

Untersuchung der katalytischen Eigenschaften  
Tropinonreduktase-ähnlicher kurzkettiger  
Dehydrogenasen/Reduktasen aus Brassicaceen

DISSERTATION

Zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Pharm. Nicole Reinhardt  
geb. am 01.07.1983 in Zittau.

Gutachter/in:

Prof. Dr. Birgit Dräger

Prof. Dr. Wolfgang Kreis

Priv.-Doz. Dr. Hauke Lilie

Halle (Saale), den 02.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
Verzeichnis der verwendeten Enzymabkürzungen .....	VII
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
Abbildungen und Tabellen im Anhang .....	X
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Tropinonreduktasen und Tropinonreduktase-ähnliche SDRs</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Funktionale Tropinonreduktasen .....	4
1.2.2 Tropinonreduktase-ähnliche SDRs – Definition .....	5
1.2.3 Verbreitung von TRL Genen im Pflanzenreich.....	6
1.2.4 Oxidoreduktasen als anwendbare Biokatalysatoren .....	8
<b>1.3 Aufgabenstellung</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	13
2.1.2 Leerplasmide.....	13
2.1.3 Kits.....	13
2.1.4 Enzyme .....	14
2.1.5 Kulturmedien für <i>E. coli</i> .....	14
2.1.6 Oligonukleotid-Primer .....	15
2.1.7 Chemikalien .....	16
2.1.8 Puffer und Reagenzien.....	19
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	22
2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	22
2.2.3 Reverse Transkription .....	23
2.2.4 Polymerasekettenreaktion .....	23
2.2.4.1 PCR mit Pfu DNA Polymerase .....	23
2.2.4.2 Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase.....	24
2.2.4.3 Mutagenese-PCR.....	25
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.2.6 TA-Klonierung .....	26
2.2.7 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien .....	26
2.2.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien .....	26
2.2.9 Flüssigkultur und Plasmidpräparation.....	27
2.2.10 Glycerolkultur .....	27
2.2.11 DNA-Sequenzierung .....	27
2.2.12 Gelextraktion .....	27
2.2.13 Herstellung rekombinanter Synthesevektoren .....	27
<b>2.3 Biochemische Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Bakterielle Proteinsynthese .....	28
2.3.2 Bakterienlyse.....	29
2.3.3 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatografie .....	29
2.3.3.1 Vorversuch - Reinigung mit Nickel-Spin-Säulen .....	29
2.3.3.2 Chromatografisches System.....	30
2.3.3.3 Umpufferung von Proteinen.....	30
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
2.3.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese .....	31
2.3.6 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen .....	32
2.3.6.1 Analytische Gelfiltration .....	32

2.3.6.2	Analytische Ultrazentrifugation .....	33
2.3.7	Quantifizierung der Bindung von NADPH an Proteine .....	34
2.3.7.1	Fluoreszenztitration .....	34
2.3.7.2	Isotherme Titrationskalorimetrie .....	34
<b>2.4</b>	<b>Aktivitätsbestimmung.....</b>	<b>36</b>
2.4.1	Fotometrische Aktivitätsbestimmung .....	36
2.4.1.1	Prinzip der Messung.....	36
2.4.1.2	Aktivitätsmessung mit dem Zweistrahlphotometer .....	37
2.4.1.3	Aktivitätsmessung mit dem Mikroplatten-Lesegerät.....	38
2.4.2	Qualitative Analyse der Reaktionsprodukte .....	40
2.4.2.1	Synthese von Standards für die qualitative Produktanalyse.....	40
2.4.2.2	Qualitativer Produktnachweis mit GC-MS .....	41
2.4.2.3	Analyse der Reduktionsprodukte von (-)- $\alpha$ -Thujon mit NMR.....	44
2.4.2.4	Qualitativer Produktnachweis mit HPLC-DAD.....	45
<b>2.5</b>	<b>Methoden der Bioinformatik.....</b>	<b>46</b>
2.5.1	Datenbanken und Computerprogramme .....	46
2.5.2	Phylogenetische Analyse .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung von <i>trl</i>-Sequenzen aus <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i>.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Isolierte RNA aus pflanzlichem Material .....	48
3.1.2	Amplifizierung von <i>trl</i> -Sequenzen .....	48
3.1.3	Synthesevektoren für TRL Proteine.....	49
3.1.3.1	Synthesevektoren mit Vollängen-cDNA .....	49
3.1.3.2	Verkürzungsmutante und ortgerichtete Mutagenese von <i>at2g29260</i> .....	50
<b>3.2</b>	<b>Synthese und Reinigung der TRL Fusionsproteine.....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Bestimmung des nativen Molekulargewichts der TRL Proteine .....	52
3.2.2	Quantifizierung der Bindung von NADPH an -61NAt2g29260 .....	54
3.2.2.1	Fluoreszenztitration .....	54
3.2.2.2	Isotherme Titrationskalorimetrie .....	55
<b>3.3</b>	<b>Aktivitätsbestimmung.....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Bestimmung der pH-Optima .....	56
3.3.2	Cosubstratakzeptanz und -präferenz.....	58
3.3.3	Reduktion von Tropinon und Analoga .....	60
3.3.4	Reduktion kleiner lipophiler Carbonyle .....	62
3.3.5	Reduktion zyklischer Terpene und Analoga .....	69
3.3.6	Reduktion von Jasmonaten.....	77
3.3.7	Oxidoreduktion von Steroiden und Sterolen .....	82
3.3.8	Reduktion von Flavonoiden.....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Besonderheiten des Proteins At2g29260 .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Quartärstruktur der TRL Proteine .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3</b>	<b>Katalytische Eigenschaften der TRL Enzyme .....</b>	<b>95</b>
4.3.1	pH-Optima für Reduktion und Oxidation .....	95
4.3.2	Cosubstratakzeptanz und -präferenz.....	97
<b>4.4</b>	<b>Substratvielfalt und -akzeptanz der TRL Enzyme .....</b>	<b>101</b>
4.4.1	TRL Enzyme sind keine Tropinonreduktasen .....	104
4.4.2	Reduktion kleiner lipophiler Carbonyle .....	106
4.4.3	Stereospezifische Reduktion zyklischer Terpene und Analoga.....	109
4.4.4	Reduktion von Jasmonaten.....	111
4.4.5	Selektive Oxidoreduktion von Steroiden .....	115
4.4.6	Reduktion von Flavonoiden .....	119
<b>4.5</b>	<b>Evolution und Funktion der TRL Proteine.....</b>	<b>121</b>
<b>4.6</b>	<b>TRL Enzyme für biotechnologische Anwendungen .....</b>	<b>124</b>

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>146</b>
	<b>Wissenschaftliche Beiträge .....</b>	<b>161</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>162</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>163</b>
	<b>Biografische Angaben.....</b>	<b>164</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Aa	<i>Artemisia annua</i>
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	molare Konzentration
Ca	<i>Capsicum annuum</i>
CDCl <sub>3</sub>	deutrieretes Chloroform
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CDS	codierende Sequenz
C-His	His-Tag am C-Terminus
Cl	<i>Cuphea lanceolata</i>
Co	<i>Cochlearia officinalis</i>
Cr	<i>Capsella rubella</i>
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatografie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dn	<i>Dendrobium nobile</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DQFCOSY	Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy
Ds	<i>Datura stramonium</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ε	spezifischer Absorptionskoeffizient

FPLC	Proteinflüssigchromatografie
g	Fallbeschleunigung oder Gramm
GC	Gaschromatografie
h	Hill-Koeffizient
HEYNH.	Heynhold
His-Tag	Hexahistidin-Anhang
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
Hn	<i>Hyoscyamus niger</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatografie
IPB	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K'	Substrataffinität berechnet mit der Gleichung nach Hill ( $\neq K_m$ )
k. A.	keine Angabe
kat	Katal (1 kat = 1 mol/s)
$k_{cat}$	Wechselzahl, katalytische Konstante
$K_i$	Hemmkonstante
$K_m$	Michaelis-Menten Konstante
konz.	konzentriert
L.	Linné
Lsg.	Lösung
M	Molarität (mol/l) oder molare Masse (g/mol)
m	Masse
MCS	Multiple Cloning Site, multiple Klonierungsstelle
M-MLV	Moloney murines Leukämie-Virus
Mp	<i>Mentha x piperita</i>
Mw	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
mTP	mitochondriales Transitpeptid
n	Anzahl der Einzelbestimmungen
$NaBH_4$	Natriumborhydrid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NEB	New England Biolabs
N-His	His-Tag am N-Terminus
NIST	Nationales Institut für Standard und Technologie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernmagnetresonanz
Nr.	Nummer
NTES-Puffer	NaCl-Tris-EDTA-SDS-Puffer
$OD_{600}$	Optische Dichte bei 600 nm

Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
Ox.	Oxidation
p.a.	<i>pro analysi</i> , für analytische Zwecke
Pb	<i>Papaver bracteatum</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PDB	RCSB Protein Data Bank
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Ph. Eur.	<i>Pharmakopoea Europaea</i> , Europäisches Arzneibuch
pK <sub>a</sub>	Säuredissoziationskonstante
Pos.	Position
ppm	parts per million
Priv.-Doz.	Privatdozent
puriss.	reinst
Red.	Reduktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
Sd	<i>Solanum dulcamara</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	Signalpeptid (sekretorischer Weg)
St	<i>Solanum tuberosum</i>
T7-Tag	Aminosäure-Anhang zur Proteinreinigung mit monoklonalen Antikörpern
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TFB-Puffer	Transformationspuffer
TIC	Total Ion Count, Totalionenstrom
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
t <sub>ret</sub>	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (1 U = 1 µmol/min)
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigchromatografie
UV	ultraviolettes Licht
v	spezifische Aktivität
V	Volumen oder Volt
VIS	visible, sichtbarer Bereich des Lichtspektrums
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, maximale spezifische Aktivität

**Verzeichnis der verwendeten Enzymabkürzungen**

ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADH	Alkoholdehydrogenase
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
CR	Carbonylreduktase
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IR	Isopiperitenonreduktase
JAR1	JASMONATE RESISTENT 1, Jasmonat-Konjugat-Synthase
KR27	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reduktase
MDH	Mannitoldehydrogenase
MLCR	Carbonylreduktase aus Mäuselunge
MMR	Menthon:Menthol Reduktase
MNR	Menthol:Neomenthol Reduktase
PTR1	Pteridinreduktase
Red1	Oxidoreduktase 1
SalR	Salutaridinreduktase
SDR	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
SOR	Sophorolreduktase
TR	Tropinonreduktase
TRI	tropinbildende Tropinonreduktase
TRII	pseudotropinbildende Tropinonreduktase
TRL	Tropinonreduktase-ähnliche SDR
VR	Vestitonreduktase



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Gliederung der SDR-Superfamilie .....	1
Abb. 2	Homologie-Modell von At2g29350 mit dem Cosubstrat NADPH.....	2
Abb. 3	Postulierter Reaktionsmechanismus der 3 $\beta$ /17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase	3
Abb. 4	Schema eines geordneten bi-bi-Reaktionsmechanismus für klassische SDRs...	4
Abb. 5	Reduktion von Tropinon .....	5
Abb. 6	<i>A. thaliana</i> Chromosomenkarte mit TRL Genloci.....	6
Abb. 7	Phylogenetischer Baum der TRLs aus <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> .....	7
Abb. 8	Schema des geplanten Arbeitsflusses in Kooperation mit Juliane Fischer .....	11
Abb. 9	Reaktionsschema – Oxidoreduktasereaktion .....	36
Abb. 10	Absorptionsspektren von NADPH und NADP .....	36
Abb. 11	NADPH-Kalibriergerade .....	38
Abb. 12	Berechnung des Faktors für die Volumenaktivität.....	38
Abb. 13	Elektropherogramme zur Kontrolle der Pfu-PCR.....	48
Abb. 14	Alignment von At2g29260 und deren Mutanten (ClustalW2) .....	51
Abb. 15	Auswertung der analytischen Gelfiltration von TRL Proteinen .....	52
Abb. 16	Elektropherogramm der nichtreduzierenden SDS-PAGE .....	53
Abb. 17	Festlegung der Emissionsdifferenzmaxima .....	55
Abb. 18	Auswertung Fluoreszenztitration .....	55
Abb. 19	ITC-Auswertung: Bindung von NADPH an -61NAt2g29260.....	56
Abb. 20	pH-Optima der Reduktion.....	57
Abb. 21	pH-Optima der Oxidation.....	58
Abb. 22	Substratsättigungskurven für die Reduktion von Chinuclidin-3-on .....	61
Abb. 23	Reduktion von Pentanal und 2,4-Dimethylpentan-3-on .....	63
Abb. 24	Umsatz von Citronellal, Citral und Nerol.....	65
Abb. 25	Reduktion von Benzaldehyd.....	66
Abb. 26	Reduktion von <i>p</i> -Anisaldehyd.....	67
Abb. 27	Oxidoreduktion von Indol-3-carbaldehyd und Indol-3-carbinol .....	68
Abb. 28	Oxidoreduktion von Methylcyclohexanon/ol.....	69
Abb. 29	Oxidoreduktion von 4-Methylcyclohexanon/ol durch CoTR .....	71
Abb. 30	Oxidoreduktion von (-)-Menthon und (+)-Neomenthol/(-)-Menthol .....	72
Abb. 31	Reduktion von (-)- $\alpha$ -Thujon und (-)-Carvon .....	73
Abb. 32	Reduktion von (-)-Fenchon.....	74
Abb. 33	Oxidoreduktion von (+)-Campher und (-)-Borneol .....	75
Abb. 34	Reduktion von 1,4-Cyclohexandion.....	77
Abb. 35	Reduktion von (-)-Jasmonsäure und ( $\pm$ )-Jasmonsäure.....	79
Abb. 36	Reduktion von Methyljasmonat .....	80
Abb. 37	Reduktion von Methyl-dihydrojasmonat.....	81
Abb. 38	C17 Oxidoreduktion von Androsten-Derivaten .....	84
Abb. 39	C20 Reduktion von Pregnen-Derivaten .....	85
Abb. 40	Reduktion von Flavonoiden.....	88
Abb. 41	Import kerncodierter Proteine in den Chloroplasten.....	89
Abb. 42	Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments von SDRs mit cTP .....	91
Abb. 43	Darstellung oligomerer SDR-Kristallstrukturen (PyMol) .....	93
Abb. 44	Sequenzalignment der TR/TRL-Cosubstratbinderegion .....	98
Abb. 45	Homologiemodell von At2g29330 mit NADPH.....	101
Abb. 46	Sequenzalignment der TR/TRL-Substratbinderegion .....	105
Abb. 47	Hypothetischer Verlauf der Biosynthese von Methylindol-3-carboxylat.....	108
Abb. 48	Metabolismus von (-)-Jasmonsäure .....	112
Abb. 49	Reaktionen pflanzlicher Flavonoid 4-Reduktasen (SDR108E).....	120
Abb. 50	Phylogenetischer Baum von TRs/TRLs und funktionell ähnlichen SDRs.....	122

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Patente der Firma Daicel zu biokatalytischen Synthesen mit TRI.....	8
Tab. 2	Vergleich der Aminosäuresequenzidentität der ausgewählten TRL Proteine.....	10
Tab. 3	Verwendete <i>E. coli</i> Bakterienstämme.....	13
Tab. 4	Verwendete bakterielle Leerplasmide.....	13
Tab. 5	Kits für Arbeiten mit Nukleinsäuren und Proteinen .....	13
Tab. 6	Verwendete Enzympräparationen .....	14
Tab. 7	Verwendete Kulturmedien für <i>E. coli</i> .....	14
Tab. 8	Verwendete Oligonukleotid-Primer .....	15
Tab. 9	Verwendete Laborchemikalien .....	16
Tab. 10	Feinchemikalien für die Substratakzeptanzuntersuchung.....	17
Tab. 11	Verwendete Puffer und Reagenzien.....	19
Tab. 12	Spezifische Absorption von Nukleinsäuren.....	22
Tab. 13	Reverse Transkription – Bedingungen und Ablauf.....	23
Tab. 14	Pfu-PCR – Zusammensetzung und Ablauf.....	24
Tab. 15	Kolonie-PCR – Zusammensetzung und Ablauf .....	24
Tab. 16	Mutagenese-PCR – Zusammensetzung und Ablauf.....	25
Tab. 17	Ligationsbedingungen der TA-Klonierung .....	26
Tab. 18	Bedingungen für den Restriktionsverdau.....	28
Tab. 19	Ligation zum Synthesevektor – Zusammensetzung und Ablauf.....	28
Tab. 20	Parameter der HisTrap HP-Säule.....	30
Tab. 21	Verwendete Lagerungspuffer .....	30
Tab. 22	Zusammensetzung des Acrylamidgels für die SDS-PAGE .....	31
Tab. 23	Coomassie-Färbung – Zusammensetzung und Ablauf.....	32
Tab. 24	Parameter für die analytische Gelfiltration .....	32
Tab. 25	Standardproteinset MW-GF-200 für die Gelfiltration.....	33
Tab. 26	Bedingungen der analytischen Ultrazentrifugation.....	33
Tab. 27	Bedingungen der Fluoreszenztitration .....	34
Tab. 28	Zusammensetzung des Standardreaktionsansatzes .....	37
Tab. 29	Puffer für pH-Optima .....	39
Tab. 30	Cosubstrate und Substrate für kinetische Charakterisierungen .....	40
Tab. 31	Chemische Reduktion mit NaBH <sub>4</sub> .....	41
Tab. 32	Verwendete GC-MS Programme.....	42
Tab. 33	Zusammensetzung des Flavonoid-Reaktionsansätze .....	45
Tab. 34	HPLC-Methode für Flavonoide .....	45
Tab. 35	Standardsubstanzen für die Flavonoid-HPLC.....	46
Tab. 36	Stationäre Computerprogramme .....	46
Tab. 37	Datenbanken und Computerprogramme im Internet.....	47
Tab. 38	Verwendete Gesamt-RNA-Proben .....	48
Tab. 39	Ergebnisse der Transit-/Signalpeptid-Vorhersage für At2g29260 .....	50
Tab. 40	Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen im Vergleich .....	53
Tab. 41	Kinetische Parameter der Reduktion mit Cosubstrat NAD(P)H.....	59
Tab. 42	Kinetische Parameter der Oxidation mit Cosubstrat NAD(P) .....	59
Tab. 43	Tropinon und Analoga.....	61
Tab. 44	Kinetische Parameter der Reduktion von Pentanal und Dimethylpentanon .....	64
Tab. 45	Kinetische Parameter für Umsatz von Citronellal und Nerol .....	64
Tab. 46	Kinetische Parameter der Reduktion von Methylcyclohexanon .....	69
Tab. 47	Kinetische Parameter der Oxidation von Methylcyclohexanolen.....	70
Tab. 48	Kinetische Parameter der Oxidoreduktion von Monoterpenen.....	75
Tab. 49	Von CoTR und TRLs nicht umgesetzte Terpene .....	76
Tab. 50	Von TRLs nicht umgesetzte Jasmonate .....	82
Tab. 51	Oxidoreduktion von Steroiden und Sterolen .....	83
Tab. 52	Reduktion von Flavonoiden.....	86
Tab. 53	Oligomere Tropinonreduktasen .....	94
Tab. 54	pH-Optima von Tropinonreduktasen für Tropinon/Tropin.....	95

Tab. 55	Cosubstrat-Unterfamilien klassischer SDRs nach Kallberg et al., 2002 .....	97
Tab. 56	Cosubstratakzeptanz der TRLs und weiterer SDRs .....	99
Tab. 57	Nummerierung der untersuchten TRLs und CoTR .....	101
Tab. 58	TRL-Substratspektrum im Vergleich mit CoTR .....	102
Tab. 59	Reduktion von Tropinon durch rekombinante Solanaceen TRs .....	104
Tab. 60	Substratinhibition bei SDR Enzymen .....	107
Tab. 61	Stereospezifität der Monoterpenreduktion für CoTR und TRLs .....	110
Tab. 62	Menthonreduzierende SDRs (SDR114C) .....	110
Tab. 63	Organismen mit natürlichem Vorkommen von Cucurbinsäure-Derivaten .....	114
Tab. 64	Biotransformation exogener Steroide durch Pflanzen(zellkulturen) .....	117
Tab. 65	Verfügbare Brassinosteroide für die Substratakzeptanzuntersuchung .....	119

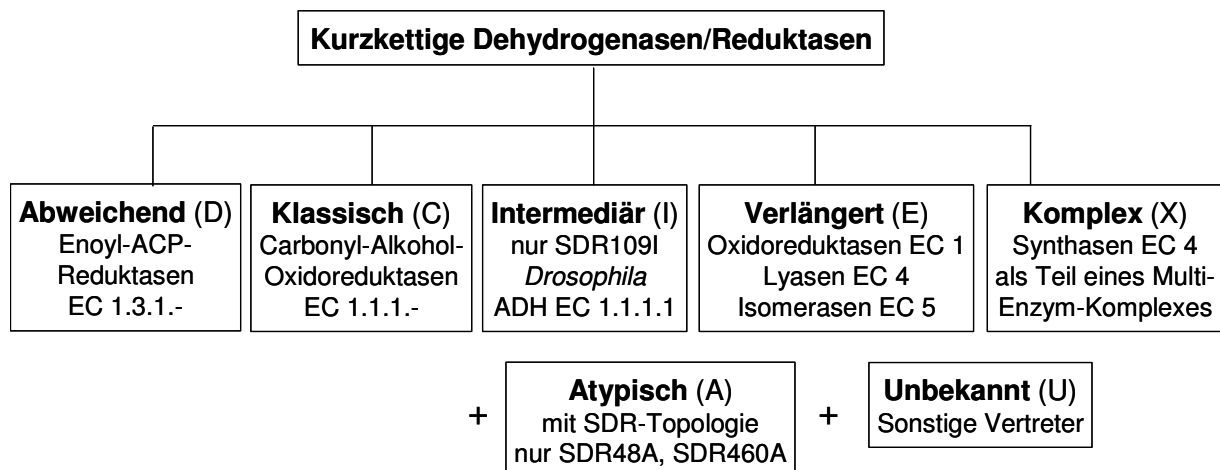
### Abbildungen und Tabellen im Anhang

Abb. A1	Elektropherogramme (SDS-PAGE) der gereinigten Fusionsproteine .....	138
Abb. A2	Substratsättigungskurven für die Cosubstrate NAD(P)(H) .....	139
Abb. A3	Substratsättigungskurven für kleine aliphatische Carbonyle/Alkohole .....	140
Abb. A4	Substratsättigungskurven für Methylcyclohexanone/ole .....	141
Abb. A5	Substratsättigungskurven für Monoterpene .....	142
Abb. A6	Reduktion von 2-Decalon .....	145
Tab. A1	SDR Enzyme mit bekanntem geordneten bi-bi-Reaktionsmechanismus .....	127
Tab. A2	Übersicht über eine Auswahl bekannter pflanzlicher TRLs .....	128
Tab. A3	Vektorkarten und Eigenschaften der Fusionsproteine .....	135
Tab. A4	<sup>13</sup> C- und <sup>1</sup> H-NMR Daten für (-)- $\alpha$ -Thujon und Reduktionsprodukte in CDCl <sub>3</sub> .....	143
Tab. A5	Retentionszeiten und Hauptfragmente der Reduktionsprodukte (GC-MS) .....	144
Tab. A6	Retentionszeiten und Hauptfragmente der Oxidationsprodukte (GC-MS) .....	145

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen

Die Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) umfasst mehr als 47.000 annotierte Primärsequenzen in Aminosäure- und Gen-Datenbanken (Kallberg et al., 2010) und ca. 300 Kristallstrukturen in der Proteindatenbank PDB (Berman et al., 2000). SDR Enzyme kommen in allen Lebensformen von Archaeen über Bakterien bis hin zu Eukaryoten vor. Die Sequenzidentität zwischen den einzelnen Mitgliedern der Enzymfamilie liegt durchschnittlich bei 20-30 %. Eine Unterteilung und Gliederung der SDR-Mitglieder in ein strukturiertes Nomenklatur-System erschien notwendig. Auf der Grundlage von Unterschieden in Sequenzmotiven (z. B. aktives Zentrum, Cosubstratbinderegion), Sequenzlänge (ca. 250-350 Aminosäuren) und Aktivität wurden die SDR Enzyme in 5 + 2 Untergruppen gegliedert (Kallberg et al., 2002; Persson et al., 2009) (Abb. 1).



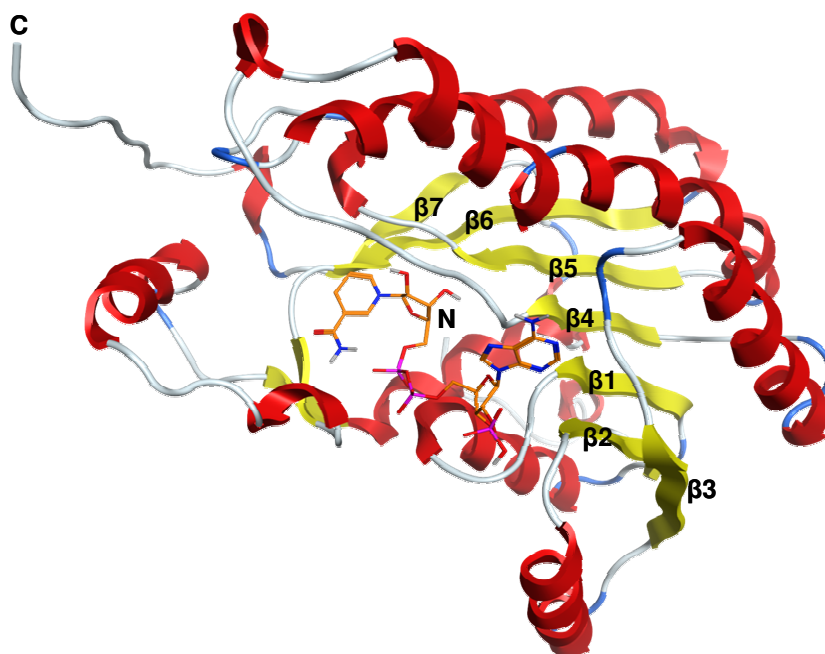
**Abb. 1 Gliederung der SDR-Superfamilie**

Abbildung modifiziert nach Kavanagh et al., 2008 und Persson et al., 2009.

Eine internationale SDR-Nomenklaturinitiative (Kallberg et al., 2010; Persson et al., 2009) unter Federführung von Yvonne Kallberg, Bengt Persson (beide Linköping Universität und Karolinska Institut, Schweden) und Udo Oppermann (University of Oxford, Großbritannien) erstellte ein Nomenklatursystem beruhend auf Aminosäuresequenzvergleichen unter Verwendung von „Hidden Markov“-Modellen ([www.sdr-enzymes.org](http://www.sdr-enzymes.org), (Kallberg et al., 2010)). Seit Juli 2012 liegt eine zweite aktualisierte Version der SDR-Datenbank vor. Beginnend mit den 47 menschlichen SDR-Familien werden die Familien absteigend nach der Anzahl ihrer Mitglieder beziffert und mit einem Buchstaben für die Untergruppe versehen (siehe Abb. 1 in Klammern). Zum Beispiel umfasst die Familie SDR1E UDP-Glucose 4-Epimerasen, die zu den verlängerten („extended“) SDRs mit 5305 bekannten Vertretern in Mensch, Eukaryoten, Bakterien und Archaeen gehören.

Es folgen 27 Familien mit Vertretern in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen, 90 Familien mit Vorkommen in Eukaryoten und Bakterien, 16 Familien, deren Vertreter ausschließlich in Bakterien und Archaeen zu finden sind und weitere 66 Familien mit eukaryotischen SDR-Sequenzen. Den Abschluss bilden 217 rein bakterielle SDR Familien. Insgesamt kann so die große Zahl von aktuell 463 verschiedenen SDR-Familien mit Hilfe von „Hidden Markov“-Modellen differenziert werden.

Die klassischen SDRs, mit einer durchschnittlichen Länge von 250 Aminosäuren, bilden die größte Untergruppe der SDRs in Eukaryoten und Bakterien. Sie gehören meist zu den NAD(P)(H)-abhängigen Carbonyl-Alkohol-Oxidoreduktasen (Kavanagh et al., 2008), die von der Enzymkommission mit der Nummer EC 1.1.1.- bezeichnet werden.

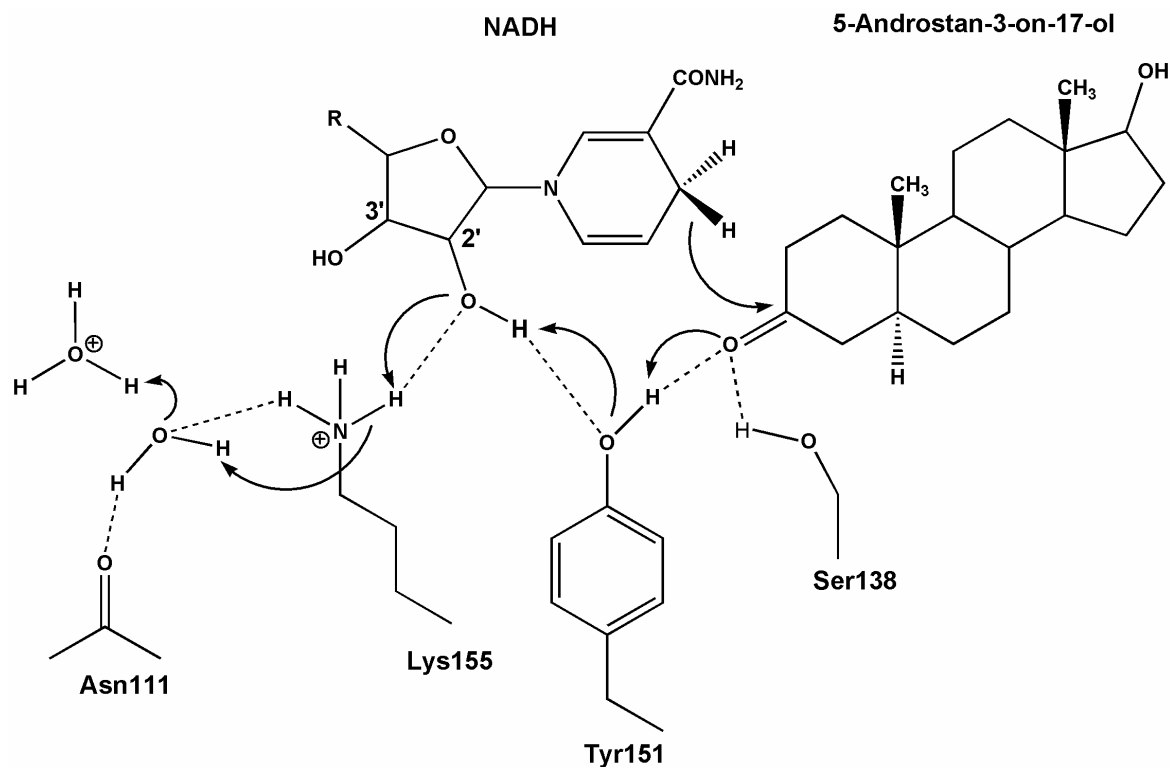


**Abb. 2 Homologie-Modell von At2g29350 mit dem Cosubstrat NADPH**

Das Modell basiert auf der Kristallstruktur der *Datura stramonium* TRII (PDB-Eintrag: 1IPE). Modell und Abbildung wurden von Juliane Fischer mit YASARA (Krieger et al., 2004) bzw. MOE (Molecular Operating Environment, 2011.10; Chemical Computing Group Inc., 2011) erstellt.

Trotz geringer Sequenzidentität untereinander zeigen die klassischen SDRs einige Gemeinsamkeiten. Die dreidimensionale Struktur entspricht einer Rossmann-Faltung (Rossmann et al., 1974) mit einem zentralen aus 7 Segmenten bestehenden  $\beta$ -Faltblatt (Abb. 2,  $\beta 1 - \beta 7$  gelb), das auf beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices (Abb. 2, rot) flankiert wird. Die Sekundärstruktur der SDRs ist somit durch die alternierende Abfolge von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices geprägt. Diese Faltung ist typisch für dinukleotidbindende Enzyme. Im N-terminalen Bereich ist die Cosubstratbinderegion mit dem glycinreichen Motiv TGxxxGxG lokalisiert. Die Präferenz für NAD(H) oder NADP(H) wird durch einzelne Aminosäuren in diesem Motiv und am C-terminalen Ende des zweiten  $\beta$ -Faltblattes ( $\beta 2$ ) festgelegt (Kallberg et al., 2002).

Eine weitere Gemeinsamkeit der klassischen SDRs ist die katalytische Triade aus Serin, Tyrosin und Lysin, die auch zur katalytischen Tetrade mit Asparagin erweitert werden kann (Filling et al., 2002; Oppermann et al., 2003) (Abb. 3). Die Aminosäure Serin bindet das Substrat über eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff. Tyrosin fungiert als katalytische Säure, deren Proton bei der Reduktion auf den Carbonyl-Sauerstoff des Substrats übertragen wird. Lysin verringert durch ein System von Wasserstoffbrückenbindungen (Protonen-Relay-System) den  $pK_a$ -Wert des Tyrosins und erleichtert die Protonenübertragung. Das konservierte Asparagin bindet ein Molekül Wasser über die Peptidcarbonyl-Funktion und ermöglicht so eine Protonenübertragung auf das Wassermolekül (Abb. 3). Bei den SDRs wird meist das 4 pro-S Hydrid des reduzierten Nikotinamidrings auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats übertragen (Kavanagh et al., 2008). Es entstehen in äquimolaren Anteilen Alkohol und oxidiertes Cosubstrat NAD(P) als Produkte der Reduktion.



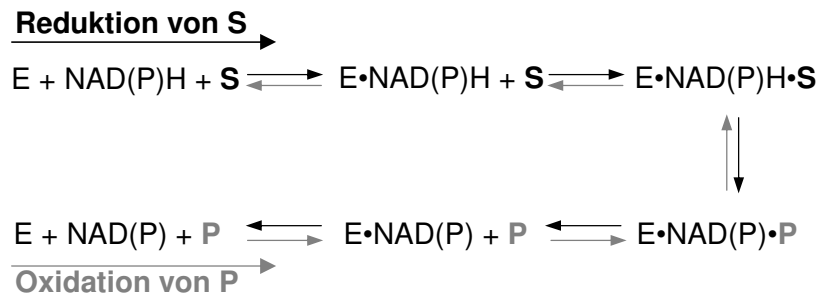
**Abb. 3 Postulierter Reaktionsmechanismus der 3β/17β-Hydroxysteroiddehydrogenase**

Abbildung modifiziert nach Filling et al., 2002. Gestrichelte Linien symbolisieren Wasserstoffbrückenbindungen, die Pfeile deuten das Protonen-Relay-System an; R, Adenosindiphosphat.

Die katalytischen Aminosäuren der SDRs befinden sich im C-terminalen Bereich in räumlicher Nähe zum Nikotinamid-Ring des Cosubstrats. Der C-terminale Bereich ist sehr variabel und bedingt das breite Substratspektrum, angefangen von aliphatischen Alkoholen und Zuckern über Alkaloid-Vorstufen zu Steroiden und Xenobiotika.

Der bekannteste Reaktionsmechanismus klassischer und auch intermediärer SDRs ist der geordnete bi-bi-Mechanismus (Tab. A1; Anhang). Dabei bindet das Cosubstrat zuerst an das

Enzym (erster binärer Komplex) und wird zuletzt aus dem zweiten binären Komplex, bestehend aus Enzym und verbrauchtem Cosubstrat, freigesetzt (Abb. 4).



**Abb. 4 Schema eines geordneten bi-bi-Reaktionsmechanismus für klassische SDRs**

Abbildung modifiziert nach Benach et al, 1999 und Sahni-Arya et al., 2007. E, Enzym; S, Substrat der Reduktion; P, Produkt der Reduktion; nähere Erläuterungen im Text.

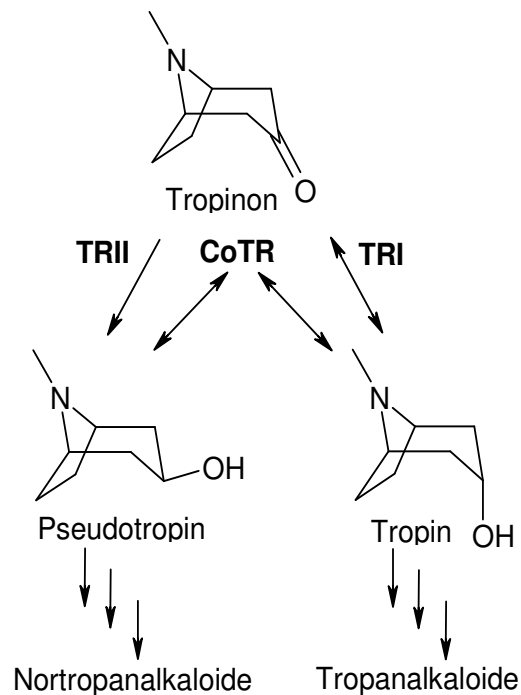
Kristallisationsexperimente mit der Tropinonreduktase II aus *Datura stramonium* (SDR65C, EC 1.1.1.236) legen nahe, dass auch die enzymatische Katalyse der Tropinonreduktion einem geordneten bi-bi Reaktionsmechanismus folgt, bei dem zuerst NADPH gebunden wird. In der Arbeitsgruppe um Nakajima und Yamashita wurden das Protein DsTRII allein (PDB-Eintrag: 2AE1), der binäre Komplex aus TRII und NADPH (E•NADPH; 1IPE), sowie der ternäre Substrat-Komplex aus TRII, NADPH und Tropinon (E•NADPH•S; 1IPF) und der ternäre Produkt-Komplex aus TRII, NADP und Pseudotropin (E•NADP•P; 2AE2) kristallisiert (Nakajima et al., 1998; Yamashita et al., 1999; Yamashita et al., 2003). Während der Entstehung des ternären Komplexes DsTRII•NADPH•Tropinon aus DsTRII•NADPH und Tropinon in einer Durchflusszelle, wurden die Reaktionsphasen mit UV/VIS-Spektroskopie verfolgt. Die gemessene Abnahme der Absorption bei 340 nm bestätigte den Ablauf der enzymatisch katalysierten Reduktion des Tropinons unter Oxidation des Cosubstrats NADPH (2.4.1.1) (Yamashita et al., 2003).

## 1.2 Tropinonreduktasen und Tropinonreduktase-ähnliche SDRs

### 1.2.1 Funktionale Tropinonreduktasen

Tropinonreduktasen (TRs) gehören zu den klassischen SDRs. Sie sind verantwortlich für die entscheidende Verzweigung im Biosyntheseweg von Tropanalkaloiden (z. B. Hyoscyamin, Scopolamin) und Nortropanalkaloiden (Calystegine) am Punkt der Reduktion des Ketons Tropinon (Dräger, 2006). Diese Verzweigung resultiert aus dem Vorkommen zweier stereospezifischer Tropinonreduktasen, der tropinbildenden TR (TRI, EC 1.1.1.206, Produkt 3 $\alpha$ -Tropanol) und der pseudotropinbildenden TR (TRII, EC 1.1.1.236; Produkt 3 $\beta$ -Tropanol). Beide Enzyme wurden bereits in diversen Solanaceen-Arten (z. B. *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *Anisodus acutangulus*, *Solanum dulcamara*, *Solanum tuberosum*) entdeckt. In *Calystegia sepium*, einem Vertreter der eng verwandten Nachbarfamilie

Convolvulaceae, wurde bisher nur die Gensequenz einer TRI gefunden. Die Vertreter beider Pflanzenfamilien enthalten entweder Tropanalkaloide (z. B. Hyoscyamin, Scopolamin) und Nortropanalkaloide (Calystegine) oder nur Nortropanalkaloide (*Solanum*, *Calystegia*). Für beide Tropinonreduktasen aus *Datura stramonium*, mit 64 % Aminosäuresequenzidentität zueinander, existieren gut aufgelöste Kristallstrukturen im Komplex mit Tropinon und NADPH für DsTRII (PDB-Eintrag: 1IPF) und im Komplex mit NADP für DsTRI (PDB-Eintrag: 1AE1)



**Abb. 5 Reduktion von Tropinon**

(Nakajima et al., 1998).

Die Brassicaceae *Cochlearia officinalis* enthält sowohl das Tropanalkaloid Cochlearin (Liebisch et al., 1973) als auch die Calystegine A5, B3 und B2 (Brock et al., 2006). Andrea Brock gelang es, ein Gen mit 54 % Nukleinsäureidentität zu *dstrI* und *dstrII* aus Blatt-RNA von *C. officinalis* zu amplifizieren (Brock et al., 2008). Das codierte Enzym, genannt CoTR, katalysierte *in vitro* die Reduktion von Tropinon zu Tropin und Pseudotropin. Auch war es in der Lage, die Oxidation beider Alkohole zurück zum Keton Tropinon zu katalysieren. Das ist eine neue Eigenschaft, da bislang nur die enzymatische Oxidation von Tropin zu Tropinon durch die TRI bekannt war (Abb. 5).

### 1.2.2 Tropinonreduktase-ähnliche SDRs – Definition

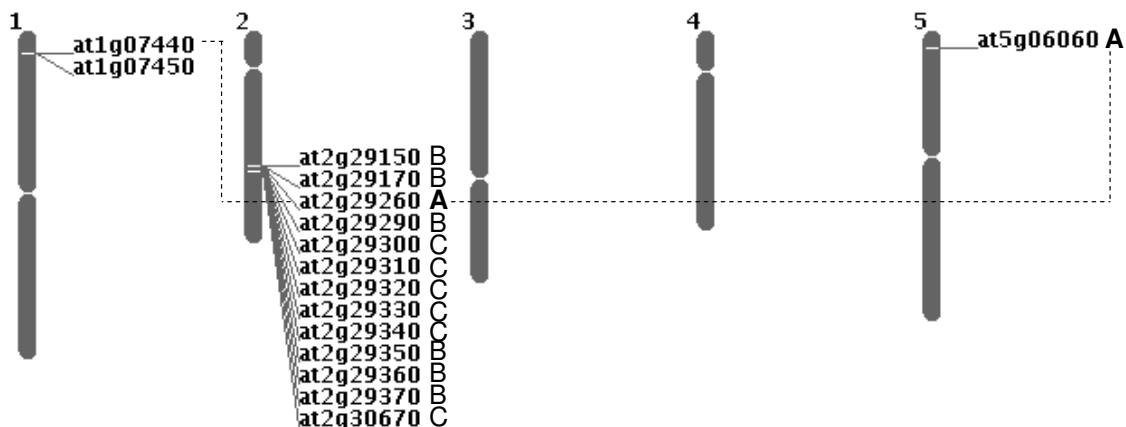
Interessanterweise lassen sich im Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) 16 Gene mit hoher Sequenzidentität ( $\geq 50\%$ ) zu bekannten Tropinonreduktasen aus Solanaceen finden. In der UniProt-Datenbank tragen sie Bezeichnungen wie „putative tropinone reductase“, „tropine dehydrogenase“ oder „TRI“. Allerdings enthält *A. thaliana* weder Tropanalkaloide noch Calystegine (Brock et al., 2006). Eine Funktion als Tropinonreduktase erscheint für die codierten Enzyme somit eher unwahrscheinlich. Die SDR-Nomenklaturinitiative fasst diese TR-ähnlichen Sequenzen auf Grund von Aminosäuresequenzvergleichen („Hidden Markov“-Modelle) mit den funktionalen Tropinonreduktasen unter der Familienbezeichnung SDR65C zusammen. Die Familie enthält klassische SDRs mit Vertretern in Eukaryoten und Bakterien und hat aktuell insgesamt 303 Mitglieder. Im Folgenden werden diese Gene als Tropinonreduktase-ähnlich (TR-like = TRL) und die resultierenden Proteine als TRL Proteine/Enzyme bezeichnet. Da die Genloci für die TRL Gene in *A. thaliana* bekannt und eindeutig zuzuordnen sind, werden sie in dieser Arbeit



als Bezeichnung für die Gene (z. B. *at5g06060*) und die zugehörigen codierten Proteine (z. B. At5g06060) verwendet.

### 1.2.3 Verbreitung von TRL Genen im Pflanzenreich

TRL Gene sind im Pflanzenreich weit verbreitet. So lassen sich in zahlreichen pflanzlichen Genomen, unabhängig vom Vorkommen von (Nor-)Tropanalkaloiden, TRL Gene finden (Beispiele siehe Tab. A2 im Anhang). Aura Navarro-Quezada untersuchte das Auftreten und die molekulare Evolution der TRLs innerhalb der Brassicaceen (Navarro-Quezada, 2007). In *Arabidopsis thaliana* sind 12 der 16 TRL Gene in Tandem auf Chromosom 2 angeordnet, zusätzlich liegt ein weiteres Gen (Locus *at2g30670*) auf diesem Chromosom (Abb. 6). Blanc und Mitarbeiter erforschten die Duplikation von Genabschnitten („Genblöcke“) im Genom von *A. thaliana* (Blanc et al., 2003). Sie stellten eine frühzeitige Genduplikation zwischen Abschnitten auf Chromosom 5 (mit Locus *at5g06060*) und Chromosom 2 fest (mit Locus *at2g29260*), die vermutlich nach der Trennung von Mono- und Dikotelydonae auftrat. Die beiden Gene *at5g06060* und *at2g029260* bilden innerhalb der TRL Gene von *A. thaliana* das sogenannte phylogenetisch alte Cluster A (Navarro-Quezada, 2007).



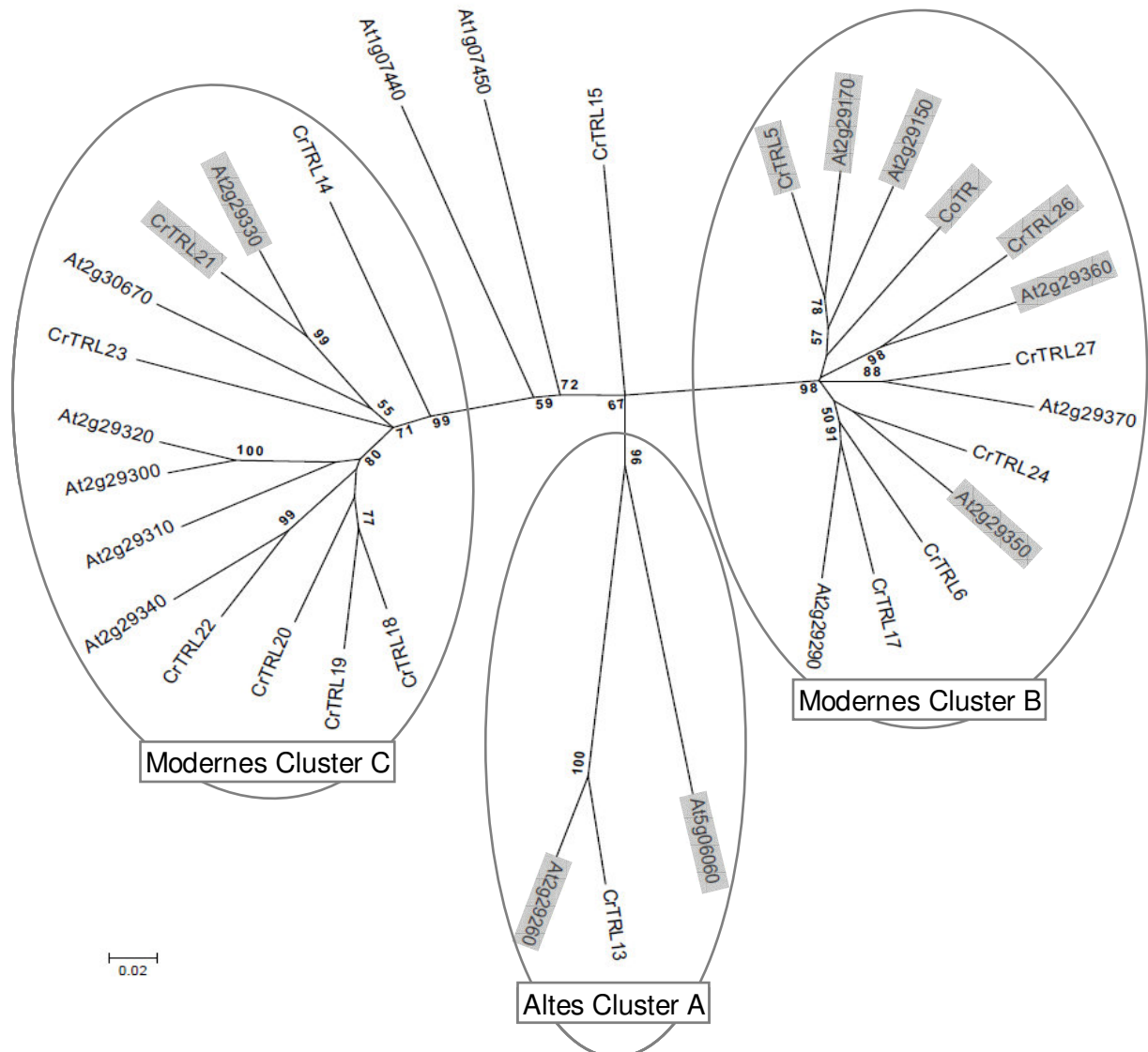
**Abb. 6** *A. thaliana* Chromosomenkarte mit TRL Genloci

Die Buchstaben hinter den Loci bezeichnen die Zuordnung zu den drei Clustern (siehe Abb. 7). Gestrichelte Linien verdeutlichen duplizierte Gene auf verschiedenen Chromosomen.

Eine zweite unabhängige Genduplikation zwischen Chromosom 2 (mit Locus *at2g29260*) und Chromosom 1 (mit Locus *at1g07440*), vermutlich nach der Trennung der Arten *A. thaliana* und *Brassica rapa* vor ca. 24-40 Mio. Jahren, führte zu den TRL Genen *at1g07440* und *at1g07450* auf Chromosom 1.

Orthologe Gene zum *A. thaliana* TRL Gencluster auf Chromosom 2 wurden im Genom weiterer Brassicaceen-Arten durch Sequenzierung von Bibliotheken bakterieller artifizierender Chromosomen (BAC) entdeckt (Navarro-Quezada, 2007). Das Vorkommen von TRL Genen ist für folgende Brassicaceen nachgewiesen: *Arabidopsis lyrata* (13 TRL Gene), *A. ceibennensis* (mindestens 6 TRL Gene), *Capsella rubella* (15 TRL Gene) und *Boechera divaricarpa* (11 TRL Gene). Ebenso enthält ein Vertreter der eng verwandten Familie

Cleomaceae, *Cleome spinosa*, 8 TRL Gene (siehe Tab. A2, Anhang). Auch die mit dem Raps eng verwandte Art *Brassica rapa* (Rübsen) enthält mindestens 3 TRL Gene. Abb. 7 zeigt die phylogenetischen Beziehungen der codierten TRL Proteine aus *A. thaliana* und *C. rubella*, im Vergleich zu CoTR.



**Abb. 7 Phylogenetischer Baum der TRLs aus *A. thaliana* und *C. rubella***

Der Baum wurde mit MEGA 5 für bekannte TRL Aminosäuresequenzen aus *A. thaliana* und *C. rubella* im Vergleich zu CoTR erstellt (nach Methode 2.5.2). Die Zuordnung der Sequenzen zu den Clustern erfolgte nach Navarro-Quezada, 2007.

Die Zahlen an den Verzweigungen entsprechen Bootstrap-Werten  $\geq 50\%$ . Die grau unterlegten TRLs, sollten in der Promotion bearbeitet werden.

### 1.2.4 Oxidoreduktasen als anwendbare Biokatalysatoren

Optisch-aktive Alkohole sind wichtige Ausgangsstoffe oder Intermediate verschiedenster Synthesen in der chemischen Industrie (z. B. für Geruchs- und Geschmacksstoffe) und der pharmazeutischen Industrie (Wirkstoffe). Sie werden entweder durch chemische Reduktion oder durch enzymatisch katalysierte Reduktion prochiraler Ketone erzeugt (Patel, 2008). Meist wird für die anschließende Synthese ein chiraler Alkohol in enantiomerenreiner Form benötigt. Biokatalysatoren zeichnen sich durch eine hohe Stereospezifität für die betreffende Reaktion und gleichzeitig durch ein breites Substratspektrum aus. Oxidoreduktasen bieten als natürlich vorkommende Biokatalysatoren enorme Möglichkeiten für die sogenannte asymmetrische Synthese optisch-aktiver Alkohole. Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, rekombinante Bakterien), Pflanzenzellkulturen und geschnittenes Pflanzenmaterial, sowie isolierte rekombinante Enzyme werden für biokatalytische Synthesen eingesetzt (Matsuda et al., 2009). Inzwischen werden Oxidoreduktasen auch in Form von Screening-Kits für die Forschungs- und Entwicklungsabteilungen chemisch-pharmazeutischer Betriebe angeboten, z. B. das KRED Panel<sup>®</sup> von Codexis (~ 300 Ketoreduktasen in 96 Well-Platten) und das Chiralscreen Biocatalyst<sup>®</sup> Kit von Daicel.

Die japanische Firma Daicel besitzt außerdem mehrere Patente auf enzymatisch katalysierte Synthesen chiraler Alkohole unter Einsatz der Tropinonreduktase I aus den Pflanzen *Datura stramonium* und *Hyoscyamus niger* (beide Solanaceae) (Tab. 1).

**Tab. 1 Patente der Firma Daicel zu biokatalytischen Synthesen mit TRI**

Patentnummer	Patenthalter	Katalysierte Reaktion	Enzyme	Jahr
<b>EP1318200 (A2)</b> Daicel Chem. Japan	Yamamoto, H., Ueda, M.; Ritsuzui, P., Hamatani, T.	3-Chinuclidinon → ( <i>R</i> )-3-Chinuclidinol	HnTRI, DsTRI	2003
<b>JP2004075561 A</b> Daicel Chem. Japan	Yamamoto, H.; Kimoto, K.; Nishikawa, K.	Benzoylformamide → ( <i>R</i> )-Mandelamide	HnTRI, DsTRI	2004
<b>WO2007142210 (A1)</b> Daicel Chem. Japan	Hayashi, M., Nikaido, T., Yamamoto, H.	1,1,1-Triflouraceton → ( <i>S</i> )-Triflour-2-propanol	HnTRI, DsTRI, weitere Oxido- reduktasen	2007
<b>JP2007189923 A</b> Daicel Chem. Japan	Kimoto, K., Yamamoto, H.	<i>N</i> -Benzyl-3-pyrrollidinon → ( <i>R</i> )- <i>N</i> -Benzyl-3-pyrrollidinol	HnTRI, DsTRI	2007
<b>JP2007176838 A</b> Daicel Chem. Japan	Mitsubishi, K., Yamaguchi, H.	3-Chinuclidinon → ( <i>R</i> )-3-Chinuclidinol (Extraktion des Produkts)	DsTRI	2007

Die Vorteile biokatalytischer Synthesen liegen auf der Hand. Sie verlaufen unter milden Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur (20–30 °C) und Atmosphärendruck in wässrigen Pufferlösungen oder Nährmedien. Das gewünschte Produkt (*R*- oder *S*-Alkohol) kann enantiomerenrein produziert und leicht isoliert werden, und die anfallenden Abfälle sind ungiftig und bioabbaubar (Biomasse). Die Biokatalyse ist somit ein zukunftsweisendes und umweltfreundliches Verfahren für die chemische und pharmazeutische Industrie.

### 1.3 Aufgabenstellung

Im Genom der Modellpflanze *A. thaliana* liegen 16 verschiedene TRL Gene vor, die Pflanze enthält aber weder Tropanalkaloide noch Calystegine (Nortropanalkaloide) (Brock et al., 2006). Durch ein weiteres Brassicaceen-Sequenzierungsprojekt in der nächsten benachbarten Gattung *Capsella* (Joint Genome Institute, Programm CSP 2006), liegen Teile des Genoms des diploiden Vertreters *Capsella rubella* (Rötliches Hirtentäschel) bereits entschlüsselt vor und stehen der Forschung zur Verfügung. Bei der Sequenzierung von BAC-Bibliotheken identifizierte Aura Navarro-Quezada 15 verschiedene TRL Gene für *Capsella rubella* (Navarro-Quezada, 2007). In den Blüten, den Früchten, den Stängeln und den Laubblättern einer getrockneten *C. rubella* Ganzpflanze wurden jedoch keine Calystegine detektiert (Pflanzenmaterial von Dr. Markus Piotrowski, Ruhr-Universität Bochum; Träger, unveröffentlicht) und auch das Vorkommen von Tropanalkaloiden in dieser Brassicaceae ist nicht bekannt.

Warum kommen Tropinonreduktase-ähnliche Gene in den Genomen beider Modellpflanzen so zahlreich vor? Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten bestehen zwischen den Mitgliedern der verschiedenen phylogenetisch abgebildeten Cluster A, B und C bei Eigenschaften, Funktionen und katalytischer Aktivität?

Welche möglichen Funktionen übernehmen die TRL Proteine im pflanzlichen Stoffwechsel? Bieten TRL Enzyme Potential für den Einsatz als Biokatalysatoren in Synthese-Prozessen?

Diese Fragen sind von zentraler Bedeutung für die vorliegende Dissertation.

Zum Vergleich wurden TRL-Sequenzen aus *A. thaliana* (At) und *C. rubella* (Cr) ausgewählt, die aus allen drei Clustern A, B und C stammen (Tab. 2, Abb. 7 grau unterlegt). Auch CoTR, als einzige bekannte funktionale Tropinonreduktase aus Brassicaceen und Vertreter des modernen Clusters B, wurde in die Auswahl einbezogen.

Das Enzym At2g29360 wurde bereits von Andrea Brock in *E. coli* löslich hergestellt und auf katalytische Aktivität mit Tropinon und weiteren Verbindungen untersucht (Brock et al., 2008). Sie erstellte auch ein Homologiemodell des als AtSDR1 bezeichneten Proteins und versuchte durch zielgerichtete Mutagenese ein tropinonreduzierendes Enzym zu erhalten. Für das Enzym At2g29360 sollten in dieser Arbeit weitere Substrate gefunden und die

Übereinstimmung des Substratspektrums mit anderen ausgewählten TRL Enzymen untersucht werden.

**Tab. 2 Vergleich der Aminosäuresequenzidentität der ausgewählten TRL Proteine**

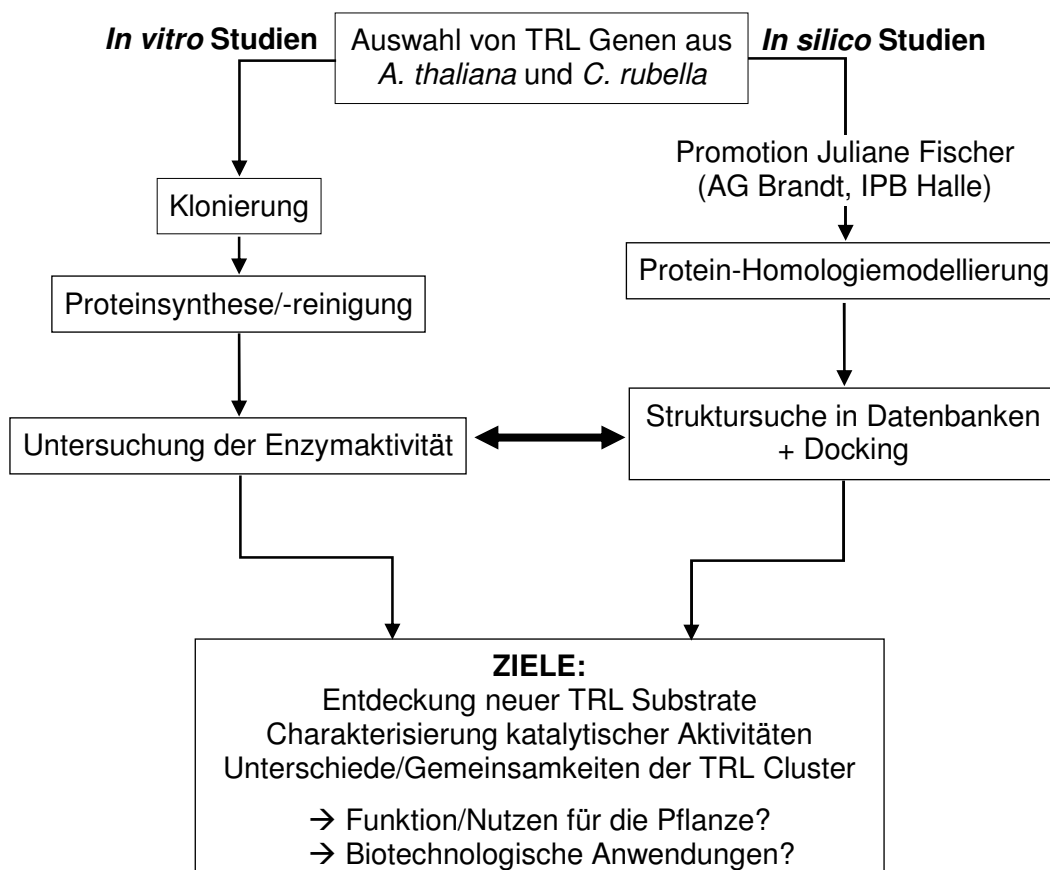
Cluster	Aminosäuresequenzidentität [%] ClustalW2	At5g06060	At2g29260	CoTR	At2g29150	At2g29170	CrTRL5	At2g29360	CrTRL26	At2g29350	At2g29330
A	At5g06060	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A	At2g29260	63	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	<b>CoTR</b>	62	56	—	—	—	—	—	—	—	—
B	At2g29150	62	58	<b>79</b>	—	—	—	—	—	—	—
B	At2g29170	62	55	<b>79</b>	83	—	—	—	—	—	—
B	CrTRL5	62	56	<b>78</b>	82	<b>87</b>	—	—	—	—	—
B	At2g29360	64	59	<b>80</b>	80	79	80	—	—	—	—
B	CrTRL26	65	60	<b>77</b>	78	76	78	<b>87</b>	—	—	—
B	At2g29350	65	56	<b>79</b>	79	80	81	79	77	—	—
C	At2g29330	64	57	61	61	61	62	65	64	63	—
C	CrTRL21	63	56	60	60	60	61	63	62	61	<b>90</b>

**Fett:** Aminosäuresequenzidentität der codierten Proteine potentiell orthologer Gene

Die Auswahl von Gensequenzen für die Klonierung und nachfolgende Synthese der Proteine in *E. coli* richtete sich zum einen auf Paare orthologer Gene mit großer Ähnlichkeit zu *cotr* (*at2g29150/at2g29170* und *crtrl5*; *at2g29360* und *crtrl26*) und zum anderen auf Gene (*at5g06060* und *at2g29260* aus altem Cluster A) und orthologe Genpaare (*at2g29330* und *crtrl21* aus modernem Cluster C) aus den drei phylogenetisch differenzierten Clustern A, B und C. Das Gen *at2g29350* erschien ebenfalls interessant, da bereits Publikationen im Zusammenhang mit erhöhten Transkripraten in verschiedenen Stadien der Blatt-Seneszenz vorlagen. Deshalb ist dieses Gen auch unter der Bezeichnung SAG13 für seneszenz-assoziiertes Gen 13 bekannt (Lohman et al., 1994; Miller et al., 1999; Weaver et al., 1998). Das codierte Protein At2g29350 zeigt mit 79 % Aminosäuresequenzidentität große Ähnlichkeit zu CoTR (Tab. 2).

Die Eckpunkte des geplanten Arbeitsflusses im Rahmen des TRL Projektes sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Das Projekt gliedert sich in zwei Zweige, von denen der biochemische Zweig (*in vitro* Studien) in dieser Arbeit verfolgt werden sollte und der bioinformatische Zweig (*in silico* Studien) die Aufgaben für die Promotion von Juliane Fischer (Diplom-Bioinformatikerin, AG Computerchemie, Priv.-Doz. Dr. Brandt, IPB, Halle (Saale)) enthält. Die Ergebnisse der *in silico* Studien wird Juliane Fischer ausführlich in ihrer Dissertationsschrift darstellen und diskutieren.

Die Aufgabenbereiche sind untereinander stark vernetzt (Doppelpfeil in Abb. 8): Diese Vernetzung beinhaltet die gegenseitige Information über neue Ergebnisse/Erkenntnisse und deren konstruktive Diskussion.



**Abb. 8 Schema des geplanten Arbeitsflusses in Kooperation mit Juliane Fischer**

Die ausgewählten TRL-Sequenzen aus *A. thaliana* und *C. rubella* aus den drei Clustern A, B und C (Tab. 2) sollten kloniert und die codierten TRL Proteine in *E. coli* synthetisiert und gereinigt werden.

CoTR, als einzige bekannte funktionale Tropinonreduktase aus Brassicaceen, diene als Referenzenzym zum direkten Vergleich der katalytischen Aktivitäten mit den TRL Enzymen. Die Eigenschaften und das Substratspektrum der TRL Proteine sollten charakterisiert und zwischen den Vertretern der verschiedenen Cluster verglichen werden. Aus Analysen der entsprechenden Aminosäuresequenzen ließen sich unterschiedliche Präferenzen für die Cosubstrate NADP(H) und NAD(H) für die Mitglieder der verschiedenen TRL Cluster ableiten (Kallberg et al., 2002). Diese Präferenzen sollten mit den rekombinanten TRL Proteinen *in vitro* überprüft werden.

Ausgehend von Carbonylverbindungen die als Substrate der Tropinonreduktasen aus Solanaceen bereits bekannt waren (z. B. Tropinon, Chinuclidinon, Piperidinone, Methylcyclohexanone), sollten die katalytischen Aktivitäten der TRLs mit denen funktionaler Tropinonreduktasen aus der gemeinsamen SDR-Familie SDR65C verglichen werden.

Da für SDR Enzyme allgemein ein breites Substratspektrum postuliert wird (Favia et al., 2008), sollten weitere Substrate für die TRL Enzyme gefunden werden. Das Docking von Homologiemodellen der TRLs mit niedermolekularen chemischen Verbindungen aus speziellen Datenbanken sollte dazu Hinweise liefern. Die chemische Struktur der Verbindungen, die als Substrate für TRLs *in vitro* identifiziert werden, sollte als Ausgangspunkt für die Suche nach ähnlichen Grundstrukturen in anderen Stoffklassen dienen.

Die katalytischen Eigenschaften, wie z. B. Substratspektrum, katalytische Aktivität und Substrataffinität, sollten für die TRL Enzyme der verschiedenen Cluster untereinander, innerhalb der Familie SDR65C, aber auch mit Enzymen anderer pflanzlicher SDR-Familien verglichen werden. Über das natürliche Vorkommen identifizierter Substrate bzw. sehr ähnlicher Verbindungen in Brassicaceen sollten Rückschlüsse über mögliche Funktionen der TRLs im Stoffwechsel der Pflanze abgeleitet werden.

Oxidoreduktasen, die ein breites Substratspektrum, gute katalytische Aktivität und Stereospezifität der Katalyse aufweisen und zusätzlich in hohen Ausbeuten heterolog synthetisiert werden, sind für die Anwendung als Biokatalysatoren in der chemischen oder pharmazeutischen Industrie geeignet. In dieser Arbeit sollten TRL Enzyme auf diese Eigenschaften untersucht werden, um ihr mögliches Potential als anwendbare Biokatalysatoren abschätzen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 3 Verwendete *E. coli* Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Verwendung
M15[pREP4] QIAGEN	Nal <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup> ; (Kan <sup>R</sup> ) [pREP4]	Synthese
Rosetta-gami (DE3) Novagen	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vul1} phoR araD139 ahpC galE galk rpsL F' [lac^+ lacI^p pro] gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam^R, Kan^R, Str^R, Tet^R)$	Synthese
XL1-Blue Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>p</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> ]	Subklonierung

#### 2.1.2 Leerplasmide

Tab. 4 Verwendete bakterielle Leerplasmide

Bezeichnung	Eigenschaften
pCR 2.1 Invitrogen	3929 bp, linearisiert, <i>lacZ</i> -Fragment, Ampicillin- /Kanamycinresistenz
pET-21d(+) Novagen	5440 bp, T7-Tag (N), His-Tag (C), Ampicillinresistenz
pQE-30 QIAGEN	3461 bp, His-Tag (N), Ampicillinresistenz

*lacZ*-Fragment,  $\beta$ -Galactosidase-Genfragment; (N), N-terminal; (C), C-terminal

#### 2.1.3 Kits

Tab. 5 Kits für Arbeiten mit Nukleinsäuren und Proteinen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Ni-NTA Spin Kit	QIAGEN	Proteinreinigung über His-Tag
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN	Plasmidisolierung
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	DNA-Extraktion aus Agarosegel
SuperScript II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen	Reverse Transkription von mRNA
TA Cloning Kit	Invitrogen	Klonierung in pCR 2.1



### 2.1.4 Enzyme

Tab. 6 Verwendete Enzympräparationen

Enzym	Konzentration	Hersteller
BamHI	10 U/ $\mu$ l	Fermentas
DNase I	5098 U/mg	AppliChem
DpnI	10 U/ $\mu$ l	Fermentas
Lysozym BioChemica	2000 U/mg	AppliChem
NcoI	10 U/ $\mu$ l	NEB
NotI	10 U/ $\mu$ l	NEB
Pfu DNA Polymerase, nativ	2,5 U/ $\mu$ l	Fermentas
PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase	2,5 U/ $\mu$ l	Stratagene
PstI	15 U/ $\mu$ l	Fermentas
Sall	10 U/ $\mu$ l	Fermentas
SphI = PaeI	10 U/ $\mu$ l	Fermentas
SuperScript II Reverse Transcriptase	200 U/ $\mu$ l	Invitrogen
T4 DNA Ligase	1 U/ $\mu$ l	Fermentas
T4 DNA Ligase	3 U/ $\mu$ l	Promega
Taq DNA Polymerase, rekombinant	1 U/ $\mu$ l	Fermentas
XmaI = Cfr9I	10 U/ $\mu$ l	Fermentas

### 2.1.5 Kulturmedien für *E. coli*

Tab. 7 Verwendete Kulturmedien für *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH-Wert 7,5
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Agar. Ein geeignetes Antibiotikum wurde gegebenenfalls zugesetzt.
SOB-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> pH-Wert 6,8 – 7,0 Magnesiumsalze wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.
SOC-Medium (nach TA Cloning Kit Manual, Invitrogen)	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
TB (Terrific Broth)-Medium	1,2 % Trypton 2,4 % Hefeextrakt 0,4 % Glycerol

## 2.1.6 Oligonukleotid-Primer

**Tab. 8** Verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und als 100 µM Lösung in DEPC-Wasser bei -20 °C gelagert. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mit OMIGA 2.0 und für die Mutageneseprimer mit dem  $T_m$ -Calculator (Stratagene) berechnet. Mutierte Triplets sind unterstrichen und Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen fett gedruckt.

Nr.	Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	$T_m$ [°C]
<b>at5g06060-N-His in pQE-30</b>				
1	At5g06060FOR	BamHI	<b>GGATCC</b> GAAACTGACAAAAGATGGTCTC	55,5
	At5g06060REV	PstI	<b>CTGCAG</b> TTAAGGCTTCATAGCATAGC	52,7
<b>at2g29260-N-His in pQE-30</b>				
2a	At2g29260FOR	SphI	<b>GCATGCG</b> TGCTTGACATGGCTTCTCAC	60,9
	At2g29260REV	XmaI	<b>CCCGGG</b> CTAATCATGTCGTGGGAAGAAACC	63,0
<b>-61Nat2g29260-N-His in pQE-30</b>				
2b	-61Nat2g29260FOR	SphI	<b>GCATGCT</b> CCAAGGAAAGATGGTCTCTCAATG	64,8
	At2g29260REV	XmaI	<b>CCCGGG</b> CTAATCATGTCGTGGGAAGAAACC	63,0
<b>-61Nat2g29260-N-His in pQE-30 Q220Y</b>				
2c	M260FOR	-	CCCTCAAGAATATGTCGGTCT <u>ACT</u> CTTCAACCAAAGGAGC	79,1
	M260REV	-	GCTCCTTTGGTTGAAGAGT <u>AG</u> ACCGACATATTCTTGAGGG	79,1
<b>cotr-C-His in pET-21d(+)</b>				
3	TRdir (Brock, 2008)	NcoI	<b>CCATGG</b> CTAATTTAAGAGAGAGCTC	61,3
	TRrev (Brock, 2008)	NotI	<b>GCGGCC</b> GCTCTTAAAGGC	60,5
<b>at2g29360-N-His in pQE-30</b>				
4	At2g29360NF (Wagner, 2011)	BamHI	<b>GGATCC</b> GCTAAGACAGGGGAAAGC	55,0
	At2g29360NR (Wagner, 2011)	Sall	<b>GTCGAC</b> TTAAGGCAGAGGCTTGAAAG	57,4
<b>crtrl26-N-His in pQE-30</b>				
5	CrTRL26FOR	BamHI	<b>GGATCC</b> GCAAAAACAGGGGAAAGC	58,3
	CrTRL26REV	Sall	<b>GTCGAC</b> TTAAGGCAGAGGTTTGTAAGAG	55,6
<b>at2g29350-N-His in pQE-30</b>				
6	At2g29350FOR	SphI	<b>GCATGCG</b> CAAAGGAAGGGGGCTTG	63,0
	At2g29350REV	PstI	<b>CTGCAG</b> TTATGGCATAGTCTTGAAGGAAAAACC	63,6
<b>at2g29150-N-His in pQE-30</b>				
7	At2g29150F (Plohmman, 2010)	BamHI	<b>GGATCC</b> GCTAAAGCAGGAGAAAACCTCGAGAG	63,2
	At2g29150R (Plohmman, 2010)	PstI	<b>CTGCAG</b> CTAAGGCTTGAAAGAGAAGCCATTC	62,9
<b>at2g29330-N-His in pQE-30</b>				
8	At2g29330F (Coppi, 2012)	BamHI	<b>GGATCC</b> GATAAAAGGTGGAGTCTCCAAG	57,0
	At2g29330R (Coppi, 2012)	Sall	<b>GTCGAC</b> CTATGGCTGATATGAGAAGCC	56,6

## 2.1.7 Chemikalien

Tab. 9 Verwendete Laborchemikalien

Substanz	Qualität	Hersteller
Aceton	chem. Rein $\geq 99,5\%$	Roth
Chloroform	DAB 9	Merck
Dimethylformamid (DMF)	$\geq 99\%$	Merck
Ethanol, unvergällt	reinst $96\%$ (V/V)	Merck
Ethanol, vergällt	$96\%$ (V/V)	Merck
Ethylacetat	$\geq 99,5\%$	Roth
Glycerol	$\geq 98\%$	Roth
Isopropanol	reinst	Roth
Methanol	$99,90\%$	Roth
n-Hexan	$\geq 99\%$ zur Synthese	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Pufferqualität $\geq 99,5\%$	AppliChem
2-Amino-2(-hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Hydrochlorid (Tris-HCl)	$\geq 99\%$	Boehringer Mannheim
Acrylamid	$\geq 99\%$	AppliChem
Agar	für die Bakteriologie	AppliChem
Agarose	peq Gold Universal	peqLab
Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	$\geq 98\%$	Serva
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	p.a. $\geq 98\%$	Merck
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Analytical grade	Serva
Ampicillin-Natrium	$\geq 99\%$	AppliChem
Bromphenolblau	research grade	Serva
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-Tetrahydrat (CaCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)	Suprapur	Merck
Citronensäure-Monohydrat	$\geq 99,5\%$	AppliChem
Coomassie Brilliant Blau G-250	$\geq 91\%$	Serva
Coomassie Brilliant Blau R-250	reinst	Serva
dATP	100 mM Lösung	Roth
dCTP	100 mM Lösung	Roth
dGTP	100 mM Lösung	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	$\geq 97\%$	AppliChem
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	$\geq 98\%$	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$\geq 99,9\%$	Sigma
Dinatriumethylendiamintetraessigsäure-Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O)	p.a. $\geq 99\%$	isocommerz
Dithiothreitol (DTT)	$\geq 99,5\%$	AppliChem
dTTP	100 mM Lösung	Roth
Essigsäure	$99\%$	Roth
Ethidiumbromid-Lösung, wässrig	10 mg/ml	Sigma
Glucose-Monohydrat	$\geq 99\%$	Fluka
Glycin	$\geq 99,5\%$	ICN Biomedicals
Hefeextrakt	Biochemica	AppliChem
Helium (He)	5.0	AirLiquide

Substanz	Qualität	Hersteller
Imidazol	≥ 99 %	AppliChem
Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid (IPTG)	Dioxan frei	Fermentas
Kanamycinsulfat	k. A.	Medexport
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	≥ 99 %	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	rein	Laborchemie Apolda
Lithiumchlorid (LiCl)	≥ 99 %	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	99,9 %	Sigma
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	reinst zur Analyse	Laborchemie Apolda
Mangan-(II)-chlorid-Tetrahydrat (MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)	analytical grade	Serva
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	research grade	Serva
Natriumacetat-Trihydrat	p.a.	Laborchemie Apolda
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	≥ 97 %	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	≥ 99,9 %	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	≥ 98 %, Ph. Eur.	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	> 97 %	Biomol
Natriumhydroxid (NaOH)	rein	Chemapol Praha
Natriumsulfat, wasserfrei (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	≥ 99 %	Roth
Nickelsulfat-Hexahydrat (NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	≥ 99 %	Roth
N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)	99 %	Fluka
Phenol	kristallin reinst	Merck
Phosphorsäure 85 % (m/m)	reinst zur Analyse	Laborchemie Apolda
Piperazin-1,4-diethansulfonsäure (PIPES)	99 %	Merck
Protease Inhibitor Cocktail (His-tagged proteins)	Kat.-Nr. P8849	Sigma
Salzsäure (HCl)	37 %	Roth
Stickstoff, flüssig (N <sub>2</sub> )	≥ 99,8 Vol.-%	Air Liquide
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	> 99 %	Fluka
Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	p.a. ≥ 99,7 %	Fluka
Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)	0,25 M in Methanol	Fluka
Trypton (Caseinhydrolysat)	pankreatisch verdaut	Roth
Tween 20	Biochemica	AppliChem

Tab. 10 Feinchemikalien für die Substratazeptanzuntersuchung

Substanz	Qualität/Reinheit	Hersteller
(-)-Borneol	≥ 99 % Terpenstandard	Fluka
(-)-Carvon	≥ 99 % puriss. p.a.	Fluka
(-)-Fenchon	98 %	Roth
(-)-Jasmonsäure	k. A. (Prof. B. Hause)	(Kramell et al., 1996)
(-)-Menthol	≥ 95 % Rotichrom GC	Roth
(-)-Menthon	≥ 99 % puriss. p.a.	Fluka
(-)-Naringenin	k. A.	Aldrich
(-)-α-Thujon	≥ 96 % purum	Aldrich
(+)-Campher	≥ 96 % Rotichrom GC	Roth
(+)-Neomenthol	97 %	Aldrich
(+)-Nootkaton	≥ 99 % puriss.	Aldrich
(+)-Pulegon	≥ 98,5 % puriss. p.a.	Fluka

Substanz	Qualität/Reinheit	Hersteller
(±)-Jasmonsäure	≥ 98 %	CHEMOS GmbH
(1 <i>R</i> )-(+)-Campher	≥ 98 %	Aldrich
(1 <i>R</i> )-endo-(+)-Fenchol	96 %	Aldrich
(1 <i>S</i> )-(-)-Verbenon	94 %	Aldrich
1,3-Cyclohexandion	97 %	Aldrich
1,4-Cyclohexandion	98 %	Aldrich
12- <i>cis</i> -Oxyphytyldiensäure	k. A.	Prof. W. Boland, MPI Jena
1-Pentanol	≥ 99 % ReagentPlus	Sigma
2,4-Dimethylpentan-3-on	98 % GC	Aldrich
2'-Hydroxyflavanon	k. A.	Aldrich
2-Decalon ( <i>cis/trans</i> )	95 %	Aldrich
3-Hydroxyflavon	≥ 98 %	Aldrich
3-Methylcyclohexanol	98 % zur Synthese	Merck
3-Methylcyclohexanon	> 98 % zur Synthese	Merck
4-Androsten-3,17-dion	Vetranal, analytical standard	Fluka
4-Methylcyclohexanol	> 98 %	Merck
4-Methylcyclohexanon	> 98 % zur Synthese	Merck
5-Androsten-3β-ol-17-onsulfat Natriumsalz	CAS 78590-17-7, k. A.	Steraloids, Newport, USA
5α-Cholestan-3-on	kristallin	Sigma
5α-Dihydropregnenolon	CAS 516-55-2, k. A.	Steraloids, Newport, USA
6-Hydroxyflavanon	99 %	Aldrich
6-Methoxyflavon	99 %	Aldrich
7-Hydroxyflavanon	98 %	Acros Organics
8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-3-on	Synthese D.T. Robins	University of Glasgow
Benzaldehyd	> 99 %	Merck
Carvacrol	≥ 98 %	Roth
Chinuclidin-3-onhydrochlorid	k. A.	Sigma
<i>cis</i> -Jasmon	≥ 85 %	SAFC Supply Solutions
Citral	≥ 95 % Rotichrom GC	Roth
Citronellal	≥ 93 % Rotichrom GC	Roth
Daidzein	purum	Roth
Flavanon	98 %	Acros Organics
Flavon	≥ 99 %	Aldrich
Genistein	≥ 98 % synthetic	Sigma
Geraniol	≥ 98 % Rotichrom GC	Roth
Indol-3-carbaldehyd	97 %	Aldrich
Indol-3-carbinol	> 96 %	Sigma
Indol-3-ethanol	97 %	Aldrich
Isoborneol	95 %	Aldrich
Menthol	≥ 99 %	Roth
Menthon	≥ 97 %	Roth
Methyldihydrojasmonat	96 %	SAFC Supply Solutions
Methyljasmonat	≥ 95 %	SAFC Supply Solutions
NAD	≥ 98 % für die Biochemie	Roth
NADH Dinatriumsalz	≥ 98 % für die Biochemie	Roth

Substanz	Qualität/Reinheit	Hersteller
NADP Dinatriumsalz	≥ 97 % für die Biochemie	Roth
NADPH Tetranatriumsalz	≥ 96 %	AppliChem
Nerol	≥ 96 % Rotichrom GC	Roth
N-Methylpiperidin-4-on	97 %	Aldrich
Nortropinonhydrochlorid	Synthese F. Bischoff	Boehringer-Ingelheim
N-Propylpiperidin-4-on	99 %	Aldrich
p-Anisaldehyd	98 %	Aldrich
Pentanal (Valeraldehyd)	97 %	Aldrich
Piperiton	≥ 96 % Rotichrom GC	Roth
Pregnenolon	CAS 145-13-1, k. A.	Steraloids, Newport, USA
Progesteron	≥ 99 % Cell Culture tested	Sigma
Pseudotropin	Synthese B. Dräger	(Nickon and Fieser, 1952)
Stigmasterol	k. A.	Extrasynthèse, Frankreich
Testosteron	98 %	Sigma
trans-Chalkon	97 %	Aldrich
Tropin	purum	Roth
Tropinon	> 90 % zur Synthese	Merck
α/β-Thujon	α: ~65 %; β: ~10 %	Roth
β-Sitosterol	80 % depur	Roth

## 2.1.8 Puffer und Reagenzien

Tab. 11 Verwendete Puffer und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Puffer mit entionisiertem Wasser hergestellt (TKA-GenPure 0,055 µS/cm, TKA GmbH).

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
10 x Laufpuffer pH 8,3 für SDS-PAGE	30,2 g/l Tris-Base 144,0 g/l Glycin 10,0 g/l SDS pH 8,3 (pH nicht eingestellt) Lagerung: Raumtemperatur, Lichtschutz Für 1 x Laufpuffer für SDS-PAGE wurde 1:10 mit Wasser verdünnt.
10 x TAE-Puffer	400 mM Tris-Base 200 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,6 (pH mit Essigsäure eingestellt) Für 1 x TAE-Puffer wurde 1:10 mit Wasser verdünnt.
10 x Taq PCR-Puffer	750 mM Tris-HCl pH 8,8 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 % Tween 20 15 mM MgCl <sub>2</sub>
2 x Probenpuffer für SDS-PAGE	90 mM Tris-HCl pH 6,8 20 % (m/V) Glycerol 2 % (m/V) SDS 0,02 % (m/V) Bromphenolblau 100 mM DTT Lagerung: -20 °C

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
100 x BSA 10 mg/ml (NEB)	Lagerung: -20 °C
4 x Bradford-Stammlösung	400 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 400 ml Phosphorsäure 85 % (m/m) 200 ml Ethanol 96 % (V/V) 400 ml entionisiertes Wasser
5 x Probenpuffer für SDS-PAGE	225 mM Tris-HCl pH 6,8 50 % (m/V) Glycerol 5 % (m/V) SDS 0,05 % (m/V) Bromphenolblau 250 mM DTT Lagerung: -20 °C
Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml	Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm). Lagerung: -20°C
Bindepuffer IMAC pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH-Wert wurde mit konz. Natronlauge eingestellt und die Lösung partikelfrei filtriert (0,45 µm). Lagerung: 4 °C
Citrat-Phosphat-Puffer 1M pH 4,5; 5,0; 5,5	1 M Citronensäure-Monohydrat wurde in entionisiertem Wasser gelöst. Mit einer 1 M Lösung von Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O wurden pH-Werte eingestellt.
DEPC-Wasser 0,1 % (V/V)	Zu 1000 ml Wasser wurde 1 ml Diethylpyro- carbonat zugesetzt, 2 h gerührt und anschließend autoklaviert.
dNTP-Mix: 2,5 mM dATP; 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP; 2,5 mM dTTP	Lösungsmittel: DEPC-Wasser Lagerung: -20 °C
DTT-Lösung 1 M	Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm). Lagerung: -20 °C
Elutionspuffer IMAC pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 300 mM NaCl 500 mM Imidazol pH-Wert wurde mit konz. Salzsäure eingestellt und Die Lösung partikelfrei filtriert (0,45 µm). Lagerung: 4 °C
Ethanol für RNA-Extraktion 70 % (V/V) Ethanol	Lösungsmittel: DEPC-Wasser Lagerung: 4 °C
Ethidiumbromid-Lösung 1 mg/ml	Lagerung: 4 °C, Lichtschutz
Glycin-NaOH-Puffer 1M pH 9,0; 9,5; 10,0	1 M Glycin wurde in entionisiertem Wasser gelöst und die pH-Werte mit Natronlauge eingestellt.
IPTG-Stammlösung 250 mM	Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm). Lagerung: -20 °C
ITC-Messpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 200 µM DTT (Zusatz vor Gebrauch) 1 mM EDTA 10 % Glycerol
Kaliumphosphat-Puffer 1 M pH 5,5; 6,0; 6,4; 6,5; 7,0; 7,5	1 M Lösungen von K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> wurden bis zum gewünschten pH-Wert gemischt. Lagerung: 4 °C

Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Kanamycin-Stammlösung 100 mg/ml	Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm). Lagerung: -20 °C
Lagerungspuffer für At2g29260	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM DTT (Zusatz vor Gebrauch) 1 mM EDTA 20 % Glycerol
Lagerungspuffer TRL pH 7,0/7,5	20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0/7,5 100 mM NaCl 1 mM DTT (Zusatz vor Gebrauch) 20 % Glycerol
LiCl-Lösung für RNA-Extraktion	4 M LiCl 20 mM Natriumacetat pH 5,2 Lösungsmittel: DEPC-Wasser Lagerung nach Autoklavieren: Raumtemperatur
Lysepuffer für Bakterienpellets pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH-Wert wurde mit konz. Natronlauge eingestellt und die Lösung partikelfrei filtriert (0,45 µm). Lagerung: 4 °C
NTES-Puffer für RNA-Extraktion	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 1 % (m/V) SDS Lösungsmittel: DEPC-Wasser Lagerung nach Autoklavieren: Raumtemperatur
Phenol für RNA-Extraktion	Phenol wurde mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0 gesättigt (bis pH 7,6 akzeptabel). Die bräunlich gefärbte Unterphase wurde verwendet. Lagerung: 4 °C
Puffer für die Ultrazentrifugation	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Stopp-Puffer für DNA-Elektrophorese	200 mM EDTA 50 % Glycerol 0,2 % Bromphenolblau Lagerung: 4 °C
Tetracyclin-Stammlösung 12,5 mg/ml	Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm). Lagerung: -20°C
TFB-Puffer für kompetente Bakterien	10 mM PIPES pH 6,7 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MnCl <sub>2</sub> MnCl <sub>2</sub> wurde nach der Einstellung des pH-Wertes zugesetzt. Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm).
Tris-HCl-Puffer 1 M pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0	Tris-Base wurde in Wasser gelöst und der pH- Wert mit konz. Salzsäure eingestellt. Lagerung: 4 °C
X-Gal-Lösung 40 mg/ml	Lösungsmittel: Dimethylformamid Lagerung: -20 °C, Lichtschutz



## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Ribonukleinsäuren aus pflanzlichem Gewebe wurden mit einer modifizierten Methode nach Reinbothe extrahiert (Reinbothe et al., 1992). Je 3 g gefrorenes Pflanzenmaterial wurde unter Zusatz von flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein verrieben. Nach Zugabe von 6 ml NTES-Puffer und je 3 ml Phenol-Unterphase (Phenol für RNA-Extraktion) und Chloroform wurde die Mischung kräftig homogenisiert. Der Mörser wurde mit 4 ml NTES-Puffer und je 2 ml Phenol-Unterphase und Chloroform nachgespült und die Spülflüssigkeit mit dem Homogenisat vereinigt. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde kräftig gemischt (5 min, Vortex-Mixer) und anschließend zur Phasentrennung 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgetrennt und mit dem gleichen Volumen an Phenol-Unterphase und Chloroform erneut 1 min kräftig gemischt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis keine Proteininterphase mehr auftrat. Die Nukleinsäuren wurden mit 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 2,5 Volumenteilen 96 % (V/V) Ethanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C wurde das Nukleinsäure-Pellet mit 70 % (V/V) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 ml DEPC-Wasser auf Eis gelöst. Die enthaltenen Ribonukleinsäuren wurden unter Zusatz von 5 ml 4 M LiCl-Lösung über Nacht auf Eis ausgefällt. Am dritten Tag der Extraktion wurde das Pellet nach Zentrifugation und erneutem Waschen mit 70 % (V/V) Ethanol in 80 µl DEPC-Wasser vorsichtig auf Eis gelöst. Die Konzentration der RNA-Präparation wurde nach Methode 2.2.2 bestimmt. Die Lösung wurde in RNase-freien Gefäßen bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit dem Spektrofotometer Gene Quant II (Pharmacia) quantifiziert. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung 1:60 mit DEPC-Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Referenzlösung wurde DEPC-Wasser verwendet. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren (Adenin- und Guaninbasen), während bei 280 nm die chromophoren Gruppen der aromatischen Aminosäuren UV-Strahlung absorbieren. Der Quotient  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  wurde zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung herangezogen (Soll: 1,5-2). Das Gerät berechnete auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) über die gemessene Absorption bei 260 nm die entsprechende Nukleinsäurekonzentration (Tab. 12).

**Tab. 12 Spezifische Absorption von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuretyp	$\epsilon_{260} [(\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}]$	c [ $\mu\text{g/ml}$ ] für A = 1
Doppelstrang-DNA	0,020	50
Einzelstrang-RNA	0,025	40

### 2.2.3 Reverse Transkription

Zur Synthese von Einzelstrang-cDNA für PCR-Anwendungen diente isolierte Gesamt-RNA als Matrize (2.2.1). Es wurde mit dem SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Das Temperaturprogramm wurde im Thermocycler T3 (Biometra) eingestellt.

**Tab. 13 Reverse Transkription – Bedingungen und Ablauf**

Gesamt-RNA	5 µg
Oligo-dT <sub>(12-18)</sub> -Primer	0,5 µg
dNTP-Mix	0,5 mM pro Nukleotid
Inkubation	1. für 5 min bei 65 °C → Primeranlagerung 2. für 2 min auf Eis
5 x Erststrangpuffer	4 µl
0,1 M DTT	10 mM
Inkubation	für 2 min bei 42 °C
Zusatz von SuperScript II RT → Gesamtansatz	200 U 20 µl in DEPC-Wasser
cDNA-Synthese	50 min bei 42 °C
Inaktivierung des Enzyms	15 min bei 70 °C
Lagerung der synthetisierten c-DNA	bei -20 °C

### 2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion wurde der Thermocycler T3 (Biometra) eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene PCR-Methoden angewendet:

- (1) Die PCR mit Pfu DNA Polymerase diente der fehlerfreien Amplifikation bekannter Vollängen-cDNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* und *Capsella rubella*.
- (2) Die Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase wurde zur Erfolgskontrolle bei der Transformation von *E. coli* eingesetzt.
- (3) Die Mutagenese-PCR mit PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase wurde zum ortsgerechten Austausch von Nukleotiden in *-61Nat2g29260* herangezogen.

#### 2.2.4.1 PCR mit Pfu DNA Polymerase

Es wurden folgende Gene mit bekannter codierender Sequenz amplifiziert: *at5g06060* (EMBL-Eintrag: BT002894), *at2g29260* (EMBL-Eintrag: AAC95209), *at2g29350* (EMBL-Eintrag: AY081642) und *ctrl26* (EMBL-Eintrag: ABW81146). Zusätzlich wurde eine um 183 Nukleotide verkürzte Form von *at2g29260* (*-61Nat2g29260*) kloniert. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Tab. 8 aufgelistet. Ein Blindansatz mit DEPC-Wasser anstelle von cDNA wurde stets mitgeführt.

Tab. 14 Pfu-PCR – Zusammensetzung und Ablauf

A) Komponenten	Zusammensetzung 50 µl Ansatz	
cDNA <sup>a</sup>	2 µl	
dNTP-Mix	0,2 mM pro Nukleotid	
Vorwärtsprimer	1 µM	
Rückwärtsprimer	1 µM	
Pfu DNA Polymerase	2 U	
10 x Pfu-Puffer + MgSO <sub>4</sub>	5 µl	
DEPC-Wasser	zu 50 µl	
B) PCR-Programm	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	2
Zyklische Denaturierung	95	1
35 x Primeranlagerung <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> -n	1
Zyklische Verlängerung	72	2,5
Finale Verlängerung	72	5

<sup>a</sup>Bei Amplifikation von *-61Nat2g29260* wurde der Vektor *at2g29260-pQE-30* (71 ng) verwendet.

<sup>b</sup>Primer-Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) siehe Tab. 8; 3 ≤ n ≤ 7.

#### 2.2.4.2 Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase

Die Kolonie-PCR mit Taq DNA Polymerase wurde zur Selektion positiver Bakterienklone nach der Transformation (2.2.8) eingesetzt. Für eine Kolonie-PCR wurden 10 Bakterienkolonien von der Platte ausgewählt und jede einzeln in 20 µl sterilem Wasser suspendiert. Zum vollständigen Aufschluss der Bakterien wurden die Proben 10 min bei 99 °C erhitzt, 5 min bei -80 °C abgekühlt und nochmals 5 min bei 99 °C erhitzt. Die freigesetzte Plasmid-DNA diente als Matrize. Eine Negativkontrolle mit 20 µl sterilem Wasser anstelle von Bakteriensuspension wurde immer mitgeführt.

Tab. 15 Kolonie-PCR – Zusammensetzung und Ablauf

A) Komponenten	Zusammensetzung 50 µl Ansatz	
Bakteriensuspension	20 µl	
dNTP-Mix	0,2 mM pro Nukleotid	
Vorwärtsprimer	2 µM	
Rückwärtsprimer	2 µM	
Taq DNA Polymerase	1 U	
10 x Taq PCR-Puffer	5 µl	
steriles Wasser	zu 50 µl	
B) PCR-Programm	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	5
Zyklische Denaturierung	95	1
35 x Primeranlagerung <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> -n	1
Zyklische Verlängerung	72	1,5
Finale Verlängerung	72	10

<sup>a</sup>Primer-Schmelztemperaturen sind in Tab. 8 angegeben; 3 ≤ n ≤ 7.

### 2.2.4.3 Mutagenese-PCR

Eine ortsgerichtete Mutagenese war für den Austausch der Aminosäure 220 Glutamin (Triplett CAA) in Tyrosin (Triplett TAC) im Protein -61Nat2g29260 notwendig. Dazu wurde nach den Vorschriften des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) gearbeitet. Die Matrize für die Mutagenese-PCR war eine Präparation des Vektors -61Nat2g29260-pQE30 aus dem Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (2.2.9). Dieser methylierte Vektor wurde während der PCR unter Einbau der Mutagenese-Primer vollständig amplifiziert, so dass ein unmethyliertes Amplifikat entstand. Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde die methylierte Matrizen-DNA durch die Restriktionsendonuklease DpnI quantitativ verdaut. Mit dem mutierten Vektor wurden *E. coli* XL1-Blue transformiert (2.2.8).

**Tab. 16 Mutagenese-PCR – Zusammensetzung und Ablauf**

<b>A) Komponenten</b>	<b>Zusammensetzung 25 µl Ansatz</b>	
-61Nat2g29260-pQE30	25,6 ng	
dNTP-Mix	0,25 mM pro Nukleotid	
M260FOR	0,4 µM	
M260REV	0,4 µM	
PfuUltra HF DNA Polymerase	1,25 U	
10 x PfuUltra HF Reaktionspuffer	2,5 µl	
DEPC-Wasser	zu 25 µl	
<b>B) PCR-Programm</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
Initiale Denaturierung	95	0,5
Zyklische Denaturierung	95	0,5
16 x Primeranlagerung	55	1
Zyklische Verlängerung	68	6
Restriktionsverdau mit DpnI (5 U)	37	180

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Gele mit 1,5 % Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt und die mit 1–2 µl Stopp-Puffer gemischten Proben aufgetragen (je nach Bedarf: 10–30 µl/Tasche). Bei 70 V wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode und trennten sich entsprechend ihres Molekulargewichts. Die Gele wurden für 30 min im Ethidiumbromid-Bad (5 mg/l in 1 x TAE-Puffer) entwickelt. Ethidiumbromid interkaliert in den DNA-Strang und führt zu orange-roter Fluoreszenz der DNA bei Anregung mit 312 nm. Die Gele wurden fotografiert und das Molekulargewicht der Fragmente mit Hilfe der aufgetragenen DNA-Leiter (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) abgeschätzt.

### 2.2.6 TA-Klonierung

Die Produkte der Pfu-PCR wurden zur Vervielfältigung in den Vermehrungsvektor pCR2.1 ligiert. Dazu war es notwendig, die Amplifikate nach der PCR mit Pfu DNA Polymerase für 15 min bei 72 °C mit 1 U Taq DNA Polymerase zu inkubieren. Diese katalysiert den zusätzlichen Anhang eines dATP an das 3'-Ende des PCR-Produkts. Das 3'-Adenosin wurde, katalysiert durch eine T4 DNA Ligase, mit dem überhängenden 5'-Thymidin des pCR2.1-Vektors verknüpft. Mit dem erhaltenen Vektor wurden *E. coli* XL1-Blue transformiert (2.2.8). Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 17 zusammengefasst.

**Tab. 17 Ligationsbedingungen der TA-Klonierung**

<b>A) Komponenten</b>	<b>Zusammensetzung 10 µl Ansatz</b>	
Vektor pCR2.1	50 µg	
PCR-Produkt	1 µl	
T4 DNA Ligase (4U/µl)	4 U	
10 x Ligationspuffer	1 µl	
steriles Wasser	zu 10 µl	
<b>B) Ablauf</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
Ligation	14	über Nacht
Inaktivierung der Ligase	65	10

### 2.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien (Tab. 3) wurden 150 ml SOB-Medium mit 6 Bakterienkolonien von einer frisch bewachsenen LB-Agarplatte angeimpft. Die Flüssigkultur wurde bei 250 rpm und 20-25 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,75 inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium in sterile Zentrifugenbecher (2 x 48 ml) überführt und für 10 min auf Eis gekühlt. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 16 ml TFB-Puffer auf Eis suspendiert. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation wurde der Puffer abgenommen und das Bakterienpellet in 4 ml gekühltem TFB-Puffer und 0,3 ml Dimethylsulfoxid resuspendiert. Die gekühlte Bakteriensuspension wurde in 0,2 ml Portionen mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.8 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Transformation wurde nach den Angaben des Protokolls im TA-Manual (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen wurden entweder mit 2-3 µl Ligationsansatz der TA-Klonierung (2.2.6) oder mit 0,5-1 µg Plasmidpräparation (2.2.9) für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 30 s bei 42 °C erwärmt. Nach Kühlung auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt und die Bakterien für 1,5-2 Stunden bei 37 °C und 1400 rpm kultiviert. Zwischen

50-100 µl Bakteriensuspension wurden auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (z. B. 50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Die erhaltenen Kolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (2.2.4.2) auf das Vorkommen des rekombinanten Vektors geprüft.

### **2.2.9 Flüssigkultur und Plasmidpräparation**

Von positiven Transformanden wurden Flüssigkulturen angelegt. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (für *E. coli* M15[pREP4] zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin) versetzt und Bakterien von Agarplatten oder Glycerolkulturen (2.2.10) angeimpft. Die Flüssigkultur wurde bei 37 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde für die Plasmidisolierung verwendet. Diese wurde nach Herstellervorgaben (QIAGEN Plasmid Purification Handbook) mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die Plasmide in 30 µl steriles Wasser eluiert und die Konzentration der Doppelstrang-DNA nach Methode 2.2.2 bestimmt.

### **2.2.10 Glycerolkultur**

Von positiven Transformanden wurden Glycerolkulturen angelegt. Dazu wurden 1,275 ml Bakterien-Flüssigkultur (2.2.9) mit 225 µl sterilem Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.11 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide (2.2.9) wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Pro Sequenzierung (vorwärts und rückwärts) wurden je 2 x 15 µl Plasmidpräparation (50-100 ng/µl) in sterilem Wasser eingesendet.

### **2.2.12 Gelextraktion**

DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aus dem Agarose-Gel isoliert. Dazu wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (QIAquick Spin Handbook). Die isolierte DNA wurde in 30 µl steriles Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert. Die Fragmente mit klebrigen Enden wurden zügig weiterverarbeitet, um den Abbau der Überhänge zu vermeiden.

### **2.2.13 Herstellung rekombinanter Synthesevektoren**

Die amplifizierten cDNA-Sequenzen (2.2.4.1) wurden in den Synthesevektor pQE-30 ligiert. Dieser führt nach Transkription und Translation zu einem Fusionsprotein mit einem sechsfachen Histidinrest am N-Terminus. Die codierenden Sequenzen wurden selektiv mit Restriktionsendonukleasen (Schnittstellen in Primer integriert, Tab. 8) aus dem Vektor pCR2.1 ausgeschnitten und anschließend in den linearisierten Vektor pQE-30 ligiert. Die optimalen Bedingungen für den Restriktionsverdau wurden mit dem Double Digest Finder von NEB ermittelt (Tab. 18). Je 1 µg Vektor wurde mit beiden Restriktionsendonukleasen

über 3-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Kontrollen ohne Restriktionsendonukleasen wurden mitgeführt. Nach Gelelektrophorese (2.2.5) und Extraktion der gewünschten DNA-Fragmente (2.2.12) wurden diese enzymatisch zum Synthesevektor *trI*-pQE-30 ligiert (Tab. 19). Mit dem Vektor wurden kompetente *E. coli* XL1-Blue und M15[pREP4] transformiert (2.2.8). Die erfolgreiche Transformation wurde mit Kolonie-PCR überprüft (2.2.4.2). Die Vorlage des korrekten rekombinanten Plasmids im transformierten Bakterienklon wurde durch Sequenzierung bestätigt (2.2.11). Die verifizierten Bakterienklone wurden als Expressionssysteme für die rekombinanten Proteine genutzt. Von diesen wurde eine Glycerolkultur angelegt (2.2.10).

**Tab. 18 Bedingungen für den Restriktionsverdau**

Vektor	Restriktionsendonukleasen		Puffer	Aktivität [%]	BSA
<i>at5g06060</i> -pCR2.1	BamHI	PstI	NEB 3	100/100	ja
<i>at2g29260</i> -pCR2.1	SphI	XmaI	NEB 4	100/100	ja
<i>-61Nat2g29260</i> -pCR2.1	SphI	XmaI	NEB 4	100/100	ja
<i>at2g29350</i> -pCR2.1	SphI	PstI	NEB 2	100/ 75	ja
<i>ctrl26</i> -pCR2.1	BamHI	Sall	NEB 3	100/100	ja

**Tab. 19 Ligation zum Synthesevektor – Zusammensetzung und Ablauf**

A) Komponente	Zusammensetzung 20 µl Ansatz	
pQE-30 linearisiert	0,1 µg	
<i>trI</i> -Fragment	0,3 µg	
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 U	
10 x T4 DNA Ligationspuffer	2 µl	
steriles Wasser	zu 20 µl	
B) Ablauf	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Ligation	22	120
Inaktivierung der Ligase	65	10

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Bakterielle Proteinsynthese

Für die Synthese der Fusionsproteine wurde eine Flüssigkultur aus der Glycerolkultur (2.2.10) der ausgewählten Bakterienkolonie in 50 ml TB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (für *E. coli* Rosetta-gami (DE3)) und zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin (für *E. coli* M15[pREP4]) angelegt. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Kolben mit 250 ml antibiotikahaltigem TB-Medium wurden mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 kultiviert. Dabei wurden für jede Proteinsynthese zwischen 0,5-1 Liter Bakterienkultur angesetzt. Die Synthese der rekombinanten Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Dauer der Induktion wurde nach Überprüfung der zeitlichen Zunahme von rekombinantem Zielprotein festgelegt

(Synthesekontrolle mit SDS-PAGE). Sie variierte zwischen den Bakterienstämmen Rosetta-gami (DE3) mit 16 Stunden (25 °C, 250 rpm) und M15[pREP4] mit 4-5 Stunden (37 °C, 250 rpm). Nach dieser Zeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm) bei 4 °C geerntet. Die Bakterienpellets wurden entweder direkt für die Proteinreinigung aufgearbeitet oder bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.3.2 Bakterienlyse

Die Bakterienpellets (2.3.1) wurden in je 10 ml Lysepuffer für Bakterienpellets pH 8,0 mit 75 µl Protease Inhibitor Cocktail homogen resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zusatz von Lysozym (16.000 U für 30 min auf Eis) und anschließende Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250, für 1 min auf Eis) quantitativ lysiert. Die Viskosität der Suspension wurde durch den Abbau bakterieller DNA mit DNase I (510 U für 10 min bei Raumtemperatur) gesenkt. Zelluläre Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C über 45 min abgetrennt. Der klare gelbliche Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde partikelfrei filtriert (0,45 µm) und als Rohlysat der Proteinreinigung (2.3.3) zugeführt.

### 2.3.3 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatografie

Die Zielproteine wurden von den rekombinanten Bakterien als Fusionsproteine mit C-terminalen (CoTR) oder N-terminalen (TRLs) sechsfach Histidin-Anhängen synthetisiert. Dieser zusätzliche Peptidanhang diente der selektiven Reinigung der Zielproteine aus der Gesamtheit der löslichen Bakterienproteine. Bei der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatografie bildet der His-Tag mit zweiwertigen Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) einen Komplex. Bei den verwendeten HisTrap HP-Säulen werden die Nickelionen von Iminodiessigsäure-Gruppen komplexiert und somit immobilisiert. Die übrigen Ligandenbindestellen des  $\text{Ni}^{2+}$ -Ions sind mit Wassermolekülen besetzt. Bei pH 8,0 tritt Histidin über den Imidazol-Stickstoff in den Komplex ein und verdrängt die vorhandenen Wassermoleküle. Histidinreiche Proteine werden an die Säule gebunden. Die Elution der komplexierten Proteine wird durch eine Zunahme der Imidazolkonzentration (Gradient: 10-500 mM) während der Reinigung erreicht. Das Zielprotein mit sechsfachem Histidin-Anhang hat die stärkste Bindungsaffinität aller löslichen *E. coli*-Proteine und eluiert erst nach den natürlich vorkommenden histidinreichen Bakterienproteinen.

#### 2.3.3.1 Vorversuch - Reinigung mit Nickel-Spin-Säulen

Mit dem Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN) wurden Bakterienpellets aus 50 ml Flüssigkultur unter Verwendung einer Mikrozentrifuge gereinigt (Ni-NTA Spin Handbuch). Die Bakterienlyse wurde analog nach 2.3.2 durchgeführt. Das Reinigungsprinzip ist wiederum Nickelionenaffinitätschromatografie, allerdings ist der Chelatbildner für die Nickelionen hier Nitrilotriessigsäure und Wasch- und Elutionsschritte erfolgen diskontinuierlich durch



schrittweise Zentrifugation für je 2 min (2000 rpm, 4 °C). Der Vorversuch diente zur Kontrolle der erfolgreichen Proteinsynthese und His-Tag-Reinigung.

### 2.3.3.2 Chromatografisches System

Größere Mengen löslicher Histidin-Fusionsproteine (mg Maßstab) wurden mit HisTrap HP-Säulen (Tab. 20) unter Verwendung des Proteinchromatografie-Systems ÄKTA explorer 100 (Pharmacia) aus dem Rohlysate (2.3.2) gereinigt. Die Parameter der Reinigung sind im folgenden Absatz aufgeführt.

**Tab. 20 Parameter der HisTrap HP-Säule**

Parameter	HisTrap HP-Säule (GE Healthcare)
Säulenvolumen	1 ml
Dimension	0,7 cm x 2,5 cm
stationäre Phase	Ni-Sepharose (quervernetzte Agarose mit Iminodiessigsäuregruppen)
Metallion	Ni <sup>2+</sup>
Partikelgröße	34 µm
Bindekapazität	mindestens 40 mg His-Tag Protein

Gerät:	Proteinchromatografie-System ÄKTA explorer 100 (Pharmacia)
Equilibrierung:	Bindepuffer IMAC pH 8,0 bis zur Konstanz von Druck und Leitfähigkeit
Flussrate:	1 ml/min
Temperatur:	20 °C
Detektion:	UV-Absorption bei 280 nm, Druck, Leitfähigkeit
Probenaufgabe:	50 ml Probenreservoir, variables Probenvolumen
Elution:	linearer Gradient 10-500 mM Imidazol über 20 Säulenvolumen durch Mischung von Binde- und Elutionspuffer IMAC pH 8,0
Fraktionierung:	2 ml ab Gradientenbeginn

### 2.3.3.3 Umpufferung von Proteinen

Die Zielproteine wurden nach der Reinigung in verschiedene imidazolfreie Lagerungspuffer (Tab. 21) umpuffert, da ein negativer Einfluss des Imidazols auf die Enzymaktivität nicht ausgeschlossen werden konnte.

**Tab. 21 Verwendete Lagerungspuffer**

Puffer	Proteine
Lagerungspuffer TRL pH 7,0	At5g06060, CoTR, At2g29360, At2g29350, At2g29330
Lagerungspuffer TRL pH 7,5	CrTRL26, At2g29150
Lagerungspuffer für At2g29260	-61NAAt2g29260, -61NAAt2g29260Q220Y

Die Proteine wurden im Kühlraum bei 2 – 8 °C oder unter Kühlung auf Eis über PD-10 Säulen (gefüllt mit Sephadex G-25, Pharmacia) umpuffert. Die Trennung basiert auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatografie. Je 2,5 ml Proteinfraction wurden auf eine mit

Lagerungspuffer equilibrierte PD-10 Säule aufgegeben und die Proteine anschließend mit 3,5 ml Lagerungspuffer eluiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde mit 20 % Glycerol gemischt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (Bradford, 1976) im Zweistrahlphotometer UV-160A (Shimadzu) bestimmt. Für die Messlösung wurde 1 ml 4 x Bradford-Stammlösung mit 3 ml Wasser verdünnt. Je 1 ml Messlösung wurde mit 50 µl Proteinlösung (= Probenlösung) bzw. 50 µl Lagerungspuffer (= Referenzlösung) in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Probenlösung gegen die Referenzlösung bei 595 nm gemessen. Zur Auswertung wurde eine mit BSA erstellte Kalibriergerade im Bereich 25-200 µg/ml (0,12-0,65 AU) verwendet. Die Proteinkonzentration wurde über die gemessene Absorption berechnet und als Mittelwert einer Doppelbestimmung angegeben.

Berechnung:  $c(\text{Protein}) [\mu\text{g/ml}] = 334,02 \cdot A - 15,353$

### 2.3.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Synthese und Reinigung der Zielproteine wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) kontrolliert. Die verwendeten Gele enthielten 5 % Acrylamid im Sammelgel und 15 % im Trenngel (Tab. 22). Die Proteinproben wurden 1:2 mit 2 x Probenpuffer versetzt. Proben mit hohem Proteingehalt (Rohlysat, Durchfluss, Fraktionen der Reinigung) wurden vorab mit Wasser verdünnt. Die Proteine wurden durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert. Tris-Glycin Puffer pH 8,3 (1:10 verdünnt aus 10 x Laufpuffer für die SDS-PAGE) diente als Laufpuffer.

**Tab. 22 Zusammensetzung des Acrylamidgels für die SDS-PAGE**

Komponenten	Sammelgel 2 ml	Trenngel 6 ml
Acrylamid	4,95 %	15 %
<i>N,N'</i> -Methylen-Bisacrylamid	0,132 %	0,4 %
Tris-HCl pH 6,8	125 mM	/
Tris-HCl pH 8,8	/	376 mM
SDS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,1 %	0,3 %
APS	0,05 %	0,1 %

Die Proteine wurden bei 25 mA (~ 100 V) im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 40 mA (~ 150 V) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Für die Zuordnung der Proteinbanden wurde der Molekulargewichtsmarker SM0431 (Fermentas) verwendet. Dieser enthielt β-Galactosidase aus *E. coli* (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin aus Hühnereiklar (45 kDa), Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel (35 kDa), die Restriktionsendonuklease Bsp 98I aus *E. coli* (25 kDa), β-Lactoglobulin aus Kuhmilch (18,4 kDa) und

Lysozym aus Hühnereiklar (14,4 kDa). Die Proteine wurden im Elektrophoresegel mit Hilfe der Coomassie-Färbung (Tab. 23) detektiert.

**Tab. 23 Coomassie-Färbung – Zusammensetzung und Ablauf**

Schritt	Zusammensetzung der Lösungen	Zeit
1. Fixierung	50 % Methanol 12 % Essigsäure	20 min
2. Färbung	2 g Coomassie Brilliant Blau R-250 425 ml Ethanol 96 % (V/V) 50 ml Methanol 100 ml Essigsäure 425 ml entionisiertes Wasser	30 min
3. Entfärbung	25 % Ethanol 96 % (V/V) 10 % Essigsäure	nach Bedarf
4. Trocknung	40 % Methanol 10 % Essigsäure 6 % Glycerol	15 min

Zur Analyse kovalenter Disulfid-Brücken zwischen Proteinmonomeren wurde die nichtreduzierende SDS-PAGE angewendet. Im Gegensatz zur Standard SDS-PAGE wurde kein Dithiotreitol zum Gel und zu den Puffern zugesetzt. Als Molekulargewichtsmarker wurden Carboanhydrase aus Rindererythrozyten (29 kDa) und BSA (66 kDa) von den Standards für die analytische Gelfiltration verwendet (Tab. 25). Für das Proteinmonomer wurde ein Molekulargewicht von 30 kDa und für ein durch Disulfid-Brücken entstandenes Dimer 60 kDa erwartet.

## 2.3.6 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen

### 2.3.6.1 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ist eine chromatografische Methode zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen. Die verwendeten Parameter sind in Tab. 24 zusammengefasst.

**Tab. 24 Parameter für die analytische Gelfiltration**

Parameter	Analytische Gelfiltration
Gerät	Proteinchromatografie-System ÄKTA explorer 100 (Pharmacia)
Säule	XK16/60 mit Sephacryl S-200 HR (Betthöhe 59 cm, Bettvolumen 119 ml)
Probenvolumen	0,5 ml (Verwendung einer 0,5 ml Probenschleife)
Flussrate	0,5 ml/min
Elution	isokratisch mit 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,5
Temperatur	20 °C

Die Proteinproben wurden unter den gleichen Bedingungen eluiert wie Standards mit bekanntem Molekulargewicht (MW-GF-200, Sigma, Tab. 25). In den erhaltenen Chromatogrammen wurde im Maximum des Proteinpeaks das Elutionsvolumen ( $V_e$ ) abgelesen. Die Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen den Quotienten aus Elutionsvolumen und Ausschlussvolumen ( $V_o$ ) für die Standardproteine aufgetragen.

**Tab. 25 Standardproteinset MW-GF-200 für die Gelfiltration**

Bezeichnung	Mw [kDa]
Dextranblau (Bestimmung von $V_o$ )	2000
$\beta$ -Amylase aus Süßkartoffeln	200
Alkoholdehydrogenase aus Hefe	150
Rinderserumalbumin	66
Carboanhydrase aus Rindererythrocyten	29
Cytochrom c aus Pferdeherzen	12,4

### 2.3.6.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation gilt als gut geeignete Methode zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen (Schuster and Toedt, 1996). Sie wurde in dieser Arbeit angewendet, um die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration zu verifizieren. Die Messungen an der Ultrazentrifuge wurden von Priv.-Doz. Dr. Hauke Lilie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Technische Biochemie) vorgenommen (Tab. 26). Die Proben waren über den Zeitraum der Messung stabil und zeigten keine Aggregation.

**Tab. 26 Bedingungen der analytischen Ultrazentrifugation**

Gerät	Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckmann), Doppelsektorzellen, AnTi 50 Rotor
Probenvorbereitung	Umpufferung der Proteine in Puffer für die Ultrazentrifugation, Konzentration zwischen 4-65 $\mu$ M Protein
Referenzlösung	Puffer für die Ultrazentrifugation (auch für Verdünnungen)
Messungen	Sedimentationsgeschwindigkeit: 40.000 rpm, 3 h, 20 °C $\rightarrow$ s Sedimentationsgleichgewicht: 12.000 rpm, 20 °C $\rightarrow$ Mw
Detektion	Aufzeichnung der Proteinabsorption bei 280 nm
Auswertung	Berechnung der apparenten Sedimentationskonstante (s) und des apparenten Molekulargewichts (Mw) mit Geräte-Software

### 2.3.7 Quantifizierung der Bindung von NADPH an Proteine

Das Protein -61NAt29260 mit der Triade Serin-Glutamin-Lysin statt Serin-Tyrosin-Lysin zeigte keine enzymatische Aktivität. Es stellte sich die Frage, ob das Protein in der Lage war das Cosubstrat NADPH zu binden. Die Bindungsstudien wurden zum einen mit Fluoreszenztitration und zum anderen mit Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt.

#### 2.3.7.1 Fluoreszenztitration

Das Cosubstrat NADPH wird durch Bestrahlung mit Licht bei 340 nm zur Fluoreszenz angeregt (Emission: 450-470 nm), verantwortlich dafür ist der reduzierte Nikotinamid-Ring. Die Fluoreszenzintensität wird allerdings durch Überlagerung des Nikotinamid-Rings mit dem Adenin-Gerüst verringert (Löschung, engl. quenching). Bindet NADPH an ein Protein wird das Quenching reduziert, die Fluoreszenzintensität steigt und die Emissionswellenlänge wird bathochrom verschoben. Auf Grund dieser Eigenschaften des Cosubstrats wurde die Bindungskonstante von NADPH und -61NAt2g29260 mit Fluoreszenztitration bestimmt. Als Positivkontrolle wurde parallel die Bindung von NADPH an das Enzym At2g29360 gemessen. Bedingungen und Ablauf der Methode sind in Tab. 27 zusammengefasst.

**Tab. 27 Bedingungen der Fluoreszenztitration**

Gerät	Fluoreszenzspektrometer FP-6500 (Jasco), Quartz-Küvette: Suprasil 101-QS, 3,5 ml, Schichtdicke 10 x 10 mm (Hellma)
Messpuffer	Lagerungspuffer für At2g29260
Probe	2 ml Ansatz: 1,8 µM Protein, 0-40 µM NADPH in Messpuffer
Messung	Emissionsspektren 360-600 nm (Anregung: 340 nm) bei 20 °C je 3 Messreihen
Referenzmessung	Emissionsspektren von NADPH-Verdünnungen in Messpuffer (0-40 µM NADPH)
Auswertung	Auftragung Emissionsintensität gegen NADPH-Konzentration
Nichtlineare Regression (SigmaPlot 10)	$F = (F_{\max} \cdot c(\text{NADPH})) / (K_d + c(\text{NADPH}))$ F <sub>max</sub> , maximale Fluoreszenzintensität; K <sub>d</sub> , Bindungskonstante

#### 2.3.7.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Titrationskalorimetrie erlaubt die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Bindung von Makromolekülen (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) mit kleineren Liganden (z. B. Arzneistoffe, Cosubstrate), da bei deren Bindung entweder Wärmeenergie freigesetzt ( $\Delta H < 0$ , exotherm) oder verbraucht ( $\Delta H > 0$ , endotherm) wird. Mit dieser Methode kann

direkt die Bindungsenthalpie (Bindungswärme), die Bindungsaffinität  $K_a$  und die Stöchiometrie  $N$  der beteiligten Bindungspartner (Ligand:Protein) gemessen werden. Die Bindungskonstante  $K_d$  entspricht der reziproken Bindungsaffinität  $K_a$ . Aus den gemessenen Daten können die Bindungsentropie  $\Delta S$  und die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  über die Gibb'sche Gleichung berechnet werden.

Gibb'sche Gleichung:  $\Delta G = - R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S$

R, universelle Gaskonstante; T, absolute Temperatur [K], K, Gleichgewichtskonstante (hier  $K_a$ )

Bei der ITC werden die Lösungen in Referenz- und Probenzelle zu Beginn auf die gleiche Temperatur erwärmt. Bei jeder Injektion des Liganden in die Probenzelle wird die entstehende oder verbrauchte Bindungswärme (Energie) durch eine Rückkopplung der Heizleistung kompensiert. Die Kompensationsleistung [ $\mu\text{cal/s}$ ] zur Einstellung der gleichen Temperatur zwischen Proben- und Referenzzelle nach erfolgter Injektion wird zeitabhängig aufgezeichnet. Erst nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen Referenz- und Probenzelle folgt die nächste Injektion. Das erhaltene Thermogramm zeigt die Rohdaten als Spikes. Die Fläche unter jedem Spike entspricht der Wärme, die bei der Bindung von Ligand und Protein pro Injektion entsteht oder verbraucht wird ( $\Delta H$  pro mol Ligand). Durch Integration dieser Flächen und Auftragung gegen das molare Verhältnis Ligand zu Protein erhält man die thermodynamischen Parameter der Reaktion.

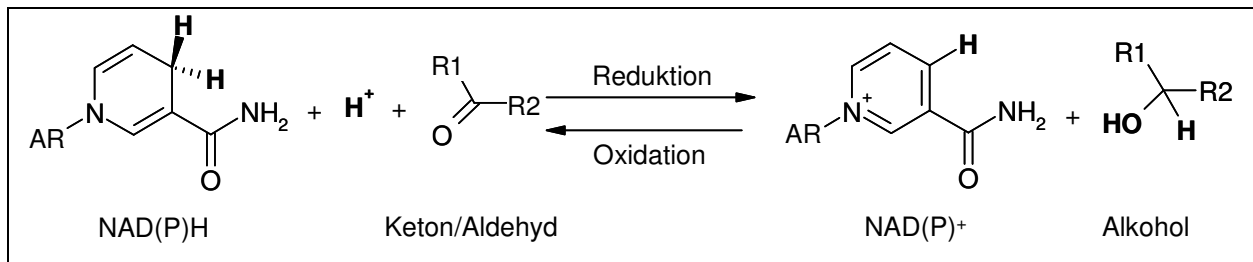
Für die Messungen stand das Mikrokolorimeter VP-ITC (MicroCal) zur Verfügung. Das Protein -61NAt2g29260 und der Ligand NADPH wurden in ITC-Messpuffer (Tab. 11) gelöst. Es wurde ein etwa zehnfacher Konzentrationsüberschuss von Ligand zu Protein gewählt (500  $\mu\text{M}$  zu 46  $\mu\text{M}$ ). Die Lösungen wurden für 10 min im Vakuum entgast (ThermoVac, MicroCal). Die Proteinlösung wurde in die Probenzelle und die NADPH-Lösung in das Injektionssystem luftblasenfrei eingefüllt. Die Referenzkammer enthielt destilliertes Wasser, da dieses etwa die gleiche Wärmekapazität wie wässrige Pufferlösungen aufweist und die Kammer nicht für jede neue Messung mit einem anderen Puffer befüllt werden muss. Zur Systemequilibration wurden die Messzellen 10 min bei 20 °C vorgewärmt, bevor mit der Injektion des Liganden begonnen wurde. Die Lösung in der Probenzelle wurde während der Messung kontinuierlich mit ca. 300 rpm gerührt. Das erhaltene Thermogramm wurde mit Origin 7.0 ausgewertet. Die Titration der NADPH-Lösung gegen ITC-Messpuffer in der Probenzelle wurde separat durchgeführt, um Lösungseffekte von NADPH in reinem Messpuffer zu quantifizieren.

## 2.4 Aktivitätsbestimmung

### 2.4.1 Fotometrische Aktivitätsbestimmung

#### 2.4.1.1 Prinzip der Messung

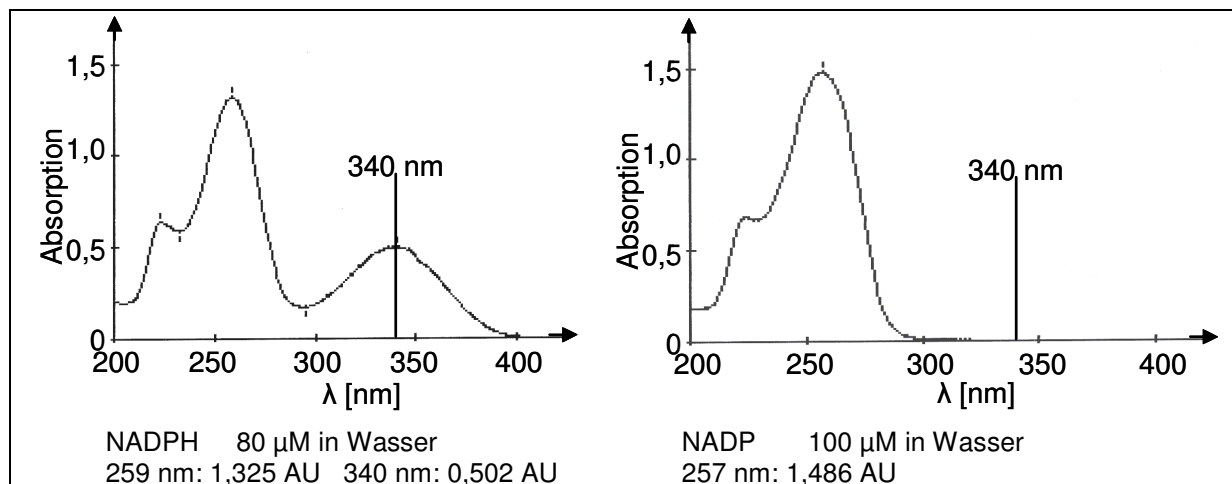
Die Tropinonreduktase-ähnlichen kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (TRLs) katalysieren Oxidoreduktionen unter Verbrauch von Cosubstraten. Bei der Reduktion von Ketonen oder Aldehyden zum Alkohol wird NAD(P)H zu NAD(P) oxidiert (Abb. 9).



**Abb. 9 Reaktionsschema – Oxidoreduktasereaktion**

AR: (phosphorylierter) Adenosindiphosphat-Rest; R1, R2: Substituenten

Bei der Oxidation wird die entsprechende Rückreaktion katalysiert. Da NAD(P)H bei 340 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, das die oxidierte Form NAD(P) nicht zeigt (Abb. 10), kann über die zeitabhängige Messung der Absorptionsänderung bei 340 nm die katalytische Aktivität der Oxidoreduktasen bestimmt werden. Bei der Reduktion nimmt die Absorption ab, bei der Oxidation steigt sie an.



**Abb. 10 Absorptionsspektren von NADPH und NADP**

Die Spektren für NAD(H) verhalten sich analog.

#### Cosubstrat-Lösungen

Die Dinukleotid-Cosubstrate für die Oxidoreduktasen wurden als wässrige Stammlösungen eingesetzt. Die Konzentration der Lösungen von NADPH und NADH wurde bei 340 nm fotometrisch gegen Wasser als Referenz bestimmt ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  Sigma-Aldrich Produktspezifikation). Diese wurden zu 2 mM oder 10 mM verdünnt. Für die oxidierten Cosubstrate NADP und NAD existieren keine spezifischen Absorptionskoeffizienten, deshalb

wurden die benötigten Konzentrationen (2 mM, 10 mM) aus der Einwaage berechnet und die Substanzen entsprechend in Wasser gelöst. Die Cosubstrat-Lösungen wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### Substrat-Lösungen

Die Substrate für die Aktivitätsuntersuchung der TRL Enzyme waren überwiegend schlecht wasserlöslich (Ausnahme: mono- und bityklische Ketone/Alkohole) und wurden deshalb zwanzigfach konzentriert in Methanol gelöst. Für kinetische Charakterisierungen wurden Verdünnungsreihen dieser Substrate ebenfalls mit Methanol hergestellt. Die methanolischen Lösungen wurden 1:20 im Reaktionsansatz verdünnt, so dass nur noch 5 % Methanol (V/V) im Ansatz vorlagen. Methanol erwies sich im Vergleich zu Ethanol und Dimethylsulfoxid als das am besten geeignete Lösungsmittel für die TRL Enzyme, da es den geringsten Einfluss auf die Enzymaktivität und gute Lösungseigenschaften zeigte (Coppi, 2012; Plohmann, 2010; Wagner, 2011).

#### 2.4.1.2 Aktivitätsmessung mit dem Zweistrahlphotometer

Zur Kontrolle der Enzymaktivität nach der Reinigung wurde ein Standardreaktionsansatz verwendet, der im Zweistrahlphotometer UV-160A (Shimadzu) bei 340 nm und 30 °C gemessen wurde. Der Ansatz wurde direkt in der Küvette gemischt und die Absorptionsänderung pro Minute gegenüber einem Referenzansatz ohne Substrat aufgezeichnet (Tab. 28). Zur Untersuchung des Substratumsatzes (qualitativ) wurden anstelle des Standardsubstrats 3-Methylcyclohexanon andere Substrate (siehe Tab. 10) in geeigneten Konzentrationen eingesetzt. Waren die Substrate in Methanol gelöst, wurde in die Referenzküvette das gleiche Volumen Methanol zugesetzt.

**Tab. 28 Zusammensetzung des Standardreaktionsansatzes**

Komponenten Reduktion	Komponenten Oxidation	Ansatz	Referenz
Wasser	Wasser	zu 1 ml	zu 1 ml
Phosphatpuffer pH 6,0 oder Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0	Tris-HCl Puffer pH 8,0 oder Glycin-NaOH Puffer pH 9,5	100 mM	100 mM
NADPH <sup>a</sup>	NADP <sup>a</sup>	200 µM	200 µM
3-Methylcyclohexanon	3-Methylcyclohexanol	5 mM	/
Enzym	Enzym	1-100 µg	1-100 µg

<sup>a</sup>Für das Enzym At2g29330 wurden NADH und NAD verwendet.

Der Grenzwert für eine messbare enzymatische Aktivität wurde bei einer linearen Abnahme (Reduktion) oder Zunahme (Oxidation) der Absorption von mindestens 0,001 AU/min festgelegt. Dieser Wert entspricht einer Volumenaktivität von 3 pkat/ml und damit einer spezifischen Aktivität von 30 pkat/mg für 100 µg/ml Enzym im Reaktionsansatz. Dies entspricht der maximal zugesetzten Enzymmenge. Absorptionsänderungen unterhalb der Detektionsgrenze wurden als „keine Aktivität“ definiert.



### 2.4.1.3 Aktivitätsmessung mit dem Mikroplatten-Lesegerät

Um den fotometrischen Aktivitätstest im größeren Maßstab und mit geringerem Zeit-, Cosubstrat-, Substrat- und Enzymeinsatz anwenden zu können, wurde das Messverfahren in 96 Well Mikrotiterplatten übertragen. Das Ansatzvolumen pro Kavität betrug 200 µl. Die Reaktion wurde durch automatische Injektion des fixen Cosubstrats bzw. Substrats gestartet. Die Mikrotiterplatten wurden bei 340 nm und 30 °C im Mikroplatten-Lesegerät Infinite F200PRO (Tecan) ausgelesen. Die Absorptionsänderung wurde je nach Aktivität des Enzyms über eine Zeitspanne von 2-10 min aufgezeichnet (in 20 s Intervallen). Pro Reaktion wurden 4 unabhängige Messwerte und 4 Blindwerte (Referenzansatz ohne das betreffende Substrat) parallel gemessen. Die mittlere Absorptionsänderung pro Minute wurde zur Auswertung herangezogen. Dafür wurde eine Kalibrierung mit NADPH (1-800 µM, 200 µl pro Kavität) vorgenommen (Abb. 11). Auf Grund identischer Absorptionskoeffizienten wurde die Kalibriergerade auch für Reaktionen mit NADH verwendet.

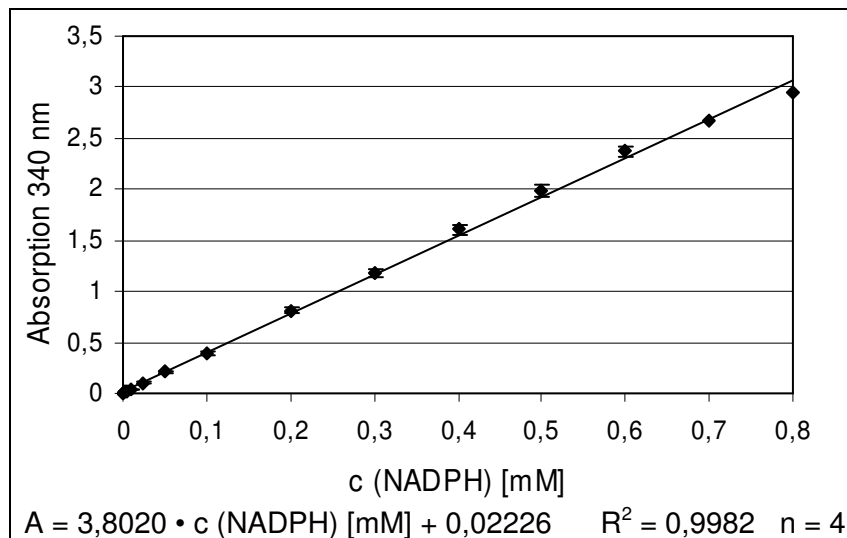


Abb. 11 NADPH-Kalibriergerade

Aus dem Anstieg der Kalibriergerade wurde ein Faktor ermittelt, mit dem die gemessene Absorptionsänderung pro Minute in die Volumenaktivität [pkat/ml = pmol/(ml·s)] umgerechnet werden konnte (Abb. 12). Für die Reduktion hatte dieser Faktor ein negatives (Absorption ↓) und für die Oxidation ein positives Vorzeichen (Absorption ↑).

$$\begin{aligned} \text{Anstieg: } a &= 3,8020 \text{ l/mmol} = 3,8020 \cdot 10^6 \text{ ml/pmol} \\ \text{Vol.-akt. [pmol/(ml·s)]} &= \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{\Delta A}{\text{min}} \\ \text{Vol.-akt. [pmol/(ml·s)]} &= \frac{1}{a} \cdot \frac{\Delta A}{\text{min}} \\ \text{Vol.-akt. [pmol/(ml·s)]} &= \frac{10^9 \text{ pmol}}{3,8020 \cdot 10^3 \text{ ml}} \cdot \frac{\Delta A}{60 \text{ s}} \\ \text{Vol.-akt. [pmol/(ml·s)]} &= 4384 \text{ pmol/(ml·s)} \cdot \Delta A \end{aligned}$$

Abb. 12 Berechnung des Faktors für die Volumenaktivität

Die spezifische Aktivität [nkat/mg] wurde als Quotient von Volumenaktivität und eingesetzter Proteinkonzentration [mg/ml] angegeben. Die pH-Optima für Reduktion und Oxidation und die kinetischen Parameter wurden mit der fotometrischen Methode im 96 Well Maßstab im Mikroplatten-Lesegerät bestimmt.

### Bestimmung der pH-Optima für Reduktion und Oxidation

Die Aktivitäten für die Reduktion von 3-Methylcyclohexanon und die Oxidation von 3-Methylcyclohexanol wurden für jedes der TRL Enzyme in einem Standardreaktionsansatz (200 µl; Tab. 28) mit unterschiedlichen Puffern (in 0,5 pH-Schritten) bestimmt. Die Puffer wurden nach Vorschrift (Tab. 11) in einer Konzentration von 1 M hergestellt und im Ansatz zu 100 mM verdünnt. Die verwendeten Puffer sind in Tab. 29 aufgeführt.

**Tab. 29 Puffer für pH-Optima**

Puffer (Konzentration 1 M)	pH für Reduktion	pH für Oxidation
Citrat-Phosphat-Puffer	4,5; 5,0; 5,5	/
Kaliumphosphat-Puffer	5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5	6,4; 6,5; 7,0; 7,5
Tris-HCl-Puffer	7,5; 8,0; 8,5; 9,0	7,5; 8,0; 8,5; 9,0
Glycin-NaOH Puffer	/	9,0; 9,5; 10,0

### Bestimmung der kinetischen Parameter $V_{\max}$ und $K_m$

Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter einer Enzymreaktion, Substrataffinität ( $K_m$ ) und maximale spezifische Aktivität ( $V_{\max}$ ) wurden fotometrisch bei 340 nm und 30 °C im Mikroplatten-Lesegerät durchgeführt. Je nach Aktivität und Substrat wurden Enzymkonzentrationen zwischen 1-20 µg/ml und Messzeiten zwischen 2-10 min verwendet. Die Grundvoraussetzung bestand darin, die Sättigung des Enzyms mit Substrat und Cosubstrat über die gesamte Messdauer zu gewährleisten. Dies wurde durch Auswertung des Regressionskoeffizienten der linearen Absorptionsänderung pro Minute kontrolliert (Anforderung:  $R^2 \geq 0,98$ ). Für Enzyme, die in Vortests messbaren Umsatz für ein Substrat zeigten, wurden entsprechende Substrat-Kandidaten für eine kinetische Charakterisierung ausgewählt (

Tab. 30). Die Cosubstratkinetiken wurden mit einer fixen Konzentration von 5 mM 3-Methylcyclohexanon (Reduktion) oder 3-Methylcyclohexanol (Oxidation) gemessen. Bei den Substratmessungen wurden jeweils 200 µM des entsprechenden Cosubstrats eingesetzt. Für At2g29330 wurde das Cosubstrat NAD(H) verwendet, für alle anderen TRL Enzyme und CoTR diente NADP(H) als Oxidoreduktionsäquivalent.

Die berechneten spezifischen Aktivitäten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen und die Daten mittels nichtlinearer Regression ausgewertet (SigmaPlot 10).

Tab. 30 Cosubstrate und Substrate für kinetische Charakterisierungen

Substrat	Gruppe	Lösung im Ansatz	c [mM]	Reaktion
NAD	Cosubstrat	Wasser	0,01-1,0	Oxidation
NADH			0,01-0,4	Reduktion
NADP			0,025-1,0	Oxidation
NADPH			0,01-0,4	Reduktion
Chinuclidin-3-on	Tropinon-analogen	Wasser	1,0-30,0	Reduktion
1-Pentanol	Aliphatische Carbonyle	5 % Methanol (V/V)	0,01-1,0	Oxidation
Pentanal			0,01-1,0	Reduktion
2,4-Dimethylpentanon			0,01-2,5	Reduktion
Citronellal			0,01-0,75	Reduktion
Nerol			0,01-1,0	Oxidation
Benzaldehyd	Aromatische Aldehyde	5 % Methanol (V/V)	0,01-1,5	Reduktion
<i>p</i> -Anisaldehyd			0,01-2,5	Reduktion
Indol-3-carbaldehyd			0,01-2,5	Reduktion
Indol-3-carbinol	Alkohol		0,01-2,5	Oxidation
3-Methylcyclohexanol	Monoterpen-analoga	Wasser	0,01-5,0	Oxidation
3-Methylcyclohexanon			0,1-10,0	Reduktion
4-Methylcyclohexanol			0,01-10,0	Oxidation
4-Methylcyclohexanon			0,1-5,0	Reduktion
1,4-Cyclohexandion			0,01-5,0	Reduktion
(-)-Carvon	Monoterpene	5 % Methanol (V/V)	0,01-5,0	Reduktion
(-)-Menthol			0,01-2,5	Oxidation
(-)-Menthon			0,01-5,0	Reduktion
(-)- $\alpha$ -Thujon			0,01-5,0	Reduktion
(+)-Neomenthol			0,01-2,0	Oxidation
( $\pm$ )-Jasmonsäure	Jasmonate	5 % Methanol (V/V)	0,5-7,5	Reduktion
Methyljasmonat			0,01-2,5	Reduktion
Methyldihydrojasmonat			0,01-2,5	Reduktion

## 2.4.2 Qualitative Analyse der Reaktionsprodukte

### 2.4.2.1 Synthese von Standards für die qualitative Produktanalyse

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die enzymatische Reduzierbarkeit diverser Ketone und Aldehyde untersucht. Da nicht für alle Reaktionsprodukte Standardsubstanzen verfügbar waren, wurden ausgewählte Substrate chemisch mit Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) reduziert (Tab. 31). Die Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  verläuft nicht stereoselektiv, das heißt aus einem prochiralen Keton entstehen mindestens zwei Reaktionsprodukte.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20-30 mg  $\text{NaBH}_4$  mit 100  $\mu\text{l}$  methanolischer Substratlösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gekühlt und das Gefäß nicht

verschlossen, da die Reaktion unter Bildung von elementarem Wasserstoff ablief. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 µl Wasser beendet. Die reduzierten Substanzen wurden mit 200 µl Ethylacetat oder n-Hexan extrahiert (Vortex-Mixer, Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm). Die mit Natriumsulfat getrocknete Ethylacetat- oder n-Hexanphase wurde für analytische Messungen mit HPLC oder GC verwendet.

**Tab. 31 Chemische Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>**

Substrate	Reaktionsprodukte	Extraktion mit
(-)-Carvon	<i>cis/trans</i> - (-)-Carveol	n-Hexan
(-)-α-Thujon	(-)-Neothujol und (-)-Thujol	n-Hexan
(+)-Campher	(-)-Isoborneol und (+)-Borneol	n-Hexan
Citral (= Neral und Geranial)	Nerol und Geraniol	n-Hexan
Citronellal	Citronellol	n-Hexan
Methyldihydrojasmonat (racemisch)	Methyldihydrocucurbate	Ethylacetat
Methyljasmonat (racemisch)	Methylcucurbate	Ethylacetat
2-Decalon ( <i>cis/trans</i> -Isomere)	2-Decalole	n-Hexan
Flavanon (racemisch)	Flavanole	Ethylacetat
2'-Hydroxyflavanon (racemisch)	2'-Hydroxyflavanole	Ethylacetat
6-Hydroxyflavanon (racemisch)	6-Hydroxyflavanole	Ethylacetat
7-Hydroxyflavanon (racemisch)	7-Hydroxyflavanole	Ethylacetat
<i>trans</i> -Chalkon	1,3-Diphenyl-2-propen-1-ole	Ethylacetat

#### 2.4.2.2 Qualitativer Produktnachweis mit GC-MS

Bei der fotometrischen Aktivitätsmessung wurde nur der Verbrauch an Cosubstrat betrachtet. Die Reaktionsprodukte enzymatisch umgesetzter Monoterpene, Aldehyde, Jasmonate und Steroide wurden mit Hilfe der Gaschromatografie gekoppelt mit massenspektrometrischer Auswertung qualitativ analysiert (Tab. 32). Dazu stand der Gaschromatograf GC-2010 mit dem Massenspektrometer GCMS-QP2010S (Shimadzu) und einer DB5 Säule (FS-Supreme-5ms, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, CS-Chromatografie Service) zur Verfügung. Als Trägergas diente Helium mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min (Steroide/Sterole: 1,2 ml/min). Von jeder Probe wurde ein Volumen von 1 µl splitlos injiziert. Es wurde bei einer Detektorspannung von 1,5 kV absolut und einer Interface-Temperatur von 250 °C gearbeitet. Die Quelle wurde bei einer Temperatur von 200 °C (Injektortemperatur) betrieben, nur im Steroid-Programm wurden 220 °C eingestellt. Die weiteren Parameter der verwendeten Programme für die verschiedenen Substanzklassen sind in Tab. 32 angegeben. Mit der NIST-Bibliothek (Version 2008) wurden die Massenspektren der Substrat- und Produkt-Peaks chemischen Verbindungen zugeordnet. Die Peakflächen und die Retentionszeiten wurden zur Auswertung herangezogen. Die Substrate wurden als Standardlösungen mit definierter Konzentration injiziert. Sofern ein Standard für die entstehenden Produkte verfügbar war, wurde dieser ebenfalls analysiert.

Tab. 32 Verwendete GC-MS Programme

<b>Substanzklasse</b>	<b>Monoterpene, Aldehyde</b>
<b>Programmname</b>	<b>A) Terpene06Juli10.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	Menthon, Thujon, (-)-Carvon, (-)-Fenchon, (+)-Pulegon, Piperiton, (1S)-(-)-Verbenon, Menthol, (+)-Neomenthol, (-)-Borneol, Carvacrol, Linalool, 2-Decalon, (+)-Campher, Nerol, Citral, Citronellal <i>p</i> -Anisaldehyd (Ansatz/Extraktion wie Benzaldehyd)
Ansatzzusammensetzung	0,5 ml Ansatz: 25 µg Protein 1 mM Substrat, 1 mM Cosubstrat, 100 mM Puffer (Reduktion: pH 5-6,4, Oxidation: pH 8-9,5) Blindansatz: 25 µg gekochtes Protein (10 min, 95 °C) Überschichtung mit 0,25 ml n-Hexan, 60 min, 30 °C
Probenextraktion	Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, n-Hexan-Phase für GC-MS-Analytik
GC-Temperaturgradient	60 °C → 4 °C/min → 150 °C (1 min) → 15 °C/min → 245 °C (3 min)
MS-Analyse	5,5-32 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z
<b>Abweichendes System</b>	Analyse der Menthon- und Thujon-Ansätze für CrTRL26, At2g29150, At2g29350, At5g06060 und -61NAAt2g29260Q220Y und der (+)-Pulegon-Ansätze für CrTRL26, At2g29360 mit:  TraceGC 2000/Polaris Qe mit manueller Injektion Injektionstemperatur 220 °C, Quelle und Transfer-line 230 °C, Ionisierungsenergie 70 eV (weitere Parameter identisch)
<b>Substanzklasse</b>	<b>Aldehyde</b>
<b>Programmname</b>	<b>B) Aldehyde25Juli11.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	Pentanal, 2,4-Dimethylpentan-3-on
Ansatzzusammensetzung	0,4 ml Ansatz: 20 µl Protein (entspricht 16-64 µg) 1 mM Substrat, 1 mM Cosubstrat, 100 mM Puffer pH 5/6 Blindansatz: 20 µl gekochtes Protein (10 min, 95 °C) Überschichtung mit 0,2 ml Ethylacetat, 30 min, 30 °C, 500 rpm
Probenextraktion	Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, Ethylacetat-Phase für GC-MS-Analytik
GC-Temperaturgradient	50 °C → 2 °C/min → 90°C (1 min)
MS-Analyse	2,55-21 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 30-100 m/z
<b>Substanzklasse</b>	<b>Aldehyde</b>
<b>Programmname</b>	<b>C) Terpene17Nov10.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	Benzaldehyd
Ansatzzusammensetzung	Analog B)
Probenextraktion	Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, Ethylacetat-Phase für GC-MS-Analytik
GC-Temperaturgradient	60°C → 2,5 °C/min → 100 °C (1 min) → 15 °C/min → 245 °C (1 min)
MS-Analyse	3,55-23 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z

<b>Substanzklasse</b>	<b>Indole</b>
<b>Programmname</b>	<b>D) Indolaldehyd06Okt11.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	Indol-3-carbaldehyd, Indol-3-carbinol, Indol-3-ethanol
Ansatzzusammensetzung	0,4 ml Ansatz: 20 µl Protein (entspricht 16-64 µg) 1 mM Substrat, 1 mM Cosubstrat, 100 mM Puffer (Reduktion: pH 5/6, Oxidation: pH 8/9,5)  Blindansatz: 20 µl gekochtes Protein (10 min, 95 °C) 60 min, 30 °C, 1000 rpm
Probenextraktion	40 µl gesättigte Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lsg., 200 µl Ethylacetat, Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, Ethylacetat-Phase zur Trockne einengen
Derivatisierung	Trimethylsilylierung der Aldehyd-/Alkohol- und Amin-Gruppe mit <i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)trifluoacetamid 50-100 µl BSTFA, 30 min, 60 °C, + 100 µl Ethylacetat
GC-Temperaturgradient	80 °C (2 min) → 12 °C/min → 280 °C (2 min)
MS-Analyse	8-20 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-700 m/z
<b>Substanzklasse</b>	<b>Nootkaton, Jasmonate</b>
<b>Programmname</b>	<b>E) Nootkaton09Juli10.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	(+)-Nootkaton (Ansatz/Extraktion wie Monoterpene) Jasmonsäure, Methyljasmonat, Methyl Dihydrojasmonat
Ansatzzusammensetzung	0,4 ml Ansatz: 20 µl Protein (entspricht 16-64 µg) 1 mM Substrat, 1 mM Cosubstrat, 100 mM Puffer pH 5-6,4 Blindansatz: 20 µl gekochtes Protein (10 min, 95 °C)  <u>Methyl(dihydro)jasmonat</u> : Überschichtung mit 0,2 ml n-Hexan 60 min, 30 °C, ohne Schütteln <u>Jasmonsäure</u> : 60 min, 30 °C, 1000 rpm
Probenextraktion	<u>Methyl(dihydro)jasmonat</u> : Vortex-Mixer, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, n-Hexan-Phase für GC-MS-Analytik  <u>Jasmonsäure</u> : 50 µl 0,1 N HCl, 2 x 200 µl Ethylacetat, Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, Ethylacetat-Phasen zur Trockne einengen, Rücklösen in 150 µl Ethylacetat
Derivatisierung	<u>Jasmonsäure</u> : Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid zu Methyljasmonat 30 µl TMSH + 100 µl Ethylacetat-Phase, 10 min bei Raumtemperatur
GC-Temperaturgradient	60 °C → 15 °C/min → 150 °C (1 min) → 10 °C/min → 245 °C (3 min)
MS-Analyse	5,5-19 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z

Substanzklasse Programmname	<b>Steroide, Sterole</b> <b>F) Steroide09Aug10.qgm</b>
Analyse der Ansätze mit	Testosteron, Progesteron, 5 $\alpha$ -Cholestan-3-on, Pregnenolon, 5 $\alpha$ -Dihydropregnenolon, 5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on, 4-Androsten-3,17-dion, Stigmasterol, $\beta$ -Sitosterol
Ansatzzusammensetzung	0,25 ml Ansatz: 25 $\mu$ g Protein 0,25-0,5 mM Substrat, 0,8 mM Cosubstrat, 100 mM Puffer (Reduktion: pH 5-6,4, Oxidation: pH 8-9,5) Blindansatz: 25 $\mu$ g gekochtes Protein (10 min, 95 °C) 30 min, 30 °C, 1000 rpm
Probenextraktion	2 x 100 $\mu$ l n-Hexan, Vortex, Zentrifugation: 1 min, 13.000 rpm, vereinigte n-Hexan-Phasen für GC-MS-Analytik
GC-Temperaturgradient	60°C $\rightarrow$ 35 °C/min $\rightarrow$ 260 °C (1 min) $\rightarrow$ 3 °C/min $\rightarrow$ 300 °C (4 min)
MS-Analyse	6,5-24 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-500 m/z

#### 2.4.2.3 Analyse der Reduktionsprodukte von (-)- $\alpha$ -Thujon mit NMR

Die Struktur des Reaktionsprodukts der enzymatischen Reduktion von (-)- $\alpha$ -Thujon mit dem Enzym CoTR und der Produkte der chemischen Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> wurden mit <sup>13</sup>C-NMR und <sup>1</sup>H-NMR aufgeklärt. Ein 10 ml Reaktionsansatz enthielt 5 mM NADPH, 3 mM (-)- $\alpha$ -Thujon, 5 % (V/V) Methanol und 100  $\mu$ g/ml CoTR in 100 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit gekochtem Protein (10 min, 95 °C) mitgeführt. Beide Ansätze wurden 22,5 h bei 30 °C inkubiert und anschließend viermal mit je 2 ml n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Phasen wurden mit wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Eine 1:10 Verdünnung des Extrakts wurde für die semi-quantitative Abschätzung der Probenzusammensetzung mit GC-MS verwendet (2.4.2.2). Für die chemische Reduktion des Ketons wurden 7,72 mg (-)- $\alpha$ -Thujon in 1 ml Methanol mit 80 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt und für 3 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Wasser wurden die Analyten dreimal mit 1 ml n-Hexan extrahiert. Die Extrakte der enzymatischen und chemischen Reduktion sowie ein authentischer Standard des Ketons wurden im Stickstoffstrom getrocknet und in deuteriertem Chloroform (CDCl<sub>3</sub>) gelöst. <sup>13</sup>C-NMR und <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden von Frau Dr. Porzel (IPB Halle) mit einem Agilent VNMR 600 Spektrometer (Varian) bei 599,82 MHz (<sup>13</sup>C) bzw. 150,84 MHz (<sup>1</sup>H) aufgenommen. Chemische Verschiebungen bezogen sich auf die internen Standards Tetramethylsilan ( $\delta$  = 0 ppm, <sup>1</sup>H) und CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 77,0 ppm, <sup>13</sup>C). Die Signale wurden mit Hilfe zweidimensionaler NMR Messungen (DQFCOSY, HSQC, HMBC) zugeordnet und mit vorhandener Literatur verglichen (Baeckström et al., 1996; Bohlmann et al., 1975; Sirisoma et al., 2001).

### 2.4.2.4 Qualitativer Produktnachweis mit HPLC-DAD

Flavonoide und deren Analoga sind für die Analyse mit GC-MS nicht ausreichend flüchtig, hingegen sind sie geeignet für die Hochleistungsflüssigchromatografie. Sie verfügen über ein chromophores System, das zur UV/VIS-Detektion mittels Diodenarray-Detektor genutzt werden kann. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tab. 33 aufgelistet.

**Tab. 33 Zusammensetzung des Flavonoid-Reaktionsansätze**

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]	Konzentration
Wasser	350	/
Puffer pH 5,0 oder pH 6,0	50	100 mM
NADPH <sup>a</sup> 10 mM	50	1 mM
Flavonoid (5-20 mM in Methanol)	25	0,25-1 mM (5 % Methanol)
Enzym	25	40-100 $\mu$ g/ml

<sup>a</sup>Für das Enzym At2g29330 wurde NADH verwendet.

Die Proben wurden 60 min bei 30 °C und 700 rpm inkubiert und anschließend mit 200  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert (Vortex-Mixer, Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm). Die Ethylacetat-Phase wurde direkt für die HPLC-Analyse verwendet (Tab. 34). Ein Blindansatz wurde mit der gleichen Konzentration des gekochten Proteins (10 min, 95 °C) präpariert und analog wie die Proben mit nativem Protein behandelt.

**Tab. 34 HPLC-Methode für Flavonoide**

Gerät	HPLC-DAD LaChrom Elite (VWR Hitachi) mit Säulenofen (Jetstream 2, W.O. Electronics)
Säule	LiChrospher 100 RP-18 LiChroCART 125 x 4,0 mm (Merck)
Säulenparameter	125 x 4 mm, 5 $\mu$ m Partikelgröße
Gradientenelution	Eluent A: Phosphorsäure:Wasser = 0,5:99,5 / Eluent B: Acetonitril
Flussrate	1 ml/min
Probenvolumen	200 $\mu$ l
Injektionsvolumen	10 $\mu$ l
Temperatur Säulenofen	25 °C
Gradient der Methode	

Die Auswertung der Peakflächen und Retentionszeiten der Signale in den HPLC-Chromatogrammen wurde beim jeweiligen lokalen Absorptionsmaximum der



untersuchten Substanz vorgenommen, dieses variierte zwischen Substrat und Produkt (Tab. 35, letzte Spalte).

**Tab. 35 Standardsubstanzen für die Flavonoid-HPLC**

Substanz	CAS-Nummer	c [mg/ml]	t <sub>ret</sub> [min]	λ <sub>max</sub> [nm]	λ <sub>max</sub> [nm] Auswertung
<i>trans</i> -Chalkon	614-47-1	0,52	15,31	305	305
Flavanon	487-26-3	0,56	14,37	250/320	250
2'-Hydroxyflavanon	17348-76-4	0,60	12,40	252/320	252
6-Hydroxyflavanon	4250-77-5	0,45	11,91	256/357	256
7-Hydroxyflavanon	6515-36-2	0,30	11,45	233/275/310	275
(-)-Naringenin	480-41-1	0,68	10,04	287	287
Daidzein	486-66-8	0,16	8,68	247/302	247
Genistein	446-72-0	0,34	10,15	210/258	258
Flavon	525-82-6	0,56	14,00	250/297	250
3-Hydroxyflavon	577-85-5	0,30	14,48	240/306/343	343
6-Methoxyflavon	26964-24-9	0,32	14,84	267/303	267
Mit NaBH <sub>4</sub> reduzierte Flavonoide					
1,3-Diphenyl-2-propen-1-ole <sup>a</sup>	62668-02-4	0,52	13,40	210/253	253
Flavanole <sup>b</sup>	487-25-2	0,23	12,63	210/276	276
			12,79	210/276	276
2'-Hydroxyflavanole <sup>b</sup>	67765-49-5	0,32	10,73	276	276
			11,23	276	276
6-Hydroxyflavanole <sup>b</sup>	488847-57-0	0,24	10,16	298	298
7-Hydroxyflavanole <sup>b</sup>	72594-23-1	0,30	9,73	206/280	280
			9,82	206/280	280

<sup>a</sup>enantiomere Alkohole; <sup>b</sup>diastereomere Alkohole

## 2.5 Methoden der Bioinformatik

### 2.5.1 Datenbanken und Computerprogramme

**Tab. 36 Stationäre Computerprogramme**

Bezeichnung	Hersteller/Anbieter	Verwendung
ACD/Chemsketch 11.01	Advanced Chemistry Development, Inc.	Erstellung von Strukturformeln, dreidimensionale Ansicht
ISIS Draw 2.3	MDL Information Systems	Erstellung von Strukturformeln und Reaktionsschemata
MEGA 5	Center for Evolutionary Medicine and Informatics	Phylogenetische Sequenzanalyse
OMIGA 2.0	Oxford Molecular Ltd.	Sequenzanalyse, Primer-Design
pDRAW32 1.1.112	AcaClone Software	Erstellung von Vektorkarten
PyMol v0.99	DeLano Scientific LLC	Darstellung von Homologiemodellen und Kristallstrukturen
SigmaPlot 10 mit Enzymkinetik-Modul 1.3	Systat Software Inc.	Auswertung von Daten mit nichtlinearer Regression

Tab. 37 Datenbanken und Computerprogramme im Internet

Bezeichnung	Betreiber (Internetadresse)	Referenz
Bio-Array Resource eFP Browser Expression Angler	Centre for the Analysis of Genome Evolution and Function, Universität Toronto, Kanada (bar.utoronto.ca)	/ (Winter et al., 2007) (Toufighi et al., 2005)
BLAST	National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)	(Altschul et al., 1990)
BRENDA	Institut für Biochemie und Bioinformatik, TU Braunschweig (www.brenda-enzymes.org)	(Scheer et al., 2011)
ChloroP 1.1 TargetP 1.1	Center for Biological Sequence Analysis, Technische Universität Dänemark, (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP)	(Emanuelsson et al., 1999) (Emanuelsson et al., 2000), (Nielsen et al., 1997)
ClustalW2	European Bioinformatics Institute, Cambridge, Großbritannien (www.ebi.ac.uk)	(Larkin et al., 2007)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (www.embl.org; www.ebi.ac.uk)	/
ExpASy ProtParam	Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Lausanne, Schweiz (www.expasy.org)	(Gasteiger et al., 2003)
GenBank	National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)	(Benson et al., 2011)
Genevestigator	Nebion AG, Schweiz (www.genevestigator.com)	(Hruz et al., 2008)
RCSB Protein Data Bank	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (www.pdb.org)	(Berman et al., 2000)
SciFinder	American Chemical Society (scifinder.cas.org)	/
SDR-Datenbank	IFM Bioinformatics, Universität Linköping, Schweden (www.sdr-enzymes.org)	(Persson et al., 2009)
TAIR	Arabidopsis Biological Research Center (www.arabidopsis.org)	/
T <sub>m</sub> -Calculator	Stratagene, USA (www.stratagene.com)	/
UniProtKB	The UniProt Consortium (www.uniprot.org)	(The UniProt Consortium, 2012)
WoLF PSORT 0.2	Korea Center for Disease Control & Prevention	(Horton et al., 2007)

## 2.5.2 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetischen Bäume dieser Arbeit wurden mit der Software MEGA 5 erstellt (Tamura et al., 2011). Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Datenbank GenBank extrahiert und vor der phylogenetischen Analyse mit ClustalW2 aliniert (Abb. 7: 32 Sequenzen, Abb. 50: 54 Sequenzen). Die ausgewählten Aminosäuresequenzen wurden mit der Neighbor-Joining Methode analysiert (Saitou and Nei, 1987). Die phylogenetischen Bäume wurden mit der Bootstrap-Methode (1000 Wiederholungen) validiert (Felsenstein, 1985). Bootstrap-Werte  $\geq 50\%$  wurden an den Knoten angegeben. Die Länge der Verzweigungen entspricht der evolutionären Distanz und ist skaliert. Die evolutionäre Distanz wurde mit der p-Distanz Methode berechnet (Nei and Kumar, 2000) und gibt die Anzahl der Aminosäureaustausche pro Position an (0,05 entspricht einem Austausch pro 20 AS).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung von *trl*-Sequenzen aus *A. thaliana* und *C. rubella*

##### 3.1.1 Isolierte RNA aus pflanzlichem Material

Bei der RNA-Extraktion nach 2.2.1 wurden die in Tab. 38 aufgeführten Gesamt-RNA-Proben von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Columbia Wildtyp) und *Capsella rubella* REUT. erhalten. Die RNA-Präparationen waren in Konzentration und Qualität geeignet für die Synthese von cDNA durch reverse Transkription (2.2.3). Für die Amplifizierung der codierenden Sequenzen von *at2g29260* und *at5g06060* aus *A. thaliana* wurde mit RNA-Probe 1 und für *at2g29350* mit RNA-Probe 2 gearbeitet.

Tab. 38 Verwendete Gesamt-RNA-Proben

Pflanze	Herkunft des Materials	Pflanzenteile, Alter	c (RNA) [µg/µl]	Verhältnis $A_{260}/A_{280}$
<i>A. thaliana</i>	1 Anzucht aus Samen <i>In vitro</i> Kultur	Keimlinge, 7 Tage alt	2,17	1,9
	2 Gewächshaus IPB Halle	oberirdische Teile einer nicht-blühenden Pflanze	1,53	1,8
<i>C. rubella</i>	<i>In vitro</i> Kultur, Samen von Dr. M. Piotrowski Ruhr-Universität Bochum	nicht-blühende Ganz- pflanze, 2 Wochen alt	2,52	2,0

##### 3.1.2 Amplifizierung von *trl*-Sequenzen

Die Amplifizierung der codierenden Sequenzen von *at2g29260*, *-61Nat2g29260* (um 183 bp verkürzt), *at5g06060*, *at2g29350* aus *A. thaliana* und von *ctrl26* aus *C. rubella* gelang durch PCR mit Pfu DNA Polymerase unter Verwendung genspezifischer Primer (2.2.4.1, Tab. 8). In den Elektropherogrammen sind eindeutige DNA-Banden bei ca. 800 bp sichtbar (*at2g29260* 1000 bp), die mit den erwarteten Fragmentgrößen übereinstimmen (Abb. 13).

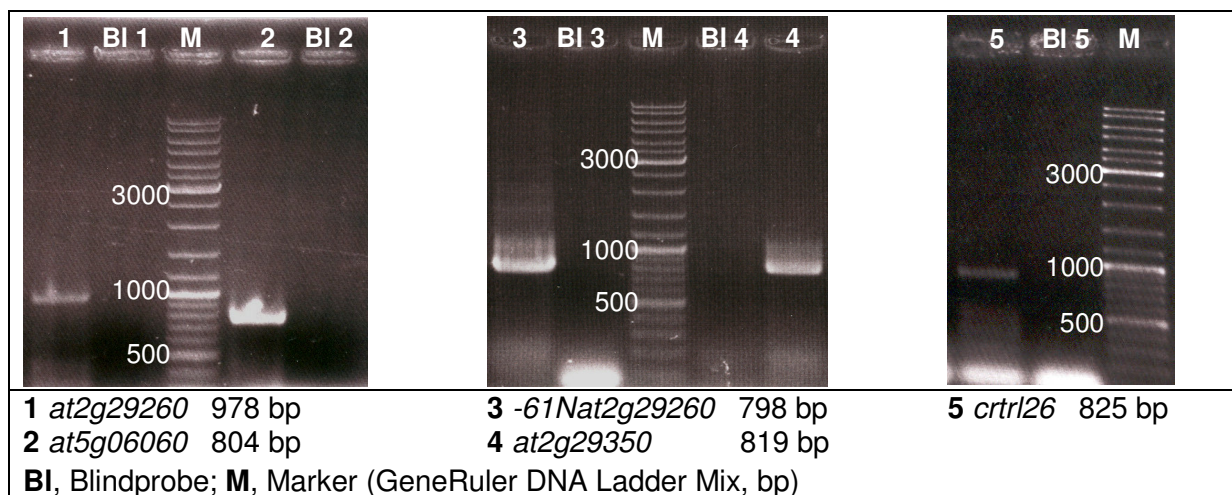


Abb. 13 Elektropherogramme zur Kontrolle der Pfu-PCR

### 3.1.3 Synthesevektoren für TRL Proteine

#### 3.1.3.1 Synthesevektoren mit Vollängen-cDNA

Die TRL cDNA-Sequenzen wurden in den Synthesevektor pQE-30 ligiert (2.2.13), der zur Synthese von TRL Proteinen mit N-terminalem His-Tag diene. Dieses Vorgehen beruht auf Erkenntnissen zur Aktivität der Tropinonreduktase II aus *Solanum dulcamara* (Solanaceae). Das Fusionsprotein mit C-terminalem His-Tag zeigte bei der Reduktion von Tropinon eine 4,5-fach verminderte spezifische Aktivität und eine zehnfach geringere Affinität zu Tropinon im Vergleich zum Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag (Freydank et al., 2008). Das Expressionssystem pQE-30 in *E. coli* M15[pREP4] wurde unter der Annahme ausgewählt, dass der His-Tag am N-Terminus die katalytische Aktivität der TRL Enzyme weniger beeinflusst als ein C-terminaler His-Tag.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Synthesevektoren selbst hergestellt: *at5g06060*-pQE-30, *at2g29260*-pQE-30, *-61Nat2g29260*-pQE-30, *at2g29350*-pQE-30 und *ctrl26*-pQE-30. Darüber hinaus wurden Fusionsproteine von vier weiteren rekombinanten Synthesestämmen untersucht, die im Rahmen von Diplomarbeiten angefertigt (*at2g29360*-pQE-30, Wagner, 2011; *at2g29150*-pQE-30, Plohmann, 2010 und *at2g29330*-pQE-30, Coppi, 2012) bzw. von Frau Dr. Brock zur Verfügung gestellt wurden (*cotr*-pET-21d (Brock, 2008)). Vektorkarten und Eigenschaften der daraus resultierenden Fusionsproteine sind aus Platzgründen im Anhang in Tab. A3 aufgeführt. Die Amplifizierung und Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenz von *at2g29170* aus isolierter RNA war nicht erfolgreich. Es wurden lediglich zwei verkürzte Varianten gefunden, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstanden sind. Die Spleißvarianten enthielten entweder keine katalytische Triade oder waren nicht löslich zu synthetisieren (Plohmann, 2010). Aus diesem Grund entfielen Untersuchungen zum TRL Protein At2g29170.

Die Amplifikation der cDNA-Sequenzen von *ctrl5* und *ctrl21* aus *Capsella rubella* (orthologe Gene zu *at2g29150* bzw. *at2g29330*) führte zu Nukleotidsequenzen mit Abweichungen zu den bekannten Annotationen in Sequenzdatenbanken (z. B. GenBank, EMBL). Im Fall von *ctrl5* traten 20 Nukleotidunterschiede zum EMBL-Eintrag ABW81165 auf, von denen fünf zu Änderungen der Aminosäuresequenz führten. Die gefundene Sequenz wurde deshalb als *ctrl51* bezeichnet. Das entsprechende Fusionsprotein CrTRL51 wurde von Anja Plohmann in ihrer Diplomarbeit untersucht (Plohmann, 2010). Für das Gen *ctrl21* wurden zwei Varianten gefunden, die durch je zwei relevante Punktmutationen vom EMBL-Eintrag ABW81150 abwichen. Die zwei Varianten *ctrl21v1* und *ctrl21v2* wurden in der Diplomarbeit von Ralph Coppi ausführlich bearbeitet (Coppi, 2012) und sind hier nicht Gegenstand der Untersuchung.

Ein Grund für die gefundenen Genvariationen in *C. rubella* könnte in der Verwendung unterschiedlicher Herkünfte des Pflanzenmaterials für Datenbankeintrag (Navarro-Quezada,

2007) und RNA-Isolierung liegen. Im Gegensatz zum Ökotyp Columbia für *A. thaliana* ist für *C. rubella* kein Ökotyp spezifiziert.

### 3.1.3.2 Verkürzungsmutante und ortsgerichtete Mutagenese von *at2g29260*

*At2g29260* wies einige signifikante Unterschiede zu den anderen *trl*-Sequenzen auf. Die codierende Sequenz war N-terminal ca. 200 Basenpaare länger (1000 bp > 800 bp) und zeigte eine auffällige Häufung von Triplets, die hydroxylierte Aminosäuren wie Serin und Threonin und basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin codierten. Darüber hinaus fehlten im N-terminalen Bereich des Proteins *At2g29260* saure Aminosäuren fast vollständig (Ausnahme: Asp4). Diese Besonderheiten weisen darauf hin, dass hier ein plastidäres Transitpeptid vorliegen könnte (Lee et al., 2008). Eine Analyse der Aminosäuresequenz von *At2g29260* (322 AS) mit Programmen für die Vorhersage von Transit- und Signalpeptiden (ChloroP, TargetP und WoLF PSORT) wurde vorgenommen (Tab. 39).

ChloroP verwendet ein Datenset von 150 Proteinsequenzen, von denen 75 ein chloroplastidäres Transitpeptid tragen und die anderen 75 nicht. Das Programm vergleicht die ersten 100 N-terminalen Aminosäuren der eingegebenen Sequenz mit dem Datenset. TargetP verwendet für die Analyse von Transit- und Signalpeptiden in Pflanzen (chloroplastidär, mitochondrial, sekretorisch) ChloroP und SignalP, wobei die ersten 130 N-terminalen Aminosäuren betrachtet werden. Mit TargetP und ChloroP sind außerdem Vorhersagen zur Schnittstelle für ein potentiell Transit-/Signalpeptid möglich. Eine N-terminale Peptidsequenz von 61 Aminosäuren wurde von TargetP und ChloroP als chloroplastidäres Transitpeptid eingeordnet und die Lokalisation von *At2g29260* in Chloroplasten als höchstwahrscheinlich angegeben.

**Tab. 39 Ergebnisse der Transit-/Signalpeptid-Vorhersage für *At2g29260***

Programm	Bewertung			Restriktionsstelle	Ergebnis
ChloroP 1.1	cTP-Score 0,558	Schnittstellen-Bewertung 3,527 (für AS 62)		N-terminal: 61 AS	cTP
TargetP 1.1	cTP 0,896	mTP 0,065	SP 0,003	N-terminal: 61 AS	cTP
WoLF PSORT	Chloroplast 11,5	Mitochondrion 2,5		N-terminal: bei AS 59-60	cTP

Mit WoLF PSORT wird die eingegebene Aminosäuresequenz mit einem Datenset von Proteinen bekannter Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien verglichen und die Lokalisation der ähnlichsten Vergleichsproteine als Zahlenwert angegeben. Die ersten 45 Aminosäuren von *At2g29260* wurden dazu betrachtet und mit den N-Termini der 14 ähnlichsten Proteine mit Transitpeptid verglichen. Auch die Analyse mit WoLF PSORT deutete auf ein chloroplastidäres Transitpeptid für *At2g29260* hin. Die wahrscheinlichste

Schnittstelle für das Transitpeptid wurde von WoLF PSORT zwischen Aminosäure 59 und 60 angegeben. Der Wert korreliert gut mit den Ergebnissen von ChloroP und TargetP, mit denen jeweils nach den ersten 61 N-terminalen Aminosäuren eine solche Schnittstelle lokalisiert wurde. Auf Basis der Vorhersagen wurde die Sequenz *-61Nat2g29260* kloniert (Tab. A3), die um die ersten 183 Nukleotide im Vergleich zu *at2g29260* verkürzt ist und ein Fusionsprotein ohne die ersten 61 N-terminalen Aminosäuren codiert (Abb. 14).

*At2g29260* und auch die Verkürzungsmutante zeigten eine weitere auffällige Besonderheit. Die bei den klassischen SDRs konservierte katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin besteht hier aus Serin, Glutamin und Lysin. Da Tyrosin als katalytische Säure/Base am Reaktionsmechanismus der Oxidoreduktion beteiligt ist, sollte ein Protein ohne das katalytische Tyrosin keine Oxidoreduktaseaktivität aufweisen. Das traf für das löslich synthetisierte Protein *-61NA<sub>t</sub>2g29260* zu. Aus diesem Grund wurde mit ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4.3) die Aminosäure Glutamin (Aminosäure 220 im nativen Protein; Triplet: CAA) gegen Tyrosin (Triplet: TAC) ausgetauscht. Das erhaltene Fusionsprotein wurde als *-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y* bezeichnet (Alignment Abb. 14). Synthesestamm und Proteinlänge sind identisch mit *-61NA<sub>t</sub>2g29260*, das Molekulargewicht der Mutante beträgt 30145,2 Da. Das verkürzte und mutierte Fusionsprotein wurde löslich synthetisiert und zeigte katalytische Aktivität als Oxidoreduktase.

<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	-----MRGSHHHHHHGSA	13	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	-----MRGSHHHHHHGSA	13	
<i>At2g29260</i>	<b>MVLDMA</b> SHLYTNPPQNLHF <b>ISSSSSLKPHLCLSFKRINPKHKSSSSSVFVPYASQSSIAI</b>	60	
			:: : :* : .*
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	CSKERWSLNGMSALVTGGTRGIGRAIVEELAGLGAEVHTCARNEYELENCLSDWNRSGFR	73	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	CSKERWSLNGMSALVTGGTRGIGRAIVEELAGLGAEVHTCARNEYELENCLSDWNRSGFR	73	
<i>At2g29260</i>	<b>T</b> SKERWSLNGMSALVTGGTRGIGRAIVEELAGLGAEVHTCARNEYELENCLSDWNRSGFR	120	
	*****		
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	VAGSVCVSDRSQREALMETVSSVFEGKLHILVNNVGTNIRKPMVEFTAGEFSTLMSTNF	133	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	VAGSVCVSDRSQREALMETVSSVFEGKLHILVNNVGTNIRKPMVEFTAGEFSTLMSTNF	133	
<i>At2g29260</i>	VAGSVCVSDRSQREALMETVSSVFEGKLHILVNNVGTNIRKPMVEFTAGEFSTLMSTNF	180	
	*****		
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	ESVFHLCQLAYPLLRESKAGSVVVIS <b>S</b> VSGFVSLKNMSV <b>Q</b> SST <b>K</b> GAINQLTRSLACEWAK	193	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	ESVFHLCQLAYPLLRESKAGSVVVIS <b>S</b> VSGFVSLKNMSV <b>Y</b> SST <b>K</b> GAINQLTRSLACEWAK	193	
<i>At2g29260</i>	ESVFHLCQLAYPLLRESKAGSVVVIS <b>S</b> VSGFVSLKNMSV <b>Q</b> SST <b>K</b> GAINQLTRSLACEWAK	240	
	*****		
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	DNIRINAVAPWYIKTSMVEQVLSNKEYLEEVYSVTPLGRLGEPREVSSAVAFCLCPASSY	253	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	DNIRINAVAPWYIKTSMVEQVLSNKEYLEEVYSVTPLGRLGEPREVSSAVAFCLCPASSY	253	
<i>At2g29260</i>	DNIRINAVAPWYIKTSMVEQVLSNKEYLEEVYSVTPLGRLGEPREVSSAVAFCLCPASSY	300	
	*****		
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260</i>	ITGQILCVDGGMSINGFFPRHD	275	
<i>-61NA<sub>t</sub>2g29260Q220Y</i>	ITGQILCVDGGMSINGFFPRHD	275	
<i>At2g29260</i>	ITGQILCVDGGMSINGFFPRHD	322	
	*****		

\* identische Aminosäuren (Gonnet Matrix)  
 His-Tag    cTP  
 ▼ Mutation Q220Y  
 katalytische Triade

Abb. 14 Alignment von *At2g29260* und deren Mutanten (ClustalW2)

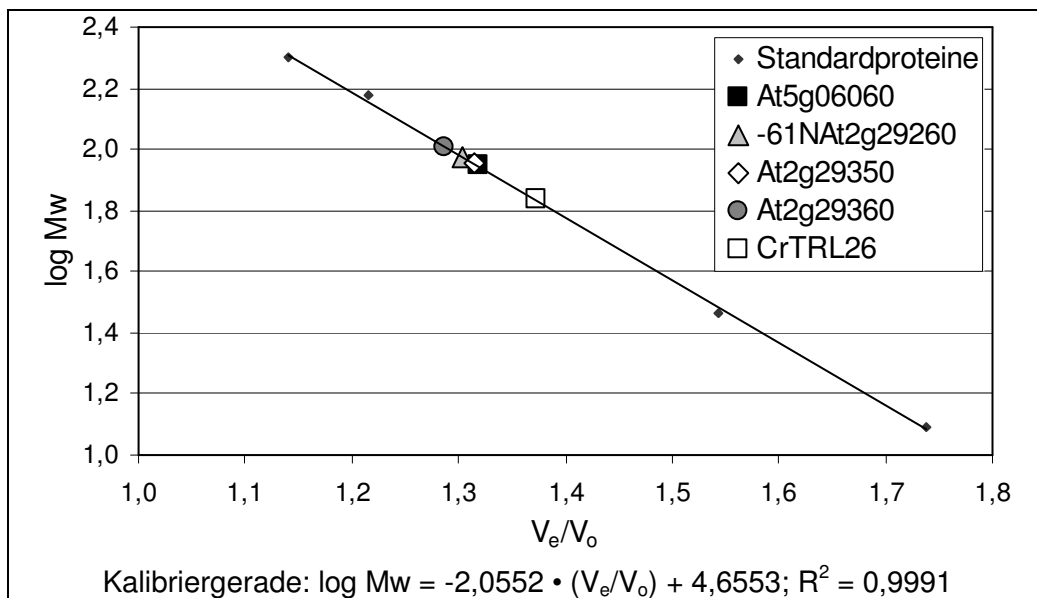
## 3.2 Synthese und Reinigung der TRL Fusionsproteine

Alle TRL Proteine, mit Ausnahme von At2g29260, wurden mit hohen Ausbeuten löslich in *E. coli* synthetisiert (Abb. A1 im Anhang). Da At2g29260 mit N-terminalem Transitpeptid nicht löslich in Bakterienzellen synthetisiert werden konnte, wurde die katalytische Aktivität nur für das verkürzte Protein -61NAt2g29260 und die Mutante -61NAt2g29260Q220Y untersucht. Reinheit und Konzentration der mit IMAC gereinigten Zielproteine (2.3.3) waren ausreichend für alle nachfolgenden Messungen.

### 3.2.1 Bestimmung des nativen Molekulargewichts der TRL Proteine

Das native Molekulargewicht der TRL Proteine war nicht bekannt. Untersuchungen dazu wurden für ausgewählte Vertreter mit analytischer Gelfiltration (2.3.6.1) und Ultrazentrifugation (2.3.6.2) vorgenommen.

Für die analytische Gelfiltration wurde das Ausschlussvolumen mit Dextranblau bei 20 °C bestimmt, es betrug 48,846 ml. Das Bettvolumen der Säule (XK 16/60 gefüllt mit Sephacryl S-200 HR, Tab. 24) lag bei 119 ml. Mit Ausnahme von Rinderserumalbumin eluierten alle Standardproteine (Tab. 25) und die untersuchten TRL Proteine in Form einzelner symmetrischer Peaks. Das Chromatogramm von Rinderserumalbumin (Monomer 66 kDa) zeigte einen zusätzlichen Peak, der dem Dimer zugeordnet wurde (132 kDa). Der BSA Standard wurde als qualitativ unzureichend bewertet und nicht in die Berechnung der Kalibriergerade einbezogen (Abb. 15).



**Abb. 15 Auswertung der analytischen Gelfiltration von TRL Proteinen**

Mw, Molekulargewicht;  $V_e$ , Elutionsvolumen;  $V_o$ , Ausschlussvolumen

Die TRL Proteine aus *A. thaliana* At5g06060, -61NAt2g29260, At2g29350 und At2g29360 eluierten bei sehr ähnlichen Volumina ( $V_e$ : 63-64 ml) jeweils als einzelner Peak. In Abweichung dazu eluierte CrTRL26 aus *C. rubella* bei einem deutlich höheren Volumen von

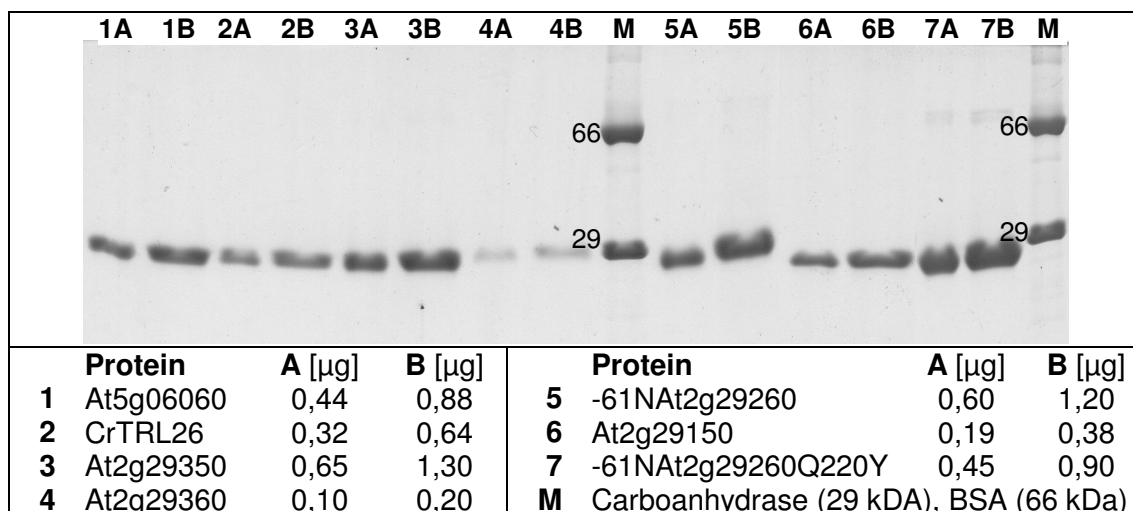
67 ml. Dem Hauptpeak folgte unmittelbar ein sehr kleiner Peak, dessen berechnetes Molekulargewicht von 20 kDa einem Monomer zugeordnet wurde. Für CrTRL26 resultierte bei der analytischen Gelfiltration ein natives Molekulargewicht von 68 kDa. Für alle anderen untersuchten Proteine lag das berechnete Molekulargewicht zwischen 88 und 102 kDa. Die Ergebnisse der Ultrazentrifugation durch Priv.-Doz. Dr. Hauke Lilie ergaben generell höhere Werte (Tab. 40). Ausnahme ist wiederum CrTRL26, für das ein Molekulargewicht von 64 kDa bestimmt wurde. Ein instabiles Verhalten, wie der Zerfall in Monomere, wurde für die CrTRL26 bei dieser Methode nicht festgestellt.

**Tab. 40 Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen im Vergleich**

Protein	Mw <sub>Monomer</sub> <sup>*</sup> [kDa]	Mw <sub>GF</sub> [kDa]	Mw <sub>UZ</sub> [kDa]	1. Mw <sub>GF</sub> : Mw <sub>Monomer</sub> 2. Mw <sub>UZ</sub> : Mw <sub>Monomer</sub>	
At5g06060	29,56	88	108	3,0	3,7
-61NAt2g29260	30,11	94	110	3,1	3,7
-61NAt2g29260Q220Y	30,15	n. a.	105	n. a.	3,5
At2g29350	30,26	90	93	3,0	3,1
At2g29360	30,45	102	104	3,4	3,4
CrTRL26	30,55	68	64	2,2	2,1
		20	/	0,7	/
At2g29150	29,97	n. a.	96	n. a.	3,2

\*berechnet aus Aminosäuresequenz; GF, Gelfiltration; UZ, Ultrazentrifugation; n. a., nicht analysiert

Um die Ausbildung kovalenter Disulfid-Brücken zwischen Protein-Monomeren auszuschließen, wurden die Proteinproben für die Ultrazentrifugation einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE (ohne Dithiothreitol) unterzogen (2.3.5). Alle Proteine lagen unter den Bedingungen der nicht-reduzierenden SDS-PAGE als Monomere vor und waren nicht durch Cystin miteinander verknüpft (Abb. 16).



**Abb. 16 Elektropherogramm der nichtreduzierenden SDS-PAGE**



Die Ergebnisse der Gelfiltration und der Ultrazentrifugation zeigten übereinstimmend, dass nur CrTRL26 nativ als Dimer vorlag. Die bestimmten Molekulargewichte der *Arabidopsis* TRL Proteine waren deutlich höher. Die Proteine At5g06060, -61NAt2g29260/Q220Y und At2g29360 sind nach den Ergebnissen der Ultrazentrifugation eindeutig als Tetramere einzuordnen. At2g29350 und At2g29150 führten auch bei der Ultrazentrifugation zu Molekulargewichten, die rein rechnerisch einem Trimer entsprechen würden.

Die katalytische Aktivität der Enzyme nach der analytischen Gelfiltration wurde überprüft (Ausnahme: -61NAt2g29260). Alle Enzyme katalysierten in Anwesenheit von NADPH die Reduktion von 3-Methylcyclohexanon. Somit lässt sich feststellen, dass die untersuchten TRLs im nativen Zustand als Oligomere katalytisch aktiv sind.

### 3.2.2 Quantifizierung der Bindung von NADPH an -61NAt2g29260

Das Protein -61NAt2g29260 wurde löslich synthetisiert (Abb. A1 im Anhang), zeigte aber keine katalytische Aktivität als Oxidoreduktase, sehr wahrscheinlich auf Grund der fehlenden katalytischen Aminosäure Tyrosin (Abb. 14). Um zu demonstrieren, dass prinzipiell die Voraussetzungen für eine TRL Aktivität unter diesen Bedingungen gegeben waren, wurde der Nachweis der Cosubstratbindung geführt. Hierfür wurden Fluoreszenztitration (2.3.7.1) und Isotherme Titrationskalorimetrie (2.3.7.2) angewendet. Als Positivkontrolle wurde die Bindung von NADPH an das katalytisch aktive Enzym At2g29360 mittels Fluoreszenztitration bestimmt.

#### 3.2.2.1 Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenzintensität für die Bindung von NADPH an -61NAt2g29260 wurde bei 448 nm und für die Positivkontrolle At2g29360 bei 435 nm ausgewertet. Bei diesen Wellenlängen lag jeweils die maximale Differenz zur Fluoreszenzintensität der reinen NADPH-Lösung vor (Emissionsdifferenzmaxima; Abb. 17).

Ab ca. 15  $\mu\text{M}$  NADPH sorgte der Überschuss an freiem gegenüber gebundenem Cosubstrat für einen deutlichen linearen Anstieg der Emissionsintensität (lineare Regression). Vor der Auswertung der Daten mit nicht-linearer Regression wurde der durch das freie NADPH verursachte Fluoreszenzanteil vom Messsignal abgezogen (Abb. 18). Aus dem nicht-linearen Anstieg der Emissionsintensität wurden die Bindungskonstante  $K_d$  und das Intensitätsmaximum ( $F_{\text{max}}$ ) berechnet (SigmaPlot 10). Für beide Enzyme lag die Bindungskonstante im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich. Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl das Protein -61NAt2g29260 als auch das aktive TRL Enzym At2g29360 in nativer Faltung vorliegen und das Cosubstrat mit ähnlich hoher Affinität binden.

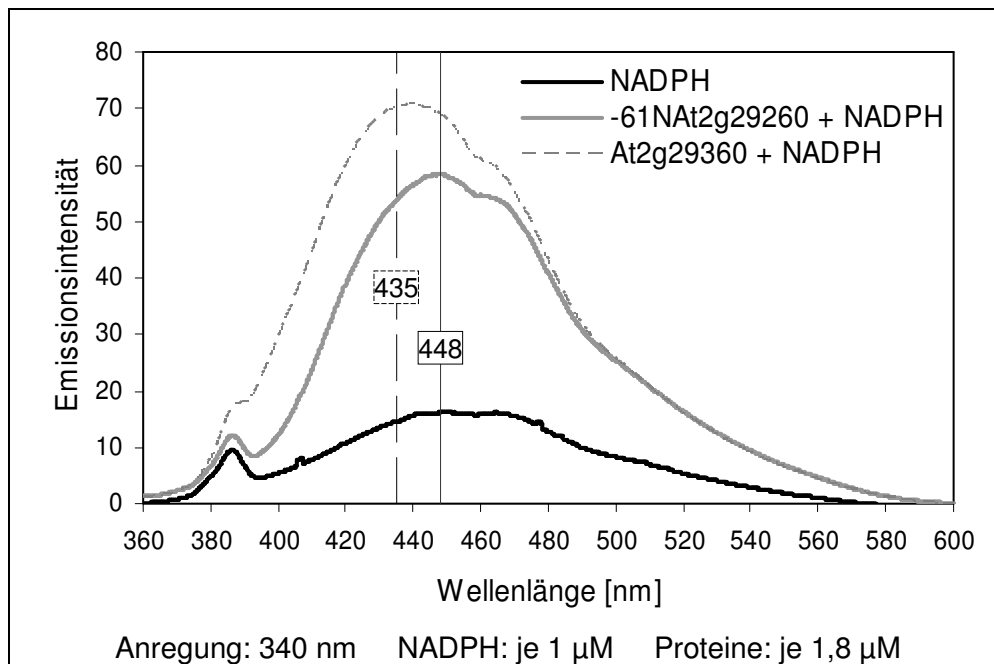


Abb. 17 Festlegung der Emissionsdifferenzmaxima

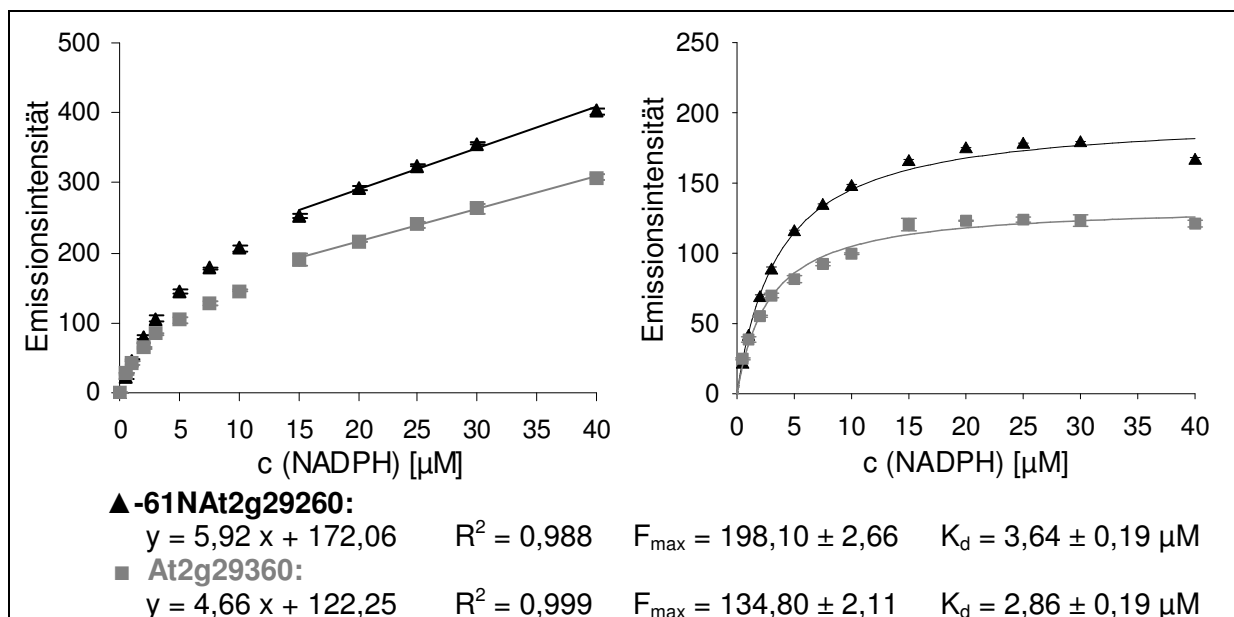


Abb. 18 Auswertung Fluoreszenztitration

$F_{\max}$ , maximale Fluoreszenzintensität;  $K_d$ , Bindungskonstante

### 3.2.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei der ITC-Messung wurde zuerst das Cosubstrat NADPH (500  $\mu\text{M}$ ) gegen die Proteinlösung von -61NAt2g29260 (46  $\mu\text{M}$ ) titriert und anschließend die Titration von NADPH (500  $\mu\text{M}$ ) gegen ITC-Puffer vom Ergebnis subtrahiert. Durch Integration des resultierenden Thermogramms wurde eine Bindungskonstante von 4,54  $\mu\text{M}$  ermittelt, die mit dem Ergebnis der Fluoreszenztitration gut übereinstimmt ( $K_d = 3,64 \mu\text{M}$ ). Auch wenn -61NAt2g29260 keine enzymatische Aktivität zeigte, war das Protein grundsätzlich in der Lage das angebotene

Cosubstrat NADPH mit hoher Affinität zu binden. Die Bindungsreaktion verlief exotherm (Abb. 19).

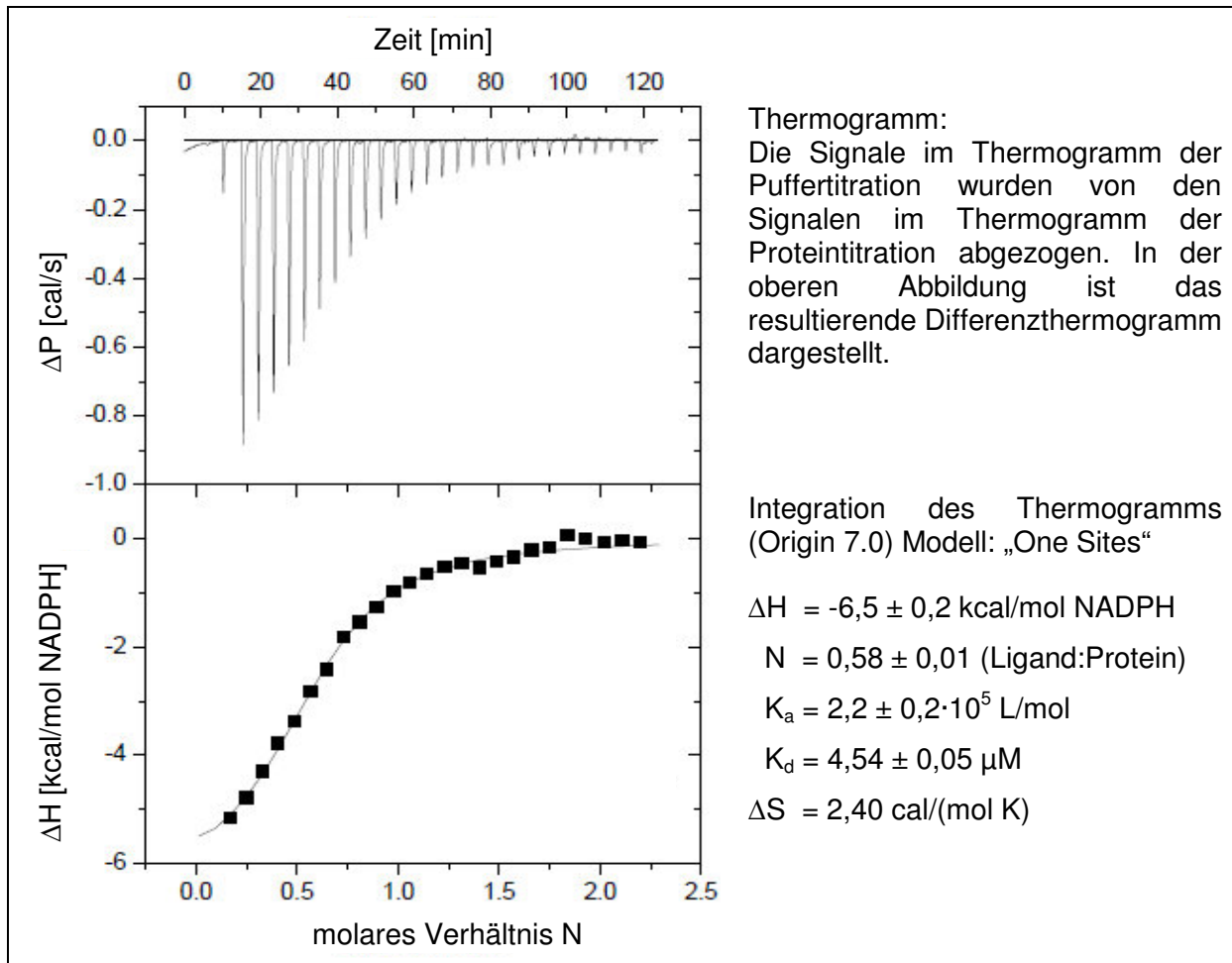


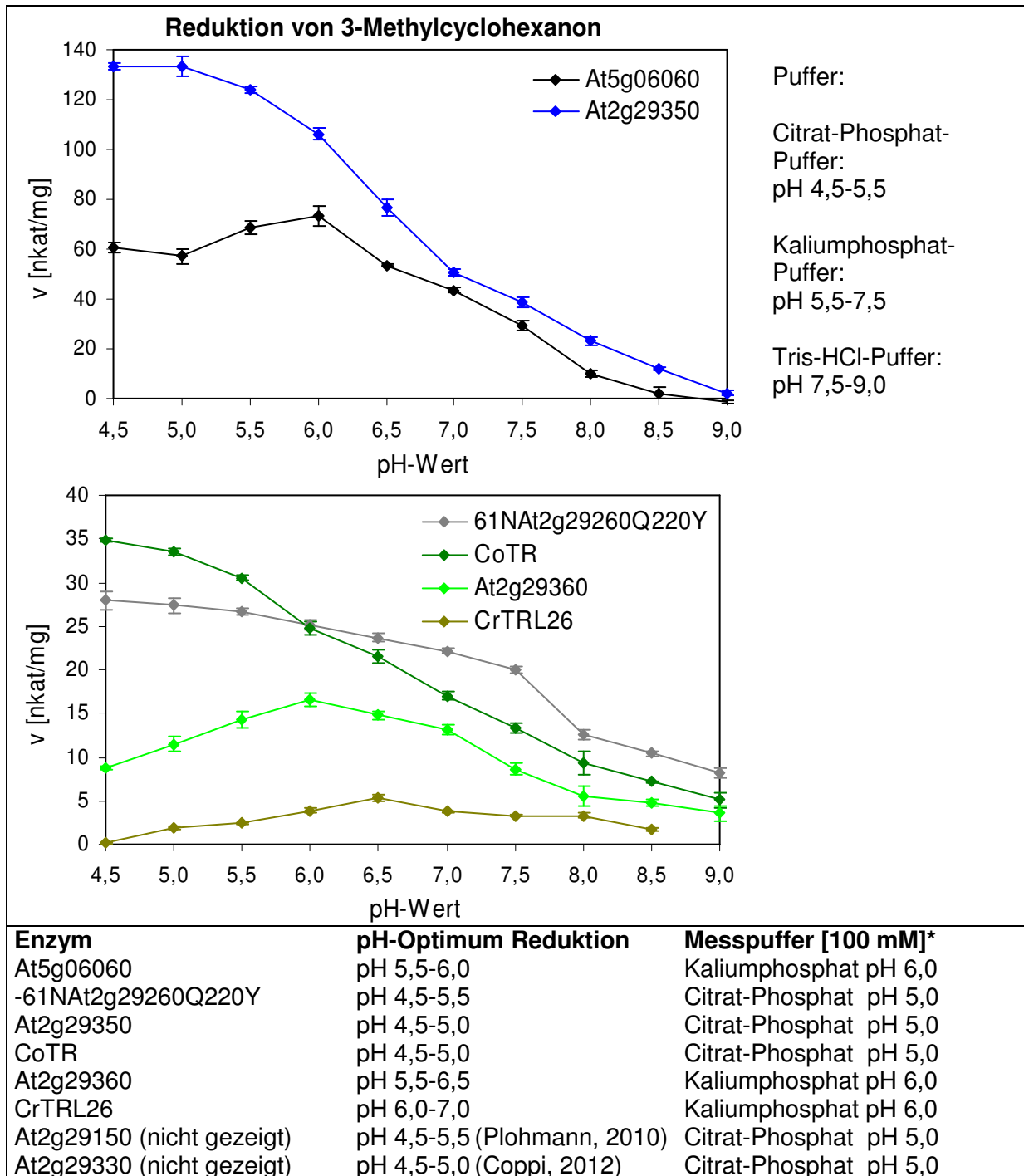
Abb. 19 ITC-Auswertung: Bindung von NADPH an -61NAt2g29260

### 3.3 Aktivitätsbestimmung

#### 3.3.1 Bestimmung der pH-Optima

Die pH-Optima wurden für die Reduktion von 3-Methylcyclohexanon und für die Oxidation von 3-Methylcyclohexanol bestimmt, da diese Substrate von allen untersuchten TRL Enzymen akzeptiert wurden. Für At2g29330 wurde das Cosubstrat NAD(H) verwendet, für alle anderen untersuchten TRL Enzyme wurde NADP(H) eingesetzt.

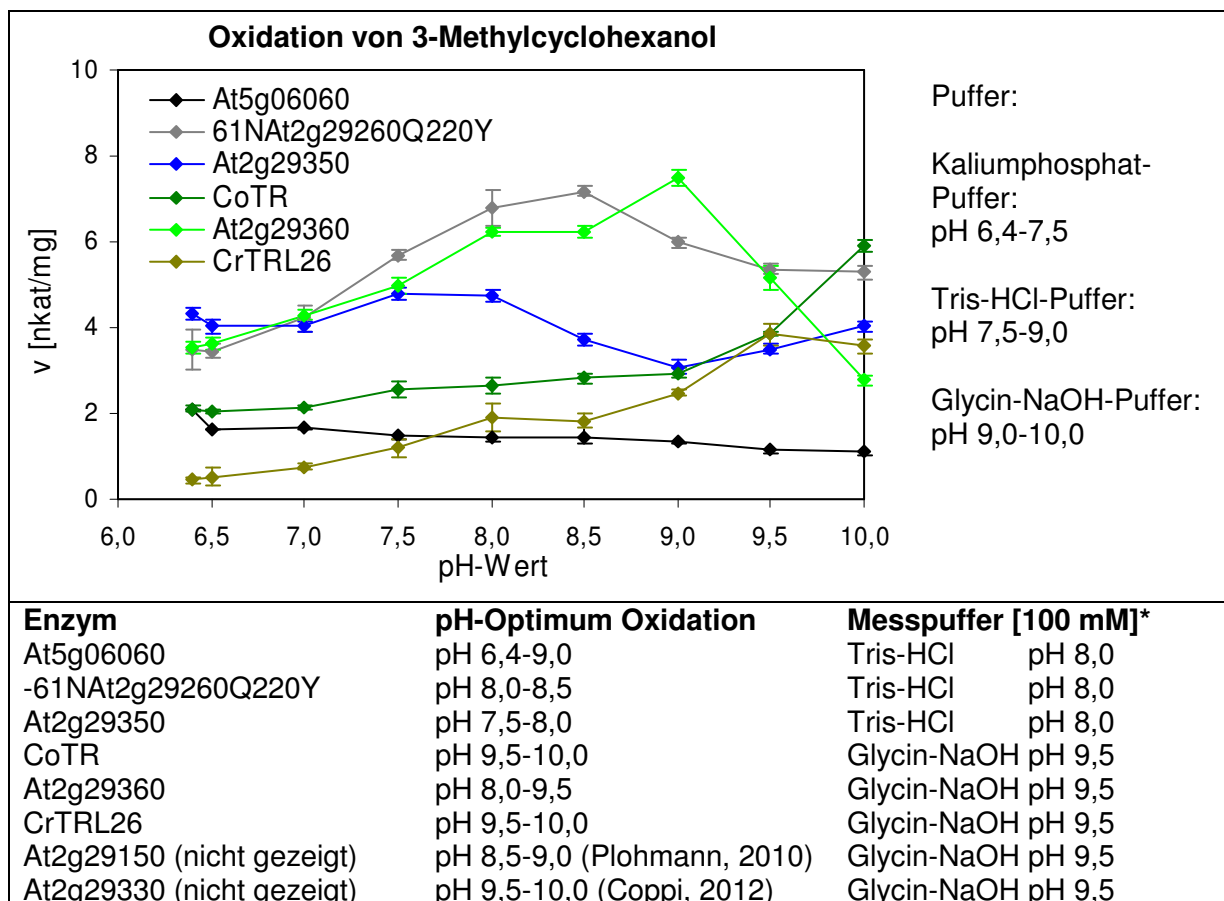
Mit dem ungeladenen Substrat 3-Methylcyclohexanon wiesen die Enzyme bei der Reduktion ein breites Optimum im sauren pH-Bereich zwischen 4,5 und 6,5 auf (Abb. 20). Unterhalb von pH 4,5 war ein deutlicher chemischer Abbau des Cosubstrats NADPH messbar. Auf Grund dieser Cosubstratinstabilität wurde pH 4,5 als untere Begrenzung der Messung festgelegt.



**Abb. 20 pH-Optima der Reduktion**

\*Puffer für Substratakzeptanz- und Enzymkinetikmessungen

Im schwach basischen Bereich ab pH 7,5 nahm die Reduktaseaktivität deutlich ab. Für jedes der Enzyme wurde ein Messpuffer ausgewählt, der für alle weiteren Substratakzeptanz- und Enzymkinetikmessungen verwendet wurde (Messpuffer). Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wurde für die Reduktion entweder mit Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 oder Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 gearbeitet (Zuordnung siehe Abb. 20).



**Abb. 21 pH-Optima der Oxidation**

\*Puffer für Substratakzeptanz- und Enzymkinetikmessungen

Mit zunehmendem pH-Wert stieg die Oxidationsaktivität der TRL Enzyme an (Abb. 21). Die pH-Profile waren für die Oxidation von 3-Methylcyclohexanol deutlich flacher als für die Reduktion des Ketons, auch die spezifische Aktivität war geringer. Das pH-Optimum für die Oxidation von 3-Methylcyclohexanol lag etwa zwischen pH 8-10. Auch hier wurde für jedes Enzym mit einem von zwei ausgewählten Messpuffern (Tris-HCl pH 8,0 oder Glycin-NaOH pH 9,5) für alle folgenden Messungen gearbeitet (Zuordnung siehe Abb. 21).

### 3.3.2 Cosubstratakzeptanz und -präferenz

Die Akzeptanz des Cosubstrats NADH und dessen phosphorylierter Variante NADPH wurde für die TRLs und die CoTR in einem Vorversuch am Zweistrahlphotometer untersucht (2.4.1.2). Es zeigte sich, dass alle untersuchten TRLs mit Ausnahme von At2g29330, ausschließlich NADPH als Cosubstrat für die Carbonylreduktion akzeptierten. CoTR und At2g29330 katalysierten die Reduktion von 3-Methylcyclohexanon auch mit dem Cosubstrat NADH. Für alle Enzyme wurden mit den entsprechenden Cosubstraten die Reduktion von 3-Methylcyclohexanon (Tab. 41, Abb. A2 im Anhang) und die Oxidation von 3-Methylcyclohexanol (Tab. 42, Abb. A2 im Anhang) kinetisch untersucht.

Tab. 41 Kinetische Parameter der Reduktion mit Cosubstrat NAD(P)H

Enzym	n	NADPH		NADH	
		$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At5g06060*	8	$65,1 \pm 2,8$	$134,7 \pm 2,0$	keine Aktivität	
-61NAt2g29260Q220Y*	4	$15,2 \pm 2,4$	$112,2 \pm 3,2$	keine Aktivität	
At2g29350	8	$30,1 \pm 2,6$	$34,9 \pm 0,7$	keine Aktivität	
CoTR	4	$78,3 \pm 7,9$	$33,0 \pm 1,0$	$666,5 \pm 20,0$	$382,3 \pm 7,0$
At2g29360	8	$41,7 \pm 4,3$	$8,1 \pm 0,2$	keine Aktivität	
CrTRL26	8	$53,0 \pm 4,2$	$5,1 \pm 0,1$	keine Aktivität	
At2g29150	4	$7,1 \pm 1,4$	$11,6 \pm 0,1$	keine Aktivität	
At2g29330	4	$297,2 \pm 45,0^a$	$24,4 \pm 1,5^a$	$59,3 \pm 7,4^a$	$11,6 \pm 0,4^a$

\*fixes Substrat: 15 mM 3-Methylcyclohexanon; <sup>a</sup>(Coppi, 2012); n, Anzahl der Einzelbestimmungen

Tab. 42 Kinetische Parameter der Oxidation mit Cosubstrat NAD(P)

Enzym	NADP		NAD	
	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At5g06060*	$7,8 \pm 1,1$	$4,7 \pm 0,1$	keine Aktivität	
-61NAt2g29260Q220Y*	$50,2 \pm 2,7$	$18,9 \pm 0,2$	keine Aktivität	
At2g29350	$37,8 \pm 2,3$	$9,3 \pm 0,1$	keine Aktivität	
CoTR	$27,9 \pm 1,8$	$5,4 \pm 0,1$	$963,5 \pm 41,7$	$14,8 \pm 0,3$
At2g29360	$44,4 \pm 2,0$	$9,5 \pm 0,1$	keine Aktivität	
CrTRL26 (Hill-Kinetik)	$K' = 392,6 \pm 12,4$ $h = 2,3$	$14,2 \pm 0,4$	keine Aktivität	
At2g29150	$4,8 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,01$	keine Aktivität	
At2g29330	keine Aktivität <sup>a</sup>		$15,0 \pm 1,1^a$	$1,2 \pm 0,01^a$

\*fixes Substrat: 15 mM 3-Methylcyclohexanol; h, Hill-Koeffizient; <sup>a</sup>(Coppi, 2012); n = 4

Die Enzyme zeigten ein Substratsättigungsverhalten nach Michaelis und Menten (Michaelis and Menten, 1913), das mit den Parametern Affinität ( $K_m$ ) und maximale spezifische Aktivität ( $V_{\text{max}}$ ) beschrieben wird. Für CrTRL26 ergab sich bei der Oxidation des Alkohols unter Verbrauch von NADP ein abweichendes Bild (Abb. A2, Tab. 42). Die Auswertung wurde mit der Kinetik nach Hill vorgenommen (Hill, 1910), da der zeitliche Verlauf der Katalyse mit CrTRL26 auf eine positive Kooperativität zwischen mindestens zwei Untereinheiten hindeutete. In diesem Fall wird die Affinität durch die Konstante  $K'$  ( $\neq K_m$ ) quantifiziert. Der berechnete Hill-Koeffizient (h) verweist auf die minimale Anzahl der beteiligten substratspezifischen Bindungsstellen.

Die Enzyme des alten Clusters A (At5g06060, -61NAt2g29260Q220Y, Abb. 7) und des modernen Clusters B (CoTR, At2g29360, CrTRL26, At2g29350, At2g29150, Abb. 7) zeigten unterschiedliche spezifische Aktivitäten bei durchweg hohen Affinitäten zu den Cosubstraten NADPH und NADP. Das Enzym CoTR reduzierte 3-Methylcyclohexanon jeweils in

Gegenwart beider Cosubstrate. Bei der Reduktion des Ketons wurde eine achtfach höhere Affinität von CoTR zum präferierten NADPH (Tab. 41) und bei der Oxidation des Alkohols eine 34-fach höhere Affinität zu NADP (Tab. 42) gemessen. Die maximale spezifische Aktivität war allerdings mit NADH zwölfmal höher und mit NAD dreifach höher als mit den phosphorylierten Formen.

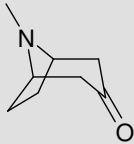
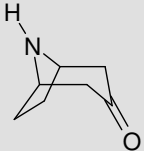
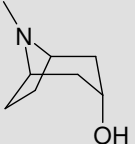
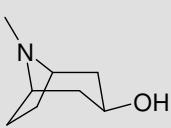
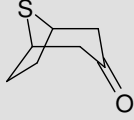
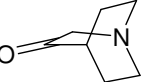
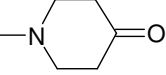
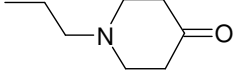
At2g29330 als Vertreter des modernen Clusters C (Abb. 7) wies mit einer fünffach höheren Affinität zu NADH eine deutliche Präferenz auf. Die maximale spezifische Aktivität war mit NADPH etwa doppelt so hoch wie mit NADH. Das Enzym zeigte nur eine geringe Oxidationsaktivität unter Umsatz des Cosubstrats NAD. Mit NADP konnte hingegen keine Aktivität oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. Aus den Ergebnissen der Cosubstrat-Kinetiken für die Carbonylreduktion und die Alkoholoxidation ergab sich für alle TRL Enzyme außer At2g29330 eine deutliche Präferenz für NADPH und NADP, ausgedrückt durch den Parameter Affinität. Nur At2g29330 katalysierte Oxidoreduktionen bevorzugt mit den Cosubstraten NAD und NADH. Für alle folgenden enzymkinetischen Messungen wurden die jeweils präferierten Cosubstrate eingesetzt.

### 3.3.3 Reduktion von Tropinon und Analoga

Die Reduktion von Tropinon und Nortropinon zu den entsprechenden Alkoholen wurde in Anwesenheit von NADPH nur durch die CoTR katalysiert (Brock et al., 2008). Auch das Schwefel-Analogon Thiabicyclooctanon (TBON) wurde ausschließlich von CoTR reduziert. Keine der in dieser Arbeit untersuchten TRLs katalysierte diese Reduktionen. Im Gegensatz dazu waren für einige TRLs geringe Aktivitäten für die Reduktion von Chinuclidin-3-on, *N*-Propylpiperidin-4-on und *N*-Methylpiperidin-4-on messbar (pH 6,4, Zweistrahlphotometer). Neben CoTR waren die TRLs At2g29360 und At2g29330 in der Lage *N*-Propylpiperidin-4-on zu reduzieren. At2g29330 katalysierte auch die Reduktion von *N*-Methylpiperidin-4-on, für eine valide kinetische Charakterisierung reichten die geringen spezifischen Aktivitäten jedoch nicht aus. Die Reduktion von Chinuclidin-3-on wurde neben CoTR auch von den TRLs At5g06060, -61NAt2g29260Q220Y, At2g29360 und At2g29330 katalysiert. Die Affinität der TRLs zu diesem Substrat war allerdings gering (Abb. 22). Bei der kinetischen Charakterisierung wurde der Bereich der Substratsättigung bis zu einer Konzentration von 30 mM nicht erreicht. Im sauren Milieu (pH 5,0-6,0) liegt Chinuclidin-3-on vorwiegend protoniert vor. Für die Bindung in das eher hydrophobe aktive Zentrum der TRLs ist vermutlich der Anteil des deprotonierten Substrats entscheidend.

Die Oxidation der Alkohole Tropin und Pseudotropin zum Keton Tropinon bei pH 9,0 wurde in Anwesenheit von NADP nur durch die CoTR katalysiert (Brock, 2008). Stickstoff- und schwefelhaltige Tropinonanaloga (Tab. 43) stellen somit keine geeigneten Substrate für die TRLs dar.

Tab. 43 Tropinon und Analoga

			
Tropinon $pK_a$ $8,93 \pm 0,20$	Nortropinon $pK_a$ $9,15 \pm 0,20$	Tropin (3 $\alpha$ ) $pK_a$ $10,80 \pm 0,40$	Pseudotropin (3 $\beta$ ) $pK_a$ $10,80 \pm 0,40$
			
Thiabicyclooctanon (TBON)	Chinuclidin-3-on $pK_a$ $6,73 \pm 0,20$	N-Methylpiperidin-4-on $pK_a$ $8,02 \pm 0,20$	N-Propylpiperidin-4-on $pK_a$ $8,10 \pm 0,20$

$pK_a$ -Werte berechnet mit ACD/Labs Software V11.02 veröffentlicht in Chemical Abstracts.  
Grau unterlegt: keine Reduktion durch TRL Enzyme.

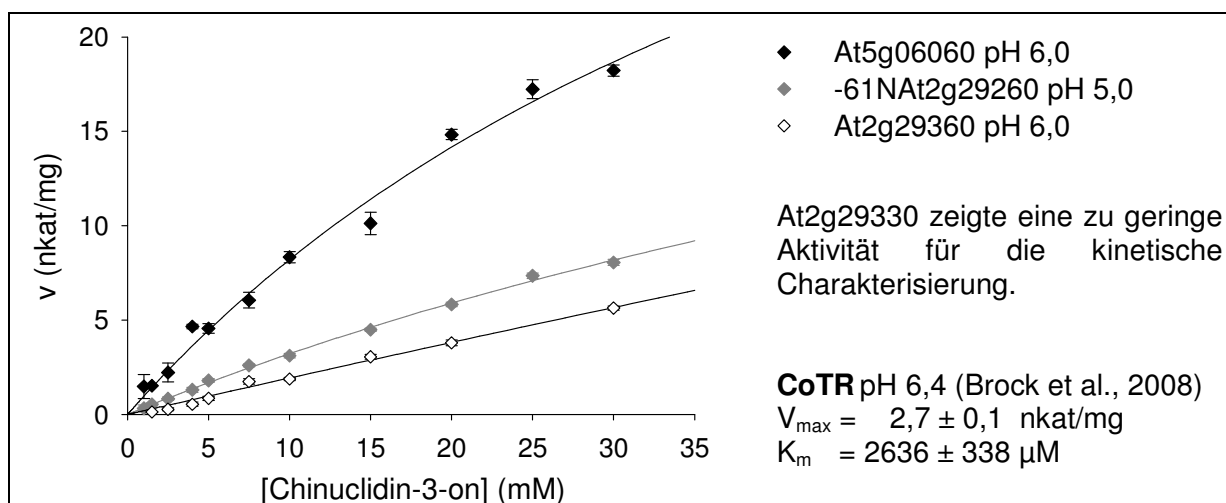


Abb. 22 Substratsättigungskurven für die Reduktion von Chinuclidin-3-on

Aus Gründen der besseren Verständlichkeit sind alle folgenden Ergebnisse zur Substratakzeptanz der TRLs aufsteigend nach struktureller Komplexität und Molekulargewicht der Substrate geordnet. Die Ergebnispräsentation ist für die einzelnen Verbindungen einheitlich aufgebaut. Zuerst wird das Substrat mit den entstehenden Produkten und der Reaktionsrichtung (Pfeil) als Formelbild dargestellt. Wenn die Konstitution des Substrats und/oder der Produkte bekannt war, wurde auch die Stereochemie mit angegeben. Die Substrate und Produkte sind, wenn möglich, in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten im GC- oder HPLC-Chromatogramm gezeigt. Unter dem Formelbild sind die Ergebnisse der qualitativen Produktanalyse mit GC-MS oder HPLC-DAD-Analytik grafisch dargestellt (absolute Produkt-Peakflächen). Entstanden zwei diastereomere Alkohole aus einem prochiralen Keton ist dies durch additive Zusammensetzung des Produktbalkens verdeutlicht (1. Produkt hellgrau, 2. Produkt dunkelgrau). Für alle Enzyme, die einen quantifizierbaren Umsatz des Substrats mit der fotometrischen Methode zeigten,

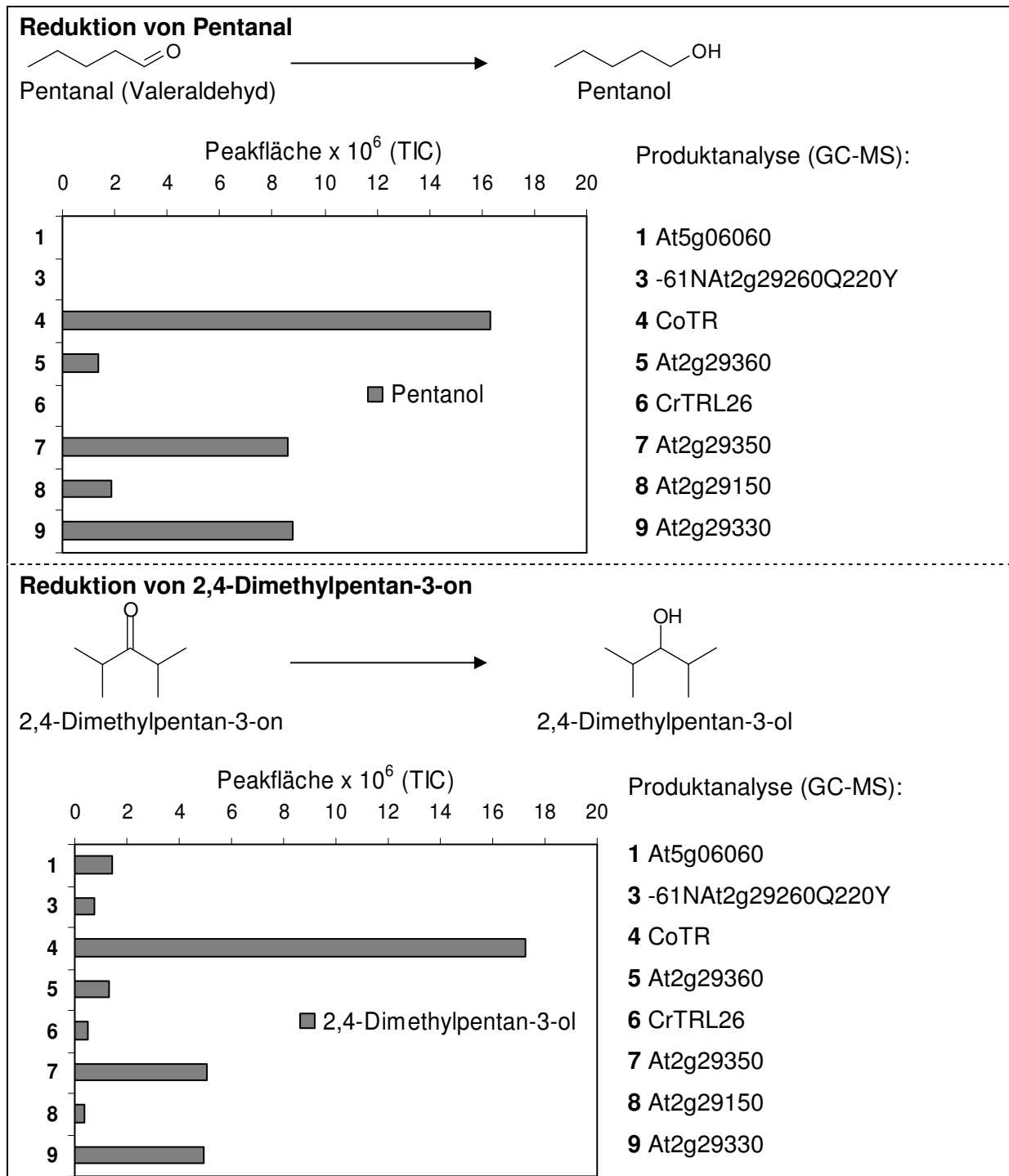


sind die kinetischen Parameter maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und Substrat-Affinität ( $K_m$ ) nach Michaelis und Menten (Michaelis and Menten, 1913) und die Anzahl der Einzelbestimmungen in Tabellenform angegeben. Die zugehörigen Substratsättigungskurven sind aus Platzgründen im Anhang zu finden (ab Abb. A3). Auf abweichendes Verhalten bei der Enzymkatalyse, wie z. B. unkompetitive Substratinhibition und Hill-Kinetik wird hingewiesen. Alle kinetischen Daten wurden mit SigmaPlot 10 unter Verwendung des dazugehörigen Enzymkinetik-Moduls 1.3 analysiert. Die Enzyme sind einheitlich mit Nummern beziffert (Produktanalyse) und farblich gekennzeichnet (Substratsättigungskurven, siehe Anhang). Das Protein -61NAt2g29260 (Nr. 2) wurde nicht mit allen Substraten auf katalytischen Umsatz untersucht, bei diesen fehlt die Nr. 2 in der grafischen Darstellung des Produktnachweises.

### 3.3.4 Reduktion kleiner lipohiler Carbonyle

Da Tropinon und stickstoffhaltige Analoga als Substrate für die TRLs nicht geeignet und die aktiven Zentren mit vielen hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet waren, wurden kleine lipophile Carbonylverbindungen als Substrate getestet. Aliphatische Carbonyle mit 5 Kohlenstoffatomen in der Kette wie Pentanal und 2,4-Dimethylpentan-3-on und aliphatische Monoterpene wie Citronellal, Citral (Gemisch aus Neral und Geranial) und Nerol bildeten die strukturell einfachsten Testverbindungen. Auch Aceton, Acetaldehyd und Butanon wurden zum Teil in Vorversuchen als Substrate getestet. Die Substanzen waren wegen ihrer hohen Flüchtigkeit nicht geeignet für weiterführende kinetische Untersuchungen. Darüber hinaus erschienen sie auf Grund ihres geringen Molekulargewichtes als wenig interessant für die Substratazeptanzversuche mit TRL Enzymen.

Pentanal wurde von At2g29350, CoTR und At2g29330 quantifizierbar reduziert (Tab. 44). Für CoTR und At2g29330 war eine Hemmung der Reaktion, vermutlich durch Bildung inaktiver Substrat- oder Produkt-Komplexe, messbar (Auswertung mit Gleichung für unkompetitive Substratinhibition). Der parallele Ablauf einer signifikanten Rückreaktion konnte ausgeschlossen werden, da CoTR weder bei pH 5,0 noch bei pH 9,5 Pentanol in Anwesenheit von NADP oxidierte. Die Enzyme des alten Clusters A (At5g06060 und -61NAt2g29260Q220Y, Abb. 7) sowie CrTRL26 akzeptierten Pentanal nicht als Substrat (Abb. 23, oben).



**Abb. 23 Reduktion von Pentanal und 2,4-Dimethylpentan-3-on**

CoTR und alle TRLs bildeten 2,4-Dimethylpentan-3-ol aus 2,4-Dimethylpentan-3-on (Abb. 23, unten). Jedoch katalysierte nur die CoTR die Reduktion von 4-Dimethylpentan-3-on mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit, guter Affinität und wiederum messbarer Substrat- oder Produkthemmung (Tab. 44, Abb. A3). At2g29330 zeigte eine geringe Affinität und spezifische Aktivität zu diesem Substrat.

Tab. 44 Kinetische Parameter der Reduktion von Pentanal und Dimethylpentanon

Enzym	Pentanal		2,4-Dimethylpentan-3-on	
	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At2g29350	$612,0 \pm 58,8$	$21,1 \pm 1,0$	+	
CoTR	$74,1^{\text{app}}$	$5,0^{\text{app}}$	$76,9 \pm 9,1^*$	$18,7 \pm 0,8^*$ $K_i^* = 8315 \pm 2157 \mu\text{M}$
At2g29330	$64,6 \pm 21,0^*$ $K_i^* = 145,9 \pm 43,7 \mu\text{M}$	$3,0 \pm 0,6^*$	$389,7 \pm 67,8$	$0,7 \pm 0,04$

\*Berechnung mit Gleichung für unkompetitive Substratinhibition. Erläuterungen im Text.;

<sup>app</sup>Wert aus Substratsättigungskurve entnommen: auf Grund starker Substrat- oder Produkthemmung war eine Berechnung dieser Werte nicht möglich;

+ Produktbildung mit GC-MS bestätigt, aber kinetische Charakterisierung nicht möglich. n = 4

Der längerkettige und verzweigte Aldehyd Citronellal wurde von CoTR, At2g29350, At2g29330, At2g29150 und At2g29360 mit ähnlichen Affinitäten und unterschiedlichen Geschwindigkeiten reduziert (Tab. 45, Abb. 24). Während der Reaktion trat für At2g29360 und CoTR erneut eine deutliche Inhibition auf (Abb. A3). Die  $K_i$ -Werte für CoTR mit den Aldehyden Pentanal und Citronellal liegen in derselben Größenordnung (unterer  $\mu\text{M}$ -Bereich) und lassen einen ähnlichen Inhibitionsmechanismus vermuten.

Da Citral ein Substratgemisch zweier Aldehyde mit unbekannter prozentualer Zusammensetzung ist, war es für die enzymkinetische Charakterisierung ungeeignet. Die qualitative Produktanalyse mit GC-MS zeigte, dass von den untersuchten TRL Enzymen nur At2g29350, At2g29150 und At2g29330 sowie CoTR die Reduktion von mindestens einem der zwei Aldehyde katalysierten (Abb. 24, Mitte). Im Gegenzug katalysierten die gleichen vier Enzyme die Oxidation des Alkohols Nerol zum Aldehyd (Abb. 24, unten). Bis auf At2g29330 wiesen sie hohe Substrataffinitäten bei insgesamt geringen Reaktionsgeschwindigkeiten auf (Tab. 45).

Tab. 45 Kinetische Parameter für Umsatz von Citronellal und Nerol

Enzym	Reduktion Citronellal		Oxidation Nerol	
	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At2g29350	$264,1 \pm 18,1$	$15,6 \pm 0,4$	$98,1 \pm 4,7$	$2,6 \pm 0,04$
CoTR	$71,4^{\text{app}}$	$5,1^{\text{app}}$	$26,0 \pm 1,0$	$1,9 \pm 0,02$
At2g29360	$86,2 \pm 29,3^*$ $K_i^* = 532,3 \pm 197,8 \mu\text{M}$	$8,0 \pm 1,5^*$	keine Aktivität	
At2g29150	$74,5 \pm 8,7$	$18,7 \pm 0,6$	$67,4 \pm 3,8$	$0,4 \pm 6 \cdot 10^{-3}$
At2g29330	$108,7 \pm 11,5$	$4,4 \pm 0,1$	$464,1 \pm 29,2$	$0,6 \pm 0,02$

\*Berechnung mit Gleichung für unkompetitive Substratinhibition. Erläuterungen im Text.;

<sup>app</sup>Wert aus Substratsättigungskurve entnommen: auf Grund starker Substrat- oder Produkthemmung war eine Berechnung dieser Werte nicht möglich; n = 4

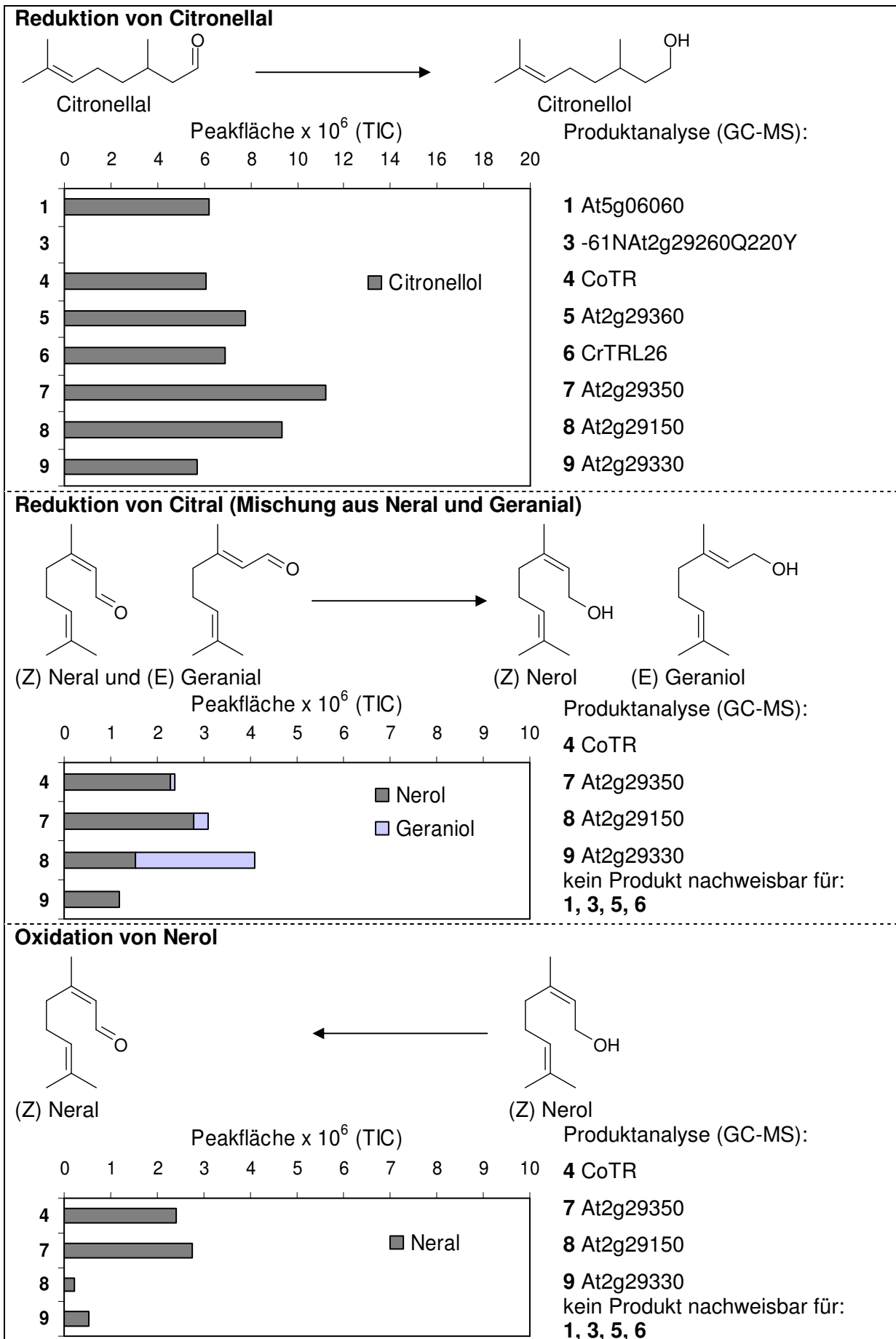
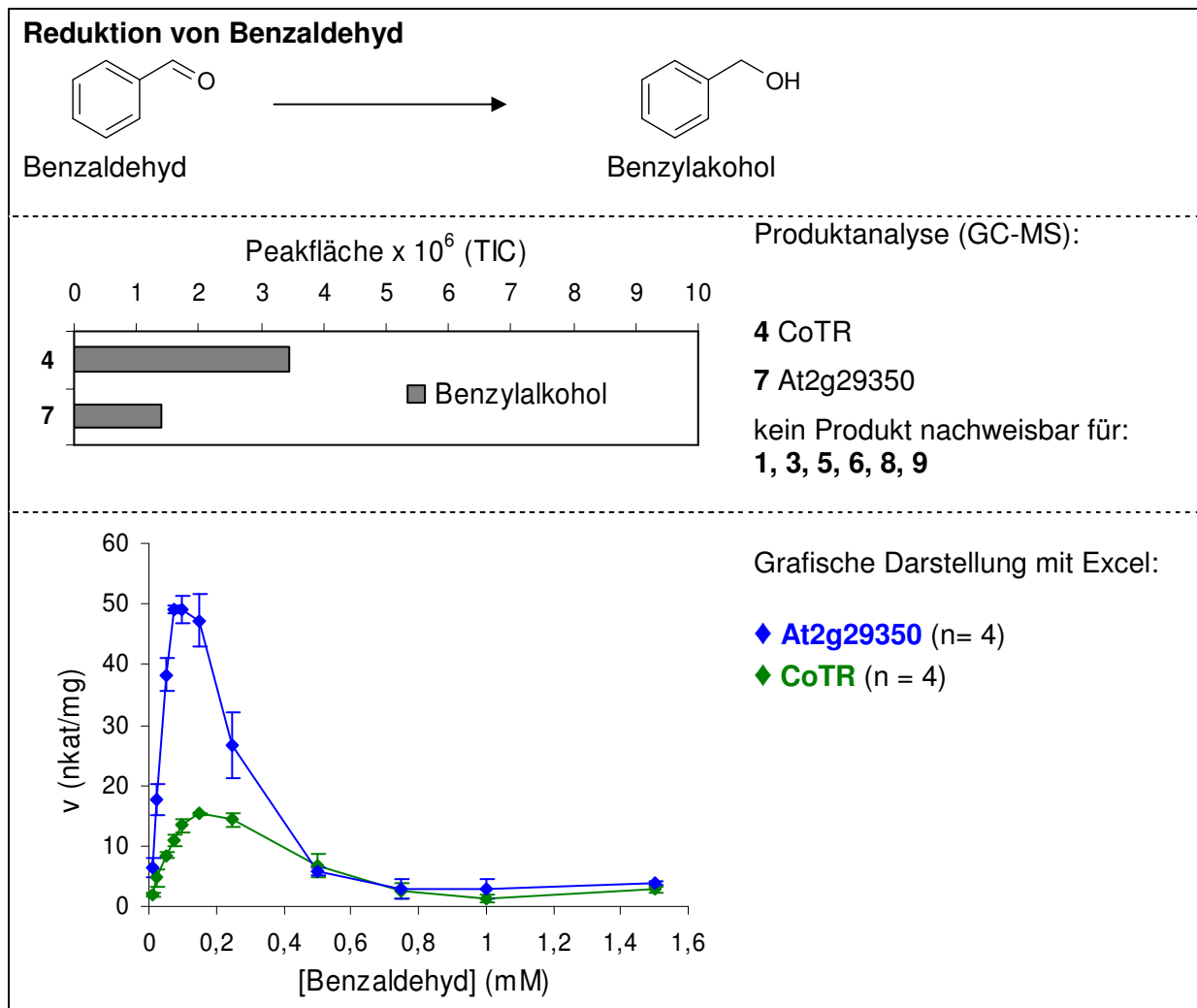
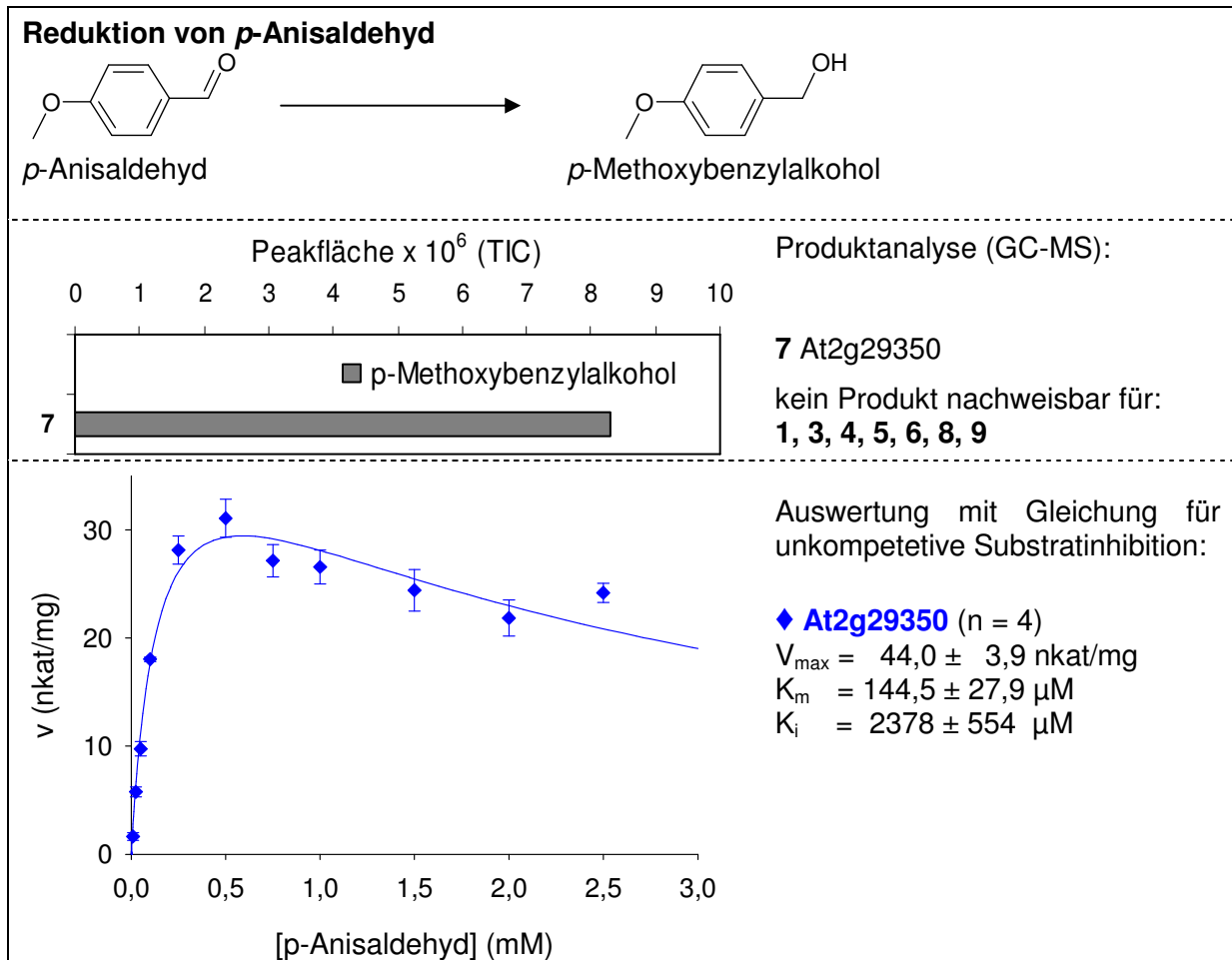


Abb. 24 Umsatz von Citronellal, Citral und Nerol

Auch aromatische Carbonyle wie Benzaldehyd und *p*-Anisaldehyd wurden als mögliche Substrate für die TRLs getestet. At2g29350 bildete als einzige TRL aus beiden Aldehyden den entsprechenden Alkohol (Abb. 25, Abb. 26). Daneben katalysierte CoTR zwar die Reduktion von Benzaldehyd, nicht aber die des *p*-Anisaldehyds. Alle anderen TRL Enzyme wurden ebenfalls mit beiden Verbindungen (Konzentration 1 mM) inkubiert, ein Produkt ließ sich jedoch in keinem Fall nachweisen. Entweder wurden die Enzyme durch die aromatischen Aldehyde vollständig gehemmt/inaktiviert oder die Verbindungen lagen nicht in reaktionsfähiger Position im aktiven Zentrum vor. Unterhalb einer Konzentration von 0,2 mM Benzaldehyd wiesen CoTR und At2g29350 hohe Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Bei höheren Konzentrationen hemmte das Substrat oder das Produkt die Reaktion (Abb. 25, Abb. 26). Eine Auswertung der gemessenen Daten mit SigmaPlot 10 war nicht möglich. Insgesamt lässt sich feststellen, dass aromatische Aldehyde nicht als Substrate für die TRLs geeignet sind.



**Abb. 25 Reduktion von Benzaldehyd**

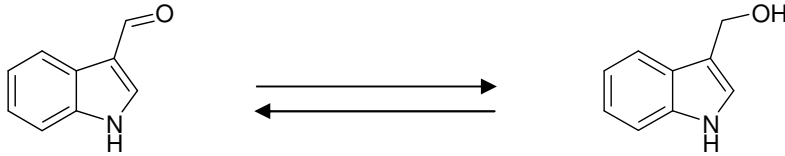


**Abb. 26 Reduktion von *p*-Anisaldehyd**

Die Idee zur Untersuchung von Indol-3-carbaldehyd und seines zugehörigen Alkohols (Abb. 27) als Substrate für die TRLs stammte von Priv.-Doz. Dr. Erich Glawischnig (Lehrstuhl für Genetik, TU München). Diese Verbindungen sind als Produkte des Insektenfraß-induzierten Indol-3-ylmethylglucosinolat-Abbaus bei *A. thaliana* bekannt (Kim et al., 2008).

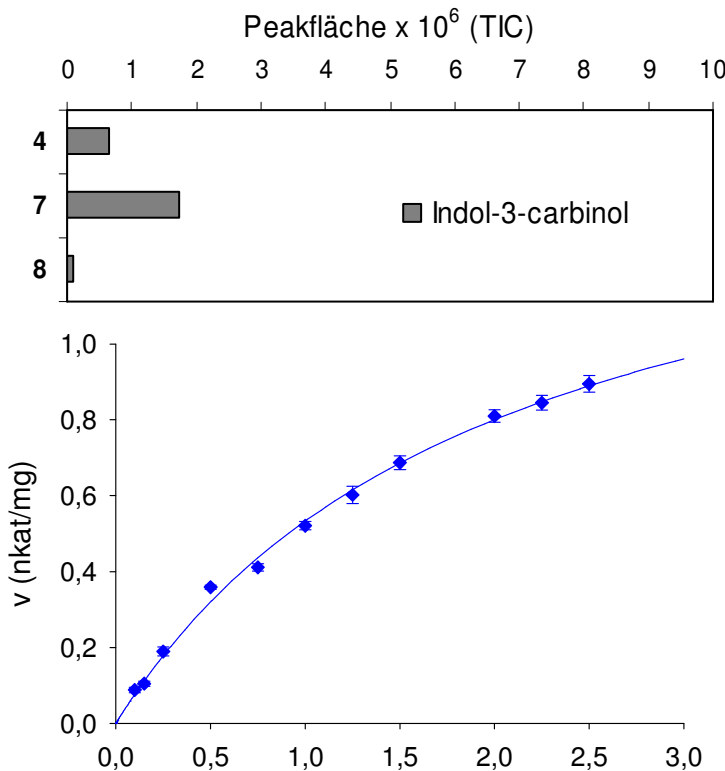
Alle TRLs wurden jeweils mit Indol-3-carbaldehyd, Indol-3-carbinol und zusätzlich auch mit Indol-3-ethanol inkubiert (2.4.2.2). Indol-3-ethanol wurde von keinem der Enzyme oxidiert. CoTR, At2g29350 und auch At2g29150 bildeten das Indol-3-carbinol aus dem Aldehyd (Abb. 27, oben). Die beiden Erstgenannten katalysierten auch die Rückreaktion, dabei zeigten sie ähnlich geringe Affinitäten und Reaktionsgeschwindigkeiten für das Substrat Indol-3-carbinol (Abb. 27, unten). Im Gegensatz zu Tropinon sind Indol-3-carbaldehyd ( $pK_a$   $15,90 \pm 0,01$  (Bagno et al., 1990)) und Indol-3-carbinol ( $pK_a$   $16,50 \pm 0,04$  (Yagil, 1967)) nur sehr schwach basische Verbindungen und liegen unter den Reaktionsbedingungen vorwiegend unprotoniert vor.

## Oxidoreduktion von Indol-3-carbaldehyd und Indol-3-carbinol



Indol-3-carbaldehyd

Indol-3-carbinol



## Reduktion des Aldehyds

Produktanalyse (GC-MS):

4 CoTR

7 At2g29350

8 At2g29150

kein Produkt nachweisbar für:

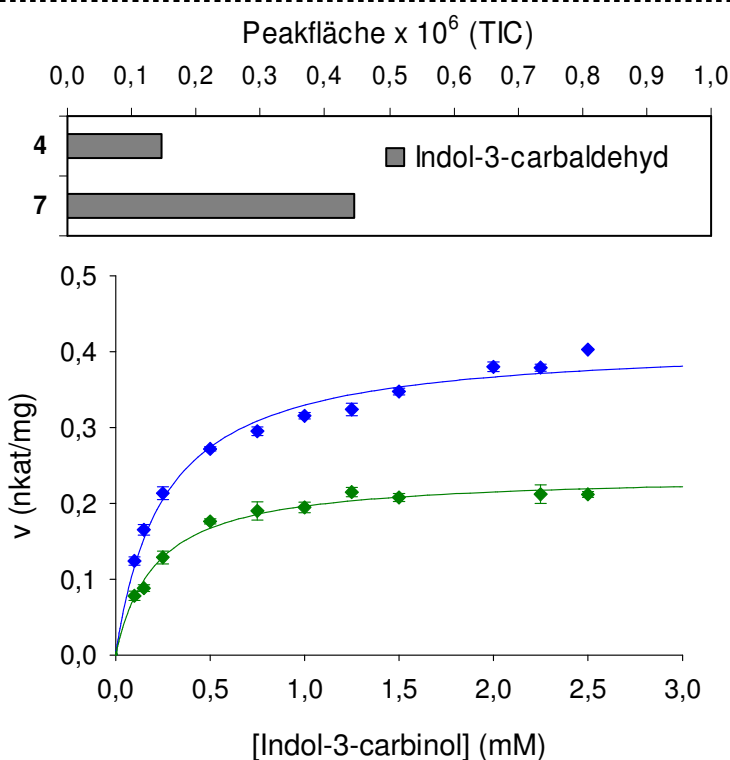
1, 3, 5, 6, 9

◆ At2g29350 (n = 4)

 $V_{\max} = 1,6 \pm 0,07$  nkat/mg $K_m = 2008 \pm 159$   $\mu$ M

Die Absorptionsänderung durch Abnahme des Substrats wurde beachtet.

Indol-3-carbaldehyd (340 nm):

 $A = 0,1934 \cdot c$  [mM] $R^2 = 0,9977$ 

## Oxidation des Alkohols

Produktanalyse (GC-MS):

4 CoTR

7 At2g29350

kein Produkt nachweisbar für:

1, 3, 5, 6, 8, 9

◆ At2g29350 (n = 4)

 $V_{\max} = 0,4 \pm 6 \cdot 10^{-3}$  nkat/mg $K_m = 253,9 \pm 15,9$   $\mu$ M

◆ CoTR (n = 4)

 $V_{\max} = 0,2 \pm 5 \cdot 10^{-3}$  nkat/mg $K_m = 211,1 \pm 19,8$   $\mu$ M

Die Absorptionsänderung durch Zunahme des Produkts wurde beachtet.

Abb. 27 Oxidoreduktion von Indol-3-carbaldehyd und Indol-3-carbinol

Nur At2g29350 reduzierte Indol-3-carbaldehyd quantifizierbar, wobei die Affinität zum Aldehyd ca. viermal geringer war als zum Alkohol (Abb. 27, oben). Der *in vitro* Umsatz der Indolverbindungen durch At2g29350 und CoTR wurde eindeutig nachgewiesen. Inwieweit diese Reaktion auch *in vivo* in der Pflanze abläuft und ob sie dort auch von SDRs katalysiert wird, bleibt allerdings offen.

### 3.3.5 Reduktion zyklischer Terpene und Analoga

Sowohl 3- und 4-Methylcyclohexanon als auch deren Alkohole wurden als Substrate für die TRL Enzyme untersucht (Abb. 28), weil sie bereits als Substrate für Tropinonreduktasen bekannt waren (Brock et al., 2008; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994). Strukturell weisen die Verbindungen Ähnlichkeiten zu zyklischen Monoterpenen auf, andererseits werden sie auch als Kohlenstoff-Analoga des Tropinons klassifiziert (Portsteffen et al., 1994).

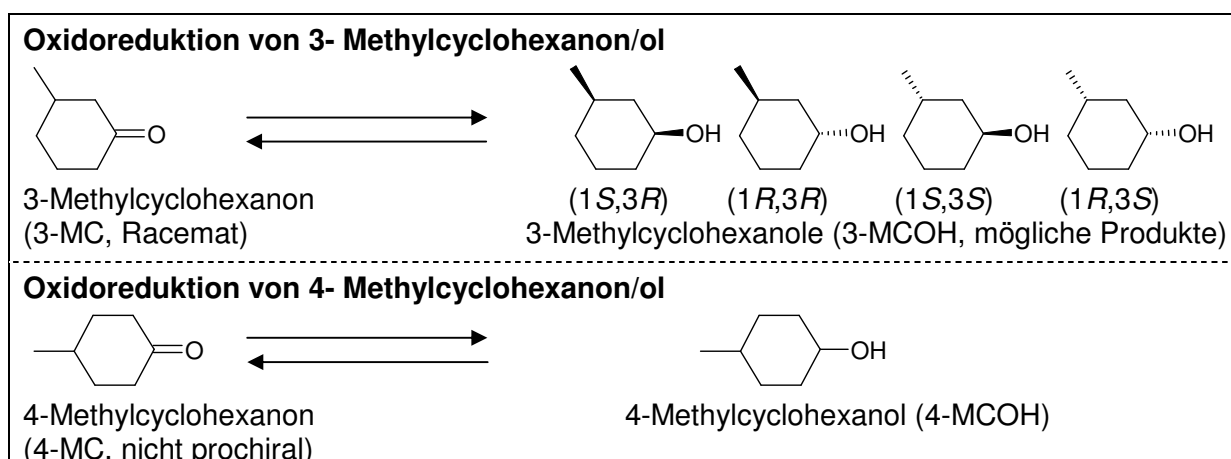


Abb. 28 Oxidoreduktion von Methylcyclohexanon/ol

Tab. 46 Kinetische Parameter der Reduktion von Methylcyclohexanon

Enzym	n	3-Methylcyclohexanon		4-Methylcyclohexanon	
		$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At5g06060	8	8303 $\pm$ 476	167,9 $\pm$ 4,1	Keine Substratsättigung!	
-61NAt2g29260Q220Y	4	15114 $\pm$ 1148	236,2 $\pm$ 11,2	Keine Substratsättigung!	
At2g29350	8	504,9 $\pm$ 33,7	53,3 $\pm$ 0,8	463,0 $\pm$ 41,8	25,9 $\pm$ 0,6
CoTR	4	24,1 $\pm$ 3,2 <sup>##</sup> $K_i^{*#} = 6641 \pm 2086 \mu\text{M}$	76,1 $\pm$ 3,1 <sup>##</sup>	5,1 $\pm$ 1,0 <sup>##</sup> $K_i^{*#} = 23672 \pm 17559 \mu\text{M}$	115,1 $\pm$ 3,2 <sup>##</sup>
At2g29360	4	214,8 $\pm$ 29,7 <sup>a</sup>	21,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	73,1 $\pm$ 8,2 <sup>##</sup> $K_i^{*#} = 15480 \pm 3460 \mu\text{M}$	28,2 $\pm$ 1,0 <sup>##</sup>
CrTRL26	4	787,1 $\pm$ 73,8 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	535,9 $\pm$ 35,4	9,2 $\pm$ 0,2
At2g29150	4	559,5 $\pm$ 46,5	11,3 $\pm$ 0,3	106,0 $\pm$ 11,0	2,9 $\pm$ 0,1
At2g29330	4	56,7 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>	7,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	71,5 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>	6,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>

\*Berechnung mit Gleichung für unkompetitive Substratinhibition; <sup>#</sup>Messbare Rückreaktion unter den Reaktionsbedingungen; <sup>a</sup>(Wagner, 2011); <sup>b</sup>(Coppi, 2012); n, Anzahl der Einzelbestimmungen



Tab. 47 Kinetische Parameter der Oxidation von Methylcyclohexanolen

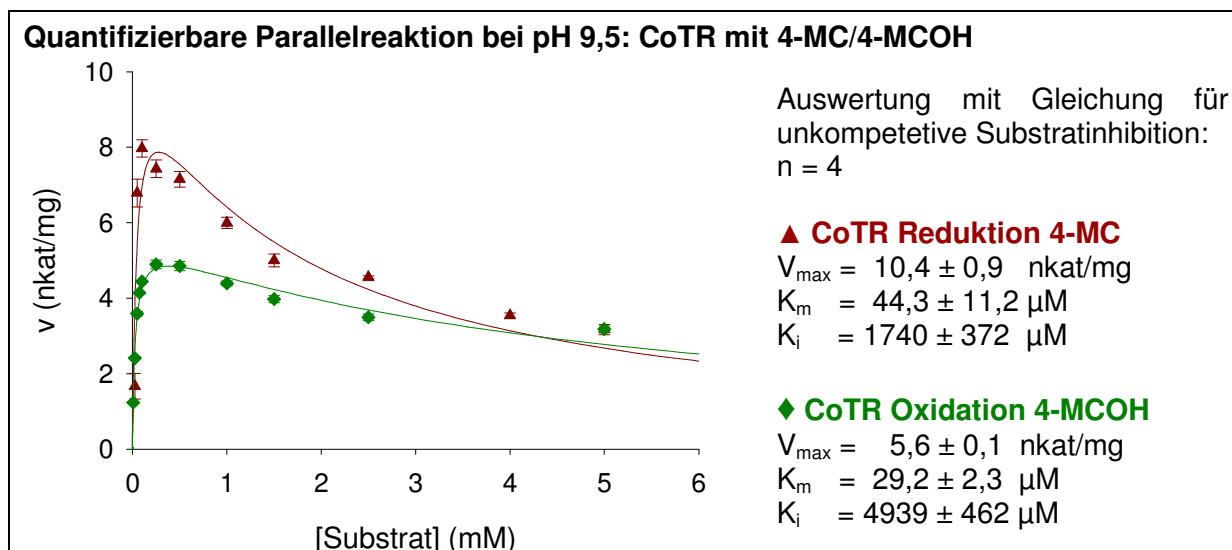
Enzym	3-Methylcyclohexanol		4-Methylcyclohexanol	
	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]
At5g06060	Keine Substratsättigung!		Keine Substratsättigung!	
-61NA2g29260Q220Y	Keine Substratsättigung!		Keine Substratsättigung!	
At2g29350	$373,4 \pm 18,8$	$5,4 \pm 0,1$	$328,8 \pm 21,4$	$1,1 \pm 0,02$
CoTR	$57,2 \pm 2,6$	$5,5 \pm 0,05$	$29,2 \pm 2,3^{*\#}$ $K_i^{*\#} = 4939 \pm 462 \mu\text{M}$	$5,6 \pm 0,1^{*\#}$
At2g29360	$2465 \pm 236$	$8,6 \pm 0,4$	$527,8 \pm 35,6$	$6,5 \pm 0,1$
CrTRL26 (Hill-Kinetik)	$K' = 2523 \pm 177$ $h = 1,6$	$3,7 \pm 0,2$	$K' = 1835 \pm 110$ $h = 1,7$	$2,5 \pm 0,1$
At2g29150	$315,2 \pm 14,2$	$0,8 \pm 0,01$	$378,5 \pm 39,6$	$0,4 \pm 0,01$
At2g29330	$61,9 \pm 7,6^b$	$1,1 \pm 0,02^b$	$63,3 \pm 7,8^b$	$1,0 \pm 0,02^b$

\*Berechnung mit Gleichung für unkompetitive Substratinhibition; #Messbare Rückreaktion unter den Reaktionsbedingungen; <sup>a</sup>(Wagner, 2011); <sup>b</sup>(Coppi, 2012); n = 4

Alle untersuchten TRLs katalysierten die Reduktion der Methylcyclohexanone mit insgesamt höheren Reaktionsgeschwindigkeiten als für die entsprechende Rückreaktion. Die Vertreter des alten Clusters A (At5g06060 und -61NA2g29260Q220Y, Abb. 7) zeigten im Vergleich zu den anderen Enzymen sehr geringe Affinitäten zu den Methylcyclohexanonen und deren Alkoholen. Mit Ausnahme von 3-Methylcyclohexanon konnten die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  für diese Enzyme nicht bestimmt werden, da eine Substratsättigung bis in Konzentrationsbereiche von 10-15 mM nicht erreicht wurde (Tab. 46, Tab. 47, Abb. A4).

Die CrTRL26 aus *Capsella rubella* katalysierte die Oxidation der Methylcyclohexanole nicht nach der typischen Michaelis-Menten-Kinetik, sondern zeigte, wie bereits bei der Reduktion von NADP (Abb. A2, Tab. 42), positive Kooperativität (Tab. 47, Abb. A4). Die Daten wurden deshalb mit der Hill-Gleichung ausgewertet (Hill, 1910). Die Hill-Konstante  $h$ , ein Maß für die Anzahl der beteiligten substratspezifischen Bindungsstellen, lag bei 1,6 bzw. 1,7 und korrelierte mit der gefundenen dimeren Quartärstruktur von CrTRL26 (siehe 3.2.1).

Das Enzym CoTR zeigte bei der Oxidation von 4-Methylcyclohexanol ein Verhalten, das am treffendsten mit der Gleichung für unkompetitive Substratinhibition ausgewertet werden konnte. Allerdings lässt sich die vermeintliche Hemmung durch die parallel ablaufende messbare Rückreaktion unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen erklären (Abb. 29). Die gleiche Ursache liegt auch bei der Reduktion der Methylcyclohexanone mit CoTR und vermutlich auch bei At2g29360 und 4-Methylcyclohexanon vor.



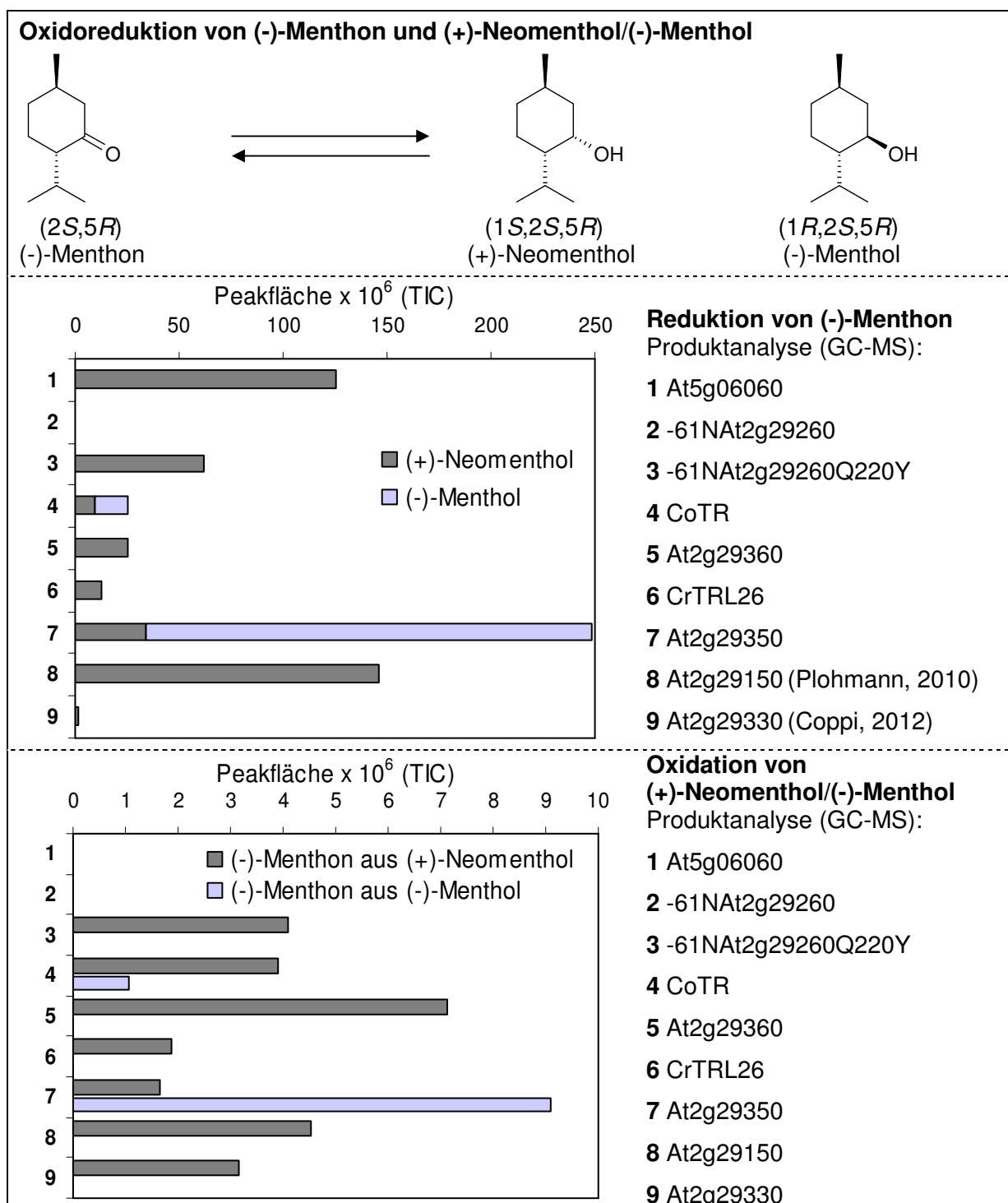
**Abb. 29** Oxidoreduktion von 4-Methylcyclohexanon/ol durch CoTR

Auch der bicyklische Vertreter 2-Decalon wurde als potentielles Substrat getestet (Abb. A6 im Anhang). Die Substanz lag als Gemisch von *cis*- und *trans*-2-Decalon in unbekannter prozentualer Zusammensetzung vor. Die verschiedenen Stereoisomere wurden von den TRLs und CoTR zu Alkoholen reduziert (Abb. A6). Eine Strukturaufklärung der Produkte wurde nicht vorgenommen. Von Bedeutung ist die Tatsache, dass auch Ketone mit Decahydro-Naphthalin-Grundkörper in das aktive Zentrum der TRL Enzyme passen und dort reduziert werden.

Wegen der großen Ähnlichkeit zu den artifiziellen Cyclohexanonverbindungen erschienen natürlich vorkommende zyklische Monoterpene wie Menthon und Carvon als weitere geeignete Testsubstrate für die TRLs. Darüber hinaus war bekannt, dass pflanzliche Menthonreduktasen z. B. aus *Mentha x piperita* ebenfalls zur Familie der klassischen SDRs gehören (SDR114C) (Davis et al., 2005).

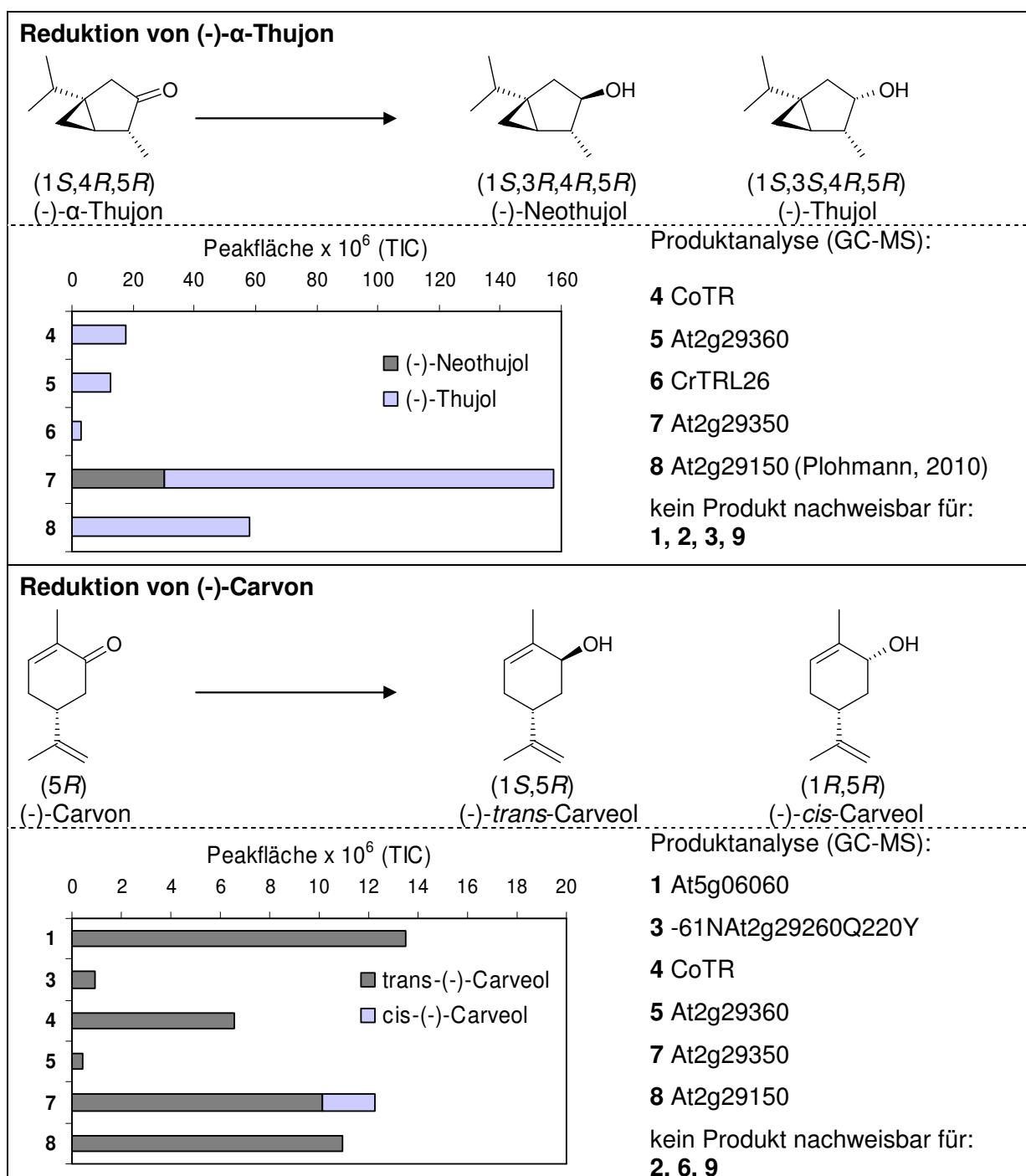
Ausgehend von (-)-Menthon wurden verfügbare Monoterpenketone und -alkohole, sowie das Sesquiterpen (+)-Nootkaton für die Analyse mit den TRL Enzymen ausgewählt. Mit Ausnahme des Verbenons kommt keines der verwendeten Terpene im volatilen Profil von *Arabidopsis thaliana* vor (Rohloff and Bones, 2005). Im Fokus stand die Untersuchung der oxidoreduktiven Katalyse von strukturell möglichst unterschiedlichen Terpenen durch die TRLs. Ausgewählt wurden:

- planare Mono- und Bicyklen, sowie Bicyklen mit Brückenkopfatom
- gesättigte und ungesättigte Carbonyle (C=C im Ring oder Ringsubstituent, Aromaten)



**Abb. 30** Oxidoreduktion von (-)-Menthon und (+)-Neomenthol/(-)-Menthol

CoTR und die untersuchten TRLs reduzierten (-)-Menthon meist stereospezifisch zum (+)-Neomenthol, nur für CoTR und At2g29350 waren beide diastereomeren Produkte nachweisbar. Eine quantifizierbare katalytische Aktivität für die Reduktion wurde mit den Enzymen CoTR, At2g29350 und At2g29150 erreicht (Tab. 48). Diese katalysierten auch quantifizierbar die Oxidation der während der Reduktion von (-)-Menthon bevorzugt gebildeten Alkohole mit guter Substrataffinität (Tab. 48).

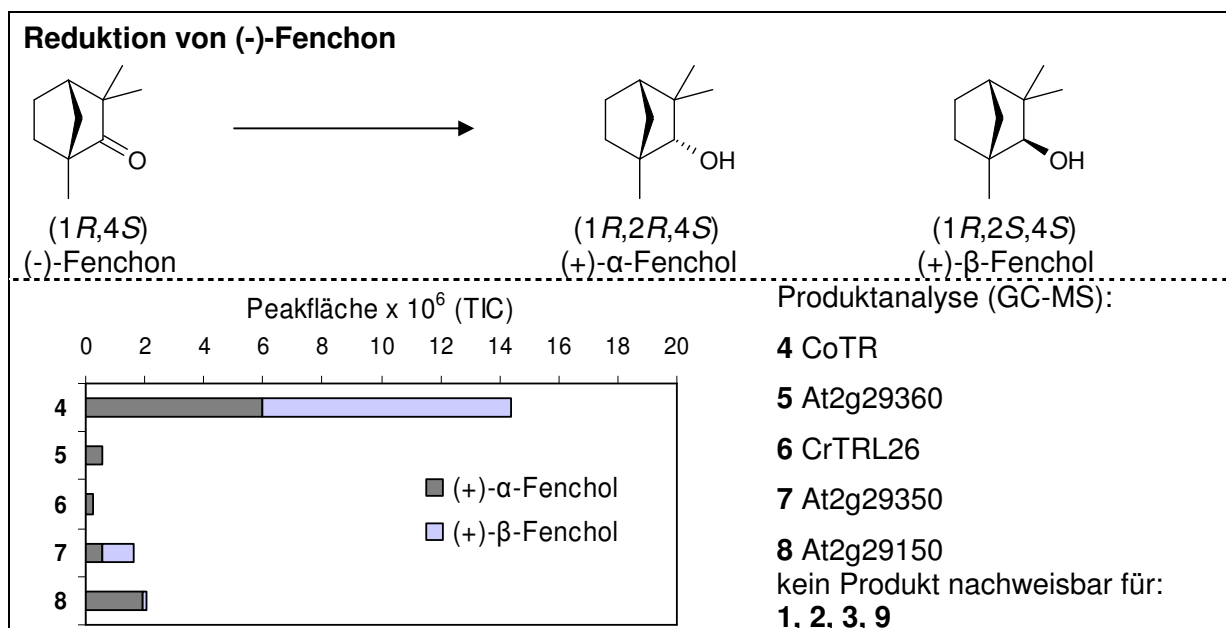


**Abb. 31** Reduktion von (-)- $\alpha$ -Thujon und (-)-Carvon

Die Reduktion des bicyklischen (-)- $\alpha$ -Thujons wurde von den TRLs des alten Clusters A (Abb. 7) und von At2g29330 nicht katalysiert (Abb. 31, oben). Alle untersuchten Enzyme des modernen Clusters B (Abb. 7), einschließlich CoTR zeigten durch nachweisbare Produktbildung katalytische Aktivität. Die höchste Substrataffinität und Reaktionsgeschwindigkeit wurde für CoTR gemessen (Tab. 48). Die Alkohole (-)-Thujol und (-)-Neothujol waren nicht kommerziell als Reinsubstanzen erhältlich. Die Struktur des Produkts der enzymatischen Reduktion von (-)- $\alpha$ -Thujon mit CoTR wurde deshalb mit <sup>13</sup>C-NMR und <sup>1</sup>H-NMR aufgeklärt (Methode 2.4.2.3, Tab. A4 im Anhang). Das Produkt

konnte zweifelsfrei als (-)-Thujol identifiziert werden. In den GC-Chromatogrammen der Reaktion mit At2g29360, CrTRL26 und At2g29150 wurde das gleiche Reduktionsprodukt detektiert wie mit CoTR. Nur im Reaktionsansatz mit At2g29350 wurden beide Diastereomere, (-)-Neothujol und (-)-Thujol, gefunden.

Das zweifach ungesättigte (-)-Carvon wurde mit Ausnahme von CrTRL26 und At2g29330 von allen untersuchten Enzymen zu (-)-*trans*-Carveol reduziert. Im GC-Chromatogramm von At2g29350 wurde als zweites Produkt auch das (-)-*cis*-Carveol detektiert (Abb. 31, unten). Wiederum zeigten nur CoTR, At2g29350 und At2g29150 einen quantifizierbaren Substratumsatz, wobei Letzteres eine sehr geringe Substrataffinität, dafür aber die höchste Reaktionsgeschwindigkeit aufwies. Die Alkoholprodukte waren nicht als Reinsubstanzen, sondern nur als Gemische mit unbekannter prozentualer Zusammensetzung verfügbar. Die Verbindungen wurden an Hand ihrer Fragmentierung im Massenspektrometer im Vergleich mit vorhandener Literatur zweifelsfrei unterschieden (Miyazawa et al., 2002; van der Werf et al., 1999).



**Abb. 32 Reduktion von (-)-Fenchon**

Die Reduktion von (-)-Fenchon wurde von den TRLs des Clusters A (Abb. 7) und At2g29330 (modernes Cluster C) nicht katalysiert. Die TRLs des modernen Clusters B bildeten meist beide Reaktionsprodukte, diese aber nur in geringen Ausbeuten (Abb. 32). Einzig CoTR katalysierte diese Reduktion quantitativ mit guter Substrataffinität und vergleichsweise geringer Reaktionsgeschwindigkeit (Tab. 48). Die Reaktion verlief stereounspezifisch. Beide Alkohole wurden im Verhältnis 40:60 im GC-Chromatogramm detektiert.

Tab. 48 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion von Monoterpenen

Substrat (Reaktion)	Parameter	At2g29150	At2g29350	CoTR
(-)-Menthon (Red.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$452,4 \pm 41,3$	$118,1 \pm 8,1$	$282,2 \pm 30,8$
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$6,5 \pm 0,2$	$27,5 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,3$
(+) - Neomenthol (Ox.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$113,0 \pm 7,5$	+	$20,3 \pm 2,9$
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$0,6 \pm 0,01$		$0,5 \pm 0,01$
(-)-Menthol (Ox.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	keine Aktivität	$50,1 \pm 2,6$	+
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]		$1,5 \pm 0,02$	
(-)- $\alpha$ -Thujon (Red.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$891,5 \pm 86,0$	$1336 \pm 207$	$65,0 \pm 6,3$
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$8,4 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	$14,8 \pm 0,3$
(-)-Carvon (Red.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$1827 \pm 168$	$75,7 \pm 7,6$	$62,3 \pm 7,7$
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]	$15,7 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
(-)-Fenchon (Red.)	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	+	+	$36,2 \pm 5,1$
	$V_{\text{max}}$ [nkat/mg]			$2,2 \pm 0,05$

Red., Reduktion; Ox., Oxidation; n = 4;

+ Produktbildung mit GC-MS bestätigt, aber kinetische Charakterisierung nicht möglich.

(+) - Campher und (-) - Borneol wurden nur von CoTR als Substrate akzeptiert. Keine der untersuchten TRLs zeigte katalytische Aktivität mit diesen zwei bicyklischen Monoterpenen.

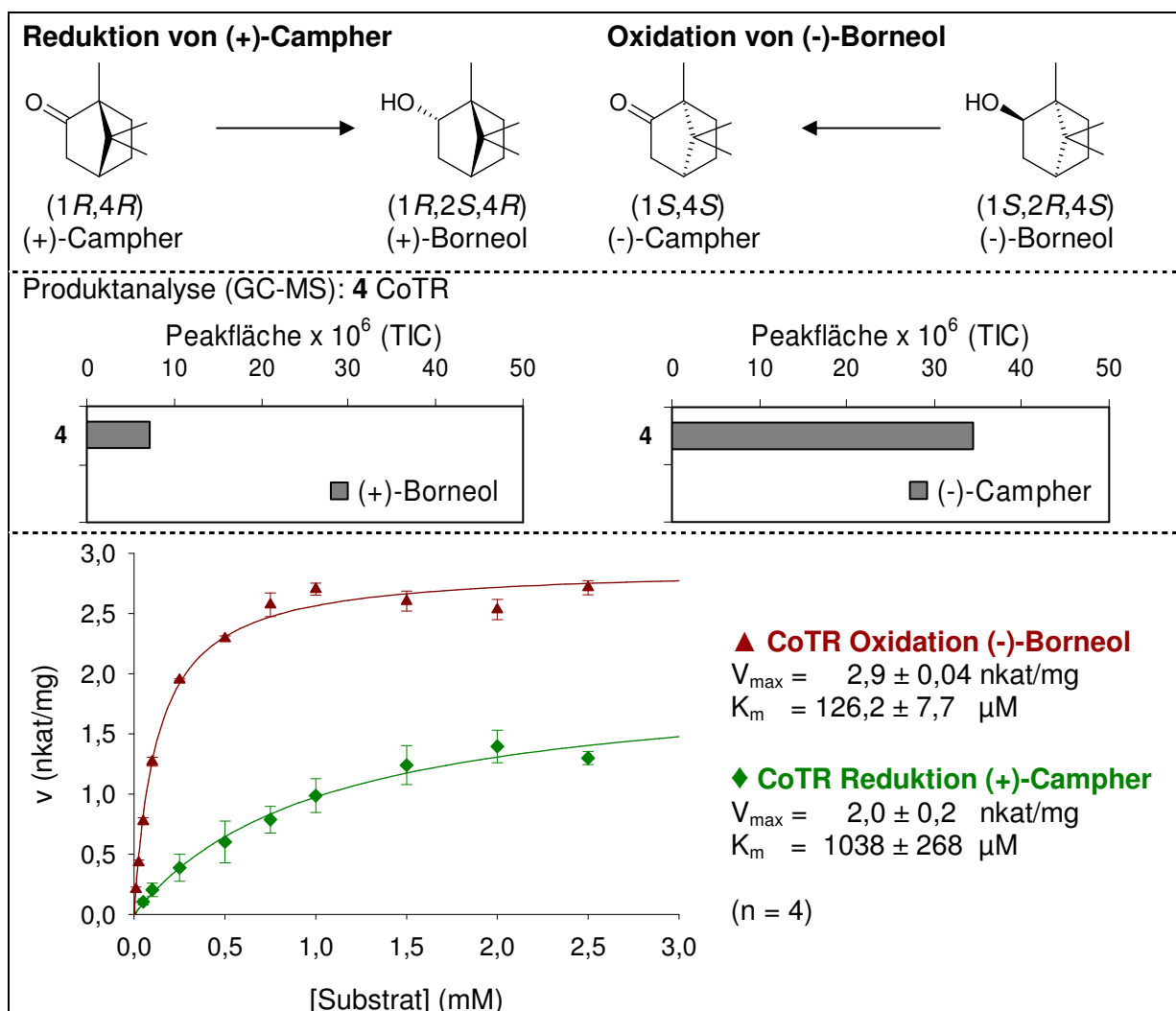
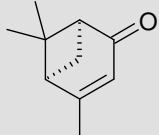
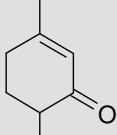
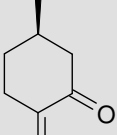
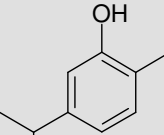
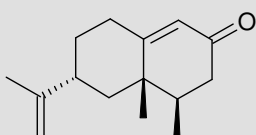


Abb. 33 Oxidoreduktion von (+)-Campher und (-)-Borneol

In den GC-Chromatogrammen wurde nur für CoTR jeweils ein Produkt detektiert (Abb. 33). Bei der Reduktion von (+)-Campher bildete sich (+)-Borneol. Obwohl CoTR (-)-Borneol zu (-)-Campher oxidierte, verlief die Rückreaktion negativ. Da die Affinität von CoTR bei ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten zu (-)-Borneol vierfach höher war als zu (+)-Campher, könnte auch das Reaktionsgleichgewicht zwischen (-)-Borneol und (-)-Campher auf Seiten der Oxidation liegen.

Zyklische Monoterpene wie (-)-Menthon, (-)- $\alpha$ -Thujon und (-)-Carvon werden als Substrate von den TRLs akzeptiert und zum Teil stereospezifisch reduziert. Monoterpene mit verbrückten Ringen werden nur von CoTR quantifizierbar umgesetzt und sind nicht als Substrate für die TRL Enzyme geeignet. Einige der getesteten Verbindungen mit Kohlenstoff-Doppelbindungen wurden von keinem der Enzyme reduziert oder oxidiert, diese sind in Tab. 49 zusammengefasst.

**Tab. 49 Von CoTR und TRLs nicht umgesetzte Terpene**

				
(1S)-(-)- Verbenon	Piperiton	(+)-Pulegon	Carvacrol	(+)-Nootkaton Sesquiterpen

At2g29330 reduzierte von den zyklischen Monoterpenen nur (-)-Menthon in Spuren (Abb. 30). Im Sequenzvergleich zwischen At2g29330 und CoTR, At2g29350 und At2g29150, die zahlreiche zyklische Monoterpene umsetzten, fiel ein Arginin auf (R213 in Position 5, Abb. 46), das nur in At2g29330 vorkam. Im Homologiemodell lag das Arginin in der Nähe des Substrats im aktiven Zentrum. In dieser Position könnte es das Substrat über eine Wasserstoffbrücke zu einer zweiten Carbonylfunktion binden. In Analogie zu den Methylcyclohexanonon wurden 1,4- und 1,3-Cyclohexandion als geeignete Testsubstrate ausgewählt. Im *in vitro* Versuch wurde nur 1,4-Cyclohexandion quantifizierbar reduziert, wobei At2g29330 im Vergleich zu den anderen drei Enzymen die höchste Substrataffinität zeigte (Abb. 34).

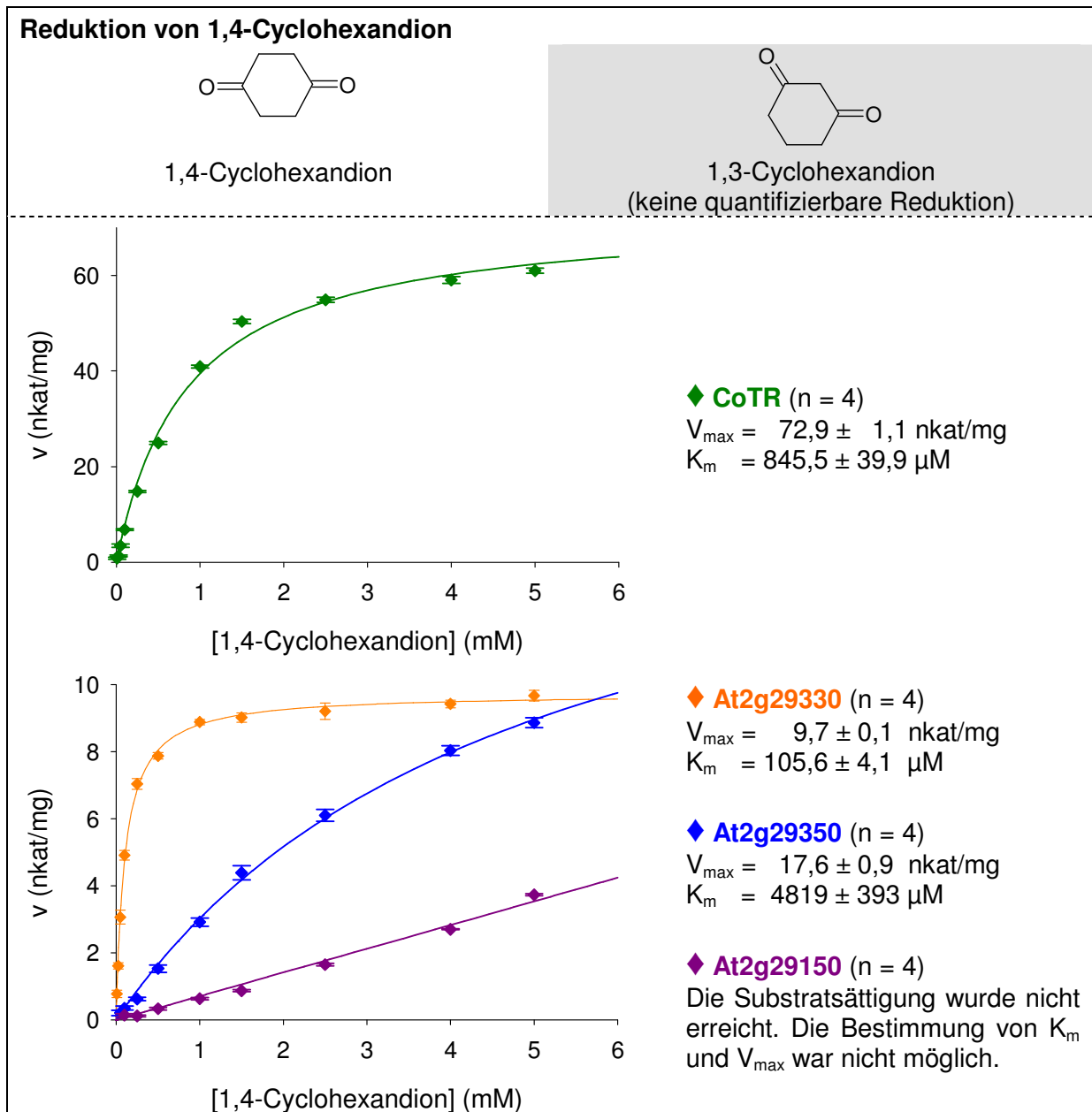


Abb. 34 Reduktion von 1,4-Cyclohexandion

### 3.3.6 Reduktion von Jasmonaten

CoTR und die TRLs akzeptierten diverse Cyclohexanon- und Cyclopentanonverbindungen als Substrate. Eine Gruppe von Verbindungen, die diese Grundstruktur auch aufweisen und ubiquitär als Pflanzenhormone vorkommen, sind die Jasmonate. Dazu zählen neben Jasmonsäure (natürliche vorkommende Diastereomere: (+)-7-*iso*-Jasmonsäure und (-)-Jasmonsäure) auch flüchtige Verbindungen wie Methyljasmonat, Methylhydrojasmonat und *cis*-Jasmon. Kommerziell verfügbar waren jeweils die Racemate, die für die Untersuchung mit den Enzymen und für kinetische Charakterisierungen verwendet wurden. (-)-Jasmonsäure (Prof. Dr. B. Hause, IPB, Halle) und eine der Vorstufen der Biosynthese, die



*cis*-Oxyphytodiensäure (Prof. Dr. W. Boland, Max-Planck-Institut, Jena), standen nur in begrenzten Mengen für einzelne Untersuchungen zur Verfügung.

Die Reduktion von ( $\pm$ )- und (-)-Jasmonsäure wurde für alle Enzyme bei pH 5,0 untersucht, da bei diesem pH-Wert etwa 33 % der Substanzen als protonierte freie Säuren vorliegen. Das (-)-Enantiomer sowie das Racemat wurden von -61NAt2g29260Q220Y, CrTRL26, At2g29350, At2g29150 und At2g29330 enzymatisch reduziert. CoTR, At5g06060 und At2g29360 zeigten keine katalytische Aktivität zu diesen Verbindungen (Abb. 35). (-)-Jasmonsäure wurde von den TRLs strikt stereospezifisch reduziert, wobei -61NAt2g29260Q220Y, CrTRL26 und At2g29150 6-*epi*-7-*iso*-Cucurbinsäure bildeten und At2g29350 sowie At2g29330 (neben 1,3 % 6-*epi*-7-*iso*-Cucurbinsäure) die diastereomere Form 7-*iso*-Cucurbinsäure. Der Name Cucurbinsäure (Abkürzung CA) leitet sich von der ersten Isolierung dieser Verbindungen aus Samen des Kürbis, *Cucurbita pepo*, ab (Fukui et al., 1977a; Fukui et al., 1977b). Aussagen zur Identität der Produkte der reduzierten racemischen Jasmonsäure konnten nicht getroffen werden, da mit der verwendeten nicht-chiralen Säule die vier möglichen Produkte (zwei Enantiomerenpaare: A. 6-*epi*-7-*iso*-CA/3-*iso*-CA und B. 7-*iso*-CA/6-*epi*-3-*iso*-CA) nicht getrennt werden können. Für CrTRL26, At2g29350 und At2g29330 lässt sich feststellen, dass diese Enzyme beide Enantiomere der Jasmonsäure als Substrat akzeptierten, da das Produktspektrum im Vergleich zum Umsatz von (-)-Jasmonsäure allein, verändert war (Abb. 35). In den GC-Chromatogrammen von At2g29150 und -61NAt2g29260Q220Y wurde jeweils ein Produkt-Peak identifiziert, der 6-*epi*-7-*iso*-CA oder einer Mischung der Enantiomere 6-*epi*-7-*iso*-CA und 3-*iso*-CA zugeordnet wurde. Die TRLs -61NAt2g29260Q220Y und At2g29330 katalysierten die Reduktion von ( $\pm$ )-Jasmonsäure mit quantifizierbarem Umsatz. Die Substrataffinität war für beide Enzyme gering ( $K_m \geq 2$  mM entspricht einer Konzentration von ca. 0,66 mM freier Säure). Für -61NAt2g29260Q220Y wurde die Substratsättigung bis zu einer Konzentration von 7,5 mM ( $\pm$ )-Jasmonsäure (entspricht ca. 2,5 mM freier Säure) nicht erreicht. Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  konnten daher nicht berechnet werden. Die Reduktion der unpolareren Methylester Methyljasmonat und Methylhydrojasmonat wurde mit Ausnahme der Vertreter des alten Clusters A (Abb. 7) von allen untersuchten TRLs und auch von der CoTR katalysiert (Abb. 36, Abb. 37). Für die vier Enzyme CoTR, At2g29350, At2g29150 und At2g29330 waren die Reaktionen kinetisch quantifizierbar. At2g29150 zeigte jeweils die höchste Affinität zu den Substraten, während CoTR die höchste spezifische Aktivität aufwies.

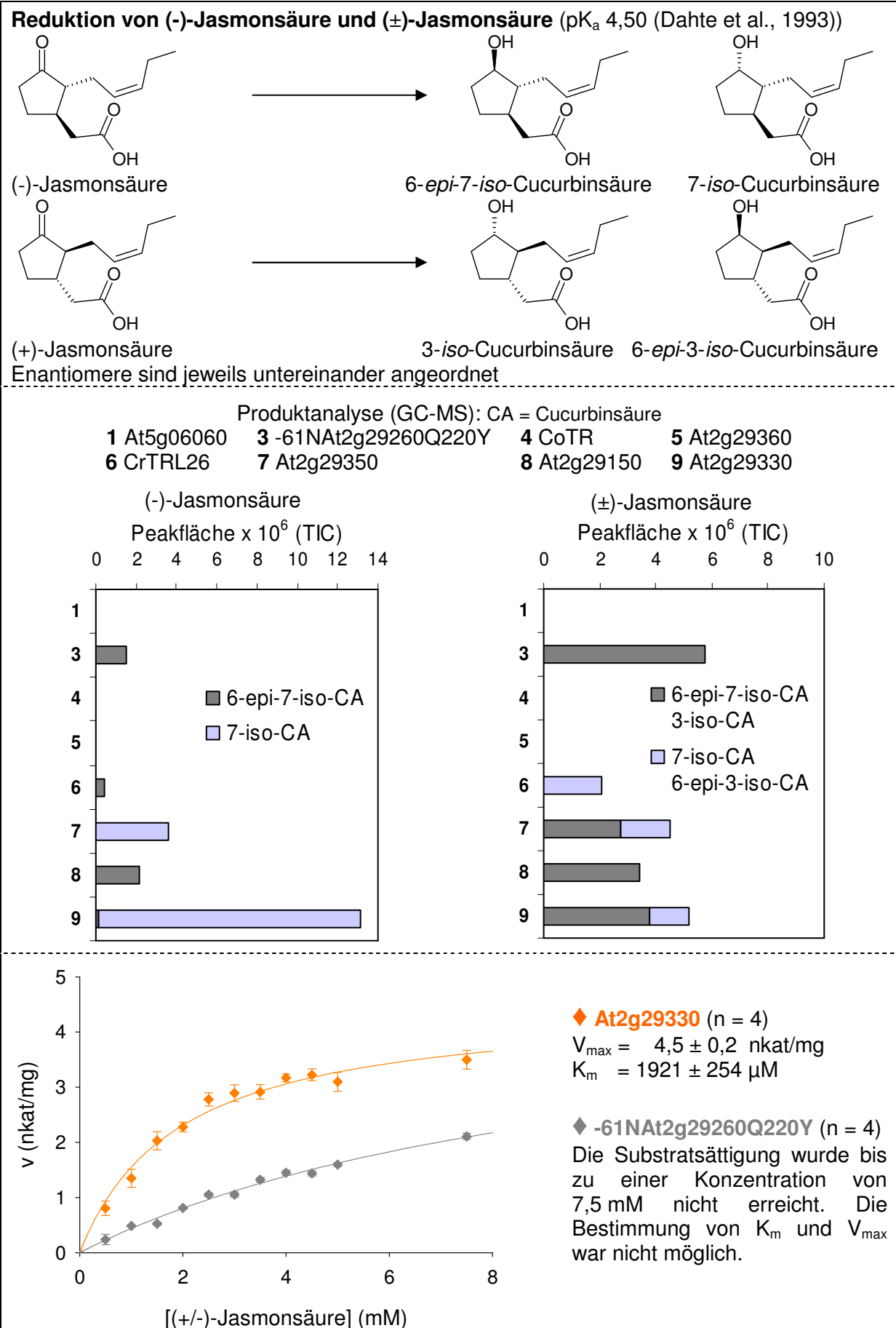


Abb. 35 Reduktion von (-)-Jasmonsäure und (±)-Jasmonsäure

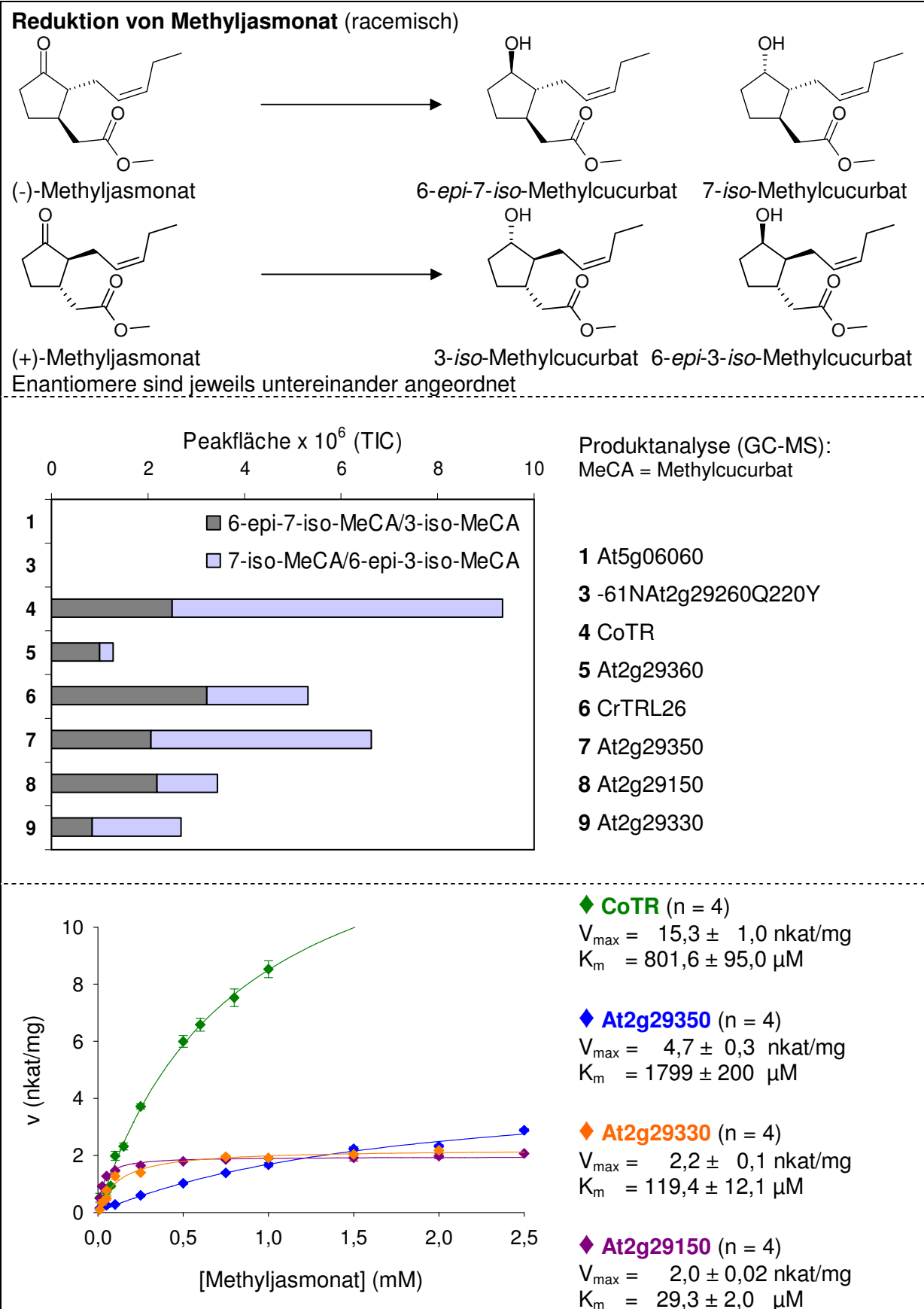


Abb. 36 Reduktion von Methyljasmonat

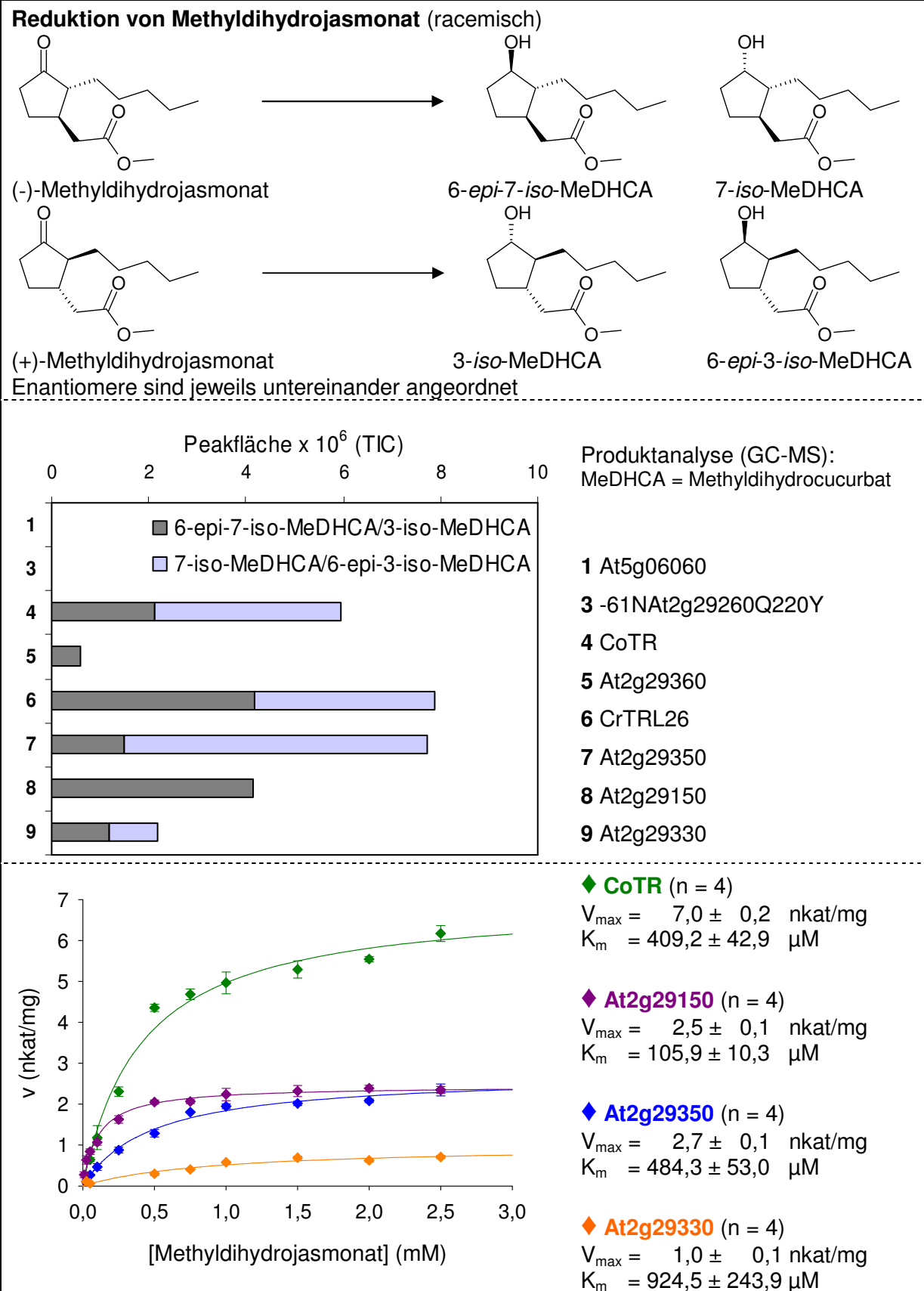
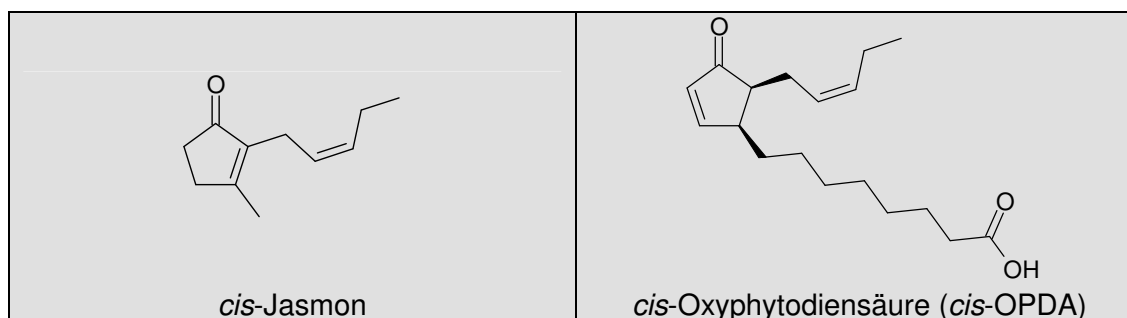


Abb. 37 Reduktion von Methyl dihydrojasmonat

Im Gegensatz zu den Jasmonaten mit Cyclopentanon-Ring wurden Verbindungen mit Cyclopentenon-Struktur (Tab. 50) von den untersuchten TRLs und der CoTR nicht als Substrate akzeptiert. Da die verfügbare Menge von *cis*-Oxyphytodiensäure sehr begrenzt war, wurde die Reduktion dieser Verbindung nur für At2g29350 und -61NAt2g29260Q220Y mit dem Standardreaktionsansatz bei pH 5,0 im Zweistrahlphotometer untersucht (2.4.1.2).

**Tab. 50 Von TRLs nicht umgesetzte Jasmonate**

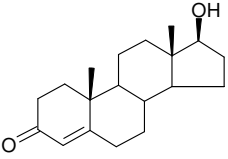
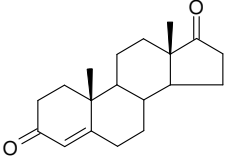
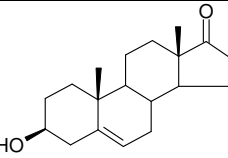
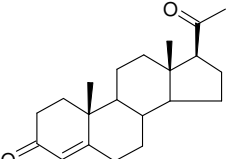
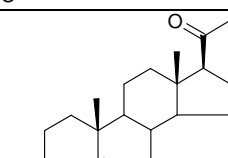
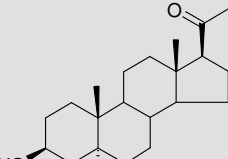
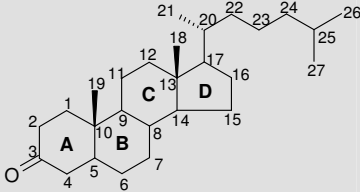
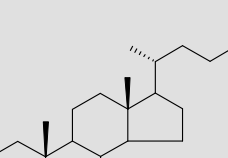
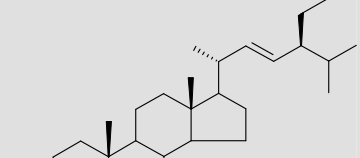


### 3.3.7 Oxidoreduktion von Steroiden und Sterolen

Die bisherigen Erkenntnisse der Substratakzeptanzuntersuchungen deuteten auf Strukturen mit zyklischer oder aliphatischer Carbonylfunktion als passende Substrate für die TRLs hin. Diese Teilstruktur kommt auch in den Grundgerüsten von Steroiden und Sterolen vor. Darüber hinaus ist bekannt, dass pflanzliche  $3\beta$ -Hydrosteroiddehydrogenasen (HSDs) aus *Digitalis*-Arten (Herl et al., 2007) sowie 10 von 11 menschlichen  $17\beta$ -HSDs (Lukacik et al., 2006) zu den klassischen SDRs gehören. Zusätzliches Docking von TRL Proteinmodellen mit Steroidkonformeren unterstützte die Hypothese deren möglicher Akzeptanz als Substrate für die TRLs. Verfügbare Verbindungen wie Steroide mit Androsten- und Pregnengerüst sowie Sterole wurden auf Reduzierbarkeit der Carbonylfunktionen an C3, C17 oder C20 und/oder Oxidierbarkeit vorhandener Hydroxylfunktionen an C3 oder C17 untersucht (Tab. 51, Bezifferung am Beispiel Cholestan-3-on). Es stellte sich heraus, dass die Keto- oder Hydroxylfunktion in Position C3 (A-Ring) durch die TRLs weder reduziert noch oxidiert wurde. Hingegen wurden die Reduktion bzw. Oxidation an Position C17 (D-Ring = Cyclopentanon/ol) sowie C20 (Keton im Substituenten am D-Ring) durch einzelne TRLs und die CoTR katalysiert (Abb. 38, Abb. 39). Die Reaktionsprodukte wurden mit GC-MS analysiert (2.4.2.2) und soweit möglich mit vorhandenen Standardsubstanzen verglichen. Kinetische Messungen für die positiv getesteten Steroide waren auf Grund ungünstiger Lösungseigenschaften in 5 % (V/V) Methanol nicht durchführbar. Eine absolute Substratsättigung der Enzyme konnte im Bereich der löslichen Steroidkonzentrationen (Progesteron < 0,2 mM, Testosteron < 0,4 mM) nicht erreicht werden. Zusätzlich waren die spezifischen Aktivitäten der Enzyme mit ca. 1 nkat/mg gering. Die Parameter  $V_{\max}$  und  $K_m$  konnten somit nicht zuverlässig quantifiziert werden.

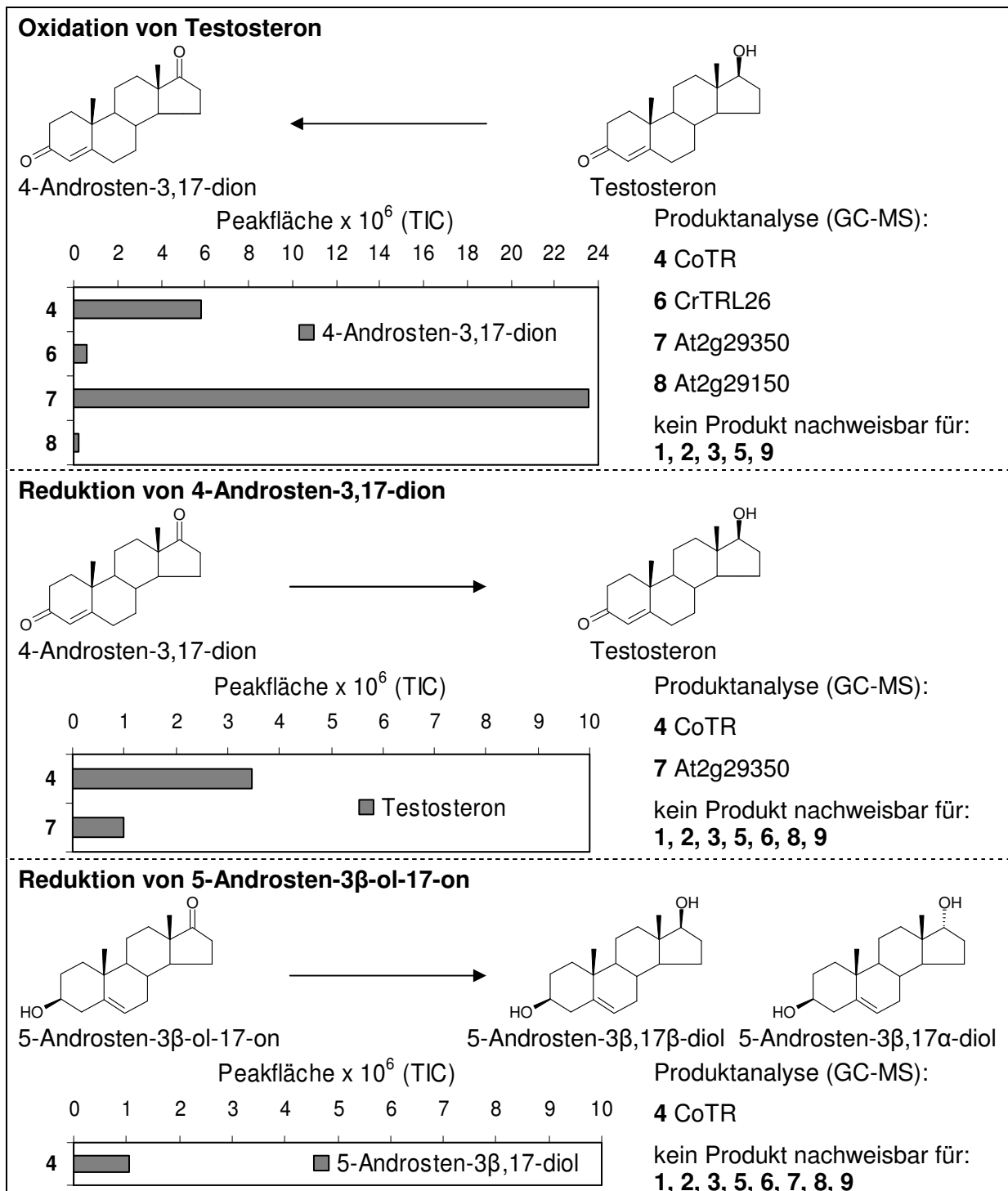
Pflanzliche Sterole mit C3-Hydroxylfunktion wie  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol, die auch in *A. thaliana* vorkommen (Schaeffer et al., 2001), wurden von den TRLs nicht als Substrate akzeptiert (Tab. 51). Auch die C3-Ketofunktion des Cholestanons wurde nicht reduziert.

**Tab. 51 Oxidoreduktion von Steroiden und Sterolen**

Steroid Sterol	Struktur	Reaktion	CoTR	CrTRL26	At2g29360	At2g29350	At2g29150	At5g06060	
Testosteron		Oxidation an C17	+	+	-	+	+	-	
4-Androsten-3,17-dion		Reduktion an C17	+	-	-	+	-	-	
5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on		Reduktion an C17	+	-	-	-	-	-	
Progesteron		Reduktion an C20	+	+	+	-	+	+	
Pregnenolon		Reduktion an C20	-	+	+	-	+	-	
5 $\alpha$ -Dihydro-pregnenolon									
		Cholestan-3-on							
									
$\beta$ -Sitosterol									
		Stigmasterol							
									

+ Produktbildung mit GC-MS nachgewiesen. – Kein Produkt nachweisbar. Die Reduktion oder Oxidation der grau unterlegten Verbindungen wurde von CoTR und den TRLs nicht katalysiert.

4-Androsten-Derivate wurden stereospezifisch von CoTR und At2g29350, sowie im Fall von Testosteron auch von CrTRL26 und At2g29150 katalytisch an Position C17 umgesetzt (Abb. 38). 5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on wurde hingegen nur in Anwesenheit von CoTR reduziert.



**Abb. 38 C17 Oxidoreduktion von Androsten-Derivaten**

Die Reduktionen der Pregnen-Derivate Progesteron und Pregnenolon wurden von At2g29360, CrTRL26 und At2g29150 katalysiert. CoTR und At5g06060 reduzierten das 4-Pregnen-Derivat jedoch nicht das 5-Pregnen-Derivat an Position C20 (Abb. 39). Die Zuordnung der entstehenden Alkohole war aus Mangel an verfügbaren Standardsubstanzen

nicht möglich. Mit At2g29150 entstanden durch enzymatische Reduktion des Progesterons beide Alkohole. Das vollständig gesättigte 5 $\alpha$ -Dihydropregnenolon wurde von keinem der untersuchten Enzyme an Position C20 reduziert (Tab. 51).

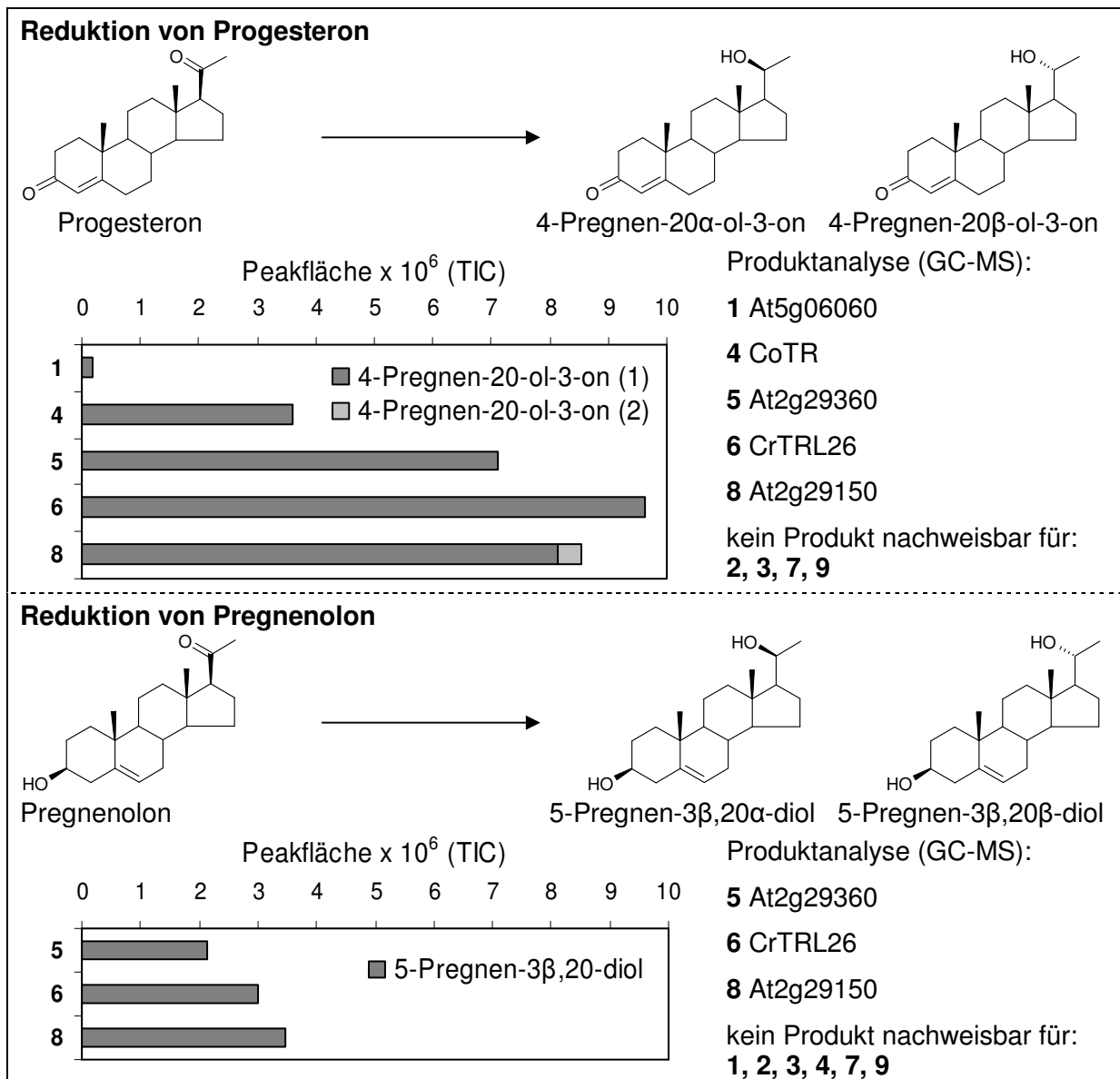


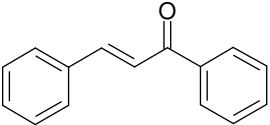
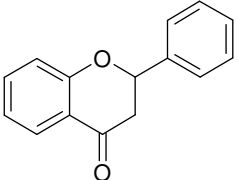
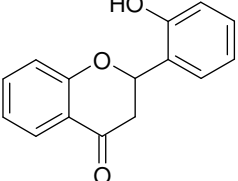
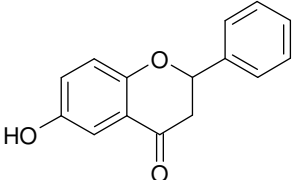
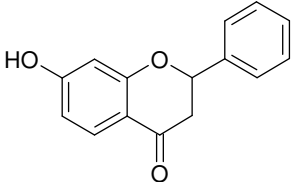
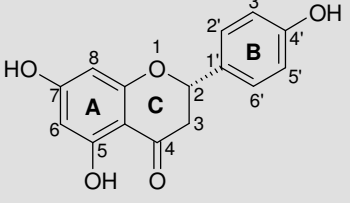
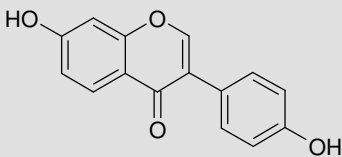
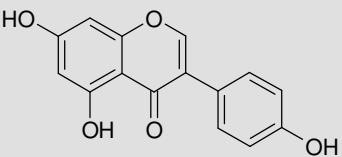
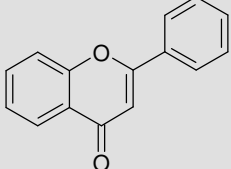
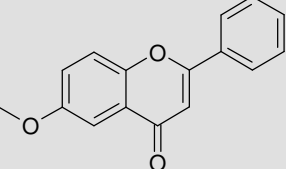
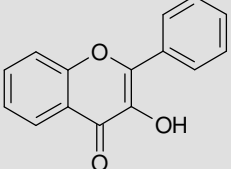
Abb. 39 C20 Reduktion von Pregnen-Derivaten

### 3.3.8 Reduktion von Flavonoiden

Ein *in silico* Screening mit dem Homologiemodell der CrTRL26 und den Strukturen der KEGG-Datenbank ergab als einen interessanten Treffer Flavanon (J. Fischer, persönliche Mitteilung), die Grundstruktur der Flavonoide. Weiterhin war bekannt, dass die Dihydroflavonol 4-Reduktasen (DFRs), die die Reduktion von Dihydroflavonolen zu Leucoanthocyanidinen katalysieren (Routaboul et al., 2006), zur Untergruppe der verlängerten SDRs zählen (bakterielle und tierische DFR: SDR77E, SDR82E; pflanzliche DFR: SDR108E) (Persson et al., 2009). Ausgehend von Flavanon wurden verfügbare Flavonoide ausgewählt, die als Substrate für die TRLs geeignet erschienen (Tab. 52, (-)-Naringenin beziffert).



Tab. 52 Reduktion von Flavonoiden

Flavonoid (racemisch)	Struktur								
		CoTR	CrTRL26	At2g29360	At2g29350	At2g29150	At2g29330	At5g06060	-61NA12g29260Q220Y
<i>trans</i> -Chalkon		+	+	+	+	+	+	-	+
Flavanon		+	+	+	+	+	+	-	+
2'-Hydroxyflavanon		+	+	+	+	+	+	-	-
6-Hydroxyflavanon		+	-	-	+	+	+	-	-
7-Hydroxyflavanon		+	-	-	+	+	+	-	-
 (-)-Naringenin	 Daidzein	 Genistein							
 Flavanon	 6-Methoxyflavon	 3-Hydroxyflavon							

+ Produktbildung mit HPLC nachgewiesen. – Kein Produkt nachweisbar. Die Reduktion der grau unterlegten Verbindungen wurde von CoTR und den TRLs nicht katalysiert.

Das prochirale *trans*-Chalkon mit aliphatischer Ketofunktion wurde von allen untersuchten TRLs, außer At5g06060, und von der CoTR reduziert (Abb. 40). Im HPLC-Chromatogramm war jeweils ein Produkt-Peak sichtbar. Eine Trennung der enantiomeren Alkohole auf der verwendeten nicht-chiralen Säule war nicht möglich.

Von allen weiteren untersuchten Flavonoiden wurden nur die Flavanone, außer (-)-Naringenin, von der CoTR und den TRLs katalytisch reduziert (Abb. 40). Dabei wurden das unsubstituierte Flavanon und das am B-Ring hydroxylierte 2'-Flavanon besser umgesetzt als die am A-Ring hydroxylierten Verbindungen. CoTR, At2g29350, At2g29150 und At2g29330 reduzierten alle vier Flavanone (Flavanon, 2'-, 6-, 7-Hydroxyflavanon) während At2g29360 und CrTRL26 nur Flavanon und das 2'-hydroxylierte Derivat reduzierten. Die Reduktion von Flavanon wurde in geringem Umfang auch von -61NAt2g29260Q220Y katalysiert.

Kinetische Untersuchungen zum Substratumsatz wurden bei den Flavonoiden nicht durchgeführt, da die fotometrische Methode auf Grund von Interferenzen der chromophoren Substrate und Produkte (Tab. 35, Methode 2.4.2.4) bei 340 nm nicht eingesetzt werden konnte.

Als Alternative wäre eine HPLC-Methode zur Bestimmung der kinetischen Parameter vorstellbar. Diese müsste zu jedem Substrat-Produkt-Paar individuell adaptiert werden und würde den Einsatz hoher Substrat-, Cosubstrat- und Enzymmengen erforderlich machen. Darüber hinaus wären zur Auswertung Kalibriergeraden, erstellt mit den kommerziell nicht verfügbaren Produkten, notwendig. Die sich daraus ergebenden Informationen stehen in keiner Relation zum zeitlichen und finanziellen Aufwand einer solchen Analyse.

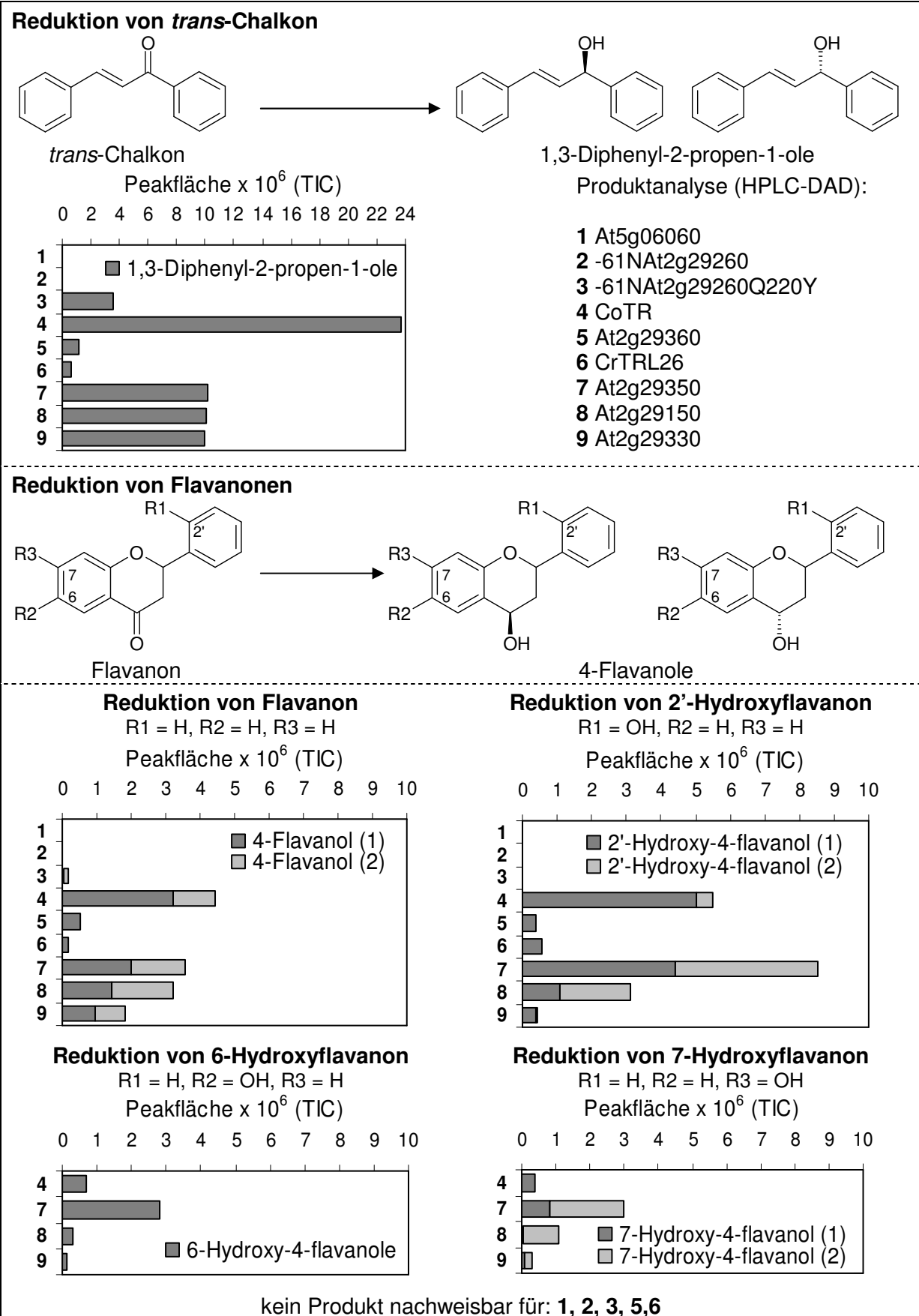
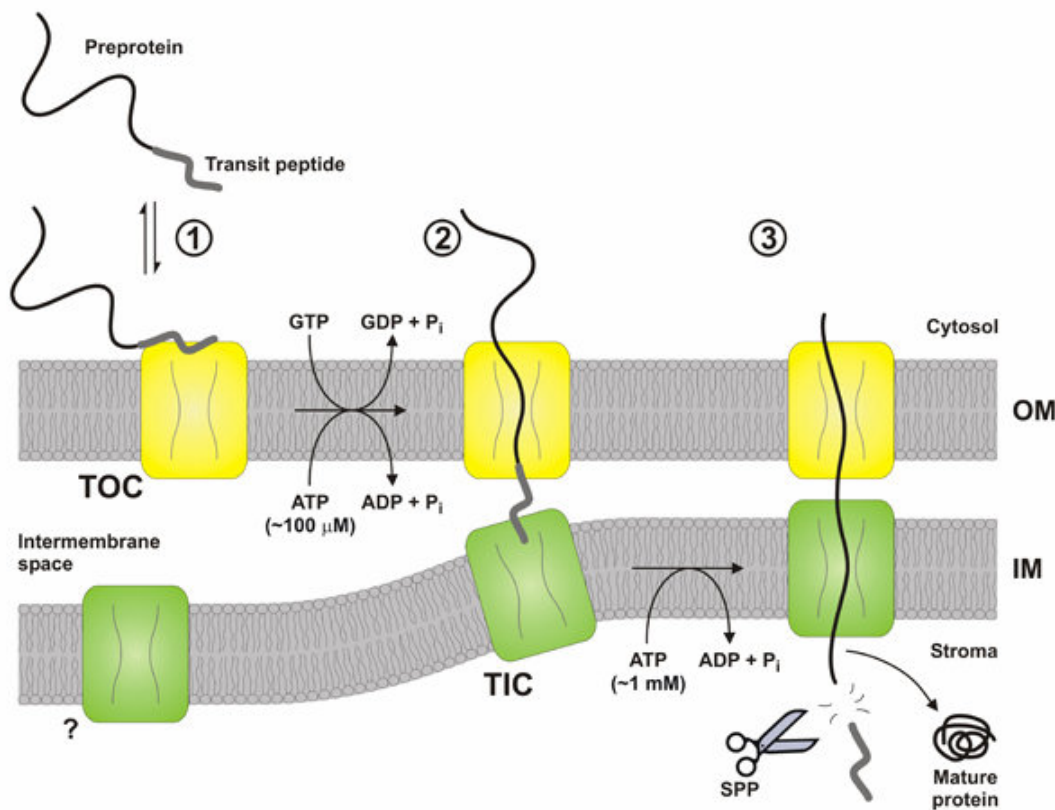


Abb. 40 Reduktion von Flavonoiden

## 4 Diskussion

### 4.1 Besonderheiten des Proteins At2g29260

Das Protein At2g29260 unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht signifikant von allen anderen TRL Proteinen in *A. thaliana*. Es ist N-terminal durch ein chloroplastidäres Transitpeptid von 61 Aminosäuren verlängert. Die Zuordnung konnte mit Hilfe von speziellen Algorithmen (TargetP/ChloroP und WoLF PSORT) vorgenommen werden (Tab. 39). Ein chloroplastidäres Transitpeptid kommt bei Proteinen vor, deren Gensequenz in der genomischen DNA im Zellkern verschlüsselt ist, die ihre Funktion aber in den Chloroplasten entfalten und dafür durch die Chloroplasten-Doppelmembran transportiert werden müssen (Abb. 41).



**Abb. 41 Import kerncodierter Proteine in den Chloroplasten**

Abbildung entnommen aus Jarvis, 2008. OM, äußere Chloroplastenhüllmembran; IM, Innere Chloroplastenhüllmembran; Nähere Erläuterungen im Text.

Der Mechanismus des Imports kerncodierter Proteine in den Chloroplasten lässt sich kurz in folgenden Schritten zusammenfassen (Jarvis, 2008; Jarvis and Soll, 2001): Transkription von genomischer DNA in mRNA im Zellkern, Translation am 80S Ribosom im Zytosol, Entstehung eines Präproteins mit N-terminalem Transitpeptid (cTP), Assoziation des cTP mit Chaperonen, Anlagerung des Proteinkomplexes an den Toc-Apparat (Translocon der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten; Rezeptorkomplex, Abb. 41: gelb) in Phase 1,

Interaktion mit dem Tic-Apparat (Translocon der inneren Hüllmembran des Chloroplasten, Rezeptorkomplex, Abb. 41: grün) in Phase 2, simultane Translokation des Präproteins durch Toc- und Tic-Apparat aus dem Zytosol in das Stroma des Chloroplasten, Assoziation mit stromalen Chaperonen, Entfernung des cTP durch Restriktion mit stromaler prozessiver Peptidase (SPP) in Phase 3, endgültige native Faltung des reifen Proteins und Funktionalisierung.

Die Sequenzen plastidärer Transitpeptide sind sehr vielfältig, deshalb lassen sich allgemeingültige Erkennungsmotive nicht festlegen. Lee und Mitarbeiter haben 208 Transitpeptide analysiert und 7 Sequenzuntergruppierungen klassifiziert, die distinkte gruppenspezifische Sequenzmotive enthalten (Lee et al., 2008). Trotzdem konnten knapp 80 % der untersuchten Transitpeptide nicht in eine der sieben Gruppen eingeordnet werden. Die Analyse bekannter Transitpeptide führte zu folgenden wichtigen Kriterien (Douwe de and Weisbeek, 1991):

- variable Länge zwischen 30-80 Aminosäuren
- gehäuftes Auftreten von hydroxylierten Aminosäuren wie Serin und Threonin
- Mangel an sauren Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat (negative Ladung)
- gehäuftes Auftreten von basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin (positive Ladung)
- relativ hydrophober N-Terminus (erste 10 Aminosäuren)

Weitere frei im Netz verfügbare Lokisationsalgorithmen für Transitpeptide sind Principal Component Logistic Regression PCLR (Schein et al., 2001) und Predotar (Small et al., 2004). Mit beiden Programmen wurde das Vorkommen eines cTP in der Sequenz von At2g29260 nochmals bestätigt. Diese Programme geben allerdings keinen Aufschluss über die Länge der Transitpeptide und erlauben daher nicht die Festlegung einer Schnittstelle zu deren Entfernung.

Das vollständige Präprotein At2g29260 mit cTP konnte in *E. coli* M15[pRE4] nicht löslich synthetisiert werden (Abb. A1 im Anhang). Um Proteine mit cTP löslich synthetisieren zu können, ist es gängige Praxis, das Transitpeptid durch geschicktes PCR-Primerdesign nicht mit zu amplifizieren und so die Synthese des reifen Proteins zu forcieren. Beispiele aus der Literatur sind eine plastidäre Serin-Acetyltransferase aus Spinat (Noji et al., 2001), Hämoxygenasen aus *A. thaliana* (Gisk et al., 2010) und eine NADP(H)-abhängige  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reduktase aus *Cuphea lanceolata* (Lythraceae, ClKR27 siehe Abb. 42, SDR152C) (Klein et al., 1992). Im Fall von At2g29260 wurde der Vorwärts-Primer um 183 Nukleotide (61 Triplets) Richtung 3'-Ende versetzt und das reife Protein -61NAt2g29260 in *E. coli* M15[pREP4] erfolgreich synthetisiert.

Wurde die cTP-Sequenz im Gen *at2g29260* vor, während oder nach den Tandem-Duplikationen der TRLs erworben? Wahrscheinlich ist sie erst während oder nach den multiplen Tandem-Duplikationen der TRL Gene entstanden, aber vor der Auftrennung der



Mutagenese mit dem Austausch des Glutamins durch Tyrosin führte zum aktiven TRL Enzym -61NAt2g29260Q220Y mit ähnlicher Aktivität und Substratakzeptanz wie At5g06060. Das basische Histidin in RcTRL5 und PtTRL1 könnte hingegen im protonierten Zustand als Protonendonator und katalytische Säure dienen (Vergleich humane Laktatdehydrogenase (Pineda et al., 2007)).

Innerhalb der SDR-Superfamilie ist das katalytische Tyrosin am stärksten konserviert (Filling et al., 2001; Jörnvall et al., 1995). Eine von zwei bisher bekannten Ausnahmen ist die unter anderem auch deshalb als „atypisch“ bezeichnete Familie SDR48A der NmrA-ähnlichen Proteine (Filling et al., 2001; Kallberg et al., 2010; Persson et al., 2009). Diese im Zytosol und Zellkern vorkommenden löslichen Proteine enthalten kein katalytisches Tyrosin, aber eine typische Rossmann-Faltung zur Bindung von NADP(H). Die Affinität zu NADPH ist höher als zu NADP<sup>+</sup>. NmrA-ähnliche Proteine werden als Redoxsensoren bezeichnet, da sie mit Änderungen der Tertiär- und Quartärstruktur sowie der räumlichen Verteilung auf Veränderungen des Konzentrationsverhältnisses von NADPH/NADP<sup>+</sup> reagieren. Ein bekannter Vertreter dieser SDR-Familie ist das humane Protein HSCARG (Zheng et al., 2007). Bei geringen NADPH-Konzentrationen liegt das Protein als Monomer vor und bindet verstärkt das Enzym Argininosuccinat-Synthetase (ASS1), dadurch wird die zelluläre NO-Synthese reduziert und eine nachfolgende Apoptose verhindert (Zhao et al., 2008). Bei höheren NADPH-Konzentrationen bindet ein Monomer NADPH, wird anschließend durch eine Konformationsänderung stabilisiert und bildet mit einem zweiten freien Monomer ein asymmetrisches Dimer (Dai et al., 2009). Die Stabilität des Dimers ist an die Bindung von NADPH geknüpft. Es kann ASS1 nicht mehr binden, da die Bindungsstelle nicht zugänglich ist. Könnte At2g29260 eine ähnliche Redoxsensor-Funktion als lösliches Protein in den Chloroplasten erfüllen? Durch Fluoreszenztitration und ITC konnte eine hohe Affinität für die Bindung von NADPH an das lösliche Protein -61NAt2g29260 nachgewiesen werden (3.2.2). Die zweite SDR-Familie ohne katalytische Triade, dafür mit RNA-Bindungs- und Nukleaseaktivität, ist SDR83U, zu der CSP41a und b (Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa) aus *Arabidopsis thaliana* gehören. Beide Proteine sind im Kerngenom codiert (CSP41a: cTP 72 AS, CSP41b: cTP?) und liegen mit plastidären Ribosomen assoziiert im Stroma des Chloroplasten vor. Für diese RNA-Bindeproteine wurde ein Einfluss auf Transkription und Translation plastidär codierter RNA festgestellt (Bollenbach et al., 2009). Nimmt At2g29260 möglicherweise eine ähnliche Funktion als Redoxsensor für plastidäre Transkriptionsprozesse ein?

Eine weitere mögliche Funktion für ein plastidäres NADPH-abhängiges TRL Protein als Redoxsensor wäre auch im Ablauf der sogenannten Chlororespiration denkbar (Bennoun, 1982). Darunter wird eine Atmungs-/Elektronentransfer-Kette in der Thylakoidmembran des Chloroplasten verstanden. Diese dient der Aufrechterhaltung des Redoxstatus des

Plastochinon-Pools (NAD(P)H-abhängige Reduktion von Plastochinon, Oxidation von Plastochinol durch Sauerstoff) in Abwesenheit des fotosynthetischen Elektronentransfers (= Fotorespiration) während der Dunkelphase (Nixon, 2000). Ein NADH-Dehydrogenase-ähnlicher-Komplex (NDH) bestehend aus multiplen Untereinheiten ist am zyklischen Elektronen-Transport um Fotosystem I und an der Chlororespiration beteiligt (Shikanai, 2007). Für die korrekte Zusammensetzung des NDH-Komplexes sind verschiedene kerncodierte Proteine, u. a. die „Chlororespiratory reduction“ (CRR) Proteine 1, 6, 7, 41 und 42 und NdhL, NdhM, NdhO und NdhN, notwendig (Peng et al., 2012). Allerdings gehört keines dieser Proteine zur SDR-Superfamilie und ein direkter Zusammenhang mit At2g29260 wurde bisher nicht hergestellt.

## 4.2 Quartärstruktur der TRL Proteine

SDR Proteine weisen meist eine oligomere Quartärstruktur als Homodimer oder Homotetramer auf (Kavanagh et al., 2008) (Abb. 43). Monomere SDRs, wie z. B. eine testikuläre Carbonylreduktase vom Schwein, sind selten (Ghosh et al., 2001). In diesem Enzym liegt eine Insertion von 20 Aminosäuren vor dem katalytischen Tyrosin vor, die als zusätzliche vorgelagerte Helix die Dimerisierungsebene (Q-Achse) der Monomere stört.

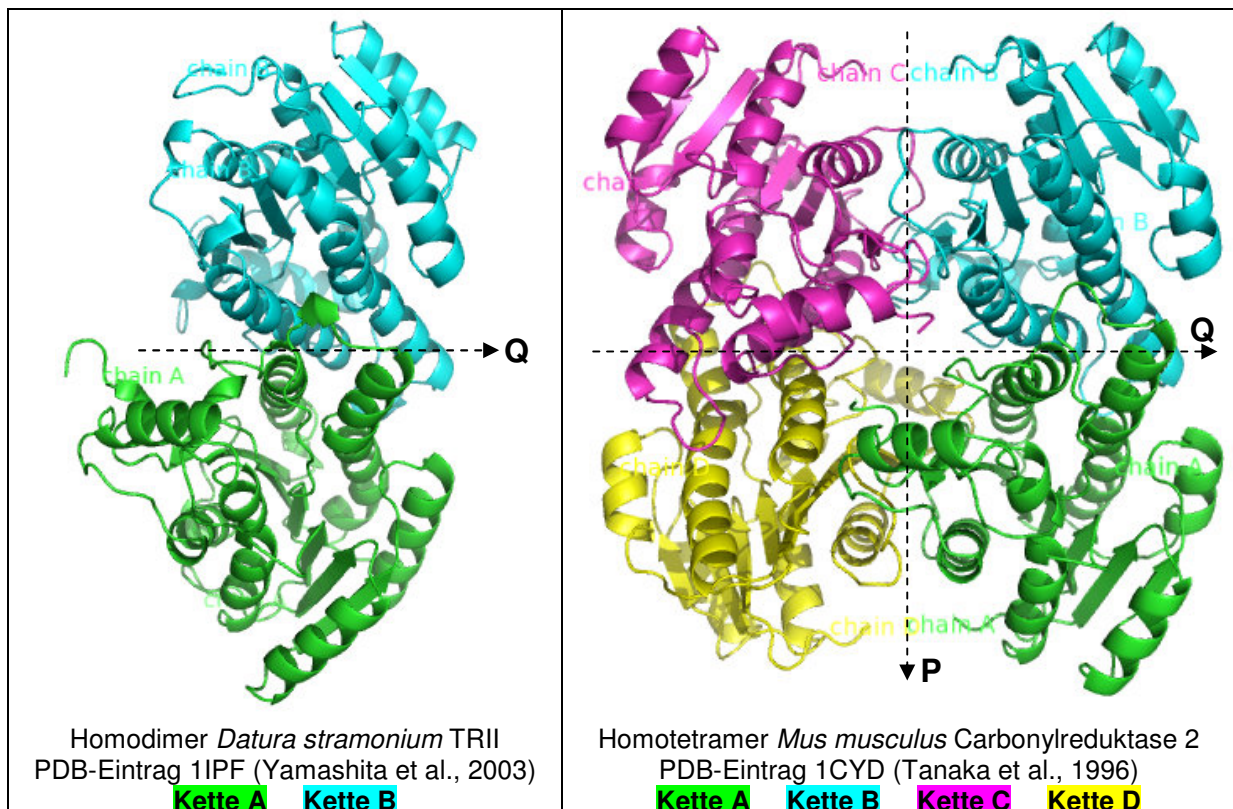


Abb. 43 Darstellung oligomerer SDR-Kristallstrukturen (PyMol)

Typisch für SDRs ist eben diese Dimerisierungsebene entlang der sogenannten Q-Achse, die als Vier-Helix-Bündel bezeichnet wird. Zwei  $\alpha$ -Helices von Untereinheit A ( $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ ) interagieren mit den zwei identischen Helices der um fast  $180^\circ$  gedrehten Untereinheit B



(Ghosh et al., 1991) (Abb. 43). Ein Homotetramer entsteht aus zwei dimeren Einheiten entlang einer zweiten Symmetrieachse, die als P-Achse bezeichnet wird. Hierbei assoziieren die C-terminalen herausragenden  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta 7$ ) je einer Untereinheit antiparallel zueinander (fast  $180^\circ$  vertikal gedreht). Homotrimere als SDR-Quartärstrukturen sind nicht vorstellbar.

Bekannte Methoden zur Bestimmung nativer Molekulargewichte sind Gelfiltration (Prinzip: Größenausschluss, 2.3.6.1) und Ultrazentrifugation (Prinzip: Sedimentation/Diffusion, 2.3.6.2). Dabei ist die Gelfiltration stärker als die Ultrazentrifugation abhängig von Molekülform und -volumen. Die für die Kalibrierung verwendeten Standardproteine bei der Gelfiltration haben eine nahezu sphärische Form. Nur für Proteine mit ähnlicher Form können verlässliche Molekulargewichte bestimmt werden. Jede Abweichung durch Asymmetrie oder veränderte Hydrathülle des untersuchten Proteins hat einen Einfluss auf das Messergebnis. Längliche Proteine können bei der Gelfiltration bis zu doppelt so schwer erscheinen wie globuläre Proteine gleichen Molekulargewichts (Erickson, 2009). Da die Analyse der Gelfiltrationsexperimente rechnerisch zu trimeren Proteinen führte (außer für At2g29360 und CrTRL26) und diese theoretisch nicht vorstellbar sind, wurde als zusätzliche unabhängige Messmethode die Ultrazentrifugation angewendet. Mit Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen wurde der apparente Sedimentationskoeffizient  $s$  und mit Sedimentationsgleichgewichtsmessungen das apparente Molekulargewicht  $M_w$  direkt, ohne Kalibrierung, bestimmt. Für At2g29360, At5g06060, und -61NAt2g29260/Q220Y wurden native Molekulargewichte im Bereich eines Tetramers ( $M_{wUZ} : M_{wMonomer} = 3,4-3,7$ ) berechnet (3.2.1; Tab. 40). Diese Ergebnisse passen gut zu den bekannten tetrameren Tropinonreduktasen aus *Hyoscyamus niger*, wobei zumindest für die HnTRII auch abweichende Molekulargewichte gemessen wurden (Tab. 53).

**Tab. 53 Oligomere Tropinonreduktasen**

Enzym	$M_{wMonomer}$ [kDa]	Methode	$M_{wOligomer}$ [kDa]	Faktor (Homomer)	Referenz
DsTRI	29,6	Kristallisation	/	1AE1 (Di)	(Nakajima et al., 1998)
		Gelfiltration	50,7	1,7 (Di)	(Portsteffen et al., 1994)
		Gelfiltration	56,0	1,9 (Di)	(Koelen and Gross, 1982)
HnTRI	30,0	Gelfiltration	115,0	3,8 (Tetra)	(Hashimoto et al., 1992)
PsTRI	28,0	Gelfiltration	58,0	2,1 (Di)	(Bartholomew et al., 1995)
AbTRII	27,5	Gelfiltration	78,5	2,9 (Di/Tri)	(Dräger and Schaal, 1994)
DsTRII	27,7	Gelfiltration	77,7	2,8 (Di/Tri)	(Portsteffen et al., 1994)
		Kristallisation	/	1IPF (Di)	(Yamashita et al., 2003)
HnTRII	29,0	Gelfiltration	103,0	3,6 (Tetra)	(Hashimoto et al., 1992)
		Gelfiltration	84,0	2,9 (Di/Tri)	(Dräger et al., 1988)

Ab, *Atropa belladonna*; Ds, *Datura stramonium*; Hn, *Hyoscyamus niger*; Ps, *Pseudomonas ssp.*  
Alle hier aufgeführten Proteine wurden nativ aus biologischer Matrix isoliert und gereinigt.

Allerdings resultierte auch die Ultrazentrifugation bei At2g29350 und At2g29150 in vermeintlichen Trimeren ( $Mw_{UZ} : Mw_{Monomer} = 3,1-3,2$ ). Vermutlich besitzen diese Proteine eine andere räumliche Ausdehnung im Vergleich zu den klar als Tetramer vorkommenden TRLs, die zu einem kleineren Molekulargewicht als dem des erwarteten Tetramers führte.

Einzig für CrTRL26 resultierten beide Methoden in einem Dimer von 64-68 kDa. Die Quartärstruktur von CrTRL26 ist somit vergleichbar mit den dimeren Tropinonreduktasen aus *Datura stramonium*, *Atropa belladonna* und der angenommenen TRI aus *Pseudomonas* (Tab. 53). Die homodimere Struktur von CrTRL26 wird außerdem gestützt durch die Beobachtung positiver Kooperativität (Hill-Kinetik) bei der Oxidation der Methylcyclohexanole (3-MCOH:  $h = 1,6$ ; 4-MCOH:  $h = 1,7$ ; NADP:  $h = 2,3$ ). Die Hill-Koeffizienten stellen ein Maß für die minimale Anzahl beteiligter substratspezifischer Bindungsstellen dar. Sie sollten bei einem Dimer mit einer spezifischen Bindungsstelle pro Monomer nicht größer als 2 sein. Die geringe Abweichung des Hill-Koeffizienten bei der NADP-Kinetik ergibt sich möglicherweise aus einer Instabilität des Enzyms. Im Chromatogramm der Gelfiltration war direkt nach dem Peak des Dimers ein zweiter sehr kleiner Peak zu sehen (20 kDa), der dem Monomer zugeordnet wurde. Interaktionen von Monomer und Dimer während der enzymatischen Katalyse könnten eine mögliche Erklärung für den Hill-Koeffizienten  $> 2$  sein.

### 4.3 Katalytische Eigenschaften der TRL Enzyme

#### 4.3.1 pH-Optima für Reduktion und Oxidation

Das pH-Optimum der funktionalen Tropinonreduktasen wurde mit Tropinon ( $pK_a$  8,93) bestimmt, dessen Protonierungsgrad vom pH-Wert abhängig ist. Die Optima für die Oxidation wurden nur für die TRI mit dem Alkohol Tropin bestimmt, da die TRII die Oxidation des Pseudotropins zum Tropinon nicht katalysiert. Die Tropinonreduktasen besitzen ein pH-Optimum für die Reduktion von Tropinon im sauren Bereich zwischen pH 5,0-6,4 (Tab. 54). Die TRII weisen im Vergleich zu den TRI ein breiteres pH-Optimum auf.

Tab. 54 pH-Optima von Tropinonreduktasen für Tropinon/Tropin

Enzym/Herkunft	pH-Optimum Reduktion	pH-Optimum Oxidation	Referenz
CoTR rekombinant	8,5	/	(Brock et al., 2008)
DsTRI nativ	6,4	9,5	(Portsteffen et al., 1994)
HnTRI nativ	6,1	7,6	(Hashimoto et al., 1992)
AbTRII nativ	6,25 (breit)	/	(Dräger and Schaal, 1994)
DiTRII nativ	6,4 (breit)	/	(Couladis et al., 1991)
DsTRII nativ	6,25 (breit)	/	(Portsteffen et al., 1994)
HnTRII nativ	5,8 (breit)	/	(Dräger et al., 1988)
SdTRII rekombinant	5,0 (breit)	/	(Freydank et al., 2008)
StTRII rekombinant	5,0 (breit)	/	(Keiner et al., 2002)

Ab, *Atropa belladonna*; Di, *Datura innoxia*; Ds, *Datura stramonium*; Hn, *Hyoscyamus niger*; Sd, *Solanum dulcamara*; St, *Solanum tuberosum*

CoTR bildet mit einem Optimum bei pH 8,5 für die Reduktion von Tropinon eine Ausnahme. In diesem Bereich liegt Tropinon zu ca. 50 % als deprotonierte freie Base vor und wird als solche bevorzugt im aktiven Zentrum von CoTR gebunden (Brock et al., 2008). Mit dem ungeladenen Substrat 3-Methylcyclohexanon zeigte CoTR ein TR/TRL typisches pH-Optimum im sauren Bereich (pH 4,5-5,0).

Die pH-Optima für die TRLs wurden mit dem Substratpaar 3-Methylcyclohexanon/ol bestimmt, da die Oxidoreduktion dieser Substrate von allen TRLs katalysiert wurde. Für die Reduktion lagen die optimalen pH-Werte in einem Bereich zwischen 4,5-6,5 (Abb. 20). Die Werte sind ähnlich den pH-Optima der TRI und TRII mit dem Substrat Tropinon (Tab. 54). Die Oxidation wurde besser im alkalischen pH-Bereich von 8-10 katalysiert (Abb. 21).

Um die Anzahl der Puffer möglichst gering zu halten und Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde für die Reduktion allgemein mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 und nur für At5g06060, At2g29360 und CrTRL26 mit Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 gearbeitet. Für die Oxidation wurde Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5 verwendet. Davon ausgenommen waren At5g06060, At2g29350 und -61NAt2g29260Q220Y für die Tris-HCl-Puffer pH 8,0 eingesetzt wurde. Bei der Auswahl der Puffer für Reduktion und Oxidation wurde darauf geachtet, einen pH-Sprung von mindestens 2 bis 4,5 pH-Einheiten zu verwenden, um die jeweilige Rückreaktion vernachlässigbar gering zu halten. Dies gelang jedoch nicht immer. Bei der Katalyse der Reduktion von 3- und 4-Methylcyclohexanon bei pH 5,0 durch CoTR nahm mit zunehmender Substratkonzentration die spezifische Aktivität ab (Abb. A4 im Anhang). Zur Auswertung mit SigmaPlot 10 wurde deshalb die Berechnungsformel für eine unkompetitive Substratinhibition verwendet. Die vermeintliche „Hemmung“ war jedoch auf die simultane Oxidation der jeweiligen Alkohole bei identischen pH-Werten zurückzuführen. Die parallele Rückreaktion war auch bei der Oxidation von 4-Methylcyclohexanol bei pH 9,5 durch CoTR deutlich messbar (Abb. 29). Die berechnete maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) für die Reduktion des Ketons bei pH 9,5 war etwa doppelt so hoch wie für die Oxidation des Alkohols bei ähnlicher Affinität ( $K_m$ ) für die beiden Substrate.

Der Grund für die Bevorzugung der jeweiligen Reaktionsrichtung in Abhängigkeit vom pH-Wert liegt in der veränderten Ladungsverteilung in der Aminosäuresequenz der Enzyme. Für eine erfolgreiche Katalyse ist bei der Reduktion ein protoniertes Tyrosin (katalytische Säure,  $pK_a$  9,0-9,5) und bei der Oxidation ein deprotoniertes Tyrosinat-Ion (katalytische Base,  $pK_a$  7,2-7,6; Verringerung durch Bindung von  $NAD(P)^+$ ) notwendig. Diese liegen in Abhängigkeit vom pH-Wert, den umgebenden Aminosäuren und positiv geladenen Cosubstraten in unterschiedlichen Verhältnissen vor (Benach et al., 1999; Chang et al., 2007).

### 4.3.2 Cosubstratazeptanz und -präferenz

Ein von Kallberg und Mitarbeitern erstelltes „Hidden Markov“-Modell (Kallberg and Persson, 2006) ermöglicht die Zuordnung der Cosubstratpräferenz für NADP(H), NAD(H) und FAD(H<sub>2</sub>) für Dehydrogenasen/Reduktasen mit Rossmann-Faltung anhand von Schlüsselpositionen in der Proteinsequenz (Wierenga et al., 1985). Die Einteilung von Cosubstrat-Unterfamilien für NAD(P)(H)-abhängige klassische und verlängerte SDRs unter Betrachtung von vier Schlüsselpositionen wurde bereits 2002 von derselben Gruppe vorgenommen (Kallberg et al., 2002). Für klassische SDRs wurden vier Unterfamilien für NAD(H)-Präferenz und drei Unterfamilien für NADP(H)-Präferenz definiert (Tab. 55). Von 253 klassischen SDR Proteinen der SWISS-PROT Datenbank (Bairoch and Apweiler, 2000) konnten 218 in die 7 Unterfamilien eingeordnet werden, die restlichen 35 (14 %) jedoch nicht. Die relevanten Schlüsselpositionen werden im Folgenden aufsteigend mit a, b, c, und d bezeichnet.

**Tab. 55 Cosubstrat-Unterfamilien klassischer SDRs nach Kallberg et al., 2002**

Unterfamilie	Schlüsselpositionen				Präferenz	SWISS-PROT: 253 SDRs (Häufigkeit in %)
	a	b	c	d		
cD1d		D			NAD(H)	64 (25 %)
cD1e		E			NAD(H)	2 (1 %)
cD2			D/E		NAD(H)	2 (1 %)
cD3				D/E	NAD(H)	8 (3 %)
cP1	K/R				NADP(H)	24 (10 %)
cP2			K/R		NADP(H)	41 (16 %)
cP3	K/R		K/R		NADP(H)	77 (30 %)

Unterfamilie: c, klassische SDR; D, NAD(H)-Präferenz; P, NADP(H)-Präferenz.  
Aminosäuren im Einbuchstabencode.

Die NAD(H)-Präferenz klassischer SDRs wird durch eine saure Aminosäure in Position b oder den folgenden zwei Positionen (c, d) am C-terminalen Ende des zweiten  $\beta$ -Faltblattes verursacht (Wierenga et al., 1986). Das Aspartat, oder seltener Glutamat, bildet je eine Wasserstoffbrücke mit der 2'- und 3'-Hydroxylfunktion der Adenosin-Ribose des NAD(H) aus. Von Bedeutung ist weiterhin, dass sich innerhalb der vier NAD(H)-Unterfamilien auf den verbliebenen drei Schlüsselpositionen keine basische Aminosäure befindet (Kallberg et al., 2002). Hingegen fixieren positiv geladene basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin in den Positionen a und/oder c die negativ geladene 2'-Phosphat-Gruppe an der Adenosin-Ribose von NADP(H) durch ionische Wechselwirkungen und führen so zur Präferenz von NADP(H) (Kallberg et al., 2002; Tanaka et al., 1996).

Die Analyse der Aminosäuresequenzen der TRs und TRLs ergab, dass für diese SDRs vor allem die Schlüsselpositionen a bis c von Bedeutung sind (Abb. 44). Anhand ihrer Aminosäuresequenzen lassen sich die Tropinonreduktasen aus *Datura stramonium*, die CoTR und die TRLs des alten Clusters A sowie des modernen Clusters B aus *A. thaliana* und *C. rubella* komplett der NADP(H)-Unterfamilie cP3 mit basischen Aminosäuren in den

Schlüsselpositionen a und c zuordnen (Abb. 44). Eine Ausnahme ist CrTRL24 mit Glutamin an Position a und Arginin an Position b, welches der NADP(H) bevorzugenden Unterfamilie cP2 angehört. Die TRLs des modernen Clusters C, mit At2g29330 als untersuchtem Vertreter, tragen alle ein Aspartat an Position b und zeigen keine basischen Aminosäuren an Position a und c. Sie lassen sich daher in die NAD(H) präferierende Unterfamilie cD1d eingruppiert. Wiederum gibt es eine Ausnahme – für CrTRL18 aus Cluster C ist keine klare Zuordnung zu den Unterfamilien möglich, da es sowohl ein Lysin an Position a (cP1) als auch ein Aspartat an Position b (cD1d) besitzt. Vermutlich würde dieses Enzym für die Katalyse beide Cosubstrate akzeptieren.

Cluster	a	bc	
DsTRI	MEESKVSMMNCNNEGRWSLKGTTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	YAIVEELAGLGARVYTC <b>SR</b> NEKE	57
DsTRII	-----MAGRWNLEGCTALV <b>TGGSRGIG</b> ---	YGIVEELASLGASVYTC <b>SR</b> NQKE	45
A At5g06060	-----METDKRWSLAKGTALV <b>TGGTRGIG</b> ---	RAVVEELAKFGAKVHTC <b>SR</b> NQEE	47
A -61Nat2g29260	-----MSKERWSLNGMSALV <b>TGGTRGIG</b> ---	RAIVEELAGLGAEVHTC <b>AR</b> NEYE	46
A -45CrTRL13	----MHVRCATQSSERWSLQGSALV <b>TGGTRGIG</b> ---	RAIVEELAGLGAKVHTC <b>AR</b> NESE	53
Cluster	a	bc	
B At2g29370	---MAKRGESLRDKPKWSLEGMTALV <b>TGGSKGLG</b> ---	KAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DETQ	54
B CrTRL27	---MAKTEENMSNKSRSWSLGGMTALV <b>TGGTKGIG</b> ---	KAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DETL	54
B At2g29170	---MAKAEENLRDKCRWSLGGMTALV <b>TGGSKGLG</b> ---	EAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> NETQ	54
B CrTRL5	---MAKTEENLRDKTRWSLGGMTALV <b>TGGSKGLG</b> ---	EAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DKTQ	54
B At2g29150	---MAKAGENS RDKSRWSLEGMTALV <b>TGGSKGLG</b> ---	EAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DETQ	54
B At2g29360	---MAKTGESLRDKPRWSLVGMTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	EAVVEELATLGARIHTC <b>AR</b> DETQ	54
B CrTRL26	---MAKTGESLRNPRWSLRGMTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	EAIVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DETE	54
B CoTR	---MANLRESSRDKSRWSLEGMTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	EAVVEELAMLGARVHTC <b>AR</b> DETQ	54
B At2g29350	---MAKEGG-LGENSRWSLGGMTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	EAVVEELAMLGAKVHTC <b>AR</b> DETQ	53
B CrTRL24	---MAKIGERLGENSRWSLGGMTALV <b>TGGTQGIG</b> ---	KAIVEELAMLGARVHTC <b>SR</b> DETQ	54
B CrTRL6	---MAKTEQNMSGKSRWSLGGMTALV <b>TGGSKGIG</b> ---	EAVVEELSMMGARVHTC <b>AR</b> DETQ	54
B At2g29290	-----MDKRWSLQGMNALV <b>TGGTKGIG</b> ---	EAVVEELSILGARVHTC <b>AR</b> DETQ	45
B CrTRL17	-----MDKRWSLQGMALV <b>TGGTKGIG</b> ---	EAVVEELSMLGARVHTC <b>AR</b> DETQ	45
Cluster	a	bc	
C At2g29300	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGAASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGARIHVCDI <b>SE</b> TL	45
C At2g29320	-----MVTRKMDKRLWSLQGMALV <b>TGAASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGAKIHI <b>CDI</b> SKTL	51
C CrTRL20	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGGASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGARVYVCDI <b>SE</b> TL	45
C At2g29340	-----MDKR-WSLKGMALV <b>TGGASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGARIHVCDI <b>SE</b> AK	45
C CrTRL22	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGAASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGARIHVCDI <b>SE</b> AK	45
C CrTRL18	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGGTKGIG</b> VF	FRYTIIVEELASFGARIHVCDI <b>SE</b> TL	48
C CrTRL19	-----MDKR-WSLQSMALV <b>TGGASGIG</b> VF	FRYAIIVEELAGFGARIHVCDI <b>SE</b> AK	48
C At2g29310	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGAASGIG</b> ---	YAIVEELASFGAIIHI <b>CDI</b> SETL	45
C CrTRL23	-----MDNNRWSLQSMALV <b>TGGASGIG</b> ---	YAIVEELAGFGARVHVCDI <b>SE</b> TK	46
C At2g29330	-----MDKR-WSLQGLTALV <b>TGGASGIG</b> ---	HAIVEELAGFGAKIHVCDI <b>SK</b> TL	45
C CrTRL21	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGGASGIG</b> ---	HAIVEELASFGAKIHVCDI <b>SK</b> TL	45
C At2g30670	-----MDKR-WSLQGMALV <b>TGGASGIG</b> ---	HAIVEELAGLGARIYVCDI <b>SE</b> TL	45
C CrTRL14	-----MDSRWSLQGMALV <b>TGGAGGIG</b> ---	HAIVEELASFGAKIHVCDI <b>SE</b> TL	46
	*.* .*****.:*:*	:****: :** ::* ..	

**Abb. 44 Sequenzalignment der TR/TRL-Cosubstratbinderegion**

Erstellt mit Gonnet-Matrix in ClustalW2. \* Zeigt Positionen mit konservierten Aminosäuren an.

: Zeigt Konservierung zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften an (> 0,5).

. Zeigt Konservierung zwischen Gruppen mit weniger ähnlichen Eigenschaften an (≤ 0,5).

**fett:** TGxxxGxG-Motiv und Positionen a, b, c für Vorhersage der Cosubstratpräferenz der TRs/TRLs.

Ein ähnlicher Fall ist für eine bakterielle 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *Pseudomonas sp.* B-0813 (SDR325C) bekannt (Ueda et al., 2004). Das Enzym besitzt ein Aspartat an Position b für NAD(H)-Präferenz (cD1d) und ein Arginin an Position c für NADP(H)-Präferenz (cP2). Tatsächlich akzeptiert das Enzym beide Cosubstrate für die

Reduktion von Dehydrocholsäure und die Oxidation von Cholsäure mit ähnlicher Affinität und 17-fach (Oxidation) bzw. 23-fach (Reduktion) schnellerem Substratumsatz mit NAD(H) als Cosubstrat (Tab. 56). Die erwartete Präferenz stimmt mit der ausschließlichen Akzeptanz von NADP(H) durch die Enzyme At5g06060, At2g29350, At2g29150, -61NAAt2g29260Q220Y, At2g29360 und CrTRL26 *in vitro* überein (Tab. 56). Auch die Tropinonreduktasen aus *D. stramonium* katalysieren Oxidoreduktionen nur mit NADP(H) (Portsteffen et al., 1994).

**Tab. 56 Cosubstratakzeptanz der TRLs und weiterer SDRs**

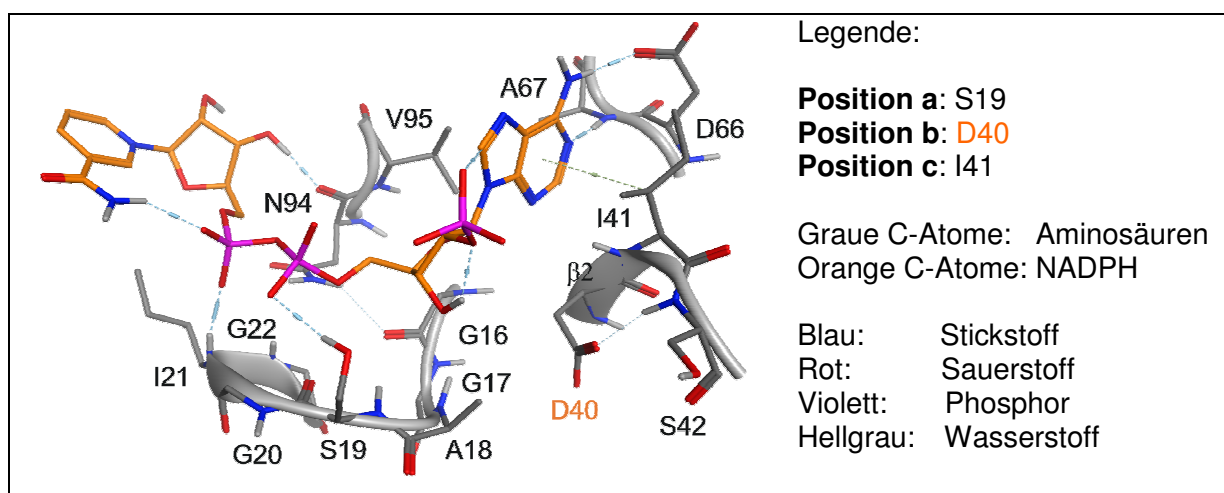
Enzym	NADPH	NADH	NADP	NAD	Referenz
<b>At5g06060</b>	3-Methylcyclohexanon		3-Methylcyclohexanol		
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	65,1	Keine	7,8	Keine	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	3,98	Aktivität	0,14	Aktivität	
<b>-61NAAt2g29260Q220Y</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	15,2	Keine	50,2	Keine	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	3,38	Aktivität	0,57	Aktivität	
<b>CoTR</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	78,3	666,5	27,9	963,5	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	1,01	11,76	0,16	0,45	
<b>At2g29360</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	41,7	Keine	44,4	Keine	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,25	Aktivität	0,29	Aktivität	
<b>CrTRL26</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	53,0	Keine	392,6*	Keine	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,16	Aktivität	0,43*	Aktivität	*Hill-Kinetik ( $K'$ statt $K_m$ )
<b>At2g29350</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	30,1	Keine	37,8	Keine	diese Arbeit, Abb. A2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	1,06	Aktivität	0,28	Aktivität	
<b>At2g29150</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	7,1	Keine	4,8	Keine	(Plohmann, 2010) (Red.)
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,35	Aktivität	0,02	Aktivität	diese Arbeit (Ox.)
<b>At2g29330</b>					
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	297,2	59,3	Keine	15,0	(Coppi, 2012)
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,71	0,34	Aktivität	0,03	
<b>SalR</b>	Salutaridin		Salutaridinol		<i>Papaver bracteatum</i>
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	3,5	1190	7,0	n. g.	abc = <b>KCR</b> ; cP3
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	2,1	3,7	21,9	n. g.	(Geissler et al., 2007)
<b>MLCR</b>	Pyridin-3-aldehyd		Cyclohex-2-en-1-ol		<i>Mus musculus</i>
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	1,1	65	3	1800	abc = <b>KTR</b> ; cP3
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	1,2	1,8	2,4	1,9	(Nakanishi et al., 1997)
<b>MLCR-T38D</b>	Pyridin-3-aldehyd		Cyclohex-2-en-1-ol		<i>Mus musculus</i>
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	220	9,7	2900	110	abc = <b>KDR</b> cD1d/cP3
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	2,3	3,3	1,7	3,6	(Nakanishi et al., 1997)
<b>3<math>\alpha</math>-HSD</b>	Dehydrocholsäure		Cholsäure		<i>Pseudomonas</i> B-0831
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	85	17	72	31	abc = <b>SDR</b> ; cD1d/cP2
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	3,3	78	4,5	75	(Ueda et al., 2004)

SalR: SDR114C; MLCR, Carbonylreduktase aus Mäuselunge: SDR20C, MLCR-T38D: Mutante T38D; 3 $\alpha$ -HSD: SDR325C; n. g. nicht gemessen.

Trotz der klaren Zuordnung der Sequenzen von CoTR (cP3) und At2g29330 (cD1d) zu gegensätzlichen Cosubstrat-Unterfamilien akzeptierten diese zwei Enzyme beide Cosubstrate für die Katalyse. Die Affinität ( $K_m$ ) zum zugeordneten Cosubstrat war jedoch in beiden Fällen deutlich höher, als zum jeweils anderen Cosubstrat (Tab. 56). CoTR bindet NAD(H) in reaktionsfähiger Position trotz der zwei vorhandenen basischen Aminosäuren. Das Cosubstrat wird dabei nicht wie NADP(H) durch ionische Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen am Adenosin-Ribose-Ring gebunden, woraus die wesentlich geringere Affinität von CoTR zu NAD(H) im Vergleich zu NADP(H) resultiert.

Der Substratumsatz hingegen war mit NADH bei der Reduktion von 3-Methylcyclohexanon etwa 12-mal schneller als mit dem stärker gebundenen NADPH. Dieses Ergebnis lässt sich erklären, wenn Cosubstratbindung oder -freisetzung den langsamsten, also geschwindigkeitsbestimmenden, Schritt im Katalysemechanismus darstellen. Eine solche Beschränkung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Freisetzung des verbrauchten Cosubstrats im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Konformationsänderung wurde für zwei NADP(H)-abhängige Aldosereduktasen (AKR, EC 1.1.1.21) mit Stopped-Flow Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen (Grimshaw et al., 1995; Kubiseski et al., 1992). Auch bei der Reduktion sekundärer Alkohole durch die Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila lebanonensis* (DADH, SDR109I, EC 1.1.1.1) wurde auf Grund sehr ähnlicher Umsatzraten für verschiedene Substrate die Dissoziation des Cosubstrats NAD(H) vom Enzym als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen (Winberg et al., 1986). Bekannte Beispiele für die Akzeptanz beider Cosubstrate trotz Zugehörigkeit zur Unterfamilie cP3 sind die Salutaridinreduktase aus *Papaver bracteatum* (SalR) und eine Carbonylreduktase aus der Mäuselunge (MLCR) (Tab. 56). Die SalR weist eine sehr geringe Affinität zu NADH, dabei aber verdoppelte Umsatzraten im Vergleich zu NADPH, auf. Die Umsatzraten mit NADP(H) und NAD(H) sind für die MLCR annähernd gleich. Die Affinität zu NADP(H) ist aber auch hier deutlich höher als zu NAD(H) und bestätigt die erwartete Präferenz. Durch Mutation des Threonin 38 in Aspartat (T38D) an Position b wurde diese Präferenz umgekehrt. Die Mutante MLCR-T38D zeigte deutlich höhere Affinitäten zu NAD(H) und stark verminderte Affinitäten zu NADP(H). Als mögliche Ursache wurde eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem negativ geladenen Aspartat und der 2'-Phosphat-Gruppe des NADP(H) vermutet (Nakanishi et al., 1997).

At2g29330 gehört durch das Aspartat an Position b zur Unterfamilie cD1d und akzeptiert trotzdem beide Cosubstrate mit Präferenz für NAD(H) (Tab. 56). Das von Juliane Fischer mit YASARA (Krieger et al., 2002) erstellte Proteinmodell erlaubt die Bindung von NADPH. Das Modell zeigt, dass die Abstoßung zwischen der 2'-Phosphat-Gruppe des NADPH und dem negativ geladenen Aspartat durch eine Drehung des Aspartats und eine gleichzeitige Lösungsmittlexposition der Phosphat-Gruppe verhindert werden kann (Abb. 45).



**Abb. 45 Homologiemodell von At2g29330 mit NADPH**

Abbildung erstellt von Juliane Fischer mit MOE (Molecular Operating Environment, 2011.10; Chemical Computing Group Inc., 2011).

#### 4.4 Substratvielfalt und –akzeptanz der TRL Enzyme

Ausgehend von den bekannten Substraten der Tropinonreduktasen, Tropinon und Nortropinon, und unterstützt durch Docking-Experimente mit Homologiemodellen wurden unterschiedlichste chemische Strukturen als Substrate für die TRLs getestet. Alle Testsubstrate wiesen eine reduzierbare Carbonylfunktion (Keton oder Aldehyd) und/oder eine oxidierbare Alkoholfunktion auf. Im Folgenden sind die Ergebnisse aller untersuchten Enzyme mit allen getesteten Substraten aufsteigend nach Molekulargewicht und struktureller Komplexizität zusammengefasst. Aus Platzgründen wurden die Enzyme durchnummeriert (siehe Tab. 57). In Tabelle 58 sind die Ergebnisse der Substratakzeptanzuntersuchung mit den kinetischen Daten ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ), soweit vorhanden, aufgelistet. Das Protein -61NAt2g29260 (Nr. 2A) zeigte keine Aktivität mit den getesteten Substraten und fehlt daher in Tabelle 58.

**Tab. 57 Nummerierung der untersuchten TRLs und CoTR**

Nr.	Altes Cluster A	Nr.	Modernes Cluster B	Nr.	Modernes Cluster C
<b>1A</b>	At5g06060	<b>4B</b>	CoTR	<b>9C</b>	At2g29330
<b>2A</b>	-61NAt2g29260	<b>5B</b>	At2g29360		
<b>3A</b>	-61NAt2g29260Q220Y	<b>6B</b>	CrTRL26		
		<b>7B</b>	At2g29350		
		<b>8B</b>	At2g29150		

Indices zu Tab. 58:

<sup>a</sup>(Brock et al., 2008), <sup>b</sup>(Wagner, 2011), <sup>c</sup>(Coppi, 2012)

H, Hill-Kinetik; Inh., ausgeprägte Substrat- oder Produktinhibition ( $K_m > K_i$ )

n. g., nicht gemessen

+ Produktnachweis positiv, aber keine kinetische Charakterisierung möglich.

– Produktnachweis negativ, keine Aktivität.



Tab. 58 TRL-Substratspektrum im Vergleich mit CoTR

Ligand	Reaktion	1A	3A	4B	5B	6B	7B	8B	9C
Obere Zeile: $K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]; untere Zeile: $k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]									
<b>Tropinon und Analoga</b>									
Tropinon	Red.	-	-	3290 <sup>a</sup> 0,02	-	-	-	-	-
Tropin	Ox.	-	-	+	-	-	-	-	-
Pseudotropin	Ox.	-	-	+	-	-	-	-	-
Nortropinon	Red.	-	-	2002 <sup>a</sup> 0,02	-	-	-	-	-
Thiabicyclooctanon	Red.	-	-	42 <sup>a</sup> 0,05	-	-	-	-	-
Chinuclidin-3-on	Red.	+	+	2636 <sup>a</sup> 0,08	+	-	-	-	+
N-Methylpiperidin-4-on	Red.	-	-	7583 <sup>a</sup> 0,91	-	-	-	-	+
N-Propylpiperidin-4-on	Red.	-	-	1342 <sup>a</sup> 0,68	+	-	-	-	+
<b>Aliphatische Carbonyle</b>									
Pentanal	Red.	-	-	Inh.	+	-	612 0,64	+	65 0,09
2,4-Dimethylpentan-3-on	Red.	+	+	77 0,57	+	+	+	+	390 0,02
Citronellal	Red.	+	-	Inh.	86 0,24	+	264 0,47	75 0,56	109 0,13
Citral	Red.	-	-	+	-	-	+	+	+
Nerol	Ox.	-	-	26 0,06	-	-	98 0,08	67 0,01	464 0,02
<b>Aromatische Carbonyle</b>									
Benzaldehyd	Red.	-	-	Inh.	-	-	Inh.	-	-
p-Anisaldehyd	Red.	-	-	-	-	-	145 1,33	-	-
Indol-3-carbaldehyd	Red.	-	-	+	-	-	2008 0,05	+	-
Indol-3-carbinol	Ox.	-	-	211 0,01	-	-	254 0,01	-	-
Indol-3-ethanol	Ox.	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Monoterpene und Analoga</b>									
3-Methylcyclohexanon	Red.	8303 4,96	15114 7,12	24 2,34	215 <sup>b</sup> 0,65	787 <sup>b</sup> 0,44	505 1,61	560 0,34	57 <sup>c</sup> 0,20
3-Methylcyclohexanol	Ox.	+	+	57 0,17	2465 0,26	2523 0,11H	373 0,16	315 0,02	62 <sup>c</sup> 0,03
4-Methylcyclohexanon	Red.	+	+	5 3,54	73 0,86	536 0,28	463 0,78	106 0,08	71 <sup>c</sup> 0,20
4-Methylcyclohexanol	Ox.	+	+	29 0,17	528 0,20	1835 0,08H	329 0,03	379 0,01	63 <sup>c</sup> 0,03
2-Decalon	Red.	+	+	+	+	+	+	+	+
(-)-Menthon	Red.	+	+	282 0,31	+	+	118 0,83	452 0,19	+
(+)-Neomenthol	Ox.	-	+	20 0,02	+	+	+	113 0,02	+
(-)-Menthol	Ox.	-	-	+	-	-	50 0,04	-	-
(-)- $\alpha$ -Thujon	Red.	-	-	65 0,46	+	+	1336 0,11	892 0,25	-
(-)-Carvon	Red.	+	+	62 0,12	+	-	76 0,17	1827 0,47	-



#### 4.4.1 TRL Enzyme sind keine Tropinonreduktasen

TRL Proteine wurden auf Grund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit ( $\geq 50\%$ ) und ihren Übereinstimmungen in wichtigen Sequenzmotiven gemeinsam mit den Tropinonreduktasen in die SDR-Familie SDR65C eingeordnet (Persson et al., 2009). Ein Docking von Tropinon in TRL Homologiemodelle (At2g29150, At2g29350, At2g29330) zeigte die Positionierung des Ketons im akzeptablen Abstand zum C4-Hydrid von NAD(P)H (Reinhardt et al., 2014). Die *in vitro* Aktivitätsuntersuchung der TRLs aus den (nor-)tropanalkaloidfreien Arten *A. thaliana* und *C. rubella* sollte die Funktion bestätigen. Jedoch katalysierte keines der untersuchten TRL Enzyme die Reduktion von Tropinon bei pH 6,4 oder die Oxidation von Tropin oder Pseudotropin bei pH 9,0 (Tab. 58). Die Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis* CoTR hingegen katalysierte diese Reaktionen unter den gleichen Bedingungen aber mit geringer Substrataffinität und Umsatzrate im Vergleich zu rekombinanten Tropinonreduktasen aus Solanaceen (Tab. 59).

**Tab. 59 Reduktion von Tropinon durch rekombinante Solanaceen TRs**

Enzym	Pflanze	pH	Tropinonreduktion		Referenz
			$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	
DsTRI	<i>Datura stramonium</i>	7,0	117	25,60	(Nakajima et al., 1999)
DsTRII	<i>Datura stramonium</i>	7,0	48	2,73	(Nakajima et al., 1999)
SdTRII	<i>Solanum dulcamara</i>	6,4	25	14,38	(Freydank et al., 2008)
StTRII	<i>Solanum tuberosum</i>	6,4	33	1,30	(Keiner et al., 2002)

Stickstoffhaltige Tropinonanaloga wie Chinuclidin-3-on und *N*-Alkyl-Piperidin-4-one wurden nur von einzelnen TRLs mit nicht quantifizierbarem Umsatz reduziert (Tab. 58, Abb. 22). Sie stellen nicht die bevorzugten Substrate der TRLs dar.

Kürzlich wurden in *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) zwei weitere TR/TRL Proteine, DnTR1 (Chen et al., 2013) und DnTR2 (Cheng et al., 2013) mit 58 % Aminosäuresequenzidentität zueinander, gefunden. Beide Enzyme wiesen eine hohe Ähnlichkeit von 57 % (DnTR1) und 58 % (DnTR2) zu CoTR auf. DnTR1 katalysierte *in vitro* stereospezifisch die Reduktion von Tropinon zu Tropin während DnTR2 Tropinon nicht als Substrat akzeptierte (Chen et al., 2013; Cheng et al., 2013).

Ein Vergleich der Substratbinderegionen von DsTRI, DsTRII, CoTR und DnTR1 mit denen der TRLs (einschließlich DnTR2) kann zur Klärung der Unterschiede beim *in vitro* Substratumsatz beitragen (Abb. 46). Die verantwortlichen Aminosäuren für die unterschiedliche Stereospezifität der Tropinonreduktasen aus *Datura stramonium* wurden mit Mutageneseexperimenten identifiziert (Nakajima et al., 1999). In DsTRII bindet ein negativ geladenes Glutamat (E156) den protonierten Tropinon-Stickstoff und führt so zur Ausrichtung des Substrats für die Reduktion zu Pseudotropin. Der Austausch des Glutamats in Valin in DsTRII (E156V) und umgekehrt in DsTRI (V168E) führte jeweils zum Verlust der absoluten Stereospezifität der Enzyme (Abb. 46, blau). Durch weitere zusätzliche

Aminosäureaustausche (für DsTRII: S148A, Y100H, L210I, L213F, analog für DsTRI) wurde der Effekt kumulativ verstärkt und die Stereospezifität bis zu maximal 90 % umgekehrt. CoTR, DnTR1 und die TRLs (einschließlich DnTR2) zeigen bereits im Aminosäuresequenzalignment einen gravierenden Unterschied zu den Tropinonreduktasen aus Solanaceen. Sie weisen eine Lücke auf, die zu einer räumlichen Einschränkung im aktiven Zentrum führt (Abb. 46). Trotzdem sind CoTR und DnTR1 im Gegensatz zu den TRLs funktionale Tropinonreduktasen (Brock et al., 2008; Chen et al., 2013). In einem von Andrea Brock erstellten CoTR-Homologiemodell (Brock et al., 2008) liegt das Tropinon im aktiven Zentrum in der Nähe eines Tyrosins (Y209, Position 2, Abb. 46). Die Rotation des flexiblen Hydroxybenzenrings und anschließendes Docking von Tropinon in das aktive Zentrum resultierten in zwei unterschiedlichen Konformationen des Tyrosins, die die entgegengesetzte Orientierung des Tropinons und damit die Bildung beider Alkoholprodukte erklären könnten. Die Mutante CoTR-Y209S zeigte keine Tropinonreduktaseaktivität (Brock et al., 2008). Auch die tropinonreduzierende DnTR1 aus *Dendrobium nobile* besitzt dieses Tyrosin (Y214), während DnTR2 an gleicher Position ein Leucin (L210) trägt und die Tropinonreduktion nicht katalysiert (Position 2, Abb. 46).

DsTRI	TEKDYNIIMGT <b>N</b> FEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFLS <b>S</b> IAGFSALPS <b>V</b> SLY <b>S</b> AS <b>K</b> GAI 178
DsTRII	TVEDYSLIMSI <b>N</b> FEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFIS <b>S</b> VSGALAVPY <b>E</b> AV <b>Y</b> GAT <b>K</b> GAM 166
DnTR1	TAEDYSFMMST <b>N</b> LESFAHLSQLAHPLLKASGEGSIVFIS <b>S</b> IAGLLGYPDIAI <b>Y</b> SAT <b>K</b> GAL 180
DnTR2	SEEDYSFIMKT <b>N</b> FDAAFHICQLAHPLLKASGNGSIVFIS <b>S</b> VAGVVAISSGVI <b>Y</b> AAT <b>K</b> AAM 176
At5g06060	SSEEYAKIMST <b>N</b> LESFAHLSQIAHPLLKASGVGSIVFIS <b>S</b> VAGLVHLSGSI <b>Y</b> GAT <b>K</b> GAL 168
-61Nat2g29260	TAGEFSTLMST <b>N</b> FESVFHLCQLAYPLLRESKAGSVVVFIS <b>S</b> VSGFVSLKNMVS <b>Q</b> SST <b>K</b> GAI 167
CoTR	TSEDFSFLMAT <b>N</b> LESSFHLSQLAHPLLKSSGLGSIVLVIS <b>S</b> VASVVHVNVGSI <b>Y</b> GAT <b>K</b> GAM 175
CrTRL26	TSEDFSFTMAT <b>N</b> LESFAHLSQLAHPLLKASGSGNIVLVIS <b>S</b> VSGVVHVVTGAS <b>Y</b> GAS <b>K</b> GAL 175
At2g29350	TAEDFSFVMAT <b>N</b> LESFAHLSQLAHPLLKASGSGSIVLVIS <b>S</b> AAGVVHVNVGSI <b>Y</b> GAT <b>K</b> GAM 174
At2g29360	TAEDFSFTMAT <b>N</b> LESFAHLSQLAHPLLKASGSGSIVLVIS <b>S</b> VSGVVHVNGASI <b>Y</b> GV <b>S</b> <b>K</b> GAM 175
At2g29150	TAEDYSFLMAT <b>N</b> LESFAHLSQIAHPLLKASGSGSIVFMS <b>S</b> VAGLVHTGA-SI <b>Y</b> GAS <b>K</b> GAM 174
At2g29330	EAEDYSFLIST <b>N</b> LESAYHLSQLSHPLLKASGNGIITFIS <b>S</b> AAGIVSFDAASI <b>Y</b> GLT <b>K</b> GAL 166
	: : * : : * : : : : : : * * : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : *
DsTRI	NQMTKSLACEWAKDNIRVNSVAP <b>G</b> VILTPLVETA <b>I</b> IKKNPHQKEEIDNFIVKTPMGRAGKP 238
DsTRII	DQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVGP <b>G</b> VIATSLVEMTI <b>Q</b> -DPEQKENLNKIDRCALRRMGEP 225
DnTR1	NQLTKNFASEWKGKDGIRTNVAVP <b>G</b> VTRTPLSIPYLE----DEEVARKMA- <b>T</b> LPLGRIGEP 235
DnTR2	NQITKNLACEWAKDNIRINSVSPW <b>Y</b> IKTSLVNHLLE----KENFLNSVVS <b>R</b> TPLNRVGEA 232
At5g06060	NQLTRNLACEWASDNIRTNCVAPW <b>Y</b> IKTSLVETLLE----KKEFVEAVVS <b>R</b> TPLGRVGEA 224
-61Nat2g29260	NQLTRSLACEWAKDNIRINAVAPW <b>Y</b> IKTSMVEQVLS----NKEYLEEVYS <b>V</b> TPLGRLGEP 223
CoTR	NQLARNLACEWASDSIKVNSVCP <b>G</b> FISTPLASNYFR----NEEFKKEVENT <b>I</b> PTGRVGEA 231
CrTRL26	NQLGRNLACEWASDNIRVNSVCPW <b>F</b> IATPFVNEVLS----DKEFRNEVES <b>R</b> PPMGRVGEA 231
At2g29350	NQLARNLACEWASDNIRTNVCPW <b>Y</b> ITTPLSNDFE----DEEFKKEAVR <b>T</b> TPMGRVGEA 229
At2g29360	NQLGRNLACEWASDNIRTNSVCPW <b>F</b> IETPLVTE <b>S</b> LS----NEEFRKEVES <b>R</b> PPMGRVGEV 231
At2g29150	NQLGRSLACEWASDNIRVNSVCPW <b>V</b> ITTPLT <b>S</b> FIF <b>S</b> ----DEKLRKAVED <b>K</b> TPMGRVGEA 230
At2g29330	NQLARNLACEWAKGIRANAVAP <b>N</b> EIT <b>T</b> ALAK <b>P</b> LE----DAGFNEIL <b>S</b> SE <b>T</b> PLGRAGEP 222
	: * : : * * * . * . * : * * * * * : : : : : . * * :

**Abb. 46 Sequenzalignment der TR/TRL-Substratbinderegion**

**rot:** katalytische Tetrade **blau:** DsTRI V168, DsTRII E156  
**Position 1a:** konserviertes **Glycin** in funktionalen TRs **Position 1b:** meist aromatische AS in TRL  
**Position 2:** Y209 in CoTR (Brock et al., 2008) **Position 3:** TRL-spezifisch, meist Arginin  
 Erstellt mit Gonnet-Matrix in ClustalW2. \* Zeigt Positionen mit konservierten Aminosäuren an.  
 : Zeigt Konservierung zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften an (> 0,5).  
 . Zeigt Konservierung zwischen Gruppen mit weniger ähnlichen Eigenschaften an (≤ 0,5).

Durch den alleinigen Austausch von Tyrosin in Valin an Position 1b (grau, Abb. 46) gelang es aus der TRL DnTR2 die Mutante DnTR2-Y201V, mit quantifizierbarer Tropinonreduktaseaktivität aber geringer Substrataffinität ( $K_m = 57,75 \text{ mM}$ ), zu erzeugen (Cheng et al., 2013). Eine weitere systematischer Unterschied zwischen funktionalen Tropinonreduktasen und TRLs ergibt sich an Position 1a (gelb, Abb. 46). In allen Sequenzen funktionaler Tropinonreduktasen befindet sich dort die kleinste Aminosäure Glycin (DnTR1, CoTR, TRI und TRII), während die TRLs entweder ein raumgreifendes Tryptophan (altes Cluster A und modernes Cluster B, Abb. 7, sowie DnTR2) oder ein Asparagin (modernes Cluster C, Ausnahme: Serin in CrTRL22) aufweisen. Die genannten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen funktionalen TRs und TRLs bieten interessante Ansatzpunkte für Mutageneseexperimente.

#### 4.4.2 Reduktion kleiner lipophiler Carbonyle

Die untersuchten TRLs akzeptierten Tropinon und dessen Analoga nicht oder nur schlecht als Substrate. Dies war der Ausgangspunkt für die Suche nach anderen möglichen Substraten für die TRLs.

Kleine lipophile Carbonyle passen gut in die aktiven Zentren der TRLs, die vorwiegend mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet sind. Darüber hinaus sind sie auch von biologischer Relevanz. Aus Gewächshauskulturen von *A. thaliana* wurden aliphatische Aldehyde von Octanal bis Tetradecanal (C8-C14) sowie das Keton 6-Methyl-5-hepten-2-on isoliert (Rohloff and Bones, 2005). Als typische Autolyseprodukte wurden auch Cyclocitral und Geranylaceton nach Verletzung des pflanzlichen Gewebes gefunden. Die aromatischen Verbindungen Benzaldehyd und Phenylacetaldehyd wurden von Blüten von *A. thaliana* (auch Alkohole und 2,6-Dimethylbenzaldehyd, (Rohloff and Bones, 2005)) und *A. lyrata* (Peer and Murphy, 2003) emittiert. Auch *p*-Anisaldehyd wurde in verschiedenen Arten der Gattungen *Brassica* und *Sinapis* gefunden (Tollsten and Bergström, 1988).

Weiterhin ist bekannt, dass nach Verletzung oder abiotischem und biotischem Stress Pflanzen flüchtige Substanzen aus den grünen Blättern (Green leaf volatiles) freisetzen. Das sind C6-Alkohole, Aldehyde und deren Ester, die aus dem oxidativen Abbau von Linolensäure oder Linolsäure entstehen (Matsui, 2006). Reaktive gesättigte oder  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyle müssen in der Pflanze schnellstmöglich zu Alkoholen reduziert werden, da sonst toxische Wirkungen durch Interaktionen mit Proteinen auftreten können (Yamauchi et al., 2011). Ungesättigte Kohlenstoffbindungen können Michael-Addukte mit Thiol- und Aminogruppen eingehen. Aldehyde können Imine (Schiffsche Basen) oder Enamine mit primären bzw. sekundären Aminogruppen bilden. Einige der für den Abbau reaktiver Carbonyle verantwortlichen zytosolischen und chloroplastidären Reduktasen (AKR, SDR) wurden bereits entdeckt (Yamauchi et al., 2011). In diesem Zusammenhang rückte auch At2g29350 als mögliche beteiligte Carbonylreduktase in den Fokus. Unter den von

Yamauchi und Mitarbeitern verwendeten Reinigungs- und Reaktionsbedingungen zeigte das Protein keine Aktivität gegenüber Substraten wie Propionaldehyd, Butyraldehyd, Butan-2-on und  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyden. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, dass Pentanal und längere aliphatische Aldehyde ohne  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung von At2g29350 *in vitro* reduziert wurden (3.3.4). Die meisten der untersuchten TRLs katalysierten die Reduktion aliphatischer Aldehyde und Ketone, jedoch war die Reaktion nur in einigen Fällen quantifizierbar (Tab. 58). Vor allem CoTR, At2g29350 sowie At2g29330 katalysierten die Reaktionen mit unterschiedlicher Substrataffinität und eher geringer Umsatzrate. Die aromatischen Aldehyde Benzaldehyd, *p*-Anisaldehyd und Indol-3-carbaldehyd wurden nur von At2g29350 und zum Teil von CoTR quantifizierbar reduziert (79 % Aminosäuresequenzidentität zwischen beiden Enzymen). Vor allem im Zusammenhang mit den Aldehyd-Substraten traten häufig Reaktionshemmungen auf, die eine Auswertung der Daten mit der Gleichung für unkompetitive Substrathemmung erforderten. CoTR wurde durch Pentanal, Citronellal und Benzaldehyd in mikromolaren Konzentrationen massiv gehemmt. Benzaldehyd inhibierte auch At2g29350 stark. At2g29330 wurde von Pentanal in ähnlichen Konzentrationsbereichen ebenfalls gehemmt. Eine mögliche Erklärung ist die Bildung eines unproduktiven Enzym-Substrat- oder Enzym-Produkt-Komplexes, der unter SDR Enzymen mit bekanntem bi-bi-Reaktionsmechanismus weit verbreitet ist (Tab. 60).

**Tab. 60 Substratinhibition bei SDR Enzymen**

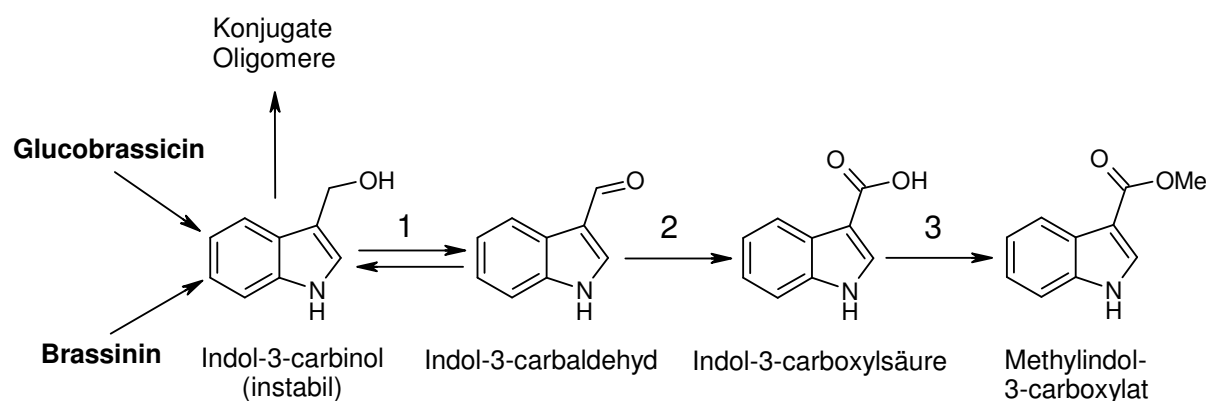
Enzym	EC-/SDR-Nummer	Reaktion	Substrat/ Inhibitor	Inhibitions- mechanismus	Referenz
<i>Vitis vinifera</i> DFR	1.1.1.219 SDR108E	geordnet bi-bi	Dihydro- quercetin	unprod. Komplex E•S oder E•NADP <sup>+</sup> •S	(Trabelsi et al., 2011)
<i>Papaver bracteatum</i> SalR	1.1.1.248 SDR114C	geordnet bi-bi	Salutaridin	unproduktive Substratbindung; E•NADP <sup>+</sup> •S- Komplex	(Higashi et al., 2011; Ziegler et al., 2009)
<i>Homo sapiens</i> 17 $\beta$ HSD1	1.1.1.62 SDR28C	nicht bekannt	Estron	unprod. Komplex E•NADP <sup>+</sup> •S (NADPH-abhängig)	(Gangloff et al., 2001)
<i>Leishmania major</i> PTR1*	1.5.1.33 SDR	geordnet bi-bi	Dihydropteridin, Dihydrofolat	unprod. Komplex E•S; allosterische Interaktion	(Luba et al., 1998; Nare et al., 1997)
<i>Drosophila lebanonensis</i> ADH	1.1.1.1 SDR109I	geordnet bi-bi	Aceton, Pentan-3-on, Cyclohexanon	Bindung eines NAD <sup>+</sup> -Keton Addukts im aktiven Zentrum	(Benach et al., 1999)

E, Enzym; S, Substrat der Reduktion; unprod., unproduktiv; \*Aminosäuresequenz unbekannt.

Denkbar wäre auch eine chemische Interaktion zwischen Aldehyd und primären oder sekundären Aminen des Proteins, wobei CoTR anfälliger zu sein scheint als die anderen

Enzyme. Der Nachweis einer chemischen Modifikation von CoTR durch Pentanal mit Proteinmassenspektrometrie verlief jedoch negativ (Dr. C. Ihling, AG Prof. Sinz, MLU Halle, persönliche Kommunikation). Ob eine *in vitro* beobachtete Enzymhemmung von biologischer Relevanz ist, lässt sich nicht belegen, da sie meist erst bei unphysiologisch hohen Substratkonzentrationen auftritt.

Indol-3-carbinol und Indol-3-carbaldehyd entstehen neben anderen Produkten beim Insektenfraß-induzierten Abbau von Indol-3-ylmethylglucosinolat (Glucobrassicin) (Kim et al., 2008) (Abb. 47). Die Hydrolyse von Glucobrassicin, dem Hauptindolglucosinolat in *Arabidopsis* und *Brassica*, wird entweder durch das Enzym Myrosinase oder durch Säure (pH 2) katalysiert (Tiedink et al., 1991). Der Alkohol Indol-3-carbinol ist instabil und reagiert in Pflanzenextrakten und als gelöste Reinsubstanz zum Diindolymethan und höheren Oligomeren (Buskov et al., 2000). Die ersten nachweisbaren Abbauprodukte tetradeuterierten Glucobrassicins in Wurzeln von Rübsen (*Brassica rapa*) waren Indol-3-carbaldehyd und Methylindol-3-carboxylat (Pedras et al., 2002). Diese Produkte wurden ebenfalls nach Inkubation von Stängeln des Braunen Senf (*Brassica juncea*) mit dem strukturell verwandten Phytoalexin Brassinin detektiert (Pedras et al., 2002) (Abb. 47).



**Abb. 47 Hypothetischer Verlauf der Biosynthese von Methylindol-3-carboxylat**

1 Oxidation: Katalysiert durch Oxidoreduktasen? Funktion für TRLs?

2 Oxidation: Katalysiert durch Aldehyddehydrogenasen?

3 Methylierung: Katalysiert durch Methyltransferasen?

Alternativ wäre die primäre Entstehung des Aldehyds und die enzymatische Reduktion zum Alkohol denkbar. Das hypothetische Reaktionsschema entstand in Anlehnung an Pedras et al., 2002 und Kim et al., 2008.

Auch ohne Beteiligung pflanzlicher Myrosinase waren die Abbauprodukte des Glucobrassicins nach Fraß an Blättern von *A. thaliana* im Honigtau der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) nachweisbar (Kim et al., 2008). Neben Konjugaten von Indol-3-carbinol mit Aminosäuren (Prolin, Leucin, Isoleucin, Cystein), Glutathion und Ascorbat wurden auch Indol-3-ethanol und Indol-3-carbaldehyd im Honigtau gefunden. Eine künstliche Diät mit Indol-3-carbinol führte in Blattläusen zur Beobachtung, dass verschiedene Indol-3-methylkonjugate das Fressverhalten der Schädlinge minderten. Indol-3-carbinol und

Konjugate mit Cystein reduzierten während der Diät auch die Reproduktionsraten der Blattläuse.

Die enzymatisch katalysierte Oxidoreduktion von Indol-3-carbinol und Indol-3-carbaldehyd wurde bisher noch nicht beschrieben (Abb. 47). CoTR und At2g29350 katalysierten diese Reaktion *in vitro* in beide Richtungen allerdings mit vergleichsweise geringen Affinitäten und Umsatzraten. Eine Bedeutung für die *in vivo* Synthese der Verbindungen im Rahmen des Indolglucosinolatabbaus ist angesichts der erhaltenen Daten fragwürdig.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich *in vitro* unter den kleinen lipophilen Carbonylverbindungen Substrate für die TRLs, mit biologischer Bedeutung für Pflanzen und speziell für Brassicaceen, finden lassen. Die untersuchten Enzyme weisen dabei Unterschiede in Substratakzeptanz, -affinität und -umsatz auf.

#### 4.4.3 Stereospezifische Reduktion zyklischer Terpene und Analoga

Die enzymatisch katalysierte Reduktion der Methylcyclohexanone ist eine Eigenschaft der TRLs, die sie mit den funktionalen Tropinonreduktasen aus Solanaceen und *Cochlearia officinalis* teilen. Die TRLs des alten Clusters A unterscheiden sich in ihrer Substrataffinität gegenüber diesen Verbindungen stark von denen der modernen Cluster B und C (Abb. 7, Tab. 58). Substratsättigungsbedingungen wurden für At5g06060 und -61NAt2g29260Q220Y auch in unphysiologisch hohen Konzentrationsbereichen kaum oder gar nicht erreicht (Abb. A4 im Anhang). Die Berechnung der Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  war mit den erhaltenen Daten nicht möglich. Alle anderen untersuchten TRLs akzeptierten die Cyclohexanone sowie deren Alkohole mit guten Affinitäten ( $K_m < 1$  mM) und unterschiedlichen Wechselzahlen ( $k_{cat}$ ). Die bekannten TRII zeigten gegenüber diesen zyklischen Ketonen generell geringe Affinitäten mit  $K_m$ -Werten zwischen 2-8 mM (Freydank et al., 2008; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994), während die TRI mit  $K_m$ -Werten von 10-30  $\mu$ M höhere Affinitäten aufwiesen (Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994). Cyclohexanon ist als Grundstruktur zahlreicher natürlich vorkommender Terpenketone anzutreffen.

Bei der Analyse des Spektrums flüchtiger Verbindungen in kultivierten *Arabidopsis thaliana* (Columbia Wildtyp) Pflanzen und Pflanzenteilen wurden 24 Monoterpene und 26 Sesquiterpene detektiert (Rohloff and Bones, 2005). Mit Ausnahme von Verbenon, das sowohl in *A. thaliana* (Rohloff and Bones, 2005) als auch in *Brassica nigra* (Tollsten and Bergström, 1988) gefunden wurde, trugen diese Terpene weder eine reduzierbare Keto- oder Aldehydfunktion noch eine oxidierbare Alkoholfunktion. Von Verbenon existieren zwei Enantiomere ((1*R*)-(+)) und (1*S*)-(-)), von denen (1*S*)-(-)-Verbenon verfügbar war und als Substrat getestet wurde. CoTR und die TRLs katalysierten dessen Reduktion jedoch nicht. Die in *A. thaliana* enthaltenen Alkohole Linalool, *p*-Cymen-8-ol und  $\alpha$ -Terpineol kamen auf Grund ihrer tertiären Alkoholfunktion nicht für eine Hydridübertragung vom Carbonyl-Kohlenstoff auf das Cosubstrat NAD(P) während der Oxidation in Frage.



Aus der Vielfalt der natürlich vorkommenden Terpenketone wurden Verbindungen mit reduzierbarer Keto- oder oxidierbarer Alkoholfunktion ausgewählt und getestet (3.3.5). Mit Ausnahme von Verbenon kommen die ausgewählten Mono- und Sesquiterpene nicht in Brassicaceen vor. Trotzdem wurden sie von Vertretern der TRLs als Substrate akzeptiert und zum Teil sogar stereospezifisch reduziert (Tab. 61). CoTR und die TRLs At2g29350 und At2g29150 katalysierten die Reduktion der Monoterpene (-)-Menthon, (-)- $\alpha$ -Thujon und (-)-Carvon mit quantifizierbarem Umsatz. Dabei katalysierte At2g29150 (Nr. 8B) diese Reaktionen stets stereospezifisch und At2g29350 (Nr. 7B) nicht (Tab. 61). Die Oxidation der Menthole verlief enantioselektiv. At2g29350 katalysierte die Oxidation von (-)-Menthol, während CoTR und At2g29150 (+)-Neomenthol präferierten.

**Tab. 61 Stereospezifität der Monoterpenreduktion für CoTR und TRLs**

Substrat	Produkte	Enzyme (Nummerierung siehe Tab. 57)							
		1A	3A	4B	5B	6B	7B	8B	9C
(-)-Menthon	1. (+)-Neomenthol	100	100	40	100	100	10	100	100
	2. (-)-Menthol	0	0	60	0	0	90	0	0
(-)- $\alpha$ -Thujon	1. (-)-Neothujol	-	-	0	0	0	20	0	-
	2. (-)-Thujol	-	-	100	100	100	80	100	-
(-)-Carvon	1. (-)- <i>trans</i> -Carveol	100	100	100	100	-	80	100	-
	2. (-)- <i>cis</i> -Carveol	0	0	0	0	-	20	0	-
(-)-Fenchon	1. (+)- $\alpha$ -Fenchol	-	-	40	100	80	35	95	-
	2. (+)- $\beta$ -Fenchol	-	-	60	0	20	65	5	-
(+) - Campher	1. (-)-Isoborneol	-	-	0	-	-	-	-	-
	2. (+)-Borneol	-	-	100	-	-	-	-	-

Die Zahlen geben das Produktflächenverhältnis [%] der GC-MS-Produktanalyse wieder.  
- Mit GC-MS kein Produkt nachweisbar.

Die Bicyklen (-)-Fenchon und (+)-Campher sowie der Alkohol (-)-Borneol wurden ausschließlich von CoTR quantifizierbar reduziert bzw. oxidiert (Tab. 58). Diese Verbindungen sind dementsprechend nicht als Substrate für die TRLs aus Brassicaceen geeignet. Alle weiteren getesteten Monoterpene sowie das Sesquiterpen (+)-Nootkaton wurden von den untersuchten Enzymen nicht reduziert oder oxidiert (Tab. 49). Vermutlich liegt der Grund hierfür in der weniger flexiblen Cyclohexanon-Struktur dieser Verbindungen (Ausnahmen: Pulegon – Methylensubstituent, Carvacrol – Aromat).

**Tab. 62 Menthonreduzierende SDRs (SDR114C)**

Enzym Substrat	MpMNR		MpMMR		AaRed1		CaMNR1	
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
(-)-Menthon	674	0,06	3,0	0,60	7,1	0,60	35,1	0,04
(+)-Neomenthol	>1000	0,06	keine Aktivität		305	0,91	113,2	0,13
(-)-Menthol	keine Aktivität		+		+		keine Aktivität	
pH Red./ pH Ox.	9,3	9,3	7,0	7,0	7,0	7,0	7,5	9,0
Referenz	(Davis et al., 2005)		(Davis et al., 2005)		(Ryden et al., 2010)		(Choi et al., 2008)	

Mp, *Mentha x piperita*; Aa, *Artemisia annua*; Ca, *Capsicum annum*; + Produktbildung nachgewiesen.

Ein ähnliches Substratazeptanzverhalten wie At2g29350 und At2g29150 zeigte die Oxidoreduktase AaRed1 aus *Artemisia annua* (Asteraceae), die ebenfalls zu den klassischen SDRs gehört (SDR114C) (Ryden et al., 2010). Das Enzym reduzierte (-)-Menthon zu den zwei diastereomeren Alkoholen und katalysierte enantioselektiv die Oxidation von (+)-Neomenthol zu (-)-Menthon (Tab. 62). Daneben katalysierte es aber auch die Reduktion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thujon und von (+)- und (-)-Dihydrocarvon. Nicht akzeptiert wurden von AaRed1 (+)-Menthol, (-)-Neomenthol, ( $\pm$ )-Borneol, Isopiperitenol sowie (+)-Menthon, ( $\pm$ )-Campher, Nootkaton und Citral.

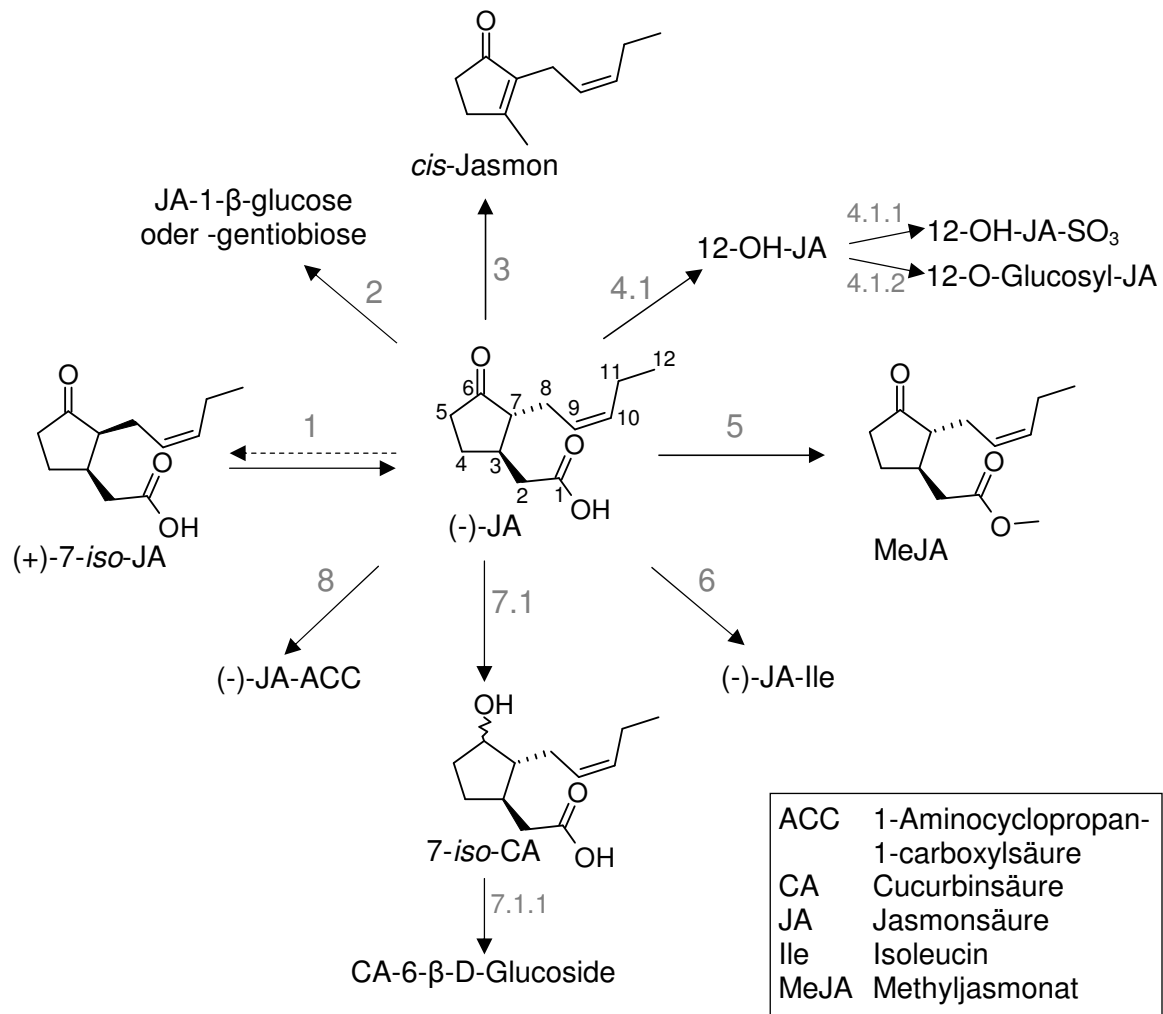
Auch in der menthon- und mentholfreien Art *Capsicum annuum* (Solanaceae) wurde eine als „Menthon:(+)-Neomenthol-Reduktase“ (CaMNR1) bezeichnete SDR gefunden (Choi et al., 2008). Diese reduzierte (-)-Menthon *in vitro* bei pH 7,5 zu 93 % (+)-Neomenthol und 7 % (-)-Menthol (Tab. 62). Eine mögliche Funktion für CaMNR1 wurde in der Beteiligung an der Pathogenabwehr der Pflanze postuliert, da die Autoren für (+)-Neomenthol und (-)-Menthol eine Wachstumshemmung auf pflanzenpathogene Bakterien (*Pseudomonas syringae pv tomato DC3000*, *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*) und Pilze (*Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum coccodes*) nachwiesen. Das Postulat erscheint allerdings zweifelhaft wegen des Fehlens von Menthon und seiner Reduktionsprodukte in der Paprikapflanze. Weitere Monoterpene und andere ähnliche Verbindungen wurden bisher nicht als Substrate für CaMNR1 getestet.

Klassische SDRs wie die TRLs und die menthonreduzierenden SDR114C aus menthonfreien Pflanzen besitzen ein vielfältiges Substratspektrum im Bereich kleiner flexibler lipophiler Terpenketone. Die in dieser Arbeit gezeigten Beispiele bilden dabei wahrscheinlich nur einen kleinen Teil der potentiell möglichen Substrate. Die Strukturen der experimentell getesteten Verbindungen sind Grundlage für die Ableitung von Pharmakophoren und ermöglichen virtuelle Screening-Ansätze mit Proteinmodellen (Reinhardt et al., 2014). Damit lassen sich weitere interessante Carbonylsubstrate für die TRLs finden.

#### 4.4.4 Reduktion von Jasmonaten

Jasmonsäure und deren Vorstufen und Metaboliten (Abb. 48) werden unter dem Begriff Jasmonate zusammengefasst und gehören zur Oxylipin-Familie der Fettsäure-Derivate. Strukturell ähneln sie tierischen Prostaglandinen. Die Biosynthese dieser ubiquitär im Pflanzenreich vorkommenden Hormone aus  $\alpha$ -Linolensäure ((all-*cis*)-Octadeca-9,12,15-triensäure) in Chloroplasten und Peroxisomen pflanzlicher Zellen ist hinlänglich erforscht (Creelman and Mullet, 1997; Wasternack, 2007). Beteiligte Enzyme wurden vor allem im Modellorganismus *A. thaliana* und in den Solanaceen *Solanum lycopersicum* und *Nicotiana attenuata* entdeckt und intensiv untersucht. Als biologisch aktive Form der Jasmonsäure wurde das Aminosäurekonjugat (+)-7-*iso*-Jasmonoylisoleucin ((+)-7-*iso*-JA-Ile) identifiziert (Fonseca et al., 2009b). Die Wirkungen der Jasmonate in der Pflanze sind vielfältig. Zum

einen sind sie wichtige Signalmoleküle bei zahlreichen Entwicklungsprozessen wie Fertilität, Festlegung des Geschlechts, Wurzellängenwachstum, Fruchtreife und Seneszenz. Zum anderen sind sie bedeutsam als Signale der pflanzlichen Abwehr gegenüber biotischem (z. B. Pathogenbefall, mechanische Verletzung) und abiotischem Stress (z. B. Trockenheit, UV-Licht) (Wasternack, 2007).



**Abb. 48 Metabolismus von (-)-Jasmonsäure**

- 1 Spontane Epimerisierung zwischen instabiler (+)-7-*iso*-JA und der stabileren Form (-)-JA.
- 2 Glycosylierung der Carboxylfunktion, Enzyme nicht bekannt (Swiatek et al., 2004).
- 3 Decarboxylierung zu *cis*-Jasmon, Beteiligung von Enzymen nicht bekannt (Koch et al., 1997).
- 4.1 12-Hydroxylierung, Enzyme nicht bekannt.
  - 4.1.1 12-Sulfatierung durch Enzym 12-OH-JA-Sulfotransferase (Gidda et al., 2003).
  - 4.1.2 12-O-Glucosylierung, Enzyme nicht bekannt (Sembdner and Parthier, 1993).
- 5 Methylierung durch Jasmonat-O-Methyltransferase EC 2.1.1.141 (Seo et al., 2001).
- 6 Konjugation mit Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Phe, etc.) durch JA-Konjugat-Synthasen EC 6.3.-.- (AtJAR1 (Staswick and Tiryaki, 2004); *Nicotiana attenuata* JAR4 (Kang et al., 2006), *Solanum lycopersicum* JAR1 (Suza et al., 2010)).
- 7.1 Reduktion des Cyclopentanons, Bildung von Cucurbinsäuren (Sembdner and Parthier, 1993), Enzyme bisher unbekannt. Die Reduktaseaktivität wurde für die TRLs *in vitro* nachgewiesen!
  - 7.1.1 6-O-Glucosylierung zu 6-β-D-Glucosiden (Fukui et al., 1977b), Enzyme nicht bekannt.
- 8 Konjugation mit 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (Vorstufe von Ethylen), AtJAR1 katalysierte die Reaktion *in vitro* (Staswick and Tiryaki, 2004).

Die Abbildung wurde aus Wasternack, 2007 entnommen und modifiziert. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind nur die Hauptstrukturen dargestellt.

Die zahlreichen Wirkungen von (+)-7-iso-JA-Ile werden über unterschiedlichste Jasmonat-responsive Gene und deren Transkriptionsfaktor-vermittelte Expression gesteuert (Cheng et al., 2011; Chini et al., 2007). Der genaue Wirkmechanismus der Jasmonate wurde inzwischen aufgeklärt (Fonseca et al., 2009a).

Neben (+)-7-iso-JA-Ile existieren auch andere aktive Jasmonate wie die Vorstufe *cis*-Oxyphytodienensäure (*cis*-OPDA), die über spezifische responsive Gene nach Verletzung unabhängig von Jasmonsäure wirkt (Taki, 2005). Auch die flüchtigen Methylester Methyljasmonat (Abb. 48) und 9,10-Methyldihydrojasmonat, dessen Biosynthese analog von Linolsäure ((*cis,cis*)-Octadeca-9,12-dienensäure) ausgeht (Blechert et al., 1995), wurden in *A. thaliana* detektiert (Meyer et al., 2003; Rohloff and Bones, 2005).

Zur Korrelation von Struktur und *in vivo* Aktivität natürlicher und synthetischer Jasmonate wurden zahlreiche Versuche mit exogen applizierten Verbindungen durchgeführt (Blechert et al., 1995; Bodnaryk and Yoshihara, 1995; Honda et al., 2006; Seto et al., 1992; Seto et al., 1999; Ward et al., 1999; Zhang et al., 1997). Bei diesen Versuchen mit von außen durch Tauchen oder Sprühen aufgetragenen Jasmonaten, spielen die Penetration in das pflanzliche Gewebe und die Permeation durch die Zellmembran eine große Rolle. Es bestehen Unterschiede in der Diffusion durch die Zellmembran zwischen den lipophilen Methylestern und den entsprechenden Säuren ( $pK_a$  4,50), deren Dissoziationsgrad vom pH-Wert abhängig ist (Dahte et al., 1993). Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen bilden daher vermutlich nur einen Teil der Wirkungen der endogen vorhandenen Jasmonate ab.

Wasternack leitete aus den bekannten *in vivo* Untersuchungen zu Jasmonaten folgende strukturelle Voraussetzungen für bioaktive Jasmonate ab (Wasternack, 2007):

- Derivate von (-)-JA (natürlich) sind biologisch aktiver als von (+)-JA (synthetisch).
- Derivate mit *cis*-Konfiguration an Position 3 und 7 ((+)-7-iso-JA) sind biologisch aktiver als die *trans*-Verbindungen ((-)-JA).
- Ein intakter Cyclopentanon-Ring ist essentiell für die biologische Aktivität.
- Derivate mit intakter Pentenyl-Seitenkette sind biologisch aktiver als solche mit Pentanyl-Seitenkette oder 11- und 12-Hydroxy-Derivate.
- Die Carboxyl-Seitenkette kann ohne Wirkverlust um das Vielfache von 2 verlängert werden.
- Die Aktivität bleibt erhalten oder steigt durch Methylierung der Carboxylfunktion oder Konjugation mit Aminosäuren.

Die Methylester der natürlich vorkommenden Jasmonsäuren zeigten im Vergleich mit den Methylestern der Cucurbinsäuren (4 Stereoisomere) fast immer eine stärkere biologische Wirkung. Allerdings gab es auch hier eine Ausnahme. 6-*epi*-MeCA hemmte die Samenkeimung von Kresse deutlich stärker als 7-*iso*-MeJA (Seto et al., 1999).

Tab. 63 Organismen mit natürlichem Vorkommen von Cucurbinsäure-Derivaten

Organismus	Lokalisation	CA-Derivate	Bemerkung	Referenz
<b>Pilze</b>				
<i>Botrydiplodia theobromae</i>	Kulturfiltrat	CA	/	(Miersch et al., 1987)
<i>Coprinus alkalinus</i>	Kulturfiltrat	CA	/	(Miersch et al., 1993)
<i>Collybia dryophila</i>	Kulturfiltrat	CA	/	(Miersch et al., 1993)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Kulturfiltrat	CA, 7-iso-CA	/	(Miersch et al., 1999)
<b>Farne</b>				
<i>Anemia phyllitidis</i> Schizaeaceae	Sporen	CA, 6- <i>epi</i> -CA, 6- <i>epi</i> -7-iso-CA	/	(Dathe et al., 1991)
<i>Equisetum arvense</i> Equisetaceae	fertile Wedel	CA	/	(Dathe et al., 1989)
<b>Gymnospermae</b>				
<i>Pinus mugo</i> Pinaceae	Pollen	7-iso-CA-Ile	/	(Knöfel and Sembdner, 1995)
<b>Angiospermae – Monokotyledonae</b>				
<i>Asparagus officinalis</i> Asparagaceae	Spargel- spitzen	2 CA-Derivate (Konfiguration unbekannt)	höchster Gehalt nach der Ernte	(Gapper et al., 2002)
<i>Secale cereale</i> Poaceae	unreife Karyopsen	CA, 6- <i>epi</i> -CA	/	(Dathe et al., 1991)
<b>Angiospermae – Dikotyledonae</b>				
<i>Boronia megastigma</i> Rutaceae	Blüten	MeCA, 6- <i>epi</i> -7-iso-MeCA	Extrakt für Parfumindustrie	(Weyerstahl et al., 1994)
<i>Cucurbita pepo</i> Cucurbitaceae	Samen	CA, MeCA, + 6-β-D- Glucoside	Wachstums- inhibitoren	(Fukui et al., 1977a; Fukui et al., 1977b)
<i>Juglans regia</i> Juglandaceae	weibliche Blüten	6- <i>epi</i> -CA, 6- <i>epi</i> -7-iso-CA	/	(Dathe et al., 1991)
<i>Perilla frutescens</i> Lamiaceae	Blätter	6- <i>epi</i> -7-iso-CA + 6-β-D-Glucosid, 6- <i>epi</i> -7-iso-MeCA	/	(Fujita et al., 1996)
<i>Phaseolus vulgaris</i> Fabaceae	Keimlinge (16 Tage alt)	CA-Derivat (Konfiguration unbekannt)	Abnahme nach Infektion mit Weißklee Mosaik Potexvirus	(Clarke et al., 2000)
<i>Solanum tuberosum</i> cv <i>Kathadin</i> Solanaceae	vegetatives Gewebe	7-iso-MeCA	Anstieg in unterirdischen Geweben (Kurztag)	(Malkawi et al., 2007)
<i>Vicia faba</i> Fabaceae	unreife Früchte	6- <i>epi</i> -7-iso-CA	/	(Miersch et al., 1989)

Konfigurationen: (+)-7-iso-JA (3*R*,7*S*) → CA (3*R*,6*S*,7*S*); 6-*epi*-CA (3*R*,6*R*,7*S*)  
(Dathe et al., 1991) (-)-JA (3*R*,7*R*) → 7-iso-CA (3*R*,6*S*,7*R*); 6-*epi*-7-iso-CA (3*R*,6*R*,7*R*)

Das verbreitete Vorkommen von Verbindungen der Cucurbinsäure (freie Säuren, Ester, Isoleucin-Konjugate, Glucoside) im Pilz- und Pflanzenreich ist bekannt (Tab. 63) und deren Biosynthese durch Reduktion des Cyclopentanon-Rings von Jasmonsäure-Derivaten ist sehr wahrscheinlich (Abb. 48). Die verantwortlichen Enzyme für diese Reduktion wurden bisher jedoch nicht gefunden. Einige Vertreter der TRLs aus Brassicaceen katalysierten die Reduktion von (-)-Jasmonsäure, Methyljasmonat und 9,10-Methyldihydrojasmonat *in vitro* (3.3.6, Tab. 58). Ob und wie diese katalytische Eigenschaft der TRLs von biologischer Relevanz ist, bleibt offen. Weiterhin ist die Aufklärung der *in vivo* Funktion von Cucurbinsäuren und ihrer Verbindungen für die Pflanze von Bedeutung.

Verbindungen mit Cyclopentanol-Ring könnten möglicherweise als Speicherformen für biologisch aktive Jasmonate fungieren. SDR Enzyme sind als Oxidoreduktasen grundsätzlich in der Lage, Reaktionen in beide Richtungen zu katalysieren. Abhängig von den herrschenden Umgebungsbedingungen (pH-Wert) ist das Gleichgewicht zu Gunsten einer Reaktionsrichtung verschoben. Da die enantiomerenreinen Cucurbinsäuren nicht verfügbar waren, konnte die *in vitro* Oxidation mit den TRLs nicht untersucht werden.

#### 4.4.5 Selektive Oxidoreduktion von Steroiden

Steroide sind im Pilz-, Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und haben unterschiedlichste Funktionen als Bestandteile von Biomembranen, als Vitamine, Hormone, Gallensäuren, herzwirksame Glykoside, Sapogenine und Krötengifte. Alle diese aus der Squalen-Biosynthese (Acetat-Mevalonat-Weg) hervorgegangenen Verbindungen verfügen über das Steran-Grundgerüst (Hexadecahydro-cyclopenta[a]phenanthren) aus drei anellierten Cyclohexan-Ringen (A, B, C) und einem Cyclopentan-Ring (D). Die Stereokonfiguration der Ringe wird unterschieden in die 5 $\alpha$ -Reihe (Ringe A/B *trans* verknüpft; Sexualhormone) und die 5 $\beta$ -Reihe (Ringe A/B *cis* verknüpft; Gallensäuren, 5 $\beta$ -Cardenolide) (Moss, 1989).

In Pflanzen kommen Sterole mit 3 $\beta$ -Hydroxylfunktion und 28 (Campesterol, Brassicasterol) oder 29 (Sitosterol, Stigmasterol) Kohlenstoff-Atomen vor. Cholesterol (C<sub>27</sub>) ist in geringen Mengen ebenfalls vorhanden (Schaeffer et al., 2001). Die Oxidation der 3 $\beta$ -Hydroxylfunktion von Sitosterol und Stigmasterol wurde von den TRLs und CoTR nicht katalysiert, ebenso die Reduktion des Cholestanons an Position C3 (3.3.7). Nach dem Ergebnis der *in vitro* Untersuchungen gehören pflanzliche Sterole nicht zum Substratspektrum der TRLs.

Lange Zeit war das Vorkommen tierischer Sexualhormone (C<sub>21</sub> Pregnane, C<sub>19</sub> Androstane) in Pflanzen umstritten. Nachweise von Progesteron in Organen diverser Pflanzen wurden mit Techniken wie Dünnschichtchromatografie (Gawienowski and Gibbs, 1968), Radioimmunoassay (Simons and Grinwich, 1989) oder Gaschromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie (Iino et al., 2007b) geführt. Dabei wurden meist nur Spuren des vermuteten Progesterons gefunden (6 ng/kg – 1,5  $\mu$ g/kg Frischmasse) (Iino et al., 2007b). Simersky und Mitarbeiter analysierten nach aufwendiger Extraktion und Reinigung tierische

Steroidhormone aus *Digitalis purpurea* (Plantaginaceae), *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) und *Inula helenium* (Asteraceae) mit UHPLC-MS/MS (Simersky et al., 2009). In allen drei Pflanzen wurden Spuren von Progesteron und in *N. tabacum* und *I. helenium* zusätzlich Androstendion detektiert. Zahlreiche Gene für putative Progesteron-Rezeptoren, sogenannte Membran-Steroid-Binde-Proteine (MSPBs), wurden von lino und Mitarbeitern aus *A. thaliana* und *Oryza sativa* kloniert und charakterisiert (lino et al., 2007b). Dabei wurde ein hemmender Einfluss von AtMSPB1 auf das Zellstreckungswachstum festgestellt (Yang et al., 2005). Der definitive Nachweis von Progesteron in höheren Gefäßpflanzen wurde aber erst von Pauli und Mitarbeitern für *Juglans regia* (Juglandaceae) erbracht (Pauli et al., 2010). Sie isolierten eine ihnen unbekannte Substanz aus den Blättern des Baumes und klärten deren Struktur mit Massenspektrometrie und <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR auf. Die Substanz wurde zweifelsfrei als Progesteron identifiziert. Weiterhin entdeckte die gleiche Gruppe in *Adonis allepica* (Ranunculaceae) drei 3-O-sulfatierte Pregnenolone neben Cardenoliden (Pauli et al., 2010). Auch wenn das Vorkommen von Progesteron in *A. thaliana* nicht absolut sicher geklärt ist (lino et al., 2007b), reduzierten einige TRLs aus dieser Pflanze das Hormon sowie das strukturell verwandte Pregnenolon *in vitro* zu den C20-Alkoholen (20-Ketoreduktaseaktivität) (3.3.7, Abb. 39).

Aus den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts existieren Publikationen verschiedener Forschungsgruppen zur Inkubation von Zellkulturen oder Pflanzenorganen mit tierischen Sexualhormonen (Tab. 64). So führte z. B. die Zugabe von Progesteron in unterschiedlichem Ausmaß zu den gleichen Produkten wie dessen *in vitro* Reduktion durch die TRLs (4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on, 4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on). Eine enzymatische Reduktion durch pflanzliche SDRs ist eine nahe liegende Erklärung für die nachgewiesenen Metaboliten.

Auch die Androstene 4-Androsten-3,17-dion und Testosteron wurden nach exogener Applikation stereospezifisch an Position C17 reduziert oder oxidiert (Tab. 64). Die gleichen Reaktionen katalysierten auch CoTR und At2g29350 *in vitro* (= 17 $\beta$ -HSD Aktivität) (3.3.7, Abb. 38). Die Funktionen und Wirkungen von Steroidhormonen vom Pregnen- oder Androsten-Typ in der Pflanze sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (lino et al., 2007a; Janeczko et al., 2003; Janeczko, 2012).

Pflanzliche Enzyme, die Pregnene oder Androstene *in vitro* als Substrate akzeptieren, sind weit verbreitet und gehören oft zur Superfamilie der SDRs. In *Digitalis*-Arten gibt es pflanzliche 3 $\beta$ -HSDs (EC 1.1.1.51, SDR110C), die in der Biosynthese der Herzglykoside die Oxidation der 3 $\beta$ -Hydroxylfunktion des Pregnenolons zu Isoprogesteron katalysieren (Herl et al., 2007). Neben der 3 $\beta$ -Oxidation von 5-Pregnenen zeigen diese Enzyme *in vitro* gegenüber Testosteron und 4-Androsten-3,17-dion auch katalytische Aktivität als 17 $\beta$ -Dehydrogenasen/Reduktasen und weisen somit eine interessante Analogie zu den

TRLs auf. Diese wiederum katalysieren weder die Oxidation noch die Reduktion der C3-Carbonylfunktion von Sterolen und Steroiden.

**Tab. 64 Biotransformation exogener Steroide durch Pflanzen(zellkulturen)**

Pflanze/ Familie	Organ/ Zellkultur	Analytik	Reaktionsprodukte (% Ausbeute)	Referenz
Reduktion von Progesteron an Position C20				
<i>Solanum lycopersicum</i> Solanaceae	Zellkultur- Suspension	DC mit [4- <sup>14</sup> C]- Progesteron quantitative GC MS, <sup>1</sup> H-NMR	4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on (3-5 %)	(Yagen et al., 1978)
<i>Capsicum frutescens</i> Solanaceae			4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on (60-90 %)	
<i>Catharanthus roseus</i> Apocynaceae			4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on (2-3 %)	
<i>Parthenocissus</i> sp. Vitaceae	Zellkultur- Suspension	DC, GC, Schmelzpunkt, IR-Spektroskopie	4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on (65 %)	(Graves and Smith, 1967)
<i>Rosa</i> sp. Rosaceae			4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on 4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on (jeweils 2-10 %)	
<i>Nicotiana tabacum</i> Solanaceae			4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on (2-10 %)	
<i>Pisum sativum</i> Fabaceae	Blätter intakter Pflanzen	HPLC mit [4- <sup>14</sup> C]- Progesteron, Kristallisation	4-Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on 4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on (20 $\alpha$ : 1,3 %; 20 $\beta$ : 7,1 %)	(Lin and Heftmann, 1981)
Reduktion von 4-Androsten-3,17-dion an Position C17				
<i>Pisum sativum</i> Fabaceae	Blätter intakter Pflanzen	DC mit [4- <sup>14</sup> C]- 4-Androsten- 3,17-dion, Kristallisation	Testosteron (36 %) Testosteronacetat (7 %) (17 $\beta$ -Alkohole)	(Lin et al., 1979)
<i>Cucumis sativus</i> Cucurbitaceae		HPLC mit [4- <sup>14</sup> C]- 4-Androsten- 3,17-dion, Kristallisation	Testosteron (16 %)	(Lin et al., 1983)
Oxidoreduktion an Position C17: 4-Androsten-3,17-dion $\leftrightarrow$ Testosteron				
<i>Nicotiana tabacum</i> Solanaceae	Zellkultur- Suspension	LC, IR, MS, NMR, Schmelzpunkt	Aus Testosteron: 4-Androsten-3,17-dion  Aus 4-Androsten-3,17-dion: Testosteron	(Hirotani and Furuya, 1974)

Ein weiteres wichtiges Enzym der Cardenolid-Biosynthese ist die 5 $\beta$ -Progesteronreduktase (SDR75U), die sowohl in 5 $\beta$ -cardenolidproduzierenden Arten von *Digitalis* (Plantaginaceae), *Erysimum* (Brassicaceae) und in *Nerium oleander* (Apocynaceae) als auch in cardenolidfreien Arten wie *A. thaliana* (VEP1 Genprodukt, At4g24220; (Herl et al., 2009)), *Mentha x piperita* (Lamiaceae) und *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) zu finden ist (Bauer et al., 2010). Das Enzym katalysiert die Reduktion der  $\Delta^{4,5}$ -Doppelbindung des Progesterons zu



5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion, einer Vorstufe der 5 $\beta$ -Cardenolide. Die Funktion der 5 $\beta$ -Progesteron-reduktasen in cardenolidfreien Pflanzenarten ist bisher nicht bekannt (Bauer et al., 2010).

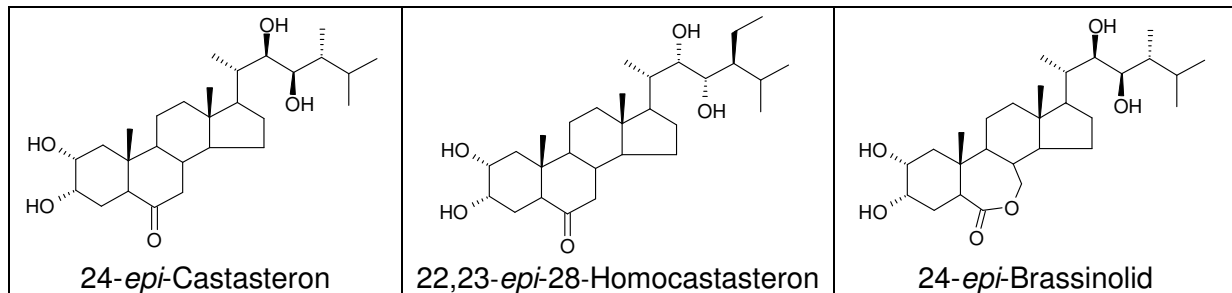
In den Ölkörpern (Oleosomen) der Samen von *A. thaliana* wurde ein Enzym mit 17 $\beta$ - und 11 $\beta$ -HSD Aktivität lokalisiert, AtHSD1 (At5g50600, SDR119C) (d'Andrea et al., 2007). Das isolierte Enzym katalysierte *in vitro* die Oxidation von Estradiol zu Estron in Anwesenheit von NADP und auch die entsprechende Rückreaktion mit NADPH (17 $\beta$ -HSD). Weiterhin zeigte es Oxidaseaktivität gegenüber Cortisol und Corticosteron (11 $\beta$ -HSD). Das Enzym katalysierte jedoch nicht die Oxidation der 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe von Cholesterol und Dehydroepiandrosteron, eine 3 $\beta$ -HSD Aktivität wurde deshalb ausgeschlossen. Die physiologische Funktion und die *in vivo* Substrate des in Ölkörpern des Samens lokalisierten Enzyms sind noch nicht aufgeklärt. AtHSD1 weist eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 60 % zur Steroldehydrogenase Sop2 (Steroleosin-A) aus *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) auf (Lin and Tzen, 2004). Weitere Gene mit hoher Sequenzidentität zu *at5g50600* wurden auf den Chromosomen 5, 3 und 4 gefunden und bilden ein Gen-Cluster (Baud et al., 2009).

Als pflanzliches Gegenstück zu den tierischen Steroidhormonen gelten die sogenannten Brassinosteroide (BRs, C<sub>27</sub> - C<sub>29</sub> Steroide) mit dem prominentesten Vertreter Brassinolid. Sie sind für die Regulierung zahlreicher Wachstums- und Entwicklungsprozesse in der Pflanze verantwortlich. Ihre Biosynthese ist vielstufig und einzelne Schritte sind untereinander vernetzt (Fujioka and Yokota, 2003). Vorstufen sind die pflanzlichen Sterole Cholesterol (C<sub>27</sub>-BRs), Campesterol (C<sub>28</sub>-BRs) und Sitosterol (C<sub>29</sub>-Brassinosteroide), die sich voneinander nur durch die Substituenten an Position 24 unterscheiden. An den ersten Schritten der Biosynthese ist eine 3 $\beta$ -HSD,  $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase (SAX1-Protein, *sax1* Mutante = Zwergmutante, hypersensitiv gegenüber Abscisinsäure und Auxin 1) beteiligt (Ephritikhine et al., 1999). Das Enzym katalysiert die Oxidation und Isomerisierung von (22*S*)-22-Hydroxycampesterol zu (22*S*,24*R*)-22-Hydroxy-4-ergosten-3-on. Der Genlocus im Genom von *A. thaliana* und damit die Proteinsequenz sind leider nicht bekannt, so dass das Protein keiner Enzymfamilie zugeordnet werden kann. Am weiteren Verlauf der Biosynthese sind vor allem CYP450-Enzyme und 5 $\alpha$ -Reduktasen beteiligt.

Die Brassinosteroide unterscheiden sich von Pregnenen und Androstenen durch fehlende C=C-Doppelbindungen, 5 $\alpha$ -Konfiguration der Ringe A und B (*trans*), eine erhöhte Anzahl von Hydroxylfunktionen an den Positionen 2, 3, 22, 23 sowie eine zusätzliche Carbonylfunktion an Position 6 (Keton, Lacton). Somit weisen sie starke Unterschiede zu den von den TRLs akzeptierten Substraten Progesteron, Pregnenolon, Testosteron und 4-Androstendion auf. Trotzdem wurden die von Prof. Dr. Wessjohann (IPB Halle) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Verbindungen 24-*epi*-Castasteron, 24-*epi*-Brassinolid und 22,23-*epi*-28-Homocastasteron (Tab. 65) mit der fotometrischen Methode (2.4.1.2) als Substrate für die

TRLs At2g29360 und CrTRL26 untersucht. Eine enzymatisch katalysierte Oxidation oder Reduktion vorhandener Hydroxyl- oder Ketofunktionen wurde nicht beobachtet. Eine Beteiligung der TRLs im Brassinosteroid-Stoffwechsel erscheint angesichts dieser Ergebnisse und der nachgewiesenen 17 $\beta$ -HSD und 20-Ketoreduktaseaktivität der TRLs als unwahrscheinlich.

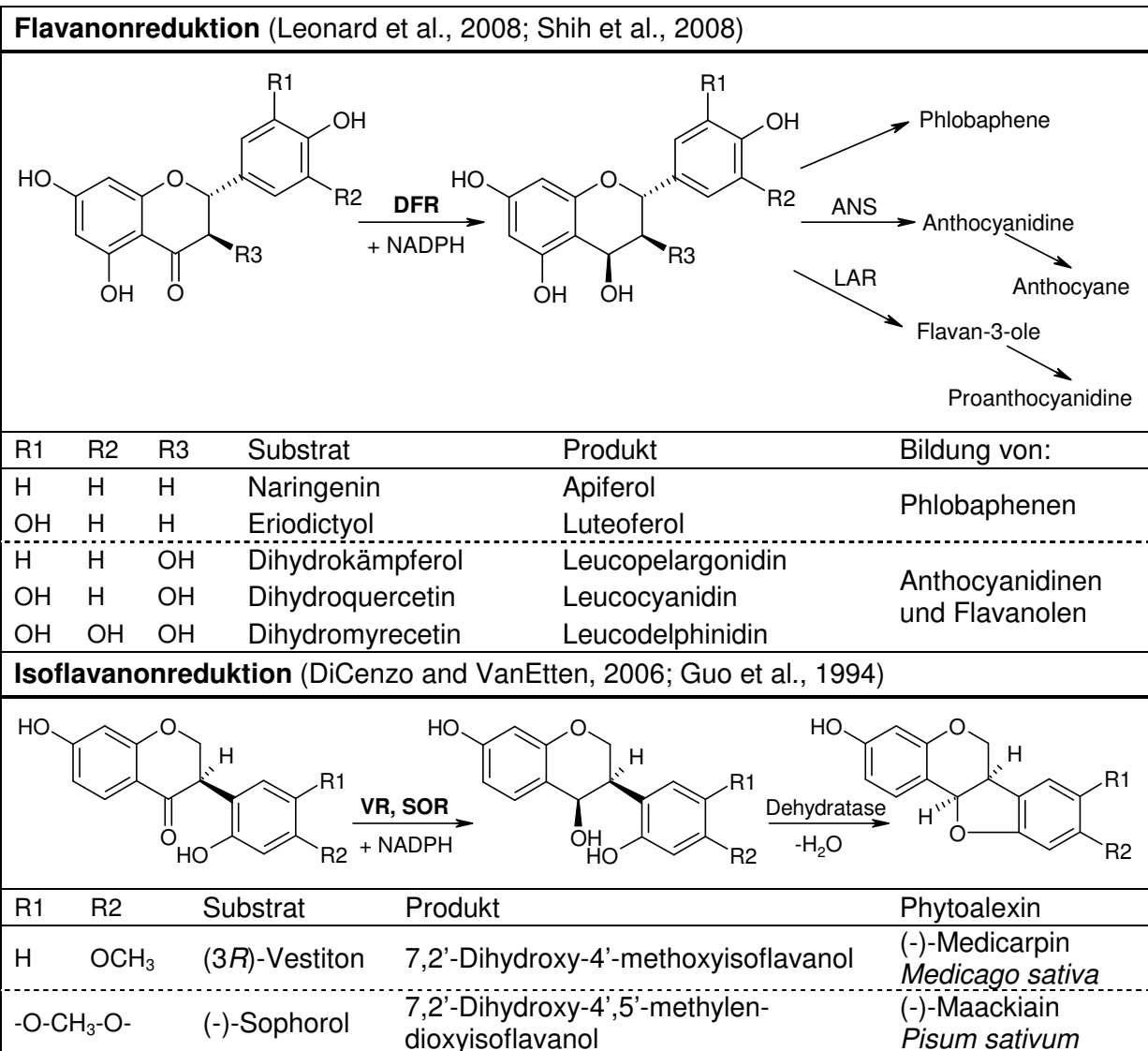
**Tab. 65** Verfügbare Brassinosteroide für die Substratazeptanzuntersuchung



#### 4.4.6 Reduktion von Flavonoiden

Flavonoide sind ubiquitäre sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Ihre Biosynthese geht von Chalkonen aus, die aus 4-Coumaroyl-CoA-Derivaten (aus Phenylpropanoid-Biosynthese, Ring B) und drei Einheiten Malonyl-CoA (aus Fettsäure-Biosynthese, Ring A) gebildet werden. Die Biosynthese erfolgt im Zytosol zum Teil über einen am endoplasmatischen Retikulum assoziierten Enzymkomplex (Burbulis and Winkel-Shirley, 1999; Hrazdina and Wagner, 1985). Aus den Chalkonen entstehen durch Isomerase-katalysierten Ringschluss Flavanone (Ring C: Tetrahydropyran-4-on), die im weiteren Verlauf zu Dihydroflavonolen, Flavonolen, Flavonen und Isoflavonen umgesetzt werden. Zytosolische Dihydroflavonol 4-Reduktasen (DFR, SDR108E, EC 1.1.1.219) katalysieren die Reduktion der Ketofunktion von Dihydroflavonolen (= 3-Hydroxyflavanon) zu Leucoanthocyanidinen (Abb. 49 oben). Aus diesen entstehen farbige Anthocyanidine und deren Glykoside (Anthocyane) sowie Catechine (Flavan-3-ole), die zu kondensierten Gerbstoffen (Proanthocyanidine) polymerisieren. DFR katalysieren auch die 4-Ketoreduktion der Flavanone Naringenin und Eriodictyol zu den entsprechenden Alkoholen. Diese reagieren wiederum zu rot-violetten, nicht gerbenden Phlobaphenen (Leonard et al., 2008). Neben den DFR gibt es in Fabaceen-Arten auch Isoflavanon 4-Reduktasen (Vestitonreduktase, VR und Sophorolreduktase, SOR, beide SDR108E), die an der Biosynthese von Phytoalexinen wie (-)-Medicarpin und (-)-Maackiaïn beteiligt sind (Abb. 49 unten). Für einzelne Vertreter der TRLs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie die Reduktion von *trans*-Chalkon und einigen nicht oder einfach hydroxylierten (2'-, 6-, 7-OH) Flavanonen katalysierten (3.3.8). Einzelne dieser Verbindungen und strukturell verwandte Derivate wurden in pflanzlichen Extrakten detektiert, darunter *trans*-Chalkon (*Ceasalpinia sappan*, Fabaceae, (Cai et al., 2005)), 7-Hydroxyflavanon (*Muntigia calabura*, Muntigiaceae, (Chen et al., 2005); *Spatholobus*

*suberectus*, Fabaceae, (Shim, 2011)), 2'-Hydroxyflavon (*Primula florindae*, *P. simplex*, *P. kewensis*, Primulaceae, (Linuma and Mizuno, 1989)) und Flavon (*Pimelea simplea*, Thymelaeaceae, (Linuma and Mizuno, 1989); *Alpinia officinarum*, Zingiberaceae, (Wang and Li, 2007)). Weitaus häufiger kommen aber polyhydroxylierte Flavonoide ausgehend von Naringenin (5-, 7-, 4'-OH) vor, z. B. 3-Hydroxyflavanone wie Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin, die auch in *A. thaliana* enthalten sind (Routaboul et al., 2006). Sie unterscheiden sich von (-)-Naringenin durch eine (3-OH) bzw. zwei (3-OH, 5'-OH) weitere Hydroxylfunktionen. Die Akzeptanz der Flavanone als Substrate durch die TRL Enzyme hängt von der Anzahl und Position der Hydroxylfunktionen ab. Die TRLs unterscheiden sich im Substratspektrum somit deutlich von den bekannten pflanzlichen Dihydroflavonol 4-Reduktasen (Abb. 49 oben). Eine biologisch relevante Funktion der TRLs in der Biosynthese der Leucoanthocyanidine ist als eher unwahrscheinlich anzusehen.



**Abb. 49 Reaktionen pflanzlicher Flavonoid 4-Reduktasen (SDR108E)**

LAR, Leucoanthocyanidinreduktase; ANS, Anthocyanidinsynthase;  
DFR, Dihydroflavonol 4-Reduktase; VR, Vestitonreduktase; SOR, Sophorolreduktase

Die enzymatische Reduktion der Carbonylfunktion von Flavonen, Flavonolen und Isoflavonen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Auch die TRLs katalysierten diese Reaktionen nicht. Vielmehr gibt es Belege für die inhibitorische Wirkung einiger Flavonoidaglyka auf Hydroxysteroiddehydrogenasen *in vitro*:

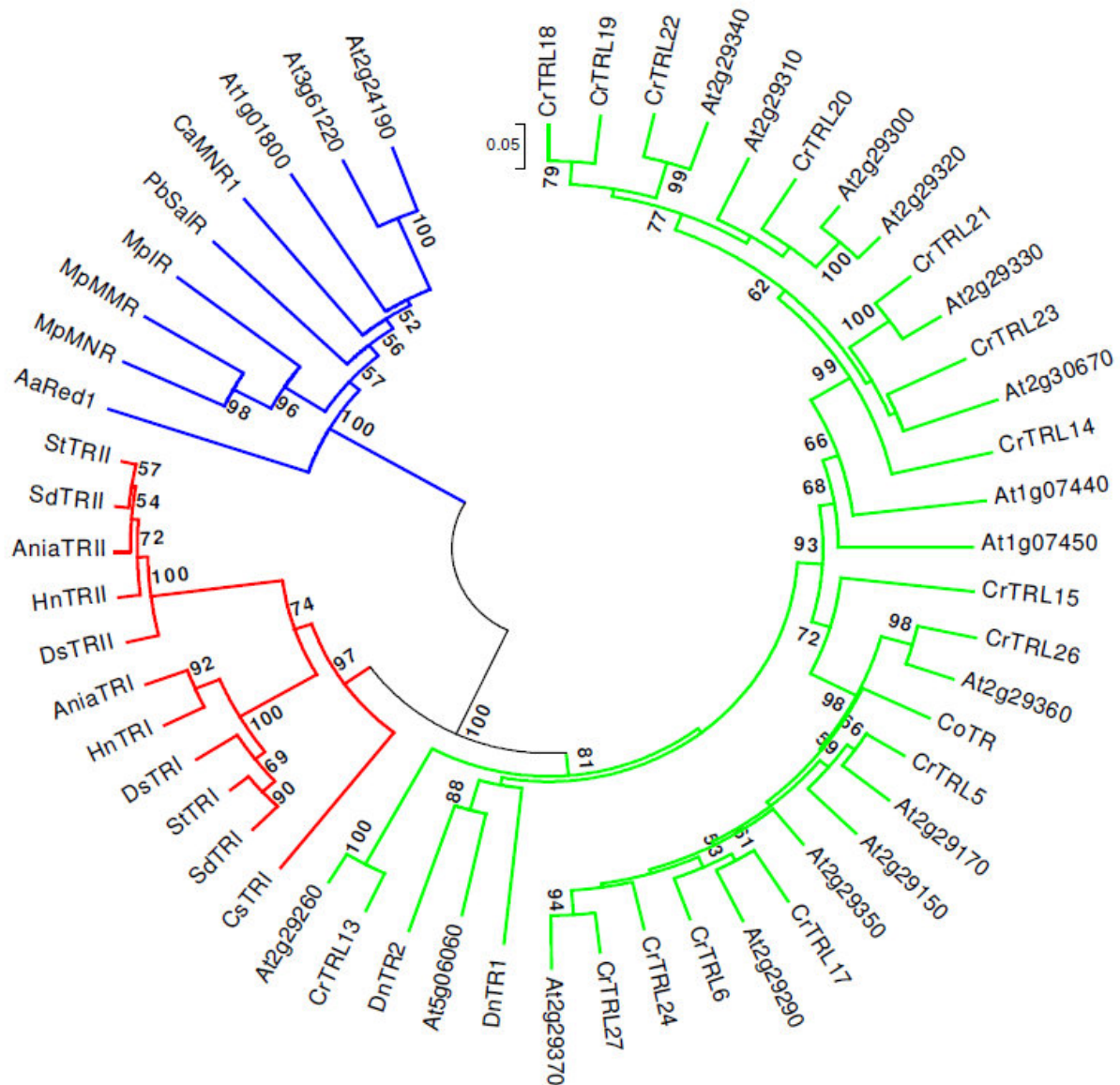
- 17 $\beta$ -HSD und Trihydroxynaphthalenreduktase (beide SDR111C) aus dem Pilz *Cochliobolus lunatus* (Kristan et al., 2005; Kristan et al., 2009)  
→ z. B. Naringenin, Flavon, Flavonol, Biochanin A (= 4'-O-Methylether von Genistein)
- humane 17 $\beta$ -HSD Typ 1 (SDR28C) und Typ 2 (SDR9C) (Schuster et al., 2008)  
→ z. B. Naringenin, Apigenin, 7-Hydroxyflavon, Genistein
- humane 17 $\beta$ -HSD Typ 5 (AKR) (Krazeisen et al., 2001; Lukacik et al., 2006)  
→ z. B. Flavanon, Naringenin, Flavon, Apigenin, 7-Hydroxyflavon, Genistein, Daidzein

Die verfügbaren Flavonoide (Tab. 52) wurden in dieser Arbeit nicht auf ihre Wirkung als potentielle Inhibitoren der TRL Enzyme untersucht. Eine räumliche Passung der Strukturen in das aktive Zentrum ist aber durchaus vorstellbar. Flavanon wurde von den TRLs als Substrat akzeptiert und Flavon, mit einer zusätzlichen Doppelbindung in Ring C, nicht. Auch die Reduktion von 7-Hydroxyflavanon wurde von einzelnen TRLs katalysiert. Naringenin mit zwei weiteren Hydroxylfunktionen (5-, 4'-OH) wurde jedoch nicht umgesetzt.

Flavonoide wären damit auch ein guter Ausgangspunkt für die Suche nach potentiellen TRL Inhibitoren.

#### 4.5 Evolution und Funktion der TRL Proteine

Die Familie der Tropinonreduktase-ähnlichen SDRs (SDR65C) ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Einen kleinen Überblick bietet Tabelle A2 im Anhang. Den aktuellen Stand über die Mitgliederzahl dieser Familie bei Eukaryoten (hauptsächlich *Viridiplantae*) und Bakterien gewährt die frei zugängliche SDR-Datenbank ([www.sdr-enzymes.org](http://www.sdr-enzymes.org), Suchfeld: family name: SDR65C, 502 Einträge am 10.05.2014). TRL Gene kommen nicht nur bei den Landpflanzen, sondern evolutionär bereits sehr früh bei den Grünalgen, z. B. *Chlamydomonas reinhardtii* (UniProt-Eintrag: A8IS20), *Chlorella variabilis* (UniProt-Einträge: E1ZGY4, E1ZF23) und *Volvox carteri* (UniProt-Eintrag: D8TT10), vor. Grünalgen und Landpflanzen werden unter der Bezeichnung *Viridiplantae* („Grüne Pflanzen“) zusammengefasst, da sie alle Chloroplasten mit Chlorophyll a und b enthalten und fotosynthetisch aktiv sind. Bei den Landpflanzen treten TRL Gene bei Moosen (*Physcomitrella patens*), Bärlappen (*Selaginella moellendorffii*) und höheren Gefäßpflanzen von *Gymnospermae* (*Picea sitchensis*) über monokotyle (Vertreter der Poaceen) und dikotyle Bedecktsamer (Vertreter der Brassicaceen, Solanaceen, Fabaceen, Euphorbiaceen, Salicaceen, Vitaceen) auf. Innerhalb der Gefäßpflanzen ist die Anzahl der TRL Gene im Vergleich zu den Genomen von Moosen und Bärlappen deutlich erhöht (meist > 5-10).



**Abb. 50 Phylogenetischer Baum von TRs/TRLs und funktionell ähnlichen SDRs**

erstellt mit MEGA 5 nach Methode 2.5.2.

**Grün:** CoTR und TRLs aus *A. thaliana* und *C. rubella* (Brassicaceae), sowie DnTR1 und DnTR2 aus *Dendrobium nobile* (Orchidaceae)(SDR65C).

**Rot:** funktionale TRI und TRII aus Solanaceen und einer Convolvulaceae (SDR65C)

Ania, *Anisodus acutangulus*; Ds, *Datura stramonium*; Hn, *Hyoscyamus niger*; Sd, *Solanum dulcamara*; St, *Solanum tuberosum* und Cs, *Calystegia sepium* (Convolvulaceae).

**Blau:** Klassische SDRs mit funktioneller Ähnlichkeit zu TRLs (SDR114C)

MNR, Menthon:Neomenthol Reduktase; MMR, Menthon:Menthol Reduktase; Ca, *Capsicum annum*; Mp, *Mentha x piperita*; AaRed1, *Artemisia annua* Oxidoreduktase; PbSal; *Papaver bracteatum* Salutaridinreduktase; At1g01800 und At2g24190 Carbonylreduktasen und At3g61220 (+)-Neomenthol Dehydrogenase aus *A. thaliana*; IR, Isopiperitenonreduktase (SDR110C)

Moummou und Mitarbeiter untergliederten mit Hilfe von „Hidden Markov“-Modellen den Hauptteil der in Landpflanzen vorkommenden SDRs in 49 Familien, von denen 35 sehr früh in der gesamten Entwicklungslinie der *Viridiplantae* auftraten (Moummou et al., 2012). Zu diesen 35 Familien gehören unter anderem die Familien SDR65C (TR/TRL), SDR108E (z. B. DFR, VR, SOR), SDR110C (z. B. 3 $\beta$ -HSD), SDR114C (z. B. Menthonreduktasen, AaRed1, PbSalR) und SDR460A (z. B. Isoflavonreduktasen). Diese Familien expandierten in der Zahl

ihrer Mitglieder und der Anzahl der Genkopien vor allem innerhalb der Gefäß- und Blütenpflanzen (Moummou et al., 2012).

Besonders interessant ist die Überschneidung der *in vitro* Substratazeptanz der untersuchten TRL Enzyme (SDR65C) mit bekannten Substraten von Menthonreduktasen und Menthonreduktase-ähnlichen Enzymen (4.4.3, SDR114C, Abb. 50, blauer Ast), Dihydroflavonol 4-Reduktasen (4.4.6, SDR108E) und 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen (4.4.5; SDR110C). Das ist ein Hinweis dafür, dass die breite Substratazeptanz für diese Carbonylverbindungen bereits bei einem frühen gemeinsamen SDR-Vorfahren auftrat. Eine Besonderheit der Evolution der SDRs ist, dass bei der Genvervielfältigung (Genduplikation) keine oder wenig Spezialisierung bei der Funktion der codierten Proteine evolvierte, sondern häufig eine breite Substratazeptanz erhalten blieb.

Durch evolutionäre Mechanismen wie Polyploidie ganzer Genome oder Teilbereichen von Genomen und dadurch verursachte blockweise Genduplikationen (Blanc et al., 2003) und vor allem durch Tandem-Genduplikationen auf demselben Chromosom (Navarro-Quezada, 2007) entstanden zahlreiche TRL Genkopien mit hoher Sequenzidentität untereinander (Abb. 50, grüner Ast). Diese evolutionären Zusammenhänge sind vor allem für *A. thaliana* und weitere Brassicaceen-Arten gut belegt (Navarro-Quezada, 2007). Der Vorteil einer großen Anzahl sehr ähnlicher Gene für die Pflanze besteht in der Möglichkeit zu Neofunktionalisierung, Subfunktionalisierung und Nonfunktionalisierung der codierten Proteine und daraus resultierenden differenzierenden Reaktionen der Pflanze bei der Änderung äußerer Umweltbedingungen. Hinweise auf Subfunktionalisierung zeigten sich für die TRLs bereits in der unterschiedlichen Cosubstratpräferenz der beiden modernen Cluster B (NADP(H)) und C (NAD(H)) (Tab. 41, Tab. 42) und in der unterschiedlichen Substratazeptanz der Vertreter des alten Clusters A und der modernen Cluster B und C (Tab. 58). Die Neofunktionalisierung lässt sich anhand von At2g29260 verdeutlichen. Das Protein hat im Unterschied zu allen weiteren *A. thaliana* TRLs eine potentielle Funktion im Chloroplasten (cTP) und keine enzymatische Aktivität als Oxidoreduktase (fehlendes katalytisches Tyrosin). So können die TRL Gene und die codierten Proteine, in ihrer Vielzahl und mit ihrer breiten Substratazeptanz, als Reservoir für die Entwicklung neuer Funktionen als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen dienen. Die Annahme, dass sich die nicht-stereospezifische Tropinonreduktaseaktivität der CoTR durch wenige Mutationen eines bereits vorhandenen TRL Gens evolviert hat und *Cochlearia officinalis* somit in der Lage war, mit der Akkumulation von Tropan- und Nortropanalkaloiden auf veränderte Bedingungen zu reagieren, ist nahe liegend (Brock et al., 2008). Das gleiche gilt für die Evolution zweier stereospezifischer Tropinonreduktasen (TRI und TRII) durch Genduplikation und wenige Mutationen eines gemeinsamen Ursprungsgens in Solanaceen wie z. B. *Datura stramonium* (Nakajima et al., 1993). SDRs im Allgemeinen und TRLs im Besonderen können als leicht

evolvierbar angesehen werden, denn Mutagenesen führen häufig zu funktionalen, löslichen Enzymen. Sie dienen der Pflanze als Reservoir von Enzymen mit zum Teil unterschiedlicher aber flexibler Substratazeptanz und ermöglichen so die zügige Anpassung an veränderte Umweltbedingungen.

#### 4.6 TRL Enzyme für biotechnologische Anwendungen

Die Biokatalyse, also der Einsatz von isolierten Enzymen oder kompletten Zellsystemen für die Synthese reiner, chiraler Verbindungen als Zwischenstufen z. B. für die Arzneistoffsynthese (Patel, 2008; Pollard and Woodley, 2007) oder für die Lebensmittelindustrie, ist in den letzten Jahren zunehmend effizient geworden. Eine wichtige Rolle spielen dabei Oxidoreduktasen, auch als Ketoreduktasen bezeichnet, die in Anwesenheit von NAD(P)H aus prochiralen Ketonen durch enzymatische Reduktion enantiomerenreine chirale Alkohole bilden. Anwendung finden zum einen isolierte, zumeist rekombinant in *E. coli* synthetisierte, Enzyme aus Bakterien oder Pilzen und zum anderen Zellkulturen von Bakterien, Pilzen und Pflanzen (Matsuda et al., 2009), das schließt auch kleingeschnittene Pflanzenteile ein (Andrade et al., 2006; Blanchard and de Weghe, 2006; Machado et al., 2006).

Die Verfügbarkeit des Cosubstrats NADH oder NADPH ist bei der Biokatalyse mit Oxidoreduktasen ein limitierender Faktor, der durch verschiedene Ansätze gelöst wird. Meist wird dem Reaktionsmedium ein NAD(P)H-regenerierendes System, bestehend aus einer Dehydrogenase und ihrem entsprechenden Substrat, zugesetzt. Diese reduziert das während der Katalyse entstehende oxidierte Cosubstrat wieder zurück in seine reduzierte Form. Beispiele für cosubstratregenerierende Systeme sind Glucose Dehydrogenase mit den Substraten D-Glucose und NADP (Choi et al., 2011; Kaluzna et al., 2005), Glucose-6-phosphat Dehydrogenase mit den Substraten Glucose-6-phosphat und NADP und Formatdehydrogenase, die das Format-Ion unter Reduktion von NAD zu Kohlendioxid oxidiert (Goldberg et al., 2007; Matsuda et al., 2009). Daneben existieren elektrochemische und fotochemische Regenerationsverfahren, die noch auf Grund geringer Produktivität weniger häufig eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten TRL Enzyme reduzieren eine Vielzahl kleiner lipophiler Carbonylverbindungen wie aliphatische und zyklische Ketone, Monoterpene, Jasmonate, Steroide und Flavonoide. Sie demonstrieren damit ein breites Substratspektrum, das sicherlich auf weitere industriell attraktive Substanzen ausgedehnt werden kann. Einige der untersuchten Enzyme katalysieren die Reduktion einzelner Substrate stereospezifisch zu einem enantiomerenreinen Produkt (Reduktion von (-)-Menthon, (-)- $\alpha$ -Thujon und (-)-Carvon) und die entsprechende Oxidation verläuft enantioselektiv ((+)-Neomenthol, (-)-Menthol) (4.4.3). Stereospezifität und Stereoselektivität sind nützliche Eigenschaften für den Einsatz von TRLs in biotechnologischen Anwendungen. Die Möglichkeit, mit TRLs Alkohole wie (-)-*trans*-Carveol oder (-)-Thujol, die bisher nicht kommerziell erhältlich sind,

enantiomerenrein zu synthetisieren, ist gegeben. Darüber hinaus dürfte es nicht schwer fallen, weitere chemisch-pharmazeutisch interessante Substrate für die Biokatalyse mit TRL Enzymen zu finden. Von Vorteil ist, bei Einsatz der isolierten TRLs, die schnelle und einfache Synthese und Reinigung über den His-Tag und die gute Ausbeute zwischen 15-30 mg/L Bakterienkultur (Abb. A1 im Anhang). Weiterhin ist auch die Cosubstratpräferenz für NADH bzw. die Cosubstratflexibilität (CoTR) nicht ohne Bedeutung, wenn man bedenkt, dass der aktuelle Preis für NADH nur etwa 10 % des Preises von NADPH beträgt. Mit wenigen gezielten Mutationen besteht außerdem die Möglichkeit, die Cosubstratakzeptanz und -präferenz zu ändern (4.3.2). Auch die Nutzung einer Suspensionskultur rekombinanter *E. coli* mit pflanzlichem TRL Gen wäre ohne großen Aufwand möglich. TRLs aus Pflanzen haben ohne Zweifel das Potential, als Biokatalysatoren in biotechnologischen Synthesen eingesetzt werden zu können.



## 5 Zusammenfassung

Den TRL Enzymen von Brassicaceen wurden in dieser Dissertation vielfältige katalytische Aktivitäten und mögliche biologische Funktionen zugewiesen. Dabei ergab sich für das Protein At2g29260 eine Sonderstellung. Nach Entfernung der ersten 61 N-terminalen Aminosäuren wurde es als lösliches, NADPH-bindendes, tetrameres Protein ohne enzymatische Oxidoreduktaseaktivität synthetisiert. Der Austausch von Glutamin in Tyrosin in der katalytischen Tetrade führte zu enzymatischer Aktivität als Oxidoreduktase und einem Substratspektrum, ähnlich dem von At5g06060. Die Gene beider Proteine gehören zum phylogenetisch ältesten TRL Cluster A. Das native Protein At2g29260 könnte im Stoffwechsel von *A. thaliana* möglicherweise als Redoxsensor für Prozesse, die in Chloroplasten ablaufen, fungieren.

Die Ergebnisse zur Cosubstratakzeptanz und -präferenz der TRLs bestätigten die durch Aminosäuresequenzanalyse erwarteten Präferenzen für die Vertreter des modernen Clusters C für NAD(H), sowie für die Mitglieder der Cluster A und B für NADP(H). Als Maß für die Cosubstratpräferenz wurde die Cosubstrataffinität ( $K_m$ ) der TRLs verwendet. Die Cosubstratbindung war jedoch nicht immer exklusiv, sondern zum Teil auch flexibel angelegt, wie für CoTR und At2g29330 gezeigt wurde. Die für die Cosubstratpräferenz verantwortlichen bekannten Aminosäuren in den Positionen a, b und c (Tab. 55) wurden durch die Ergebnisse dieser Arbeit in ihrer Bedeutung untermauert.

Die untersuchten TRLs wiesen *in vitro* ein breites Substratspektrum auf. Dabei gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Clustern. Die Mitglieder des alten Clusters A zeigten meist eine geringe Affinität und/oder Aktivität zu den getesteten Substraten. Die Vertreter der beiden modernen Cluster unterschieden sich untereinander im Substratspektrum, der Substrataffinität und der enzymatischen Aktivität (Tab. 58). CoTR und At2g29350 besaßen das breiteste Substratspektrum, und At2g29350 zeigte von den untersuchten TRL Enzymen die größten Ähnlichkeiten zu CoTR. Die TRLs unterschieden sich auch in der Stereospezifität der katalysierten Reduktionen und der Stereoselektivität zu einzelnen Substraten. At2g29350 katalysierte, im Gegensatz zu At2g29150, die Reduktion der meisten Keto-Substrate stereounspezifisch zu beiden Alkoholen.

Die TRLs mit ihrem breiten *in vitro* Substratspektrum könnten im Stoffwechsel der Pflanze in diversen Biosynthesen (Terpene, Steroide, Flavonoide, Jasmonate, etc.) Funktionen als Carbonylreduktasen oder Alkoholdehydrogenasen einnehmen oder zur Entgiftung exogener oder endogener toxischer Aldehyde und Ketone durch deren Reduktion zu Alkoholen nützlich sein. Sicher ist jedoch, dass die vielfältigen TRLs großes Potential für Anwendungen als Biokatalysatoren zur asymmetrischen Synthese chiraler Alkohole für die chemische und pharmazeutische Industrie bieten.

## 6 Anhang

Tab. A1 SDR Enzyme mit bekanntem geordneten bi-bi-Reaktionsmechanismus

Enzym	Organismus	SDR-Familie	EC-Nummer	Referenz
ADH	<i>Drosophila melanogaster</i>	SDR109I	1.1.1.1	(Winberg and Mckinley-Mckee, 1994)
3 $\alpha$ -HSD/CR	<i>Comamonas testosteroni</i>	SDR325C	1.1.1.50	(Chang et al., 2007)
MDH	<i>Candida magnoliae</i> /		1.1.1.138	(Lee et al., 2003)
11 $\beta$ -HSD1	<i>Homo sapiens</i>	SDR26C	1.1.1.146	(Sahni-Arya et al., 2007)
MLCR	<i>Mus musculus</i>	SDR20C	1.1.1.184	(Nakanishi et al., 1997)

Enzymabkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Tab. A2 Übersicht über eine Auswahl bekannter pflanzlicher TRLs

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
1	TRL2	<i>Arabidopsis cebenensis</i> <sup>a</sup> Brassicaceae	262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXY3	ABW81170	/
2	TRL11		249	S-Y-K	NADP (K,A,R)	/	B2BXY7	ABW81174	/
3	TRL16		271	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXZ1	ABW81178	/
4	TRL24		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXZ7	ABW81184	/
Ψ1	TRL7		210	S-Y-K	Kein TGxxxGxG!	/	B2BXY4	ABW81171	Pseudogen
Ψ2	TRL22		213	S-Y-K	Kein TGxxxGxG!	/	B2BXZ6	ABW81183	Pseudogen
1	AITRL27	<i>Arabidopsis lyrata</i> <sup>a</sup> Brassicaceae	265	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XK5	ABW81042	/
2	AITRL28		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XK6	ABW81043	/
3	AITRL29		269	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XK7	ABW81044	/
4	AITRL32		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2B XL0	ABW81047	/
5	AITRL32_2		263	S-Y-K	n. m. (R,D,I)	SDR65C	B2B XK9	ABW81046	/
6	AITRL33		219	S-Y-K	NAD (S,D,I)	/	B2B XL2	ABW81049	/
7	AITRL33_2		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2B XL1	ABW81048	/
8	AITRL35		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2B XL3	ABW81050	/
9	AITRL37		250	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XL5	ABW81052	/
10	AITRL38		263	S-Y-K	NAD (G,D,I)	SDR65C	B2B XL6	ABW81053	/
11	AITRL39		325 (cTP64)	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B2B XL7	ABW81054	/
12	AITRL53		271	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XM9	ABW81066	/
13	AITRL54		270	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2B XN0	ABW81067	/
1	At1g07440	<i>Arabidopsis thaliana</i> Brassicaceae	266	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ASX2	AY055094	At1g07440
2	At1g07450		260	S-Y-K	n. m. (K,D,I)	SDR65C	Q8RX32	AY090925	At1g07450
3	At2g29150		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ZW03	DQ056552	At2g29150
4	At2g29170		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ZW04	AAC95218	At2g29170
5	At2g29260		322 (cTP61)	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	Q9ZW12	AAC95209	At2g29260
6	At2g29290		262	S-Y-K	NADP (K,R)	SDR65C	Q9ZW13	BT010409	At2g29290

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
7	At2g29300	<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b> Brassicaceae	263	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	Q42182	BT000135	At2g29300
8	At2g29310		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	Q9ZW14	BT010425	At2g29310
9	At2g29320		269	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	Q9ZW15	AAC95206	At2g29320
10	At2g29330		260	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	Q9ZW16	BT005864	At2g29330
11	At2g29340		202	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	Q94C81	AAK59598	At2g29340
12	At2g29350		269	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ZW18	AY085321	At2g29350
13	At2g29360		271	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ZW19	AY045613	At2g29360
14	At2g29370		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q9ZW20	AAC95201	At2g29370
15	At2g30670		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	O49332	AAC02738	At2g30670
16	At5g06060		264	S-Y-K	NADP (R,R)	SDR65C	Q9LHT0	BT002894	At5g06060
1	BdTRL9	<b><i>Boechea divaricarpa</i><sup>a</sup></b> Brassicaceae	293	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B6REK7	ABW74557	/
2	BdTRL12		318 (cTP57)	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B2BXU1	ABW81118	/
3	BdTRL13		263	S-Y-K	NAD (G,D,I)	SDR65C	B2BXU2	ABW81119	/
4	BdTRL14		262	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXS3	ABW81120	/
5	BdTRL15		263	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXS4	ABW81121	/
6	BdTRL18		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXS5	ABW81122	/
7	BdTRL19		253	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXS6	ABW81123	/
8	BdTRL20		260	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXS8	ABW81125	/
9	BdTRL21		261	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXS9	ABW81126	/
10	BdTRL22		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXT0	ABW81127	/
11	BdTRL30		267	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B6REN3	ABW74581	/
1	CrTRL5	<b><i>Capsella rubella</i><sup>a</sup></b> Brassicaceae	271	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXX8	ABW81165	/
2	CrTRL6		272	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXX7	ABW81164	/
3	CrTRL13		313 (cTP45)	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B2BXX1	ABW81158	/
4	CrTRL14		263	S-Y-K	NAD (G,D,I)	SDR65C	B2BXX0	ABW81157	/
5	CrTRL15		262	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXW9	ABW81156	/
6	CrTRL17		263	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B2BXW7	ABW81154	/
7	CrTRL18		265	S-Y-K	n. m. (K,D,I)	SDR65C	B2BXW6	ABW81153	/

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
8	CrTRL19	<b>Capsella rubella<sup>a</sup></b> Brassicaceae	265	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXW5	ABW81152	/
9	CrTRL20		260	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXW4	ABW81151	/
10	CrTRL21		263	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXW3	ABW81150	/
11	CrTRL22		262	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXW2	ABW81149	/
12	CrTRL23		263	S-Y-K	NAD (S,D,I)	SDR65C	B2BXW1	ABW81148	/
13	CrTRL24		272	S-Y-K	NADP (Q,S,R)	SDR65C	B2BXW0	ABW81147	/
14	CrTRL26		271	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	B2BXV9	ABW81146	/
15	CrTRL27		268	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	B2BXV8	ABW81145	/
1	CsTRL1	<b>Cleome spinosa<sup>a</sup></b> Cleomaceae	257	S-Y-K	n. m. (R,D,I)	SDR65C	B2BXP1	ABW81078	/
2	CsTRL3		292	S-Y-K	n. m. (R,D,I)	/	B2BXP3	ABW81080	/
3	CsTRL4		262	S-Y-K	n. m. (G,D,K)	SDR65C	B2BXP5	ABW81082	/
4	CsTRL5		261	S-Y-K	n. m. (R,D,K)	SDR65C	B2BXP6	ABW81083	/
5	CsTRL6		264	S-Y-K	n. m. (G,D,K)	SDR65C	B2BXP7	ABW81084	/
6	CsTRL9		284	S-Y-K	n. m. (R,D,K)	SDR65C	B2BXP9	ABW81086	/
7	CsTRL10		269	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	B2BXQ1	ABW81088	/
8	CsTRL11		280	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	B2BXQ0	ABW81087	/
1	DcTRL1	<b>Daucus carota</b> Apiaceae	302 (cTP41)	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q84S34	BAC65128	/
1	DnTR1	<b>Dendrobium nobile</b> Orchidaceae	268	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	H9BQR7	AFD23287	/
2	DnTR2		272	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	H9BQR9	AFD23289	/
1	EcTRL1 <sup>b</sup>	<b>Erythroxylum coca</b> Erythroylanceae	272	S-Y-K	NAD (I,D,I)	<b>SDR110C</b>	H9BFQ0	JQ015102	/
2	EcTRL2 <sup>b</sup>		275	S-Y-K	NAD (I,D,I)	<b>SDR110C</b>	H9BFQ1	JQ015103	/
3	EcTRL3 <sup>b</sup>		258	S-Y-K	NADP (I,S,R)	<b>SDR25C</b>	H9BFQ2	JQ015104	/
1	GmTRL1	<b>Glycine max</b> Fabaceae	266	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	C6SY07	ACU14130	/
2	GmTRL2		269	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	C6W4T1	ACU16743	/
3	GmTRL3		212	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	C6T6Q8	ACU17500	/
4	GmTRL4		245	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	C6T7C6	ACU17728	/
5	GmTRL5		269	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	C6TBU9	ACU19301	/
6	GmTRL6		271	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	C6THG4	ACU21266	/

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
7	GmTRL7	<b><i>Glycine max</i></b> Fabaceae	263	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	/	XP_003537972	11g100799534
8	GmTRL8		307	S-Q-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	/	XP_003540716	12g100809170
1	HvTRL1 <sup>b</sup>	<b><i>Hordeum vulgare</i></b> Poaceae	270	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	F2CWF6	BAJ87177	/
1	MtTRL1	<b><i>Medicago truncatula</i></b> Fabaceae	264	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B7FIZ7	ACJ84726	/
2	MtTRL2		225	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B7FLK4	ACJ85638	/
3	MtTRL3		214	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	B7FLP5	ACJ85678	/
1	OsiTRL1	<b><i>Oryza sativa</i></b> <i>ssp. indica</i> Poaceae	270	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B8AKP3	EEC74938	/
2	OsiTRL2		264	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A2WQ48	EAY74094	Osl_01980
3	OsiTRL3		281	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	A2WYP4	EAY77090	Osl_05052
4	OsiTRL4		277	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	A2WYP5	EAY77091	Osl_05053
5	OsiTRL5		277	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	A2XEZ0	EAY89400	Osl_10905
6	OsiTRL6		308	S-Y-K	n. m. (R)	SDR65C	A2XEZ1	EAY89401	Osl_10906
7	OsiTRL7		350	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A2XP30	EAY92590	Osl_14331
8	OsiTRL8		260	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A2YSD8	EAZ05999	Osl_28244
1	OsjTRL1	<b><i>Oryza sativa</i></b> <i>ssp. japonica</i> Poaceae	281	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	Q942W0	BAB67934	Os01g70525
2	OsjTRL2_1		216	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	Q10NH6	ABF95186	Os03g16210
3	OsjTRL2_2		270	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	Q10NH7	ABF95185	Os03g16210
4	OsjTRL2_3		293	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	Q84K74	AAP06906	Os03g16210
5	OsjTRL3_1		213	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q10NH4	ABF95187	Os03g16220
6	OsjTRL3_2		263	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q10NH2	ABF95189	Os03g16220
7	OsjTRL3_3		268	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q10NH3	ABF95190	Os03g16220
8	OsjTRL3_4		271	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q10NH5	ABF95188	Os03g16220
9	OsjTRL3_5		311	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q84Q70	AAP06917	Os03g16220
10	OsjTRL4_1		269	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q10NH1	ABF95192	Os03g16230
11	OsjTRL4_2		308	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	Q84JJ3	ABF95191	Os03g16230
12	OsjTRL5		264	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q2R5F6	ABA93289	Os11g25160
13	OsjTRL6		260	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q53KZ3	ABA93379	Os11g25700

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
14	OsjTRL7	<b><i>Oryza sativa</i></b> <i>ssp. japonica</i> Poaceae	264	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q2R0A8	ABA95062	Os11g43200
15	OsjTRL8		268	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q2R092	ABA95078	Os11g43360
16	OsjTRL9		350	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	Q53JM9	AAX95325	OsJ_31167
17	OsjTRL10		277	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	Q942V9	BAB67935	/
1	PstTRL1	<b><i>Picea sitchensis</i></b>	265	S-Y-K	NADP(K,A,R)	SDR65C	D5AD75	ADE77494	/
2	PstTRL2	Pinaceae	266	S-Y-K	NADP (K,G,R)	SDR65C	D5ABQ5	ADE76974	/
1	PpTRL1	<b><i>Physcomitrella patens</i></b> Funariaceae	270	S-Y-K	NADP (R,A,R)	SDR65C	A9U349	EDQ49904	PHYPADRAFT_2 27898
1	PtTRL1	<b><i>Populus trichocarpa</i></b> Salicaceae	255	S-H-K	NADP (R,C,R)	SDR65C	B9GJ82	EEE84653	POPTRDRAFT_1 72537
2	PtTRL2		266	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B9HML1	EEE88549	POPTRDRAFT_8 32557
3	PtTRL3		260	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B9I7Y9	EEE95485	POPTRDRAFT_5 70880
4	PtTRL4		267	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B9I7Z0	EEE95486	POPTRDRAFT_8 34497
5	PtTRL5		267	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A9PDY4	ABK94587	/
6	PtTRL6		265	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B9HWY3	EEF01103	POPTRDRAFT_8 33658
7	PtTRL7		253	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A9PI58	ABK96061	/
8	PtTRL8		266	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	A9PEY3	EEE84652	POPTRDRAFT_7 06088
9	PtTRL9		267	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B9HC33	EEE91696	POPTRDRAFT_5 60806
10	PtTRL10		275	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B9HC34	EEE91697	POPTRDRAFT_7 17182
ψ1	PtTRL11		172	S-Y-K	Kein TGxxxGxG!	SDR65C	B9P678	EEE74229	POPTRDRAFT_9 45394
1	RcTRL1	<b><i>Ricinus communis</i></b> Euphorbiaceae	255	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	B9S3E0	EEF41922	RCOM_0732870
2	RcTRL2		266	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B9T429	EEF29390	RCOM_0233850
3	RcTRL3		272	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B9SDZ5	EEF38138	RCOM_1480890

Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
4	RcTRL4	<i>Ricinus communis</i> Euphorbiaceae	268	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	B9S3D8	EEF41920	RCOM_0732750
5	RcTRL5*		582 (1. cTP45)	S-H-K S-Y-K	NADP (R,C,R) NADP (K,S,R)	SDR65C SDR65C	B9S3E2	EEF41924	RCOM_0732990
ψ1	RcTRL6		148	S-Y-K	Kein TGxxxGxG!	/	B9TC11	EEF26603	RCOM_0418450
1	SmTRL1*	<i>Selaginella moellendorffii</i> Selaginellaceae	532	S-Y-K S-Y-K	NADP (R,S,R) NADP (R,S,R)	SDR65C SDR65C	D8SBE7	EFJ18376	SELMODRAFT_444601
2	SmTRL2*		561	S-Y-K S-Y-K	NADP (R,S,R) NADP (R,S,R)	SDR65C SDR65C	D8S0S1	EFJ22098	SELMODRAFT_416905
1	Sb01g039880	<i>Sorghum bicolor</i> Poaceae	273	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	C5WQ28	EER92492	Sb01g039880
2	Sb05g004530		301	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	C5Y5Q0	EES08074	Sb05g004530
3	Sb05g025820		264	S-Y-K	NADP (R,R,R)	SDR65C	C5Y7C9	EES10195	Sb05g025820
4	Sb05g025827		251	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	C5Y7D2	EES10197	Sb05g025827
5	Sb05g025830		271	S-S-P	NADP (K,A,R)	SDR65C	C5Y7D3	EES10198	Sb05g025830
6	Sb05g025840		266	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	C5Y7D4	EES10199	Sb05g025840
7	Sb05g025860		259	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	C5Y7D7	EES10202	Sb05g025860
8	Sb05g027900		284	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	C5Y1T8	EES09066	Sb05g027900
1	VvTRL1	<i>Vitis vinifera</i> Vitaceae	274	S-Q-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	A5AJK7	CAN69103	VITISV_027298
2	VvTRL2		270	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	A5AYP2	CAN69507	VITISV_016037
3	VvTRL3		298	S-Y-K	n. m. (K)	SDR65C	A5AYP3	CAN69508	VITISV_016038
4	VvTRL4*		866	S-Y-K S-Y-K	n. m. (L) NADP (L,S,R)	SDR65C	A5BDB5	CAN72262	VITISV_037365
5	VvTRL5		307	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	A5BEX4	CAN74482	VITISV_028249
6	VvTRL6		270	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	A5BIT3	CAN63543	VITISV_035429
7	VvTRL7		498	S-Y-K	n. m. (R)	SDR65C	A5BN03	CAN77076	VITISV_005617
8	VvTRL8		270	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	D7SK85	CBI16061	VIT_06s0004g05430
9	VvTRL9		270	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	D7SK90	CBI16066	VIT_06s0004g05380



Nr.	Protein	Pflanze Familie	Länge (AS)	Katalyt. Triade	Cosubstrat-Vorhersage	SDR-Familie	UniProt-Eintrag	EMBL-Eintrag	Genlocus oder ORF
10	VvTRL10	<i>Vitis vinifera</i> Vitaceae	252	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	D7SK92	CBI16068	VIT_06s0004g05370
11	VvTRL11		252	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	D7SK98	CBI16074	VIT_06s0004g05320
12	VvTRL12		252	S-Q-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	D7SKA2	CBI16078	VIT_06s0004g05280
13	VvTRL13		267	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	D7THJ0	CBI30506	VIT_08s0007g00920
14	VvTRL14		250	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	D7THJ3	CBI30509	VIT_08s0007g00890
15	VvTRL15		268	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	D7TLP2	CBI31629	VIT_13s0019g02180
16	VvTRL16		271	S-Y-K	NADP (L,S,R)	SDR65C	D7TLP5	CBI31632	VIT_13s0019g02140
1	ZmTRL1	<i>Zea mays</i> Poaceae	273	S-Y-K	NADP (R,S,R)	SDR65C	B6TAE7	ACG34080	/
2	ZmTRL2		276	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B6TXT0	ACG41913	/
3	ZmTRL3		263	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B6SUU1	ACG28624	/
4	ZmTRL4		268	S-Y-K	NADP (K,S,R)	SDR65C	B6SZL1	ACG30294	/
5	ZmTRL5		263	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	B4FFM6	ACF80919	/
6	ZmTRL6		280	S-Y-K	NADP (K,A,R)	SDR65C	C4J719	ACR36969	/

grau unterlegt: Sequenzen ohne Y in katalytischer Triade.

n. m. Vorhersage der Cosubstratpräferenz nicht möglich.

Ψ Verkürzte Sequenzen ohne Cosubstratbinderegion TGxxxGxG, deshalb vermutlich ohne enzymatische Aktivität.

<sup>a</sup>TRL-Gene aus diesen Pflanzen wurden entdeckt und benannt durch Aura Navarro-Quezada (Navarro-Quezada, 2007).

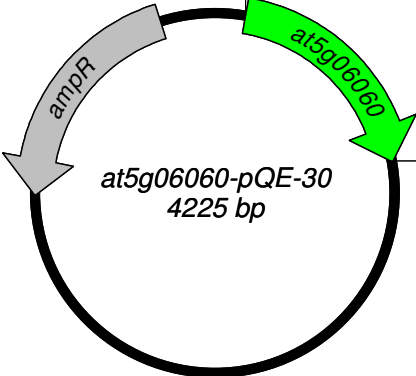
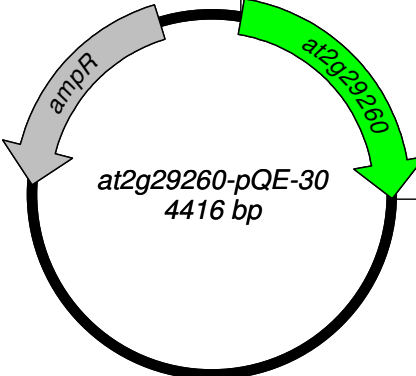
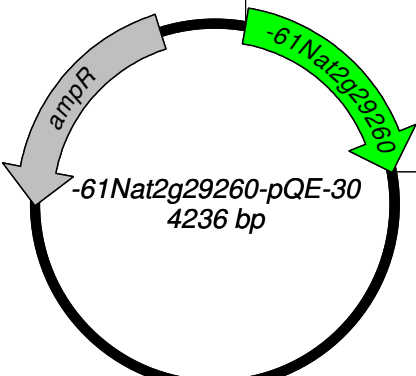
<sup>b</sup>Diese Sequenzen wurden als TR-like bezeichnet (Jirschitzka et al., 2012), gehören aber nicht zur Familie SDR65C (< 50 % Identität zu Solanaceen-TRs).

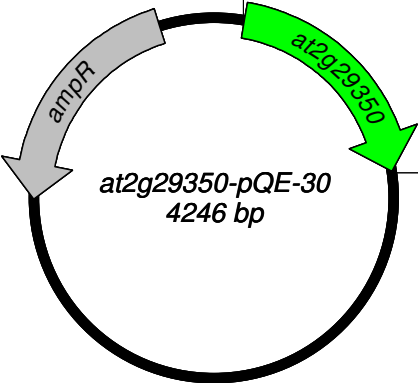
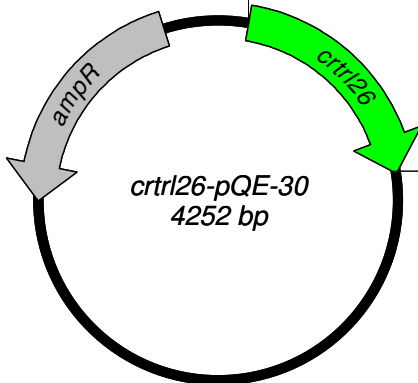
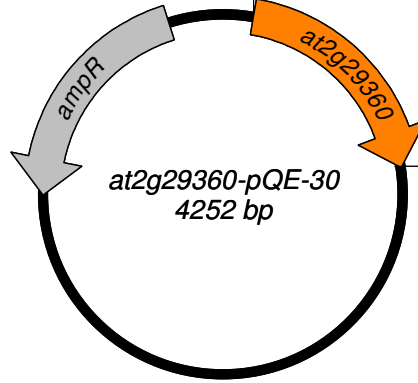
Alle weiteren TRLs dieser Liste sind aus der SDR-Familie SDR65C der SDR-Datenbank ([www.sdr-enzymes.org](http://www.sdr-enzymes.org)) entnommen und wurden für diese Arbeit aufsteigend als TRL1-x durchnummeriert (Stand: 04.05.2012). Es sind Proteine deren Funktionen bisher nicht untersucht wurden („putative uncharacterized protein“).

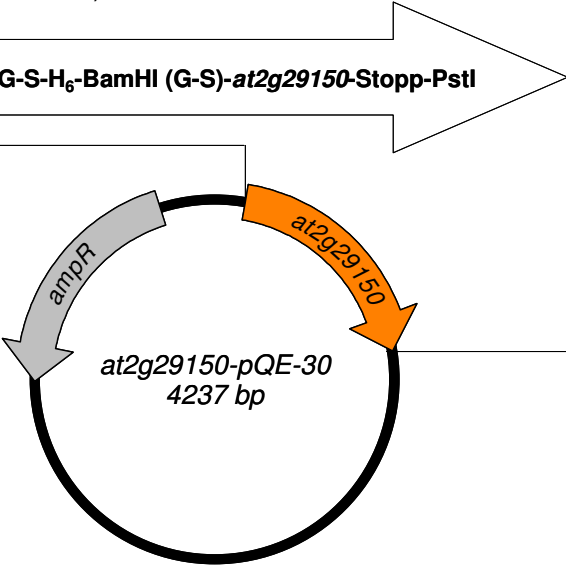
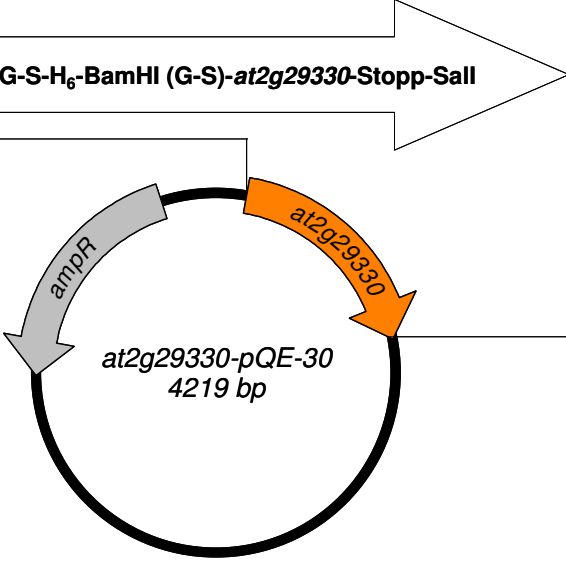
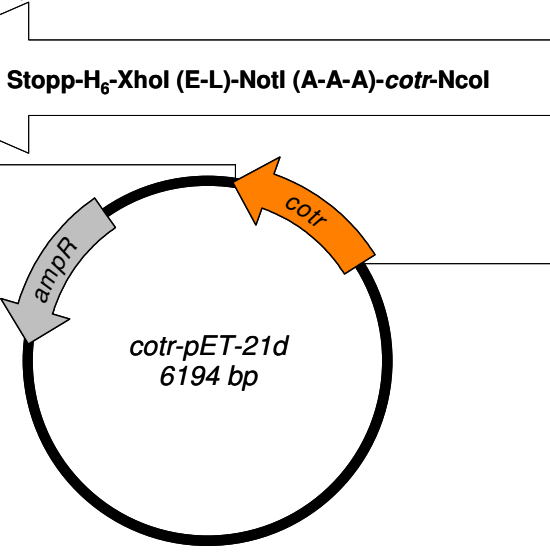
Tropinonreduktasen und TRL aus Solanaceaeen (*Datura*, *Hyoscyamus*, *Anisodus* und *Solanum*), sowie aus *Calystegia sepium* (Convolvulaceae) und *Cochlearia officinalis* (Brassicaceae) wurden nicht aufgeführt. Diese Pflanzen enthalten Tropanalkaloide und/oder Calystegine, wodurch die Abtrennung der TRL Proteine von Tropinonreduktasen ohne funktionelle Untersuchung nicht möglich ist.

Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da im Zuge diverser Genom-Projekte ständig neue TRL Gene gefunden und in die SDR-Datenbank integriert werden. Vielmehr soll die Tabelle Beispiele für die Verbreitung der TRL im Pflanzenreich übersichtlich darstellen.

Tab. A3 Vektorkarten und Eigenschaften der Fusionsproteine

Synthese-Vektor	Eigenschaften Fusionsprotein
<p data-bbox="193 376 890 479"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-at5g06060-Stopp-PstI</b></p>  <p data-bbox="427 680 663 741"><i>at5g06060-pQE-30</i> 4225 bp</p>	<p data-bbox="930 360 1166 394">Name: At5g06060</p> <p data-bbox="930 412 1294 445">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="930 463 1294 497">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="930 515 1313 548">Länge des Proteins: 275 AS</p> <p data-bbox="930 566 1369 600">Molekulargewicht: 29559,5 Da</p> <p data-bbox="930 667 1404 831">Das erste Tripletts von <i>at5g06060</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (12 Triplets).</p>
<p data-bbox="193 981 890 1084"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-SphI (A-C)-at2g29260-Stopp-XmaI</b></p>  <p data-bbox="427 1263 663 1323"><i>at2g29260-pQE-30</i> 4416 bp</p>	<p data-bbox="930 958 1166 992">Name: At2g29260</p> <p data-bbox="930 1010 1294 1043">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="930 1061 1294 1095">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="930 1113 1313 1146">Länge des Proteins: 335 AS</p> <p data-bbox="930 1164 1369 1198">Molekulargewicht: 36679,7 Da</p> <p data-bbox="930 1265 1404 1429">Das erste Tripletts von <i>at2g29260</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (14 Triplets).</p>
<p data-bbox="193 1563 890 1666"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-SphI (A-C)-61Nat2g29260-Stopp-XmaI</b></p>  <p data-bbox="427 1854 663 1915"><i>-61Nat2g29260-pQE-30</i> 4236 bp</p>	<p data-bbox="930 1547 1230 1581">Name: -61Nat2g29260</p> <p data-bbox="930 1599 1294 1632">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="930 1650 1294 1684">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="930 1702 1313 1736">Länge des Proteins: 275 AS</p> <p data-bbox="930 1753 1369 1787">Molekulargewicht: 30110,2 Da</p> <p data-bbox="930 1854 1404 2018">Die ersten 61 Triplets von <i>at2g29260</i> wurden weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (14 Triplets).</p>

Synthese-Vektor	Eigenschaften Fusionsprotein
<p data-bbox="197 331 879 365"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-SphI (A-C)-at2g29350-Stopp-PstI</b></p>  <p data-bbox="416 613 655 674"><i>at2g29350-pQE-30</i> 4246 bp</p>	<p data-bbox="927 304 1166 338">Name: At2g29350</p> <p data-bbox="927 353 1294 387">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="927 403 1294 436">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="927 452 1310 486">Länge des Proteins: 282 AS</p> <p data-bbox="927 501 1358 535">Molekulargewicht: 30261,2 Da</p> <p data-bbox="927 607 1406 775">Das erste Tripletts von <i>at2g29350</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (14 Tripletts).</p>
<p data-bbox="197 920 879 954"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-ctrl26-Stopp-Sall</b></p>  <p data-bbox="416 1202 655 1263"><i>ctrl26-pQE-30</i> 4252 bp</p>	<p data-bbox="927 893 1134 927">Name: CrTRL26</p> <p data-bbox="927 943 1294 976">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="927 992 1294 1025">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="927 1041 1310 1075">Länge des Proteins: 282 AS</p> <p data-bbox="927 1090 1358 1124">Molekulargewicht: 30553,7 Da</p> <p data-bbox="927 1196 1406 1364">Das erste Tripletts von <i>ctrl26</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (12 Tripletts).</p>
<p data-bbox="197 1424 400 1458">(Wagner, 2011)</p> <p data-bbox="197 1514 879 1547"><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-at2g29360-Stopp-Sall</b></p>  <p data-bbox="416 1807 655 1868"><i>at2g29360-pQE-30</i> 4252 bp</p>	<p data-bbox="927 1496 1166 1529">Name: At2g29360</p> <p data-bbox="927 1545 1294 1579">Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]</p> <p data-bbox="927 1594 1294 1628">His-Tag: 6 x His, N-terminal</p> <p data-bbox="927 1644 1310 1677">Länge des Proteins: 282 AS</p> <p data-bbox="927 1693 1358 1727">Molekulargewicht: 30452,6 Da</p> <p data-bbox="927 1798 1406 1966">Das erste Tripletts von <i>at2g29360</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektorkodierten Transkriptionsstart ersetzt (12 Tripletts).</p>

Synthese-Vektor	Eigenschaften Fusionsprotein
<p>(Plohmann, 2010)</p> <p><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-at2g29150-Stopp-PstI</b></p>  <p><i>at2g29150-pQE-30</i> 4237 bp</p>	<p>Name: At2g29150  Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]  His-Tag: 6 x His, N-terminal  Länge des Proteins: 279 AS  Molekulargewicht: 29972,8 Da</p> <p>Das erste Triplet von <i>at2g29150</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektor-kodierten Transkriptionsstart ersetzt (12 Triplets).</p>
<p>(Coppi, 2012)</p> <p><b>M-R-G-S-H<sub>6</sub>-BamHI (G-S)-at2g29330-Stopp-Sall</b></p>  <p><i>at2g29330-pQE-30</i> 4219 bp</p>	<p>Name: At2g29330  Stamm: <i>E. coli</i> M15[pREP4]  His-Tag: 6 x His, N-terminal  Länge des Proteins: 271 AS  Molekulargewicht: 28928,8 Da</p> <p>Das erste Triplet von <i>at2g29330</i> (ATG, kodiert Methionin) wurde weggelassen und durch den vektor-kodierten Transkriptionsstart ersetzt (12 Triplets).</p>
<p>(Brock, 2008)</p> <p><b>Stopp-H<sub>6</sub>-XhoI (E-L)-NotI (A-A-A)-cotr-NcoI</b></p>  <p><i>cotr-pET-21d</i> 6194 bp</p>	<p>Name: CoTR  Stamm: <i>E. coli</i> Rosetta-gami (DE3)  His-Tag: 6 x His, C-terminal  Länge des Proteins: 284 AS  Molekulargewicht: 30756,8 Da</p> <p>Das erste Triplet des Leserahmens (ATG, kodiert Methionin) wird von der Schnittstelle NcoI codiert. Am C-Terminus wurde das Stopp-Codon entfernt, dafür befinden sich dort zusätzliche 11 Triplets.</p>

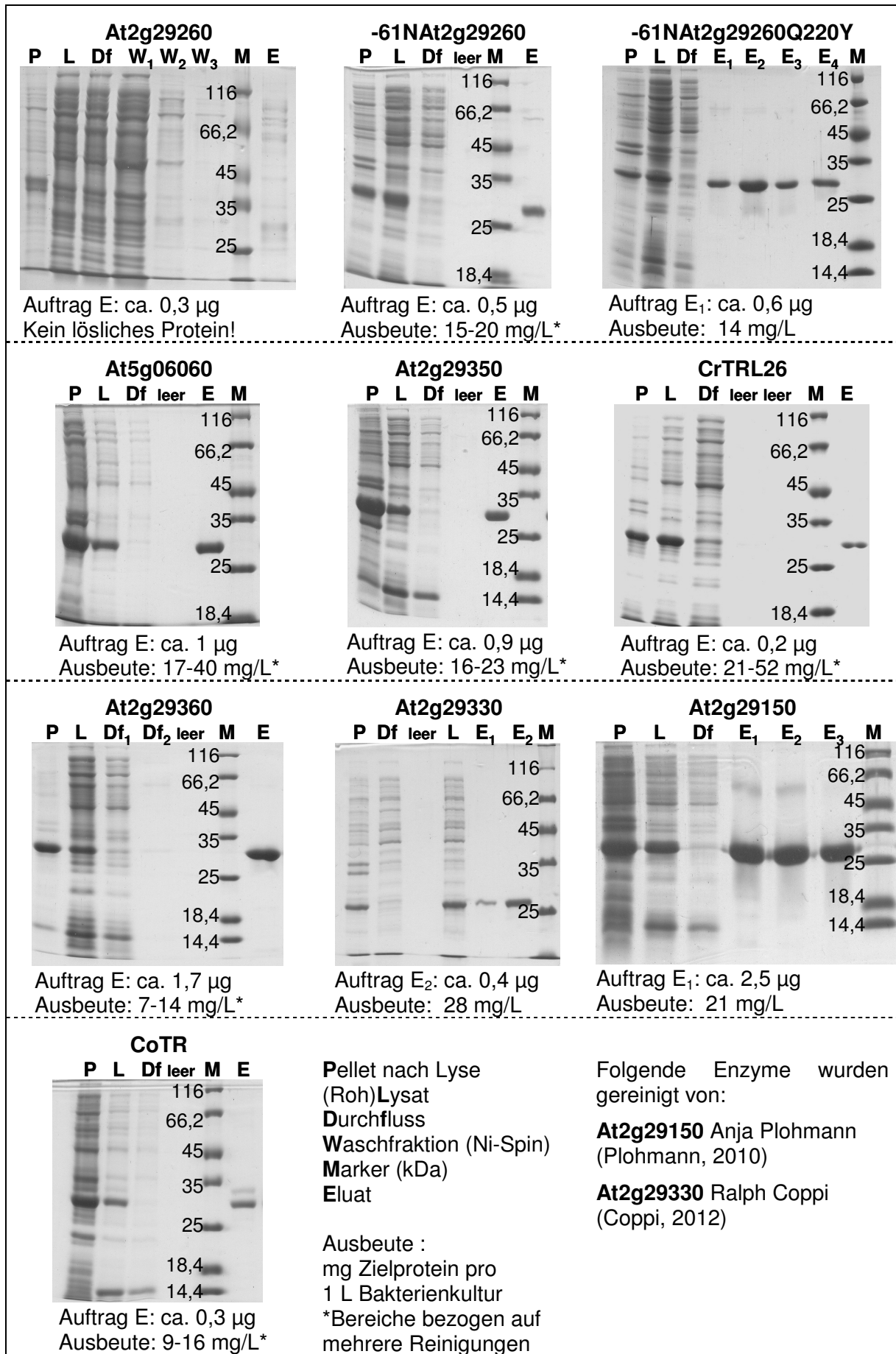
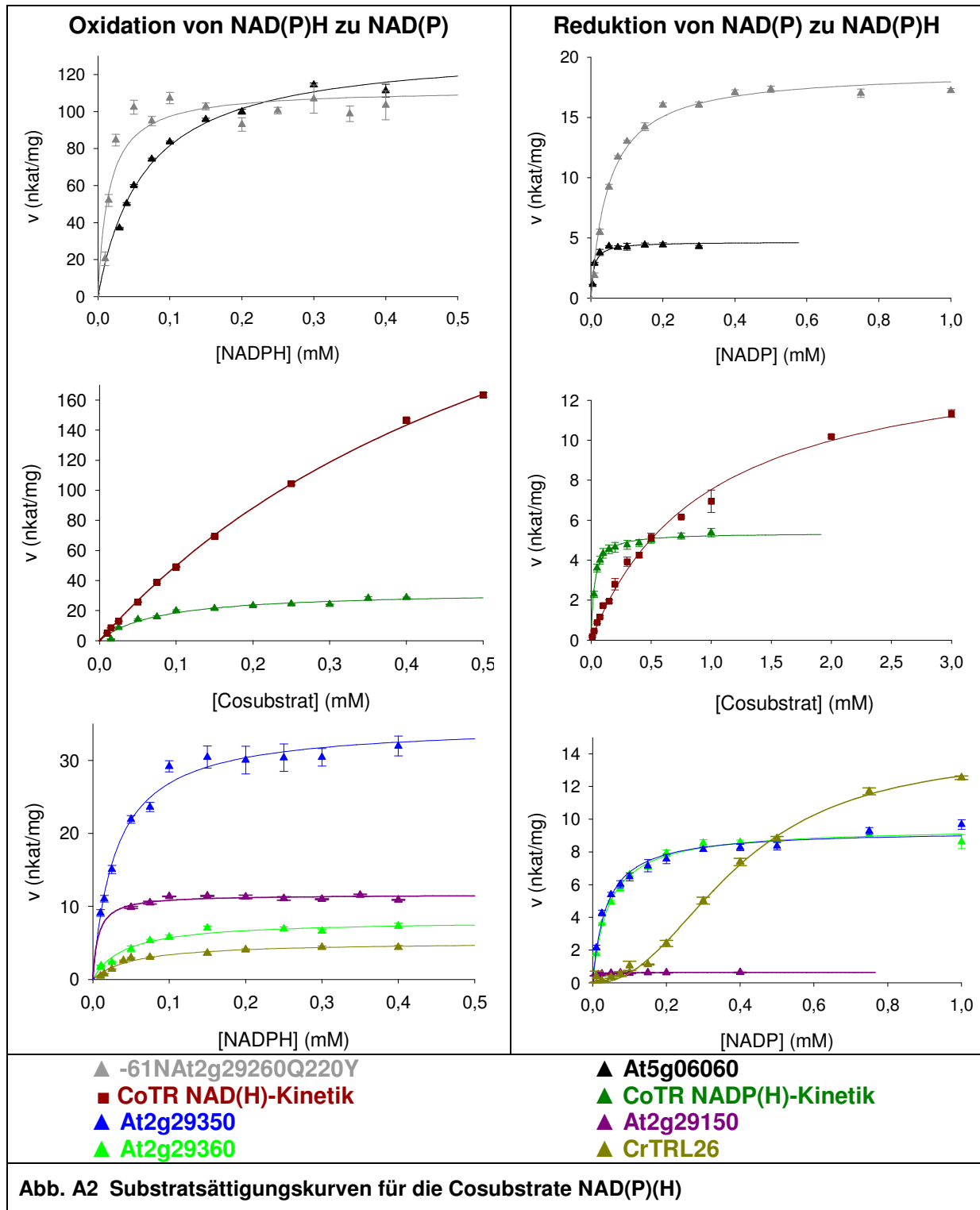


Abb. A1 Elektropherogramme (SDS-PAGE) der gereinigten Fusionsproteine



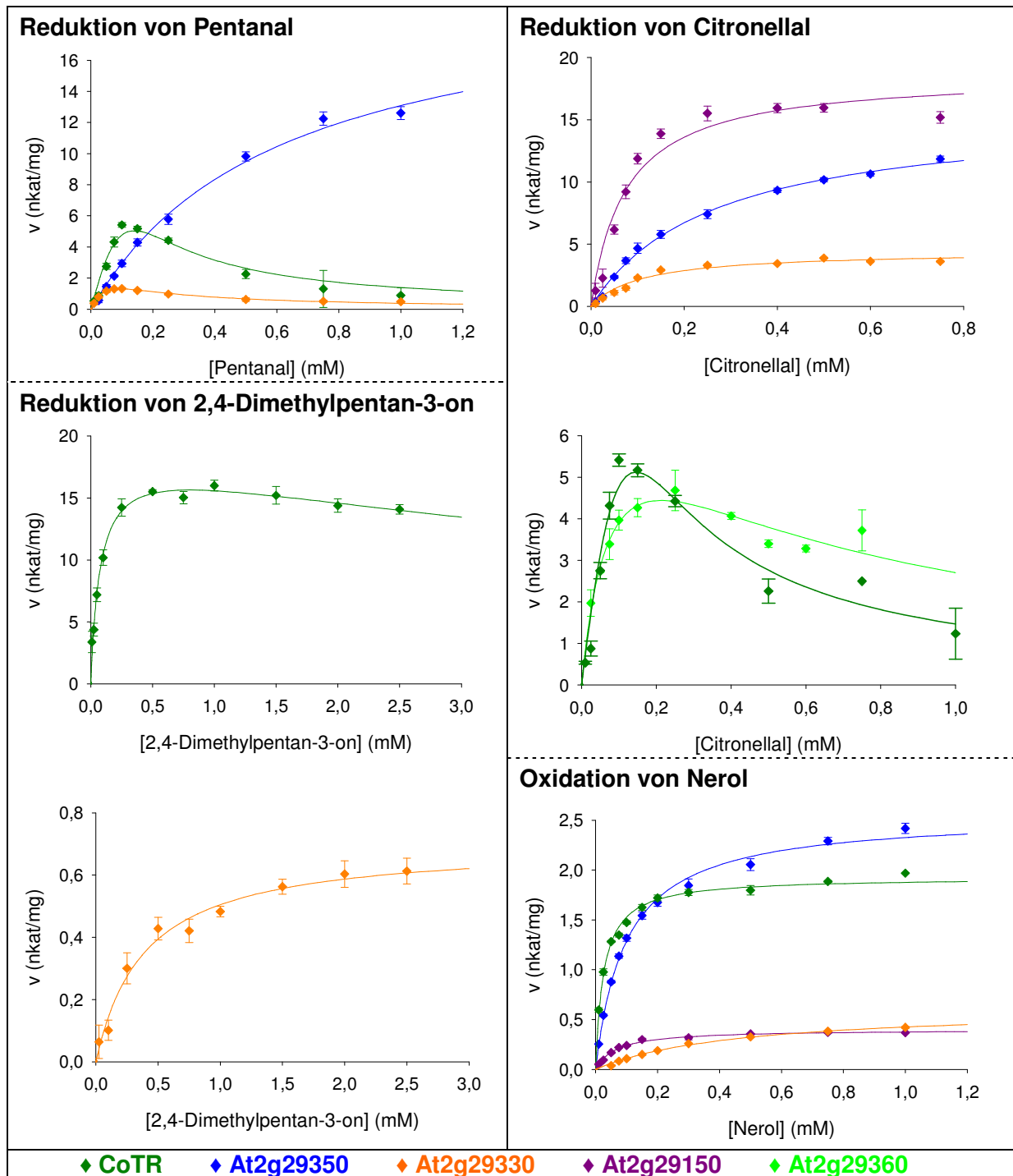


Abb. A3 Substratsättigungskurven für kleine aliphatische Carbonyle/Alkohole

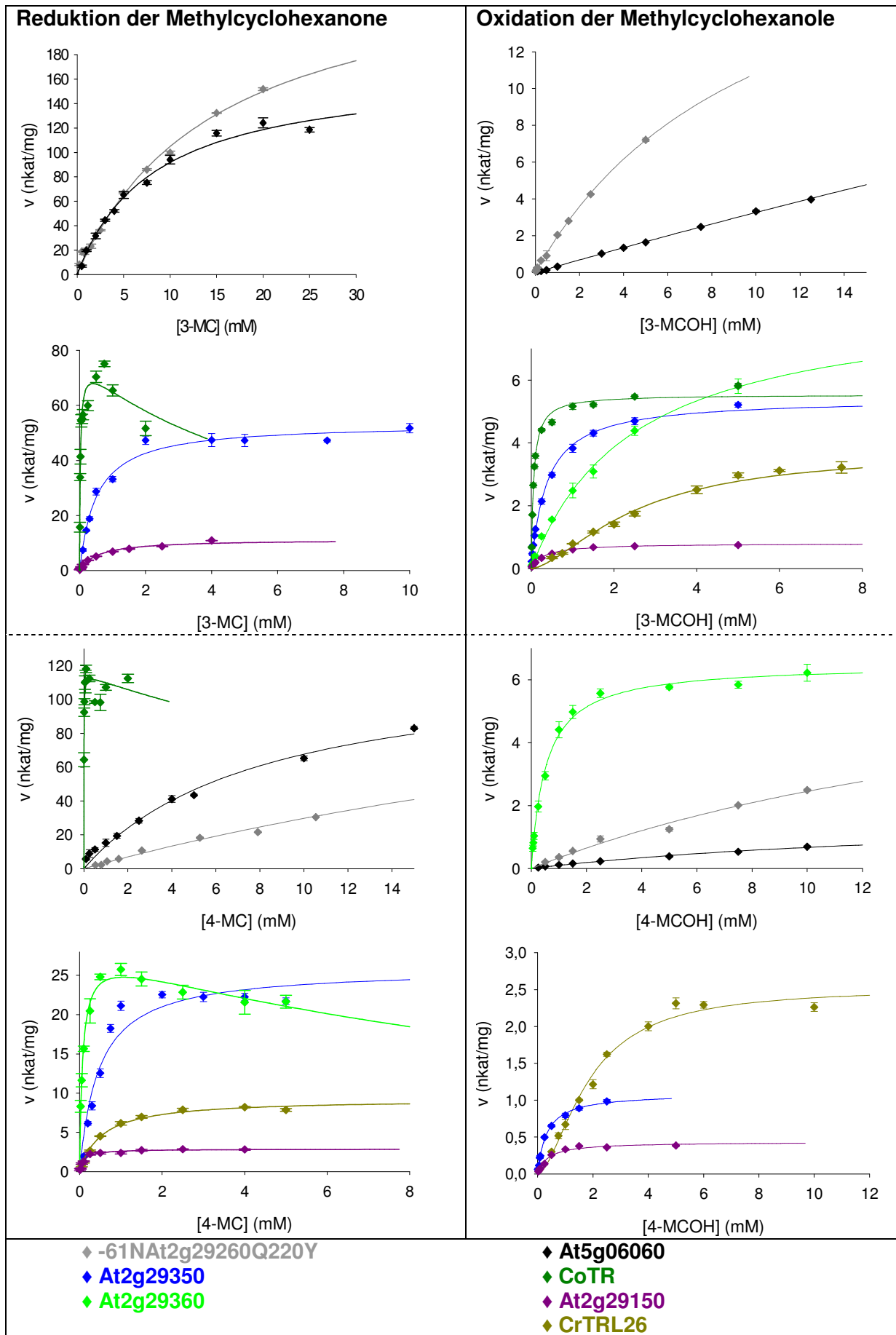


Abb. A4 Substratsättigungskurven für Methylcyclohexanone/ole



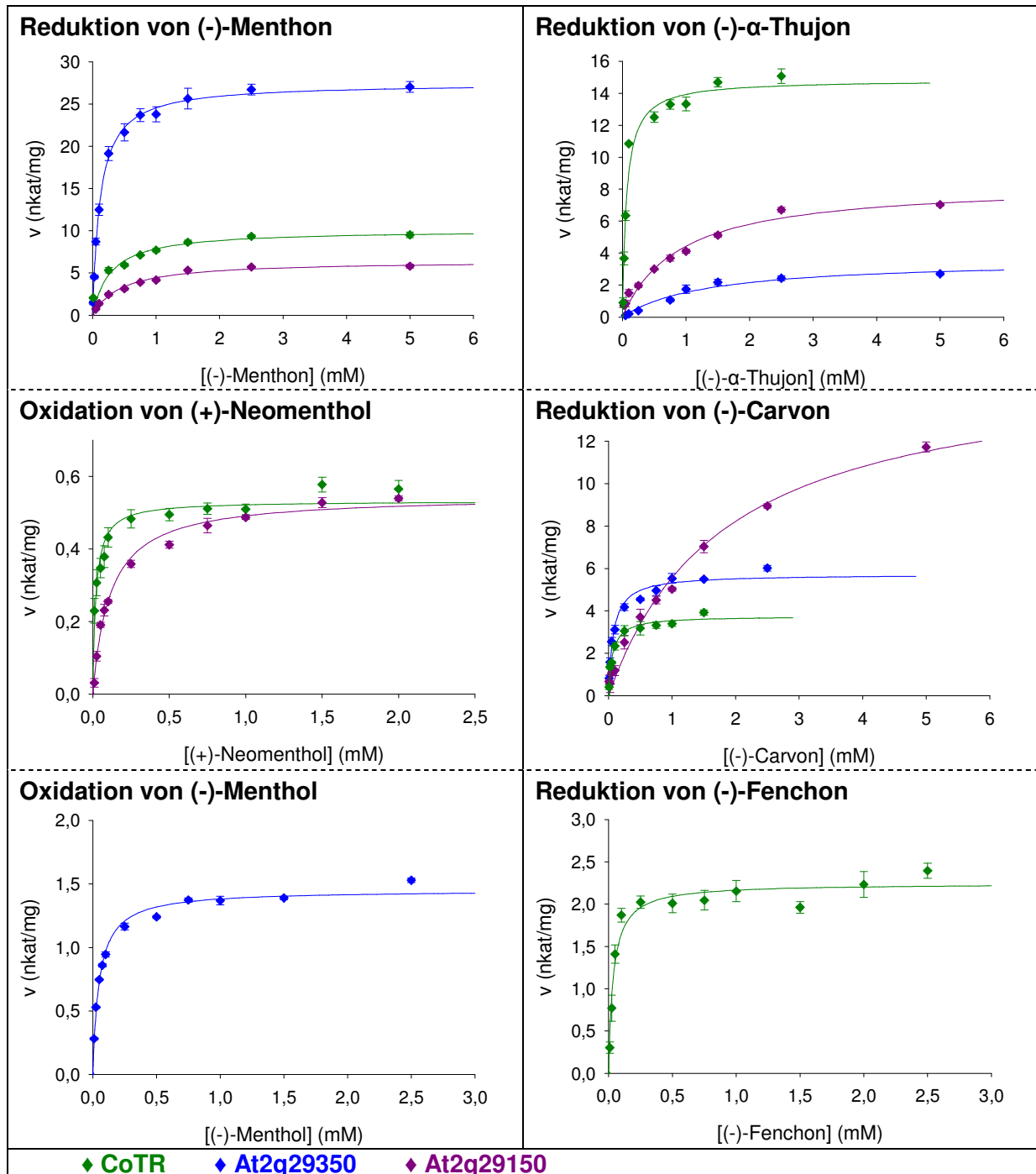


Abb. A5 Substratsättigungskurven für Monoterpene

Tab. A4 <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR Daten für (-)-α-Thujon und Reduktionsprodukte in CDCl<sub>3</sub>

Pos.	(-)-α-Thujon GC-MS: t <sub>ret</sub> = 8,65 min		(-)-Neothujol GC-MS: t <sub>ret</sub> = 9,97 min		(-)-Thujol GC-MS: t <sub>ret</sub> = 10,51 min	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	29,6	---	34,5	---	31,2	---
2	39,7	2,546 ddd (15,8;2,4;1,2) 2,071 d (18,8)	35,9	2,058 ddd (14,1;6,8;1,9) 1,532 dd (14,1;1,0)	33,4	1,933 dd (12,1;7,2) 1,556 ddd (12,1;9,1;1,3)
3	221,4	---	80,2	3,899 dddd (6,8;1,0;1,0;1,0)	72,6	3,943 ddd (9,1;7,2;7,0)
4	47,3	2,220 qd (7,5;1,2)	45,3	1,922 br q (7,3)	37,3	2,153 dq (7,1;7,0)
5	25,5	1,085 dd (8,1;4,0)	29,6	0,828 ddd (8,2;3,9;1,0)	28,2	0,858 dd (8,3;3,9)
6	18,7	0,762 ddd (8,1;5,6;2,4) 0,124 dd (5,6;4,0)	17,2	0,802 dd (4,2;3,9) 0,418 ddd (8,2;4,2;1,9)	14,4	0,351 dd (5,1;3,9) 0,231 ddd (8,3;5,1;1,3)
7	32,9	1,355 sept (6,9)	32,9	1,299 sept (6,9)	33,3	1,234 sept (6,9)
8 <sup>a</sup>	19,7	1,008 d (6,9)	19,9	0,934 d (6,8)	19,6	0,961 d (6,9)
9 <sup>a</sup>	20,0	0,954 d (6,9)	20,2	0,906 d (6,8)	20,1	0,905 d (6,9)
10	18,2	1,158 d (7,5)	20,1	0,940 d (7,3)	14,4	0,926 d (7,1)

<sup>a</sup>Positionen könnten auch vertauscht vorliegen, keine eindeutige Signalzuordnung möglich.

<sup>13</sup>C-NMR (chem. Verschiebung δ in ppm)

<sup>1</sup>H-NMR (chem. Verschiebung δ in ppm, Multiplizität, (Kopplungsfrequenz J in Hz))

d, Duplett; dd; Duplett vom Duplett usw.; q, Quartett; sept, Septett; br, Kopplung nicht aufgelöst.

Referenzen: (-)-α-Thujon: (Bohlmann et al., 1975; Sirisoma et al., 2001)  
 (-)-Thujol (Baeckström et al., 1996; Bohlmann et al., 1975)  
 (-)-Neothujol keine Literatur vorhanden

Tab. A5 Retentionszeiten und Hauptfragmente der Reduktionsprodukte (GC-MS)

Reduktionsprodukte	$t_{\text{ret}}$ [min]	Hauptfragmente (% Häufigkeit)					Standard/ Referenz
<b>Monoterpene und Analoga</b>							
(+)-Neomenthol	11,21	71(100)	81(59)	109(11)	123(23)	138(23)	(+)-Neo- menthol
(-)-Menthol	11,48	71(97)	81(100)	109(13)	123(36)	138(20)	(-)-Menthol
(-)-Neothujol	9,97	55(94)	79(58)	93(100)	121(53)	136(18)	$^{13}\text{C}$ -/ $^1\text{H}$ -NMR
(-)-Thujol	10,51	55(100)	79(47)	93(83)	121(72)	136(20)	
(-)- <i>trans</i> -Carveol	13,31	69(23)	84(60)	109(100)	134(4)	<b>152(7)</b>	(van der Werf et al., 1999)
(-)- <i>cis</i> -Carveol	13,77	69(40)	84(100)	109(63)	134(42)	<b>152(2)</b>	
(+)- $\alpha$ -Fenchol	9,99	81(100)	93(15)	111(13)	121(11)	139(2)	(+)- $\alpha$ - Fenchol
(+)- $\beta$ -Fenchol	10,15	81(100)	93(16)	111(14)	121(12)	139(4)	
(+)-Borneol	11,73	67(10)	95(100)	110(20)	121(6)	139(6)	(-)-Borneol
Decalole	15,46	94(56)	107(33)	121(46)	136(100)	<b>154(1)</b>	Reduktion mit $\text{NaBH}_4$
	15,76	94(68)	107(40)	121(56)	136(100)	<b>154(1)</b>	
	17,10	94(100)	107(35)	121(53)	136(81)	<b>154(1)</b>	
	17,22	94(81)	107(43)	121(61)	136(100)	<b>154(0)</b>	
<b>Aliphatische Carbonyle</b>							
Citronellol	13,14	69(100)	95(37)	109(13)	123(16)	<b>156(3)</b>	NIST 2008
Nerol	13,13	69(100)	93(21)	111(5)	123(9)	139(2)	Nerol
Geraniol	14,00	69(100)	93(11)	111(5)	123(8)	139(2)	Geraniol
2,4-Dimethylpentan- 3-ol	4,58	41(2)	43(31)	55(62)	72(13)	73(100)	NIST 2008
Pentanol	3,40	31(65)	41(68)	42(100)	55(61)	70(27)	NIST 2008
<b>Aromatische Carbonyle</b>							
Benzylalkohol	9,07	77(67)	79(100)	91(14)	107(49)	<b>108(69)</b>	NIST 2008
<i>p</i> -Methoxy benzylalkohol	17,55	77(58)	94(50)	109(100)	121(57)	<b>138(92)</b>	NIST 2008
Indol-3-carbinol (silyliert mit BSTFA)	13,13	73(100)	147(13)	202(57)	290(31)	<b>291(34)</b>	Indol-3- carbinol
<b>Jasmonate</b>							
6- <i>epi</i> -7- <i>iso</i> -MeCA 3- <i>iso</i> -MeCA	11,26	79(59)	119(34)	134(100)	152(12)	195(0)	Reduktion mit $\text{NaBH}_4$ (Dathe et al., 1991)
7- <i>iso</i> -MeCA 6- <i>epi</i> -3- <i>iso</i> -MeCA	11,43	79(100)	119(66)	134(95)	152(39)	195(9)	
6- <i>epi</i> -7- <i>iso</i> -MeDHCA 3- <i>iso</i> -MeDHCA	11,20	74(100)	136(39)	153(9)	196(1)	210(1)	Reduktion mit $\text{NaBH}_4$ (Dathe et al., 1991)
7- <i>iso</i> -MeDHCA 6- <i>epi</i> -3- <i>iso</i> -MeDHCA	11,36	74(100)	136(30)	153(27)	196(3)	210(4)	
<b>Steroide</b>							
Testosteron	10,92	124(100)	147(30)	203(16)	246(22)	<b>288(26)</b>	Testosteron
5-Androsten-3,17-diol	9,73	161(37)	205(37)	239(28)	272(28)	<b>290(35)</b>	NIST 2008
4-Pregnen-20-ol-3- one	12,71	124(100)	149(22)	274(7)	298(6)	<b>316(8)</b>	NIST 2008
	12,96	124(100)	149(20)	274(6)	298(7)	<b>316(9)</b>	
5-Pregnen-3 $\beta$ ,20-diol	11,32	189(41)	233(31)	267(21)	300(22)	<b>318(30)</b>	NIST 2008

Tab. A6 Retentionszeiten und Hauptfragmente der Oxidationsprodukte (GC-MS)

Oxidationsprodukte	$t_{\text{ret}}$ [min]	Hauptfragmente (% Häufigkeit)					Standard/ Referenz
<b>Monoterpene</b>							
(-)-Menthon	10,82	69(91)	97(33)	112(100)	139(36)	<b>154</b> (22)	(-)-Menthon
(-)-Campher	11,04	81(77)	95(100)	108(45)	137(4)	<b>152</b> (26)	(+)-Campher
<b>Aliphatische Carbonyle</b>							
Neral	13,56	69(100)	94(20)	109(15)	119(6)	137(2)	Citral
<b>Aromatische Carbonyle</b>							
Indol-3-carbaldehyd (silyliert mit BSTFA)	11,77	73(100)	147(5)	290(61)	291(17)	<b>359</b> (9)	Indol-3- carbaldehyd
<b>Steroide</b>							
4-Androsten-3,17- dion	10,64	124(100)	148(57)	201(21)	244(44)	<b>286</b> (68)	4-Androsten- 3,17-dion

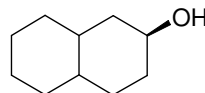
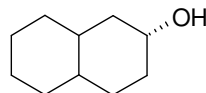
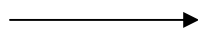
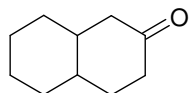
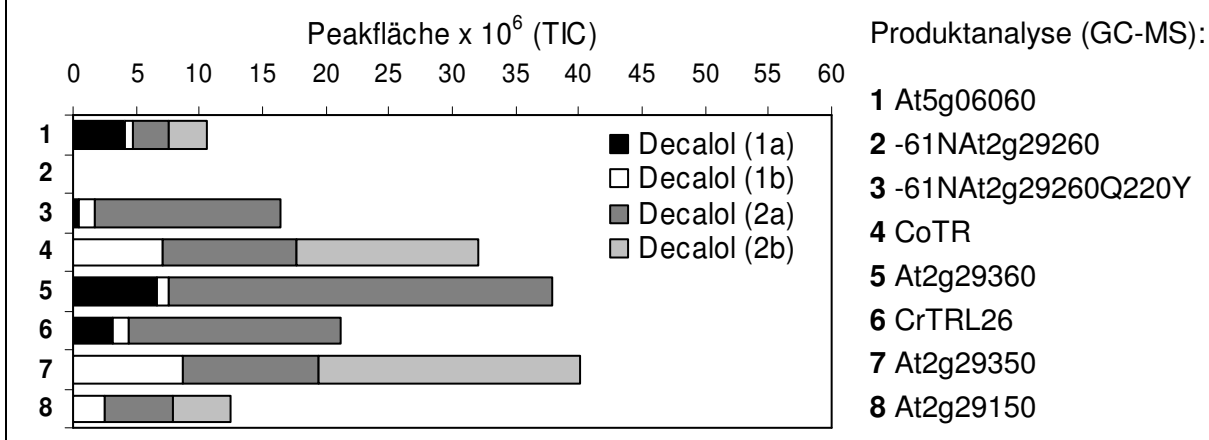
**Reduktion von 2-Decalon**2-Decalon (*cis* und *trans*)*cis*- und *trans*-Decalole (je 2 Diastereomere)

Abb. A6 Reduktion von 2-Decalon

## 7 Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Andrade, L.H., Utsunomiya, R.S., Omori, A.T., Porto, A.L.M., Comasseto, J.V., 2006. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *J Mol Catal B: Enzym.* 38, 84-90.
- Baekström, P., Koutek, B., Saman, D., Vrkoc, J., 1996. A convenient synthesis of trans-sabinene hydrate from (-)-3-thujol via a highly selective ene reaction of singlet oxygen. *Bioorg Med Chem.* 4, 419-421.
- Bagno, A., Scorrano, G., Terrier, F., 1990. The excess basicity of alkali-metal methoxides in methanol. *J Chem Soc, Perkin Trans 2.* 1017-1027.
- Bairoch, A. and Apweiler, R., 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28, 45-48.
- Bartholomew, B.A., Smith, M.J., Long, M.T., Darcy, P.J., Trudgill, P.W., Hopper, D.J., 1995. Tropine dehydrogenase - Purification, some properties and an evaluation of its role in the bacterial metabolism of tropine. *Biochem J.* 307, 603-608.
- Baud, S., Dichow, N.R., Kelemen, Z., d'Andrea, S., To, A., Berger, N., Canonge, M., Kronenberger, J., Viterbo, D., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Chardot, T., Miquel, M., 2009. Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 50, 1463-1478.
- Bauer, P., Munkert, J., Brydziun, M., Burda, E., Müller-Uri, F., Groger, H., Muller, Y.A., Kreis, W., 2010. Highly conserved progesterone 5 beta-reductase genes (P5 beta R) from 5 beta-cardenolide-free and 5 beta-cardenolide-producing angiosperms. *Phytochemistry.* 71, 1495-1505.
- Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Ladenstein, R., 1999. The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: Observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 angstrom resolution by X-ray crystallography. *J Mol Biol.* 289, 335-355.
- Bennoun, P., 1982. Evidence for a respiratory-chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79, 4352-4356.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2011. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 39, D32-D37.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
- Blanc, G., Hokamp, K., Wolfe, K.H., 2003. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res.* 13, 137-144.
- Blanchard, N. and de Weghe, P.V., 2006. *Daucus carota* L. mediated bioreduction of prochiral ketones. *Org Biomol Chem.* 4, 2348-2353.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.Q., Zenk, M.H., 1995. The octadecanoic pathway - Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 4099-4105.

- Bodnaryk, R. and Yoshihara, T., 1995. Structure-activity relationships of cyclopentane analogs of jasmonic acid for induced responses of canola seedlings, *Brassica napus* L. *J Chem Ecol.* 21, 1735-1743.
- Bohlmann, F., Zeisberg, R., Klein, E., 1975. C-13 NMR-spectra of monoterpenes. *Org Magn Resonance.* 7, 426-432.
- Bollenbach, T.J., Sharwood, R.E., Gutierrez, R., Lerbs-Mache, S., Stern, D.B., 2009. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 69, 541-552.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.
- Brock, A., 2008. Gene, Enzyme und Produkte der (Nor)tropanalkaloidbiosynthese in *Cochlearia officinalis* L., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Brock, A., Brandt, W., Dräger, B., 2008. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant J.* 54, 388-401.
- Brock, A., Herzfeld, T., Paschke, R., Koch, M., Dräger, B., 2006. Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry.* 67, 2050-2057.
- Burbulis, I.E. and Winkel-Shirley, B., 1999. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 12929-12934.
- Buskov, S., Olsen, C.E., Sorensen, H., Sorensen, S., 2000. Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indol-3-ylmethyl oligomers and ascorbigens. *J Biochem Biophys Meth.* 43, 175-195.
- Cai, Y.-Z., Sun, M., Luo, Q., Corke, H., 2005. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78, 2872-2888.
- Chang, Y.H., Chuang, L.Y., Hwang, C.C., 2007. Mechanism of proton transfer in the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *J Biol Chem.* 282, 34306-34314.
- Chen, J.J., Lee, H.H., Duh, C.Y., Chen, I.S., 2005. Cytotoxic chalcones of flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. *Planta Med.* 71, 970-973.
- Chen, W., Cheng, X., Zhou, Z., Liu, J., Wang, H., 2013. Molecular cloning and characterization of a tropinone reductase from *Dendrobium nobile* Lindl. *Mol Biol Rep.* 40, 1145-1154.
- Cheng, X., Chen, W., Zhou, Z., Liu, J., Wang, H., 2013. Functional characterization of a novel tropinone reductase-like gene in *Dendrobium nobile* Lindl. *J Plant Physiol.* 170, 958-964.
- Cheng, Z.W., Sun, L., Qi, T.C., Zhang, B.S., Peng, W., Liu, Y.L., Xie, D.X., 2011. The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 4, 279-288.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., Solano, R., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature.* 448, 666-6U4.

- Choi, H.J., Uhm, K.N., Kim, H.K., 2011. Production of chiral compound using recombinant *Escherichia coli* cells co-expressing reductase and glucose dehydrogenase in an ionic liquid/water two phase system. *J Mol Catal B-Enzym.* 70, 114-118.
- Choi, H.W., Lee, B.G., Kim, N.H., Park, Y., Lim, C.W., Song, H.K., Hwang, B.K., 2008. A role for a menthone reductase in resistance against microbial pathogens in plants. *Plant Physiol.* 148, 383-401.
- Clarke, S.E., Guy, P.L., Jameson, P.E., Schmierer, D., Burritt, D.J., 2000. Influence of white clover mosaic potyvirus infection on the endogenous levels of jasmonic acid and related compounds in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *J Plant Physiol.* 156, 433-437.
- Coppi, R., 2012. Klonierung und Charakterisierung Tropinonreduktase-ähnlicher Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. und *Capsella rubella* REUT., Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Couladis, M.M., Friesen, J.B., Landgrebe, M.E., Leete, E., 1991. Chemistry of the tropane alkaloids and related-compounds .47. Enzymes catalyzing the reduction of tropinone to tropine and psi-tropine isolated from the roots of *Datura innoxia*. *Phytochemistry.* 30, 801-805.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E., 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48, 355-381.
- d'Andrea, S., Canonge, M., Beopoulos, A., Jolivet, P., Hartmann, M.A., Miquel, M., Lepiniec, L., Chardot, T., 2007. At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11 beta- and 17 beta-hydroxy steroid dehydrogenase activities associated with *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies. *Biochimie.* 89, 222-229.
- Dahte, W., Kramell, H.M., Daeter, W., Kramell, R., Slovik, S., Hartung, W., 1993. Uptake of jasmonic acid and related compounds by mesophyll protoplasts of the barley leaf. *J Plant Growth Regul.* 12, 133-140.
- Dahte, W., Miersch, O., Schmidt, J., 1989. Occurrence of jasmonic acid, related compounds and abscisic acid in fertile and sterile fronds of three *Equisetum* species. *Biochem Physiol Pflanzen.* 185, 83-92.
- Dai, X.Y., Li, Y.Y., Meng, G., Yao, S., Zhao, Y.M., Yu, Q., Zhang, J.F., Luo, M., Zheng, X.F., 2009. NADPH Is an allosteric regulator of HSCARG. *J Mol Biol.* 387, 1277-1285.
- Dathe, W., Schindler, C., Schneider, G., Schmidt, J., Porzel, A., Jensen, E., Yamaguchi, I., 1991. Cucurbitic acid and its 6,7-stereoisomers. *Phytochemistry.* 30, 1909-1914.
- Davis, E.M., Ringer, K.L., McConkey, M.E., Croteau, R., 2005. Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant Physiol.* 137, 873-881.
- DiCenzo, G.L. and VanEtten, H.D., 2006. Studies on the late steps of (+) pisatin biosynthesis: Evidence for (-) enantiomeric intermediates. *Phytochemistry.* 67, 675-683.
- Douwe de, B.A. and Weisbeek, P.J., 1991. Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1071, 221-253.
- Dräger, B., 2006. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry.* 67, 327-337.

- Dräger, B., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1988. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. *Agr Biol Chem Tokyo*. 52, 2663-2667.
- Dräger, B. and Schaal, A., 1994. Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry*. 35, 1441-1447.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Von Heijne, G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*. 300, 1005-1016.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Von Heijne, G., 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*. 8, 978-984.
- Ephritikhine, G., Pagant, S., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lapous, D., Caboche, M., Kendrick, R.E., Barbier-Brygoo, H., 1999. The sax1 mutation defines a new locus involved in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 18, 315-320.
- Erickson, H.P., 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*. 11, 32-51.
- Favia, A.D., Nobeli, I., Glaser, F., Thornton, J.M., 2008. Molecular docking for substrate identification: The short-chain dehydrogenases/reductases. *J Mol Biol*. 375, 855-874.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U., 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*. 277, 25677-25684.
- Filling, C., Nordling, E., Benach, J., Berndt, K.D., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U., 2001. Structural role of conserved Asn179 in the short-chain dehydrogenase/reductase scaffold. *Biochem Biophys Res Commun*. 289, 712-717.
- Fonseca, S., Chico, J.M., Solano, R., 2009a. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol*. 12, 539-547.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R., 2009b. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol*. 5, 344-350.
- Freydank, A.C., Brandt, W., Dräger, B., 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins*. 72, 173-183.
- Fujioka, S. and Yokota, T., 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*. 54, 137-164.
- Fujita, T., Terato, K., Nakayama, M., 1996. Two jasmonoid glucosides and a phenylvaleric acid glucoside from *Perilla frutescens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60, 732-735.
- Fukui, H., Koshimizu, K., Usuda, S., Yamazaki, Y., 1977a. Plant-growth regulators in seeds of *Cucurbita pepo* L. 1. Isolation of plant-growth regulators from seeds of *Cucurbita pepo* L. *Agric Biol Chem*. 41, 175-180.



- Fukui, H., Koshimizu, K., Yamazaki, Y., Usuda, S., 1977b. Plant-growth regulators in seeds of *Cucurbita pepo* L. 3. Structures of plant-growth inhibitors in seeds of *Cucurbita pepo* L. Agric Biol Chem. 41, 189-194.
- Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y.W., Yang, F., Lin, S.X., 2001. Human oestrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction. Biochem J. 356, 269-275.
- Gapper, N.E., Norris, G.E., Clarke, S.E., Lill, R.E., Jameson, P.E., 2002. Novel jasmonate amino acid conjugates in *Asparagus officinalis* during harvest-induced and natural foliar senescence. Physiol Plant. 114, 116-124.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31, 3784-3788.
- Gawienowski, A.M. and Gibbs, C.C., 1968. Identification of cholesterol and progesterone in apple seeds. Steroids. 12, 545-8.
- Geissler, R., Brandt, W., Ziegler, J., 2007. Molecular modeling and site-directed mutagenesis reveal the benzylisoquinoline binding site of the short-chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase. Plant Physiol. 143, 1493-1503.
- Ghosh, D., Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S., Duax, W.L., 2001. Porcine carbonyl reductase - Structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. J Biol Chem. 276, 18457-18463.
- Ghosh, D., Weeks, C.M., Grochulski, P., Duax, W.L., Erman, M., Rimsay, R.L., Orr, J.C., 1991. 3-Dimensional structure of holo 3-alpha,20-beta-hydroxysteroid dehydrogenase - a member of a short-chain dehydrogenase family. Proc Natl Acad Sci USA. 88, 10064-10068.
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., Varin, L., 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem. 278, 17895-17900.
- Gisk, B., Yasui, Y., Kohchi, T., Frankenberg-Dinkel, N., 2010. Characterization of the haem oxygenase protein family in *Arabidopsis thaliana* reveals a diversity of functions. Biochem J. 425, 425-434.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lutz, S., Liese, A., 2007. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. Appl Microbiol Biotechnol. 76, 237-248.
- Graves, J.M.H. and Smith, W.K., 1967. Transformation of pregnenolone and progesterone by cultured plant cells. Nature. 214, 1248-8.
- Grimshaw, C.E., Bohren, K.M., Lai, C.J., Gabbay, K.H., 1995. Human aldose reductase - Rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme. Biochemistry. 34, 14356-14365.
- Guo, L.N., Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1994. Conversion of vestitone to medicarpin in alfalfa (*Medicago sativa* L) is catalyzed by 2 independent enzymes - Identification, purification, and characterization of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase. J Biol Chem. 269, 22372-22378.

- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y., 1992. 2-Tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* 100, 836-845.
- Herl, V., Fischer, G., Reva, V.A., Stiebritz, M., Muller, Y.A., Muller-Uri, F., Kreis, W., 2009. The VEP1 gene (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo-delta(4,5)-steroid 5 beta-reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochimie.* 91, 517-525.
- Herl, V., Frankenstein, J., Meitinger, N., Muller-Uri, F., Kreis, W., 2007. Delta5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and characterisation of the recombinant enzyme. *Planta Med.* 73, 704-710.
- Higashi, Y., Kutchan, T.M., Smith, T.J., 2011. Atomic structure of salutaridine reductase from the opium poppy (*Papaver somniferum*). *J Biol Chem.* 286, 6532-6541.
- Hill, A.V., 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol.* 40, iv-vii.
- Hirotsu, M. and Furuya, T., 1974. Studies on plant-tissue cultures .22. Biotransformation of testosterone and other androgens by suspension cultures of *Nicotiana tabacum* bright yellow. *Phytochemistry.* 13, 2135-2142.
- Honda, I., Seto, H., Turuspekov, Y., Watanabe, Y., Yoshida, S., 2006. Inhibitory effects of jasmonic acid and its analogues on barley (*Hordeum vulgare* L.) anther extrusion. *J Plant Growth Regul.* 48, 201-206.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585-W587.
- Hrazdina, G. and Wagner, G.J., 1985. Metabolic pathways as enzyme complexes - Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane-associated enzyme complexes. *Arch Biochem Biophys.* 237, 88-100.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P., 2008. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics.* 2008, 420747
- Iino, M., Nakano, T., Mori, M., Asami, T., Goda, H., Yoshida, S., Hattori, A., Tsujimoto, M., Takeuchi, Y., Yoneyama, K., Yokota, T., 2007a. Analysis of biological functions of progesterone in plant. *Plant Cell Physiol.* 48, S120-S120.
- Iino, M., Nomura, T., Tamaki, Y., Yamada, Y., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Mori, M., Asami, T., Nakano, T., Yokota, T., 2007b. Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochemistry.* 68, 1664-1673.
- Iinuma, M. and Mizuno, M., 1989. Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry.* 28, 681-694.
- Janeczko, A., 2012. The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids.* 77, 169-173.
- Janeczko, A., Filek, W., Biesaga-Koscielniak, J., Marcinska, I., Janeczko, Z., 2003. The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-epibrassinolide. *Plant Cell Tiss Org.* 72, 147-151.

- Jarvis, P., 2008. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179, 257-285.
- Jarvis, P. and Soll, M., 2001. Toc, Tic, and chloroplast protein import. *BBA-Molecular Cell Research.* 1541, 64-79.
- Jirschitzka, J., Schmidt, G.W., Reichelt, M., Schneider, B., Gershenzon, J., D'Auria, J.C., 2012. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 10304-10309.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalezduarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D., 1995. Short-chain dehydrogenases reductases (SDR). *Biochemistry.* 34, 6003-6013.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B., 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur J Biochem.* 269, 4409-4417.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Persson, B., 2010. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J.* 277, 2375-2386.
- Kallberg, Y. and Persson, B., 2006. Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases - A hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *FEBS J.* 273, 1177-1184.
- Kaluzna, I.A., Rozzell, J.D., Kambourakis, S., 2005. Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron-Asymmetry.* 16, 3682-3689.
- Kang, J.H., Wang, L., Giri, A., Baldwin, I.T., 2006. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell.* 18, 3303-3320.
- Kavanagh, K., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U., 2008. The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci.* 65, 3895-3906.
- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, B., 2002. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). *Plant Mol Biol.* 48, 299-308.
- Kim, J.H., Lee, B.W., Schroeder, F.C., Jander, G., 2008. Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J.* 54, 1015-1026.
- Klein, B., Pawlowski, K., Hörnicke-Grandpierre, C., Schell, J., Töpfer, R., 1992. Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a beta-Ketoacyl-ACP reductase. *Mol Gen Genet.* 233, 122-128.
- Knöfel, H.D. and Sembdner, G., 1995. Jasmonates from pine pollen. *Phytochemistry.* 38, 569-571.
- Koch, T., Bandemer, K., Boland, W., 1997. Biosynthesis of *cis*-jasmonone: A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv Chim Acta.* 80, 838-850.

- Koelen, K.J. and Gross, G.G., 1982. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 44, 227-230.
- Kramell, R., Schneider, G., Miersch, O., 1996. Resolution of racemic jasmonic acid and abscisic acid by chiral high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 7, 209-212.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Moller, G., Adamski, J., 2001. Phytoestrogens inhibit human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol.* 171, 151-162.
- Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S.B., Finkelstein, A., Vriend, G., 2004. Making optimal use of empirical energy functions: Force-field parameterization in crystal space. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics.* 57, 678-683.
- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field. *Proteins.* 47, 393-402.
- Kristan, K., Brunskole, M., Stojan, J., Rizner, T.L., 2009. Two homologous fungal carbonyl reductases with different substrate specificities. *Chem Biol Interact.* 178, 295-302.
- Kristan, K., Krajnc, K., Konc, J., Gobec, S., Stojan, J., Rizner, T.L., 2005. Phytoestrogens as inhibitors of fungal 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids.* 70, 694-703.
- Kubiseski, T.J., Hyndman, D.J., Morjana, N.A., Flynn, T.G., 1992. Studies on pig muscle aldose reductase - Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J Biol Chem.* 267, 6510-6517.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature.* 227, 680-&.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23, 2947-2948.
- Lee, D.W., Kim, J.K., Lee, S., Choi, S., Kim, S., Hwang, I., 2008. *Arabidopsis* nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell.* 20, 1603-1622.
- Lee, J.K., Koo, B.S., Kim, S.Y., Hyun, H.H., 2003. Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from a newly isolated strain of *Candida magnoliae*. *Appl Environ Microbiol.* 69, 4438-4447.
- Leonard, E., Yan, Y., Chemler, J., Matern, U., Martens, S., Koffas, M.A.G., 2008. Characterization of dihydroflavonol 4-reductases for recombinant plant pigment biosynthesis applications. *Biocatal Biotransform.* 26, 243-251.
- Liebisch, H.W., Bernasch, H., Schütte, H.R., 1973. Biosynthesis of tropane alkaloids .12. Biosynthesis of cochlearine. *Z Chem.* 13, 372-373.
- Lin, J.T. and Heftmann, E., 1981. Stereospecific reduction of progesterone by *Pisum sativum*. *Phytochemistry.* 20, 1017-1022.
- Lin, J.T., Palevitch, D., Heftmann, E., 1983. Reduction of 4-androstene-3,17-dione by growing cucumber plants. *Phytochemistry.* 22, 1149-1154.
- Lin, J.T., Proebsting, W.M., Heftmann, E., 1979. Conversion of 4-androstene-3,17-dione to testosterone by *Pisum sativum*. *Phytochemistry.* 18, 1667-1669.

- Lin, L.J. and Tzen, J.T.C., 2004. Two distinct steroleosins are present in seed oil bodies. *Plant Physiol Biochem.* 42, 601-608.
- Lohman, K.N., Gan, S.S., John, M.C., Amasino, R.M., 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol.Plant.* 92, 322-328.
- Luba, J., Nare, B., Liang, P.H., Anderson, K.S., Beverley, S.M., Hardy, L.W., 1998. *Leishmania major* pteridine reductase 1 belongs to the short chain dehydrogenase family: Stereochemical and kinetic evidence. *Biochemistry.* 37, 4093-4104.
- Lukacik, P., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., 2006. Structure and function of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 248, 61-71.
- Machado, L.L., Souza, J.S.N., de Mattos, M.C., Sakata, S.K., Cordell, G.A., Lemos, T.L.G., 2006. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry.* 67, 1637-1643.
- Malkawi, A., Jensen, B.L., Langille, A.R., 2007. Plant hormones isolated from "Katahdin" potato plant tissues and the influence of photoperiod and temperature on their levels in relation to tuber induction. *J Plant Growth Regul.* 26, 308-317.
- Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K., 2009. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron Asymmetr.* 20, 513-557.
- Matsui, K., 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol.* 9, 274-280.
- Meyer, R., Rautenbach, G.F., Dubery, I.A., 2003. Identification and quantification of methyl jasmonate in leaf volatiles of *Arabidopsis thaliana* using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 14, 155-159.
- Michaelis, L. and Menten, M.L., 1913. Kinetics of invertase action. *Biochem Z.* 49, 333-369.
- Miersch, O., Bohlmann, H., Wasternack, C., 1999. Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry.* 50, 517-523.
- Miersch, O., Günther, T., Fritsche, W., Sembdner, G., 1993. Jasmonates from different fungal species. *Nat Prod Lett.* 2, 293-299.
- Miersch, O., Preiss, A., Sembdner, G., Schreiber, K., 1987. (+)-7-*iso*-Jasmonic acid and related-compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry.* 26, 1037-1039.
- Miersch, O., Sembdner, G., Schreiber, K., 1989. Occurrence of jasmonic acid analogs in *Vicia faba*. *Phytochemistry.* 28, 339-340.
- Miller, J.D., Arteca, R.N., Pell, E.J., 1999. Senescence associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 1015-1023.
- Miyazawa, M., Shindo, M., Shimada, T., 2002. Sex differences in the metabolism of (+)- and (-)-limonene enantiomers to carveol and perillyl alcohol derivatives by cytochrome P450 enzymes in rat liver microsomes. *Chem Res Toxicol.* 15, 15-20.
- Moss, G.P., 1989. The Nomenclature of Steroids - Recommendations 1989. *Eur J Biochem.* 186, 429-458.

- Moummou, H., Kallberg, Y., Tonfack, L.B., Persson, B., van der Rest, B., 2012. The Plant Short-Chain Dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC Plant Biol.* 12,
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1993. 2 Tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 9591-9595.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y., Hashimoto, T., 1999. Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases. *J Biol Chem.* 274, 16563-16568.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y., 1998. Crystal structures of two tropinone reductases: Different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 4876-4881.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A., 1997. Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *J Biol Chem.* 272, 2218-2222.
- Nare, B., Hardy, L.W., Beverley, S.M., 1997. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 272, 13883-13891.
- Navarro-Quezada, A.R., 2007. Molecular evolution of tropinone-reductase-like and tau GST genes duplicated in tandem in Brassicaceae; Dissertation; Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Nei, M. and Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics.
- Nickon, A. and Fieser, L.F., 1952. Configuration of tropine and pseudotropine. *J Am Chem Soc.* 74, 5566-5570.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., vonHeijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1-6.
- Nixon, P.J., 2000. Chlororespiration. *Philos T Roy Soc B.* 355, 1541-1547.
- Noji, M., Takagi, Y., Kimura, N., Inoue, K., Saito, M., Horikoshi, M., Saito, F., Takahashi, H., Saito, K., 2001. Serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from spinach: Molecular cloning, characterization and expression analysis of cDNA encoding a plastidic isoform. *Plant Cell Physiol.* 42, 627-634.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X.Q., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H., 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact.* 143, 247-253.
- Patel, R.N., 2008. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord Chem Rev.* 252, 659-701.
- Pauli, G.F., Friesen, J.B., Gödecke, T., Farnsworth, N.R., Glodny, B., 2010. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plant. *J Nat Prod.* 73, 338-345.
- Pedras, M.S.C., Nycholat, C.M., Montaut, S., Xu, Y.M., Khan, A.Q., 2002. Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry.* 59, 611-625.

- Peer, W.A. and Murphy, A.S., 2003. Floral scent of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *Biochem Syst Ecol.* 31, 1193-1195.
- Peng, L.W., Fukao, Y., Fujiwara, M., Shikanai, T., 2012. Multistep assembly of chloroplast NADH dehydrogenase-like subcomplex A requires several nucleus-encoded proteins, including CRR41 and CRR42, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24, 202-214.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jörnvall, H., Kavanagh, K.L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maserk, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact.* 178, 94-98.
- Pineda, J.R.E.T., Callender, R., Schwartz, S.D., 2007. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. *Biophys J.* 93, 1474-1483.
- Plohm, A., 2010. Untersuchung Tropinonreduktase-ähnlicher Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. und *Capsella rubella* REUT., Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Pollard, D.J. and Woodley, J.M., 2007. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* 25, 66-73.
- Portsteffen, A., Dräger, B., Nahrstedt, A., 1994. The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by 2 specific reductases. *Phytochemistry.* 37, 391-400.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M., Reinbothe, S., 1992. Differential Gene-Expression During Somatic Embryogenesis in *Digitalis-Lanata* Analyzed by In vivo and In vitro Protein-Synthesis. *Plant Journal.* 2, 917-926.
- Reinhardt, N., Fischer, J., Coppi, R., Blum, E., Brandt, W., Dräger, B., 2014. Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases. *Bioorg Chem.* 53C, 37-49.
- Rohloff, J. and Bones, A.M., 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry.* 66, 1941-1955.
- Rossmann, M.G., Moras, D., Olsen, K.W., 1974. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature.* 250, 194-199.
- Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Debeaujon, I., Pourcel, L., Caboche, M., Einhorn, J., Lepiniec, L., 2006. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 224, 96-107.
- Ryden, A.-M., Ruyter-Spira, C., Litjens, R., Takahashi, S., Quax, W., Osada, H., Bouwmeester, H., Kayser, O., 2010. Molecular cloning and characterization of a broad substrate terpenoid oxidoreductase from *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiol.* 51, 1219-1228.
- Sahni-Arya, B., Flynn, M.J., Bergeron, L., Salyan, M.E.K., Pedicord, D.L., Golla, R., Ma, Z.P., Wang, H.X., Seethala, R., Wu, S.C., Li, J.J., Nayeem, A., Gates, C., Hamann, L.G., Gordon, D.A., Blat, Y., 2007. Cofactor-specific modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitor potency. *BBA-Proteins and Proteomics.* 1774, 1184-1191.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406-425.

- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., Schaller, H., 2001. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J.* 25, 605-615.
- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., Söhngen, C., Stelzer, M., Thiele, J., Schomburg, D., 2011. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res.* 39, D670-D676.
- Schein, A.I., Kissinger, J.C., Ungar, L.H., 2001. Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* 29,
- Schuster, D., Nashev, L.G., Kirchmair, J., Laggner, C., Wolber, G., Langer, T., Odermatt, A., 2008. Discovery of nonsteroidal 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors by pharmacophore-based screening of virtual compound libraries. *J Med Chem.* 51, 4188-4199.
- Schuster, T.M. and Toedt, J.M., 1996. New revolutions in the evolution of analytical ultracentrifugation. *Curr Opin Struct Biol.* 6, 650-658.
- Sembdner, G. and Parthier, B., 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44, 569-589.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., Choi, Y.D., 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 4788-4793.
- Seto, H., Kamuro, Y., Qian, Z.H., Shimizu, T., 1992. Structure-activity-relationships of (+/-)-cucurbitic acid analogs on the root-growth of rice seedlings and height of young corn plants. *J Pesticide Sci.* 17, 61-67.
- Seto, H., Nomura, E., Fujioka, S., Koshino, H., Suenaga, T., Yoshida, S., 1999. Easy preparation of methyl 7-epi-jasmonate and four stereoisomers of methyl cucurbate, and assessment of the stereogenic effect of jasmonate on phytohormonal activities. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63, 361-367.
- Shih, C.H., Chu, H., Tang, L.K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I.K., Wang, M., Lo, C., 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta.* 228, 1043-1054.
- Shikanai, T., 2007. Cyclic electron transport around photosystem I: Genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol.* 58, 199-217.
- Shim, S.H., 2011. 20S Proteasome inhibitory activity of flavonoids isolated from *Spatholobus suberectus*. *Phytother Res.* 25, 615-618.
- Simersky, R., Novak, O., Morris, D.A., Pouzar, V., Strnad, M., 2009. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS. *J Plant Growth Regul.* 28, 125-136.
- Simons, R.G. and Grinwich, D.L., 1989. Immunoreactive detection of 4 mammalian steroids in plants. *Can J Bot.* 67, 288-296.
- Sirisoma, N.S., Hold, K.M., Casida, J.E., 2001. Alpha- and beta-thujones (herbal medicines and food additives): Synthesis and analysis of hydroxy and dehydro metabolites. *J Agric Food Chem.* 49, 1915-1921.



- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., Lurin, C., 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*. 4, 1581-1590.
- Staswick, P.E. and Tiryaki, I., 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16, 2117-2127.
- Suza, W.P., Rowe, M.L., Hamberg, M., Staswick, P.E., 2010. A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-I-isoleucine in wounded leaves. *Planta*. 231, 717-728.
- Swiatek, A., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Van Onckelen, H., 2004. Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol*. 135, 161-172.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 28, 2731-2739.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y., 1996. Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 angstrom resolution: The structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*. 4, 33-45.
- The UniProt Consortium, 2012. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 40, D71-D75.
- Tiedink, H.G.M., Malingre, C.E., Vanbroekhoven, L.W., Jongen, W.M.F., Lewis, J., Fenwick, G.R., 1991. Role of glucosinolates in the formation of N-nitroso compounds. *J Agric Food Chem*. 39, 922-926.
- Tollsten, L. and Bergström, G., 1988. Headspace volatiles of whole plants and macerated plant-parts of *Brassica* and *Sinapis*. *Phytochemistry*. 27, 4013-4018.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., Provart, N.J., 2005. The botany array resource: e-northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant J*. 43, 153-163.
- Trabelsi, N., Langlois d'Estaintot, B., Sigaud, G., Gallois, B., Chaudiere, J., 2011. Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition. *JBPC*. 2, 332-344.
- Ueda, S., Oda, M., Imamura, S., Ohnishi, M., 2004. Transient-phase kinetic studies on the nucleotide binding to 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp B-0831 using fluorescence stopped-flow procedures. *Eur J Biochem*. 271, 1774-1780.
- van der Werf, M.J., van der Ven, C., Barbirato, F., Eppink, M.H.M., de Bont, J.A.M., van Berkel, W.J.H., 1999. Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 - A novel nicotinoprotein belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem*. 274, 26296-26304.
- Wagner, D., 2011. Untersuchungen an tropinonreduktaseähnlichen Enzymen At2g29360 aus *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. und CrTRL26 aus *Capsella rubella* REUT., Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wang, L.-H. and Li, W.-H., 2007. General method for determining flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector. *Pharm Chem J*. 41, 46-51.

- Ward, K.A., Tung, P., Lamb, N., Abrams, S.R., Reid, D.M., Moloney, M.M., Holbrook, L.A., 1999. Structural requirements for biologically active jasmonates: Induction of protease inhibitors and cotyledon senescence. *J Plant Growth Regul.* 27, 49-56.
- Wasternack, C., 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100, 681-697.
- Weaver, L.M., Gan, S.S., Quirino, B., Amasino, R.M., 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol.* 37, 455-469.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Bork, W.R., Rilk, R., 1994. Megastigmanes and other constituents of the absolute of *Boronia megastigma* from Tasmania. *Liebigs Ann Chem.* 1043-1047.
- Wierenga, R.K., Demaeyer, M.C.H., Hol, W.G.J., 1985. Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide binding-proteins. *Biochemistry.* 24, 1346-1357.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G.J., 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta-alpha-beta-fold in proteins, using an amino-acid-sequence fingerprint. *J Mol Biol.* 187, 101-107.
- Winberg, J.O., Hovik, R., Mckinley-Mckee, J.S., Juan, E., Gonzalez-Duarte, R., 1986. Biochemical properties of alcohol-dehydrogenase from *Drosophila lebanonensis*. *Biochem J.* 235, 481-490.
- Winberg, J.O. and Mckinley-Mckee, J.S., 1994. *Drosophila melanogaster* alcohol-dehydrogenase - Product-inhibition studies. *Biochem J.* 301, 901-909.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J., 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *Plos One.* 2, e718
- Yagen, B., Gallili, G.E., Mateles, R.I., 1978. Progesterone biotransformation by plant-cell suspension cultures. *Appl Environ Microbiol.* 36, 213-216.
- Yagil, G., 1967. Proton dissociation constant of pyrrole indole and related compounds. *Tetrahedron.* 23, 2855-&.
- Yamashita, A., Endo, M., Higashi, T., Nakatsu, T., Yamada, Y., Oda, J., Kato, H., 2003. Capturing enzyme structure prior to reaction initiation: Tropinone reductase-II-substrate complexes. *Biochemistry.* 42, 5566-5573.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J., 1999. Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP(+) and pseudotropine at 1.9 angstrom resolution: Implication for stereospecific substrate binding and catalysis. *Biochemistry.* 38, 7630-7637.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M., Sugimoto, Y., 2011. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *J Biol Chem.* 286, 6999-7009.
- Yang, X.H., Xu, Z.H., Xue, H.W., 2005. *Arabidopsis* Membrane Steroid Binding Protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell.* 17, 116-131.
- Zhang, Z.P., Krumm, T., Baldwin, I.T., 1997. Structural requirements of jasmonates and mimics for nicotine induction in *Nicotiana sylvestris*. *J Chem Ecol.* 23, 2777-2789.

- Zhao, Y.M., Zhang, J.F., Li, H.Y., Li, Y.Y., Ren, J., Luo, M., Zheng, X., 2008. An NADPH sensor protein (HSCARG) down-regulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *J Biol Chem.* 283, 11004-11013.
- Zheng, X.F., Dai, X.Y., Zhao, Y.M., Chen, Q., Lu, F., Yao, D.Q., Yu, Q., Liu, X.P., Zhang, C.M., Gu, X.C., Luo, M., 2007. Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 8809-8814.
- Ziegler, J., Brandt, W., Geissler, R., Facchini, P.J., 2009. Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. *J Biol Chem.* 284, 26758-26767.

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen

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

Reinhardt, N., Fischer, J., Coppi, R., Blum, E., Brandt, W., Dräger, B., 2014. Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases. Bioorg Chem. 53C, 37-49.

### Vorträge

Reinhardt, N., Navarro-Quezada, A., Schmid, K., Brock, B., Brandt, W., Dräger, B. 2008. *In silico* screening and *in vitro* evaluation of ligands for tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases/reductases from *Arabidopsis thaliana* and *Capsella rubella*. 6<sup>th</sup> Kurt Mothes Workshop – Secondary Metabolism, Jena.

Reinhardt, N. 2010. *In silico* Screening und *in vitro* Evaluierung von Liganden für Tropinonreduktase-ähnliche kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen. Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. W. Kreis, Erlangen.

### Poster

Reinhardt, N., Navarro-Quezada, A., Schmid, K., Fischer, J., Brandt, W., Dräger, B. 2009. Investigating biochemical role of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases/reductases for *Arabidopsis thaliana* and *Capsella rubella*. Botanikertagung – Plants for the Future, Leipzig.

Reinhardt, N., Fischer, J., Brandt, W., Dräger, B. 2009. Tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases/reductases in *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae. IPMB, St. Louis (USA).

Fischer, J., Reinhardt, N., Dräger, B., Brandt, W., Wessjohann, L. A. 2010. Modelling of short-chain dehydrogenases/reductases and *in silico* screening for potential ligands. EuroQSAR, Rhodos (GR).

Reinhardt, N., Fischer, J., Brandt, W., Dräger, B. 2011. Promiscuous but straight: tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases/reductases in Brassicaceae. Botanikertagung – Diversity makes the difference, Berlin.

Reinhardt, N., Fischer, J., Brandt, W., Dräger, B. 2011. Swiss knife enzymes: short chain dehydrogenases/reductases (SDR) with relaxed substrate acceptance are encoded in many in plant genomes. Botanikertagung – Diversity makes the difference, Berlin.

## Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dräger für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Unterstützung, sowie für ihre ständige Bereitschaft zu konstruktiv-kritischen Diskussionen. Den Mitgliedern der AG Biogene Arzneistoffe Dr. Elke Blum, Sebastian Pietack, Mathias Reisberg, Nadine Küster, Dr. Bettina Rahfeld, Anja Wodak sowie den ehemaligen Mitgliedern Nebojša Jocković, Anne Junker, Dr. Ulrike Heinkel, Dr. Anna-Carolin Freydank, Dr. Marion Weid, Dr. Yvonne Sichhart, Dr. Stefan Biastoff, und den technischen Mitarbeitern der Abteilung Frau Watzka, Frau Schöne, Frau Ködel und Frau Marx, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die schöne Zeit am „Hohen Weg 8“.

Bei den Mitarbeitern des IPB Halle Priv.-Doz. Dr. Brandt, den Diplom-Bioinformatikerinnen Juliane Fischer und Eva Schulze und Dr. Silke Pienkny möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe und Zusammenarbeit auf dem Gebiet des molekularen Modellierens von Proteinen, dem Docking von potentiellen Substraten und für die Einführung in die theoretischen Grundlagen der Bioinformatik bedanken. Ganz besonderer Dank gebührt Juliane Fischer für ihre hilfreichen TRL Proteinmodelle, zahllose Docking-Versuche unter wochenlanger Ausnutzung aller verfügbaren Lizenzen und die eindrucksvollen Abbildungen mit denen so manche „Eigenarten“ der TRLs verdeutlicht werden konnten.

Frau Priv.-Doz. Dr. Andrea Porzel danke ich für die NMR-Messungen zur Aufklärung des Reaktionsprodukts der Thujon-Reduktion mit CoTR und ihre Hilfe bei deren Auswertung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Veaceslav Reva, Universität Chisinau, Moldawien, für seine Unterstützung bei der analytischen Gelfiltration und die fundierte Einweisung in die Methodik.

Bei den Mitgliedern der AG Biophysik von Prof. Balbach bedanke ich mich für die Möglichkeit der Nutzung des Fluoreszenz-Spektrometers für die NADPH-Protein-Fluoreszenzstudien.

Ich danke Dr. Christian Lange, Institut für Biochemie, Uni Halle-Wittenberg, für seine Unterstützung bei den ITC-Experimenten und Priv.-Doz. Dr. Hauke Lilie für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei Diplomarbeiten und Praktika danke ich Dipl.-Pharm. Daniela Wagner, Dipl.-Pharm. Anja Plohmann, Dipl.-Pharm. Ralph Coppi und Anne Finck.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen eines DFG-Projektes (BR 1329, DR 227).

Ein ganz besonders herzlicher Dank gehört meiner Familie, die mich fortwährend in allen Lebenslagen unterstützt und mich immer bestärkt hat, meinen Weg zu gehen.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen wurden von mir als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), den 02.12.2014

## Biografische Angaben

01. Juli 1983	Geboren in Zittau (Sachsen)
1994-2002	Besuch des Christian-Weise Gymnasiums in Zittau
2002	Abitur
2002-2006	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2006-2007	Praktisches Jahr des Pharmaziestudiums:
- 10/2006-03/2007	Diplomandin in der AG „Biogene Arzneistoffe“ bei Frau Prof. Dr. Dräger Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 04/2007-09/2007	Pharmaziepraktikum in der Zinzendorf-Apotheke Niesky bei Herrn Apotheker Heiko Neumann
2007	Approbation als Apothekerin
2008	Diplom-Pharmazeutin, „Vergleichende Untersuchung der Spermidin- synthase aus <i>Cochlearia officinalis</i> L. mit der Spermidinsynthase 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) HEYNH. und der Putrescin <i>N</i> -methyl- transferase aus <i>Datura stramonium</i> L.“ Auszeichnung mit dem Diplompriis des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gestiftet von der Serumwerk Bernburg AG
2008-2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG „Biogene Arzneistoffe“ bei Frau Prof. Dr. Dräger, Praktische Tätigkeit im Rahmen der Promotion
seit 10/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Qualitätskontrolle der Menarini – Von Heyden GmbH, Dresden (Arzneimittelherstellung)