et al.*, (1992) beschrieben, wiesen die  $v/s$ -Kurven einen bi-phasischen Charakter auf. Der Wechsel zu einem MES-Puffersystem, lieferte hingegen hyperbole Michaelis-Menten Kurven. Ein möglicher Grund für die bi-phasigen Kurven in Anwesenheit von Phosphationen könnte deren Bindung bei niedrigen Substratkonzentrationen im aktiven Zentrum der SMT und der vollständigen Verdrängung bei höheren Substratkonzentrationen sein. Die Kinetik der AtSMT wurde infolgedessen in einem MES-Puffersystem aufgenommen, was im Gegensatz zur *R. sativus*-SMT, bei der aufgrund der bi-phasischen Kurven der je zwei kinetischen

Konstanten bestimmten wurden (Gräwe *et al.*, 1992), in jeweils nur einer Michaelis-Menten-Konstante resultierte.



**Abb. 4.2** Reaktionsschema der SMT. **E**, Enzym; **A**, Acylgruppen-Donor (Sinapoylglucose); **B**, Acylgruppen-Akzeptor als Nukleophil (L-Malat); **P**, Freigesetztes Produkt ( $\beta$ -Glucose); **Q**, Freigesetztes Produkt (Sinapoylmalat); **EAB**, Enzym-Donor-Akzeptor-Komplex; **E'**, putativer Acylenzym-Komplex; **E'PB**, putativer Acylenzym-Akzeptor-Komplex;  $K_A(\text{SinGlc})$  Dissoziationskonstante für Sinapoylglucose und  $K_B(\text{Mal})$  für L-Malat;  $\alpha K_A(\text{SinGlc})$  Dissoziationskonstante aus dem Ternärkomplex für Sinapoylglucose und  $\alpha K_B(\text{Mal})$  für L-Malat.

Die kinetischen Daten der AtSMT weisen auf einen sequenziellen Zufallsmechanismus hin. Die erhaltenen Graphen in der Lineweaver-Burk-Auftragung sind nicht parallel, sondern besitzen einen gemeinsamen Schnittpunkt im 3. Quadranten. Da sich der Schnittpunkt nicht auf der Ordinate befindet und demzufolge bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen unterschiedliche apparente Maximalgeschwindigkeiten zu beobachten sind, kann ein sequenziell geordneter Mechanismus ausgeschlossen werden (Schellenberger, 1989). Darüber hinaus zeigten Auswertungen der Daten mit dem Enzymkinetik-Tool der SigmaPlot-Software, bei einem vorgegebenen sequenziell geordneten Mechanismus, dass die gemessenen Datenpunkte nicht mit den angepassten Geraden übereinstimmen (vgl. Appendix Abb. A4 C & D). Im Gegensatz dazu stimmen die Messwerte sehr gut mit einem vorgegebenen sequenziellen Zufallsmechanismus überein (vgl. Appendix Abb. A4 A & B). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der enzymkinetischen Charakterisierung der SMT aus *R. sativus* (Gräwe *et al.*, 1992).

Die Produkthemmversuche zeigten, dass beide Produkte nur einen sehr geringen Einfluss auf die SMT-Aktivität besitzen. Der Einfluss auf die Zeitlinearität der Produkt/Zeit-Kurven durch eine Hemmung von weniger als 5% ist zu gering, damit die sich schneidenden Kurven aufgrund von Produkthemmungen zustande kommen könnten. Somit kann ein Ping-Pong-Mechanismus ausgeschlossen werden.

Das Verhältnis von  $K_{A(\text{SinGlc})} / \alpha K_{A(\text{SinGlc})}$  zu  $K_{B(\text{Mal})} / \alpha K_{B(\text{Mal})}$  sollte bei einem sequenziellen Zufallsmechanismus identisch sein, offenbart aber im Falle der AtSMT eine leichte Präferenz gegenüber Sinapoylglucose (Abb. 4.2). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte der partiell deprotonierte Zustand des L-Malats liefern. Unter den verwendeten Assaybedingungen kann die Interaktion der SMT mit L-Malat beeinträchtigt sein, da beide Carboxylgruppen weitestgehend deprotoniert sind. Bei pH 6,0 ist die C4-Carboxylgruppe des Acylakzeptors L-Malat ( $pK_a$  3,46) überwiegend deprotoniert, die C1-Carboxylgruppe ( $pK_a$  5,1) liegt zu mehr als 50% deprotoniert vor. Die SMT-Modellstruktur sowie die Analyse der mutierten Enzymvarianten (siehe Abb. 3.7 & Abb. 3.8) und der Substratspezifität (siehe Tab. 3.5) zeigten, dass die Interaktion der AtSMT mit der protonierten C1-Carboxylgruppe des L-Malats essentiell für die Substraterkennung ist (Stehle *et al.*, 2006). Die Anwesenheit von deprotonierten L-Malat-Molekülen verringert die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von protonierten L-Malat-Molekülen und könnte somit der Grund für die aus den kinetischen Daten ableitbare, scheinbar bevorzugte Bindung von Sinapoylglucose sein.

Eine Substrataktivierung der AtSMT durch Sinapoylglucose, sowie eine Substratüberschusshemmung durch L-Malat, wie für die SMT aus *R. sativus* beschrieben (Gräwe *et al.*, 1992), konnten für die AtSMT nicht bestätigt werden.

Das SMT-Strukturmodell weist daraufhin, dass für die Substratspezifität des Acylakzeptor L-Malats die Erkennung der Carboxylgruppen essentiell ist (Stehle *et al.*, 2006). Dies konnte durch Enzymassays bestätigt werden, in denen das L-Malat durch die beiden strukturverwandten L-Malat-Verbindungen (*S*)-2-Hydroxybutyrat und (*R*)-3-Hydroxybutyrat ersetzt wurde. Beide Verbindungen unterscheiden sich von L-Malat lediglich durch das Fehlen je einer Carboxylgruppe. Mit keinem dieser Substrate konnte in Enzymassays Produktbildung nachgewiesen werden. Inhibitorstudien mit diesen beiden Verbindungen zeigten eine schwache Beeinträchtigung der SMT-Aktivität. Das lässt ebenfalls darauf schließen, dass das Fehlen einer Carboxylgruppe die Interaktion mit dem Enzym deutlich herabsetzt. Diese Daten unterstützen die funktionellen Aussagen des AtSMT-Strukturmodells sowie die Aussagen aus den Analysen der mutierten AtSMT-Varianten. Auch sie belegen, dass Substitutionen der Aminosäuren Arg322 und Asn73, welche hauptsächlich an der L-Malat Erkennung beteiligt sind, eine starke Reduktion der SMT-Aktivität zu Folge hatten (vgl. Abb. 3.7).

Hemmversuche mit weiteren L-Malat-ähnlichen Verbindungen ergaben, dass die stärkste Inhibierung der SMT-Aktivität durch Succinat erfolgte. Succinat unterscheidet sich von L-Malat lediglich durch die Abwesenheit der reaktiven Hydroxylgruppe. Auch mit diesem Substrat war jedoch die zu beobachtende Abnahme der AtSMT-Aktivität mit 20% gering. Die geringste Inhibierung konnte mit dem D-Malat-Isomer verzeichnet werden.

Somit scheint die optimale Erkennung des Acylakzeptors neben den beiden Carboxylgruppen auch die Hydroxylgruppe und deren räumliche Orientierung von entscheidender Bedeutung zu sein.

#### 4.3.2 Nebenaktivitäten der AtSMT

Die bisherigen Untersuchungen zeigten eine strikte Acyl-Akzeptorspezifität der AtSMT gegenüber L-Malat. Interessanterweise bildet die AtSMT aber in Abwesenheit von L-Malat 1,2-Disinapoylglucose. Zudem katalysiert sie zugleich die hydrolytische Spaltung von Sinapoylglucose unter Bildung von freier Sinapinsäure. Diese beiden Aktivitäten konnten im alkalischen Milieu deutlich verstärkt werden. Um die Disproportionierungsreaktion erklären zu können, wurde versucht, ein zweites Sinapoylglucose-Molekül in das aktive Zentrum des SMT-Strukturmodells einzupassen. Dies war in dem bereits errechneten Strukturmodell ohne Veränderung des Proteinrückgrats möglich. Zudem zeigt das Modell, dass die Bindung der Akzeptor-Sinapoylglucose nur über zwei Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt (Gly75 und Arg322).

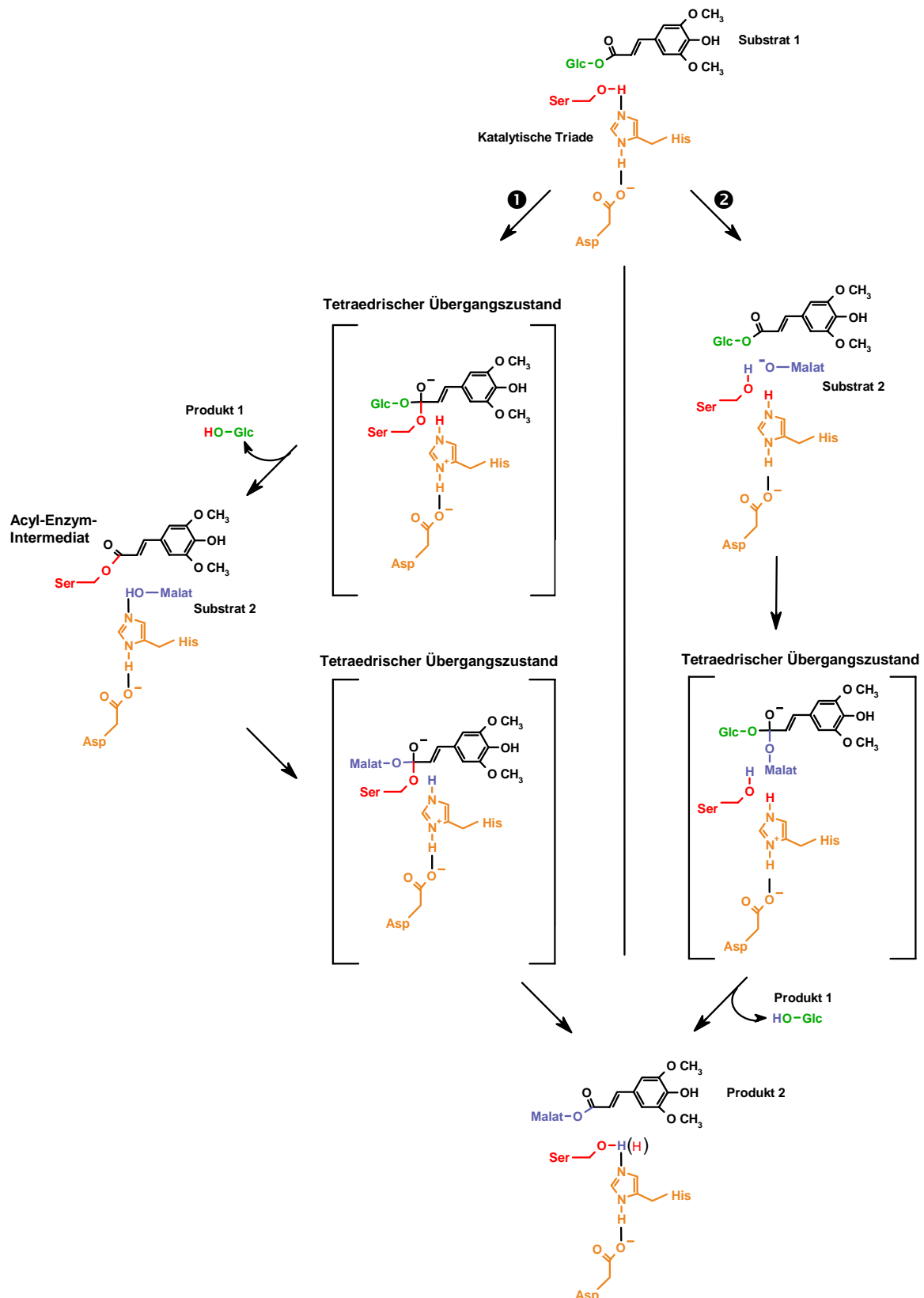
Nachdem die Glucose des Sinapoylglucose-Donors abgespalten ist, kann das Akzeptor-Molekül aufgrund des freigewordenen Raums leicht seine Position ändern und wird daraufhin durch vier Wasserstoffbrücken in Position gehalten, wobei Arg322 zwei Wasserstoffbrücken zu dem Carbonylsauerstoff ausbilden kann. Infolgedessen kann das katalytisch aktive His411 die C2-Hydroxylgruppe des Glucoserests des Acylakzeptors aktivieren und diese danach den Acylenzym-Komplex angreifen und spalten. Die relativ schwache Bindung der zweiten Sinapoylglucose im Vergleich zu L-Malat könnte ein Grund sein, warum bei Anwesenheit von L-Malat (pH 6,0) keine 1,2-Disinapoylglucose-Bildung zu beobachten ist. Eine Schwächung der L-Malat Bindung wird aber bei pH 8,0 erreicht, dem pH Optimum der SST aus *R. sativus* (Dahlbender und Strack, 1986). Unter diesen alkalischen Bedingungen konnte neben der Bildung von 1,2-Disinapoylglucose und der Freisetzung von Sinapinsäure auch die Bildung von Sinapoylmalat beobachtet werden. Bei diesem pH-Wert ist die C4-Carboxylgruppe von L-Malat weitestgehend deprotoniert und somit können das His272 sowie das Asp172 das Akzeptor-Molekül nicht mehr durch Wasserstoffbrücken stabilisieren. Die Spezifität der AtSMT für den Acylakzeptor L-Malat wäre dadurch deutlich herabgesetzt und die Bildung von 1,2-Disinapoylglucose und Sinapinsäure gefördert. Dies würde die geringe SMT-Restaktivität bei pH 8,0 erklären, die für die Bildung von Sinapoylmalat nur 1% gegenüber der Aktivität bei pH 6,0 betrug, sowie auch die 12-fach erhöhte Hydrolyseaktivität. Die Disproportionierungsreaktion wurde um den Faktor sieben



gesteigert. Wie bereits in den Abschnitten 3.3.3 und 3.3.4 gezeigt wurde, spielt die Erkennung der Carboxylgruppe des Acylakzeptors L-Malat eine essentielle Rolle für die Acyltransferase-Aktivität der AtSMT. Unter Standardbedingungen bei pH 6,0 und in Anwesenheit von L-Malat ist eine hydrolytische Spaltung der Sinapoylglucose kaum zu beobachten. Somit kann die Hydrolyse der Sinapoylglucose nur unter Bedingungen beobachtet werden, in denen entweder kein L-Malat vorhanden ist, oder die Bindung des L-Malats an das aktive Zentrum geschwächt ist. Die hydrolytische Aktivität der AtSMT kann folglich nur dadurch erklärt werden, dass der Acylakzeptor durch Wasser verdrängt wird, Wasser selber aber nicht in der Lage ist, die Reaktion zu initiieren. Allerdings scheint die Substratspezifität der AtSMT in der Pflanze jedoch nicht so spezifisch zu sein, da in der SMT-defizienten Arabidopsis-Mutante *sng1-6* durch Komplementation mit dem *SNG1*-Gen die Akkumulation von 1,2-Disinapoylglucose initiiert werden konnte (Fraser *et al.*, 2007). Wohingegen die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die SMT-Spezifität gegenüber L-Malat hauptsächlich bei leicht sauren pH-Werten ausgeprägt ist. Dieser Befund lässt die Lokalisation der SMT im leicht sauren Milieu der pflanzlichen Zentralvakuole (Hause *et al.*, 2002; Sharma und Strack, 1985; Strack und Sharma, 1985) biochemisch sinnvoll erscheinen.

#### 4.3.3 Acylenzym-Intermediat

Die Fähigkeit der AtSMT Sinapoylglucose hydrolytisch zu spalten hilft eine der Schlüsselfragen des AtSMT-Reaktionsmechanismus zu beantworten. Bisher war es nicht möglich zwischen zwei unterschiedlichen Reaktionsmechanismen zu unterscheiden. Einerseits ist ein Mechanismus denkbar, der über einen Acylenzym-Komplex verläuft (Sinapoylseryl-SMT), der charakteristisch für Serin-Carboxypeptidasen ist (Douglas *et al.*, 1976). Andererseits könnte die SMT-Reaktion analog einem Mechanismus, der für C-C-Hydrolasen beschrieben wurde ablaufen (Fleming *et al.*, 2000), in dem das katalytische Serin als Base fungiert (Abb. 4.3). Basierend auf den bisherigen Ergebnissen kann aber die Existenz eines Acylenzym-Komplexes postuliert werden. Da im Standard-Enzymassay nur Spuren an freigesetzter Sinapinsäure nachweisbar sind, wird Wasser wahrscheinlich nicht als Acylakzeptor erkannt und ist somit nicht in der Lage, die Reaktion zu initiieren (vgl. 4.3.2). Demzufolge, würde die SMT-Reaktion nicht ablaufen, wenn ein genereller Basen-Mechanismus zugrunde läge. Die SMT-Reaktion folgt einem sequentiellen Mechanismus, der voraussetzt, dass beide Substrate gleichzeitig im aktiven Zentrum gebunden sind. Diese Voraussetzung wäre nicht erfüllt, wenn Wasser den Acylakzeptor verdrängen würde.



**Abb. 4.3** Alternative Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus der Glucoseester-abhängigen Acytransferasen am Beispiel der SMT. (1) Reaktionsmechanismus der über ein Acylenzym-Intermediat (Sinapoylseryl-SMT) verläuft, analog zu den Serin-Carboxypeptidasen (Dodson und Wlodawer, 1998). (2) Reaktionsmechanismus bei dem das katalytische Serin als Base fungiert (Fleming *et al.*, 2000) und das Akzeptormolekül (L-Malat) durch Protonenabstraktion aktiviert. Rot: katalytisches Serin; Orange: katalytisches Histidin und Aspartat; Grün: Glucoserest; Blau: L-Malat; Schwarz: Sinapoylrest.

Somit weist die Beobachtung der hydrolytischen Reaktion der AtSMT auf die Existenz eines kurzlebigen Acylenzym-Intermediats hin, das durch den Angriff eines Wassermoleküls gespalten werden kann. Die endgültige Bestätigung für die Existenz eines Acylenzym-Intermediats muss allerdings durch kristallographische Methoden erbracht werden. Dies gelang unter anderem bei einer Elastase aus Schweinepankreas, indem der Komplex aus Substrat und Proteinkristall bei  $-53^{\circ}\text{C}$  stabilisiert wurde. Dazu wurde das Substrat zu den Kristallen gegeben und sofort danach abgekühlt, um die gebildeten Spezies zu stabilisieren (Ding *et al.*, 2006).

Des Weiteren weist die hydrolytische Aktivität der AtSMT darauf hin, dass es keine hydrophobe Abschirmung des aktiven Zentrums gegenüber Wasser gibt. Vielmehr wird die Hydrolyse unter normalen Bedingungen im Wesentlichen durch zwei Mechanismen unterdrückt. Zum einen konnte für die AtSMT ein sequentieller Reaktionsmechanismus bestimmt werden, in dem beide Substrate im aktiven Zentrum gebunden sein müssen, bevor die Reaktion startet. Zum Anderen ist der Acylakzeptor L-Malat durch Wasserstoffbrücken relativ stabil an das aktive Zentrum der AtSMT gebunden und erschwert somit die Verdrängung durch Wasser. Die räumliche Nähe der gebundenen Reaktionspartner sowie die starke Fixierung des L-Malats verhindern somit, dass unter leicht sauren Bedingungen und in Anwesenheit des Acylakzeptors L-Malat der Acylenzym-Komplex durch Wasser gespalten wird.

#### 4.4 Evolution der SCPL-Acyltransferasen

Genetische Dynamik spielt insbesondere bei der Evolution des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels eine entscheidende Rolle (Hartmann, 2007), da die enorme Mannigfaltigkeit der pflanzlichen Chemie erst durch eine Vielzahl an Genfamilien ermöglicht wird. Dabei wird die Vielfältigkeit der über 200.000 verschiedenen Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels durch die enzymatische Modifizierung der unterschiedlichsten Grundgerüste der Phenylpropanoide, Isoprenoide, Alkaloide oder Polyketide erreicht. Diese Grundgerüste werden hydroxyliert, methyliert, glycosyliert, prenyliert oder, wie im Falle der AtSMT, acyliert. Enzyme, die sowohl ähnliche Proteinstrukturen als auch ähnliche Reaktionsspezifitäten aufzeigen, geben einen Hinweis auf die evolutionäre Aufspaltung der Genome durch Duplikationsereignisse. Dabei spielt der Neuerwerb bzw. die teilweise Spezialisierung der duplizierten Gene eine entscheidende Rolle für deren Erhalt (Wagner, 1999). Darüber hinaus spielt die funktionelle Redundanz der duplizierten Gene eine wichtige Rolle bei der Kompensation von Null-Mutationen (Gu *et al.*, 2003).

Interessanterweise liegen 17 der 19 SCPL Acyltransferasen aus Arabidopsis in multiplen Genclustern (Fraser *et al.*, 2005). Dabei ist das SMT-codierende Gen *SNG1* in einem Cluster von fünf tandemartig angeordneten SCPL-Acyltransferase-Genen auf dem Chromosom 2 lokalisiert. Für drei Gene dieses Clusters wurde postuliert, dass sie für Enzyme mit SST Aktivität codieren (Fraser *et al.*, 2007). Die Haupt-SST-Aktivität von Arabidopsis wird durch das Genprodukt von *At2g23010* katalysiert. Geringfügige SST Aktivitäten wurden aber auch für die Genprodukte von *At2g22980* und die AtSMT (*At2g22990*) postuliert. Für die AtSMT konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vitro* SST-Aktivität nachgewiesen werden (vgl. 3.4.5).

Anhand des Homologie-basierten SMT-Strukturmodells konnten Aminosäurereste identifiziert werden, denen eine Schlüsselrolle in der Erkennung des Acyldonors, der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerks und der Ausbildung der Oxyaniontasche zugeordnet werden kann. Ein Sequenzvergleich mit den SMT-homologen Enzymen SST und SAT zeigt, dass diese Reste weitestgehend konserviert sind (siehe Abb. 4.1).

Im Gegensatz dazu sind für die L-Malat-Erkennung verantwortlichen Aminosäurereste, weder in den beiden Acyltransferasen SAT und SST noch in den putativen Acyltransferasen, die durch die Gene *At2g22970* und *At2g22980* kodiert werden, vollständig konserviert. Des Weiteren offenbart der Sequenzvergleich (Abb. 4.1), dass die am wenigsten konservierten Bereiche in der unmittelbaren Umgebung jener Aminosäurereste lokalisiert sind, die sich für die Erkennung des Acylakzeptors verantwortlich zeigen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass dieser Molekülbereich ein bevorzugtes Ziel für einen strukturellen Umbau der SCPL-Acyltransferasen darstellen könnte, wobei jedoch die allgemeine Gesamtstruktur der Proteine erhalten bleibt. Interessanterweise sind in der SCT die homologen Aminosäurepositionen ebenfalls konserviert, mit Ausnahme der für die Cholin-Erkennung verantwortlichen Reste. Bemerkenswert dabei ist die Lokalisation des *SCT*-Gens (*At5g09640*) auf Chromosom 5, sowie die posttranslationale Endopeptidspaltung während der Enzymreifung, wodurch sich die SCT deutlich von den 18 anderen SCPL-Acyltransferasen in Arabidopsis unterscheidet.

Den beiden Proteinen, die durch die Gene *At2g22970* und *At2g22980* kodiert werden, konnte bislang noch keine enzymatische Aktivität zugeordnet werden. Allerdings wurde für das Genprodukt von *At2g22980* eine SST Nebenaktivität postuliert (Fraser *et al.*, 2007) und für *At2g22970* konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Protein der Mutantenvariante *Ser75Asn-Pro218Gln-Phe272His* in der Lage war, Sinapoylglucose und L-Malat zu Sinapoylmalat umzusetzen (Stehle *et al.*, 2008a). Insgesamt sind aber in diesen beiden Proteinen die homologen Aminosäurereste, die in der SMT für die Substraterkennung und -stabilisierung verantwortlich sind, nicht vollständig konserviert,

jedoch deuten die bisherigen Untersuchungen darauf hin, dass diese Enzyme ebenfalls Sinapoylglucose als Acyldonor verwenden, auch wenn die katalysierten Primärreaktionen bis jetzt nicht bekannt sind.

Bisher konnte die hydrolytische Spaltung des Substrats nur für die SMT nachgewiesen werden, aber es gilt als wahrscheinlich, dass die anderen Acyltransferasen des Clusters auf Chromosom 2 ebenfalls neben der Transacylierung Hydrolyse-Aktivität aufweisen. Solch bifunktionale Enzyme wurden auch für andere Systeme beschrieben. Kowalczyk *et al.* (2003) zeigten, dass die Indol-3-Acetyltransferase aus *Zea mays* sowohl die Synthese als auch die hydrolytische Spaltung von Indol-3-Acetylinositol katalysiert. Erste Peptidsequenzen belegen die Hypothese, dass es sich hierbei um einen weiteren Vertreter der SCPL-Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen handelt (Kowalczyk *et al.*, 2003). Im Gegensatz zur SMT wird in dieser Reaktion aber das Produkt anstelle des Substrats hydrolytisch gespalten. Weitere Beispiele für bifunktionale Acyltransferasen sind die beiden Acyl-Coenzym A:Ethanol *O*-Acyltransferasen Eht1 und Eeb1 aus *S. cerevisiae*. Sie gehören zur Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, besitzen eine katalytische Triade bestehend aus Serin, Aspartat und Histidin und zeigen sowohl eine Acyltransferase- als auch eine Esterase-Aktivität (Saerens *et al.*, 2006). Somit erscheint der Funktionswechsel von einer Hydrolase- zu einer Acyltransferaseaktivität innerhalb der Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Enzyme als eine weit verbreitete Modulation.

Die beschriebenen enzymatischen Aktivitäten der AtSMT legen die Vermutung nahe, dass dieses Enzym bislang weder absolute Substrat- noch Reaktionsspezifität erlangt hat. Darüber hinaus deutet die genetische Organisation darauf hin, dass das SMT-codierende Gen *SNG1* sowie die anderen vier SCPL Acyltransferase-Gene auf Chromosom 2 von Arabidopsis einen gemeinsamen Vorläufer besitzen und in jüngerer Vergangenheit durch Genduplikationen entstanden sind. All diese Enzyme verwenden den gleichen Acyldonor (Sinapoylglucose) und weisen zum Teil überlappende Acylakzeptor-Spezifitäten auf (Fraser *et al.*, 2007; Stehle *et al.*, 2008a). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Neufunktionalisierung der SCPs die zum Erwerb der Acyltransferaseaktivität führte, mit der Herausbildung der Acyldonorspezifität einherging, gefolgt von weiteren Genduplikationen und einer Spezialisierung dieser Duplikate zu verschiedenen Acylakzeptorspezifitäten.

## 4.5 Weiterführende Arbeiten

Zur detaillierteren Aufklärung der molekularen Mechanismen, die den Funktionswechsel von einer Hydrolase- zu einer Acyltransferaseaktivität der AtSMT bewirken, ist die Aufklärung der Kristallstruktur der AtSMT eine unerlässliche Voraussetzung. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte heterologe Expression in *S. cerevisiae* bietet die Möglichkeit, die AtSMT durch Fermentation in größeren Mengen herzustellen, um entsprechende Kristallisationsexperimente zu ermöglichen. Die Co-Kristallisation mit Sinapoylglucose würde das molekulare Verständnis der Substratbindung weiter erklären und Unterschiede zu den SCPLs aufzeigen, die möglicherweise einen Aufschluss darüber liefern, warum die SMT nicht mehr in der Lage ist Peptidsubstrate zu hydrolysieren.

Die genetische Organisation des SMT-codierenden Gens *SNG1* und der anderen vier SCPL Acyltransferase-Gene auf Chromosom 2, die in einem multiplen Tandemcluster lokalisiert sind, deutet darauf hin, dass diese Gene durch Genduplikationen in jüngerer Vergangenheit entstanden sind. Somit bieten diese Glucoseester-abhängiger Acyltransferasen aus Arabidopsis einen interessanten Ansatzpunkt, zur näheren Untersuchung der Evolution dieser Enzymklasse. Voraussetzung hierfür ist die Klonierung der entsprechenden cDNAs der SST und SAT, die heterologe Expression sowie die biochemische Charakterisierung der entsprechenden Enzyme. Die für die AtSMT etablierte Expression in *S. cerevisiae* sollte ohne weitere aufwendige Optimierung auf diese Gene übertragbar sein. Neben Untersuchungen zur Substratspezifität, sollte die Frage geklärt werden, in wie weit diese beiden Acyltransferasen Hydrolyseaktivität gegenüber Sinapoylglucose besitzen, um allgemeingültige Aussagen über die Existenz eines Acyl-Enzym-Komplexes in den SCPL-Acyltransferasen ableiten zu können. Des Weiteren könnten diese Untersuchungen zusammen mit der Charakterisierung des Reaktionsmechanismus weitere Einblicke darüber gewähren, wie diese Acyltransferasen den Angriff eines Wassermoleküls während der Acyltransferierungsreaktion verhindern.

Die Klonierung des *At2g22970*-Gens und die Mutageneseexperimente zeigten, dass dieses Enzym zur Gruppe der SCPL-Acyltransferasen gehört. Allerdings ist die Präferenzreaktion dieses Enzyms bisher unbekannt. Zur Klärung dieser Fragestellung sollen methanolische Blütenextrakte der Wildtyppflanze und einer Pflanze, die eine Insertion in dem entsprechenden Gen trägt, mittels GC-MS untersucht werden. Unterschiede in den Metabolitenprofilen sollten Rückschlüsse auf die, durch das *At2g22970*-Enzym katalysierte Reaktion ermöglichen.

Bislang ist über die zeitliche Entstehung der Glucoseester-abhängigen Acyltransferasen aus Arabidopsis nichts bekannt. Die Untersuchung von evolutionären Markern, in den

Sequenzbereichen des katalytischen Zentrums, sollte einen Aufschluss über die zeitliche Entwicklung dieser Enzymklasse geben. Analoge Untersuchungen zu Serin-Peptidasen konnten ein genaues Bild zum Ursprung der einzelnen Peptidase-*clans* liefern (Krem und Di Cera, 2001). Zusammen mit der Charakterisierung der oben genannten Acyltransferasen könnten so erste Vorhersagen zu den Substratspezifitäten der einzelnen Acyltransferasen ermöglicht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel kommen Acyltransferasen vor, die 1-*O*-Glucoseester ( $\beta$ -Acetalester) der Hydroxyzimtsäuren als Acyldonor nutzen und damit einen alternativen Mechanismus zur Coenzym A-Thioester-abhängigen Acyltransferase-Aktivität definieren. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten zur MEROPS Peptidase Familie S10 konnten diese Acyltransferasen als SCPL (*serine-carboxypeptidase like*) Proteine klassifiziert werden. Die Verwandtschaft mit proteolytischen Enzymen deutet darauf hin, dass diese Acyltransferasen während der Evolution der Landpflanzen aus hydrolytischen Enzymen entstanden sind.

Der Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Enzyms Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase aus Arabidopsis (AtSMT), um erste Einblicke in den molekularen Mechanismus, der den Funktionswechsel von einer hydrolytischen zu einer Acyltransferase-Aktivität bewirkt haben könnte, zu erlangen. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Resultate erzielt:

- Es wurde ein heterologes Expressionssystem in *S. cerevisiae* etabliert, das die intrazelluläre Anreicherung aktiver AtSMT ermöglicht. Dabei konnte der Ertrag an AtSMT-Protein durch nachfolgend beschriebene Optimierungsschritte um den Faktor 850 gesteigert werden: Anpassung der *AtSMT*-cDNA-Sequenz an den Proteinsyntheseapparat von *S. cerevisiae* durch Veränderung des Codon-Gebrauchs (*codon usage*) und der 5'UTR sowie N-terminale Fusion mit dem PEP4-Signalpeptid, Konstruktion eines *high copy* Expressionsplasmids und Verwendung eines Hefestamms, der den Induktor Galactose nicht mehr metabolisieren kann. Zusätzlich wurde das Expressionssystem an die Fermentation in einem Bioreaktor adaptiert und ein Protokoll zur Aufreinigung des rekombinanten AtSMT-Proteins entwickelt.
- Die hydrolytische Spaltung von Peptidsubstraten läuft nach einem Ping-Pong-Mechanismus ab. Dem gegenüber zeigten enzymkinetische Untersuchungen an dem heterolog produzierten Protein, dass die AtSMT-Reaktion einem sequenziellen Zufallsmechanismus folgt. Dieser setzt voraus, dass beide Substrate im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden sind, bevor die Reaktion startet.



- Untersuchungen zur Substratspezifität ergaben, dass das Vorhandensein beider Carboxylgruppen des Acylakzeptors L-Malat essentiell für die AtSMT-Aktivität ist. L-Malat-ähnliche Verbindungen, in denen eine der beiden Carboxylgruppen durch je eine Methylgruppe ersetzt wurde sind zwar in der Lage die Reaktion mit L-Malat kompetitiv zu hemmen, werden aber selbst nicht umgesetzt.
- Es wurde ein 3D-Modell der AtSMT-Proteinstruktur erstellt. Dies ermöglichte die Vorhersage von Aminosäuren, die sich im katalytischen Zentrum befinden oder die an der Substraterkennung und -stabilisierung beteiligt sein könnten. Dieses Modell konnte mittels ortsgerichteter Mutagenese verifiziert werden. Dabei konnte die abgeleitete funktionelle Bedeutung der katalytischen Triade, des Wasserstoffbrückennetzwerks, das die Erkennung des Glucoserests als auch der Carboxylgruppe des Acylakzeptors vermittelt, sowie von Aminosäureresten, die an der L-Malat Bindung beteiligt sind bestätigt werden.
- In Aktivitätsstudien wurde gezeigt, dass die AtSMT die Disproportionierungsreaktion von Sinapoylglucose zu 1,2-Disinapoylglucose katalysieren kann. Docking-Studien mit dem Strukturmodell der AtSMT weisen darauf hin, dass die Konformation des Peptidrückgrats mit der Bindung von zwei Molekülen Sinapoylglucose als Substrate kompatibel ist. Diese Reaktion setzt die Abwesenheit des Acylakzeptors L-Malat bzw. ein leicht alkalisches Reaktionsmilieu voraus. Unter identischen Bedingungen ist die AtSMT auch in der Lage Sinapoylglucose hydrolytisch zu spalten.
- Die Tatsache, dass die AtSMT in der Lage ist, den Acyldonor Sinapoylglucose hydrolytisch zu spalten, spricht gegen eine hydrophobe Abschirmung des aktiven Zentrums. Dies deutet auf die Fixierung beider Substrate, Sinapoylglucose und L-Malat, in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander hin. Damit wird die Acyltransferasenaktivität gegenüber einer möglichen Hydrolyse der Sinapoylglucose favorisiert. Die unter bestimmten Bedingungen auftretende hydrolytische Spaltung durch die SMT bei dem gegebenen sequentiellen Zufallsmechanismus lässt zudem die Existenz eines kurzlebigen Acylenzym-Intermediats, analog zu den Serin-Carboxypeptidasen, vermuten.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, Saari GC, Valls LA & Stevens TH. (1986). *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol Cell Biol* **6**: 2490-2499.
- Aubourg S, Lecharny A & Bohlmann J. (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **267**: 730-745.
- Bachovchin WW. (1985). Confirmation of the assignment of the low-field proton resonance of serine proteases by using specifically nitrogen-15 labeled enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7948-7951.
- Barrett A & Rawlings N. (1995). Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys* **318**: 247-250.
- Barrett A, Rawlings N & Woessner J. (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, London.
- Baumert A, Milkowski C, Schmidt J, Nimtze M, Wray V & Strack D. (2005). Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? *Phytochemistry* **66**: 1334-1345.
- Bech LM & Breddam K. (1989). Inactivation of carboxypeptidase Y by mutational removal of the putative essential histidyl residue. *Carlsberg Res Commun* **54**: 165-171.
- Beggs JD. (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**: 104-109.
- Bellizzi JJ, 3rd, Widom J, Kemp C, Lu JY, Das AK, Hofmann SL & Clardy J. (2000). The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4573-4578.
- Bitter GA, Chen KK, Banks AR & Lai PH. (1984). Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by alpha-factor gene fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5330-5334.

- Blow DM, Birktoft JJ & Hartley BS.** (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**: 337-340.
- Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D & Dudareva N.** (2004). Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol* **135**: 1993-2011.
- Bokern M & Strack D.** (1988). Synthesis of hydroxycinnamic acid esters of betacyanins via 1-*O*-acylglucosides of hydroxycinnamic acids by protein preparations from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* and petals of *Lampranthus sociorum*. *Planta* **174**: 101-105.
- Bokern M, Heuer S & Strack D.** (1991a). Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the Caryophyllales. *Bot. Acta* **105**: 146-151.
- Bokern M, Wray V & Strack D.** (1991b). Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* **184**: 261-270.
- Bone R, Frank D, Kettner CA & Agard DA.** (1989). Structural analysis of specificity: alpha-lytic protease complexes with analogues of reaction intermediates. *Biochemistry* **28**: 7600-7609.
- Bone R, Sampson NS, Bartlett PA & Agard DA.** (1991). Crystal structures of alpha-lytic protease complexes with irreversibly bound phosphonate esters. *Biochemistry* **30**: 2263-2272.
- Booij-James IS, Dube SK, Jansen MA, Edelman M & Mattoo AK.** (2000). Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in Arabidopsis mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiol* **124**: 1275-1284.
- Bouchereau A, Hamelin J, Lamour I, Renard M & Larher F.** (1991). Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera. *Phytochemistry* **30**: 1873-1881.
- Boudet AM.** (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**: 2722-2735.
- Bourne PC, Isupov MN & Littlechild JA.** (2000). The atomic-resolution structure of a novel bacterial esterase. *Structure* **8**: 143-151.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brady K, Wei AZ, Ringe D & Abeles RH. (1990). Structure of chymotrypsin-trifluoromethyl ketone inhibitor complexes: comparison of slowly and rapidly equilibrating inhibitors. *Biochemistry* **29**: 7600-7607.
- Brandl W, Herrmann K & Grothjahn L. (1984). Hydroxycinnamoyl esters of malic acid in small radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Z Naturforsch* **39c**: 515-520.
- Breddam K, Soerensen SB & Svendsen I. (1987). Primary structure and enzymatic properties of carboxypeptidase II from wheat bran. *Carlsberg Res Commun* **52**: 297-311.
- Bruner SD, Weber T, Kohli RM, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT & Stubbs MT. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**: 301-310.
- Burghardt H, Brunner H, Oelmüller R, Lottspeich F, Oster U & Rudiger W. (1994). Natural inhibitors of germination and growth.VII. Synthesis of ribulosephosphate carboxylase in darkness and its inhibition by coumarin. *Z. Naturforsch.* **49c**: 321-326.
- Chang CN, Matteucci M, Perry LJ, Wulf JJ, Chen CY & Hitzeman RA. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. *Mol Cell Biol* **6**: 1812-1819.
- Clark M, Cramer Jr. RD & van Opdenbosch NJ. (1989). Validation of the general purpose tripos 5.2 Force Field. *J. Comput. Chem.* **10**: 982–1012.
- Clauß K, Baumert A, Nimtz M, Milkowski C & Strack D. (2008). Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *Plant J* **53**: 802-813.
- Clements JM, Catlin GH, Price MJ & Edwards RM. (1991). Secretion of human epidermal growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic leader sequences. *Gene* **106**: 267-271.
- Corey D & Craik CS. (1992). An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 1784 - 1790.
- Cousin X, Hotelier T, Lievin P, Toutant JP & Chatonnet A. (1996). A cholinesterase genes server (ESTHER): a database of cholinesterase-related sequences for multiple alignments, phylogenetic relationships, mutations and structural data retrieval. *Nucleic Acids Res* **24**: 132-136.
- Crabtree HG. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* **23**: 149-156.

- Craik CS, Roczniak S, Largman C & Rutter WJ.** (1987). The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* **237**: 909-913.
- Croteau R, Kutchan TM & Lewis NG.** (2000). Natural products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, ASPP.* (ed. Buchanan), pp. 1250-1341.
- Dahlbender B & Strack D.** (1984). Nitrogen nutrition and the accumulation of free and sinapoyl-bound malic acid in *Raphanus sativus* cotyledons. *Planta* **161**: 142-147.
- Dahlbender B & Strack D.** (1986). Purification and properties of 1-(hydroxycinnamoyl)-glucose:1-(hydroxycinnamoyl)-glucose hydroxycinnamoyltransferase from radish seedlings. *Phytochemistry* **25**: 1043-1046.
- D'Auria JC.** (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 331-340.
- De Deken RH.** (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol.* **44**: 149-156.
- DeLano WL.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
- Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM & Derewenda ZS.** (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**: 1532-1541.
- Devedjiev Y, Dauter Z, Kuznetsov SR, Jones TL & Derewenda ZS.** (2000). Crystal structure of the human acyl protein thioesterase I from a single X-ray data set to 1.5 Å. *Structure* **8**: 1137-1146.
- Ding X, Rasmussen BF, Petsko GA & Ringe D.** (2006). Direct crystallographic observation of an acyl-enzyme intermediate in the elastase-catalyzed hydrolysis of a peptidyl ester substrate: Exploiting the "glass transition" in protein dynamics. *Bioorg Chem* **34**: 410-423.
- Dixon RA & Steele CL.** (1999). Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* **4**: 394-400.
- Dixon RA.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Doan NP & Fincher GB.** (1988). The A- and B-chains of carboxypeptidase I from germinated barley originate from a single precursor polypeptide. *J Biol Chem* **263**: 11106-11110.
- Dodson G & Wlodawer A.** (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci* **23**: 347-352.

- Douglas KT, Nakagawa Y & Kaiser ET. (1976). Mechanistic studies of carboxypeptidase Y. Kinetic detection of an acyl-enzyme intermediate in trimethylacetate esterase action. *J Am Chem Soc* **98**: 8231-8236.
- Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA & Pichersky E. (1998). Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* **14**: 297-304.
- Endrizzi JA, Breddam K & Remington SJ. (1994). 2.8 Å structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* **33**: 11106-11120.
- Erhart E & Hollenberg CP. (1983). The presence of a defective *LEU2* gene on 2 μ DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J Bacteriol* **156**: 625-635.
- Fahrney D & Gold A. (1963). Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, alpha-chymotrypsin, and trypsin. *J Am Chem Soc* **85**: 997-1000.
- Feng Y & Xue Q. (2006). The serine carboxypeptidase like gene family of rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Funct Integr Genomics* **6**: 14-24.
- Fischer D, Barret C, Bryson K, Elofsson A, Godzik A, Jones D, Karplus KJ, Kelley LA, MacCallum RM, Pawowski K, Rost B, Rychlewski L & Sternberg M. (1999). CAFASP-1: critical assessment of fully automated structure prediction methods. *Proteins Suppl* **3**: 209-217.
- Fleming SM, Robertson TA, Langley GJ & Bugg TD. (2000). Catalytic mechanism of a C-C hydrolase enzyme: evidence for a gem-diol intermediate, not an acyl enzyme. *Biochemistry* **39**: 1522-1531.
- Florini JR & Vestling CS. (1957). Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems. *Biochim. Biophys. Acta* **25**: 575-578.
- Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM & Chapple C. (2002a). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of Arabidopsis. *Plant J* **30**: 47-59.
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC & Chapple C. (2002b). The Arabidopsis *REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* **30**: 33-45.
- Fraser CM, Rider LW & Chapple C. (2005). An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol* **138**: 1136-1148.

- Fraser CM, Thompson MG, Shirley AM, Ralph J, Schoenherr JA, Sinlapadech T, Hall MC & Chapple C. (2007). Related Arabidopsis Serine Carboxypeptidase-like Sinapoylglucose Acyltransferases Display Distinct but Overlapping Substrate Specificities. *Plant Physiol* **144**: 1986-1999.
- Fujiwara H, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Fukui Y, Yamaguchi M, Ashikari T & Kusumi T. (1998). cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J* **16**: 421-431.
- Fulop V, Bocskei Z & Polgar L. (1998). Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94**: 161-170.
- Gasteiger J & Marsili M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **36**: 3219-3228.
- GGOLD<sup>®</sup>. (1998). Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), Available from: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>.
- Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, Bechtold N, Lu F, Ralph J, Mila I, Barriere Y, Lapierre C & Jouanin L. (2003). A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of *O*-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol Biol* **51**: 973-989.
- Graham TR & Krasnov VA. (1995). Sorting of yeast alpha-1,3-mannosyltransferase is mediated by a luminal domain interaction, and a transmembrane domain signal that can confer clathrin-dependent Golgi localization to a secreted protein. *Mol Biol Cell* **6**: 809-824.
- Grand C. (1984). Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Letters* **169**: 7-11.
- Gräwe W & Strack D. (1986). Partial purification and some properties of 1-sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase (sinapine synthase) from seeds of *Raphanus sativus* L. and *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **41c**: 28-33.
- Gräwe W, Bachhuber P, Mock H-P & Strack D. (1992). Purification and characterization of sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase from *Raphanus sativus* L. *Planta* **187**: 236-241.
- Gross GG & Kreiten W. (1975). Reduction of coenzyme A thioesters of cinnamic acids with an enzyme preparation from lignifying tissue of Forsythia. *FEBS Lett* **54**: 259-262.
- Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW & Li WH. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**: 63-66.

- Gustafsson C, Govindarajan S & Minshull J.** (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**: 346-353.
- Hahlbrock K & Scheel D.** (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369.
- Hamilton R, Watanabe CK & de Boer HA.** (1987). Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Res* **15**: 3581-3593.
- Hartmann T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**: 347-369.
- Hartmann T & Ober D.** (2002). Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. *Carolo-Wilhelmina: Forschungsmagazin der Technischen Universität Braunschweig*: 26-32.
- Hartmann T.** (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831-2846.
- Hause B, Meyer K, Viitanen PV, Chapple C & Strack D.** (2002). Immunolocalization of 1-*O*-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 26-32.
- Hayashi R, Moore S & Stein WH.** (1973). Serine at the active center of yeast carboxypeptidase. *J Biol Chem* **248**: 8366-8369.
- Hayashi R, Bai Y & Hata T.** (1975). Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. Reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine. *J Biol Chem* **250**: 5221-5226.
- Hedstrom L.** (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**: 4501-4524.
- Heller W & Kuhn T.** (1985). Elicitor induction of a microsomal 5-*O*-(4-coumaroyl) shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* **241**: 453-460.
- Henderson R.** (1970). Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *J Mol Biol* **54**: 341-354.
- Henderson R.** (1971). Catalytic activity of alpha-chymotrypsin in which histidine-57 has been methylated. *Biochem J* **124**: 13-18.
- Henikoff S & Henikoff JG.** (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10915-10919.



- Henikoff S & Henikoff JG.** (1993). Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* **17**: 49-61.
- Herrick D, Parker R & Jacobson A.** (1990). Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 2269-2284.
- Herrmann KM & Weaver LM.** (1999). The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 473-503.
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P & Legrand M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**: 95-103.
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B & Legrand M.** (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 1446-1465.
- Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P & Chatonnet A.** (2004). ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res* **32**: D145-147.
- Humphreys JM, Hemm MR & Chapple C.** (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10045-10050.
- Humphreys JM & Chapple C.** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 224-229.
- Iiyama K, Lam T & Stone BA.** (1994). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol* **104**: 315-320.
- Jensen E, Fellows Nutting M, Jang R & Balls A.** (1949). Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate: crystallization of inhibited chymotrypsin. *J Biol Chem* **179**: 189-199.
- Jordan F & Polgar L.** (1981). Proton nuclear magnetic resonance evidence for the absence of a stable hydrogen bond between the active site aspartate and histidine residues of native subtilisins and for its presence in thiolsubtilisins. *Biochemistry* **20**: 6366-6370.
- Jung G, Ueno H & Hayashi R.** (1998). Proton-relay system of carboxypeptidase Y as a sole catalytic site: studies on mutagenic replacement of his 397. *J Biochem* **124**: 446-450.
- Jung G, Ueno H & Hayashi R.** (1999). Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 1-6.

- Kamsteeg J, Van Brederode J, Hommels CH & Van Nigtevecht G.** (1980). Identification, properties and genetic control of hydroxycinnamoyl-coenzyme A:anthocyanidin 3-rhamnosyl(1-6)glucoside 4'-hydroxycinnamoyl transferase isolated from petals of *Silene dioica*. *Biochem Physiol Pflanzen* **175**: 403-411.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M & Angenon G.** (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**: 101-108.
- Kehl T.** (2007). Sequenzierung und Klonierung von 1,2,3,6-Tetra-*O*-Galloylglucose-4-*O*-Galloyltransferase, des Schlüsselenzyms in der Biosynthese hydrolysierbarer Tannine. In *Dissertation*. Universität Ulm, Fakultät für Naturwissenschaften, Ulm.
- Kelley LA, MacCallum RM & Sternberg MJ.** (2000). Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* **299**: 499-520.
- Kesy JM & Bandurski RS.** (1990). Partial purification and characterization of indol-3-ylacetylglucose:myo-inositol indol-3-ylacetyltransferase (indoleacetic acid-inositol synthase). *Plant Physiol* **94**: 1598-1604.
- Kojima M & Uritani I.** (1972). Elucidation of the structure of a possible intermediate in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue. *Plant Cell Physiol* **13**: 1075-1084.
- Kojima M & Kondo T.** (1985). An Enzyme in Sweet Potato Root which Catalyzes the Conversion of Chlorogenic Acid, 3-Caffeoylquinic Acid, to Isochlorogenic Acid, 3, 5-Dicaffeoylquinic Acid. *Agric Biol Chem* **49**: 2467-2469.
- Kossiakoff AA & Spencer SA.** (1981). Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin. *Biochemistry* **20**: 6462-6474.
- Koukol J & Conn EE.** (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* **236**: 2692-2698.
- Kowalczyk S, Jakubowska A, Zielinska E & Bandurski RS.** (2003). Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-*myo*-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* **119**: 165-174.
- Kozak M.** (1981). Mechanism of mRNA recognition by eukaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**: 81-123.
- Kozak M.** (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* **47**: 1-45.

- Kozak M.** (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* **308**: 241-246.
- Kozak M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.
- Krem MM & Di Cera E.** (2001). Molecular markers of serine protease evolution. *Embo J* **20**: 3036-3045.
- Lamb CJ.** (1977). trans-Cinnamic acid as a mediator of the light-stimulated increase in hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase. *FEBS Lett* **75**: 37-40.
- Landry LG, Chapple CC & Last RL.** (1995). Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**: 1159-1166.
- Lang DA, Mannesse ML, de Haas GH, Verheij HM & Dijkstra BW.** (1998). Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* **254**: 333-340.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM.** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291.
- Lauble H, Forster S, Miehlich B, Wajant H & Effenberger F.** (2001). Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**: 194-200.
- Lawson DM, Derewenda U, Serre L, Ferri S, Szittner R, Wei Y, Meighen EA & Derewenda ZS.** (1994). Structure of a myristoyl-ACP-specific thioesterase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **33**: 9382-9388.
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D & Chapple C.** (2000). Cloning of the *SNG1* gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**: 1295-1306.
- Li AX, Eannetta N, Ghangas GS & Steffens JC.** (1999). Glucose polyester biosynthesis. Purification and characterization of a glucose acyltransferase. *Plant Physiol* **121**: 453-460.
- Li AX & Steffens JC.** (2000). An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6902-6907.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG & Last RL.** (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.

- Li J, Derewenda U, Dauter Z, Smith S & Derewenda ZS. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nat Struct Biol* **7**: 555-559.
- Liao DI & Remington SJ. (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5 Å resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem* **265**: 6528-6531.
- Liao DI, Breddam K, Sweet RM, Bullock T & Remington SJ. (1992). Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2 Å resolution. *Biochemistry* **31**: 9796-9812.
- Lim EK, Li Y, Parr A, Jackson R, Ashford DA & Bowles DJ. (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**: 4344-4349.
- Lindl T, Kreuzaler F & Hahlbrock K. (1973). Synthesis of p-coumaroyl coenzyme a with a partially purified p-coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *Biochim Biophys Acta* **302**: 457-464.
- Lorenzen M, Racicot V, Strack D & Chapple C. (1996). Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of arabidopsis. *Plant Physiol* **112**: 1625-1630.
- Luo J, Nishiyama Y, Fuell C, Taguchi G, Elliott K, Hill L, Tanaka Y, Kitayama M, Yamazaki M, Bailey P, Parr A, Michael AJ, Saito K & Martin C. (2007). Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**: 678-695.
- Lynch M & Conery JS. (2003). The evolutionary demography of duplicate genes. *J Struct Funct Genomics* **3**: 35-44.
- Ma X, Koepke J, Panjekar S, Fritsch G & Stöckigt J. (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J Biol Chem* **280**: 13576-13583.
- Mackenzie PI, Owens I, Burchell B, Bock K, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum D, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF & Nebert DW. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**: 255-269.
- MacKerell Jr. AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr. RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher III WE, *et al.* (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**,: 3586–3616.

- Mathew S & Abraham TE.** (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol* **24**: 59-83.
- Matthews BW.** (1977). X-ray structure of proteins. In *The proteins.* (eds. Neurath H, and Hill RL), pp. 404-590. Academic Press, New York.
- Matthews DA, Alden RA, Birktoft JJ, Freer T & Kraut J.** (1977). Re-examination of the charge relay system in subtilisin comparison with other serine proteases. *J Biol Chem* **252**: 8875-8883.
- McBride KE & Summerfelt KR.** (1990). Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **14**: 269-276.
- Meißner D, Albert A, Böttcher C, Strack D & Milkowski C.** (2008). The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **228**: 663-674
- Milkowski C, Baumert A & Strack D.** (2000a). Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211**: 883-886.
- Milkowski C, Baumert A & Strack D.** (2000b). Identification of four Arabidopsis genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett* **486**: 183-184.
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L & Strack D.** (2004). Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* **38**: 80-92.
- Milkowski C & Strack D.** (2004). Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **65**: 517-524.
- Mock H-P, Vogt T & Strack D.** (1992). Sinapoylglucose:malate-sinapoyltransferase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. *Z Naturforsch* **47**: 680-682.
- Mock H-P & Strack D.** (1993). Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose: Hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction. *Phytochemistry* **32**: 575-579.
- Monnat J, Neuhaus EM, Pop MS, Ferrari DM, Kramer B & Soldati T.** (2000). Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a Dictyostelium protein disulfide isomerase. *Mol Biol Cell* **11**: 3469-3484.
- Mortensen UH, Raaschou-Nielsen M & Breddam K.** (1994a). Recognition of C-terminal amide groups by (serine) carboxypeptidase Y investigated by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **269**: 15528-15532.

- Mortensen UH, Remington SJ & Breddam K.** (1994b). Site-directed mutagenesis on (serine) carboxypeptidase Y. A hydrogen bond network stabilizes the transition state by interaction with the C-terminal carboxylate group of the substrate. *Biochemistry* **33**: 508-517.
- Moura DS, Bergey DR & Ryan CA.** (2001). Characterization and localization of a wound-inducible type I serine-carboxypeptidase from leaves of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* **212**: 222-230.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Munro S & Pelham HR.** (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907.
- Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW & Chapple C.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* *REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1* gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 544-554.
- Nardini M & Dijkstra BW.** (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 732-737.
- Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE & Dijkstra BW.** (2000). Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* **275**: 31219-31225.
- Ng DT, Brown JD & Walter P.** (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 269-278.
- Nielsen JK, Olsen O, Pedersen LH & Sørensen H.** (1984). 2-*O*-(*p*-coumaroyl)-L-malate, 2-*O*-caffeoyl-L-malate and 2-*O*-feruloyl-L-malate in *Raphanus sativus*. *Phytochemistry* **23**: 1741-1743.
- Nielsen TL, Holmberg S & Petersen JG.** (1990). Regulated overproduction and secretion of yeast carboxypeptidase Y. *Appl Microbiol Biotechnol* **33**: 307-312.
- Nurmann G & Strack D.** (1979). Sinapine esterase. I. Characterisation of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z. Naturforsch* **34**: 715-720.
- Nurmann G & Strack D.** (1981). Formation of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Pflanzenphysiol* **102**: 11-17.
- Ober D.** (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* **10**: 444-449.

- Ohno S. (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J & et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**: 197-211.
- Omura T & Sato R. (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* **239**: 2379-2385.
- Onufriev A, Bashford D & Case DA. (2000). Modification of the generalized born model suitable for macromolecules. *J. Phys. Chem. B* **104**: 3712–3720.
- Oosterbaan RA, Kunst P, Van Rotterdam J & Cohen JA. (1958). The reaction of chymotrypsin and diisopropylphosphorofluoridate. II. The structure of two DP-substituted peptides from chymotrypsin-DP. *Biochim Biophys Acta* **27**: 556-563.
- Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W & Jongsma MA. (2003). The promoter-terminator of chrysanthemum rbs1 directs very high expression levels in plants. *Planta* **216**: 1003-1012.
- Pakusch AE, Kneusel RE & Matern U. (1989). S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* **271**: 488-494.
- Paquette S, Møller BL & Bak S. (2003). On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**: 399-413.
- Pelham HR, Hardwick KG & Lewis MJ. (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *Embo J* **7**: 1757-1762.
- Pichersky E. (1990). Nomad DNA - a model for movement and duplication of DNA sequences in plant genomes. *Plant Mol Biol* **15**: 437-448.
- Pichersky E & Gang DR. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* **5**: 439-445.
- Polgar L & Bender ML. (1969). The nature of general base-general acid catalysis in serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**: 1335-1342.
- Puente XS, Sanchez LM, Gutierrez-Fernandez A, Velasco G & Lopez-Otin C. (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* **33**: 331-334.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J & Barrett AJ. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**: 320-325.
- Regenbrecht J & Strack D. (1985). Distribution of 1-sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase activity in the *brassicaceae*. *Phytochemistry* **24**: 407-410.

- Roberts CJ, Nothwehr SF & Stevens TH.** (1992). Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. *J Cell Biol* **119**: 69-83.
- Robillard G & Shulman RG.** (1972). High resolution nuclear magnetic resonance study of the histidine--aspartate hydrogen bond in chymotrypsin and chymotrypsinogen. *J Mol Biol* **71**: 507-511.
- Robillard G & Shulman RG.** (1974). High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin. II. Polarization of histidine 57 by substrate analogues and competitive inhibitors. *J Mol Biol* **86**: 541-558.
- Robinson M, Lilley R, Little S, Emtage JS, Yarranton G, Stephens P, Millican A, Eaton M & Humphreys G.** (1984). Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **12**: 6663-6671.
- Rothe C & Lehle L.** (1998). Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *Eur J Biochem* **252**: 16-24.
- Rothman JH & Stevens TH.** (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**: 1041-1051.
- Rudenko G, Bonten E, d'Azzo A & Hol WG.** (1995). Three-dimensional structure of the human 'protective protein': structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure* **3**: 1249-1259.
- Rudolph R & Lilie H.** (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**: 49-56.
- Rudolph R, Böhm G, Lilie H & Jaenicke R.** (1997). Folding Proteins. In *Protein Function: a Practical Approach*. (ed. Creighton TE), pp. 57-99. IRL Press, Oxford.
- Russell DW & Conn EE.** (1967). The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch Biochem Biophys* **122**: 256-258.
- Sachs J.** (1873). *Lehrbuch der Botanik*. W. Engelmann,, Leipzig.
- Saerens SM, Verstrepen KJ, Van Laere SD, Voet AR, Van Dijck P, Delvaux FR & Thevelein JM.** (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem* **281**: 4446-4456.
- Sali A & Blundell TL.** (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815.



- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning-a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saylor MH & Mansell RL.** (1977). Hydroxycinnamoyl:coenzyme A transferase involved in the biosynthesis of kaempferol-3-(*p*-coumaroyl triglucoside) in *Pisum sativum*. *Z Naturforsch* **32c**: 765-768.
- Schaffer NK, May SC, Jr. & Summerson WH.** (1953). Serine phosphoric acid from diisopropylphosphoryl chymotrypsin. *J Biol Chem* **202**: 67-76.
- Schellenberger A.** (1989). *Enzymkatalyse - Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme (unter Mitarbeit von G. Fischer, G. Hübner und R. Ulbrich.)*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schmidt A, Scheel D & Strack D.** (1998). Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyl-tyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* **205**: 51-55.
- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D & Rosahl S.** (1999). Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* **274**: 4273-4280.
- Schmidt SW, Denzel K, Schilling G & Gross GG.** (1986). Enzymatic synthesis of 1,6-digalloylglucose from  $\beta$ -glucogallin by  $\beta$ -glucogallin:  $\beta$ -glucogallin 6-*O*-galloyltransferase from oak leaves. *Z. Naturforsch.* **42**: 87-92.
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P & Werck-Reichhart D.** (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem* **276**: 36566-36574.
- Schoellmann G & Shaw E.** (1963). Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**: 252-255.
- Scholl RL, May ST & Ware DH.** (2000). Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**: 1477-1480.
- Segel IH.** (1975). *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Inc. Wiley-Interscience, Toronto.
- Sharma V & Strack D.** (1985). Vacuolar localization of 1-sinapoylglucose: L-malate sinapoyltransferase in protoplasts from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Planta* **163**: 563-568.
- Sharp PM & Li WH.** (1987). The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**: 1281-1295.

- Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH & Wright F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* **16**: 8207-8211.
- Sheahan JJ. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *Am J Bot* **83**: 679-686.
- Shilton BH, Li Y, Tessier D, Thomas DY & Cygler M. (1996). Crystallization of a soluble form of the Kex1p serine carboxypeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Sci* **5**: 395-397.
- Shimada M, Kuroda H & Higuchi T. (1973). Evidence for the formation of methoxy groups of ferulic and sinapic acids in Bambusa by the same *O*-methyltransferase. *Phytochemistry* **12**: 2873-2875.
- Shirley AM, McMichael CM & Chapple C. (2001). The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J* **28**: 83-94.
- Shirley AM & Chapple C. (2003). Biochemical characterization of sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. *J Biol Chem* **278**: 19870-19877.
- Sippl MJ. (1990). Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. *J Mol Biol* **213**: 859-883.
- Sørensen SB, Breddam K & Svendsen I. (1986). Primary structure of carboxypeptidase I from malted barley. *Carlsberg Res Commun* **51**: 475.
- Sørensen SB, Svendsen I & Breddam K. (1987). Primary structure of carboxypeptidase I from malted barley. *Carlsberg Res Commun* **52**: 285.
- Stagoj MN, Comino A & Komel R. (2006). A novel GAL recombinant yeast strain for enhanced protein production. *Biomol Eng* **23**: 195-199.
- Stehle F, Brandt W, Milkowski C & Strack D. (2006). Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism. *FEBS Lett* **580**: 6366-6374.
- Stehle F, Brandt W, Schmidt J, Milkowski C & Strack D. (2008a). Activities of *Arabidopsis* sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **69**: 1826-1831.

- Stehle F, Stubbs MT, Strack D & Milkowski C. (2008b). Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. *FEBS Journal* **275**: 775-787.
- Stöckigt J & Zenk MH. (1974). Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Lett* **42**: 131-134.
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM & De Luca V. (1998). The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J* **14**: 703-713.
- St-Pierre B & De Luca V. (2000). Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification fo the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In *Recent Advances in Phytochemistry Vol. 34. Evolution of Metabolic Pathways*. (ed. John T. Romeo RI, Luc Varin and Vincenzo De Luca), pp. 285-315. Elsevier Science Ltd., Amsterdam or New York.
- Strack D, Tkotz N & Klug M. (1978). Phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus* and the effect of competitive *in vivo* inhibition of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) by hydroxylamine derivatives. *Z. Pflanzenphysiol* **89**: 343-353.
- Strack D. (1980). Enzymatic Synthesis of 1-Sinapoylglucose from Free Sinapic Acid and UDP-Glucose by a Cell-Free System from *Raphanus sativus* Seedlings. *Z. Naturforsch.* **35c**: 204-208.
- Strack D, Nurmamann G & Sachs G. (1980). Sinapine esterase. II. Specificity and change of sinapine esterase activity during germination of *Raphanus sativus*. *Z. Naturforsch.* **35**: 963-966.
- Strack D. (1981). Sinapine as a supply of choline for the biosynthesis of phosphatidylcholine in *Raphanus sativus* seedlings. *Z. Naturforsch* **36c**: 215-221.
- Strack D. (1982). Development of 1-*O*-sinapoyl- $\beta$ -D-glucose: L-malate sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* **155**: 31-36.
- Strack D, Knogge W & Dahlbender B. (1983). Enzymatic synthesis of sinapin from 1-*O*-sinapoyl-glucose and choline by a cell-free system from developing seeds of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Z Naturforsch* **38c**: 21-27.
- Strack D & Sharma V. (1985). Vacuolar localization of the enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of malic acid in protoplasts from *Raphanus sativus* leaves. *Physiologia Plantarum* **65**: 45-50.
- Strack D, Reinecke J & Takeuchi S. (1986). Evidence of a relationship between malate metabolism and activity of 1-sinapoylglucose:L-malate-sinapoyltransferase in radish (*Raphanus sativus* L.). *Planta* **167**: 212-217.

- Strack D, Gross W, Wray V & Grotjahn L.** (1987a). Enzymic Synthesis of Caffeoylglucaric Acid from Chlorogenic Acid and Glucaric Acid by a Protein Preparation from Tomato Cotyledons. *Plant Physiol* **83**: 475-478.
- Strack D, Heilemann J, Boehnert B, Grotjahn L & Wray V.** (1987b). Accumulation and enzymatic synthesis of 2-acetyl-3-(*p*-coumaroyl)-*meso*-tartaric acid in spinach cotyledons. *Phytochemistry* **26**: 107-111.
- Strack D, Gross W, Heilemann J, Keller H & Ohm S.** (1988). Enzymic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of glucaric acid and hydroaromatic acids from the respective 1-O-hydroxycinnamoylglucoside and hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioester as acyl donors with a protein preparation from *Cestrum elegans* leaves. *Z. Naturforsch.* **43**: 32-36.
- Strack D & Gross W.** (1990). Properties and Activity Changes of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase From Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol* **92**: 41-47.
- Strack D & Mock H-P.** (1993). Hydroxycinnamic acids and lignins. In *Methods in Plant Biochemistry*, pp. 45-97. Academic Press, 1993.
- Svendsen I, Martin BM, Viswanatha T & Johansen JT.** (1982). Amino acid sequence of carboxypeptidase Y. Peptides from enzymatic cleavages. *Carlsberg Res Commun* **47**: 15-27.
- SYBYL®.** (1996). Tripos Associates Inc., S. L., MO, USA, Available from: <http://www.tripos.com>.
- Tague BW & Chrispeels MJ.** (1987). The plant vacuolar protein, phytohemagglutinin, is transported to the vacuole of transgenic yeast. *J Cell Biol* **105**: 1971-1979.
- Tague BW, Dickinson CD & Chrispeels MJ.** (1990). A short domain of the plant vacuolar protein phytohemagglutinin targets invertase to the yeast vacuole. *Plant Cell* **2**: 533-546.
- Tkotz N & Strack D.** (1980). Enzymatic Synthesis of Sinapoyl-L-Malate from 1-Sinapoylglucose and L-Malate by a Protein Preparation from *Raphanus sativus* Cotyledons. *Z. Naturforsch* **35c**: 835-837.
- Tripathi LP & Sowdhamini R.** (2006). Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* **7**: 200.
- Tzagoloff A.** (1963a). Metabolism of Sinapine in Mustard Plants. II. Purification & Some Properties of Sinapine Esterase. *Plant Physiol* **38**: 207-213.
- Tzagoloff A.** (1963b). Metabolism of Sinapine in Mustard Plants. I. Degradation of Sinapine into Sinapic Acid & Choline. *Plant Physiol* **38**: 202-206.

- Ulbrich B, Stöckigt J & Zenk MH. (1976). Induction by light of hydroxy-cinnamoyl-CoA-quinase-transferase activity in buckwheat hypocotyls. *Naturwissenschaften* **63**: 484.
- Ulbrich B & Zenk MH. (1980). Partial purification and properties of *p*-hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate-*p*-hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **19**: 1625-1629.
- Unno H, Ichimaida F, Suzuki H, Takahashi S, Tanaka Y, Saito A, Nishino T, Kusunoki M & Nakayama T. (2007). Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *J Biol Chem* **282**: 15812-15822.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA & Van Dijken JP. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**: 501-517.
- Vicient CM & Delseny M. (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal Biochem* **268**: 412-413.
- Villegas RJ & Kojima M. (1986). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose: Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *J Biol Chem* **261**: 8729-8733.
- Villegas RJA, Shimokawa T, Okuyama H & Kojima M. (1987). Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. *Phytochemistry* **26**: 1577-1581.
- Vogt T, Aebershold R & Ellis B. (1993). Purification and characterization of sinapine synthase from seeds of *Brassica napus*. *Arch Biochem Biophys* **300**: 622-628.
- Wagner A. (1999). Redundant gene functions and natural selection. *J Evol Biol* **12**: 1-16.
- Wajant H, Mundry KW & Pfizenmaier K. (1994). Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* (L.). Homologies to serine carboxypeptidases. *Plant Mol Biol* **26**: 735-746.
- Wallace G & Fry SC. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *Int Rev Cytol* **151**: 229-267.
- Wang SX & Ellis BE. (1998). Enzymology of UDP-glucose:sinapic acid glucosyl-transferase from *Brassica napus*. *Phytochemistry* **49**: 307-318.
- Weaver LM & Herrmann K. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 346-351.

- Weier D, Mittasch J, Strack D & Milkowski C. (2008). The genes *BnSCT1* and *BnSCT2* from *Brassica napus* encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: molecular characterization and suppression. *Planta* **227**: 375-385.
- Weiner H, White WN, Hoare DG & Koshland DE, Jr. (1966). The formation of anhydrochymotrypsin by removing the elements of water from the serine at the active site. *J Am Chem Soc* **88**: 3851-3859.
- Whiting AK & Peticolas WL. (1994). Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. *Biochemistry* **33**: 552-561.
- Winkler FK, D'Arcy A & Hunziker W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774.
- Yang Q, Reinhard K, Schiltz E & Matern U. (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Mol Biol* **35**: 777-789.
- Zhou, A. & Li, J. (2005). Arabidopsis BRS1 is a secreted and active serine carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **280**: 35554–35561.
- Zsebo KM, Lu HS, Fieschko JC, Goldstein L, Davis J, Duker K, Suggs SV, Lai PH & Bitter GA. (1986). Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the pre-pro-alpha-factor leader region. *J Biol Chem* **261**: 5858-5865.

## 7 APPENDIX

**Tab. A1** verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz von 5' nach 3':
HindIII-AtSMT-fw	AGTAAGCTTATGAGTTTGAAAAATAAAGTTTCTGCTTCTGCTTGTCTTGTAT
HindIII-KozakAtSMT-fw	CATGAAGCTTACACAGAGAATATAATGGGTTTGAAAAATAAAGTTTCTGC
XbaI-AtSMT-rv	GCATTCTAGATTACAGGGTTGGCCACTGATCCACCTTTGGAACATGATAA AGGTCTCGTTTGGTCTATACTCTGCCGTGTGTCC
HindIII-ySMT-fw	ATGCAAGCTTATGTCTTTAAAGATTAAGTTCTTATTATTGTTGGTTTTGTA TCATCATGTTGATTCTGCTTCTATTGTTAAGTTTTTGCCAGGTTTTG
HindIII-CPY-ySMT-fw	AGCTAAGCTTATGAAAGCATTACCAGTTTACTATGTGGACTAGGCCGTGC CACTACACTCGCTAAGGCCGCTTCTATTGTTAAG
HindIII-PHA-L-fw	AAGCTTATGGCTTCCCTCCAAGTTCTTCAC
link PHA-L & ySMT-rv	AGTTTCCAATTCAAATGGCAATGGACCTTC
HindIII-SUC2-ySMT-fw	AGCTAAGCTTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCCTTTTGGCTGGTTTTG AGCCAAAATATCTGCAGCTTCTATTGTTAAGTTTTTGCCAGGTTTTG
HindIII-Consensus-ySMT-fw	AGCTAAGCTTATGAAAGTTTAAATAGTTTTATTGGCTATTTTTGCTGCTTT GCCATTGGCTTTGGCTGCTTCTATTGTTAAGTTTTTGCCAGGTTTTG
HindIII-OCH1-ySMT-fw	AGCTAAGCTTATGTCTAGGAAGTTGTCCACCTGATCGCTACAAGGAAATC AAAAACAATAGTCGTAACCGTACTTCTTATTTATTCTTTGTTGACATTTGC TTCTATTGTTAAGTTTTTGCCAGGTTTTG
HindIII-PEP4-ySMT-fw	AGCTAAGCTTATGTTTCAGCTTGAAAGCATTATTGCCATTGGCCTTGTGTT GGTCAGCGCCAACCAAGTTGCTGCAGCTTCTATTGTTAAGTTTTTGCCAGG TTTTG
ySMT-XbaI-rv	CGATTCTAGATTACAATGGTTGACCAGAAAATCCATCTTTGAAACATTATGA AAGTTTC
ySMT-His-XbaI-rv	AGCTTCTAGATTATCAATGGTGATGGTGATGATGCAATGGTTGACCAGAAA TCCATCTTTG
ySMT-HDEL-XbaI-rv	GCATTCTAGATTACAATTCATCATGCAATGGTTGACCAGAAAATCCATCTTT GAAACATTATGAAAGTTTCAATTTGGTCTGTATTCT
BspHI-leu2d-marker-rv	GGTCATGATTTTTTATATATATTTCAAGGATATACCATTGTAATG
leu2d-marker-BspHI-rv	CCTCATGATTTTTTTTGTACAAAATATCATAAAAAAAGAGAATC
AflIII-5'UTR-AtSMT-fw	AGTCACATGtAGAGAATATAATGAGTTTGAAAAATAAAGTTTCTG
XbaI-AtSMT-fw	ATAATCTAGAAAAGATCCTATGTCTATCCGTTAAATG
XbaI-5'UTR-AtSMT-fw	AGTCTCTAGAAGAGAATATAATGAGTTTGAAAAATAAAG
AtSMT-NotI-rv	GACTGCGGCCGCTTATTACAGGGTTGGCCACTGATCC
S173A-ySMT-fw	CTAATCCATTATACGTTGTTGGTGATGCTTATTCTGGTATGATTGTT
S173A-ySMT-rv	AACAATCATAACCAGAATAAGCATCACCAACAACGTATAATGGATTAG
H411A-ySMT-fw	GCTACTATTAAGGTGGTGGTGCTACAGCAGAATACAGACCAAATGAAAC

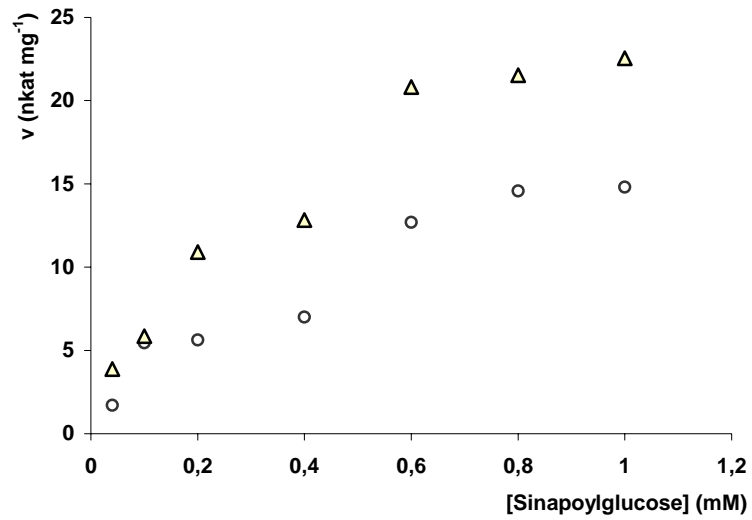
Bezeichnung	Nukleotidsequenz von 5' nach 3':
H411A-ySMT-rv	GTTTCATTTGGTCTGTATTCTGCTGTAGCACCACCACCTTTAATAGTAGC
D358A-ySMT-fw	CAGATCTTTGATTTATTCTGGTGACGCTGATATTGCTGTTCCATTTTTGG
D358A-ySMT-rv	CCAAAAATGGAACAGCAATATCAGCGTCACCAGAATAAATCAAAGATCTG
D172E/S175A-ySMT-fw	CATTATACGTTGTTGGTGAATCTTATGCTGGTATGATTGTTCCAGCTTT
D172E/S175A-ySMT-rv	AAAGCTGGAACAATCATAACCAGCATAAGATTCACCAACAACGTATAATG
N73A-ySMT-fw	GGAAGATCCATTGTTGATTTGGTTAGCTGGTGGTCTGGTTGTTCTTG
N73A-ySMT-rv	CAAGAACAACCAGGACCACCAGCTAACCAAATCAACAATGGATCTTCC
R322E-ySMT-fw	GGTTCTAAAGGTAAATGGGCTGAATGTAATAGAACTATTCCATACAATC
R322E-ySMT-rv	GATTGTATGGAATAGTTCTATTACATTCAGCCATTTACCTTTAGAACC
H272D-ySMT-fw	CATAAGTGTACTGCTAAGATTAACATTTGATCATATTTTACTCCAGATTG
H272D-ySMT-rv	CAATCTGGAGTCAAAAATATGATCAATGTTAATCTTAGCAGTACACTTATG
K268E-ySMT-fw	GGAATATCATAAGTGTACTGCTGAAATTAACATTCATCATATTTTGAC
K268E-ySMT-rv	GTCAAAAATATGATGAATGTTAATTTTCAGCAGTACACTTATGATATTCC
HindIII-At2g22970-fw	CGATAAGCTTAAAAAAATGGAATTAACACTAAAATTGCTGGTTCTG
At2g22970-XbaI-rv	GCTATCTAGATTACAAAAGGTTGGCCATTAATCCAC
S75N-At2g22970-fw	CTTCTTCTCTGGTTAAATGGAGGACCTGGATGTTCTTCTATC
S75N-At2g22970-rv	GATAGAAGAACATCCAGGTCCTCCATTTAACCAGAGAAGAAG
P218Q-At2g22970-fw	GATAACGCACGAAGACGACCAAAAATATCGCATTCATTTTCTC
P218Q-At2g22970-rv	GAGAAAATGGAATGCGATAGTTTTGGTTCGTCTTCGTGCGTTATC
F272H-At2g22970-fw	GAATTTTCATAAGTGTACCGACAAAATAAATGAACATCATATACTATCACCA GATTGCGACACGGCATCTC
F272H-At2g22970-rv	GAGATGCCGTGTCGCAATCTGGTGATAGTATATGATGTTCAATTTAGTTTGT CGGTACACTTATGAAATTC



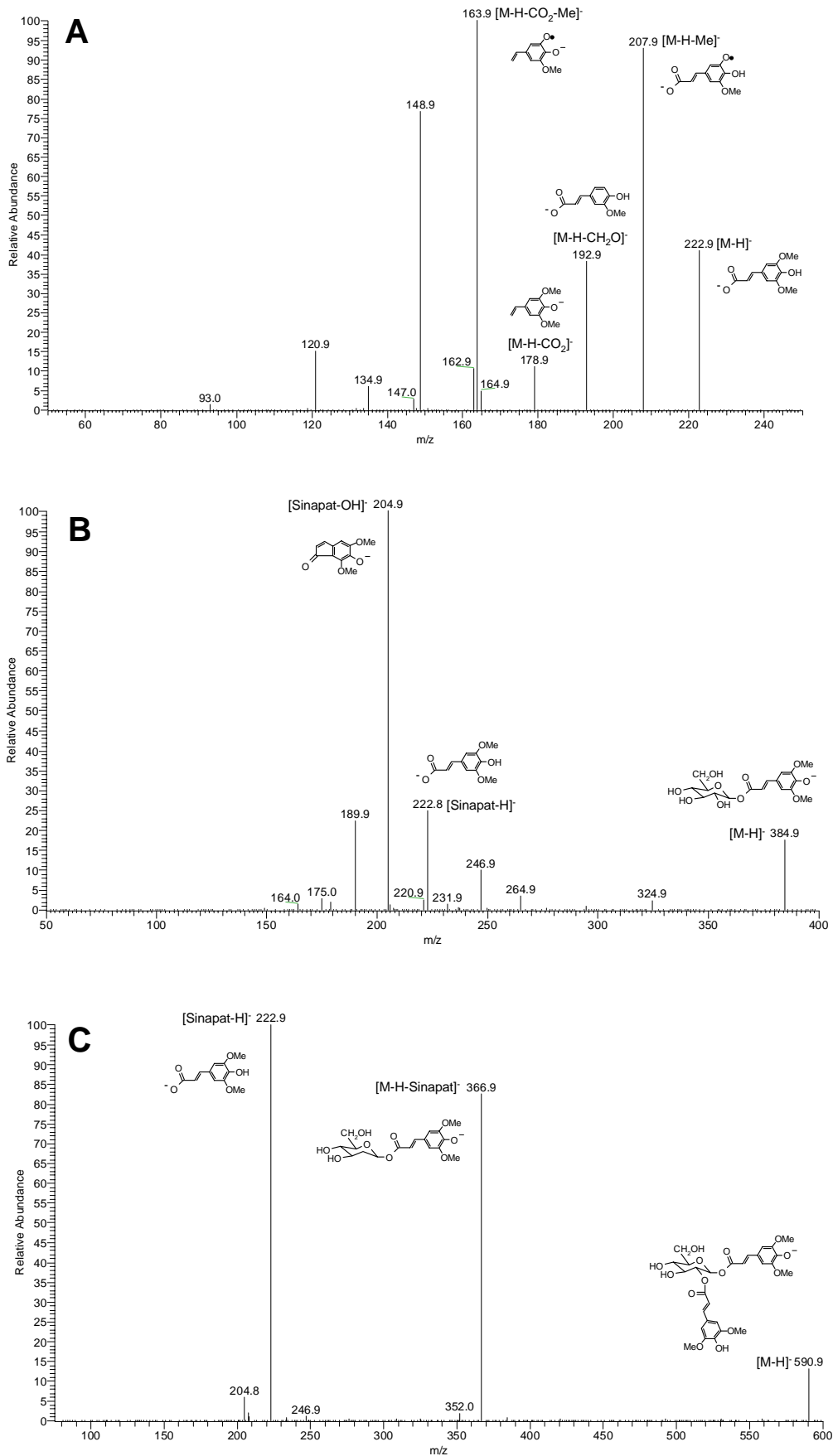
**Abb. A1** Sequenzvergleich der Arabidopsis *SMT*-cDNA (*AtSMT*) und der *codon usage* optimierten cDNA (*ySMT*) für die Expression in *S. cerevisiae*

<i>AtSMT</i> (original)	1	ATGAGTTTGAAAAATAAGTTCTGCTTCTGCTTGTCTTGTATCATCATGTTGATTCTGCCTCTATCGTCA
<i>ySMT</i> (optimiert)	1	ATGTCCTTAAAGATTAAAGTTCTTATTATTGTTGGTTTGTATCATCATGTTGATTCTGCCTCTATTTGTTA
<i>AtSMT</i> (original)	71	AGTTTCCTCCGTTTGGAGGCGCTCTCCCTTTCGAACTTGAAACCAGGTTACATTGGTATTGGTGAGGA
<i>ySMT</i> (optimiert)	71	AGTTTTGCCAGGTTTTGAAGGTCATTGCCATTTGAATTGAAACTGGTTATATTGGTATTGGTGAAGA
<i>AtSMT</i> (original)	141	CGAGAAATGTCAAATTTTTCTACTATTTTCATCAAATCTGAAAACAATCCAAAAGAAGATCCCTCTTTATA
<i>ySMT</i> (optimiert)	141	TGAAAACGTTCAATTTTTCTATTATTTTCATTAAATCAGAAAACAAATCCAAAAGGAAGATCCATTGTTGATT
<i>AtSMT</i> (original)	211	TGGTTAAATGGAGGACCTGGATGTTCTTGTCTTGGTGGTATTATTTTTGAGAACGGACCGGTGGGTTTGA
<i>ySMT</i> (optimiert)	211	TGGTTAAATGGTGGTCTCTGGTTGTTCTTGGTTGGTATTATCTTCGAAAATGGTCCAGTTGGTTTAA
<i>AtSMT</i> (original)	281	AGTTTGAGGTGTTCAACGGAAAGTGCTCCTCTTTGTTCTTACTACATATTCATGGACAAAGATGGCAAA
<i>ySMT</i> (optimiert)	281	AGTTCGAAGTTTTAATGGTCTGCTCCATCTTTGTTTTCTACTACTTATTCTTGGACTAAAATGGCTAA
<i>AtSMT</i> (original)	351	CATTATATTCCTTGGATCAGCCAGTAGGATCTGGCTTCTCCTACTCAAAAACCTCCAATTGATAAAAAGGTT
<i>ySMT</i> (optimiert)	351	CATTAATTTCTTGGATCAACCAGTTGGTCTGGTTTTCTTATCTAAAACCTCCAATTGATAAAAAGGTT
<i>AtSMT</i> (original)	421	GACATAAGTGAAGTAAAGAGGACCCATGAGTTTCTTCAAAAAGTGGCTAAGCAGGCATCCACAATATTTCT
<i>ySMT</i> (optimiert)	421	GATATTTCTGAAGTTAAGAGAACAATGAAATTTTTACAAAATGGTTGTCAAGACATCCACAATACTTTTT
<i>AtSMT</i> (original)	491	CCAACCCCTTATATGTTGTTGGAGATTCTTATTCGGTATGATTGTCCCGGCCCTCGTTCAAGAAATCTC
<i>ySMT</i> (optimiert)	491	CTAATCCATTATACGTTGTTGGTGAATCTTATTCGGTATGATTGTTCCAGCTTTGGTTCAAGAGATTTT
<i>AtSMT</i> (original)	561	ACAAGGAAATATATATGTTGCGAACCTCCTATAAATCTACAGGGTTATATGCTTGGAAACCCGTAAACA
<i>ySMT</i> (optimiert)	561	TCAAGGTAATTAATTTGTTGTAACCAACCAATTAACCTTCAAGGTTACATGTTGGGTAATCCAGTTACT
<i>AtSMT</i> (original)	631	TATATGGACTTTGAACAAAACCTCCGCATTCCATATGCTTATGGTATGGGATTAATCTCTGACGAAATCT
<i>ySMT</i> (optimiert)	631	TATATGGATTTTGAACAAAATTTTCCAGATACCATACGCATACCGGAATGGGTTAAATTTCTGATGAAATTT
<i>AtSMT</i> (original)	701	ATGAGCCAATGAAGAGAATCTGCAACGGAAATTAATTAACAATGTGGATCCATCTAACACACAATGTTTGAA
<i>ySMT</i> (optimiert)	701	ACGAACCAATGAAGAGAAATTTGTAATGGTAAATTAATTAACAATGTGGATCCATCTAACTCAATGTTTGAA
<i>AtSMT</i> (original)	771	ACTTACTGAAGAATATCATAAAGTGCACTGCCAAAATAAATATCCATCACATATTAACACCAGATTGCGAT
<i>ySMT</i> (optimiert)	771	ATTGACAGAGGAATATCATAAAGTGACTGCTAAGATTAACATTCATCATATTTTACTCCAGATTGTGAT
<i>AtSMT</i> (original)	841	GTAACCAATGTAACATCTCCTGATTGTTATTATTATCCATATCATCTCATTGAATGTTGGGCTAACGACG
<i>ySMT</i> (optimiert)	841	GTTACAAATGTTACTTCTCCAGATTGTTATTACTATCCATATCATTGATTGAATGTTGGGCAACGATG
<i>AtSMT</i> (original)	911	AGAGCGTTCCGGAAGCTCTTCATATTGAAAAGGGTAGTAAAGGAAAATGGGCGCGATGTAATCCGACTAT
<i>ySMT</i> (optimiert)	911	AATCTGTTAGAGAAGCATTGCATATTGAAAAGGTTCTAAAGGTAATGGGCTAGATGTAATAGAACTAT
<i>AtSMT</i> (original)	981	TCCATACAATCACGCATTGTAAGCAGCATACCATATCACATGAATAACAGCATCAGTTGGATACCGATCT
<i>ySMT</i> (optimiert)	981	TCCATACAATCACGATATTGTTCTTCTATTCCATATCACATGAACAATCTATTTCTGGTTACAGATCT
<i>AtSMT</i> (original)	1051	CTTATTTACAGTGGTGTACACGCATCGCGTCCCTTTTCTTGCAACTCAAGCCTGGATAAAGATCTCTCA
<i>ySMT</i> (optimiert)	1051	TTGATTTATTTCTGGTGACCATGATATTGCTGTTCCATTTTGGCTACTCAAGCATGGATTAGATCTTTAA
<i>AtSMT</i> (original)	1121	ATTACTCCCCATTATAACTGGAGGCCATGGATGATAAAACAATCAAATCGCTGGATACACGAGAGCTTA
<i>ySMT</i> (optimiert)	1121	ACTATTTCCCTATTATAATTTGGAGGCCATGGATGATTAAACAATCAAATTTGCTGGTTATACTAGAGCTTA
<i>AtSMT</i> (original)	1191	TTCCAATAAGATGACATTTGCTACTATCAAAGGAGTGGACACACGGCAGAGTATAGACCAACGAGACC
<i>ySMT</i> (optimiert)	1191	TTCTAACAAAATGACTTTTCTACTATTAAGGTTGGTGGTCATACAGCAGAAATACAGACCAAAATGAAACT
<i>AtSMT</i> (original)	1261	TTTATCATGTTCCAAAGGTGGATCAGTGGCCAAACCCTGTAA
<i>ySMT</i> (optimiert)	1261	TTCATATGTTTCAAAGATGGATTTCTGGTCAACCATTGTAA

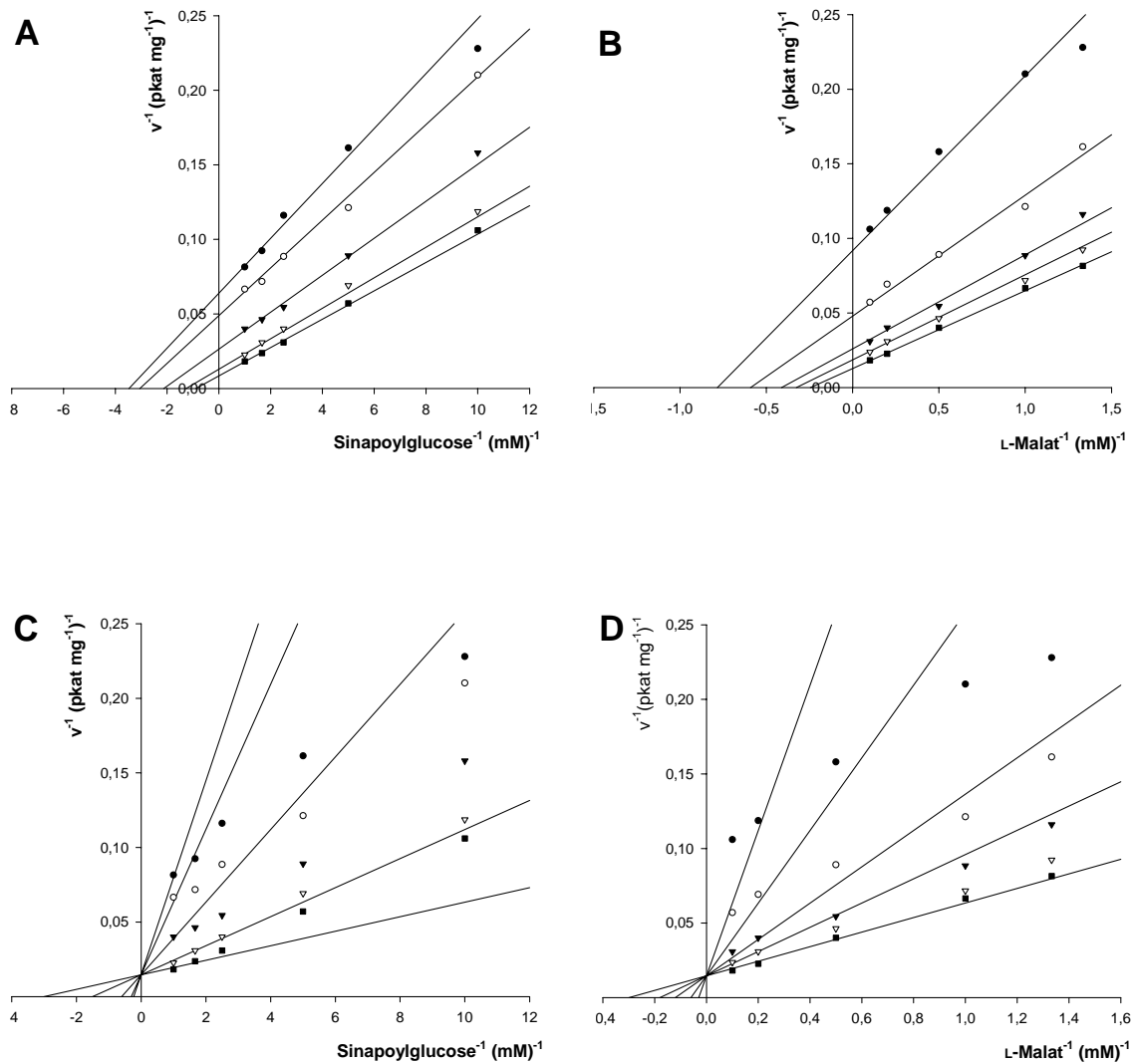
**Abb. A2** Bi-phasige  $v/s$ -Plots der SMT Reaktion in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0). Beispielhaft sind die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der Sinapoylglucose-Konzentration in Gegenwart 1mM (○) und 2mM (△) L-Malat gezeigt.



**Abb. A3** ESI-CID Massenspektren von **A** Sinapinsäure, **B** Sinapoylglucose und **C** 1,2-Disinapoylglucose aus einem SMT-Assays bei pH 6,0, in dem lediglich Sinapoylglucose als Substrat vorlag.



**Abb. A4** Lineweaver-Burk Plots der SMT Reaktion erstellt mit dem Enzymkinetik-Tool der SigmaPlot Software. **(A & B)** Anpassung an einen *random*-bi-bi-Mechanismus mit erzwungenem Schnittpunkt. **(C & D)** Anpassung an einen *ordered*-bi-bi-Mechanismus mit erzwungenem Schnittpunkt. Enzymaktivität in Abhängigkeit der Sinapoylglucose-Konzentration in Gegenwart von 0,75 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM L-Malat in **(A & C)** und in Abhängigkeit der L-Malat-Konzentration in Gegenwart von 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM und 1 mM Sinapoylglucose in **(B & D)**.



## PUBLIKATIONSLISTE

### PUBLIKATIONEN:

**Stehle F, Brandt W, Milkowski C & Strack D.** (2006). Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism. *FEBS Lett* **580**: 6366-6374.

**Stehle F, Stubbs MT, Strack D & Milkowski C.** (2008). Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. *FEBS J* **275**: 775-787

**Stehle F, Brandt W, Schmidt J, Milkowski C & Strack D.** (2008). Activities of Arabidopsis sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like sinapoyltransferases. *Phytochemistry* **69**: 1826-1832.

### VORTRÄGE:

**Stehle Felix.** Heterologous Protein Expression of a Plant Acyltransferase. ISC, 2<sup>nd</sup> IPK Student Conference, 30. Mai – 01. Juni 2006, Gatersleben

**Stehle Felix, Milkowski Carsten, Stubbs Milton T. und Strack Dieter.** Structure-function relationships of SCPL-acyltransferases. 5<sup>th</sup> Colloquium of Priority Program SPP 1152, Evolution of metabolic Diversity, 7. – 8. Juni 2006, Halle

**Stehle Felix.** From Hydrolases to Acyltransferases: Heterologous Protein Expression of a Plant Acyltransferase. 9<sup>th</sup> Heart of Europe Meeting on Bio-Crystallography (HEC), 25. – 27. September 2006, Teistungenburg

**Stehle, Felix.** Towards the Mystery of Being no Hydrolase of a Serine-Carboxypeptidase-like Acyltransferase, 3<sup>rd</sup> Plant Science Student Conference, 5. – 8. Juni 2007, Halle

**Stehle Felix, Milkowski Carsten, Stubbs Milton T. und Strack Dieter.** Structure-function relationships of SCPL-acyltransferases. 7<sup>th</sup> Colloquium of Priority Program SPP 1152, Evolution of metabolic Diversity, 3. – 4. April 2008, Halle

## POSTER:

**Stehle Felix, Milkowski Carsten, Stubbs Milton T. und Strack Dieter.** From hydrolases to acyltransferases: Structure-function relationships of SCPL-acyltransferases from plant phenylpropanoid pathway. 2<sup>nd</sup> Colloquium of Priority Program SPP 1152, Evolution of metabolic Diversity, 23. – 14. Oktober 2003, Halle

**Schmidt Diana, Stehle Felix, Strack Dieter und Milkowski Carsten.** From Hydrolases to acyltransferases: Serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant phenylpropanoid metabolism, Botanikertagung 5. – 10. September 2004, Braunschweig

**Stehle Felix, Milkowski Carsten, Stubbs Milton T. und Strack Dieter.** From hydrolases to acyltransferases: Structure-function relationships of SCPL-acyltransferases from plant phenylpropanoid pathway. 4<sup>th</sup> Colloquium of Priority Program SPP 1152, Evolution of metabolic Diversity, 16. – 17. Februar 2005, Halle

**Stehle Felix, Milkowski Carsten, Stubbs Milton T. und Strack Dieter.** From hydrolases to acyltransferases: Structure-function relationships of SCPL-acyltransferases from plant phenylpropanoid pathway. 6<sup>th</sup> Colloquium of Priority Program SPP 1152, Evolution of metabolic Diversity, 1. – 2. Februar 2006, Halle

**Stehle Felix, Milkowski Carsten und Strack Dieter.** Von Hydrolasen zu Acyltransferasen: Die Sinapoylglucose:Malat-Sinapoyltransferase des pflanzlichen Phenylpropanstoffwechsels. 20. Irseer Naturstofftage, 20. – 22. Februar 2008, Irsee

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Angaben

Name: Felix-Oliver Stehle  
Geburtsdatum: 19.01.1977  
Geburtsort: Darmstadt  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Grashalmstr. 22  
06120 Halle

## Werdegang

1983 - 1987 Grund- & Hauptschule Wäschenbeuren  
1987 - 1996 Gymnasium Ehingen/Donau  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
11/1996 - 08/1997 Grundwehrdienst im Heeresfliegergeschwader in Laupheim  
10/1997 - 09/2002 Biochemie Studium an der Martin-Luther Universität  
Halle / Wittenberg  
Abschluss: Diplom Biochemiker  
Diplomarbeit am Institut für Biochemie,  
Arbeitsgruppe Enzymologie:  
Charakterisierung der Varianten H481A und H103A  
des Enzyms Transketolase aus *S. cerevisiae*  
11/2000 – 05/2001 Wissenschaftl. Hilfskraft am Institut für Biotechnologie, Halle  
01/2003 – 03/2003 Wissenschaftl. Mitarbeiter am Institut für Biochemie,  
Arbeitsgruppe Enzymologie, Halle  
05/2003 – 08/2008 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie,  
Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle  
ab 09/2008 Wissenschaftl. Mitarbeiter am Leibniz-Institut für  
Pflanzenbiochemie, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrads bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, 28 August 2008



## DANKE

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Strack für das Vertrauen in meine Arbeit, die zahlreichen Anregungen und nicht zuletzt die mit unter temperamentvollen Diskussionen, die immer eine Bereicherung waren und zu neuen Denkanstößen anregten.

Bei Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs möchte ich mich ebenso herzlich bedanken, dass er mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglichte. Die vielen hilfreichen Tipps und Diskussionen haben zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Ein großer Dank auch an Herrn Dr. Carsten Milkowski für die Betreuung des interessanten Themas, die vielen Anstöße und Ideen, sowie die Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation. Zudem Danke für die großen Freiheiten, die er mir gewährt hat, sowie die Anregung zum selbständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten.

Herrn PD Dr. Wolfgang Brandt danke ich für die Erstellung der Modellstruktur und der aufgebrauchten Geduld mit meinen unzähligen Sonderwünschen.

Danke an Herrn Dr. Alfred Baumert für die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen rund um die HPLC, sowie die Bereitstellung wertvoller Standardsubstanzen und an Herrn PD Dr. Thomas Vogt für viele nützliche Ratschläge.

Herrn Dr. Jürgen Schmidt danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen. Bei Dr. Andreas Gesell und Dr. Doreen Floß möchte ich mich für die Hilfe und Anleitung der Expression in Tabakblättern bzw. Insektenzellen bedanken und bei Dr. Narendar K. Khatri und Kathrin Schröder-Tittmann für die Unterstützung bei der Anzucht der Hefezellen in einem Bioreaktor. Herrn PD Dr. Stephan König danke ich für die konstruktive Diskussion bezüglich des Reaktionsmechanismus.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Sekundärstoffwechsel möchte ich mich für eine sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit und die vielen kleinen Tipps und Tricks die einem den Laboralltag vereinfachen bedanken. Einen besonderen Dank an Dr. Diana Weier, Dr. Dirk Meißner und Kathleen Clauß für die einmalige Teamatmosphäre und an Sylvia Vetter für die hervorragenden RNA-Präparationen.

Ein riesiger Dank gilt Claudia Horn für die tägliche Arbeitsunterstützung und die nette gemeinsame Zeit im kleinen Labor.

Die „Aufbauhilfe“ in Form von frustbewältigenden Kaffeepausen mit Stephan, Diana, Dirk und Franzi geleitete mich durch die lange Durststrecke des wissenschaftlichen Alltags und motivierte mich immer wieder aufs Neue. Nicht zu vergessen die vielen netten gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors. Schön, dass Ihr immer Zeit hattet, wenn man Euch gebraucht hat. Danke!

Lieben Dank an Dr. Dörte Adolph für die ständige Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit, sowie die Hilfe bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack für sein Engagement beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein liebes Dankeschön auch an Franziska Leich, die sich streckenweise durch dieses Werk gekämpft und somit dazu beigetragen hat, ihm den finalen Schliff zu verpassen.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Helga und Manfred Stehle, von ganzem Herzen für die immerwährende Unterstützung. Danke, dass Ihr nie aufgehört habt an mich zu glauben!

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms 152 (Evolution metabolischer Diversität) gefördert und teilweise vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle finanziert.