

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Clarissa Dziggel

aus: Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: .....



**Klonierung und Co-Expression  
der Tryptophan-Decarboxylase, Strictosidinsynthase  
und Strictosidinglucosidase,  
dreier Schlüsselgene der Monoterpenindolalkaloid-Biosynthese  
aus *Catharanthus roseus* (L.) G. DON**

Gutachter:

Prof. Dr. Michael Wink  
Prof. Dr. Stefan Wölfel



## **Inhaltsverzeichnis**

Danksagung

Zusammenfassung

Abstract

Veröffentlichungen im Rahmen der Arbeit

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Sekundärstoffe/Sekundärmetaboliten SM	1
1.2 Vinca-Alkaloide aus <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	2
1.3 Strictosidin als zentraler Vorläufer der MIA-Biosynthese in <i>C. roseus</i>	4
1.4 Strictosidin und sein Aglycon als Vorläufer wichtiger Pharmazeutika	7
1.5 Biotechnologische Herstellung von Sekundärstoffen	9
1.6 Zielsetzung	15
2 Material	16
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
2.2 Enzyme, Marker und Antibiotika	17
2.3 Oligonukleotide	17
2.4 Gene und Plasmidvektoren	18
2.5 Bakterien- und Hefestämme	18
2.6 Puffer, Medien und Lösungen	19
2.6.1 Puffer und Medien für molekularbiologische Arbeiten	19
2.6.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	19
2.7 Kits und Chromatographie-Säulen	21
2.8 Geräte und Software	21
3 Methoden	23
3.1 Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1 Anzucht von Mikroorganismen	24
3.1.2 Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	24
3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.1.4 Agarosegelelektrophorese	26
3.1.5 Reinigung von PCR-Produkten und Extraktion aus dem Agarosegel	26

3.1.6	Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren	26
3.1.7	Restriktion von DNA	26
3.1.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	27
3.1.9	Ligation von DNA	27
3.1.10	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	27
3.1.11	Sequenzierung von Plasmid-DNA	28
3.1.12	Mutagenesen	28
3.2	Proteinbiochemische Arbeiten und Analytik	28
3.2.1	Heterologe Expression in <i>P. pastoris</i>	28
3.2.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	29
3.2.3	Proteinextraktion	30
3.2.4	Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung	31
3.2.5	Proteinreinigung	31
3.2.6	Proteingehaltsbestimmung	32
3.2.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
3.2.8	Färbung von SDS-Gelen	33
3.2.9	Westernblot	33
3.2.10	Untersuchung der pH-Stabilität von Strictosidin	34
3.2.11	Produktion von Strictosidin durch immobilisierte STR	34
3.2.12	Herstellung von Standardgeraden	35
3.2.13	Charakterisierung von Enzymen	36
3.2.14	<i>In vivo</i> Enzymassays in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	40
3.2.15	Chromatographische und spektroskopische Methoden (HPLC/LC-MS)	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Gene und Vektorkonstrukte	42
4.1.1	Korrektur des TDC-Gens durch Oligonukleotid vermittelte Mutagenese	43
4.2	<i>Pichia pastoris</i> als Wirtssystem	44
4.2.1	Klonierungen in <i>P. pastoris</i> Expressionsvektoren	44
4.2.2	Heterologe Expression in <i>P. pastoris</i>	48
4.2.3	Enzymassays der in <i>P. pastoris</i> exprimierten Proteine	49
4.3	<i>Escherichia coli</i> als Wirtssystem	51

4.3.1 Klonierungen in <i>E. coli</i> Expressionsvektoren	52
4.3.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	58
4.3.3 Enzymassays der in <i>E. coli</i> exprimierten Proteine	62
4.3.4 HPLC- und LC-MS-Analysen der Enzymassays von Dreifachexpressionen	84
5 Diskussion	94
5.1 Herstellung der Expressionskonstrukte, Expressionsoptimierung, Proteinausbeuten und Enzymcharakterisierung	94
5.1.1 Tryptophandecarboxylase (TDC)	94
5.1.2 Strictosidinsynthase (STR)	96
5.1.3 Strictosidin-Glucosidase (SGD)	100
5.2 Dreifachexpression von TDC, STR und SGD in <i>E. coli</i>	102
5.3 Produktion von Strictosidin	104
5.4 Fazit/Ausblick	104
6 Literatur	106
7 Anhang	116
7.1 Sequenzdaten	116
7.2 LC-MS-Daten	125

## **Danksagung**

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Michael Wink, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Vielen Dank für das spannende Thema und die wissenschaftliche Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an meinen Zweitgutachter Prof. Dr. Stefan Wölfl sowie meine weiteren Prüfer Prof. Dr. Jürgen Reichling und Prof. Dr. Thomas Rausch für die Zeit, die sie sich genommen haben, um meine Arbeit zu begutachten.

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und NANOKAT für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit sowie Prof. Dr. Matthias Mack von der Hochschule Mannheim, ohne die meine Doktorarbeit an diesem Institut wahrscheinlich nicht zu Stande gekommen wäre.

Allen Kollegen am IPMB, besonders Petra Fellhauer, Hedi Sauer-Gürth, Heidi Staudter, Astrid Backhaus und allen Azubis, die während meiner Doktorarbeit in unserer Abteilung ausgebildet wurden, möchte ich danken für die liebe Hilfe im Labor und bei organisatorischen Dingen.

Mein besonderer Dank geht außerdem an Eva Arnold, Dr. Holger Schäfer, Robin Gantner, Bernhard Wetterauer, Pille Link, Ina Groß und viele andere Mitarbeiter und Studenten für die netten, manchmal etwas speziellen Momente während und außerhalb der Arbeitszeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Oma, für die jahrelange liebe Unterstützung und die vielen Care-Pakete während des Studiums und der Doktorarbeit.

## Zusammenfassung

Strictosidin ist der gemeinsame Vorläufer vieler medizinisch relevanter, pflanzlicher Monoterpenindolalkaloide, deren Produktion in der Pflanze häufig nicht ausreicht, um den steigenden Marktbedarf zu decken. Die Produktion dieser Alkaloide bzw. ihres Vorläufers Strictosidin in einem mikrobiellen heterologen System könnte eine Alternative zur Synthese/Produktion in der Pflanze bieten.

In dieser Arbeit wurde daher ein System zur Co-Expression von drei Schlüsselgenen der *Catharanthus roseus* Monoterpenindolalkaloid-Biosynthese entwickelt, das die gleichzeitige funktionelle Expression der Tryptophandecarboxylase (TDC), der Strictosidinsynthase (STR) und der Strictosidinglucosidase (SGD) in *Escherichia coli* ermöglicht.

Um dies zu erreichen, wurden zunächst zwei unterschiedliche Expressionssysteme auf ihre Eignung hin untersucht. Zum einen wurde mit *Pichia pastoris*, ein eukaryotes System getestet, zum anderen mit *Escherichia coli*, ein prokaryotes. Für beide Systeme wurden verschiedene Vektorkonstrukte zur Einzelexpression der *Catharanthus*-Gene hergestellt und deren Funktionalität im jeweiligen System/Organismus überprüft. Die Gene der STR und SGD wurden für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert. Bei der STR, für die bekannt ist, dass sie in *E. coli* vermehrt in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* produziert wird, wurde zusätzlich der Einfluss des Vektors (Kopienzahl) und verschiedener Tag-Sequenzen auf die Expression löslicher, enzymatisch aktiver Enzyme untersucht. Die Aktivität der unterschiedlichen Konstrukte wurde über *in vivo* Enzymassays in *E. coli* und anschließendem Nachweis des enzymatischen Produkts Strictosidin mittels HPLC verglichen.

Da sich die TDC im *P. pastoris* System trotz vielfältiger Optimierungsversuche nicht exprimieren ließ, und die STR trotz nachgewiesener funktioneller Expression nicht aus dem Expressionsmedium gereinigt werden konnte, wurden die Arbeiten mit diesem System eingestellt. Alle Arbeiten zur Produktion der drei *Catharanthus*-Enzyme erfolgten von nun an im *E. coli* System, in dem sich alle drei Enzyme in löslicher, aktiver Form exprimieren und reinigen ließen. Die gereinigten Enzyme wurden hinsichtlich pH- und Temperaturoptima, kinetischer Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  und des Einflusses verschiedener Aktivatoren und Hemmstoffe charakterisiert.

Für die Co-Expression aller drei Gene wurden Doppeltransformanten hergestellt, die zum einen den Vektor pET45b(+)\_TDC\_C-His und zum anderen den Vektor pCDFDuet1\_SGD\_STR enthielten. Der Erfolg der Expression wurde über SDS-PAGE, die Funktionalität der gebildeten Enzyme über *in vivo* Enzymassays mit Tryptophan und Secologanin als Substrate und anschließendem Nachweis der Edukte bzw. Produkte über HPLC bzw. LC-MS überprüft. Als kostengünstigere Alternative wurden auch Enzymassays durchgeführt, bei denen anstelle des reinen Secologanin ein Methanol-Extrakt von *Symphoricarpos albus* Beeren verwendet wurde.

Zusätzlich zu den *in vivo* Klonierungs- und Expressionsarbeiten wurde ein säulenbasiertes System zur *in vitro* Produktion von Strictosidin mittels rekombinanter STR etabliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen ersten Beitrag zur heterologen Produktion pharmazeutisch wichtiger Monoterpenindolalkaloide in einem *E. coli* System.

## Abstract

Strictosidine is the central precursor of various medically important monoterpene indole alkaloids. Some of these alkaloids are extracted in very low amounts from plantation grown plants. To meet the increasing market demands, the production of these alkaloids in a heterologous system could be an alternative to their synthesis/production in plants.

In this study, a system for co-expression of three key genes of the monoterpene indole alkaloid biosynthesis from *Catharanthus roseus* was developed, which allows the simultaneous functional expression of tryptophan decarboxylase (TDC), strictosidine synthase (STR) and strictosidine glucosidase (SGD) in *Escherichia coli*.

To achieve this, two different expression systems were originally tested, the eukaryotic yeast *Pichia pastoris* and the prokaryotic bacterium *Escherichia coli*. For both systems, vectors for single gene expression were constructed and tested for functionality in the respective host. The genes of STR and SGD were codon optimized for expression in *E. coli*. For the STR, which often forms insoluble inclusion bodies when expressed in *E. coli*, the influence of different vectors (copy number) and tag sequences on soluble expression was tested. The activity of the different vector constructs was then compared by *in vivo* enzyme assays and subsequent HPLC detection of the enzymatic product strictosidine.

Despite of various optimization efforts, no TDC expression could be detected in the *P. pastoris* system, and while the STR was functionally expressed in this system, its purification from the expression media was not successful. The *E. coli* system, on the other hand, allowed the soluble, functional expression and purification of all three *Catharanthus* enzymes. Therefore, all following experiments were conducted using the *E. coli* system. The purified enzymes were characterized regarding pH- and temperature optima, the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  and the susceptibility to known enzyme activators and inhibitors.

For co-expression of all three *Catharanthus* genes *E. coli* harboring both, the vector pET45b(+)\_TDC\_C-His and pCDFDuet1\_SGD\_STR were created. Expression and functionality of the enzymes was analyzed using SDS-PAGE and *in vivo* enzyme assays, respectively. For the *in vivo* assays tryptophan and secologanin were used as substrates and enzymatic activity was proven by HPLC and LC-MS detection of the enzymatic products. Additionally a more cost-effective enzyme assay using a methanol extract of secologanin containing *Symphoricarpos albus* berries instead of pure secologanin was tested.

Beside the *in vivo* cloning and expression work, a column-based system for *in vitro* production of strictosidine was established using purified, recombinant STR.

The results of this work present a first step to the heterologous production of strictosidine-derived medically important alkaloids in an *E. coli* system.

## **Veröffentlichungen im Rahmen der Arbeit**

### **Wissenschaftliche Paper**

Dziggel, C., Schäfer, H. and Wink, M. (2016) "Tools of pathway reconstruction and production of economically relevant plant secondary metabolites in recombinant microorganisms" *Biotechnol J*, 12, DOI:10.1002/biot.201600145.

### **Poster Präsentationen**

Dziggel, C., Arnold, E., Wetterauer, B. und Wink, M. „Heterologe Expression von Schlüsselnzymen der Monoterpen-Indolalkaloid-Biosynthese“, 4. Young Researcher Meeting 2015, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Deutschland.



## Abkürzungsverzeichnis

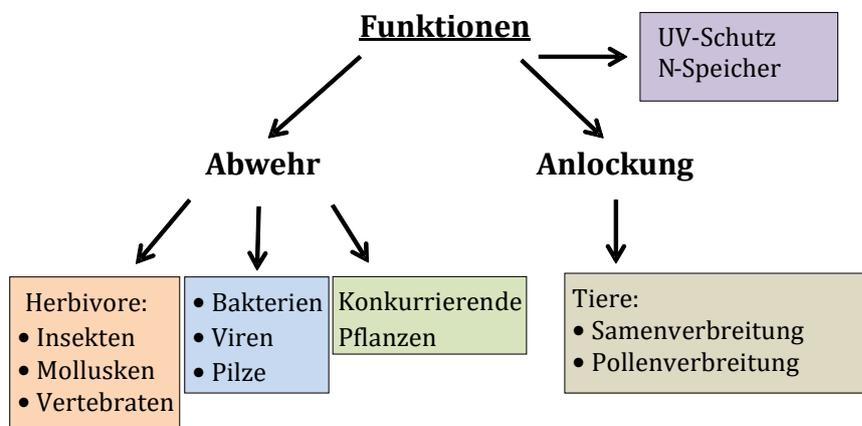
7DLGT	7-Deoxyloganetinsäureglucosyltransferase
7DLH	7-Deoxyloganinsäure 7-hydroxylase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BIAs	Benzylochinolinalkaloide
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G10H	Geraniol 10-Hydroxylase
GPPS	Geranyldiphosphatsynthase
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSR	Meerrettichperoxidase
IMAC	Metallionenaffinitätschromatographie
IO	Iridoidoxidase
IPAP	Internes Phloem-assoziiertes Parenchym
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IS	Iridoidsynthase
Km	Michaelis-Konstante
LAMT	Loganinsäure O-methyltransferase
LB-Medium	Standard Bakterienkultur Komplexmedium
LC-MS	HPLC mit Massenspektrometrie-Kopplung
LEW	Lyse-Equilibrierungs-Wasch-Puffer
MD	Minimalmedium mit Dextrose
MIAs	Monoterpenindolalkaloide
MM	Minimalmedium mit Methanol
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion

<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGD	Strictosidin-β-D-glucosidase
SLS	Secologaninsynthase
SM	Sekundärstoffe/Sekundärmetaboliten
STR	Strictosidinsynthase
TDC	Tryptophandecarboxylase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
YPD	Hefe Pepton Dextrose
YPG	Hefe Pepton Glycerin

## 1 Einleitung

### 1.1 Sekundärstoffe/Sekundärmetaboliten SM

Pflanzen produzieren eine große Anzahl an strukturell sehr vielfältigen niedermolekularen Naturstoffen. Da diese Substanzen meist keine Rolle im Primärstoffwechsel der Pflanzen spielen, werden sie auch als Sekundärstoffe oder Sekundärmetabolite (SM) bezeichnet (Wink, 2016d). Lange Zeit hielt sich die Ansicht, dass es sich hierbei lediglich um funktionslose Abfallprodukte handelt, die spontan oder durch unspezifische Enzyme gebildet werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Stoffe von großer Bedeutung für das Überleben der Pflanzen sind, die sie produzieren und dass ihre Biosynthese streng reguliert und durch hoch spezifische Enzyme katalysiert wird (Hartmann, 2007). Im Laufe der Evolution der Pflanzen wurden SM anscheinend vorwiegend als Abwehrstoffe gegen Herbivore oder den Befall mit Bakterien, Pilzen oder Viren entwickelt, aber auch gegen andere Pflanzen, mit denen um Licht, Wasser und Nährstoffe konkurriert werden musste. Darüber hinaus werden einige SM als Signalmoleküle zum Anlocken von Tieren, als Antioxidantien oder zum UV-Schutz der Pflanze produziert (Wink, 2016c). Die verschiedenen Funktionen von Sekundärstoffen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.



**Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Funktionen von Sekundärstoffen in der Pflanze** (modifiziert nach Wink, 2010b).

Die biochemischen und physiologischen Eigenschaften unterschiedlicher SM korrelieren stark mit ihrer Funktion in der Pflanze. Viele SM, die als Abwehrstoffe produziert werden, interagieren z. B. mit zellulären Zielstrukturen von Herbivoren oder Pathogenen, wie Proteinen, Biomembranen und/oder DNA und RNA (Wink, 2015).

Sekundärstoffe können grob in zwei große Gruppen unterteilt werden, die stickstoffhaltigen und die stickstofffreien SM (Tabelle 1). Zur Gruppe der stickstoffhaltigen SM zählen unter anderem die Alkaloide, die nicht-proteinogenen Aminosäuren, die

Cyanglucoside und die Lektine. In dieser Gruppe bilden die Alkaloide mit mehr als 27000 bekannten Strukturen die größte Klasse. In der Gruppe der stickstofffreien SM, zu der die Terpene, die Polyphenole und die Kohlenhydrate gezählt werden, stellen die Terpene die größte Klasse (Wink, 2015).

**Tabelle 1: Darstellung der Hauptklassen pflanzlicher SM** (modifiziert nach Wink, 2015).

Sekundärstoffe	Anzahl
<b>Mit Stickstoff</b>	
Alkaloide	27000
Nicht-proteinogene Aminosäuren	700
Cyanglucoside	60
Glucosinolate	150
Amine	100
Lektine, Peptide, AMPs	2000
<b>Ohne Stickstoff</b>	
<b>Terpene</b>	
Monoterpene (und Iridoidglucoside)	3000
Sesquiterpene	5000
Diterpene	2500
Triterpene, Steroide, Saponine (und Herzglycoside)	5000
Tetraterpene	500
<b>Phenole</b>	
Flavonoide, Anthocyane, Tannine	4000
Phenylpropanoide, Cumarine, Lignane	2000
Polyketide (Anthrachinone)	800
<b>Andere</b>	
Polyacetylene	1500
Kohlenhydrate, organische Säuren	600

Besonders in der Gruppe der Alkaloide findet man viele wichtige Arzneistoffe, wie z. B. das aus *Papaver somniferum* gewonnene Schmerzmittel Morphin oder die aus *Camptotheca acuminata* (Camptothecin) oder *Catharanthus roseus* (Vinblastin und Vincristin) isolierten Chemotherapeutika (Wink, 2016b).

## 1.2 Vinca-Alkaloide aus *Catharanthus roseus* (L.) G. DON

Ein Großteil der strukturell sehr diversen Alkaloide wird aus Aminosäurevorläufern gebildet. Zum Beispiel werden die Pyrrolizidin- und Tropanalkaloide aus Ornithin synthetisiert, Isochinolinalkaloide aus Tyrosin und Indolalkaloide aus Tryptophan (Wink, 2010a). Zusätzlich können Teile des Grundgerüsts von anderen Biosynthesewegen abstammen, wie zum Beispiel bei den Terpenindolalkaloiden vom Terpenoidweg (Wink, 2016a).

Die Chemotherapeutika Vinblastin und Vincristin sowie die von Vinblastin abstammenden semi-synthetischen Stoffe Vindesin und Vinorelbin zählen zu den dimeren Indolalkaloiden. Sie wirken als Spindelgifte, indem sie an Tubulin binden und die Polymerisation der Mikrotubuli inhibieren. Sie verhindern dadurch die Ausbildung des Spindelapparats während der Zellteilung und führen zur Apoptoseinduktion (Sertel et al., 2011, van Wyk und Wink, 2015). Trotz ihrer starken strukturellen Ähnlichkeit zeigen sie abweichende Wirkungen gegenüber unterschiedlichen Krebsarten. Vincristin zum Beispiel ist effektiver bei der Behandlung von non-Hodgkin's Lymphomen, Hodgkin's Lymphomen und soliden Tumoren bei Kindern, wohingegen Vinblastin neben der Behandlung von non-Hodgkin's Lymphomen auch bei Hoden- und Brustkrebs eingesetzt wird. Vinorelbin wiederum zeigt eine bessere Wirkung bei Brust- und Lungenkrebs (Hait et al., 2007).

Die einzige Quelle dieser wichtigen Chemotherapeutika ist die Pflanze *Catharanthus roseus* (L.) G. DON (Apocynaceae) auch bekannt als Madagaskar-Immergrün oder früher als *Vinca rosea*. Die ursprünglich aus Madagaskar stammende, mehrjährige Pflanze mit glänzenden dunkelgrünen Blättern und rosafarbenen oder weißen Blüten ist Namensgeber der auch als Vinca-Alkaloide bezeichneten Substanzen (van Wyk und Wink, 2015). In *C. roseus* finden sich nahezu 200 verschiedene Alkaloide, von denen die meisten zur Gruppe der Monoterpenindolalkaloide (MIAs) gehören (De Luca et al., 2014). Bisher ist keine andere Pflanze bekannt, die ein so breites Spektrum an Alkaloiden produzieren kann (Blaskò und Cordell, 1990). Neben Vinblastin und Vincristin findet man auch das als Antihypertensivum genutzte Ajmalicin und das als Beruhigungsmittel verwendete Serpentin, sowie Vindolin und Catharanthin, die blutzuckersenkende Wirkung zeigen (Pan et al., 2016, van Wyk und Wink, 2015, Wink, 2010b). In der traditionellen Medizin wurden Wurzeln und Blätter von *C. roseus* zur Behandlung von Diabetes und Rheuma verwendet. Heute nutzt man hauptsächlich die aus den oberirdischen Pflanzenteilen extrahierten Reinalkaloide zur Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen (van Wyk und Wink, 2015).

Da die Ausbeute an Reinalkaloiden durch das geringe Vorkommen in der Pflanze, sowie die aufwendige Extraktion und Reinigung sehr gering ist, wird deren Marktpreis sehr hoch gehandelt. Nur 0,01 % und 0,003 % Vinblastin bzw. Vincristin können aus einem Gramm trockenem Blattmaterial gewonnen werden, wobei die Ausbeute stark von den herrschenden Wachstumsbedingungen abhängt (Glenn et al., 2013). Aus diesem Grund wird seit langem nach alternativen Methoden zur wirtschaftlichen/industriellen Produktion dieser Alkaloide gesucht.

Die komplexe Struktur von Vincristin und Vinblastin macht ihre chemische Synthese sehr aufwendig und kostenintensiv, wodurch sie keine Alternative zur Isolation aus der Pflanze bietet. Der Versuch der Produktionssteigerung in der Pflanze selbst durch Induktion der Expression beteiligter Biosynthesegene oder Fütterung kostengünstiger Vorläufersubstanzen (Facchini, 2001), sowie die *in vitro* Produktion in undifferenzierten *C. roseus* Pflanzenzell- oder Wurzelhaarkulturen bot nicht den erhofften Erfolg. In den *in vitro* Systemen konnten im besten Fall monomere Indolalkaloide wie Ajmalicin

detektiert werden. Jedoch keine bzw. sehr geringe Mengen an dimeren Indolalkaloiden (Wink et al., 2005). Es zeigte sich, dass undifferenzierte Zellkulturen nicht zur Bildung von Vindolin im Stande waren, einem der beiden monomeren Vorläufer von Vinblastin und Vincristin (Pan et al., 2016). Bisher ist es noch nicht gelungen ein erfolgreiches *in vitro* Produktionssystem für Vinblastin und Vincristin in Pflanzenzellkulturen zu etablieren (van Wyk und Wink, 2015).

Um eine Erhöhung der Produktion, sei es in der Pflanze selbst oder, wie dies schon bei anderen Sekundärstoffen der Fall ist, in rekombinanten Mikroorganismen zu erreichen, ist die vollständige Aufklärung des Biosynthesewegs hin zu den dimeren Indolalkaloiden Vinblastin und Vincristin nötig. Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits unternommen, werden jedoch aufgrund des komplexen Synthesewegs der MIAs in *C. roseus* erschwert, dessen Enzyme in verschiedenen Zelltypen und subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Courdavault et al., Miettinen et al., 2014). Insgesamt sind mindestens vier verschiedene Zelltypen und fünf unterschiedliche subzelluläre Kompartimente beteiligt (Pan et al., 2016). Die gesamte MIA-Synthese umfasst mehr als 50 Biosyntheseereignisse, ausgeführt von verschiedenen Enzymen, Regulatoren und Transportern (Zhu et al. 2014).

In den letzten Jahren haben sich durch die Entwicklung von Next-Generation-Sequencing-Methoden neue Möglichkeiten der Aufklärung von pflanzlichen Biosynthesewegen eröffnet. Der Vergleich von, unter unterschiedlichen Bedingungen gewonnenen Transkriptom-, Proteom- und Metabolomdaten, ermöglichte die Entdeckung von Kandidatengen und die Analyse der zugehörigen Enzyme (Diamond und Desgagne-Penix, 2016, Miettinen et al., 2014). Eine weitere Methode, die die Entdeckung und Charakterisierung neuer Gene erleichtert, ist das Virus induzierte Gen Silencing (VIGS), bei der ausgewählte Gene in der Pflanze ausgeschaltet werden, um über die Analyse der gebildeten Intermediate, einen Rückschluss auf die Genfunktion zu ziehen (Liscombe und O'Connor, 2011, Qu et al., 2015).

Bis heute konnten bereits 30 Biosynthese- und einige regulatorische Gene der MIA-Biosynthese identifiziert und kloniert werden; aber einige Abschnitte des Biosynthesewegs sind noch immer nicht vollständig aufgeklärt (Pan et al., 2016).

### 1.3 Strictosidin als zentraler Vorläufer der MIA-Biosynthese in *C. roseus*

Ein zentraler Punkt in der MIA-Biosynthese ist die Bildung von 3 $\alpha$ (S)-Strictosidin durch die Verknüpfung des Indols Tryptamin mit dem Glykoiridoid Secologanin. Diese stereospezifische Kondensationsreaktion, wird durch die in der Vakuole, einem eher unüblichen Ort für die Biosynthese von SM, lokalisierte Strictosidinsynthase (STR: EC 4.3.3.2.) katalysiert. Die anschließende Deglucosylierung des Strictosidins durch die Strictosidin- $\beta$ -D-glucosidase (SGD: EC 3.2.1.105), findet, nach neusten Erkenntnissen im Zellkern statt und führt zur Bildung eines instabilen, reaktiven Strictosidin-Aglycons (Facchini und De Luca, 2008, Stavrinides et al., 2015).

Es wird angenommen, dass die SGD zusätzlich zu ihrer Rolle in der MIA-Biosynthese, auch Teil eines biochemischen Schutzmechanismus' der Pflanze ist. Unter „normalen“ Bedingungen, werden aus dem Aglycon eine Reihe wichtiger Alkaloide aus der Gruppe der Monoterpenindolalkaloide gebildet. Wird die Pflanze jedoch beschädigt, kommt es zum Transport des gesamten Strictosidins zum Kern, wo eine Massendeglucosylierung stattfindet. Das gebildete reaktive Aglycon, dem antimikrobielle Aktivität nachgewiesen wurde, scheint dazu in der Lage zu sein, Proteine quer zu vernetzen und als Abwehrstoff zu dienen (Glenn et al., 2013, Guirimand et al., 2010).

Das für die Synthese von Strictosidin benötigte Tryptamin entsteht durch eine einzige enzymatische Reaktion: Die Decarboxylierung der im Shikimat-Weg gebildeten Aminosäure L-Tryptophan (Abbildung 2). Katalysiert wird diese Reaktion durch die im Cytosol lokalisierte Tryptophandecarboxylase (TDC: EC 4.1.1.28) (Facchini und De Luca, 2008).

Im Gegensatz dazu benötigt die Bildung des Secologanin, dessen Biosynthese erst vor kurzem vollständig aufgeklärt wurde, eine Reihe von Reaktionsschritten (Duge de Bernonville et al., 2015, Miettinen et al., 2014). Insgesamt werden zehn Enzyme benötigt um aus den aus dem MEP-Weg stammenden Isoprenvorläufern Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) Secologanin herzustellen. Die ersten acht enzymatischen Schritte bis hin zur Loganinsäure finden in unterschiedlichen Kompartimenten der spezialisierten Zellen des internen Phloem-assoziierten Parenchyms (IPAP) statt (Qu et al., 2015).

Zunächst wird ein Molekül IPP mit einem Molekül DMAPP zu Geranyldiphosphat kondensiert. Diese, durch die in den Plastiden lokalisierte Geranyldiphosphatsynthase (GPPS) katalysierte Reaktion ist ein Schlüsselschritt hin zur Biosynthese der Monoterpeneinheit der MIAs. Das entstandene Geranyldiphosphat wird durch die im Stroma der Plastiden lokalisierte Geraniolsynthase (GS) zu Geraniol umgewandelt, welches wiederum durch die im ER lokalisierte 8-Hydroxylase (G8O oder CYP76B6) zu 8-Hydroxygeraniol hydroxyliert wird. Die G8O ist abhängig von einer Cytochrom P450 Reduktase (CPR), die Elektronen von NADPH auf G8O überträgt. Das entstandene 8-Hydroxygeraniol wird weiter oxidiert zu 8-Oxogeranial, durch die im Cytosol lokalisierte 8-HGO. Das 8-Oxogeranial wird dann durch die ebenfalls im Cytosol lokalisierte Iridoidsynthase (IS) zu Iridodial umgewandelt, welches im ER zu 7-Deoxyloganetinsäure weiter oxidiert wird durch die Iridoidoxidase (IO).

Im nächsten Schritt wird, durch die sowohl im Cytosol als auch im Kern lokalisierte 7-Deoxyloganetinsäureglucosyltransferase (7DLGT) 7-Deoxyloganinsäure produziert, die im ER zu Loganinsäure hydroxyliert wird (7-Deoxyloganinsäure-7-hydroxylase (7DLH) oder CYP72A224). Loganinsäure wird von den IPAP Zellen in die Zellen der Epidermis transportiert, wo es durch die im Cytosol lokalisierte Loganinsäure-O-methyltransferase (LAMT) zu Loganin umgewandelt wird. Aus Loganin entsteht schließlich, durch die im ER der Epidermiszellen lokalisierte Secologaninsynthase (SLS oder CYP72A1), Secologanin (Miettinen et al., 2014, Pan et al., 2016, Zhu et al., 2014b).

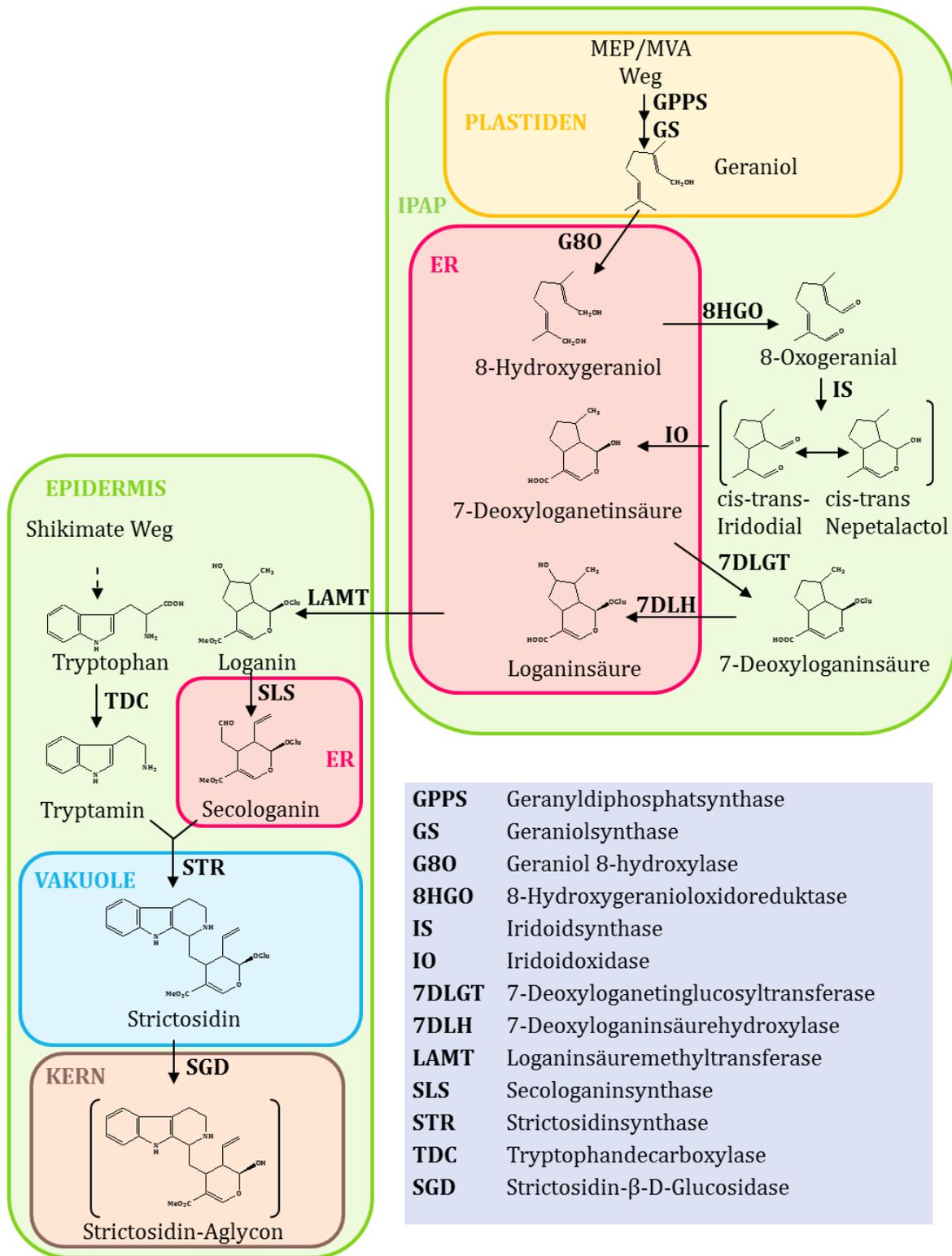


Abbildung 2: Darstellung der Kompartimentierung der MIA-Biosynthese bis zum Strictosidin-Aglycon in *C. roseus*. ER= Endoplasmatisches Retikulum, IPAP= Internes Phloem-assoziiertes Parenchym

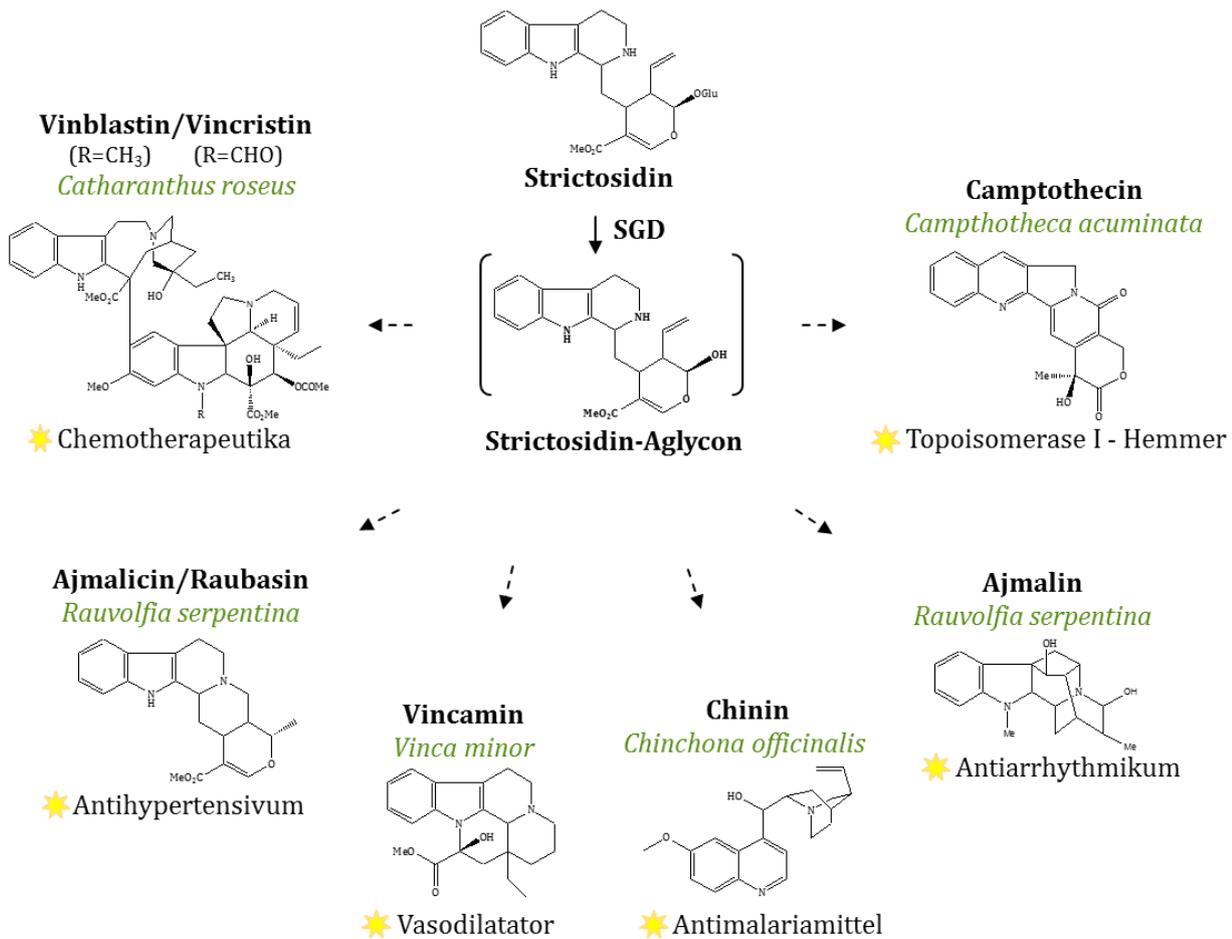
Auch die weiteren Schritte vom Strictosidin-Aglycon hin zu den jeweiligen Alkaloiden benötigt meist eine Vielzahl an Reaktionsschritten, deren Aufklärung durch den komplexen Syntheseweg der MIAs mit seiner starken Kompartimentierung erschwert wird. Das Strictosidin-Aglycon kann in mehreren isomeren Formen vorliegen, wobei es sich bei Cathenamin wohl um die dominante Form handelt (Gerasimenko et al., 2002, Stöckigt und Zenk, 1977). Ausgehend von Cathenamin kommt es zur Bildung unterschiedlicher monomerer MIAs, wie z. B. Ajmalicin, Vindolin, Tabersonin und Catharanthin. Ajmalicin entsteht durch Reduktion von Cathenamin durch die Cathenaminreduktase (CR). Catharanthin, Vindolin und Tabersonin hingegen werden durch reversible Umwandlung zu 4,21-Dehydrogeissoschizin und Bildung von Stemmadenin synthetisiert (Pan et al., 2016). Das Enzym, das Cathenamin zu Tetrahydroalstonin umwandelt, wurde erst vor kurzem identifiziert und kloniert. Die Tetrahydroalstoninsynthase (THAS) (Stavrinos et al., 2015). Bisher konnten keine Enzyme oder Gene identifiziert werden, die an der Biosynthese von Catharanthin beteiligt sind (El-Sayed und Verpoorte, 2007) und auch der Weg hin zu Tabersonin ist bisher nicht bekannt. Der sieben Enzyme umfassende Biosyntheseweg vom Tabersonin hin zum Vindolin hingegen wurde vor kurzem aufgeklärt (Besseau et al., 2013, Qu et al., 2015).

Tabersonin wird zunächst durch die Tabersonin-16-hydroxylase (T16H), einem Cytochrom P450, zu 16-Hydroxytabersonin umgewandelt (Abbildung 4). 16-Hydroxytabersonin wird anschließend durch die 16-Hydroxytabersonin-16-O-methyltransferase (16OMT) zu 16-Methoxytabersonin methyliert und durch die Tabersonin-3-oxygenase (T3O) und Tabersonin-3-reduktase (T3R), zu 3-Hydroxy-16-methoxy-2,3-dihydroxytabersonin umgewandelt. Die 16-Methoxy-2,3-dihydroxytabersonin-N-methyltransferase (NMT) katalysiert die Methylierung zu Desacetoxyvindolin, welches dann zunächst durch die Desacetoxyvindolin-4-hydroxylase (D4H) hydroxyliert und anschließend durch die Deacetylvindolin-4-O-acetyltransferase (DAT) acetyliert wird um Vindolin zu bilden (Duge de Bernonville et al., 2015, Qu et al., 2015).

Die dimeren Inolalkaloide Vinblastin und Vincristin entstehen schließlich durch die Kopplung der monomeren MIAs Catharanthin und Vindolin durch eine in der Vakuole lokalisierte Peroxidase (CrPrx1). Durch diese Kopplungsreaktion entsteht zunächst Anhydrovinblastin, aus dem Vinblastin und schließlich Vincristin gebildet werden kann (Costa et al., 2008, Verpoorte et al., 1997).

#### **1.4 Strictosidin und sein Aglycon als Vorläufer wichtiger Pharmazeutika**

Strictosidin spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Vinblastin und Vincristin, sondern ist die Vorläufersubstanz von über 2500 Indolalkaloiden (Szabo, 2008). Unter diesen aus Strictosidin gebildeten Alkaloiden findet man viele medizinisch wertvolle Substanzen, wie z. B. das Antimalariamittel Chinin, den Topoisomerase I-Hemmer Camptothecin, das Antiarrhythmikum Ajmalin, den Vasodilatator Vincamin und das Antihypertensivum Ajmalicin (Abbildung 3) (Stöckigt et al., 2011).



**Abbildung 3: Darstellung einiger aus Strictosidin bzw. seiner deglycosylierten Form gebildeter Arzneistoffe.** Modifiziert nach (Stöckigt et al., 2011).

Vincamin (Monoterpenindolalkaloid) wurde in den 50er Jahren aus den Blättern von *Vinca minor* (Apocynaceae) isoliert (Schlittler und Furlenmeier, 1953). Das Reinalkaloid und sein Derivat Vinpocetin bewirken eine Erhöhung der Durchblutung und des Metabolismus des Gehirns (Wink, 2010b). Die Wirkung wird zum einen auf die Inhibition von spannungsgesteuerten Natriumkanälen zurückgeführt, zum anderen auf die antioxidativen Eigenschaften (Ma et al., 2016, Vas und Gulyas, 2005).

Ajmalin (Monoterpenindolalkaloid) wurde zum ersten Mal 1931 von Salimuzzaman Siddiqui und Rafar Hussein Siddiqui aus den Wurzeln von *Rauwolfia serpentina* isoliert (Sneader, 2005). Ajmalin wirkt am Herzen als Natriumkanalblocker und wird als Antiarrhythmikum der Klasse 1 bei Herzrhythmusstörungen eingesetzt (Hänsel und Sticher, 2010). Darüber hinaus wird es zur Diagnose des Brugada Syndroms, einer angeborenen Herzerkrankung verwendet, die die Ionenkanäle betrifft und zu plötzlichem Herzstillstand führen kann (Arnalsteen-Dassonvalle et al., 2010).

Ajmalicin/Raubasin (Monoterpenindolalkaloid) wurde 1931 ebenfalls von Salimuzzaman Siddiqui aus den Wurzeln von *Rauwolfia serpentina* isoliert, wo es als Nebenalkaloid vorkommt (Kroneberg, 1958). Heute wird es meist aus den Wurzeln von *C. roseus* extrahiert oder durch Partialsynthese aus Serpentin hergestellt. Ajmalicin zeigt

blutdrucksenkende und gefäßerweiternde Eigenschaften und wird daher vor allem bei der Behandlung von zerebralen und peripheren Durchblutungsstörungen eingesetzt (Hänsel und Hölzl, 1996). Darüber hinaus wird eine Kombinationstherapie von Raubasin und Almitrin bei der Behandlung von Demenzpatienten untersucht (Yang et al., 2011).

Chinin (Chinolinalkaloid) wurde 1820 zum ersten Mal von Pierre Joseph Pelletier und Joseph Bienaimé Caventou in nahezu reiner Form aus der Rinde von *Chinchona*-Bäumen isoliert (Achan et al., 2011). Chinin war das Mittel der Wahl zur Behandlung von Malaria bis es in den 1920er Jahren durch das Aufkommen besser wirksamer, synthetischer Mittel ersetzt wurde. Auf Grund zunehmender Resistenzentwicklungen wird Chinin heute von der WHO als Wirkstoff der zweiten Wahl bei der Behandlung unkomplizierter Malaria in Kombinationstherapie mit Doxycyclin, Tetracyclin oder Clindamycin empfohlen, sollte die erste Therapie (meist Artemisinin-basierte Kombinationstherapie) nicht anschlagen (Achan et al., 2011, Paddon und Keasling, 2014).

Camptothecin (Chinolinalkaloid) wurde 1966 aus der Rinde von *Camptotheca acuminata* (Cornaceae) isoliert (Wall et al., 1966). Es zeigt zytostatische und antitumor Aktivität, die auf der Hemmung der DNA-Topoisomerase I beruht und der daraus resultierenden Störung der Replikation und Transkription von Tumorzellen (van Wyk und Wink, 2015). Auf Grund der starken Nebenwirkungen von Camptothecin wurden teilsynthetische Derivate wie Topotecan und Irinotecan entwickelt, die heute zur Behandlung von Darm-, Lungen- und Eierstockkrebs verwendet werden (Cui et al., 2015, Wang et al., 2014).

## 1.5 Biotechnologische Herstellung von Sekundärstoffen

Die biotechnologische Herstellung von seltenen, medizinisch wichtigen SM wie z. B. des Antimalariamittels Artemisinin, der Chemotherapeutika Vinblastin und Vincristin oder des Schmerzmittels Morphin, steht seit Jahrzehnten im Fokus vieler Forschungsgruppen. Um diese Stoffe in Mikroorganismen herstellen zu können, müssen jedoch zunächst die jeweiligen Biosynthesewege mit den verantwortlichen Genen und Enzymen aufgeklärt werden. Hierbei handelt es sich häufig um einen jahrzehntelangen Prozess (Schäfer und Wink, 2009).

Bei den MIAs wurde bereits 1979 eine STR aus dem löslichen Proteinextrakt einer *C. roseus* Zellsuspensionskultur isoliert und charakterisiert. Das Enzym zeigte eine Masse von 34 kDa und scheint für seine katalytische Aktivität keinen Cofaktor zu benötigen (Treimer und Zenk, 1979). Einige Jahre später folgte die Isolation einer weiteren STR (STR1) aus *R. serpentina* (Hampp und Zenk, 1988). Es stellte sich heraus, dass die *C. roseus* STR im Gegensatz zu der STR1 aus *R. serpentina*, in der Pflanze in vier verschiedenen Isoformen vorliegt, wohingegen die STR1 nur eine Proteinform bildet (Pfitzner und Zenk, 1989). Die cDNA-Sequenz der STR1 wurde 1988 von Kutchan et al. ermittelt und 1989 wurde die STR1 als erstes Enzym aus dem pflanzlichen Sekundärmetabolismus funktionell in einem Mikroorganismus (*E. coli*) exprimiert (Kutchan,

1989). 1990 folgte die cDNA-Sequenz der *C. roseus* STR (McKnight et al., 1990) und 1992 ihre funktionelle Expression und Reinigung in *E. coli* (Roessner et al., 1992).

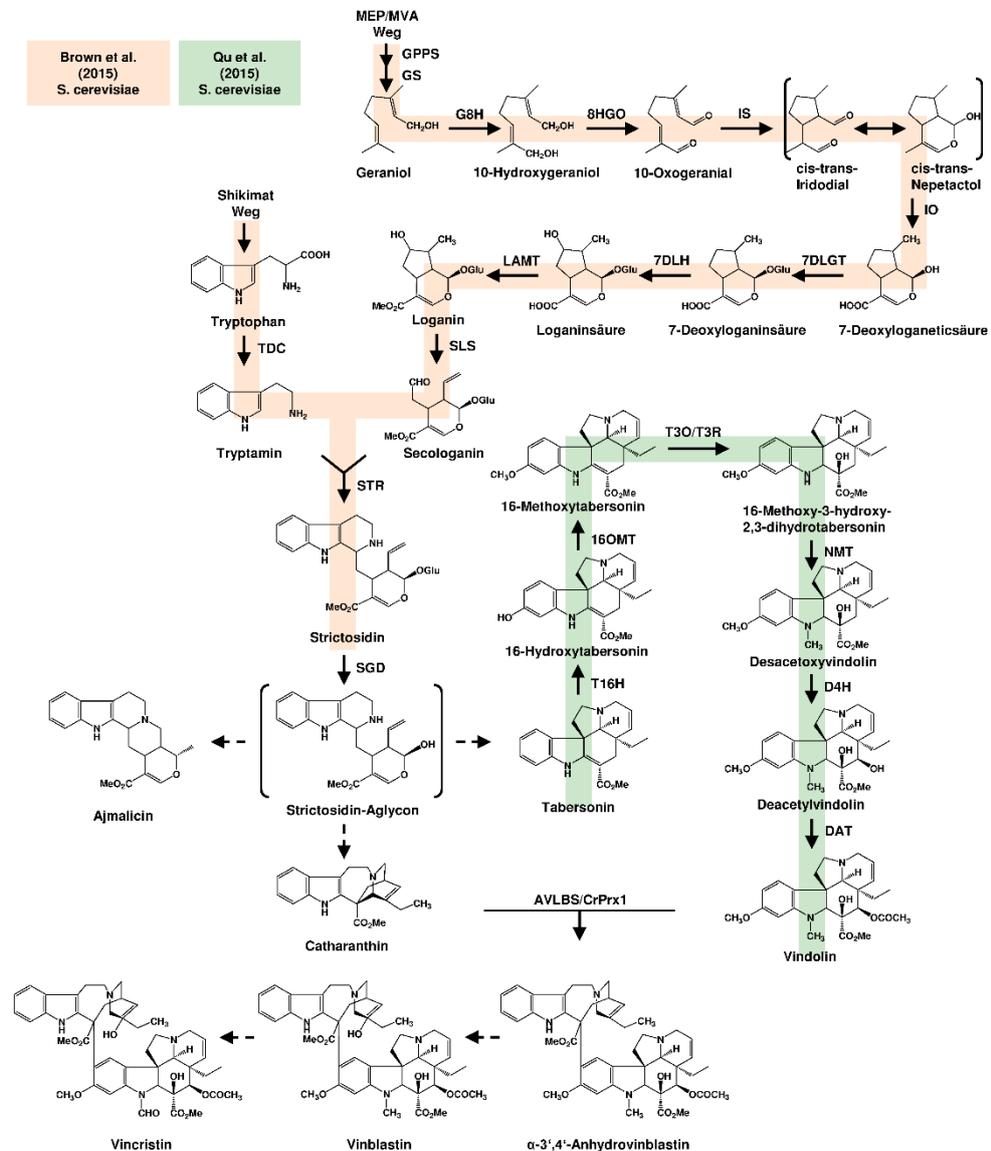
Die TDC war das zweite Enzym, das aus *C. roseus* Zellsuspensionskulturen isoliert und charakterisiert wurde. Das Enzym besteht aus zwei 54 kDa Untereinheiten, von denen jede ein kovalent gebundenes Pyrrolochinolinchinon und ein Pyridoxalphosphat als Cofaktor trägt (Noe et al., 1984, Pennings et al., 1989). Auch die TDC konnte funktionell in *E. coli* exprimiert werden (De Luca et al., 1989) und wurde 2011 von Park et al. verwendet, um durch duale Expression zusammen mit einer Tryptamin 5-Hydroxylase (T5H) aus Reis Serotonin in *E. coli* zu produzieren (Park et al., 2011).

Ein weiteres zentrales Enzym aus der Biosynthese der MIAs, die SGD, wurde 1998 aus *C. roseus* Zellsuspensionskulturen isoliert und charakterisiert. Das Enzym bildet Aggregate, die aus vier, acht oder zwölf Untereinheiten von 63 kDa bestehen. Alle diese Aggregate sind enzymatisch aktiv (Luijendijk et al., 1998). Die Ermittlung der cDNA-Sequenz der SGD und deren heterologe Expression in *S. cerevisiae* folgte (Geerlings et al., 2000).

Nur ein Jahr nach der erfolgreichen Einzelexpression der SGD in *S. cerevisiae* gelang Geerlings et al. die Produktion von Strictosidin und Cathenamin durch duale Expression der SGD zusammen mit der STR (Geerlings et al., 2001). Durch Fütterung von Tryptamin und Secologanin konnten 3 g/L Strictosidin in 3 Tagen produziert werden. Ein Problem dieses Systems lag jedoch darin, dass die STR hauptsächlich ins Medium sekretiert wurde, wohingegen die SGD in der Zelle vorlag. Zur Bildung von Cathenamin war es daher nötig, die Zellen aufzuschließen damit das gebildete Strictosidin in die Zelle gelangen konnte.

In den folgenden Jahren wurden viele Fortschritte bei der Aufklärung der MIA-Biosynthese und vieler anderer pflanzlicher SM-Biosynthesewege gemacht. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten über die erfolgreiche partielle oder vollständige Rekonstruktion von SM-Biosynthesewegen in Mikroorganismen.

Bei den MIAs wurde 2015 die erste Totalsynthese von Strictosidin in *S. cerevisiae* berichtet, mit Ausbeuten an Strictosidin von bis zu 0,5 mg/L (Brown et al., 2015). Der bisher bekannte Biosyntheseweg der MIAs, sowie die heterolog in Mikroorganismen exprimierten Teilabschnitte können Abbildung 4 entnommen werden.



**Abbildung 4: Biosyntheseweg der MIAs.** Bereits heterolog in Mikroorganismen exprimierte Abschnitte sind farbig unterlegt (aus Dziggel et al., 2016).

Auf dem Gebiet der Benzylisochinolinalkaloide (BIAs) (Abbildung 5), wurde 2008 zum ersten Mal die Produktion von Alkaloiden in einem mikrobiellen System berichtet: Die Produktion von (S)-Reticulin und weiteren einfachen Alkaloiden (Magnoflorin, Scoulerin) aus Dopamin. Als Produktionssystem für (S)-Reticulin diente *E. coli* wohingegen für die Herstellung von Magnoflorin und Scoulerin Mischkulturen aus den (S)-Reticulin produzierenden *E. coli* und rekombinanten *S. cerevisiae* verwendet wurden, die die entsprechenden Enzyme, wie z. B. das Berberine Bridge Enzyme (BBE) für die Scoulerin Synthese, exprimierten (Minami et al., 2008).

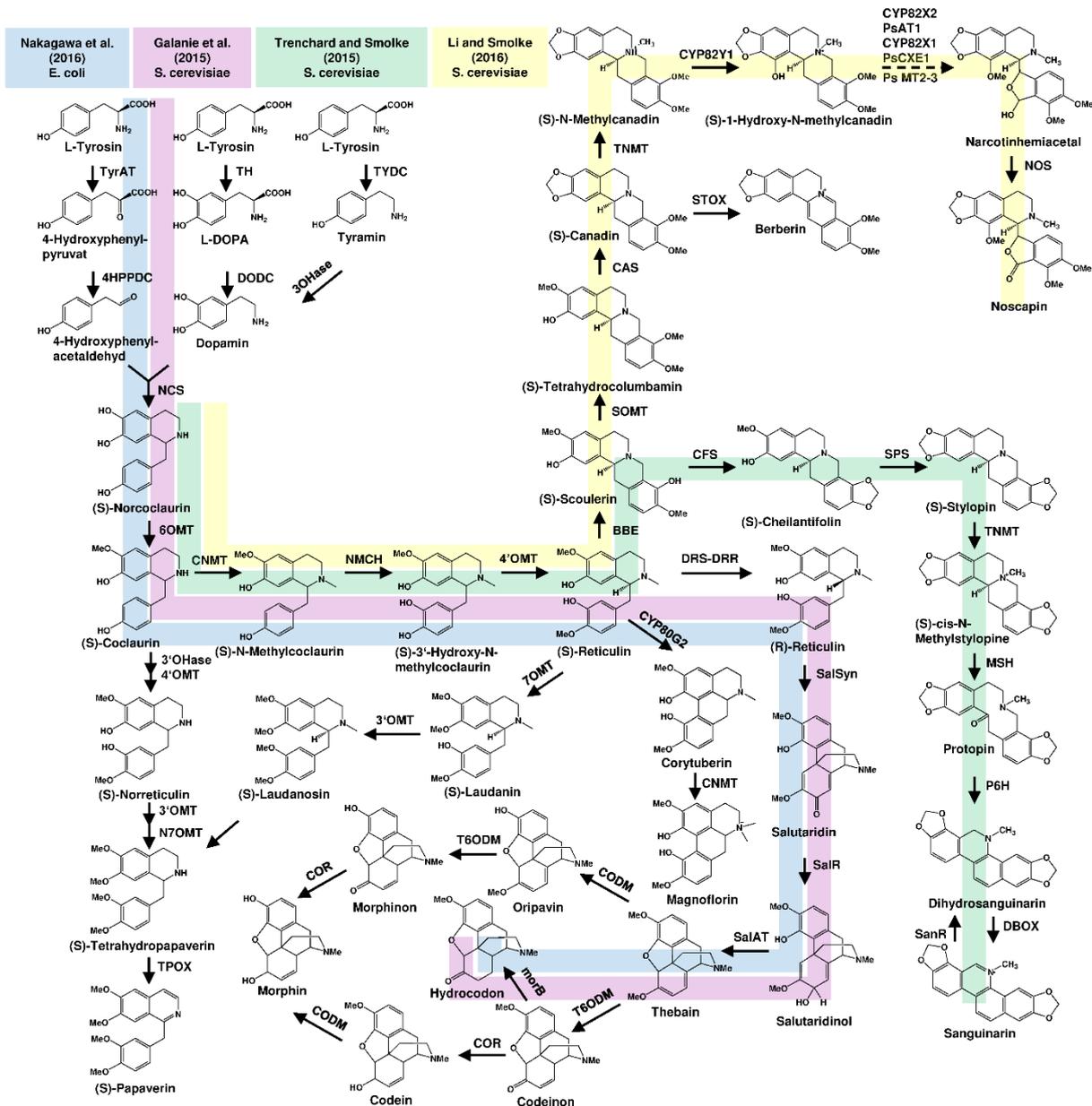
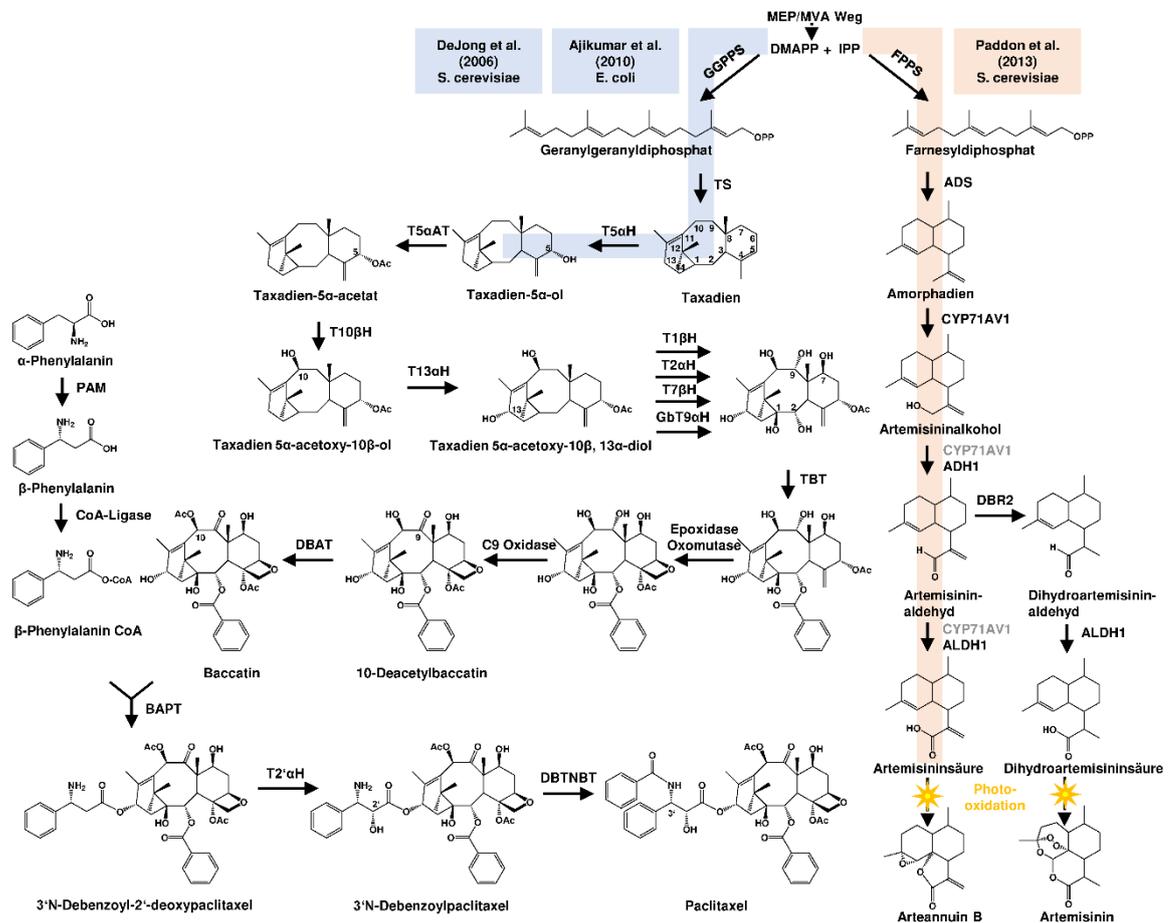


Abbildung 5: Biosyntheseweg der BIA. Bereits heterolog in Mikroorganismen exprimierte Abschnitte sind farbig unterlegt (aus Dziggel et al., 2016).

Im selben Jahr gelang auch die Synthese von (S)-Scoulerin, (S)-Tetrahydrocolumbamin und (S)-Tetrahydroberberin aus (S)-Reticulin in *S. cerevisiae* (Hawkins und Smolke, 2008). Darüber hinaus wurde die Produktion von Sanguinarin (Trenchard und Smolke, 2015) und Noscapiin (Li und Smolke, 2016), nach Fütterung von (R/S)-Norlaudanoso- lin, in einem Hefesystem erreicht. Die vollständige Aufklärung der Morphin-Biosyn- these ermöglichte 2015 die ersten Totalsynthesen von Opiaten aus einfachen Kohlen- stoffquellen. Die Synthese von Thebain und Hydrocodon wurde zuerst in einem *S. cerevisiae* System (Galanie et al., 2015) berichtet und kurz darauf auch in einem *E. coli* System, wobei das *E. coli* System mit Ausbeuten von etwa 2,1 mg/L Thebain eine etwa 300-fache Steigerung zum Hefesystem zeigte (Nakagawa et al., 2016). Abbildung 5 gibt einen Überblick über den Biosyntheseweg der BIA und zeigt die Abschnitte auf, die bereits erfolgreich in Mikroorganismen überführt werden konnten.

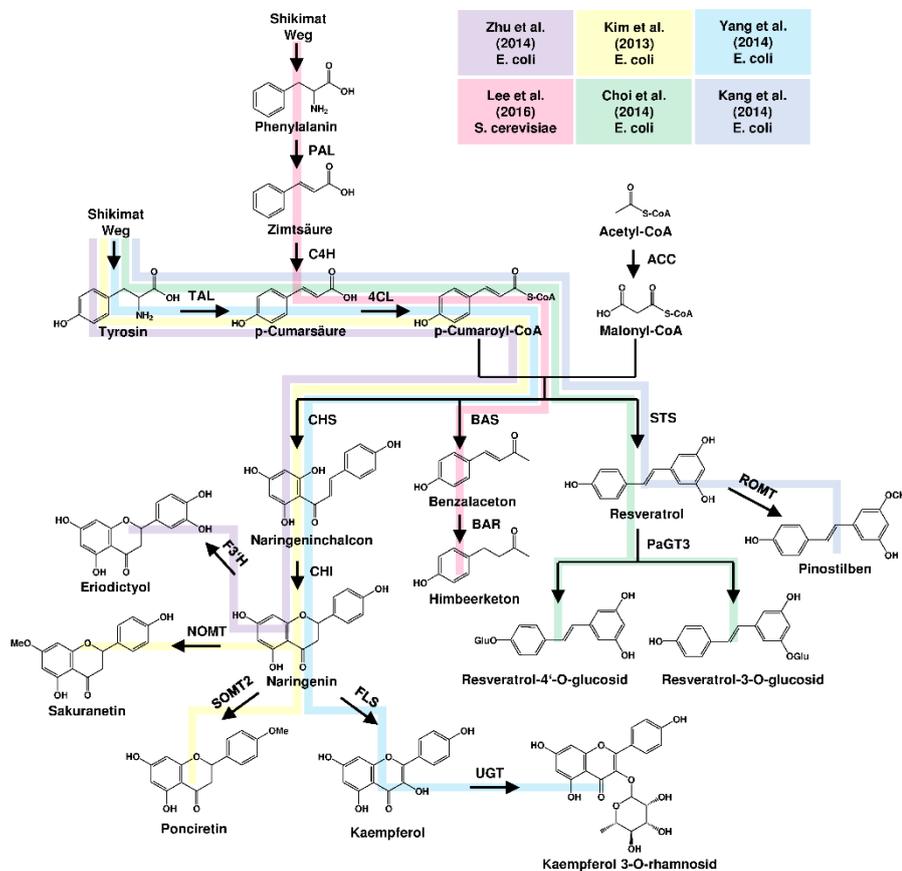
Neben den Alkaloiden wurden auch auf dem Gebiet der Terpene und der Phenylpropanoide große Fortschritte gemacht. Abbildung 6 zeigt den vermuteten Biosyntheseweg der Terpene Artemisinin und Paclitaxel. Die bereits heterolog in Mikroorganismen exprimierten Abschnitte der Biosynthese sind farbig unterlegt.



**Abbildung 6: Biosyntheseweg der Terpene Paclitaxel und Artemisinin.** Bereits heterolog in Mikroorganismen exprimierte Abschnitte sind farbig unterlegt (aus Dziggel et al., 2016).

Auf dem Gebiet der Terpene wurde die Totalsynthese von Artemisininsäure, dem Vorläufer des Antimalariamittels Artemisinin, in Mengen von 25 g/L in *S. cerevisiae* publiziert, sowie eine neue chemische Methode zur Umwandlung der gebildeten Artemisininsäure zu Artemisinin (Paddon et al., 2013). Darüber hinaus wird an der heterologen Produktion des Antikrebsmittels Paclitaxel (Taxol®) gearbeitet. Hier ist es gelungen, frühe Abschnitte der Biosynthese in mikrobielle Systeme zu überführen, wodurch die Produktion der Paclitaxel-Vorläufer Taxadien und Taxadien-5α-ol in *S. cerevisiae* und *E. coli* ermöglicht wurde. Wie schon bei der Totalsynthese von Opiaten zeigte auch hier das *E. coli* System eine deutlich höhere Ausbeute als das Hefesystem (1 g/L Taxadien und 58 mg/L Taxadien-5α-ol im Gegensatz zu 1 mg/L Taxadien und 25 µg/L Taxadien-5α-ol).

Im Bereich der Phenylpropanoide (Abbildung 7) wurde bereits 2003 die heterologe Produktion des Flavonoids Naringenin und seines Downstream-Metabolits Pinocembrin aus zugefütterten Aminosäurevorläufern in einem *E. coli* System verwirklicht.



**Abbildung 7: Biosyntheseweg verschiedener Phenylpropanoide.** Bereits heterolog in Mikroorganismen exprimierte Abschnitte sind farblich unterlegt (aus Dziggel et al., 2016).

Die Ausbeuten an Naringenin betragen etwa 450 - 750 µg/L (Hwang et al., 2003). Seit-her ist es gelungen, die Ausbeute an Naringenin deutlich zu steigern. Das momentan beste System liefert eine Ausbeute von 421 mg/L Naringenin aus Glucose (Wu et al., 2015). Darüber hinaus ist es gelungen, weitere Downstream-Metabolite des Naringenin heterolog in *E. coli* herzustellen, wie Eriodictiol (5 mg/L) (Zhu et al., 2014a), Kaempferol 3-O-rhamnosid (57 mg/L) (Yang et al., 2014) oder Ponciretin (42,5 mg/L) und Sakuranetin (401 mg/L) (Kim et al., 2013).

Neben den aus Naringenin gebildeten Flavonoiden ist es auch gelungen das Stilben Resveratrol sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *E. coli* rekombinant herzustellen (Li et al., 2015, Liu et al., 2016), sowie modifizierte Formen mit besserer Stabilität und Bioverfügbarkeit (Choi et al., 2014, Kang et al., 2014). Eine genauere Darstellung der Biosynthesewege der besprochenen Phenylpropanoide kann Abbildung 7 entnommen werden.

## 1.6 Zielsetzung

Im Fokus dieser Arbeit steht die heterologe Produktion von Strictosidin und seinem Aglycon, zweier zentraler Moleküle der Monoterpenindolalkaloide.

Zu diesem Zweck sollten drei Schlüsselenzyme der MIA-Biosynthese aus *Catharanthus roseus*, die Tryptophandecarboxylase, die Strictosidinsynthase und die Strictosidin- $\beta$ -D-glucosidase, funktionell in einem Mikroorganismus (*Pichia pastoris* bzw. *Escherichia coli*) co-exprimiert werden, so dass sie nach Fütterung mit den entsprechenden Substraten die enzymatischen Produkte herstellen.

Zur Realisierung dieses Ziels wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Klonierung der *C. roseus* Gene in *P. pastoris* und *E. coli* Expressionsvektoren
- Einzelexpression der rekombinanten Enzyme und Expressionsoptimierung
- Reinigung über Affinitätschromatografie
- Charakterisierung der gereinigten Enzyme (pH, Temperatur,  $K_m$ ,  $V_{max}$ )
- Co-Expression aller drei Gene in einem einzigen Mikroorganismus

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Acetonitril	Sigma-Aldrich
Acrylamid Mix: Bisacrylamid (30 : 1)	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Ameisensäure	Th. Geyer GmbH und Co. KG
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare
Ammoniumsulfat	AppliChem
Bacto Agar	Becton, Dickinson
Bacto Trypton	Becton, Dickinson
Bacto Hefeextrakt	Becton, Dickinson
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Fulka Chemi
Coomassie Brilliant Blue R250/G250	Sigma bzw. Fulka Chemi
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Merck
Ethanol 99 % und 96 %	Zentralbereich Neuenheimer Feld
Ethidumbromid	Serva
Formaldehyd	Riedel-de Haën
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
HCl $\geq 32$ %	Fluka
HPLC-H <sub>2</sub> O	AppliChem
Imidazol	AppliChem
Isopropanol	Zentralbereich Neuenheimer Feld
IPTG	AppliChem
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> trihydrat	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
$\beta$ - Mercaptoethanol	Carl Roth
Methanol	J.T.Baker
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihydrat	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> monohydrat	Merck
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Riedel-de Haën
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumthiosulfat	J.T.Baker
Pepton	Merck
Phosphorsäure $\geq 85$ %	Sigma-Aldrich
Pyridoxal-5-phosphat	Merck
Secologanin	Sigma-Aldrich
Silbernitrat	AppliChem
Sorbitol	Th. Geyer GmbH und Co.
Tryptamin	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan	Merck



Mut_STR_N-His_Rev	ATGGTGATGCATGAGATCTGC
STR_opti_KpnI_Fw	GATCGGTACCAGCCCGATCCTGAG
STR_opti_XhoI_Rev	GATCCTCGAGCCAATTGGATCTGC
pET32_STR_N-His_Fw	ATGCATCACCATCATCACCACAGCCCGATC
pET32_STR_Rev	AGAACCAGAACCGGCCAGGTTAGCGTC
pET_Fw	TAATACGACTCACTATA
pET_Rev	CCGCTGAGCAATAACTAG
pCDFDuet1_Fw1	GGATCTCGACGCTCTCCCT
pCDFDuet1_Rev1	GATTATGCGGCCGTGTACAA
pCDFDuet1_Fw2	TTGTACACGGCCGCATAATC

## 2.4 Gene und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurden Plasmide für die Expression in *P. pastoris* GS115 und KM71, sowie für die Expression in *E. coli* BL21(DE3) verwendet (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Verwendete Plasmidvektoren.** \*Cat1= STR aus *Catharanthus roseus*

Vektor	Herkunft
<b>PCR-Template und Expression in <i>P. pastoris</i></b>	
pPIC9_Cat1*	Bachelorarbeit Severin Uebbing (2009)
pPIC9_TDC	Bachelorarbeit Daniel Krüger (2011)
pPICZ $\alpha$ A	Invitrogen
<b>Expression in <i>E. coli</i></b>	
pET45b(+)	Novagen
pET32c(+)	Novagen
pCDFDuet1_SGD	GenScript HK Limited
pCDFDuet1_SGD_STR	GenScript HK Limited

Zur Expression in *P. pastoris* wurden die Plasmide pPIC9 und pPICZ $\alpha$ A verwendet, die den AOX1-Promotor besitzen. Dieser Promotor lässt sich über Methanol induzieren und ermöglicht dadurch die kontrollierte Expression heterologer Gene. Zur Expression in *E. coli* wurden Plasmide des pET- und pCDF-Typs verwendet, die den T7-Promotor enthielten. In Kombination mit einem *E. coli* Stamm, der eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des IPTG induzierbaren lacUV5-Promotors besitzt, kann bei diesen Vektoren die Expression heterologer Gene über IPTG gesteuert werden.

Die verwendeten *Catharanthus*-Gene der TDC, STR und SGD entstammten früheren Bachelorarbeiten (Tabelle 5) bzw. wurden für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert synthetisiert (GenScript HK Limited).

## 2.5 Bakterien- und Hefestämme

Bakterien: *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* BL21(DE3)

Hefen: *P. pastoris* GS115 und *P. pastoris* KM71

## 2.6 Puffer, Medien und Lösungen

### 2.6.1 Puffer und Medien für molekularbiologische Arbeiten

**Tabelle 6: Für molekularbiologische Arbeiten verwendete Puffer und Medien.** \*Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 2 % Agar zugefügt.

MM-Medium*	Wasser autoklavieren und nach Abkühlen auf ca. 60 °C 1,34 % YNB, $4 \times 10^{-5}$ % Biotin, 0,5 % Methanol, alle Lösungen sterilfiltriert, zugeben
MD-Medium*	Wasser autoklavieren und nach Abkühlen auf ca. 60 °C 1,34 % YNB, $4 \times 10^{-5}$ % Biotin, 2 % Dextrose, alle Lösungen sterilfiltriert, zugeben
YPD-Medium*	1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, nach dem Autoklavieren 2 % sterile Dextrose zugeben, Lagerung bei 4 °C
YPG-Medium*	1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, nach dem Autoklavieren 1 % steriles Glycerin zugeben, Lagerung bei 4 °C
LB-Medium*	1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl <sub>2</sub> , 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, autoklavieren
10x PCR Puffer	15 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris, 500 mM KCl, 5 % Triton X-100
Blaumarker	50 % Glycerin (v/v), 0,0025 g Bromphenol Blau, 50 % Wasser (v/v)
Nukleotidmix	2,5 mM je dNTP
Agarosegellösung	0,6 - 1 % (w/v) in TAE 0,00001 % Ethidiumbromid

### 2.6.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

**Tabelle 7: Für proteinbiochemische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Proteinreinigung:</b>		
1x LEW-Puffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl NaOH (pH 8)	
1x Elutionspuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol NaOH (pH 8)	
10x Tris-Glycin Laufpuffer:	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS	
5x Bradford-Reagenz: (100 ml)	Coomassie Brilliant Blue G250 Ethanol (99,8 %ig) Phosphorsäure (85 %ig) H <sub>2</sub> O	0,05 g 24 ml 50 ml 26 ml

<b>SDS-PAGE:</b>			
Gellösungen:		12 % Trenngel	5 % Sammelgel
	H <sub>2</sub> O	3,3 mL	3,40 mL
	30 % Acrylamidmix (v/v)	4,0 mL	0,83 mL
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL	
	1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)		0,63 mL
	10 % SDS (v/v)	0,1 mL	0,05 mL
	10 % APS (v/v)	0,1 mL	0,05 mL
	TEMED	0,005 mL	0,005 mL
4x Lämmli-Puffer:	1 M Tris (pH 6,8) 10 % SDS (v/v) Bromphenolblau Glycerin H <sub>2</sub> O β-Mercaptoethanol	5 ml 20 ml 0,5 % (w/v) 10 ml 5 ml 10 % (v/v)	
Coomassie-Färbelösug:	0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % Essigsäure, 40 % Ethanol, 50 % H <sub>2</sub> O		
Coomassie-Entfärbelösung:	10 % Essigsäure, 20 % Ethanol, 70 % H <sub>2</sub> O		
Lösungen zur Silberfärbung:	Lösung A: 50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 1,85 % Formaldehyd Lösung B: 50 % Ethanol Lösung C: 0,1 g/L Natriumthiosulfat Lösung D: 1 g/L Silbernitrat Lösung E: 30 g/L Natriumcarbonat, 1,85 % Formaldehyd, 2 % C Lösung F: 25 mM EDTA		
Transferpuffer	25 mM Tris, 196 mM Glycin, 20 % Methanol		
<b>Enzymassays:</b>	pH-Wert	1 M Puffer 1	1 M Puffer 2
0,1 M Natriumphosphatpuffer (1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnt)	6	12,0 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	88,0 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7	57,7 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42,3 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8	93,2 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	06,8 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 M Kaliumphosphatpuffer (1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnt)	6	13,2 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	86,8 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7	61,5 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	38,5 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8	94,0 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	06,0 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

	pH-Wert	0,2 M Puffer 1	0,1 M Puffer 2
0,1 M Citratpuffer	3	20,6 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	79,4 mL Zitronensäure
	4	38,6 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	61,4 mL Zitronensäure
	5	51,5 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48,5 mL Zitronensäure
	6	63,2 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36,8 mL Zitronensäure
	7	82,4 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,6 mL Zitronensäure
	pH-Wert	1 M Puffer 1	1 M Puffer 2
0,1 M Carbonatpuffer (1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnt)	9	10 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	90 mL NaHCO <sub>3</sub>
	10	60 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40 mL NaHCO <sub>3</sub>
	11	90 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 mL NaHCO <sub>3</sub>

## 2.7 Kits und Chromatographie-Säulen

Tabelle 8: Verwendete Kits und Säulen

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
GeneJET Extraction and DNA Clean up Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
TransformAid™ Bacterial Transformation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare
Protino® Ni-TED/Ni-IDA 2000 Packed Columns	Macharey-Nagel
Bio-Scale™ Mini Profinity IMAC Cartridges (1mL)	BioRad
S-Protein-Agarose (2 mL)	Novagen

## 2.8 Geräte und Software

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Software

<b>Zentrifugen</b>	
Fresco17 Heraeus Centrifuge (Eppis)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Rotina 380R (Falcons)	Hettich Lab Technology
<b>Ultraschall</b>	
Omni Sonic Ruptor 4000	Omni International, Inc.
<b>PCR-Maschinen</b>	
T Gradient Thermocycler	Biometra GmbH
<b>Inkubatoren und Schüttelinkubatoren</b>	
Thermoshaker bioSan TS-100	Peqlab
Incubator Shaker G25	New Brunswick Scientific Co. Inc.
HettCube 400R	Hettich Lab Technology
<b>Wasserbäder und Autoklaven</b>	
Buchi Heating Bath B-490	Büchi Labortechnik
Certoclav Tisch Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH
<b>pH-Meter und Photometer</b>	
MP120 Basic Portable pH/mV/°C Meter	Mettler-Toledo International Inc.
WPA Biowave II Spectrophotometer	Biochrom Ltd.

<b>HPLC und LC-MS</b>	
YL9100 HPLC System: Vacuum Degasser, Quaternary Pump, PDA Detector	YL Instrument Co.
Marathon Autosampler	Spark Holland
Finnigan Surveyor HPLC System: MS Pumpe+, Autosampler und PDA-Detektor+	Thermo Fisher Scientific Inc.
Finnigan LCQ-Duo Ion Trap Massenspektrometer mit APCI Quelle	Thermo Quest
ÄKTA start	GE Healthcare life Sciences
<b>Gelelektrophorese</b>	
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	CONSORT nv
Electrophoresis Power Supply EV243	Peqlab
Agarose-Gelelektrophoresekammern	Werkstatt Uni Heidelberg
PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem TwinS	VWR/Peqlab
BioDoc-It™ Imaging System	Ultra-Violet Products Ltd.
<b>Westernblot</b>	
Sartoblot®II	Sartorius
Desatronic 500/100 Powersupply	Desaga
ChemiDoc XRS+	BioRad
<b>Software</b>	
Clone Manager	Scientific & Educational Software
Chromas	Technelysium Pty Ltd.
YL-Clarity Software	YL Instrument Co.
Xcalibur™2.0.7 Software	Thermo Fisher Scientific Inc.
SigmaPlot	Systat Software GmbH

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Zur Herstellung von Vektorkonstrukten für die spätere Expression der TDC, STR und SGD in *P. pastoris* GS115 und KM71 bzw. *E. coli* Bl21(DE3) wurden verschiedene molekularbiologische Methoden verwendet, die im Folgenden näher erklärt werden. Tabelle 10 gibt einen Überblick darüber, welche Konstrukte in dieser Arbeit durch welche Methoden hergestellt wurden.

**Tabelle 10: Übersicht über alle hergestellten Expressionskonstrukte.** RE= Restriktionsenzyme; \* = Für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte Gene.

Konstrukt (+Tag)	RE	Ausgangsvektor	Gen
<b><i>P. pastoris</i></b>			
Klassische Klonierungen:			
1) pPIC9_STR_C-His	XhoI, NotI	pPIC9_Cat1	STR <i>C. roseus</i>
2) pPICZ $\alpha$ A_STR_C-His	XhoI, NotI	pPICZ $\alpha$ A	STR <i>C. roseus</i>
3) pPICZ $\alpha$ A_TDC_C-His	XhoI, NotI	pPICZ $\alpha$ A	TDC <i>C. roseus</i>
<b><i>E. coli</i></b>			
Klassische Klonierungen:			
1) pET45b(+)_TDC_N-His	NotI, XhoI	pET45b(+)	TDC <i>C. roseus</i>
2) pET45b(+)_STR_N-His	NotI, XhoI	pET45b(+)	STR <i>C. roseus</i>
3) pET45b(+)_STR_opti	KpnI, BglII	pET45b(+)	* STR aus 10)
4) pET32c(+)_STR_Trx	NotI, XhoI	pET32c(+)	* STR aus 10)
Bestellte Konstrukte:			
5) pCDFDuet1_SGD_STR	AscI, BglII	pCDFDuet1_SGD	* STR u. SGD
6) pCDFDuet1_SGD	AscI	pCDFDuet1	* SGD
Entfernen der SGD:			
7) pCDFDuet1	AscI	pCDFDuet1_SGD	- (Kontrolle)
8) pCDFDuet1_STR_S-tag	AscI	pCDFDuet1_SGD_STR	* STR

Mutagenese:			
9) pCDFDuet1_STR_C-His	-	pCDFDuet1_STR_S-tag	* STR
10) pCDFDuet1_STR_N-/C-His	-	pCDFDuet1_STR_C-His	* STR

### 3.1.1 Anzucht von Mikroorganismen

Zur Klonierung und Expression der Gene der TDC, STR und SGD wurden zwei unterschiedliche Mikroorganismen verwendet: Die eukaryote Hefe *Pichia pastoris* und das prokaryote Bakterium *Escherichia coli*.

#### 3.1.1.1 *P. pastoris*

Zur Expression der Gene der TDC und STR in der methylotrophen Hefe *P. pastoris* wurden die Stämme GS115 und KM71 verwendet. In Kombination mit Vektoren, die den mit Methanol induzierbaren AOX1-Promotor enthalten, lässt sich die Expression von heterologen Genen über die Zugabe von Methanol regulieren.

Beide Stämme wurden bei 28 °C für 2 - 3 Tage unter Schütteln in YPD- bzw. YPG-Medium angezogen.

#### 3.1.1.2 *E. coli*

Zur Klonierung der Gene der TDC, STR und SGD sowie zur Aufbewahrung von Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Dieser Stamm besitzt eine hohe Transformationseffizienz und Plasmidausbeute.

Zur Expression der Gene der TDC, STR und SGD wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Dieser Stamm enthält eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht und mit IPTG induziert werden kann. In Kombination mit Vektoren, die den T7-Promotor besitzen (z. B. pET und pCDFDuet1) lässt sich so die Genexpression von heterolog exprimierten Genen regulieren.

Beide *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln über Nacht in LB-Medium angezogen.

### 3.1.2 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen wurden die Bakterien in 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C schüttelnd angezogen und das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben verwendet. Isolierte Plasmide wurden über Restriktionsverdau und ggf. Sequenzierung auf ihre Identität hin überprüft und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von Genen für Klonierungen, sowie zur Überprüfung des Erfolgs von Transformations- und Ligationsreaktionen wurde die Methode der PCR (Mullis et al., 1986) angewendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend zur Überprüfung ihrer Größe und Reinheit in 1 % igen Agarosegelen aufgetrennt.

#### 3.1.3.1 Standard PCR

Zur Amplifikation der Gene der TDC, STR und SGD mit entsprechenden Restriktionsenzymststellen für deren folgende Klonierung wurden Standard PCRs (Sambrook und Russell, 2006) durchgeführt. Die Sequenzen, der zu diesem Zweck designten Primer, können Tabelle 4 entnommen werden. Ein typisches Temperaturprofil einer Amplifikationsreaktion sowie die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11: Temperaturprofil einer typischen PCR-Reaktion und Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes.**

Temperaturprofil			PCR-Ansatz	
Denaturierung	95 °C	5 min	DNA	50-100 ng
Denaturierung	95 °C	30 s	10x Puffer	1x
Anlagerung	56 °C	30 s		
Extension	72 °C	60 s		
			Vorwärts Primer	5 pmol
			Rückwärts Primer	5 pmol
Finale Elongation	72 °C	5 min	dNTPs	250 µM
Pause	4 °C	∞	Taq	1 Unit
			H <sub>2</sub> O	ad. 50 µL

#### 3.1.3.2 Kolonie PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs von Ligations- bzw. Transformationsreaktionen wurde die Methode der Kolonie PCR verwendet. Hierfür wurden nach Transformation auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und in 50 µl Wasser resuspendiert.

### 3.1.3.2.1 *P. pastoris*

Zur Analyse von *P. pastoris*-Zellen wurde diese Zellsuspension zum Zellaufschluss zunächst 2 min mit Glasperlen (0,17 - 0,18 mm) gevortext, für 15 min bei -80 °C tiefgefroren und anschließend 5 min bei 100 °C inkubiert. Dieser Ablauf wurde wiederholt und die Ansätze anschließend für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 5 µL - 10 µL des Überstands wurden als Template in eine PCR eingesetzt. Als Primer wurden AOX1- bzw. Gen-spezifische Primer (Tabelle 4) verwendet.

### 3.1.3.2.2 *E. coli*

Zur Analyse von *E. coli*-Zellen wurden 4 µL der Zellsuspension direkt als Template in eine PCR eingesetzt. Als Primer wurden pET- und pCDFDuet1- bzw. AOX1-spezifische Primer und Gen-spezifische Primer (Tabelle 4) verwendet.

## 3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen, zur Bestimmung ihrer Größe und Reinheit, wurde die Methode der Agarosegelelektrophorese verwendet. Zu diesem Zweck wurden 1 %ige Agarosegele hergestellt, die zur Sichtbarmachung der DNA 0,00001 % Ethidiumbromid enthielten. Als DNA-Größenstandard wurde der λ-PstI-Marker (Eigenproduktion der Arbeitsgruppe) verwendet.

## 3.1.5 Reinigung von PCR-Produkten und Extraktion aus dem Agarosegel

Zur Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen wurde das GeneJET Extraction and DNA Clean up Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Extraktion aus dem Agarosegel wurden, anstelle der sonst verwendeten 1 %igen Gele, 0,6 %ige Agarosegele hergestellt.

## 3.1.6 Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von isolierter Plasmid-DNA wurde die Absorption der DNA bei 260 nm photometrisch gemessen (WPA Biowave II Spectrophotometer; Biochrom Ltd.).

## 3.1.7 Restriktion von DNA

Zur endonukleolytischen Restriktion von PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA wurden Enzyme und Puffer der Firma New England Biolabs (siehe Tabelle 3) nach Herstellerangaben verwendet. Die Dauer der Restriktionen variierte zwischen zwei und sechzehn Stunden. Zur Kontrolle der geschnittenen Fragmente wurden diese in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.1.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Verhinderung der Re-Ligation von Plasmid-DNA nach endonukleolytischer Restriktion wurde der geschnittene Vektor anschließend mit Hilfe der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) dephosphoryliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.1.9 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung zweier zuvor durch Restriktionsverdau geschnittener DNA-Fragmente wurde die T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Die Konzentrationsbestimmung der zu ligierenden DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese durch Vergleich der Bandenintensität. In den Ligationsansatz wurden dann Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 eingesetzt.

### 3.1.10 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

#### 3.1.10.1 *P. pastoris*

Zur Herstellung von kompetenten *P. pastoris* GS115- bzw. KM71-Zellen wurden diese auf YPG-Platten frisch ausgestrichen und 2 x 50 mL YPG-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Die Kulturen wurden bei 28 °C über Nacht im Schüttelinkubator angezogen und am nächsten Tag für 10 min bei 700 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 50 mL sterilem, eiskaltem Wasser gewaschen und einmal mit 25 mL sterilem, eiskaltem 1 M Sorbitol. Nach diesen Waschschrritten wurde das Pellet in 0,5 - 1 mL 1 M Sorbitol resuspendiert und über Elektroporation mit 5 - 10 µg des BglII bzw. SacI linearisierten, gereinigten Vektors transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 1 h bei 28 °C in 1 M Sorbitol inkubiert und anschließend auf Selektionsplatten ausplattiert.

Mit dem Vektor pPIC9 transformierte Zellen wurden auf MD-Platten (ohne Histidin) ausplattiert, Zellen mit dem Vektor pPICZαA auf YPD-Platten (mit 100 - 500 µg/mL Zeocin). Nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 28 °C gewachsene Transformanten wurden auf frische MD- bzw. YPD-Platten überführt. Die Integration des gewünschten Gens (STR bzw. TDC) ins *Pichia*-Genom wurde über Kolonie-PCR (AOX1-Primer und Gen-spezifische Primer) der gewachsenen Kolonien überprüft.

#### 3.1.10.2 *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und deren Transformation wurde das TransformAid™ Bacterial Transformation Kit von ThermoFisher nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Herstellung von Doppeltransformanten wurden bereits mit einem Plasmid transformierte Bakterienstämme nochmals mit Hilfe des TransformAid™ Bacterial Transformation Kit kompetent gemacht. Anschließend wurde das zweite Plasmid, welches eine andere Antibiotikaresistenz und einen kompatiblen Replikationsursprung enthielt, zusätzlich transformiert. Die Selektion auf Doppeltransformanten erfolgte durch Ausplattieren auf LB-Platten, die beide entsprechenden Antibiotika enthielten.

### 3.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Analyse der hergestellten Plasmidkonstrukte wurden deren Gensequenzen durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma StarSEQ® GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Alle Sequenzierungsansätze wurden nach deren Vorgaben zusammenpipettiert.

### 3.1.12 Mutagenesen

Zur Entfernung des vorzeitigen Stopp-Codons in der Gensequenz der TDC sowie zum Einfügen des N- und C-terminalen His-Tags bei der STR im Vektor pCDFDuet1 wurde das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit von New England BioLabs nach Herstellerangaben verwendet. Die für die Mutagenesen entworfenen Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

## 3.2 Proteinbiochemische Arbeiten und Analytik

### 3.2.1 Heterologe Expression in *P. pastoris*

Zur heterologen Expression in *P. pastoris* GS115 und KM71 wurde eine Kolonie über Nacht bei 28 °C in 50 - 500 mL YPG-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 2$  herangezogen und für 5 min bei 2100 rpm und 20 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zur Induktion der Proteinexpression in ½ Volumen YPM-Medium überführt und 4 - 7 Tage bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Alle 24 h wurde frisches Methanol (0,125 % - 2 %) supplementiert, um die Proteinexpression aufrecht zu erhalten. Der Erfolg der Expression wurde durch Analyse des Kulturüberstands und der Pellets über SDS-Page, Westernblot und/oder Enzymassays untersucht.

Zur Überprüfung der Expressionsbedingungen wurde zusätzlich der Kontrollstamm GS115/His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup> HSA untersucht, der das Gen für Humanes Serum Albumin (HSA) enthält und rekombinantes HSA (67 kDa) ins Medium abgibt.

#### 3.2.1.1 „Pilotexperiment“: Proteinanalyse des Mediums und der Pellets

Zur ersten Analyse der *P. pastoris* Kulturen auf die heterolog exprimierte Enzyme wurden 50 mL Kulturen angesetzt und wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt. Die Expression wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen aufrechterhalten. Alle 24 h wurden

2 mL Hefekultur entnommen um die optimale Dauer für die Proteinexpression zu ermitteln. Die genommenen Proben wurden zentrifugiert und die Überstände und Pellets bis zur Analyse über SDS-PAGE und anschließende Coomassie- und Silberfärbung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.2.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen der TDC und STR

Zur Erhöhung der Ausbeute an heterolog exprimiertem Protein wurden verschiedene Expressionsbedingungen untersucht. Hierzu wurde die Expressionstemperatur (23 °C - 28 °C), sowie die zur Induktion verwendete Menge an Methanol (0,125 % - 2 %) variiert. Die Analyse der Optimierungsversuche erfolgte über SDS-PAGE und anschließender Coomassie- und Silberfärbung bzw. Westernblot.

### 3.2.2 Heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)

Zur heterologen Expression der TDC, STR und SGD in *E. coli* BL21(DE3) wurde zuerst eine Bakterien-Vorkultur hergestellt. Es wurden 10 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer einzelnen Kolonie des *E. coli* Expressionsstammes, der das gewünschte Konstrukt enthielt angeimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Inkubationstemperatur variierte zwischen 20 °C und 37 °C. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur mit der Vorkultur inokuliert (1:100) und je nach Experiment unterschiedlich weiter behandelt. Der Erfolg der Expression und die Funktionalität des jeweiligen Enzyms wurden anschließend über SDS-PAGE bzw. *in vivo* Enzymassays nachgewiesen.

#### 3.2.2.1 „Pilotexperiment“: Gesamtproteinanalyse der TDC, STR und SGD

Zur Analyse des Gesamtproteins einer Expression auf das heterolog exprimierte Protein hin, wurde eine 25 mL Hauptkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde photometrisch verfolgt und die Induktion der Expression bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 mit IPTG vorgenommen. Die verwendete IPTG-Konzentration lag bei 0,1 mM. Nach der Induktion erfolgte die weitere Inkubation schüttelnd bei 37 °C. Um den Verlauf der Expression nachvollziehen zu können wurden in einem Zeitraum von sechs Stunden alle zwei Stunden Proben genommen (0 h, 2 h, 4 h, 6 h) und bei 4 °C für 1 min pelletiert. Die Pellets wurden bis zur Analyse über SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.2.2.2 Optimierung der Expressionsbedingungen der TDC und STR

Zur Erhöhung der Ausbeute an heterolog exprimiertem löslichem Protein wurde eine Optimierung der TDC- und STR-Expression vorgenommen, da diese hauptsächlich in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* produziert wurden. Durch die vorgenommenen Veränderungen sollte vor allem eine Verlangsamung der Expression erreicht werden, um eine größere Menge an korrekt gefaltetem Protein zu erhalten. Daher wurden zum

einen geringere IPTG-Konzentrationen, zum anderen niedrigere Expressionstemperaturen getestet.

#### **3.2.2.2.1 Optimierung der TDC-Expression**

Zur Optimierung der TDC-Expression wurde nach Induktion mit 0,2 mM IPTG zunächst der Einfluß von niedrigeren Temperaturen (22 °C und 7 °C) getestet. In weiteren Tests wurde zusätzlich die IPTG-Konzentration auf 0,01 mM reduziert. Der Erfolg der Optimierungsversuche wurde anschließend über Analyse des gereinigten Proteins (Nickelaffinitätsreinigung) über SDS-PAGE analysiert.

#### **3.2.2.2.2 Optimierung der STR-Expression**

Zur Optimierung der STR-Expression wurden aufgrund der vielen zu testenden Konstrukte anstelle der Nickelaffinitätsreinigung mit anschließender SDS-PAGE *in vivo* Enzymassays aller Konstrukte in *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Hierzu wurden Kulturen wie unter 3.2.2 beschrieben hergestellt und die zur Induktion der Expression verwendete IPTG-Konzentration (0,01 mM und 0,1 mM) sowie die Expressionstemperatur (20 °C, 28 °C und 37 °C) variiert. Die Enzymassays wurden anschließend über HPLC auf die Bildung von Strictosidin untersucht.

#### **3.2.2.3 Expression löslicher Proteine in *E. coli***

Zur Herstellung von löslichen Proteinen für die spätere Reinigung wurden, abhängig vom jeweiligen Enzym, Hauptkulturen von 100 - 1000 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Vorkultur inokuliert (1:100). Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 - 0,9 bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 0,01 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 20 h bei 20 °C. Anschließend wurden die Kulturen durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C pelletiert und das Zellpellet sofort weiter verarbeitet oder bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.2.3 Proteinextraktion**

#### **3.2.3.1 *P. pastoris***

Zur einfachen Extraktion der heterolog exprimierten TDC und STR aus *P. pastoris* wurden diese mit einer N-terminalen Signalsequenz ( $\alpha$ -Faktor Sekretionssignal von *S. cerevisiae*) zur Sekretion ins Kulturmedium versehen. Um die rekombinanten Proteine zu erhalten, wurde die Expressionskultur bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Kulturüberstand entweder direkt zur Proteinreinigung über Nickelaffinitätschromatographie verwendet oder zuvor durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert.

### 3.2.3.2 *E. coli*

Zur Extraktion löslicher Proteine aus *E. coli* wurden die aus den Expressionskulturen erhaltenen Bakterienpellets auf Eis aufgetaut (wenn bei -80 °C gelagert) oder direkt nach der Zentrifugation weiterverarbeitet. Die Pellets wurden abhängig von ihrer Masse (ca. 3 mL pro g Pellet) in 10 - 20 mL kaltem LEW-Puffer resuspendiert und Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/mL dazugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation unter Schütteln auf Eis, erfolgte eine Ultraschallbehandlung (2x 2 min 50 % Puls mit je 1 min Kühlung auf Eis). War die Lösung nach der Ultraschallbehandlung immer noch viskos, wurde zusätzlich für 15 min mit 5 µg/mL DNase schüttelnd auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysate bei 5000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur Proteinreinigung auf Eis gelagert.

### 3.2.4 Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung

Zur Konzentrierung der von *P. pastoris* ins Kulturmedium sekretierten rekombinanten Enzyme wurde eine Proteinfällung mit 60 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Dem Kulturmedium wurde hierzu unter Rühren schrittweise Ammoniumsulfat zugefügt, bis eine Konzentration von 60 % erreicht wurde. Die Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C und 5000 rpm für 20 min zentrifugiert und das Pellet mit den Proteinen in ca. 3 mL LEW-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand durch PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare) vom restlichen Ammoniumsulfat gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, es wurden 16 Fraktionen von 500 µL gesammelt und der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen über Bradford bestimmt.

### 3.2.5 Proteinreinigung

Zur späteren Reinigung der heterolog exprimierten Proteine wurden alle Vektorkonstrukte, mit Ausnahme von pCDFDuet1\_STR\_S-Tag, welches einen C-terminalen S-Tag besaß, mit einem N- und/oder C-terminalen 6x Histidin-Tag versehen.

#### 3.2.5.1 S-Tag Proteine

Zur Reinigung der STR mit S-Tag wurde S-Protein-Agarose von Novagen nach Herstellerangaben verwendet. Der lösliche Proteinextrakt wurde 30 min mit der S-Protein-Agarose bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrfach mit 1x Bind/Wash Buffer gewaschen. Die Elution erfolgte nach 10-minütiger Inkubation mit 2 - 3 mL 3 M Magnesiumchlorid in 1x Bind/Wash Buffer.

### 3.2.5.2 His-Tag Proteine

Zur Reinigung von His-Tag Proteinen wurden Nickelsäulen (Bio-Scale™ Mini Profinity IMAC Cartridges) der Firma BioRad verwendet, die über die Methode der Metallionen-affinitätschromatographie (IMAC) wirken. Diese Methode basiert auf der Interaktion des Histidin-Tags des rekombinanten Proteins mit an einer Trägermatrix immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Für die Reinigung von Proteinen zur späteren Charakterisierung wurden die Bio-Scale™ Mini Profinity IMAC Cartridges mit dem Äkta-Start System (GE Healthcare) verbunden und nach Herstellerangaben verwendet. Ein typisches Programm einer Nickelaffinitätsreinigung ist in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Programm einer Nickelaffinitätsreinigung mit dem Äkta-Start System.**

<b>Reinigungsschritt</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Puffer (pH 8)</b>
Spülen/Äquilibrieren	15	LEW-Puffer
Probenbeladung	10-25	Zellaufschluß in LEW
Waschen	10-15	LEW-Puffer
Eluieren	15	Elutionspuffer
Spülen/Äquilibrieren	15	LEW-Puffer

Die erhaltenen Proteinfractionen wurden auf Eis gehalten und ihre Konzentration und Reinheit bestimmt. Anschließend wurden die Proben entweder sofort für Enzymassays verwendet oder nach Zugabe von 20 - 50 % Glycerin bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.6 Proteingehaltsbestimmung

Zur Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen wurde der Bradford-Assay (Bradford, 1976) angewandt. Die Zusammensetzung des verwendeten Bradford-Reagenz kann Tabelle 7 entnommen werden. Alle Ansätze wurden im 1 mL Maßstab in Küvetten mit dem WPA Biowave II Spectrophotometer (Biochrom Ltd.) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand von BSA-Standardgeraden (0,01 - 0,25 mg) ermittelt.

### 3.2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der heterolog exprimierten Enzyme wurde die Methode der SDS-PAGE verwendet. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen sowie des Laufpuffers kann Tabelle 7 entnommen werden. Bei der Probenvorbereitung zur Analyse von Gesamtprotein wurden die Zellpellets von 0,5 - 2 mL Aliquots zunächst in 500 µL LEW-Puffer oder Wasser resuspendiert. 90 µL davon wurden anschließend mit 30 µL 4x Lämmli-Puffer (Tabelle 7) gemischt. Bei der Analyse von gereinigtem Protein wurden 90 µL Proteinlösung direkt mit 30 µL 4x Lämmli-Puffer gemischt. Die vorbereiteten Proben wurden für 5 min bei ca. 100 °C aufgekocht und anschließend 10 - 90 µL aufs Gel aufgetragen.

Als Größenstandards wurden die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, die Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder oder der Unstained Protein Molecular Weight Marker von ThermoFisher verwendet. Die Gele wurden bei 200 V und 60 mA für ca. 2 h laufen gelassen, bis die Ladepufferfront vollständig aus dem Gel hinausdiffundiert war. Die Sichtbarmachung der Proteine im SDS-Gel erfolgte anschließend über Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.

### **3.2.8 Färbung von SDS-Gelen**

#### **3.2.8.1 Coomassie Färbung**

Zur Analyse von SDS-Gelen auf das Vorhandensein und die Reinheit der exprimierten Proteine wurden diese 10 - 30 min schüttelnd mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 7) inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgossen und durch Coomassie-Entfärbelösung (Tabelle 7) ersetzt. Die Entfärbelösung wurde nach einigen Sekunden durch frische Lösung ersetzt und das Gel anschließend bis zur vollständigen Entfärbung, bis der Hintergrund klar war, schüttelnd inkubiert.

#### **3.2.8.2 Silberfärbung**

Zur Analyse von SDS-Gelen auf das Vorhandensein geringer Mengen an Protein wurde die Methode der Silberfärbung angewandt. Alle Inkubationen erfolgten unter Schütteln bei Raumtemperatur. Als erstes erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel durch eine 16- bis 20-stündige Inkubation in Lösung A. Anschließend wurde das Gel 2x 30 min in Lösung B und 1x 1 min in Lösung C inkubiert. Als nächstes wurde das Gel 3x 20 sek mit Wasser gewaschen und anschließend für 30 min mit Lösung D behandelt. Nach Entfernen von Lösung D wurde das Gel erneut 3x mit Wasser gewaschen bevor Lösung E zugegeben wurde. Sobald klare Banden zu erkennen waren wurde die Reaktion durch Zugabe von Lösung F beendet (20 min Inkubation). Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen kann Tabelle 7 entnommen werden.

### **3.2.9 Westernblot**

Zur Analyse der Hefeexpressionen wurde zusätzlich zur Methode der SDS-PAGE die Methode des Westernblots verwendet, um spezifisch die heterolog exprimierten Proteinen nachzuweisen. Hierzu wurden die Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran (Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore) geblottet und anschließend über das SuperSignal®West HisProbe™ Kit (Thermo Scientific) nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte hierbei über eine Meerrettichperoxidase (HSR) gekoppelte Probe, die mit dem His-Tag der rekombinanten Proteine interagiert und über Chemilumineszenz nachgewiesen werden kann (ChemiDoc XRS+; BioRad). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

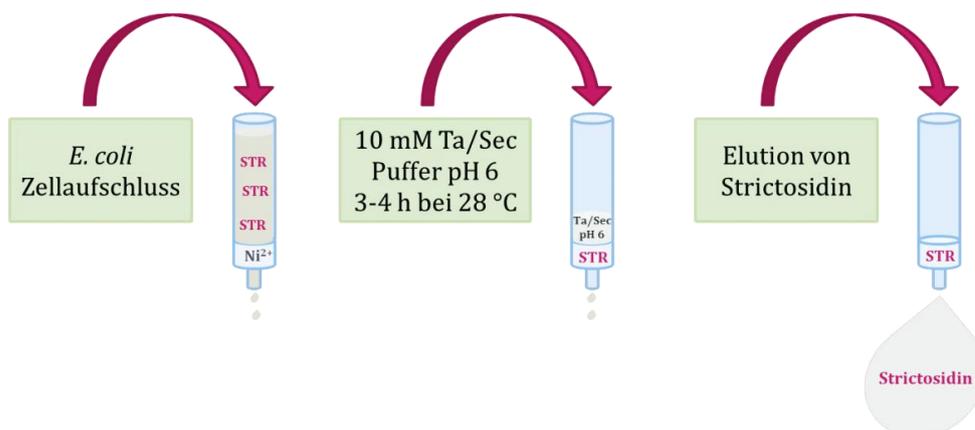
### 3.2.10 Untersuchung der pH-Stabilität von Strictosidin

Zur Untersuchung der pH-Stabilität von Strictosidin wurden pH-Werte von pH 3 bis pH 9 bzw. pH 12 getestet (Puffer siehe Tabelle 7). Die Tests wurden in 1 mL Ansätzen in Triplikaten durchgeführt, wobei Strictosidin jeweils einzeln zupipettiert wurde. Die Ansätze wurden für 20 h bei 28 °C inkubiert und anschließend über HPLC bzw. LC-MS analysiert.

### 3.2.11 Produktion von Strictosidin durch immobilisierte STR

Zur Herstellung von Strictosidin als Substrat für die SGD wurde eine modifizierte Form der Methode von Pfitzner und Zenk (1982) etabliert. Die zur Reinigung mit einem C- und einem N-terminalen His-Tag versehene STR (Konstrukt pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His) wurde hierbei an einer Nickelsäule (Protino® Ni-TED oder Ni-IDA 2000 Packed Columns, Macharey-Nagel) immobilisiert. Durch Zugabe der beiden Substrate konnte Strictosidin direkt an der Säule gebildet und anschließend ohne Verunreinigung mit Proteinen eluiert werden.

Expression und Zellaufschluss erfolgten bei dieser Methode wie unter 3.2.2.3 und 3.2.3.2 beschrieben. Der lösliche Zellaufschluss wurde über eine Nickelsäule gegeben und die Säule mit 10 - 15 mL LEW-Puffer (pH 8) gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die in 1 mL 0,1 M Natrium- oder Kaliumphosphat-puffer (pH 6) gelösten Substrate Tryptamin und Secologanin (je 10 mM) aufs Säulenbett gegeben und die Säule verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von etwa vier Stunden bei 28 °C wurde der Puffer mit 1 mL 0,1 M Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer von der Säule eluiert und die Bildung von Strictosidin über HPLC und LC-MS überprüft. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufs.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Strictosidin-Produktion durch immobilisierte STR.** Der *E. coli* Zellaufschluss wird auf die Nickelsäule gegeben und unspezifisch gebundenen Proteine durch Waschen mit LEW-Puffer (pH 8) entfernt. Anschließend werden die beiden in Puffer (pH 6) gelösten Substrate der STR (Tryptamin und Secologanin je 10 mM) auf die Säule gegeben. Nach 3-4 stündiger Inkubation bei 28 °C wird der Puffer wieder von der Säule eluiert und mittels LC-MS-Analyse auf die Bildung von Strictosidin hin untersucht.

### 3.2.12 Herstellung von Standardgeraden

Zur Quantifizierung der hergestellten enzymatischen Produkte der TDC (Tryptamin) und STR (Strictosidin) wurden Standardgeraden mittels HPLC erstellt.

#### 3.2.12.1 Tryptamin

Zur Quantifizierung von Tryptamin wurden Konzentrationen von 50 - 500  $\mu\text{M}$  (in  $\text{H}_2\text{O}$ ) vermessen und anschließend graphisch gegen die jeweils ermittelten Peak-Areas aufgetragen. Die hieraus bestimmte Geradengleichung wurde für die Berechnung der Konzentration des enzymatisch hergestellten Tryptamin verwendet.

#### 3.2.12.2 Strictosidin

Zur Quantifizierung von Strictosidin wurde, da sich der Standard nicht käuflich erwerben ließ, Strictosidin aus eigener enzymatischer Produktion (siehe 3.2.11) verwendet. Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Herstellung von Strictosidin-Standardgeraden angewendet.

Bei der ersten Methode wurde Strictosidin über einen Zeitraum von bis zu 7,5 h enzymatisch gebildet und stündlich Aliquots genommen. Anschließend wurde für jedes Aliquot über HPLC der Tryptaminverbrauch bestimmt und diese Konzentration der entsprechenden Strictosidin-Peak-Area zugeordnet. Eine Voraussetzung für diese Methode war, dass die Abnahme des Tryptamin ausschließlich durch die enzymatische Herstellung von Strictosidin erfolgte, ohne die Bildung von Neben- oder Abbauprodukten. Alle hierzu herangezogenen Enzymtests wurden mit am Tag des Enzymtests frisch gereinigter STR aus 400 mL Kulturen durchgeführt. Es wurde mit äquimolaren Verhältnissen von Tryptamin und Secolganin (200  $\mu\text{M}$ ) in LEW-Puffer (pH 6,5) gearbeitet und die Ansätze bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h - 7,5 h) wurden 500  $\mu\text{L}$  Proben (Doppelproben) genommen und die Reaktion mit 500  $\mu\text{L}$  MeOH gestoppt. Die Proben wurden anschließend über HPLC analysiert und die Strictosidinkonzentration anhand der Abnahme der Tryptaminkonzentration über die Peak-Areas bestimmt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Bei der zweiten Methode wurde die Standardgerade direkt aus enzymatisch produziertem Strictosidin (siehe 3.2.11) gebildet. Hierzu wurde das von der Nickelsäule eluierte Strictosidin zunächst gefriergetrocknet und anschließend gewogen. Da das Strictosidin in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer gelöst vorlag, wurden zur Bestimmung der Masse des Puffers zusätzlich zwei Kontrollansätze mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer ohne Strictosidin mitgeführt. Die ermittelte Masse der Kontrollansätze wurde anschließend von der Masse des Ansatzes mit Strictosidin subtrahiert. Bei der ermittelten Masse handelt es sich um Strictosidin bzw. Reste der beiden Substrate Tryptamin und Secologanin. Um die Masse an reinem Strictosidin bestimmen zu können wurde die noch im Ansatz enthaltene Tryptaminkonzentration über HPLC-Analyse bestimmt und die entsprechende Masse von der Gesamtmasse subtrahiert. Da Tryptamin und Secologanin in

äquimolaren Mengen in den Enzymassay eingesetzt wurden und durch die STR im Verhältnis 1:1 zu Strictosidin kondensiert werden, wurde angenommen, dass Secologanin in der gleichen Konzentration im Ansatz vorlag. Die für Secologanin ermittelte Masse wurde ebenfalls von der Gesamtmasse subtrahiert. Mit der so erhaltenen Masse von reinem Strictosidin wurde eine Standardgerade über HPLC hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  – 500  $\mu\text{M}$  Strictosidin verwendet.

### **3.2.13 Charakterisierung von Enzymen**

Zur Charakterisierung der Enzyme wurden diese löslich exprimiert, gereinigt und ihre Konzentration und Reinheit nach Bradford bzw. über SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurde ihre Aktivität bei unterschiedlichen Bedingungen (Kofaktorkonzentration, pH-Wert, Temperatur) analysiert und ihre kinetischen Parameter ( $K_m$ -Wert,  $V_{\text{max}}$ ) bestimmt.

#### **3.2.13.1 Bestimmung der optimalen Kofaktorkonzentration der TDC**

Zur Bestimmung der Kofaktorkonzentration, die zur höchsten TDC-Aktivität führt, wurden Enzymtests des gereinigten Proteins mit unterschiedlichen Konzentrationen seines Kofaktors Pyridoxal-5-phosphat durchgeführt. Es wurden 500  $\mu\text{L}$  Ansätze in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 angesetzt, die das Substrat Tryptophan in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  enthielten, sowie Pyridoxal-5-phosphatkonzentrationen von 0 mM- 1 mM. Die Ansätze wurden 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe der TDC gestartet. Nach weiteren 15 Minuten wurde der Enzymtest durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  Methanol gestoppt. Um sicherzugehen, dass es sich um eine rein enzymatische Umsetzung des Tryptophan zu Tryptamin handelt wurden zusätzlich Ansätze ohne Enzym durchgeführt. Alle Ansätze wurden in Doppelproben vorgenommen und für jede Pyridoxal-5-phosphatkonzentration wurde ein gemeinsamer Mastermix hergestellt.

Die Aktivität der TDC bei den unterschiedlichen Pyridoxalphosphatkonzentrationen wurde über den Nachweis ihres enzymatischen Produktes Tryptamin mittels HPLC bestimmt.

#### **3.2.13.2 Temperatur-Optima**

Zur Bestimmung der Temperatur-Optima der gereinigten TDC und STR wurden Enzymtests bei Temperaturen von 10 °C - 60 °C durchgeführt, bei der SGD von 10 °C - 80 °C. Alle Ansätze wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer durchgeführt und vor Zugabe des Enzyms 15 Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die genauen Reaktionsbedingungen für jedes Enzym können Tabelle 13 entnommen werden.

**Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Temperatur-Optima.** \* Die TDC benötigt für ihre optimale Funktion den Kofaktor Pyridoxal-5-phosphat.

Enzym	Ansatzvolumen (µl)	pH-Wert	Substrat (µM)	*Kofaktor (µM)	Inkubation (min)
TDC	500	7,5	100	100	10
STR	300	6	100	-	30
SGD	500	6	20	-	1

Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von Methanol (1:1) gestoppt und die Bildung der enzymatischen Produkte (TDC, STR) bzw. die Abnahme des Substrates (SGD) mittels HPLC überprüft. Die Proben der STR wurden vor der HPLC-Analyse zusätzlich mit 300 µL Wasser verdünnt. Alle Ansätze wurden in Dreifach- bzw. Doppelproben durchgeführt.

### 3.2.13.3 pH-Optima

Zur Bestimmung der pH-Optima der gereinigten Enzyme wurden Enzymtests in Puffern mit pH-Werten zwischen pH 3 und pH 10 durchgeführt. Die verwendeten Puffer können Tabelle 7 entnommen werden. Alle Ansätze wurden vor Zugabe des Enzyms 10 min bei 30 °C vorinkubiert. Die genauen Reaktionsbedingungen können Tabelle 14 entnommen werden.

**Tabelle 14: Reaktionsansätze für die Bestimmung der pH-Optima.** \* Die TDC benötigt für ihre optimale Funktion den Kofaktor Pyridoxal-5-phosphat.

Enzym	Ansatzvolumen (µl)	Substrat (µM)	*Kofaktor (µM)	Inkubation (min)
TDC	500	100	100	10
STR	300	100	-	15
SGD	500	20	-	1

Die enzymatischen Reaktionen wurden durch Zugabe von Methanol (1:1) gestoppt und die Bildung der enzymatischen Produkte (bei TDC, STR) bzw. die Abnahme des Substrates (bei der SGD) über HPLC analysiert. Die Proben der STR wurden vor der HPLC-Analyse zusätzlich mit 300 µL Wasser verdünnt. Alle Ansätze wurden in Dreifach- bzw. Doppelproben durchgeführt.

### 3.2.13.4 Bestimmung von $K_m$ und $V_{max}$

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten ( $K_m$ ) sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) der gereinigten Enzyme wurde zunächst eine Zeitabhängigkeitskurven mit variierenden Inkubationszeiten (0 min - 60 min) bei gleichbleibenden Substratkonzentrationen aufgenommen. Nach Auswertung dieser Kurven wurden für alle weiteren Tests zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte Inkubationszeiten verwendet, bei denen sich die Reaktion im linearen Bereich dieser Kurve befand.

#### 3.2.13.4.1 TDC (Ein-Substrat-Reaktion)

Zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes von Tryptophan, wurde die Methode von (Lineweaver und Burk, 1934) verwendet. Hierbei erfolgte die Auftragung der experimentell ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die eingesetzte Substratkonzentration ( $S$ ) in reziproker Form ( $1/v$  gegen  $1/(S)$ ). Aus der entstandenen Geraden konnte der reziproke, negative  $K_m$ -Wert ( $-1/K_m$ ) sowie der reziproke  $V_{max}$ -Wert ( $1/V_{max}$ ) direkt abgelesen werden (Schnittpunkt mit der X- bzw. der Y-Achse). Es wurden Tryptophan-Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$  getestet. Die Tests wurden fünf Mal durchgeführt, mit Enzym ( $0,01 \text{ mg}$  -  $0,015 \text{ mg}$  TDC) aus drei unterschiedlichen Expressionen.

#### 3.2.13.4.2 STR (Zwei-Substrat-Reaktion)

Zur Ermittlung der  $K_m$ -Werte für Tryptamin und Secologanin wurde die Methode von (Florini und Vestling, 1957) verwendet. Diese Methode wird eingesetzt, wenn eines der beiden Substrate (hier Secologanin) nicht in den für eine Substratsättigung benötigten hohen Konzentrationen eingesetzt werden kann. Bei dieser Methode wird ein Substrat ( $S_1$ = Tryptamin) konstant gehalten, während das andere Substrat ( $S_2$ = Secologanin) variiert wird.

Die Auftragung der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die eingesetzte Substratkonzentration von Secologanin erfolgte reziprok nach Lineweaver-Burk. Der hierbei ermittelte Y-Achsenabschnitt entspricht jedoch nicht  $1/V_{max}$ , sondern ist von der eingesetzten konstanten Substratkonzentration von Tryptamin abhängig (= relative maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{maxR}$ ). Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes mussten mehrere Messungen mit unterschiedlichen konstanten Konzentrationen von Tryptamin durchgeführt werden. Die hierbei ermittelten reziproken relativen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anschließend in Abhängigkeit von den zugehörigen reziproken Substrat-konzentrationen  $1/(\text{Tryptamin})$  aufgetragen. Aus der entstandenen Geraden konnte dann der reziproke  $K_m$ -Wert für das Substrat Tryptamin bestimmt werden (= Schnitt-punkt mit der X-Achse). Die Bestimmung des  $K_m$ - und  $V_{maxR}$ -Wertes von Secologanin erfolgte analog.

Es wurden Konzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$  Tryptamin und  $50 \mu\text{M}$  -  $3000 \mu\text{M}$  Secologanin eingesetzt. Die Tests wurden drei Mal durchgeführt, mit Enzym ( $0,1 \text{ mg}$  -  $0,13 \text{ mg}$  STR) aus drei unterschiedlichen Expressionen.

#### 3.2.13.4.3 SGD (Ein-Substrat-Reaktion)

Zur Bestimmung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes von Strictosidin wurden zunächst die Methoden nach (Michaelis und Menten, 1913) sowie von Lineweaver und Burk (1934) angewendet. Da die Auftragung nach Michaelis-Menten zu einer eher sigmoidalen Kurvenform führte, was häufig bei oligomeren Enzymen wie der SGD beobachtet werden kann, wurde zusätzlich die Methode nach (Hill, 1910) verwendet. Die Berechnung nach

Lineweaver-Burk erfolgte wie bereits für die TDC beschrieben über die Geradengleichung der reziproken Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration. Die Berechnung nach Michaelis-Menten und Hill erfolgte über die Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max} * (S)}{K_m + (S)} \quad \text{bzw.} \quad v = \frac{V_{\max} * (S)^h}{K_m^h + (S)^h}$$

Der Hill-Koeffizient (h) entspricht hierbei dem Ausmaß an Kooperativität. Ein Hill-Koeffizient > 1 spricht für positive Kooperativität, ein Koeffizient < 1 spricht für negative Kooperativität. Zur Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werts wurden Konzentrationen von 7  $\mu\text{M}$  - 1750  $\mu\text{M}$  Strictosidin getestet. Die Tests wurden vier Mal durchgeführt, mit Enzym (0,001 mg SGD) aus zwei unterschiedlichen Expressionen.

### 3.2.13.5 Auswirkung verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität

Zur weiteren Charakterisierung der Enzyme wurde der Einfluss einiger Substanzen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie hemmend bzw. fördernd auf die Enzymaktivität wirken können. Zu diesem Zweck wurden die Enzyme jeweils 15 min bei 30 °C mit verschiedenen Konzentrationen (0,03 mM; 0,3 mM; 3 mM) der entsprechenden Substanz inkubiert und die Reaktion dann erst durch Zugabe der jeweiligen Substrate (ggf. Kofaktor) gestartet. Nach weiterer 10-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol (1:1) gestoppt und über HPLC analysiert. Genaue Angaben für das jeweilige Enzym können Tabelle 15 entnommen werden.

**Tabelle 15: Reaktionsansätze zur Bestimmung der Auswirkung verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität.** \*Pyridoxal-5-phosphat; \*\* Die Substrate Tryptamin und Secologanin wurden im Verhältnis 1:2 eingesetzt.

Enzym	Ansatzvolumen ( $\mu\text{l}$ )	pH-Wert	Substrat ( $\mu\text{M}$ )	*Kofaktor ( $\mu\text{M}$ )	Inkubation (min)
TDC	500	7,5	200	100	15
STR	500	6,0	100 bzw. 200 **	-	60
SGD	500	6,0	10	-	1

Reaktionsansätze, bei denen die Enzyme mit Wasser anstelle der zu untersuchenden Substanzen vorinkubiert wurden, dienten als Referenzen. Die in diesen Ansätzen gemessenen Aktivitäten wurden als 100 % angesehen und die Hemmung der Enzymaktivität daran berechnet.

Um sicher zu stellen, dass die getesteten Substanzen keinen Einfluß (durch rein chemische Reaktionen) auf die jeweiligen Substrate haben, wurden zusätzlich Tests mit den höchsten verwendeten Konzentrationen (3 mM) ohne Enzym durchgeführt.

### 3.2.14 *In vivo* Enzymassays in *E. coli* BL21(DE3)

Zur Analyse der Expressionsoptimierung der STR und zum Aktivitätsvergleich der verschiedenen STR-Konstrukte sowie zur Analyse von Dreifachexpressionen wurden Enzymtests direkt in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die Kulturen (20 mL - 50 mL) zur *in vivo* Expression wurden wie unter 3.2.2 beschrieben zunächst mit einer Vorkultur inokuliert und anschließend bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,7 bei 37 °C inkubiert. Sowohl für die TDC (Park et al., 2011), als auch für die STR (Kutchan, 1989) wurde bereits gezeigt, dass ein *in vivo* Ansatz für Enzymassays in *E. coli* möglich ist. *E. coli* scheint dazu in der Lage zu sein, die zugefütterten Substrate in die Zelle aufzunehmen, wo sie von den heterolog exprimierten Enzymen umgewandelt werden können. Die in der Zelle angesammelten enzymatischen Produkte werden anschließend wieder ins Medium ausschleust, wo sie leicht detektiert werden können.

#### 3.2.14.1 Analyse der Expressionsoptimierung der STR und Vergleich der Aktivität verschiedener STR-Konstrukte

Zur Analyse der Expressionsoptimierung der STR und zur Ermittlung des STR-Konstrukts, das zur höchsten Ausbeute an Strictosidin führt, wurden die unter 3.2.2.2.2 beschriebenen Expressionskulturen über *in vivo* Enzymassays auf die Bildung von Strictosidin hin untersucht. Hierzu wurden pro Testansatz 2 mL Bakterienkultur bei 4 °C und 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und das Medium entfernt. Das Zellpellet wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) resuspendiert, der die beiden Substrate Tryptamin (100 µM) und Secologanin (200 µM) enthielt. Die Bakterien wurden dann für 3 h bei 37 °C inkubiert und der Überstand nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm für 5 min abgenommen. Der Überstand wurde für die HPLC bzw. LC-MS Analyse 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt und auf die enzymatischen Produkte hin untersucht.

#### 3.2.14.2 Dreifachexpressionen

Zur gemeinsamen funktionellen Expression aller drei Enzyme in einem *E. coli* wurde der Vektor pCDFDuet1\_SGD\_STR zusammen mit dem Vektor pET45b(+)\_TDC\_N-His in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 0,01 mM IPTG bei 20 °C für 20 h. Anschließend wurden pro Testansatz 2 mL Bakterienkultur bei 4 °C und 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und das Medium entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) resuspendiert. Als Substrate wurden Tryptophan und Secologanin in einer Konzentration von 100 µM - 500 µM eingesetzt. Die Bakterien wurden dann für 3 h bei 28 °C bzw. 37 °C inkubiert und der Überstand nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm für 5 min abgenommen. Der Überstand wurde für die HPLC bzw. LC-MS Analyse 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt und auf die enzymatischen Produkte hin untersucht.

### 3.2.14.2.1 *Symphoricarpos albus* Beeren als Secologanin Quelle

Als kostengünstigere Alternative für das käuflich erworbene Substrat Secologanin (Sigma-Aldrich) wurde ein Methanol-Extrakt aus den Beeren von *Symphoricarpos albus* hergestellt und in *in vivo* Assays eingesetzt. Die Herstellung des Extrakts wurde nach einer modifizierten Methode von Kim et al. durchgeführt (Kim et al., 2004). 10 g der gefrorenen Beeren wurden in 10 mL eiskaltem Methanol auf Eis gemörsert und anschließend 30 min mit Ultraschall behandelt. Der filtrierte Extrakt wurde bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert. Es wurden 100 µL des Extrakts in den Enzymtest (1 mL Ansatz) eingesetzt, sowie 500 µM Tryptophan. Der Enzymassay wurde einmal bei pH 6 durchgeführt und einmal bei pH 4 (Negativkontrolle).

### 3.2.15 Chromatographische und spektroskopische Methoden (HPLC/LC-MS)

Zur Analyse von Enzymtests auf die Bildung der enzymatischen Produkte wurden die Methoden der HPLC und LC-MS verwendet.

#### 3.2.15.1 HPLC-Analysen

Zur Detektion mittels HPLC wurde das YL9100 HPLC System (Vacuum Degasser, Quaternary Pump, PDA Detector von YL Instrument Co.) zusammen mit dem Marathon Autosampler (Spark Holland) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 200 µL. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine 5 µm LiChrospher®100 RP-18 Säule von Merck Millipore mit einer Länge von 25 cm und einem Durchmesser von 4 mm. Es wurde ein Gradient von 100 % HPLC-Wasser (mit 1 % Ameisensäure) zu 100 % Acetonitril (mit 1 % Ameisensäure) in 20 min durchgeführt, bei einer Flussrate von 1 mL/min. Zur Datenanalyse wurde die YL-Clarity Software verwendet.

#### 3.2.15.2 LC-MS-Analysen

Zur Detektion und Identifizierung mittels MS wurde das Finnigan LCQ-Duo Ion Trap Massenspektrometer mit APCI Quelle (Thermo Quest) verwendet. Für LC-MS Analysen wurde das Massenspektrometer an das Finnigan Surveyor HPLC System (MS Pumpe Plus, Autosampler und PDA-Detektor Plus) gekoppelt. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine EC150/3 NUCLEODUR 100-3 C18ec Säule (Marcherey-Nagel). Es wurde ein Gradient von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril (mit 1 % Ameisensäure) in 20 min bei 30 °C durchgeführt, mit einer Flußrate von 0,5 mL/min. Die MS-Analysen erfolgten im Positiv-Modus bei einer Kapillarspannung von 18 V, einer Kapillar-temperatur von 150 °C und einer Quellentemperatur von 450 °C. Stickstoff hoher Reinheit diente als Hüll- und Hilfsgas, die Flussrate betrug 80 bzw. 60 (Arbitrary Units). Ionen einer Massenspanne von 50 - 2000 m/z wurden detektiert. Für die MS/MS-Fragmentierung wurde eine Kollisionsenergie von 35 % verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit der Xcalibur™2.0.7 Software (Thermo Scientific).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gene und Vektorkonstrukte

In dieser Arbeit wurden sowohl Vektorkonstrukte für die Expression der TDC und STR in *Pichia pastoris*, als auch für die Expression der TDC, STR und SGD in *Escherichia coli* hergestellt. Die verwendeten Gene stammten zum einen aus Bachelorarbeiten (STR: Konstrukt pPIC9\_Cat1 aus Uebbing, 2009; TDC: Konstrukt pPIC9\_TDC aus Krüger, 2011) und enthielten die Originalcodonsätze aus *C. roseus*, zum anderen wurden Codon optimierte Gene der STR und SGD für die Expression in *E. coli* bei der Firma GenScript HK Limited in Auftrag gegeben. Alle Vektorkonstrukte wurden vor ihrer Verwendung durch DNA-Sequenzierung überprüft. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Vektorkonstrukte, sowie der darin enthaltenen Gene kann Tabelle 16 entnommen werden.

**Tabelle 16: Übersicht über die hergestellten Expressionskonstrukte.** \* Für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte Gene. Die chemische Synthese und Klonierung in den Expressionsvektor pCDFDuet1 wurde von der Firma GenScript HK Limited durchgeführt.

Konstrukt	Tag	Ori (Kopienzahl)	Gen
<i>P. pastoris</i>			
pPIC9_STR_C-His	C-terminaler His-Tag	Integration in <i>P. pastoris</i> Genom	STR ( <i>C. roseus</i> )
pPICZαA_TDC_C-His	C-terminaler His-Tag	Integration in <i>P. pastoris</i> Genom	TDC ( <i>C. roseus</i> )
pPICZαA_STR_C-His	C-terminaler His-Tag	Integration in <i>P. pastoris</i> Genom	STR ( <i>C. roseus</i> )
<i>E. coli</i>			
pET45b(+)_TDC_N-His	N-terminaler His-Tag	ColE1 (pBR322) (~40)	TDC ( <i>C. roseus</i> )
pET45b(+)_STR_N-His	N-terminaler His-Tag	ColE1 (pBR322) (~40)	STR ( <i>C. roseus</i> )
pET45b(+)_STR_opti	N- und C-terminaler His-Tag	ColE1 (pBR322) (~40)	*STR
pET32c(+)_STR_Trx	N- und C-terminaler His-Tag, Trx-Tag	ColE1 (pBR322) (~40)	*STR
pCDFDuet1_STR_S-tag	C-terminaler S-Tag	CloDF13 (CDF) (20-40)	*STR
pCDFDuet1_STR_C-His	C-terminaler His-Tag	CloDF13 (CDF) (20-40)	*STR
pCDFDuet1_STR_N-/C-His	N- und C-terminaler His-Tag	CloDF13 (CDF) (20-40)	*STR
pCDFDuet1_SGD_N-His	N-terminaler His-Tag	CloDF13 (CDF) (20-40)	*SGD

#### 4.1.1 Korrektur des TDC-Gens durch Oligonukleotid vermittelte Mutagenese

Da das TDC-Gen sowohl im *P. pastoris* Vektor pPICZ $\alpha$ A als auch im *E. coli* Vektor pET45b(+) eine Punktmutation (C  $\rightarrow$  T) an Position 433 aufwies (Abbildung 9), die zu einem frühzeitigen Stopp-Codon (TAG) führte, musste diese Mutation zunächst durch Oligonukleotid vermittelte Mutagenese entfernt werden.

TDC GenBank:M25151	1	atgggcagcattgattcaacaaatgtagccatgtccaattctccagttgg
pET45b(+)_TDC_STOPP	8	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	24	.....
TDC GenBank:M25151	51	agaatttaagccacttgaagctgaggaattccgaaaacaagcccatcgta
pET45b(+)_TDC_STOPP	58	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	74	.....
TDC GenBank:M25151	101	tggtagatttcatagccgattattacaaaaatgtggaaacatatccggtc
pET45b(+)_TDC_STOPP	108	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	124	.....
TDC GenBank:M25151	151	cttagcgaagtcgaacctggatactccgaaaacgtatccccgaaaccgc
pET45b(+)_TDC_STOPP	158	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	174	.....
TDC GenBank:M25151	201	tccttacctccccgaaccacttgacgacatcatgaaagatattcagaagg
pET45b(+)_TDC_STOPP	208	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	224	.....
TDC GenBank:M25151	251	atattatcccaggaatgacaaattggatgagccctaatttttatgcattt
pET45b(+)_TDC_STOPP	258	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	274	.....
TDC GenBank:M25151	301	tttcctgccactgtttagttcagctgccttttaggagaaatgttgtctac
pET45b(+)_TDC_STOPP	308	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	324	.....
TDC GenBank:M25151	351	tgccctaaattcagtaggctttacttgggtttcttcaccagccgccaccg
pET45b(+)_TDC_STOPP	358	.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	374	.....
TDC GenBank:M25151	401	aattagaaatgattggttatggattggttggtcagatc...
pET45b(+)_TDC_STOPP	408	.....t.....
pPICZ $\alpha$ A_TDC_STOPP	424	.....t.....

**Abbildung 9: Vergleich eines Sequenzausschnitts der klonierten TDC-Gene mit Basenaustausch mit der Datenbanksequenz (Gen Bank: M25151).** Die Position der Punktmutation ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das durch die Mutation entstandene Stopp-Codon ist grau unterlegt.

Es wurde ein Mutagenese-Primer entworfen, der an Position 433 anstelle der Mutation (T) die richtige Base (C) enthält. Über das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs) wurde mithilfe dieses TDC\_Mutageneseprimers und eines gewöhnlichen TDC\_Fw-Primers das gesamte Plasmid pET45b(+)\_TDC\_N-His amplifiziert. Die PCR-Amplifikate wurden anschließend nach Kit-Herstellerangaben weiter bearbeitet um die linearen Vektoren zu zirkularisieren und das in die PCR eingesetzte Template zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* (NEB 5-alpha Competent Cells) transformiert und auf Selektionsplatten (LB-Amp) ausplattiert.

Einige der gewachsenen Transformanten wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und der Erfolg der Mutagenese durch erneute Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungs-ergebnisse zeigten, dass das frühzeitige Stopp-Codon erfolgreich entfernt werden konnte (siehe Anhang).

Das korrigierte Konstrukt pET45b(+)\_TDC\_N-His diente anschließend als Template für die erneute Klonierung der TDC in den Hefe-Vektor pPICZ $\alpha$ A.

## 4.2 *Pichia pastoris* als Wirtssystem

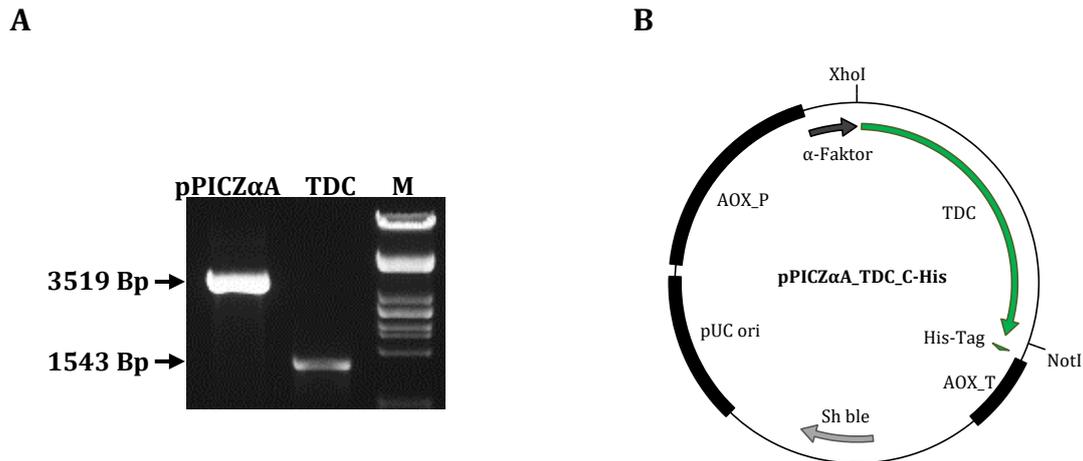
Zur Expression der *Catharanthus*-Gene wurde mit *P. pastoris* zunächst ein eukaryotes Hefe-Wirtssystem verwendet, das dazu in der Lage ist, viele der in höherern Eukaryoten durchgeführten post-translationale Modifikationen vorzunehmen, wie z. B. korrekte Proteinfaltung, Glycosylierungen und Prozessierung von Signalsequenzen. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Regulierbarkeit der Expression über den mit Methanol induzierbaren AOX1-Promotor. Darüber hinaus ermöglicht *P. pastoris* das Ausschleusen heterolog exprimierter Proteine ins Kulturmedium. Da *P. pastoris* selbst kaum endogene Proteine ins Medium sekretiert, liegen die rekombinanten Proteine dort in relativ reiner Form vor, wodurch die spätere Proteinreinigung erleichtert wird.

### 4.2.1 Klonierungen in *P. pastoris* Expressionsvektoren

Für die Expression der TDC und STR in *P. pastoris* wurden die Vektoren pPIC9 und pPICZ $\alpha$ A verwendet, die den mit Methanol induzierbaren AOX1-Promotor enthalten und die Integration der enthaltenen Gene ins Hefegenom ermöglichen. Zur leichteren Isolation und Reinigung der rekombinanten Enzyme wurden diese mit einer N-terminalen Signalsequenzen ( $\alpha$ -Faktor Sekretionssignal von *S. cerevisiae*) zur Sekretion ins Kulturmedium und einem C-terminalen His-Tag versehen.

#### 4.2.1.1 Klonierung der TDC mit C-terminalem His-Tag in pPICZ $\alpha$ A

Zur Klonierung der TDC in den Vektor pPICZ $\alpha$ A wurde das Gen mit Primern, die die Sequenz der Restriktionsenzymstellen XhoI und NotI enthielten (Tabelle 4) über PCR amplifiziert. Als Template diente der Vektor pPIC9\_TDC (Krüger, 2011). Das Gen wurde anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pPICZ $\alpha$ A (Abbildung 10A) ligiert. Nach Transformation in chemisch kompetente *E. coli* wurden die auf Selektionsplatten (LB-Zeocin) gewachsenen Transformanten mittels Kolonie PCR mit Vektor spezifischen AOX1-Primern auf das Insert hin untersucht.



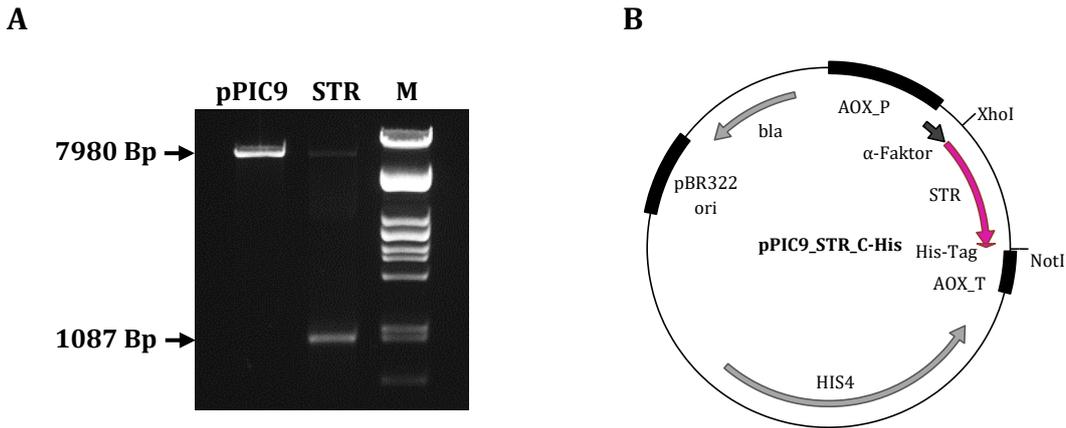
**Abbildung 10: Klonierung des Vektors pPICZαA\_TDC\_C-His.** A: Agarosegelelektrophorese des XhoI und NotI geschnittenen PCR-Amplifikats des TDC-Gens mit His-Tag und des geschnittenen Vektors pPICZαA. M=λ PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pPICZαA\_TDC\_C-His. AOX\_P=AOX1-Promotor, α-Faktor=α-Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae*, AOX\_T=AOX1-Terminator, Sh ble=Sh ble-Gen zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*, pUC ori=*E. coli* Replikationsursprung

Ausgewählte Klone, die das TDC-Gen im Vektor pPICZαA enthielten, wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und die Gensequenz durch Sequenzierung überprüft. Da alle untersuchten Klone eine Punktmutation an Position 433 des TDC-Gens aufwiesen, wurde die Klonierung nach erfolgter Oligonukleotid vermittelter Mutagenese mit pET45b(+)\_TDC\_N-His als Template wiederholt. Die Vektorkarte des fertigen Konstrukts ist in Abbildung 10B dargestellt.

Nach erneuter Sequenzüberprüfung wurde das Konstrukt für die effektive Transformation in *P. pastoris* KM71 mit dem Restriktionsenzym SacI linearisiert und anschließend der Erfolg der Restriktion durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Nach Aufreinigung des Restriktionsansatzes erfolgte die Transformation in frisch hergestellte elektrokompente *P. pastoris* Zellen, die dann auf YPD-Platten ausplattiert wurden. Gewachsene Transformanten wurden auf frische YPD-Platten überführt und die Integration des TDC-Gens über Kolonie PCR mit vektorspezifischen AOX1- und genspezifischen TDC-Primern überprüft. Klone, die bei beiden Primerpaaren Banden im Agarosegel zeigten, wurden für späteren Expressionsversuche herangezogen.

#### 4.2.1.2 Klonierung der STR mit C-terminalem His-Tag in pPIC9

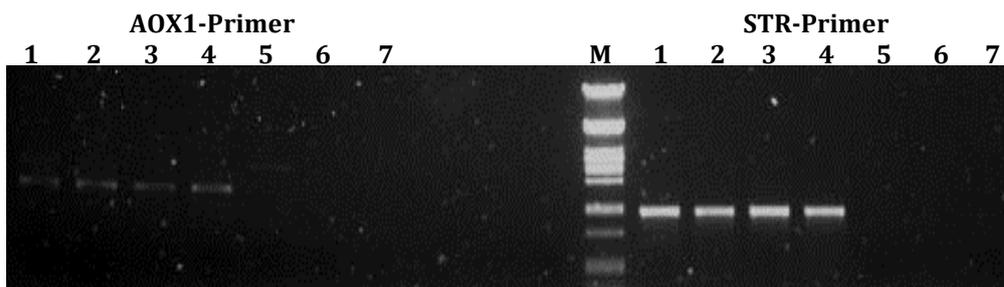
Da das STR-Gen aus der Bachelorarbeit von Uebbing (2009) ohne His-Tag im Vektor pPIC9 vorlag (pPIC9\_Cat1) und daher keine Reinigung des Proteins über Nickelaffinitätschromatografie möglich war, wurde das STR-Gen zur Expression in *P. pastoris* zusätzlich mit einem C-terminalem His-Tag in den Vektor pPIC9 kloniert. Hierzu wurde das Gen mit Primern, die die Sequenz der Restriktionsenzymchnittstellen XhoI und NotI sowie die Sequenz für einen C-terminalen His-Tag enthielten (Tabelle 4), mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen, Phosphatase behandelten Vektor über Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 11A).



**Abbildung 11: Klonierung des Vektors pPIC9\_STR\_C-His.** A: Agarosegelelektrophorese des XhoI und NotI geschnittenen PCR-Amplifikats des STR-Gens mit His-Tag und des geschnittenen Vektors pPIC9. M=λ PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pPIC9\_STR\_C-His. bla=Bla-Gen, vermittelt Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E. coli*, AOX\_P= AOX1-Promotor, α-Faktor= α-Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae*, AOX\_T=AOX1-Terminator, HIS4=Histidinoldehydrogenase-Gen zur Selektion in *P. pastoris*, pBR322=*E. coli* Replikationsursprung

Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α. Die auf Selektionsplatten (LB-Amp) gewachsenen Transformanten wurden über Kolonie PCR mit vektorspezifischen Primern (AOX1-Primer) auf das Insert hin untersucht. Ausgewählte Klone wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und die Gensequenz durch Sequenzierung überprüft. Klone, deren Sequenz mit der Datenbanksequenz der STR (Gen Bank: X53602) übereinstimmten, wurden für die Transformation in *P. pastoris* (GS115) herangezogen. Die Vektorkarte des fertigen Konstrukts kann Abbildung 11B entnommen werden.

Für eine effektive Transformation in *P. pastoris* wurde das Konstrukt mit dem Restriktionsenzym BglII linearisiert und das Ergebnis der Restriktion durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Nach Aufreinigung des Restriktionsansatzes erfolgte die Transformation in frisch hergestellte elektrokompente *P. pastoris* Zellen, die anschließend auf MD-Platten ausplattiert wurden. Auf MD-Platten gewachsene Transformanten wurden erneut auf MD-Platten überführt und die Integration des STR-Gens über Kolonie PCR mit vektorspezifischen AOX1- und genspezifischen STR-Primern überprüft (Abbildung 12).

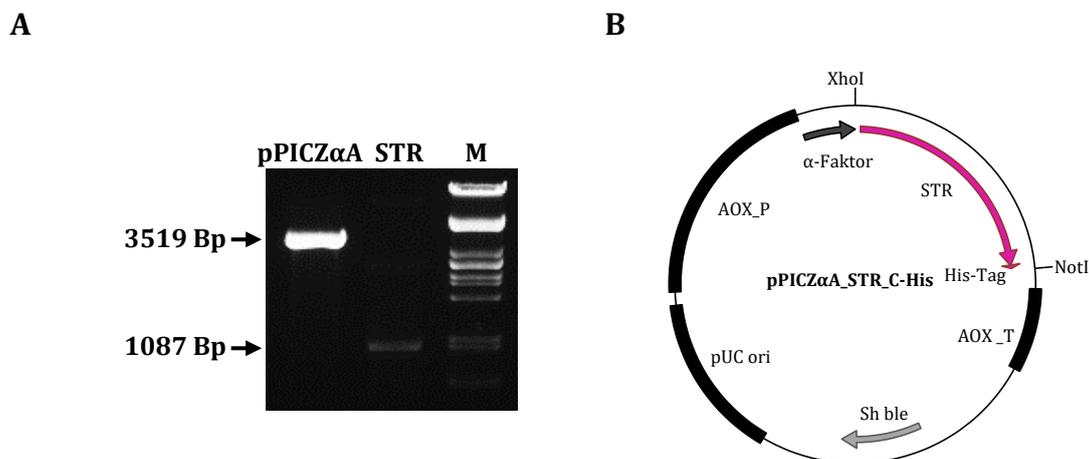


**Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese einer Kolonie PCR der mit dem Vektor pPIC9\_STR\_C-His transformierten *P. pastoris*-Klone.** 1-7=getestete *Pichia*-Klone, M=λ PstI Marker.

Die Klone 1 - 4, die sowohl mit den AOX1- als auch mit den genspezifischen Primern eine Bande im Agarosegel zeigten, wurden für Expressionsversuche herangezogen.

#### 4.2.1.3 Klonierung der STR mit C-terminalem His-Tag in pPICZ $\alpha$ A

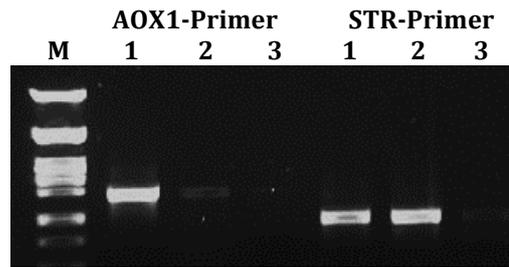
Zur Klonierung des STR-Gens in den Vektor pPICZ $\alpha$ A wurde das Gen mit den Schnittstellen XhoI und NotI über PCR amplifiziert und geschnitten. Als Template diente der Vektor pPIC9\_Cat1 (Uebbing, 2009). Anschließend wurde das geschnittene STR-Gen zusammen mit dem ebenfalls geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pPICZ $\alpha$ A über Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 13A), ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* transformiert. Die auf Selektionsplatten (LB-Zeocin) gewachsenen Transformanten wurden mittels Kolonie PCR mit Vektor spezifischen Primern (AOX1- Primer) auf das Insert hin untersucht.



**Abbildung 13: Klonierung des Vektors pPICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His.** A: Agarosegelelektrophorese des XhoI und NotI geschnittenen PCR-Amplifikats des STR-Gens mit His-Tag und des geschnittenen Vektors pPICZ $\alpha$ A. M= $\lambda$  PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pPICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His. AOX\_P= AOX1-Promotor,  $\alpha$ -Faktor=  $\alpha$ -Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae*, AOX\_T=AOX1-Terminator, Sh ble=Sh ble-Gen zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*, pUC ori=*E. coli* Replikationsursprung

Ausgewählte Transformanten wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und durch Sequenzierung überprüft. Klone, deren Sequenz mit der Datenbanksequenz (Gen Bank: X53602) überein stimmten, wurden für die folgenden Transformation in *P. pastoris* KM71 weiterverwendet. Die Vektorkarte des fertigen Konstrukts kann Abbildung 13B entnommen werden.

Für die Transformation in *P. pastoris* KM71 wurden die Konstrukte mit dem Restriktionsenzym SacI linearisiert und der Erfolg der Restriktion durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Nach Aufreinigung des Restriktionsansatzes erfolgte die Transformation in elektrokompente *P. pastoris* Zellen, die anschließend auf YPD-Platten ausplattiert wurden. Gewachsene Transformanten wurden auf frische YPD-Platten überführt und die Integration des STR-Gens über Kolonie PCR mit vektorspezifischen AOX1- und genspezifischen STR-Primern überprüft (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Agarosegelelektrophorese einer Kolonie PCR der mit dem Vektor pPICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His transformierten *P. pastoris*-Klone. 1-3=getestete *Pichia*-Klone, M= $\lambda$  PstI Marker

Klon 1, der sowohl mit den AOX1- als auch mit den genspezifischen Primern eine deutliche Bande im Agarosegel zeigte, wurde für die späteren Expressionsversuche herangezogen.

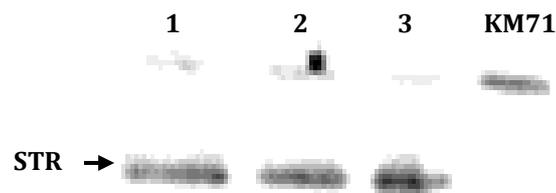
#### 4.2.2 Heterologe Expression in *P. pastoris*

Alle Hefe-Konstrukte wurden für die heterologe Expression in *P. pastoris* in den Expressionsstamm GS115 bzw. KM71 transformiert. Nach Überprüfung der Integration ins *Pichia*-Genom wurden Glycerolstocks hergestellt und zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

##### 4.2.2.1 „Pilotexperiment“

Die Expressionen der TDC und STR im Vektor pPIC9 sowie die der TDC im Vektor pPICZ $\alpha$ A zeigten nach Coomassie- und Silberfärbung weder im Kulturüberstand, noch im Pellet Banden der erwarteten Größen im SDS-Gel. Auch Veränderungen der Expressionsbedingungen (Erniedrigung der Expressionstemperatur, Variation der zur Induktion eingesetzten Methanolkonzentration und Variation der Inkubationsdauer) zeigten keinen Erfolg. Es konnten weder über Silberfärbung, noch über Westernblot Banden der rekombinanten Proteine detektiert werden. Der mitgeführte Kontrollstamm GS115/His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup>\_Albumin, der Albumin ins Medium sekretiert, zeigte hingegen in allen durchgeführten Expressionen die erwartete Bande bei etwa 67 kDa.

Die STR im Vektor pPICZ $\alpha$ A (pICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His) zeigte als einziges Hefekonstrukt nach 7-tägiger Inkubation bei 22 °C und täglicher Supplementation von 0,5 % Methanol schwache Banden im Westernblot (Abbildung 15). Der Nachweis der STR erfolgte hierbei über eine Meerrettichperoxidase (HSR) gekoppelte HisProbe (Thermo Scientific), die mit dem His-Tag der STR interagiert und über Chemilumineszenz nachgewiesen werden kann. Der Kulturüberstand von drei STR-Klonen (1 - 3) wurde getestet, als Negativkontrolle diente eine KM71-Kultur ohne STR.



**Abbildung 15: Westernblotanalyse des Kulturmediums einer *Pichia*-KM71 Expression mit dem Konstrukt pPICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His.1-3=getestete *Pichia*-Klone mit STR-Gen; KM71= *Pichia*-Stamm ohne STR-Gen. Der Nachweis der STR erfolgte über eine Meerrettichperoxidase (HSR) gekoppelte HisProbe (Thermo Scientific), die mit dem His-Tag der rekombinanten STR interagiert und über Chemilumineszenz nachgewiesen wurde.**

Der Westernblot zeigte, neben einer schwachen Bande, die auch in etwas stärkerer Form in der Kontrollkultur ohne STR vorkam, für alle drei Klone, die das STR-Gen enthielten, eine Bande bei den für die STR erwarteten 35 - 38 kDa. Diese Bande wurde in der Kontrollkultur nicht detektiert.

#### 4.2.3 Enzymassays der in *P. pastoris* exprimierten Proteine

Die Enzymaktivität der in *P. pastoris* exprimierten TDC und STR wurde durch den Nachweis des jeweiligen enzymatischen Produkts (Tryptamin bzw. Strictosidin) über HPLC überprüft.

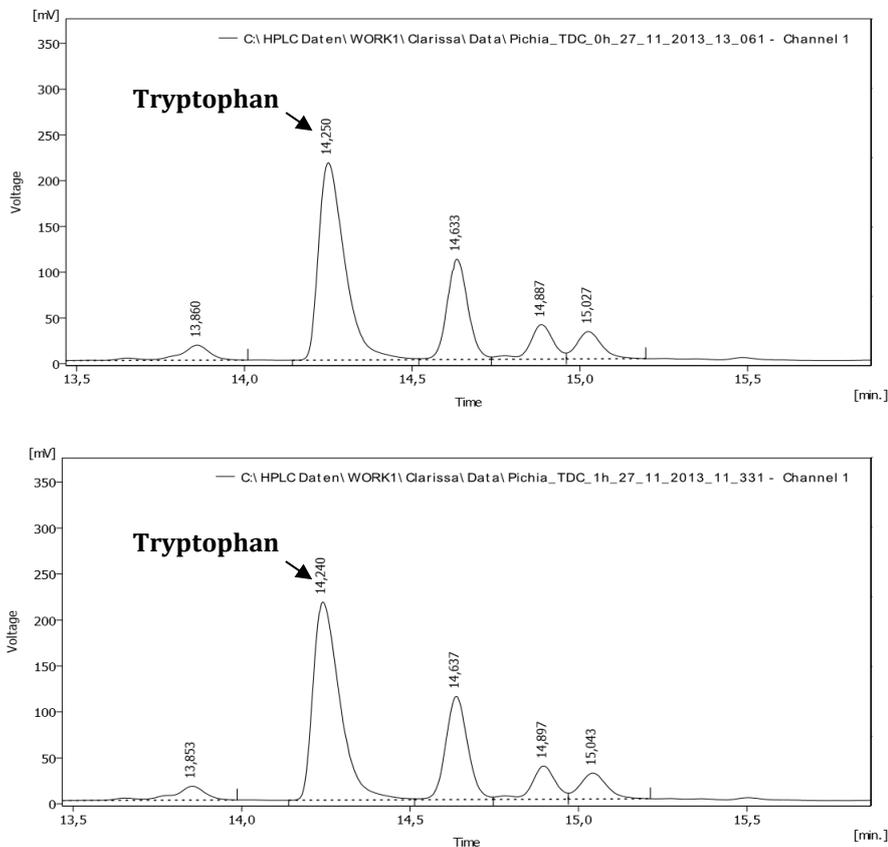
##### 4.2.3.1 Tryptophandecarboxylase (TDC)

Obwohl die TDC weder nach Silberfärbung im SDS-Gel, noch nach Westernblot-Analyse mittels SuperSignal<sup>®</sup>West HisProbe<sup>™</sup> Kit (Thermo Scientific) detektiert werden konnte, wurden Enzymassays mit *Pichia*-Kulturüberstand durchgeführt. Hierzu wurde die Expression der TDC (Konstrukt: pPICZ $\alpha$ A\_TDC\_C-His) in *P. pastoris* wie unter (3.2.1) beschrieben durchgeführt, jedoch wurde nach der anfänglichen Biomassenproduktion anstelle des Hefe-Vollmediums (YPM) ein auf pH 7,5 gepuffertes Minimalmedium mit Methanol verwendet.

Nach Zentrifugation der Kulturen wurden die erhaltenen Überstände direkt für die Enzymtests verwendet. Es wurden 100  $\mu$ M Tryptophan und 100  $\mu$ M Pyridoxalphosphat zu 100  $\mu$ L Kulturüberstand gegeben und bei 30 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Enzymtest direkt per HPLC analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Kulturüberstand der sofort nach Zugabe des Substrates Tryptophan durch Methanolzugabe gestoppt wurde. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen sind in Abbildung 16 dargestellt.

Die HPLC-Analysen der beiden Ansätze zeigen eine Abfolge nahezu identischer Peaks, von denen nur der Peak mit der Retentionszeit von 14,2 min eindeutig einer bekannten Substanz, dem Substrat Tryptophan, zugeordnet werden kann. Die Peak-Area dieses Substratpeaks zeigt keine Abnahme während der ein-stündigen Inkubationszeit und es

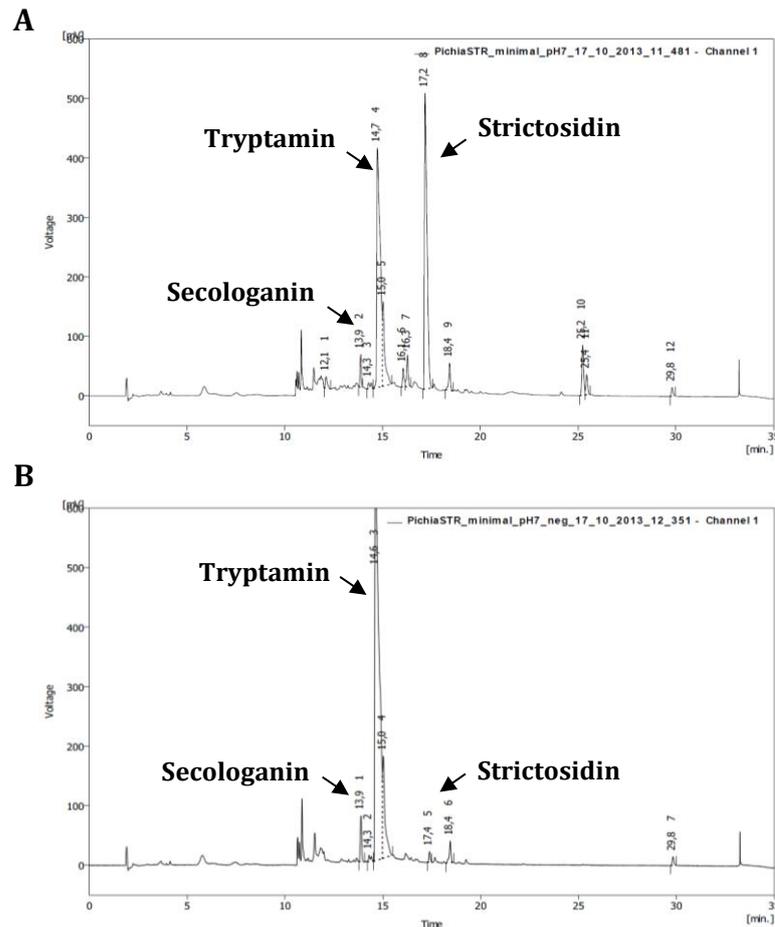
konnte auch kein Peak detektiert werden, der dem enzymatischen Produkt der TDC, dem Tryptamin entspricht. Diese Beobachtung konnte in weiteren Enzymassays mit der TDC aus *P. pastoris* bestätigt werden.



**Abbildung 16: HPLC-Analyse eines TDC-Enzymassays der Kulturüberstände einer *P. pastoris* Expressionskultur, die das Konstrukt pPICZ $\alpha$ A\_TDC\_C-His enthält. A:** Enzymtest des TDC-Kulturüberstandes zum Zeitpunkt 0 h, **B:** Der gleiche Enzymtest nach 1 h Inkubation bei 30 °C.

#### 4.2.3.2 Strictosidinsynthase

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität der STR (Konstrukt: pPICZ $\alpha$ A\_STR\_C-His) in *P. pastoris* wurde wie unter (3.2.1) für die Expression beschrieben verfahren, nur wurde nach der anfänglichen Biomasseproduktion anstelle des Hefe-Vollmediums (YPM) ein auf pH 7 gepuffertes Minimalmedium mit Methanol verwendet. Die nach Zentrifugation der Kulturen erhaltenen Überstände wurden direkt für die Enzymtests verwendet. Es wurden je 1 mM Secologanin und Tryptamin zu 100  $\mu$ L Kulturüberstand gegeben und bei 30 °C für 3 h inkubiert. Anschließend wurde der Enzymtest direkt per HPLC analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein Kulturüberstand verwendet, der 15 min bei 95 °C inkubiert wurde. Die HPLC-Analyse des Enzymtests zeigte einen prominenten Peak bei 17,2 min (Abbildung 17A). Dieser Peak ist bei der hitzeinaktivierten Probe um etwa einen Faktor 100 kleiner und gerade noch detektierbar (Abbildung 17B).



**Abbildung 17:** HPLC-Analyse eines STR-Enzymassays der Kulturüberstände einer *P. pastoris* Expressionskultur, die das Konstrukt pPICZαA\_STR\_C-His enthält. **A:** Enzymtest einer STR-Expressionskultur, **B:** Enzymtest der gleichen STR-Expressionskultur nach Hitzeinaktivierung.

#### 4.2.3.3 Ammoniumsulfatfällung und Proteinreinigung

Die Konzentrierung und Isolation der ins Kulturmedium sekretierten rekombinanten TDC und STR über Ammoniumsulfatfällung und die anschließende Reinigung über Nickelaffinitätschromatografie, sowie die direkte Reinigung aus dem Kulturmedium zeigten keinen Erfolg. Nach Silberfärbung bzw. Westernblot konnte keine Bande der TDC oder STR detektiert werden.

#### 4.3 *Escherichia coli* als Wirtssystem

Zusätzlich zum Hefe-System wurde mit *Escherichia coli* ein prokaryotes System zur Expression der drei *Catharanthus*-Gene untersucht. Im Gegensatz zum Hefe-System ist *E. coli* nicht dazu in der Lage post-translationale Modifikationen an den rekombinanten Proteinen durchzuführen, aber das *E. coli*-System ermöglicht, ebenso wie das *Pichia*-System, eine Regulation der heterologen Genexpression über einen induzierbaren Promotor (IPTG induzierbarer lacUV5-Promotor). Darüber hinaus, stehen eine Vielzahl an Vektoren mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen, Tags und Fusionsproteinen zur Auswahl um eine optimale Expression des gewünschten Proteins zu erreichen.

### 4.3.1 Klonierungen in *E. coli* Expressionsvektoren

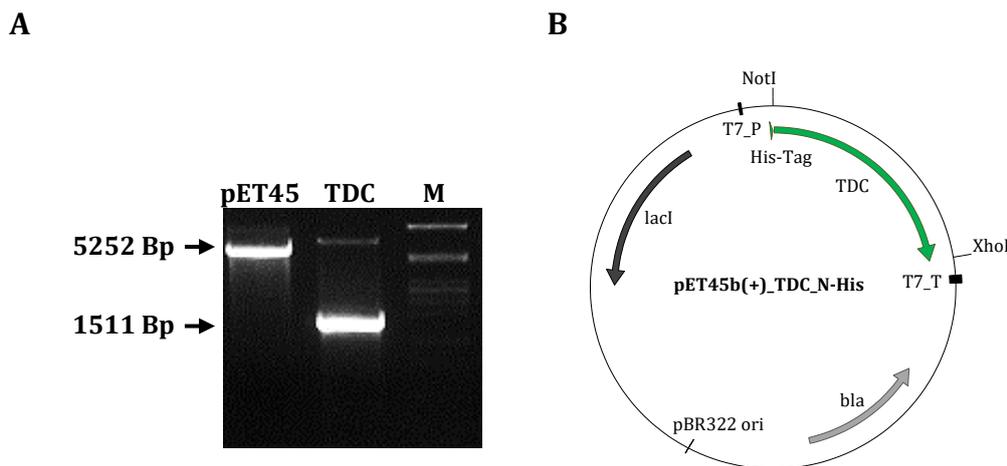
Für die Expression der TDC, STR und SGD in *E. coli* wurden IPTG induzierbare Vektoren des pET- und pCDF-Typs verwendet. Alle Gene wurden für eine spätere Reinigung der rekombinanten Proteine mit N- und/oder C-terminalen His-Tags kloniert.

#### 4.3.1.1 Klonierung der TDC mit N-terminalem His-Tag in pET45b(+)

Zur Expression der Tryptophandecarboxylase in *E. coli* wurde das TDC-Gen mit N-terminalem His-Tag in den Vektor pET45b(+) kloniert. Hierzu wurde das TDC-Gen mit Primern, die die Sequenz der Restriktionsenzymstrecke NotI bzw. XhoI enthielten, mittels PCR amplifiziert. Als Template diente der Vektor pPIC9\_TDC (Krüger, 2011). Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und zusammen mit dem ebenfalls geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pET45b(+) über Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 18A).

Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die auf Selektionsplatten (LB-Amp) gewachsenen Transformanten wurden über Kolonie PCR mit pET-Vektor spezifischen Primern (Tabelle 4) auf das Insert hin untersucht. Ausgewählte Klone, wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und die Gensequenz durch Sequenzierung überprüft.

Die Ergebnisse der Sequenzierung des TDC-Gens zeigten, wie schon beim *P. pastoris* Konstrukt pPICZ $\alpha$ \_TDC\_C-His, in allen Klonen eine Punktmutation (C  $\rightarrow$  T) an Position 433, die zu einem frühzeitigen Stopp-Codon (TAG) im TDC-Gen führte. Die Mutation wurde über Oligonukleotid vermittelte Mutagenese entfernt, die Vektorkarte des fertigen Konstrukts ist in Abbildung 18B dargestellt.



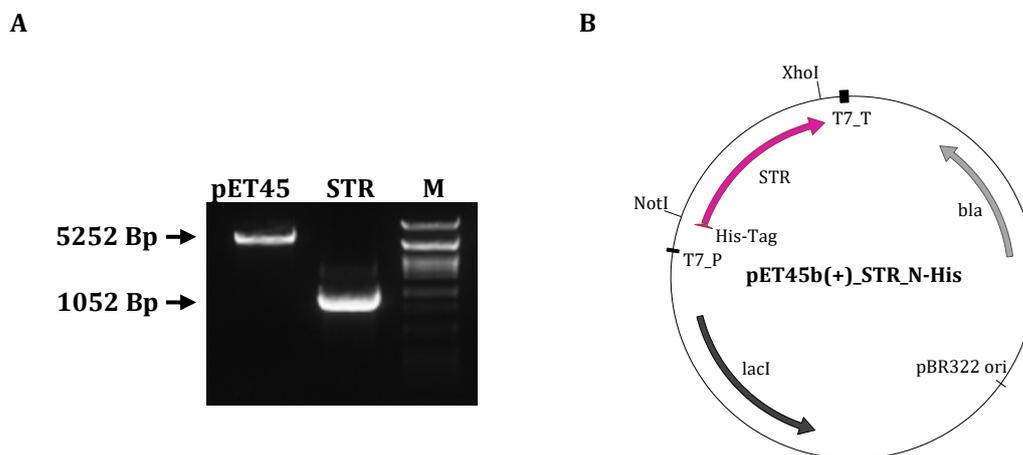
**Abbildung 18: Klonierung des Vektors pET45b(+)\_TDC\_N-His.** A: Agarosegelelektrophorese des NotI und XhoI geschnittenen Vektors pET45b(+) und des geschnittenen PCR-Amplifikats der TDC. M=  $\lambda$  PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pET45b(+)\_TDC\_N-His. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T= T7 Terminator, bla= bla Gen zur Selektion in *E. coli*, pBR322 ori=Replikationsursprung.

#### 4.3.1.2 Klonierung der STR mit N-terminalem His-Tag in pET45b(+)

Zur Expression der Strictosidinsynthase in *E. coli* wurde das STR-Gen mit N-terminalem His-Tag mit den Schnittstellen NotI und XhoI über PCR amplifiziert, geschnitten und in den geschnittenen, dephosphorylierten Vektoren pET45b(+) ligiert (Abbildung 19A).

Als Template diente der Vektor pPIC9\_Cat1 (Uebbing, 2009). Anschließend wurden, die Ligationsansätze in chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und die auf Selektionsplatten (LB-Amp) gewachsenen Transformanten mittels Kolonie-PCR (pET-Vektor spezifische Primer) auf das Insert hin untersucht.

Ausgewählte Transformanten wurden für eine Plasmidisolierung herangezogen und durch Sequenzierung überprüft. Klone, deren Sequenz mit der Datenbanksequenz überein stimmten, wurden für die folgenden Expressionsversuche weiterverwendet. Die Vektorkarte des fertigen Konstrukts kann Abbildung 19B entnommen werden.

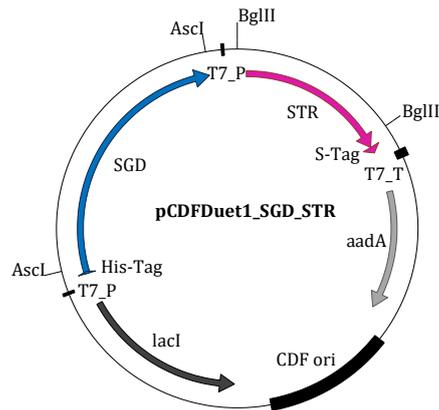


**Abbildung 19: Klonierung des Vektors pET45b(+)\_STR\_N-His.** A: Agarosegelelektrophorese des NotI und XhoI geschnittenen Vektors pET45b(+) und des geschnittenen PCR-Amplifikats der STR, M=  $\lambda$  PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pET45b(+)\_STR\_N-His. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T=T7 Terminator, bla= bla Gen zur Selektion in *E. coli*, pBR322 ori=Replikationsursprung

#### 4.3.1.3 Codon-Optimierung der Gensequenzen der STR und SGD für *E. coli*

Da die Expression der STR mit dem Originalcodonsatz aus *C. roseus* in *E. coli* zu einer sehr geringen Proteinausbeute führte, die im SDS-Gel nicht detektiert werden konnte, wurde zusätzlich die Synthese eines für die Expression in *E. coli* Codon-optimierten STR-Gens in Auftrag gegeben (GenScript HK Limited). Im Hinblick auf zukünftig geplante Arbeiten wurde ein Vektor konstruiert, der die gleichzeitige Expression des STR-Gens zusammen mit dem SGD-Gen ermöglicht.

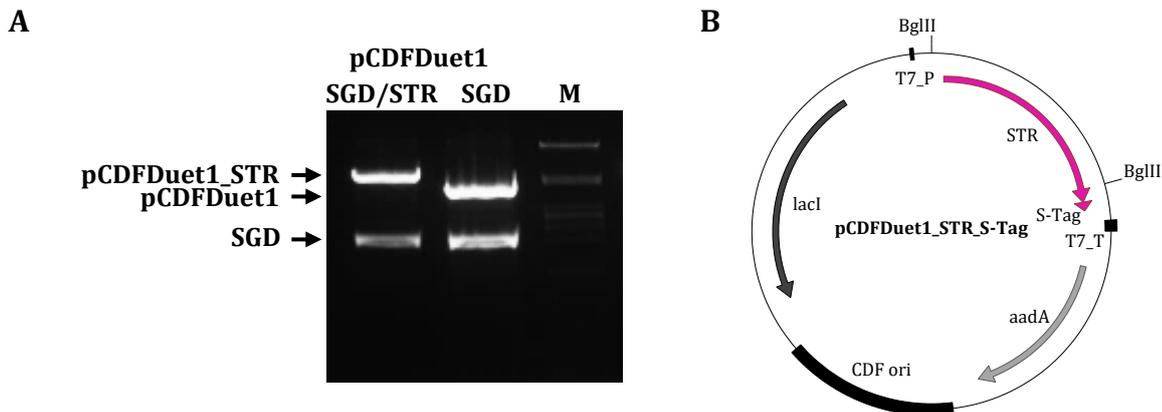
Die Vektorkarte dieses Konstrukts (pCDFDuet1\_SGD\_STR) ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Sequenzdaten sind im Anhang zu finden.



**Abbildung 20: Vektorkarte des Konstrukts pCDFDuet1\_SGD\_STR.** Beide Gene wurden so in den Vektor pCDFDuet1 eingebracht, dass man sie leicht über Restriktionsverdau mit nur einem Restriktionsenzym und anschließender Ligation wieder aus dem Vektor entfernen kann. Das STR-Gen wurde zu diesem Zweck mit flankierenden Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym BglII versehen und in die multiple Klonierungsstelle 2 (mit C-terminalem S-Tag) des Duet-Vektors kloniert. Das Gen für die SGD mit Erkennungsstellen für AscI wurde in die multiple Klonierungsstelle 1 (mit N-terminalem His-Tag) kloniert. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T=T7 Terminator, aadA=aadA-Gen zur Selektion in *E. coli*, CDF ori=Replikationsursprung

#### 4.3.1.3.1 Klonierung von pCDFDuet1\_STR\_S-Tag und pCDFDuet1

Um den Vektor pCDFDuet1 nur mit dem Codon-optimierten STR-Gen bzw. ohne Insert zu erhalten, wurde das Gen der SGD durch Restriktionsverdau mit AscI aus den Vektoren pCDFDuet1\_SGD\_STR und pCDFDuet1\_SGD entfernt (Abbildung 21A) und die aus dem Gel gereinigten Vektoren wieder ligiert. Die Vektorkarte des Konstrukts pCDFDuet1\_STR\_S-Tag ist in Abbildung 21B dargestellt.



**Abbildung 21: Klonierung des Vektors pCDFDuet1\_STR\_S-Tag.** A: Agarosegelelektrophorese der mit AscI geschnittenen Vektoren pCDFDuet1\_SGD\_STR und pCDFDuet1\_SGD. M= $\lambda$  PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pCDFDuet1\_STR\_S-Tag. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T=T7 Terminator, aadA=aadA-Gen zur Selektion in *E. coli*, CDF ori=Replikationsursprung

#### 4.3.1.3.2 Klonierung von pCDFDuet1\_STR\_C-His und pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His

Neben dem STR-Konstrukt mit C-terminalem S-tag wurden weitere Konstrukte der Codon-optimierten STR im Vektor pCDFDuet1 zur Expression in *E. coli* hergestellt. Zum

einen wurde der C-terminale S-Tag über Oligonukleotid vermittelte Mutagenese (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit) durch einen C-terminalen His-Tag ersetzt, zum anderen wurde dieser bereits mit einem C-terminalen His-tag versehenen STR durch eine weitere Oligonukleotid vermittelte Mutagenese (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit) ein zusätzlicher N-terminaler His-Tag angefügt. Die verwendeten Primer können Tabelle 4 entnommen werden.

Der Erfolg der Mutagenesen wurde über Sequenzierung des N- (pCDF\_Fw2) bzw. C-Terminus (pET\_Rev) überprüft. Die Sequenzanalysen der beiden Konstrukte zeigten, dass sowohl der C-terminale (pCDFDuet1\_STR\_C-His) als auch der N-terminale His-Tag (pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His) erfolgreich eingefügt wurden Abbildung 22.

**A**

```
STR_S-Tag      1 atg-----agcccgatcctgaagaaaatctttattgaa
STR_C-His      1 atg-----agcccgatcctgaagaaaatctttattgaa
STR_C-/N-His   1 atgcatcaccatcatcaccacagcccgatcctgaagaaaatctttattgaa
```

**B**

```

                                N-terminaler His-Tag
STR_S-Tag      958 gttagccagctgggtcattaatgcagatctcaattggatatcggccggc
STR_C-His      958 gttagccagctgggtcattaat-----
STR_C-/N-His   976 gttagccagctgggtcattaat-----

STR_S-Tag      1006 cacgcgatcgcctgacgtcgggtaccctcgagtctggtaaagaaaccgct
STR_C-His      1006 -----
STR_C-/N-His   1024 -----

STR_S-Tag      1054 gctgcgaaatttgaacgccagcacatggactcgtctactagcgcagct
STR_C-His      1054 -----
STR_C-/N-His   1072 -----

STR_S-Tag      1102 -----taa
STR_C-His      1102 catcaccatcatcaccactaa
STR_C-/N-His   1120 catcaccatcatcaccactaa
                                C-terminaler His-Tag

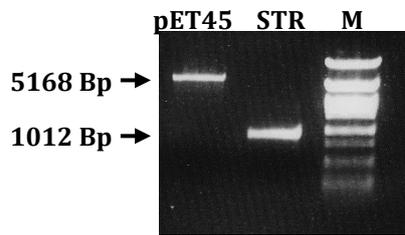
```

**Abbildung 22: Sequenzvergleich der N- und C-Termini der STR-Konstrukte in pCDFDuet1. A:** N-Terminus der Vektoren pCDFDuet1\_STR\_S-Tag, pCDFDuet1\_STR\_C-His, pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His. **B:** C-Terminus der Vektoren pCDFDuet1\_STR\_S-Tag, pCDFDuet1\_STR\_C-His, pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His.

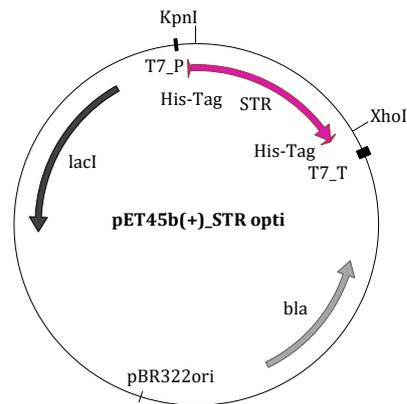
#### 4.3.1.3.3 Klonierung des Codon-optimierten STR-Gens in pET45b(+)

Um den Einfluss der Kopienzahl auf die Expression des STR-Gens zu untersuchen wurde die Codon-optimierte STR zusätzlich in den Vektor pET45b(+) kloniert, der eine etwas höhere Kopienzahl (~40), als der zuvor verwendete pCDFDuet1 (20 - 40) besitzt. Die Codon-optimierte STR mit N- und C-terminalen His-Tag wurde mit den Schnittstellen KpnI und XhoI vom Vektor pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His mittels PCR amplifiziert (Primer siehe Tabelle 4) und in den ebenfalls geschnittenen, gereinigten Vektor pET45b(+) kloniert (Abbildung 22A). Der Erfolg der Klonierung wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft. Die Vektorkarte ist in Abbildung 23B dargestellt.

A



B



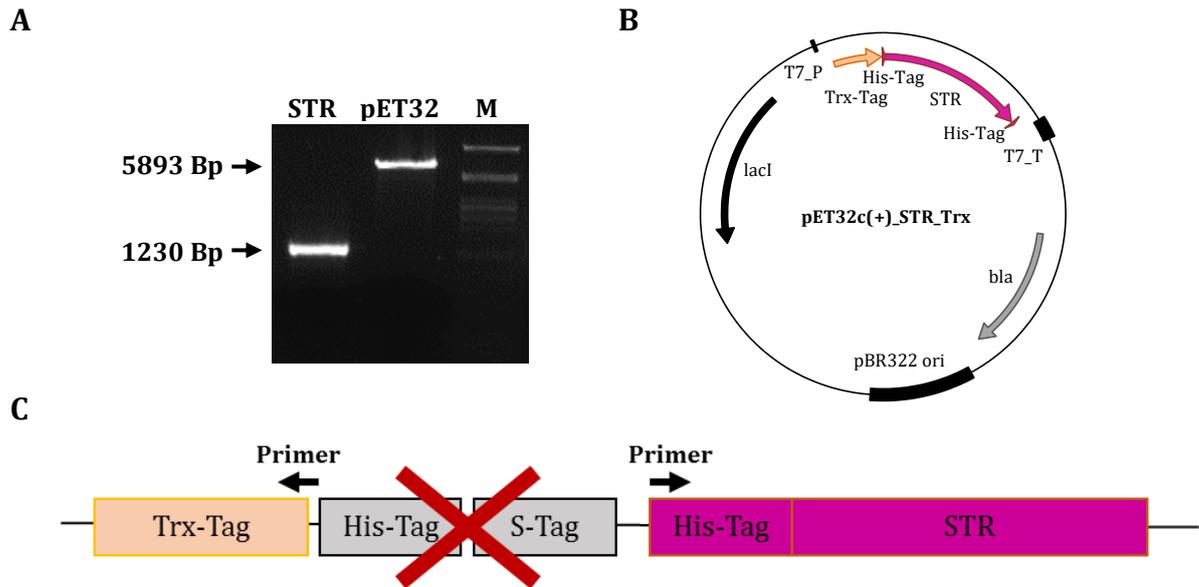
**Abbildung 23: Klonierung des Vektors pET45b(+)\_STR\_opti.** A: Agarosegelelektrophorese des KpnI und XhoI geschnittenen PCR-Amplifikats des Codon-optimierten STR-Gens und des Vektors pET45b(+). M=  $\lambda$  PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pET45b(+)\_STR\_opti. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T= T7 Terminator, bla= bla-Gen zur Selektion in *E. coli*, pBR322 ori=Replikationsursprung

#### 4.3.1.3.4 Klonierung des Codon-optimierten STR-Gens in pET32c(+)

Da viele Proteine in *E. coli* als unlösliche *Inclusion Bodies* produziert werden, wurde das STR-Gen zusätzlich in den Vektor pET32c(+) kloniert. Dieser Vektor enthält die Sequenz für einen N-terminalen Thioredoxin-Tag, der bei einigen Proteinen eine erhöhte Löslichkeit bewirkt. Das Codon-optimierte STR-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI aus dem Vektor pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His ausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt (Abbildung 24A).

Anschließend wurde es in den ebenfalls mit NotI und XhoI geschnittenen Vektor pET32c(+) ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* (NEB 5-alpha Competent Cells) transformiert. Auf Selektionsplatten (LB-Amp) gewachsene Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (pET-Vektor spezifische Primer) auf das Insert hin untersucht und ihre Sequenz analysiert.

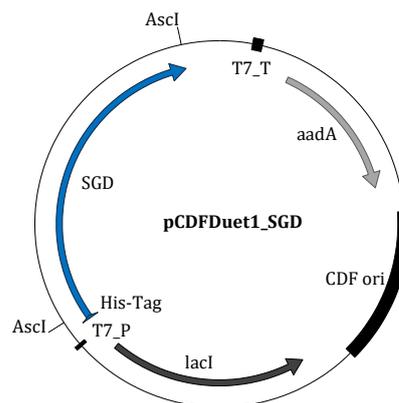
Da nach dieser ersten Klonierung noch die im Vektor enthaltenen Tag-Sequenzen (His- und S-Tag) zwischen dem Trx-Tag und dem STR-Gen vorlagen (Abbildung 24C), wurden diese anschließend über Oligonukleotid vermittelte Mutagenese (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit) entfernt. Die Sequenzen der verwendet Primer können Tabelle 4 entnommen werden, die Bindestellen sind in Abbildung 24C dargestellt. Der Erfolg der Mutagenese wurde anschließend über Sequenzierung überprüft. Die Vektorkarte des fertigen Konstrukts ist in Abbildung 24B dargestellt.



**Abbildung 24: Klonierung des Vektors pET32c(+)\_STR\_Trx.** A: Agarosegelelektrophorese des NotI und XhoI geschnittenen Codon-optimierten STR-Gens aus pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His und des Vektors pET32c(+). M= λ PstI Marker; B: Vektorkarte des Konstrukts pET32c(+)\_STR\_Trx nach Mutagenese. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, Trx-Tag= Thioredoxin-Tag, T7\_T= T7 Terminator, bla= bla Gen zur Selektion in *E. coli*, pBR322 ori=Replikationsursprung; C: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des durch Mutagenese veränderten Vektors pET32c(+)\_STR\_Trx.

#### 4.3.1.3.5 Klonierung des Vektors pCDFDuet1\_SGD

Zusätzlich zum Vektor pCDFDuet1\_SGD\_STR wurde, der Vektor pCDFDuet1\_SGD, bei der Firma GenScript HK Limited in Auftrag gegeben, der die alleinige Expression der SGD ermöglicht. Die Vektorkarte des Konstrukts ist in Abbildung 25 dargestellt, die Sequenzdaten sind im Anhang zu finden.



**Abbildung 25: Vektorkarte des Konstrukts pCDFDuet1\_SGD.** Das Gen der SGD wurde mit Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym AscI so in die multiple Klonierungsstelle 1 des Vektors pCDFDuet1 kloniert, das es bei der späteren Expression mit einem N-terminalen His-Tag versehen ist. lacI=lacI-Gen, T7\_P=T7 Promotor, T7\_T=T7 Terminator, aadA=aadA-Gen zur Selektion in *E. coli*, CDF ori= Replikationsursprung

### 4.3.2 Heterologe Expression in *E. coli*

Alle hergestellten Vektorkonstrukte für die heterologe Expression in *E. coli* (siehe Tabelle 16) wurden in den Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert und zur längerfristigen Aufbewahrung als Glycerolstocks bei -80 °C gelagert.

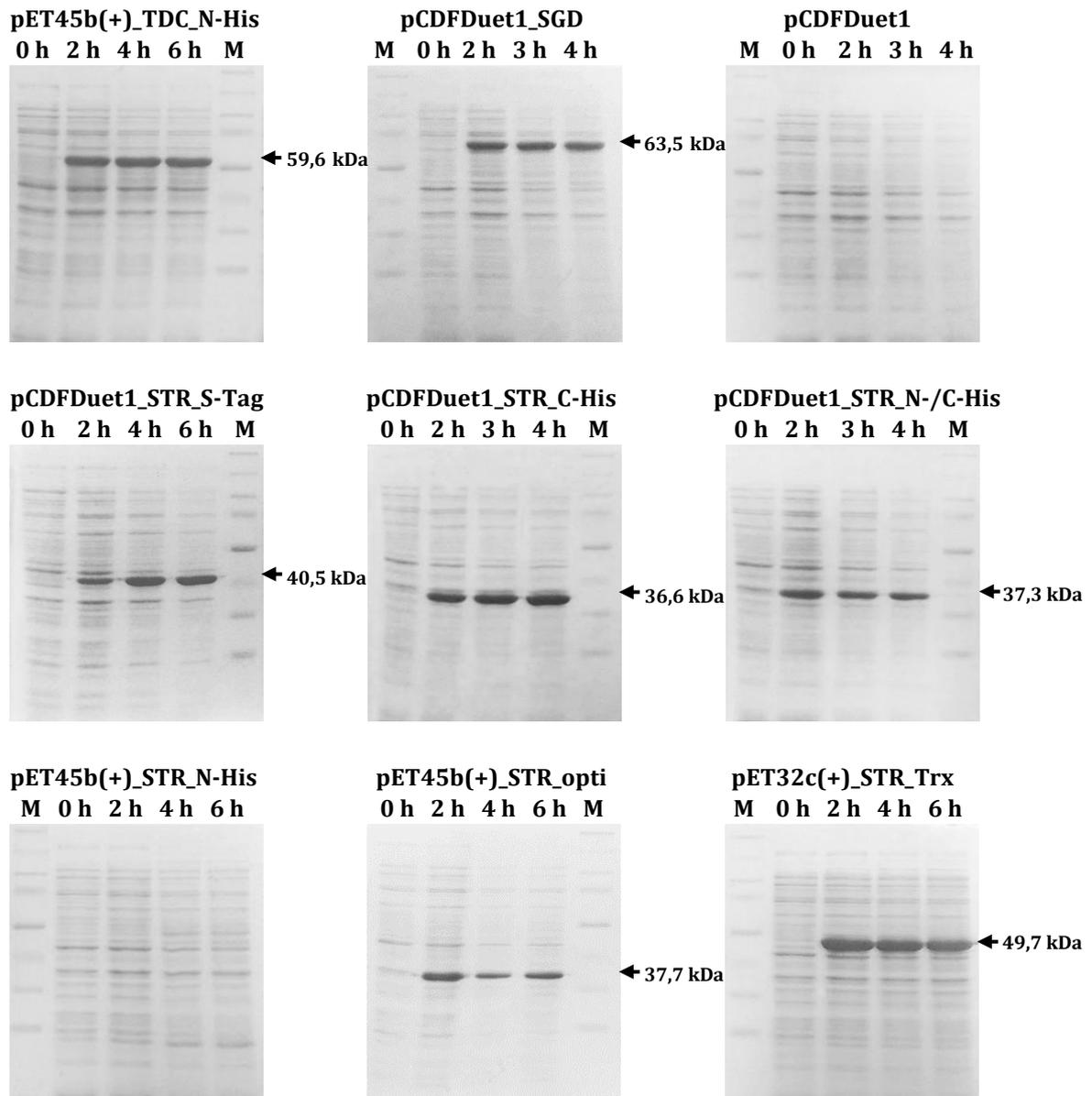
#### 4.3.2.1 „Pilotexperiment“: Gesamtproteinanalyse der TDC, STR und SGD

Um den Erfolg der heterologen Expression in *E. coli* zu überprüfen, wurden alle Vektorkonstrukte bei 37 °C auf die Produktion des jeweiligen rekombinanten Proteins hin untersucht. Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden nach IPTG-Zugabe. Um den Verlauf der Expression nachvollziehen zu können wurden innerhalb dieser Zeit alle zwei Stunden Proben der Bakterienkultur genommen und pelletiert. Nach erfolgtem Zellaufschluß wurde das Gesamtprotein über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 26).

Das Konstrukt pET45b(+)\_TDC\_N-His, das die TDC mit N-terminalem His-tag (59,6 kDa) enthält, zeigt schon nach zwei stündiger Expression eine deutliche Bande etwas oberhalb der 50 kDa Bande des Markers. Diese Bande ist auch in den Proben nach vier- und sechs-stündiger Expression zu erkennen, jedoch nicht in der Kontrollprobe vor Induktion (0 h).

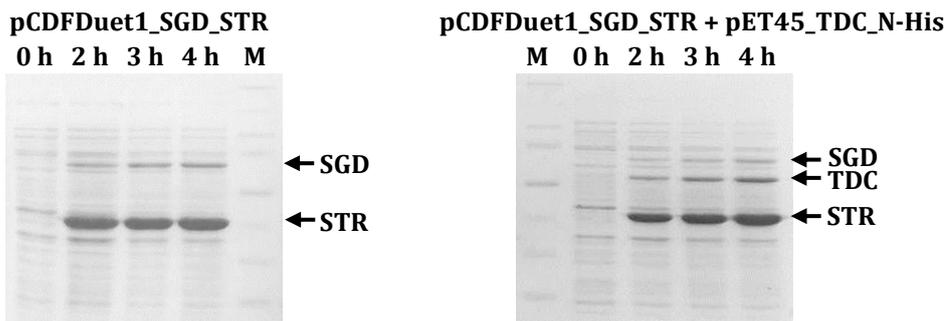
Das Konstrukt pET45b(+)\_STR\_N-His, welches die Originalcodons aus *C. roseus* enthält, zeigt in keiner der genommenen Proben eine Bande auf der für die STR mit His-Tag (42,8 kDa) erwarteten Höhe. Bei allen anderen Konstrukten der STR sind in Abbildung 26 deutliche Banden im Bereich der erwarteten Größen zu erkennen. pCDFDuet1\_STR\_S-tag zeigt eine Bande bei 41 kDa, pCDFDuet1\_STR\_C-His bei 36,6 kDa, pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His bei 37,3 kDa, pET32\_STR\_Trx bei 49,7 kDa und pET45\_STR\_opti bei 37,7 kDa. Keine derart prominenten Banden sind in den jeweiligen Proben vor Induktion (0 h) oder in der Kontrollexpression des leeren Vektors pCDFDuet1 zu erkennen.

Das Konstrukt pCDFDuet1\_SGD, das die SGD mit N-terminalem His-Tag enthält zeigte in allen Proben, außer der 0 h Probe, eine deutliche Bande auf der Höhe der erwarteten 63,5 kDa.



**Abbildung 26: Gesamtproteinanalyse der 37 °C Expressionen aller hergestellten Einzelkonstrukte über Coomassie gefärbte SDS-Gele.** 0 h=Vor Induktion genommene Proben, 2 h - 6 h= Zwei bis sechs Stunden nach Induktion genommene Proben, M= Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

Neben den Einzelexpressionen wurden auch erste Doppel- (pCDFDuet1\_SGD\_STR) und Dreifachexpressionen (pET45\_TDC\_N-His zusammen mit pCDFDuet1\_SGD\_STR) in einem *E. coli* durchgeführt. Diese zeigten nach Analyse des Gesamtproteins über SDS-PAGE in allen Proben, außer der 0 h Probe Banden auf den für die SGD und STR bzw. SGD, STR und TDC erwarteten Höhen (Abbildung 27).

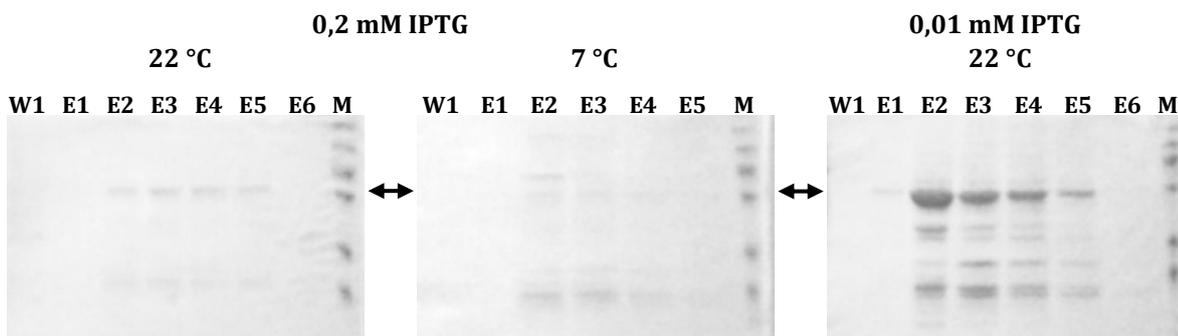


**Abbildung 27: Gesamtproteinanalyse einer Doppel- und einer Dreifachexpression bei 37 °C über Coomassie gefärbte SDS-Gele.** 0 h= Vor Induktion genommene Proben, 2 h - 6 h= Zwei bis sechs Stunden nach Induktion genommene Proben, M= Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder.

#### 4.3.2.2 Expressionsoptimierungen und Reinigung löslicher Proteine

Nachdem die Expressionen aller Enzyme in kleinem Maßstab bei 37 °C nachgewiesen werden konnte, wurden größere Kulturansätze zur Gewinnung der löslichen, gereinigten Enzyme verwendet. Es stellte sich heraus, dass besonders die Expression der TDC und STR bei 37 °C fast ausschließlich zur Herstellung der Enzyme in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* führte. Um dies zu vermeiden, wurden verschiedene Optimierungsversuche vorgenommen, die hauptsächlich dazu dienen sollten, die Expression zu verlangsamen. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Ausbeute an korrekt gefaltetem, löslichem Protein zunimmt. Zum einen wurde die zur Induktion der Expression verwendete IPTG-Konzentration variiert, zum anderen die Expressionstemperatur.

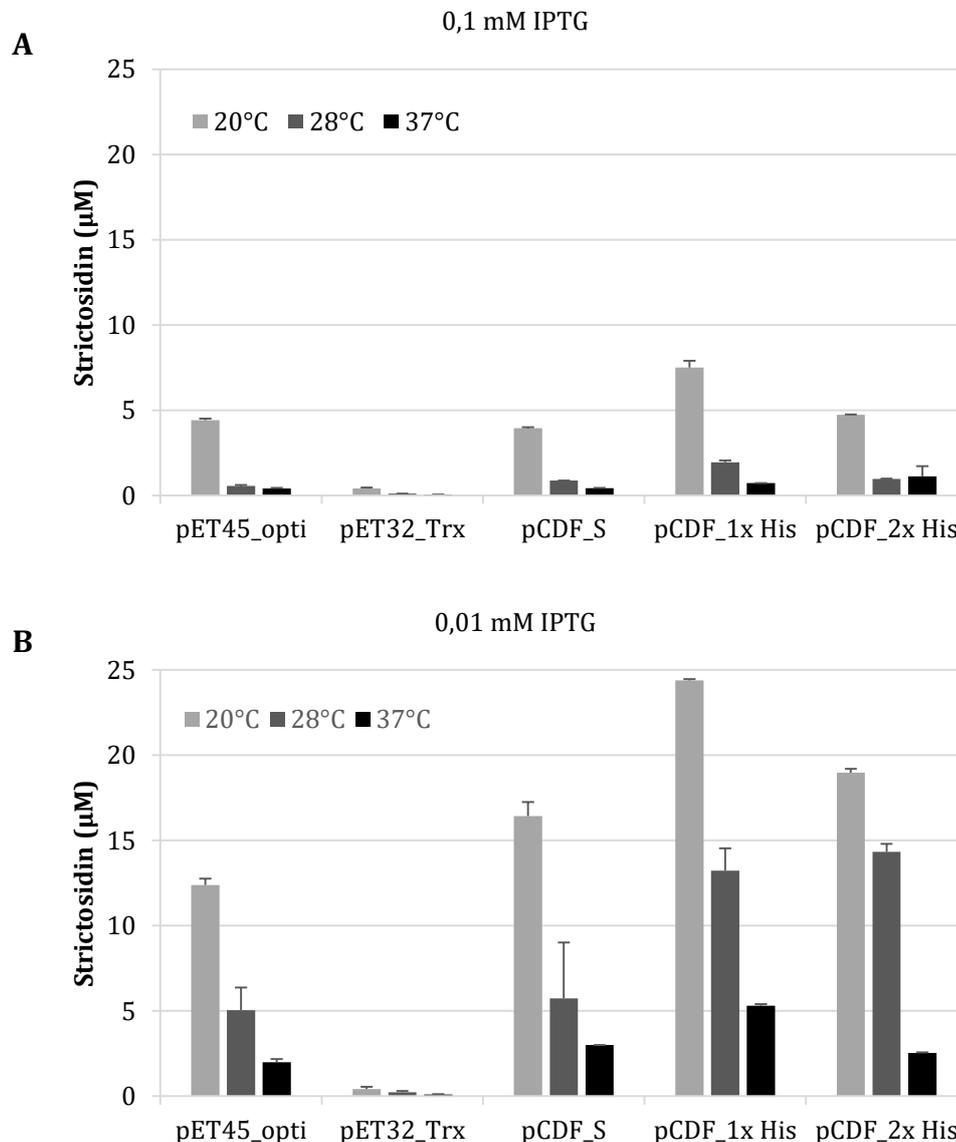
Zur Optimierung der TDC-Expression wurde diese nach Induktion mit 0,2 mM IPTG zunächst bei kälteren Temperaturen (22 °C und 7 °C) durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine geringere IPTG-Konzentration (0,01 mM) getestet. Anschließend wurde das Protein über eine Nickel-TED-Säule gereinigt und die Eluatfraktionen über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Coomassie gefärbte SDS-Gele verschiedener TDC-Expressionen nach Nickelaffinitätsreinigung.** Je 1 L Kultur wurde über Nickelaffinitätsäulen gereinigt und jeweils der erste Waschschritt (W1) und die Eluatfraktionen (E1 - E6) aufgetragen. Die Induktion erfolgte zum einen mit 0,2 mM IPTG, wobei eine Kultur bei 22 °C inkubiert wurde, eine andere bei 7 °C. Zum anderen wurde die Induktion mit 0,01 mM IPTG durchgeführt und die Kultur anschließend bei 22 °C inkubiert. M= PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Bei der STR wurden, aufgrund der vielen zu testenden Konstrukte, zur Analyse der Expressionsoptimierung anstelle der Nickelaffinitätsreinigung mit anschließender SDS-

PAGE zunächst *in vivo* Enzymassays aller Konstrukte durchgeführt. Es wurden IPTG-Konzentration von 0,1 und 0,01 mM untersucht und Expressionstemperaturen von 37 °C, 28 °C und 20 °C. Die Enzymassays wurden anschließend über HPLC auf die Bildung von Strictosidin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 zusammengefasst.

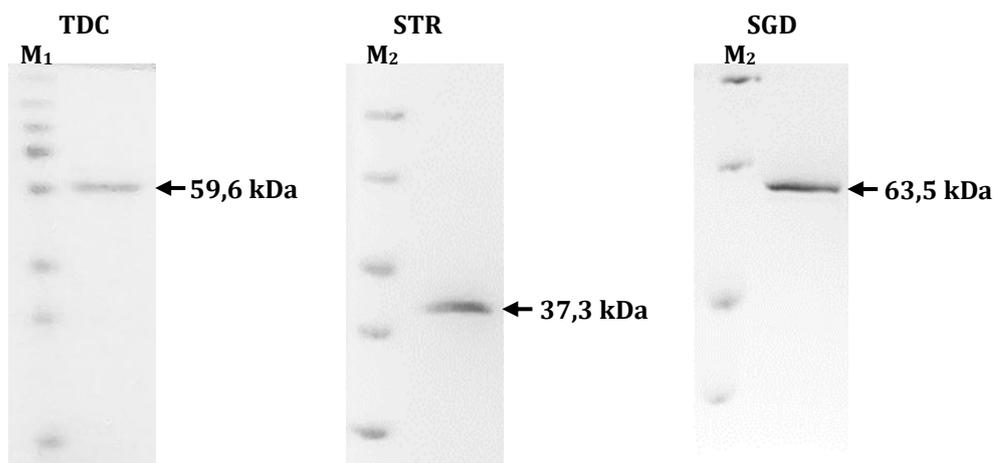


**Abbildung 29: *In vivo* Enzymassays verschiedener STR-Konstrukte bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen.** **A** 0,1 mM IPTG; **B** 0,01 mM IPTG. pET45\_opti=Codon-optimierte STR mit N- und C-terminalem His-Tag im Vektor pET45b(+), pET32\_Trx= Codon-optimierte STR mit N-terminalem Thio-redoxin-Tag und N- und C- terminalem His-Tag im Vektor pET32c(+), pCDF\_S= Codon-optimierte STR mit C-terminalem S-Tag im Vektor pCDFDuet1, pCDF\_1x His= Codon-optimierte STR mit C-terminalem His-Tag im Vektor pCDFDuet1, pCDF\_2xHis= Codon-optimierte STR mit C- und N-terminalem His-Tag.

Sowohl aus Abbildung 29A, als auch Abbildung 29B ist zu erkennen, dass die Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 20 °C bei allen untersuchten STR-Konstrukten zu einer Steigerung der Strictosidinkonzentration führte. Darüber hinaus führte die Erniedrigung der IPTG Konzentration von 0,1 auf 0,01 mM zu einer weiteren

Steigerung. Bei einzelner Betrachtung der verschiedenen STR-Konstrukte wird deutlich, dass die drei Konstrukte im Vektor pCDFDuet1 zu einer deutlich höheren Ausbeute an Strictosidin führen, als die beiden anderen Konstrukte. Das Konstrukt mit C-terminalem His-Tag zeigt eine etwa 20 % höhere Ausbeute als das Konstrukt mit C- und N-terminalem His-Tag, und eine etwa 30 % höhere Ausbeute als das Konstrukt mit C-terminalem S-Tag (Abbildung 29B).

Nach Auswertung der Enzymtests wurden die Expressionsbedingungen, die zur höchsten Ausbeute an aktiver STR führten, für alle folgenden Expressionen (auch für die Expression der TDC und SGD) zur Gewinnung löslicher Proteine verwendet: Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,01 mM IPTG und die Inkubation nach Induktion wurde bei 20 °C für 20 h durchgeführt. Die Reinigung der Proteine erfolgte anschließend über Nickel-IDA Säulen der Firma BioRad (Bio-Scale™ Mini Profinity IMAC Cartridges), die mit dem ÄKTA Start Chromatography System (GE Healthcare Life Sciences) verbunden wurden. Ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der gereinigten Proteine ist in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: Coomassie-gefärbte SDS-Gele der über Nickelaffinitätschromatografie gereinigten Enzyme.** TDC: Aus pET45b(+)\_TDC\_N-His, STR: Aus pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His, SGD: Aus pCDFDuet1\_SGD; M<sub>1</sub>= PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; M<sub>2</sub>= Unstained Protein Molecular Weight Marker

Obwohl das STR-Konstrukt mit nur einem C-terminalen His-Tag (pCDFDuet1\_STR\_C-His) bei den *in vivo* Tests zur höchsten Ausbeute an Strictosidin führte, wurden alle späteren Enzymassays mit gereinigter STR mit dem zweitbesten Konstrukt (pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His) durchgeführt, da sich dieses aufgrund des zweiten His-Tags besser reinigen ließ.

#### 4.3.3 Enzymassays der in *E. coli* exprimierten Proteine

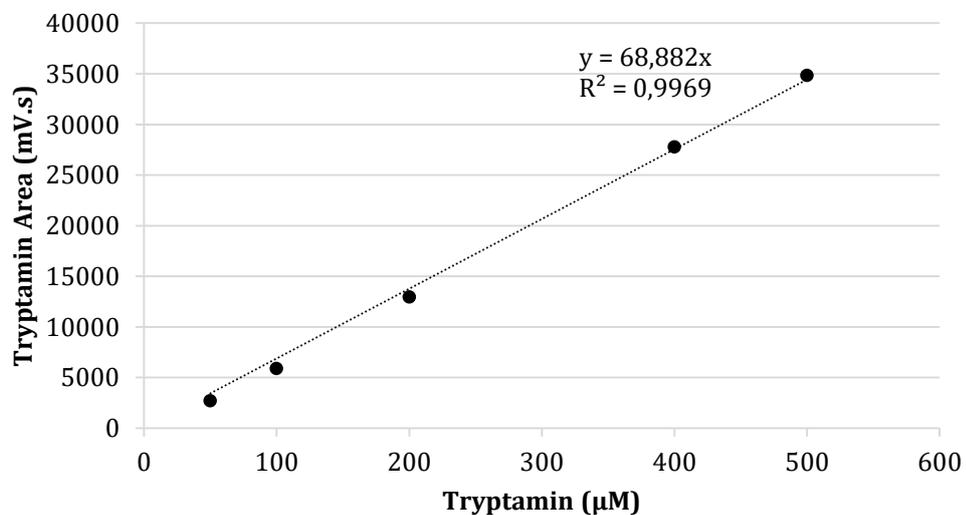
Die Enzymaktivität der TDC und STR wurde durch den Nachweis des jeweiligen enzymatischen Produkts (Tryptamin bzw. Strictosidin) über HPLC bestimmt. Aufgrund der Instabilität des enzymatischen Produkts der SGD (Strictosidin-Aglykon) wurde deren Aktivität anhand der Abnahme ihres Substrats (Strictosidin) ebenfalls über HPLC

analysiert. Zur Quantifizierung der gebildeten Tryptamin- bzw. Strictosidinkonzentrationen wurden Standardgeraden mittels HPLC erstellt und die gebildeten Mengen anhand der Geradengleichungen berechnet.

Da die Expression und Reinigung der *C. roseus* Proteine in *P. pastoris* deutlich geringeren Erfolg zeigte als im *E. coli*-System, wurde das *P. pastoris*-System verworfen und für alle folgenden Arbeiten das *E. coli*-System verwendet.

#### 4.3.3.1 Herstellung einer Tryptamin Standardgeraden

Zur Herstellung von Tryptamin Standardgeraden wurden Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  verwendet. Die ermittelte Gerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ist in Abbildung 31 dargestellt.



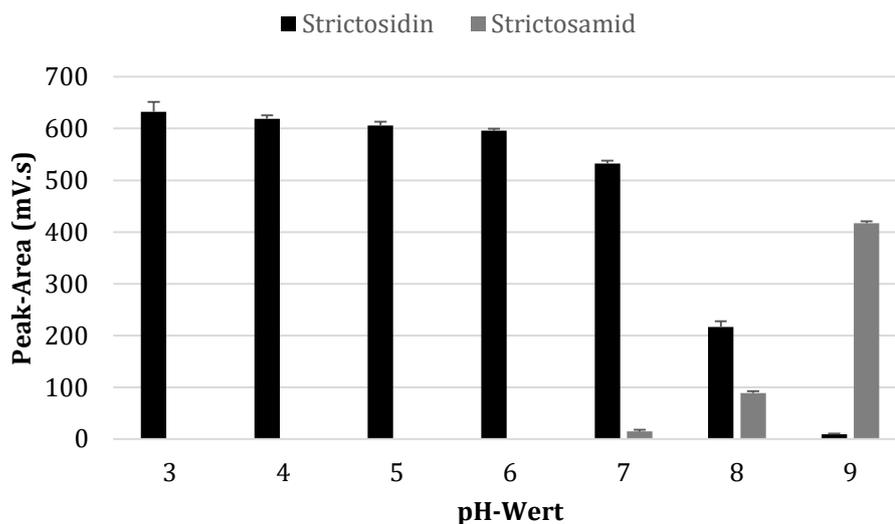
**Abbildung 31: Tryptamin Standardgerade.** Es wurden Tryptaminkonzentrationen zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  über HPLC analysiert und die jeweiligen Konzentrationen gegen die gemessenen Peak-Areas aufgetragen. Es ergab sich eine Geradengleichung  $y = 68,882x$  bei einem  $R^2$  von 0,9969.

#### 4.3.3.2 Strictosidin

Das Glycoalkaloid Strictosidin spielt in dieser Arbeit sowohl als enzymatisches Produkt der STR, als auch als Substrat der SGD eine wichtige Rolle. Da es nicht möglich war, einen geeigneten Strictosidin-Standard käuflich zu erwerben (das von Wuhan Chem-Faces Biochemical Co., Ltd erworbene Strictosidin zeigte ein untypisches Fragmentierungsmuster im MS und konnte nicht von der rekombinant hergestellten SGD deglycosyliert werden) wurden verschiedene Versuche zur Charakterisierung und Produktion dieses Moleküls durchgeführt.

#### 4.3.3.2.1 pH-Stabilität von Strictosidin

Als Vorversuch für die späteren Enzymkinetiken der STR und SGD sowie für die Produktion von Strictosidin durch immobilisierte STR wurde die Stabilität des enzymatisch produzierten Strictosidin bei unterschiedlichen pH-Bedingungen ermittelt. Hierzu wurde Strictosidin bei pH-Werten zwischen pH 3 und pH 9 für 20 h bei 28 °C inkubiert und anschließend die Strictosidinkonzentration über HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.



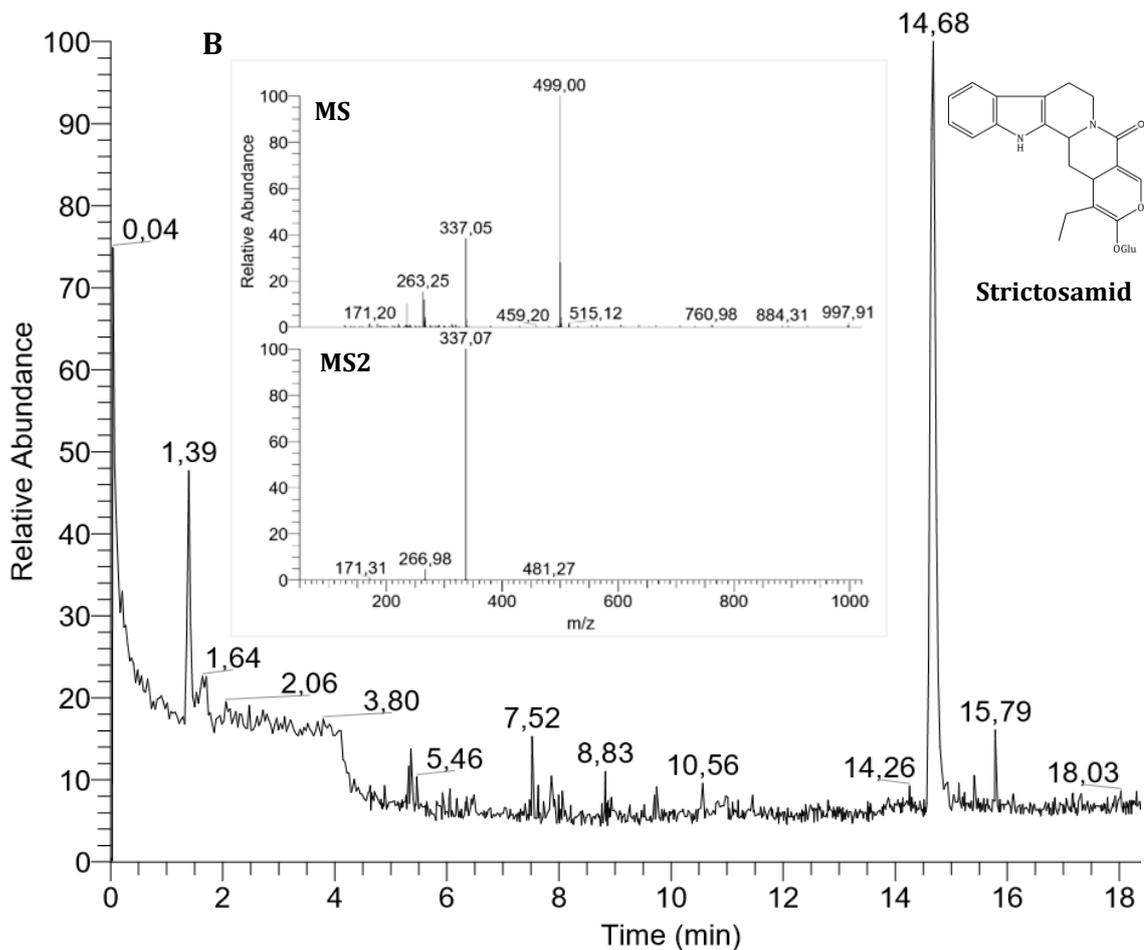
**Abbildung 32: pH-Stabilität von Strictosidin.** Es wurden pH-Bereiche von pH 3 bis pH 9 getestet. Als Puffer wurden Citratpuffer (pH 3 - 5), Kaliumphosphatpuffer (pH 6 - 8) und Natriumcarbonatpuffer (pH 9) in einer Konzentration von 0,1 M verwendet (n=3).

Es zeigte sich, dass im alkalischen Bereich eine deutliche Abnahme der Strictosidinkonzentration auftritt. Bei pH 8 konnten nur noch etwa 35 % Strictosidin detektiert werden, bei pH 9 waren es nur noch 1,5 %. Im sauren pH-Bereich (pH 3 - 6) hingegen scheint Strictosidin relativ stabil zu sein. Im neutralen Bereich (pH 7) konnte eine leichte Abnahme der Konzentration um etwa 15 % beobachtet werden.

Darüber hinaus konnte hier, sowie im alkalischen Bereich die Bildung einer unbekannt Substanz detektiert werden, die in etwa mit der Abnahme von Strictosidin korreliert. Zur Identifizierung dieser Substanz wurde ein bei pH 12 durchgeführter Testansatz mit Strictosidin über LC-MS analysiert (Abbildung 33).

Die LC-MS-Analyse zeigte einen deutlichen Massenpeak nach 14,68 min, mit einer Masse von 499 (m/z), wohingegen Strictosidin nur noch in Spuren detektiert werden konnte. Die MS2-Analyse des Peaks zeigte einen Zerfall zu einer Masse von 337 (m/z). Nach Analyse der MS- und MS2-Daten konnte die unbekannte Substanz als Strictosamid identifiziert werden, welches unter basischen pH-Bedingungen nicht-enzymatisch durch intramolekulare Zyklisierung aus Strictosidin gebildet wird (Yamazaki et al., 2003).

A



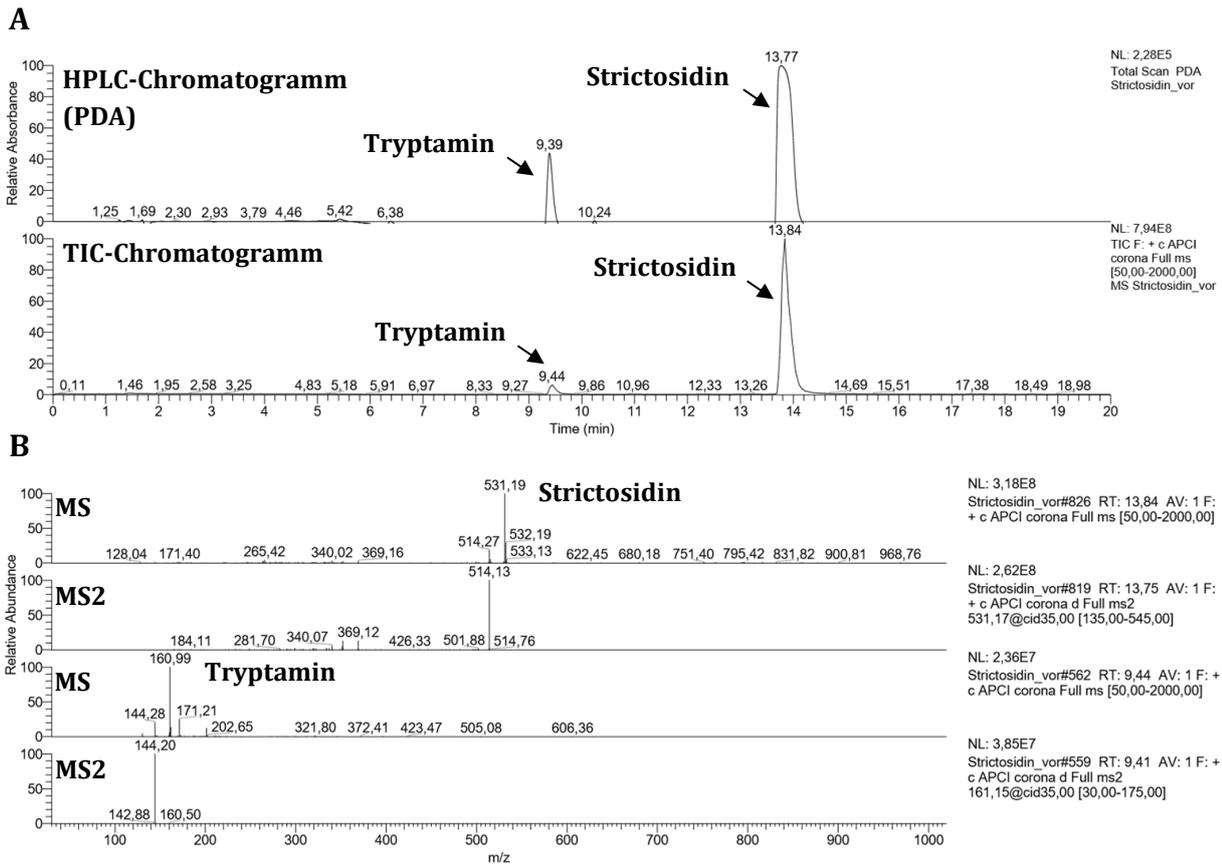
**Abbildung 33: LC-MS-Analyse einer Strictosidinprobe in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 12).**  
**A:** LC-MS-Chromatogramm der Strictosidinprobe bei pH 12. **B:** MS- bzw. MS2-Daten des 14,68 min Peaks aus dem LC-MS-Chromatogramm. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2=Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

Nach Betrachtung dieser Ergebnisse zur pH-Stabilität von Strictosidin wurden die folgenden Versuche zur Produktion von Strictosidin im leicht sauren pH-Bereich bei pH 6 durchgeführt.

#### 4.3.3.2 Produktion von Strictosidin durch immobilisierte STR

Da es keine Möglichkeit gab, das für die Enzymtests der SGD als Substrat benötigte Strictosidin käuflich zu erwerben, wurde ein System zur Eigenproduktion von Strictosidin nach der Methode von Pfitzner und Zenk (1982) entwickelt.

Bei diesem System wurde die STR (pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His) über ihre beiden His-Tags an eine Nickel-Säule gebunden und gereinigt. Anschließend erfolgte die Verknüpfung der Substrate Tryptamin und Secologanin (je 10 mM) direkt durch die an die Säulenmatrix gebundene STR. Nach erfolgter Inkubation wurde das gebildete Strictosidin eluiert, ohne die gebundene STR von der Säule zu lösen. Das Eluat wurde anschließend mittels LC-MS analysiert (Abbildung 34).



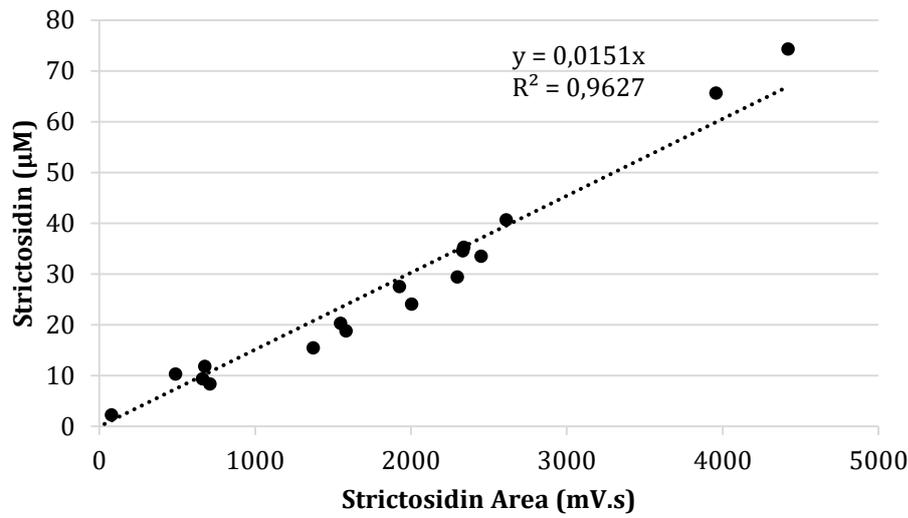
**Abbildung 34: LC-MS-Analyse des Säulen-Eluats eines Enzymtest zur Produktion von Strictosidin durch immobilisierte STR.** **A:** LC-MS-Chromatogramme des Säulen-Eluats, PDA=Photodiodenarray, TIC=Totaler Ionenfluss; **B:** MS- und MS2-Daten der beiden Peaks (9,44 min und 13,84 min) des LC-MS-Chromatogramms. MS= Masse des untersuchten Moleküls, MS2= Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

Die LC-MS-Daten zeigen einen deutlichen Massenpeak nach 13,84 min mit einer Masse von 531 (m/z), die der erwarteten Masse von einfach protoniertem Strictosidin ( $M+H^+$ )<sup>+</sup> entspricht. Die MS2-Analyse dieses Peaks zeigte das typische Fragmentierungsmuster von Strictosidin. Neben dem Strictosidin Peak ist ein weiterer kleiner Massenpeak zu erkennen (9,44 min). Dieser Peak zeigt eine Masse von 161 (m/z), was der Masse von einfach protoniertem Tryptamin ( $M+H^+$ )<sup>+</sup> entspricht. Anhand der LC-MS-Daten konnte festgestellt werden, dass die beiden Substrate Tryptamin und Secologanin fast vollständig zu Strictosidin umgewandelt werden konnten. Daher wurde die Menge an gebildetem Strictosidin zunächst anhand der Abnahme des eingesetzten Tryptamin berechnet. Zu Beginn der Reaktion wurde für Tryptamin bei einer 1:100 Verdünnung des Säuleneluats eine Peak-Area von 6064 mV.s ermittelt, die der eingesetzten Tryptaminkonzentration von 10 mM entspricht. Am Ende der Reaktion konnte nur noch eine Tryptamin-Area von 853 mV.s detektiert werden, was in etwa 1 mM Tryptamin entspricht. Setzt man voraus, dass die verbrauchten 9 mM Tryptamin ausschließlich zur Produktion von Strictosidin verwendet wurden, dann muss die Peak-Area, die für Strictosidin ermittelt wurde (6058 mV.s) in etwa 9 mM entsprechen. Dies entspricht der Bildung von etwa 4,8 mg Strictosidin.

#### 4.3.3.2.3 Herstellung von Strictosidin-Standardgeraden

Um die genaue Menge des enzymatisch gebildeten Strictosidin zu ermitteln, wurden zwei Standardgeraden wie unter 0 beschrieben hergestellt.

Eine der Geraden wurde anhand der Abnahme von bekannten Tryptaminkonzentrationen berechnet. Hierzu wurden Enzymtests der STR durchgeführt und Proben über einen Zeitraum von 7,5 h mittels HPLC untersucht. Die ermittelte Gerade mit Geradengleichung und  $R^2$  ist in Abbildung 35 dargestellt.

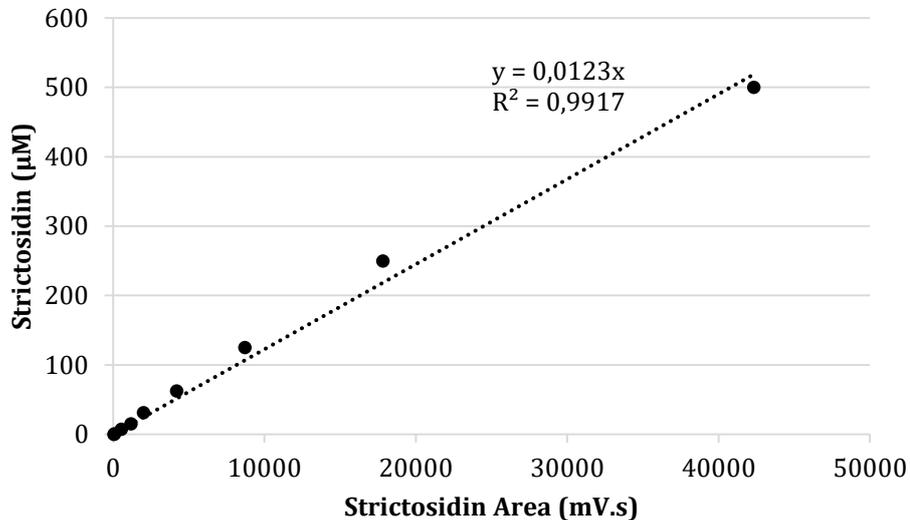


**Abbildung 35: Strictosidin-Standardgerade, ermittelt anhand der Abnahme von bekannten Tryptaminkonzentrationen.** Es wurden Enzymtests der STR durchgeführt, bei denen mit äquimolaren Verhältnissen von Tryptamin und Secologanin (200 µM) in LEW-Puffer (pH 6,5) gearbeitet wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h – 7,5 h) wurden Proben genommen und über HPLC analysiert.

Die zweite Standardgerade wurde direkt aus enzymatisch produziertem Strictosidin (3.2.11) ermittelt. Hierzu wurde das hergestellte Strictosidin zunächst gefriergetrocknet und gewogen. Da das Strictosidin in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer gelöst von der Nickelsäule eluiert wurde, wurden zusätzlich Doppelansätze mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer auf die gleiche Weise behandelt. Für den Ansatz mit Strictosidin wurde eine Masse von 21,2 mg bestimmt, für die beiden Ansätze mit Puffer  $16 \text{ mg} \pm 0,3$ . Berechnet man die Masse der beiden Pufferbestandteile  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  für diesen Ansatz anhand ihrer molaren Massen, kommt man auf 15,6 mg, was in etwa den zuvor bestimmten Massen der gefriergetrockneten Pufferansätzen entspricht.

Die Differenz zwischen dem Ansatz mit Strictosidin und den Pufferansätzen betrug etwa 5,2 mg. Bei diesen 5,2 mg muss es sich um Strictosidin bzw. Reste der beiden Substrate Tryptamin und Secologanin handeln. Wie unter 4.3.2.2 beschrieben wurde war noch etwa 1 mM Tryptamin (0,16 mg) im Ansatz enthalten. Da äquimolare Mengen an Tryptamin und Secologanin eingesetzt wurden und Strictosidin aus der Kondensation von einem Molekül Tryptamin und Secologanin gebildet wird, kann angenommen werden, dass auch noch 1 mM (0,388 mg) Secologanin im Ansatz vorliegt. Subtrahiert man

diese Werte von den berechneten 5,2 mg, kommt man zu einer Masse von 4,7 mg Strictosidin. Mit diesem Wert für Strictosidin wurde eine Standardgerade mittels HPLC hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  - 500  $\mu\text{M}$  Strictosidin verwendet. Die ermittelte Gerade mit Geradengleichung und  $R^2$  ist in Abbildung 36 dargestellt.



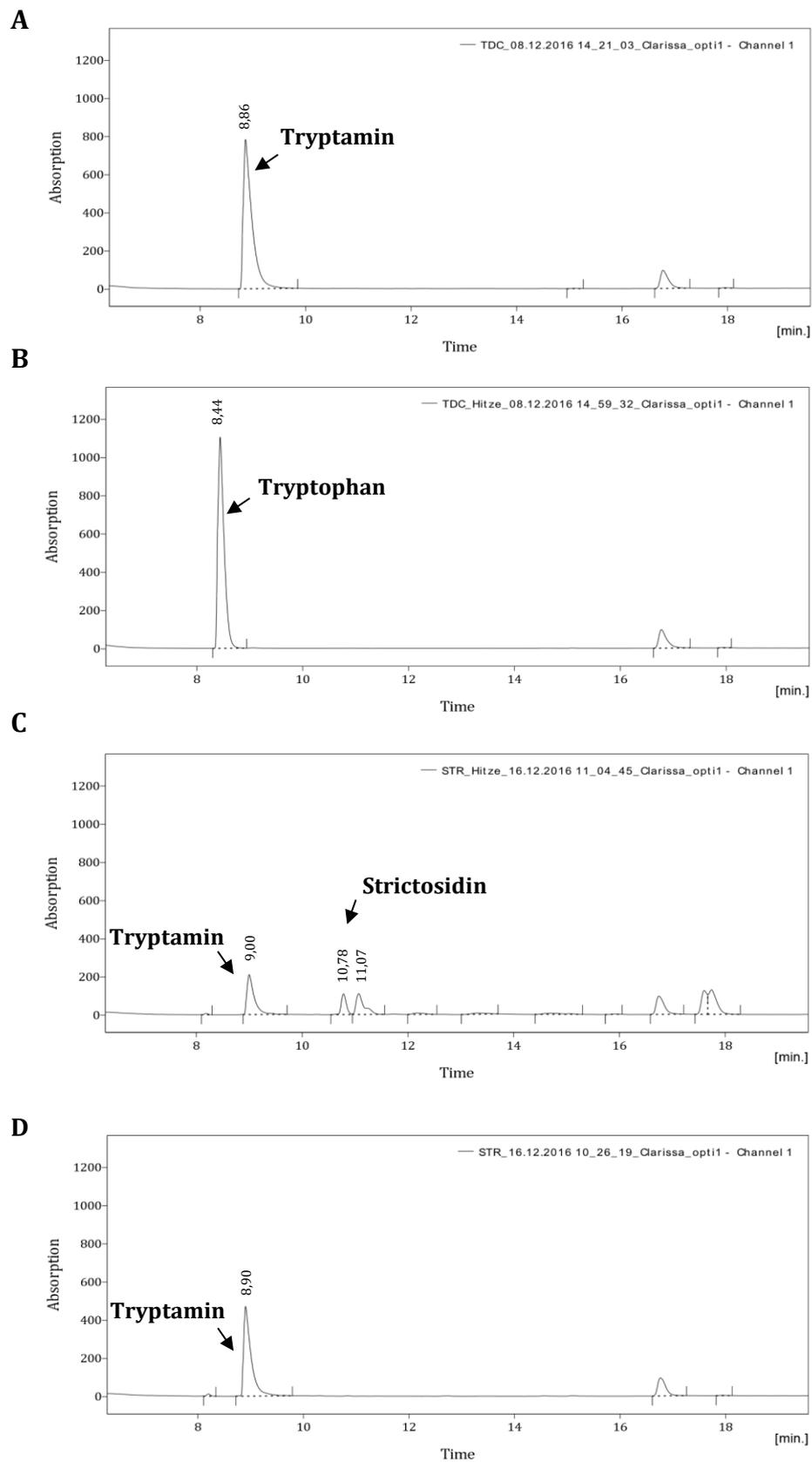
**Abbildung 36: Strictosidin-Standardgerade ermittelt aus enzymatisch produziertem Strictosidin.** Hierzu wurde das produzierte Strictosidin gefriergetrocknet und seine Masse bestimmt. Mit diesem Wert für Strictosidin wurde eine Standardgerade mittels HPLC hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ -500  $\mu\text{M}$  Strictosidin verwendet

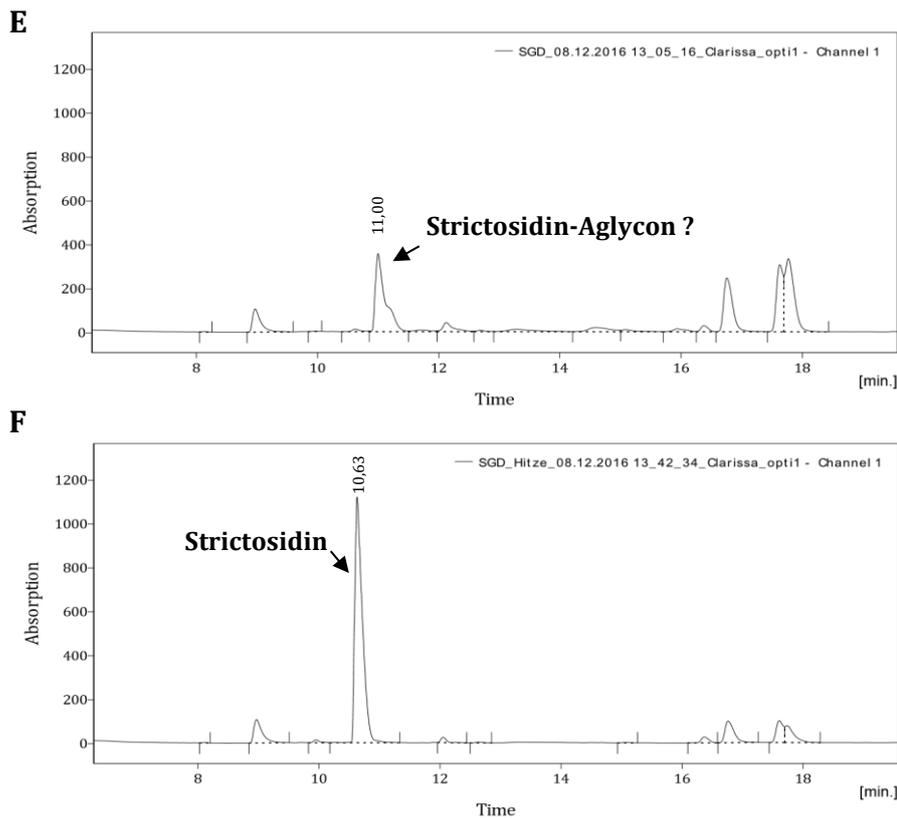
#### 4.3.3.3 Überprüfung der enzymatischen Aktivität und Hitzeinaktivierung

Um sicherzustellen, dass die später detektierten Produkte Tryptamin, Strictosidin und Strictosidin-Aglycon ausschließlich durch die heterolog produzierten Enzyme gebildet wurden, wurden Kontrollen mit hitzeinaktiviertem Enzym durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde je ein Aliquot der gereinigten Enzyme 20 min bei 95 °C inkubiert und anschließend in Enzymtests eingesetzt. Als Vergleich wurden Enzymtests mit einem nicht hitzebehandelten Aliquot durchgeführt. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen sind in Abbildung 37 dargestellt.

In Chromatogramm A (aktive TDC) ist nach einer Retentionszeit von 8,86 min ein deutlicher Peak von Tryptamin, dem enzymatischen Produkt der TDC zu erkennen. In Chromatogramm B (hitzeinaktivierte TDC) hingegen konnte nur der Peak des eingesetzten Substrats Tryptophan mit einer Retentionszeit von 8,44 min detektiert werden. Chromatogramm C (aktive STR) zeigt neben dem Peak des Substrats Tryptamin, den Peak des enzymatischen Produkts der STR, Strictosidin, der nach einer Retentionszeit von 10,78 min von der Säule eluiert. Dieser Peak konnte in Chromatogramm D (hitzeinaktivierte STR) nicht detektiert werden. Darüber hinaus ist in Chromatogramm D ein deutlich größerer Tryptaminpeak zu erkennen. In Chromatogramm E (aktive SGD) wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 11,00 min detektiert, der dem Strictosidin-Aglycon entsprechen könnte. In Chromatogramm F (hitzeinaktivierte SGD) konnte

dieser Peak nicht detektiert werden. Hier ist nur der Peak des eingesetzten Substrats der SGD, Strictosidin, nach einer Retentionszeit von 10,63 min zu erkennen.





**Abbildung 37: Nachweis der enzymatischen Aktivität und Hitzeinaktivierung der gereinigten Enzyme.** Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Enzymtests. **A:** Enzymtest der TDC, **B:** Enzymtest der hitzeinaktivierten TDC, **C:** Enzymtest der STR, **D:** Enzymtest der hitzeinaktivierten STR, **E:** Enzymtest der SGD, **F:** Enzymtest der hitzeinaktivierten SGD.

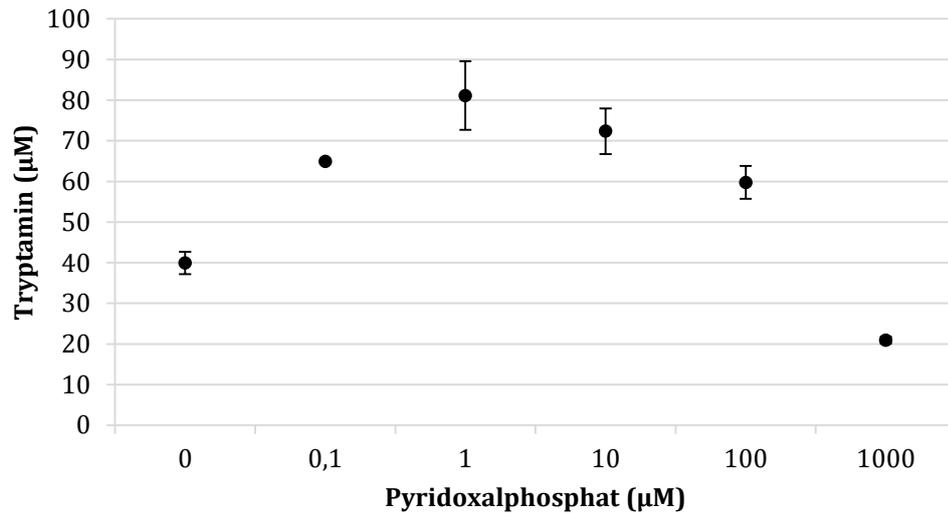
#### 4.3.3.4 Charakterisierung der gereinigten Enzyme

Zur Charakterisierung der gereinigten Enzyme wurde deren Aktivität unter verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen untersucht sowie nach Inkubation mit verschiedenen bekannten Enzym hemmenden bzw. fördernden Substanzen. Darüber hinaus wurden die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte bestimmt.

##### 4.3.3.4.1 TDC

###### 4.3.3.4.1.1 Bestimmung der optimalen Kofaktorkonzentration

Die TDC benötigt für ihre optimale Aktivität den Kofaktor Pyridoxal-5-phosphat. Da dieser jedoch durch den Reinigungsprozess über die Nickelsäule teilweise verloren geht, muss er anschließend wieder in entsprechender Menge zugeführt werden. Um die optimale Kofaktorkonzentration zu ermitteln, wurden Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$  Pyridoxalphosphat getestet und die Enzymaktivität der TDC direkt über die Bildung von Tryptamin aus dem Substrat Tryptophan mittels HPLC-Analyse ermittelt (Abbildung 38).



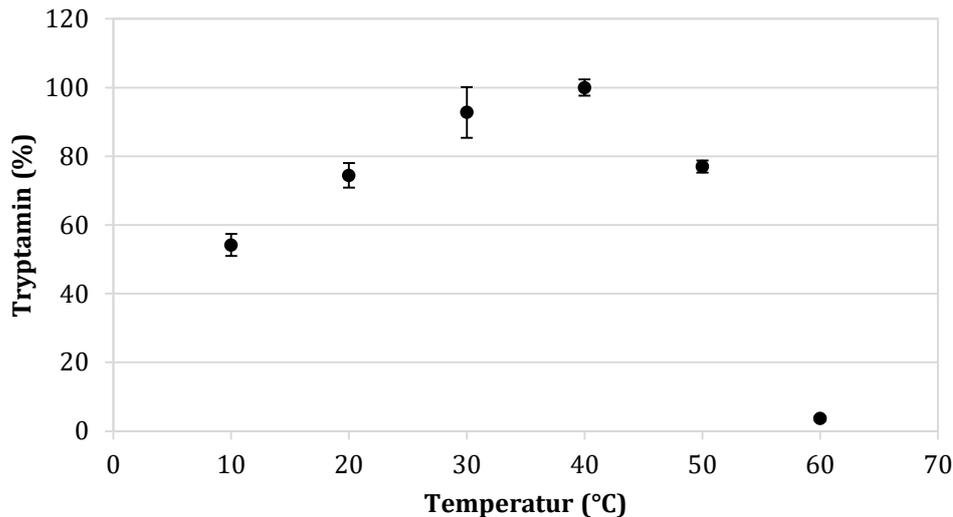
**Abbildung 38: TDC-Aktivität bei unterschiedlichen Pyridoxal-5-phosphatkonzentrationen.** Getestet wurden Konzentrationen zwischen 0 µM und 1000 µM Pyridoxal-5-phosphat. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

Die HPLC-Daten zeigten, dass eine Pyridoxal-5-phosphate Konzentration zwischen 0,1 µM und 100 µM zu Tryptaminausbeuten zwischen 60 µM und 80 µM führten. Ohne Kofaktor sank die Ausbeute um fast 50 % auf 40 µM. Zu hohe Kofaktorkonzentrationen (1000 µM) führten jedoch zu noch geringeren Tryptaminkonzentrationen von 20 µM.

#### 4.3.3.4.1.2 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

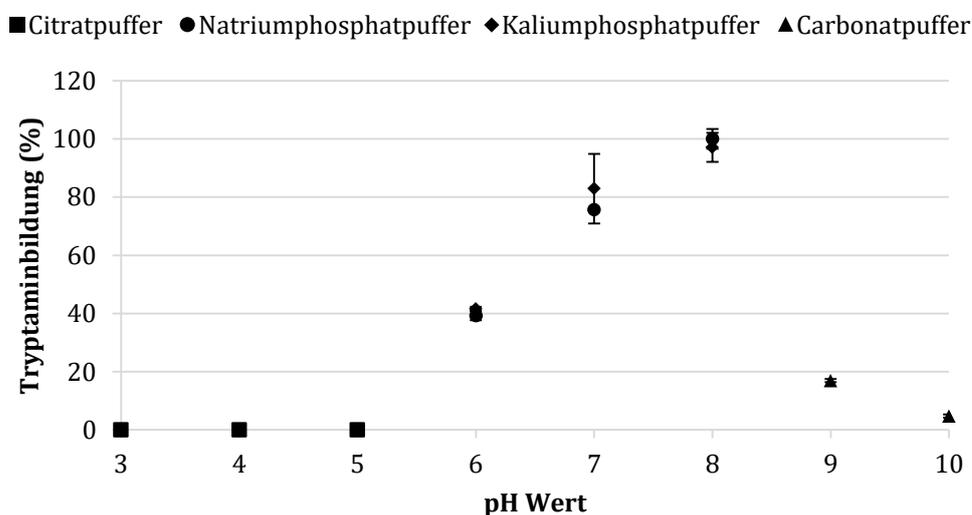
Zur weiteren Charakterisierung der TDC wurde deren Aktivität unter verschiedenen Temperatur- und pH-Bedingungen anhand der Bildung ihres enzymatischen Produktes Tryptamin untersucht. Es wurden Temperaturen im Bereich von 10 °C - 60 °C betrachtet, sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 10.

Die HPLC-Analysen der Temperatur-Ansätze zeigten ein Optimum der Tryptaminbildung bei Temperaturen von 30 °C - 40 °C (Abbildung 39). Erhöhung der Temperatur auf 50 °C bzw. Erniedrigung auf 10 °C - 20 °C führten zu einer etwa 20 % bzw. 45 % geringeren Ausbeute. Bei einer Temperatur von 60 °C konnte kaum noch Tryptamin detektiert werden.



**Abbildung 39: TDC-Aktivität in Abhängigkeit zur Temperatur.** Es wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 60 °C getestet und die TDC-Aktivität anhand der Bildung von Tryptamin über HPLC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

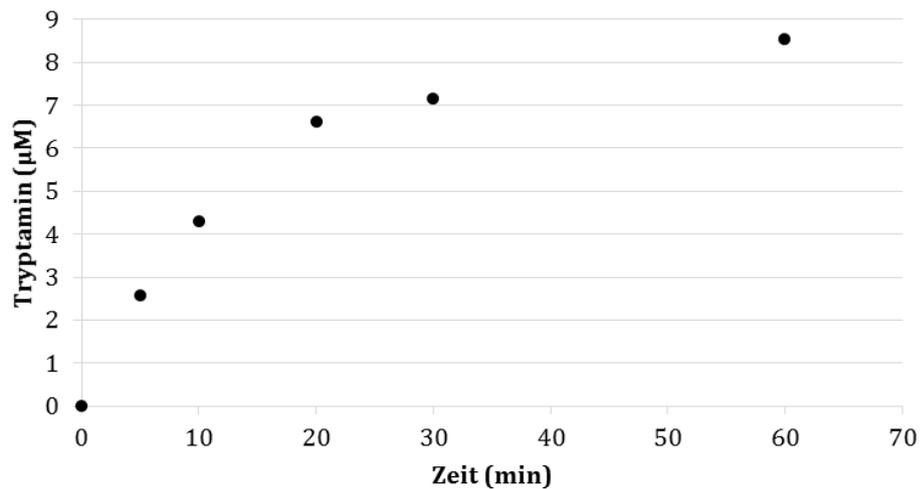
Bei der Analyse der pH-Ansätze, zeigte sich ein klares Optimum im leicht alkalischen Bereich bei pH 8 (Abbildung 40). Im neutralen (pH 7) und leicht sauren (pH 6) Bereich sank die Tryptaminausbeute auf etwa 80 % bzw. 40 %. Bei stärker sauren pH-Werten (pH 3 - pH 5) konnte keine Tryptaminbildung detektiert werden und auch im stärker alkalischen Bereich (pH 9 - pH 10) zeigte die TDC nur noch geringe Aktivität.



**Abbildung 40: TDC-Aktivität in Abhängigkeit zum pH-Wert.** Es wurden pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 10 getestet und die TDC-Aktivität anhand der Bildung von Tryptamin über HPLC bestimmt. Die höchste Tryptaminausbeute wurde 100 % gesetzt und alle anderen Werte daran berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

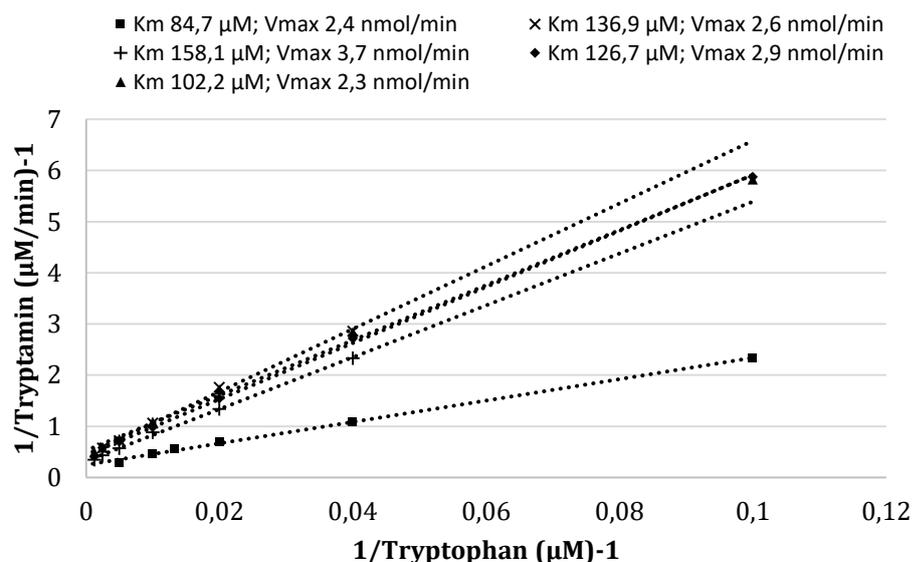
#### 4.3.3.4.1.3 Bestimmung von $K_m$ und $V_{max}$ nach Lineweaver und Burk

Die Bestimmung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes von Tryptophan erfolgte nach der Methode von Lineweaver und Burk (1934). Um sicher zu stellen, dass die späteren Messungen im linearen Bereich stattfanden, wurde zunächst eine Zeitabhängigkeitskurve mit variierenden Inkubationszeiten (5 min - 60 min) bei konstanter Tryptophan-konzentration ( $10 \mu\text{M}$ ) aufgenommen (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Zeitabhängigkeitskurve der Tryptaminbildung.** Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Die Anfangskonzentration des Substrates Tryptophan betrug  $10 \mu\text{M}$ . Die Analyse erfolgte über HPLC ( $n=1$ ).

Nach Auswertung der Kurve wurde zur Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{max}$  (Abbildung 42) eine Inkubationszeit von 10 min verwendet.

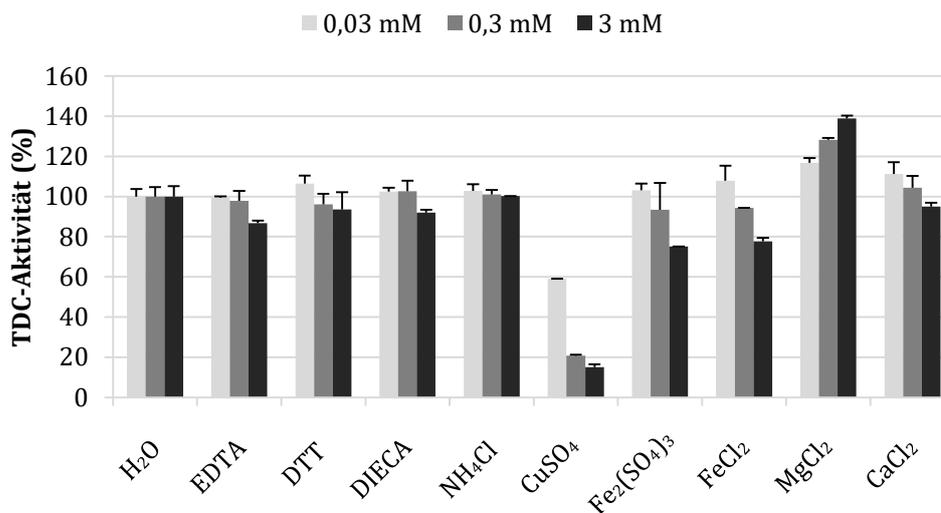


**Abbildung 42: Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes für Tryptophan nach Lineweaver und Burk (1934).** Es wurden Tryptophan-Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$  getestet. Die Bestimmung wurde fünf Mal durchgeführt, mit gereinigtem Enzym ( $0,01 \text{ mg}$  -  $0,015 \text{ mg}$  TDC) aus drei unterschiedlichen Expressionen.

Es wurden Tryptophankonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$  getestet. Die Tests wurden fünf Mal durchgeführt, mit Enzym (0,01 mg - 0,015 mg TDC) aus drei unterschiedlichen Expressionen. Die jeweils ermittelten Geraden und die daraus berechneten  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte sind in Abbildung 42 dargestellt. Der für Tryptophan ermittelte  $K_m$ -Wert liegt bei  $122 \mu\text{M} \pm 29 \mu\text{M}$ , der  $V_{\text{max}}$ -Wert bei  $2,8 \text{ nmol/min} \pm 0,56 \text{ nmol/min}$ .

#### 4.3.3.4.1 Einfluss verschiedener Substanzen auf die TDC-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der TDC wurde unter anderem die Auswirkung verschiedener Konzentrationen bekannter Enzyminhibitoren sowie verschiedener Kationen auf die Enzym-Aktivität untersucht. Hierzu wurde die TDC zunächst mit der jeweiligen Substanz inkubiert und anschließend Substrat und Kofaktor zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Als Referenz dienten Ansätze, bei denen die TDC mit Wasser anstelle der untersuchten Substanzen inkubiert wurde. Die Aktivität dieser Referenz-Ansätze wurde als 100 % TDC-Aktivität angesehen und alle anderen Aktivitäten daraus bestimmt (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Einfluss verschiedener Substanzen auf die TDC-Aktivität.** Die TDC wurde zunächst mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert und anschließend Substrat und Kofaktor zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Ansätze, bei denen die TDC mit Wasser anstelle der zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurde, dienten als Referenz und wurden als 100 % TDC-Aktivität angesehen. Alle anderen Aktivitäten wurden daraus bestimmt. Getestet wurden jeweils drei Konzentrationen: 0,03 mM, 0,3 mM und 3 mM (n=2).

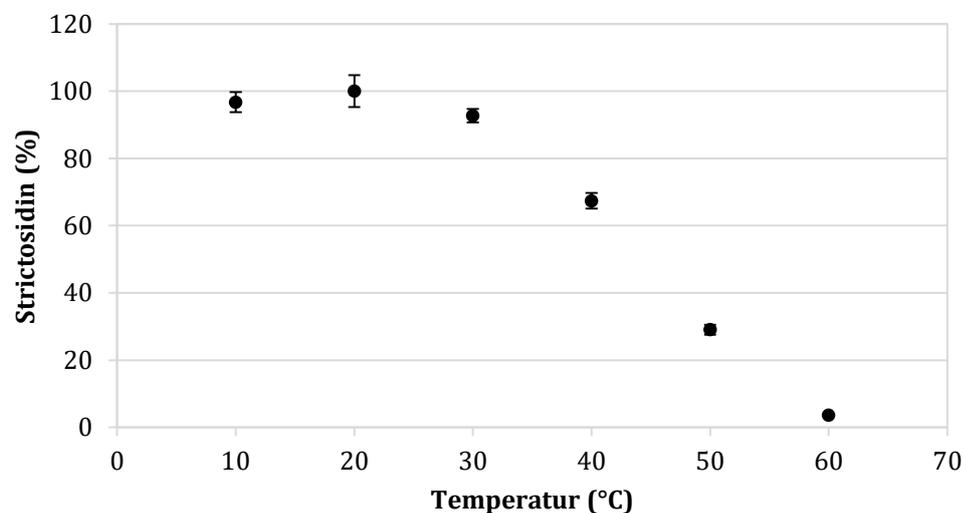
Aus der Abbildung geht hervor, dass die meisten getesteten Substanzen in keiner der untersuchten Konzentrationen einen starken Einfluss auf die enzymatische Aktivität der TDC haben. Eisensulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) und Eisenchlorid ( $\text{FeCl}_2$ ) zeigen in der höchsten eingesetzten Konzentration eine leichte Hemmung auf etwa 80 % TDC-Aktivität. Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) zeigt als einzige Substanz, eine deutliche Hemmung der TDC-Aktivität, besonders in den beiden höheren getesteten Konzentrationen (0,3 mM und 3 mM).

Hier ist eine Abnahme der TDC Aktivität auf etwa 20 % zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ) eine leichte Erhöhung der Aktivität auf bis zu 140 % (3 mM).

#### 4.3.3.4.2 STR

##### 4.3.3.4.2.1 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

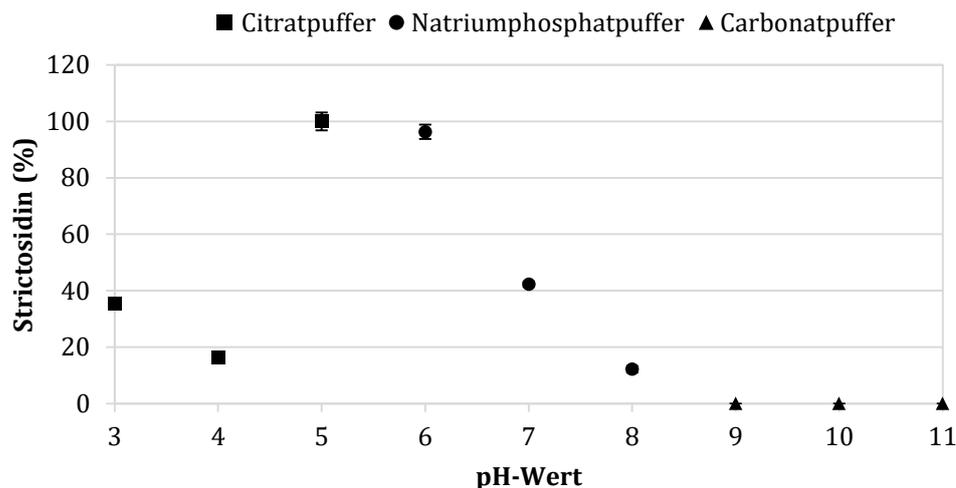
Zur Charakterisierung der STR wurde deren Aktivität unter verschiedenen Temperatur und pH-Bedingungen anhand der Bildung ihres Produkts Strictosidin untersucht. Es wurden Temperaturen im Bereich von 10 °C - 60 °C betrachtet, sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 8. Die Analyse der Temperatur-Ansätze zeigte ein Optimum der STR-Aktivität im Bereich von 10 °C - 30 °C (Abbildung 44).



**Abbildung 44: STR-Aktivität in Abhängigkeit zur Temperatur.** Es wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 60 °C getestet und die STR-Aktivität anhand der Bildung von Strictosidin über HPLC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ).

Höhere Temperaturen führten zu einer Abnahme der Strictosidinbildung um etwa 30 % bei 40 °C und um etwa 70 % bei 50 °C. Bei einer Temperatur von 60 °C konnte kaum noch Strictosidin detektiert werden.

Die Analyse der pH-Ansätze zeigte ein klares Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 5 - pH 6 (Abbildung 45).



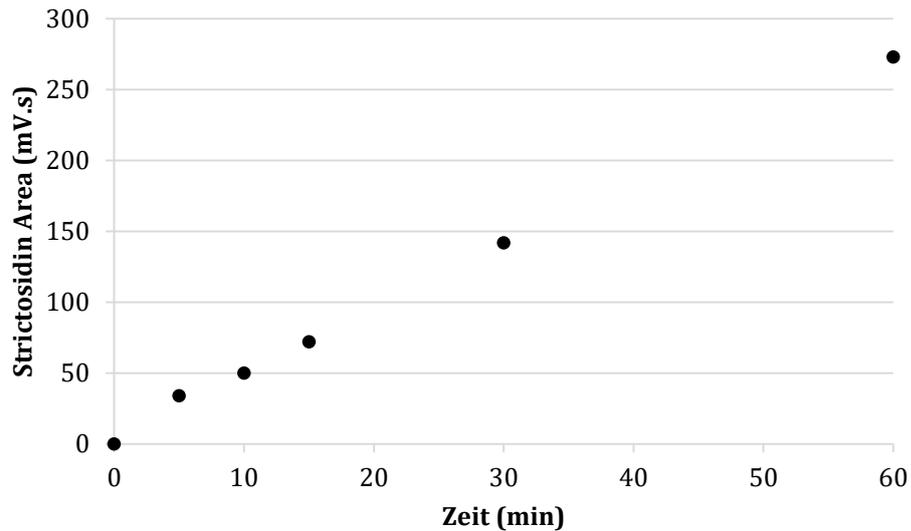
**Abbildung 45: STR-Aktivität in Abhängigkeit zum pH-Wert.** Es wurden pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 10 getestet und die STR-Aktivität anhand der Bildung von Strictosidin über HPLC bestimmt. Die höchste Strictosidinausbeute wurde 100 % gesetzt und alle anderen Werte daran berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

Im neutralen Bereich (pH 7) sank die Strictosidinausbeute auf etwa 40 %. Im schwach alkalischen Bereich (pH 8) bzw. im sauren Bereich (pH 4) konnten nur noch geringe Mengen an Strictosidin detektiert werden. Im stärker alkalischen Bereich zwischen pH 9 und pH 11 konnte kein Strictosidin mehr detektiert werden.

#### 4.3.3.4.2 Bestimmung von $K_m$ nach Florini und Vestling

Da sich die benötigten hohen Secologaninkonzentrationen nur schwer erreichen ließen, erfolgte die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von Tryptamin und Secologanin nach der Methode von Florini und Vestling (1957). Die Ermittlung des  $V_{max}$ -Wertes ist über diese Methode nicht möglich, da keine Substratsättigung erreicht wird.

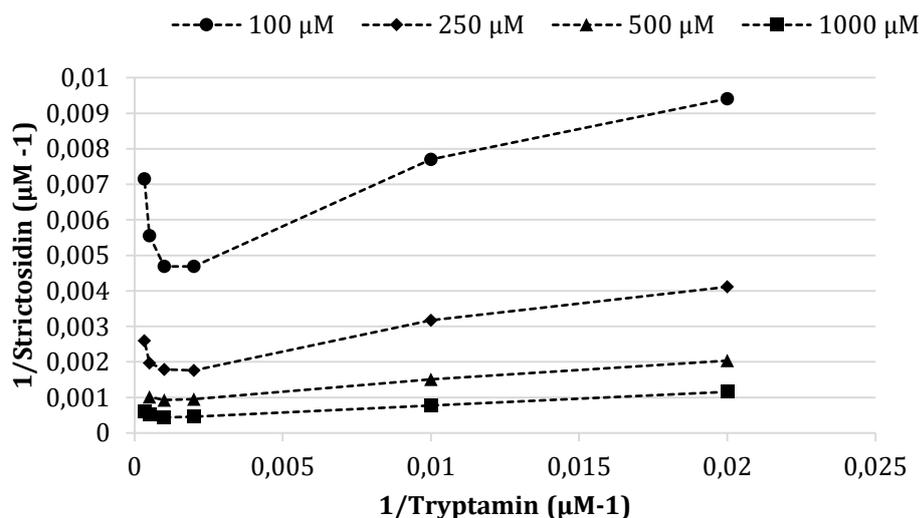
Um sicher zu stellen, dass alle späteren Messungen im linearen Bereich stattfanden, wurde zunächst eine Zeitabhängigkeitskurve mit variierenden Inkubationszeiten (5 min - 60 min) bei gleichbleibender Tryptamin- (100  $\mu$ M) und Secologaninkonzentration (200  $\mu$ M) aufgenommen. Die Kurve ist in Abbildung 46 dargestellt.



**Abbildung 46: Zeitabhängigkeitskurve der Strictosidinbildung.** Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Die Anfangskonzentration der Substrate Tryptamin und Secologanin betrug  $100 \mu\text{M}$  bzw.  $200 \mu\text{M}$ . Die Analyse erfolgte über HPLC ( $n=1$ ).

Nach Auswertung der Kurve wurde für die weiteren Tests zur Bestimmung des Km-Werts eine Inkubationszeit von 10 min verwendet. In den ersten Enzymtests wurden Tryptamin- und Secologaninkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $3000 \mu\text{M}$  getestet.

Da die Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 47), unabhängig von der eingesetzten Secologaninkonzentration, ab einer Konzentration von etwa  $1000 \mu\text{M}$  Tryptamin eine deutliche Substrathemmung zeigte (Chmiel, 2011), wurden in den folgenden Tests nur noch Tryptaminkonzentrationen bis  $1000 \mu\text{M}$  verwendet.

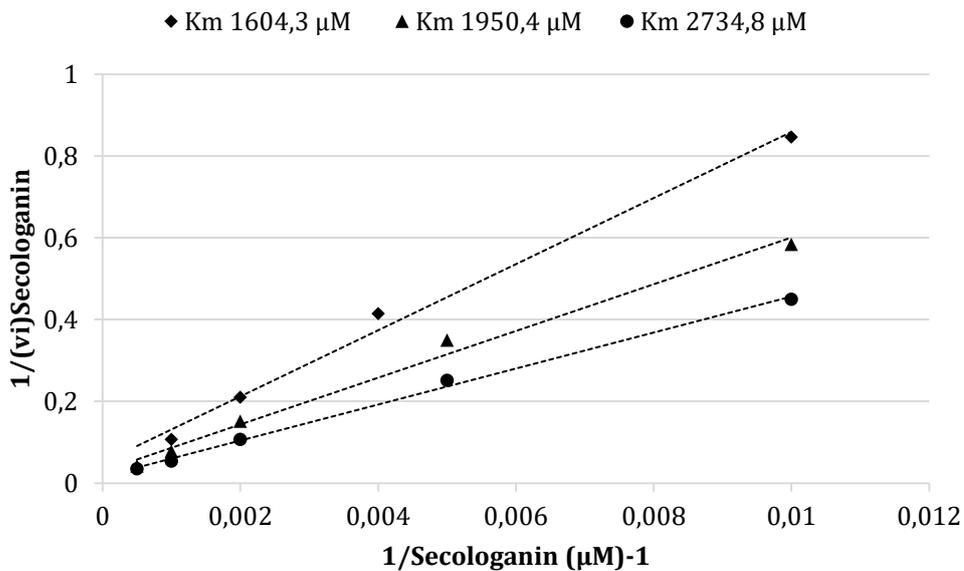


**Abbildung 47: Lineweaver-Burk Darstellung der Substrathemmung der STR durch Tryptaminkonzentrationen  $>1000 \mu\text{M}$ .** Es wurden Tryptaminkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $3000 \mu\text{M}$  getestet. Die Strictosidinkonzentration ( $100 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$ ) wurde jeweils konstant gehalten.

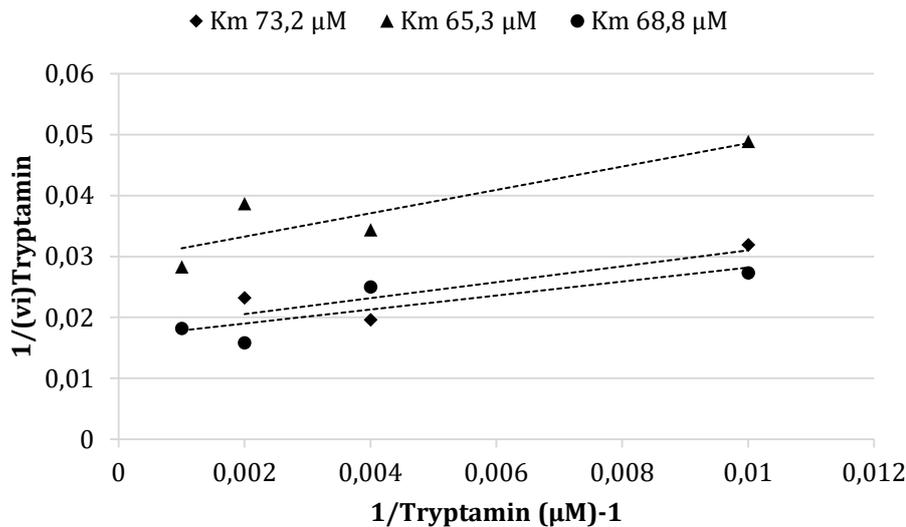
Zur Ermittlung der  $K_m$ -Werte wurden Tryptaminkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$  und Secologaninkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $3000 \mu\text{M}$  getestet. Die Tests wurden drei Mal durchgeführt, mit Enzym ( $0,1 \text{ mg}$  -  $0,13 \text{ mg STR}$ ) aus drei unterschiedlichen Expressionen.

Die jeweiligen nach Florini und Vestling (1957) ermittelten Geraden und die daraus berechneten  $K_m$ -Werte sind in Abbildung 48 dargestellt. Der für Tryptamin ermittelte  $K_m$ -Wert liegt bei  $69 \mu\text{M} \pm 4,0 \mu\text{M}$  der für Secologanin bei  $2096 \mu\text{M} \pm 579 \mu\text{M}$ .

A



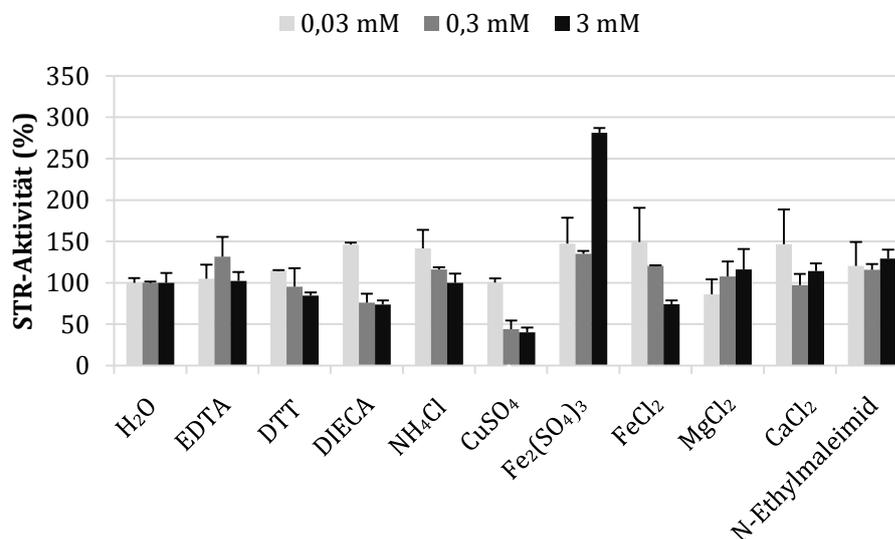
B



**Abbildung 48: Ermittlung der  $K_m$ -Werte für Secologanin (A) und Tryptamin (B) nach Florini und Vestling (1957).** Es wurden Tryptaminkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $1000 \mu\text{M}$  und Secologaninkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  -  $3000 \mu\text{M}$  getestet. Die Bestimmung wurde drei Mal durchgeführt, mit gereinigtem Enzym ( $0,1 \text{ mg}$  -  $0,13 \text{ mg STR}$ ) aus drei unterschiedlichen Expressionen.

#### 4.3.3.4.2.3 Einfluss verschiedener Substanzen auf die STR-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der STR wurden die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen einiger bekannter Enzyminhibitoren und verschiedener Kationen auf die Enzymaktivität untersucht. Die STR wurde hierzu zunächst mit der jeweiligen Substanz inkubiert und anschließend die beiden Substrate zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Als Referenz dienten Ansätze, bei denen die STR mit Wasser anstelle der untersuchten Substanzen inkubiert wurde. Die Aktivität dieser Referenz-Ansätze wurde als 100 % STR-Aktivität angesehen und alle anderen Aktivitäten daraus bestimmt (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Einfluss verschiedener Substanzen auf die STR-Aktivität.** Die STR wurde zunächst mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert und anschließend die beiden Substrate zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Ansätze, bei denen die STR mit Wasser anstelle der zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurde, dienten als Referenz und wurden als 100 % STR-Aktivität angesehen. Alle anderen Aktivitäten wurden daraus bestimmt. Getestet wurden jeweils drei Konzentrationen: 0,03 mM, 0,3 mM und 3 mM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=2$ ).

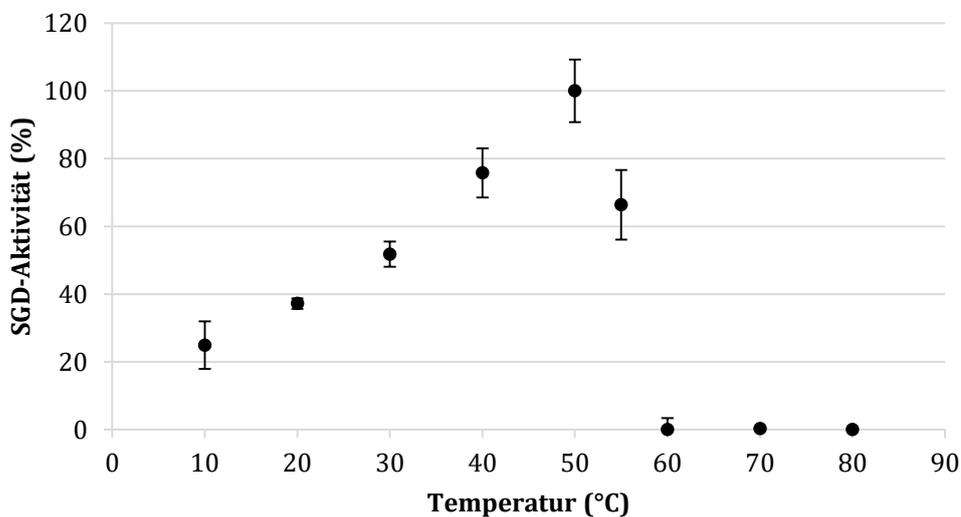
Aus Abbildung 49 geht hervor, dass die meisten getesteten Substanzen in keiner der untersuchten Konzentrationen einen größeren Einfluss auf die enzymatische Aktivität der STR haben. Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) zeigt als einzige getestete Substanz, eine deutliche Hemmung der Aktivität. Mit den beiden höheren eingesetzten Konzentrationen (0,3 mM und 3 mM) wird eine Hemmung der STR-Aktivität um etwa 50 % erreicht, wohingegen die niedrigste Konzentration (0,03 mM) zu keiner Hemmung führt. Im Gegensatz zum Kupfersulfat zeigt Eisen(III)-sulfat (Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) in der höchsten getesteten Konzentration (3 mM) eine starke Erhöhung der STR-Aktivität auf fast 300 %.

#### 4.3.3.4.3 SGD

##### 4.3.3.4.3.1 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

Zur Charakterisierung der SGD wurde deren Aktivität unter verschiedenen Temperatur und pH-Bedingungen untersucht. Es wurden Temperaturen im Bereich von 10 °C - 80 °C betrachtet, sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 8.

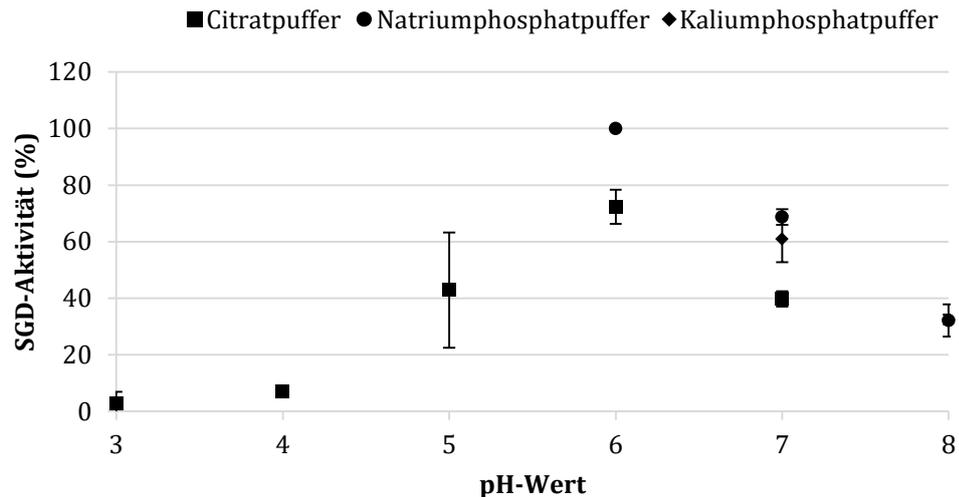
Die Analyse der Temperatur-Ansätze zeigte ein deutliches Optimum der SGD-Aktivität bei 50 °C. Erhöhung der Temperatur auf 55 °C führte zu einem Abfall der Aktivität auf etwa 67 %. Ab 60 °C konnte keine SGD-Aktivität mehr festgestellt werden. Im Temperaturbereich unter 50 °C nahm die SGD-Aktivität mit abnehmender Temperatur kontinuierlich ab. Bei einer Temperatur von 30 °C zeigte die SGD noch etwa 50 % Aktivität, bei 10 °C noch etwa 26 % (Abbildung 50).



**Abbildung 50: SGD-Aktivität in Abhängigkeit zur Temperatur.** Es wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 80 °C getestet und die SGD-Aktivität (Aglyconbildung) anhand der Abnahme von Strictosidin über HPLC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=2).

Um zu überprüfen, dass die Glucose ausschließlich enzymatisch durch die Aktivität der SGD abgespalten wurde, wurden für alle Temperaturen auch Tests ohne Enzym durchgeführt.

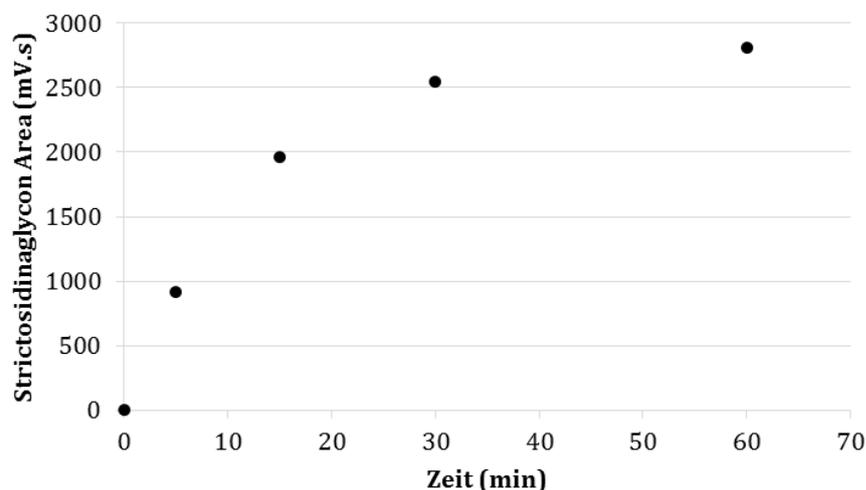
Die Analyse der pH-Ansätze zeigte ein Optimum der SGD-Aktivität bei pH 6 (Abbildung 51), wobei von den drei in diesem Bereich getesteten Puffern Natriumphosphatpuffer zur höchsten Aktivität führte. Bei pH 5 und pH 7 zeigt die SGD noch etwa 40 - 65 % Aktivität, bei pH 8 nur noch etwa 30 %. Im stark sauren pH-Bereich (pH 3 und pH 4) ist kaum noch Aktivität zu erkennen.



**Abbildung 51: SGD-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.** Es wurden pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 8 getestet und die SGD-Aktivität anhand der Strictosidinabnahme über HPLC bestimmt. Die höchste Strictosidinabnahme wurde 100 % gesetzt und alle anderen Werte daran berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=2).

#### 4.3.3.4.3.2 Bestimmung von $K_m$ und $V_{max}$

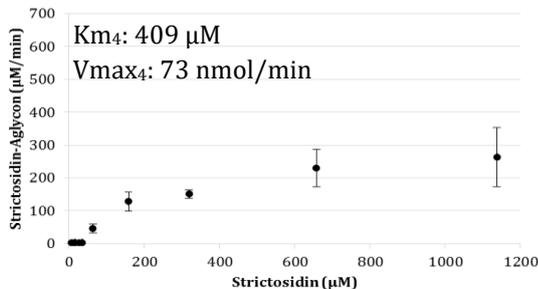
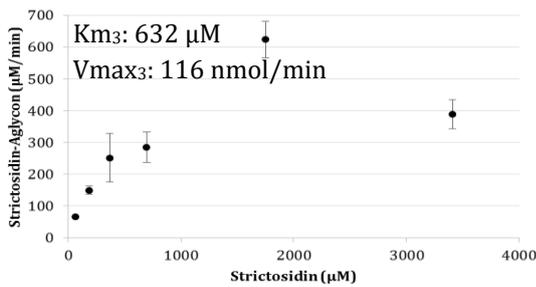
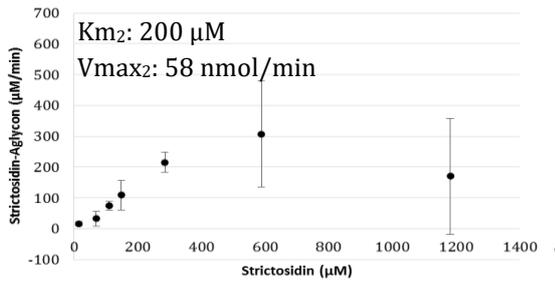
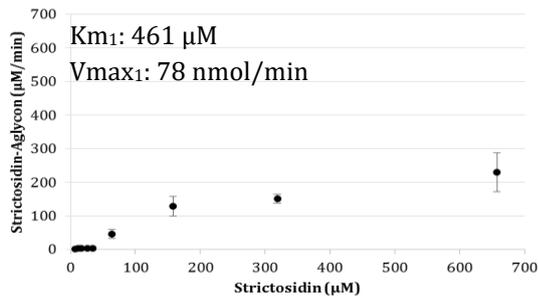
Um sicher zu stellen, dass alle späteren Messungen im linearen Bereich stattfanden, wurde zunächst eine Zeitabhängigkeitskurve mit variierenden Inkubationszeiten (5 min - 60 min) bei gleichbleibender Strictosidinkonzentration ( $37 \mu\text{M}$ ) aufgenommen (Abbildung 52).



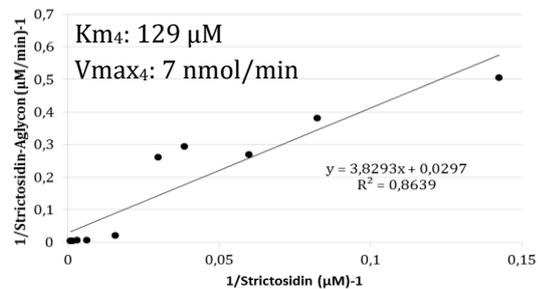
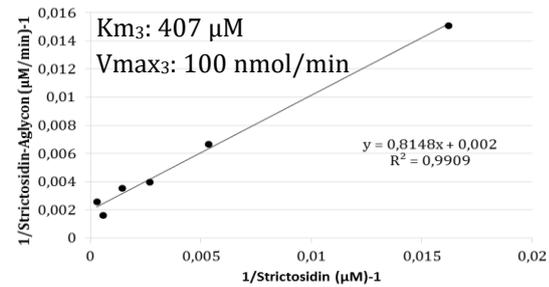
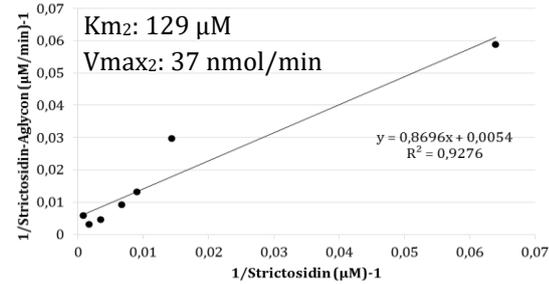
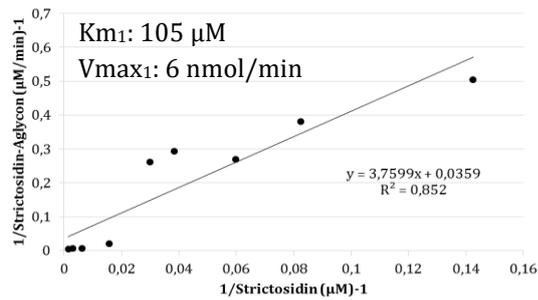
**Abbildung 52: Zeitabhängigkeitskurve der Strictosidinaglycon-Bildung.** Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Die Anfangskonzentration des Substrats Strictosidin betrug  $37 \mu\text{M}$ . Die über HPLC-Analyse bestimmte Abnahme des Strictosidin wurde gleichgesetzt mit der Bildung des Strictosidin-aglycons, (n=1).

Nach Auswertung der Zeitabhängigkeitskurve wurde für die folgenden Messungen zur Bestimmung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes eine Inkubationszeit von 30 sek verwendet, da diese kurze Zeitspanne bereits für eine HPLC-Analyse ausreichte.

A



B

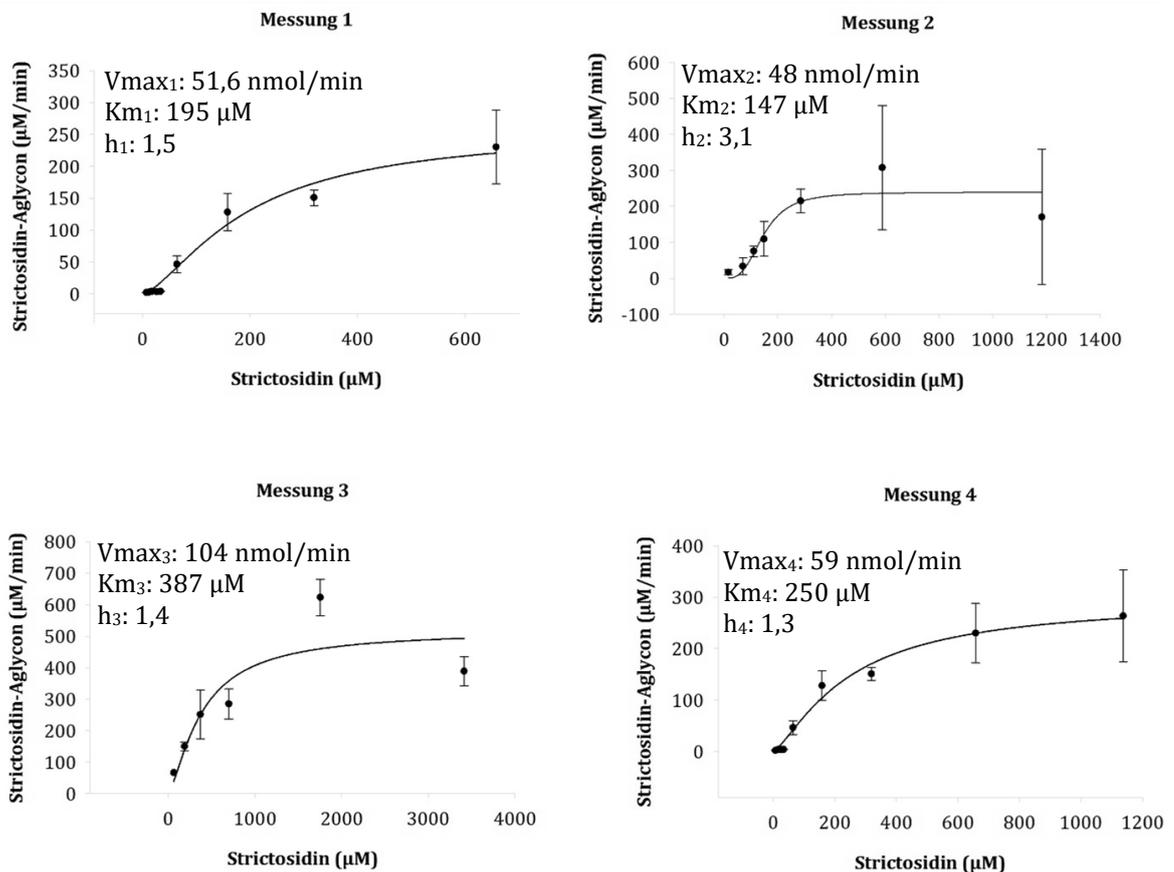


**Abbildung 53: Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes für Strictosidin nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk.** A: Michaelis-Menten Auftragung; B: Lineweaver-Burk Auftragung. Es wurden Strictosidinkonzentrationen von  $7 \mu\text{M}$  -  $1750 \mu\text{M}$  getestet. Die Bestimmung wurde vier Mal durchgeführt, mit gereinigtem Enzym ( $0,001 \text{ mg SGD}$ ) aus zwei unterschiedlichen Expressionen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=2$ ).

Zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes wurden Konzentrationen von  $7 \mu\text{M}$  -  $1750 \mu\text{M}$  Strictosidin getestet. Die Tests wurden vier Mal durchgeführt, mit Enzym ( $0,001 \text{ mg SGD}$ ) aus zwei unterschiedlichen Expressionen. In Abbildung 53 sind die Auftragungen der ermittelten Werte nach Michaelis und Menten, sowie nach Lineweaver und Burk dargestellt. Der für Strictosidin ermittelte  $K_m$ -Wert nach Michaelis-Menten lag bei  $426 \mu\text{M} \pm 178 \mu\text{M}$ , der  $V_{max}$ -Wert bei  $81 \text{ nmol}/\text{min} \pm 25 \text{ nmol}/\text{min}$ . Der nach Lineweaver und

Burk ermittelte  $K_m$ -Wert lag bei  $193 \mu\text{M} \pm 143 \mu\text{M}$ , der  $V_{\text{max}}$ -Wert bei  $38 \text{ nmol}/\text{min} \pm 44 \text{ nmol}/\text{min}$ .

Da die ermittelte Kurve nicht der klassischen hyperbolischen Sättigungskurve nach Michaelis-Menten entsprach, sondern eher eine sigmoidale Form zeigte wurden die Werte für  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  zusätzlich über die Hill-Gleichung bestimmt Abbildung 54.



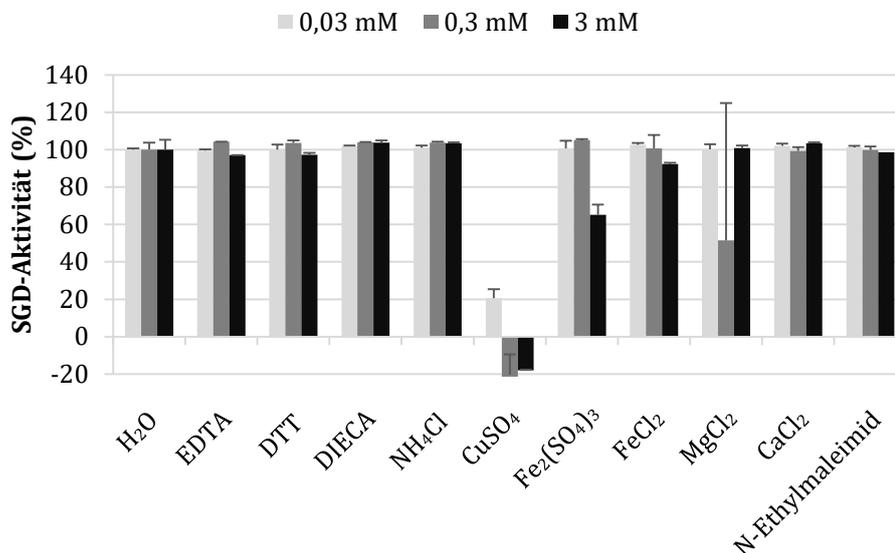
**Abbildung 54: Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Wertes sowie des Hill-Koeffizienten ( $h$ ) für Strictosidin nach Hill (1910).** Es wurden Strictosidin-Konzentrationen von  $7 \mu\text{M}$  -  $1750 \mu\text{M}$  getestet. Die Bestimmung wurde vier Mal durchgeführt, mit gereinigtem Enzym ( $0,001 \text{ mg SGD}$ ) aus zwei unterschiedlichen Expressionen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=2$ ).

Der nach Hill ermittelte  $K_m$ -Wert lag bei  $245 \mu\text{M} \pm 104 \mu\text{M}$ , der  $V_{\text{max}}$ -Wert bei  $66 \text{ nmol}/\text{min} \pm 26 \text{ nmol}/\text{min}$ . Zusätzlich wurde der Hill-Koeffizient ( $h$ ) ermittelt, der das Ausmaß der Kooperativität wieder gibt. Ist  $h=1$ , lässt sich die Kinetik durch eine Michaelis-Menten Kurve beschreiben, es gibt keine Kooperativität. Für  $h>1$  entsteht eine sigmoidale Kurve (positive Kooperativität), für  $h<1$  sinkt die Steigung der Kurve (negative Kooperativität). Die ermittelten Hill-Koeffizienten ( $1,3 - 3,1$ ) lagen alle im Bereich  $h>1$ .

#### 4.3.3.4.3 Auswirkung verschiedener Substanzen auf die SGD-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der SGD wurde die Auswirkung verschiedener Konzentrationen bekannter Enzyminhibitoren sowie verschiedener Kationen auf die Enzym-Aktivität untersucht. Die SGD wurde hierzu zunächst mit der jeweiligen Substanz

inkubiert und anschließend ihr Substrat Strictosidin zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Als Referenz dienten Ansätze, bei denen die SGD mit Wasser anstelle der untersuchten Substanzen inkubiert wurde. Die Aktivität dieser Referenz-Ansätze wurde als 100 % SGD-Aktivität angesehen und alle anderen Aktivitäten daraus bestimmt.



**Abbildung 55: Einfluss verschiedener Substanzen auf die SGD-Aktivität.** Die SGD wurde zunächst mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert und anschließend das Substrat zugefügt. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Ansätze, bei denen die SGD mit Wasser anstelle der zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurde, dienten als Referenz und wurden als 100 % SGD-Aktivität angesehen. Alle anderen Aktivitäten wurden daraus bestimmt. Ge-testet wurden jeweils drei Konzentrationen: 0,03 mM, 0,3 mM und 3 mM (n=2).

Aus Abbildung 55 ist die starke Hemmung der SGD-Aktivität durch Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) zu erkennen, schon die niedrigste Konzentration zeigt eine Hemmung von etwa 80 %. Von den anderen getesteten Substanzen zeigt nur Eisen(III)-sulfat (Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) in der höchsten eingesetzten Konzentration eine hemmende Wirkung von etwa 40%.

#### 4.3.4 HPLC- und LC-MS-Analysen der Enzymassays von Dreifachexpressionen

Zum Nachweis, der gleichzeitigen funktionellen Expression aller drei Enzyme in einem *E. coli* wurden *in vivo* Enzymassays wie unter 0 beschrieben durchgeführt und über HPLC bzw. LC-MS analysiert.

##### 4.3.4.1 HPLC Analysen von *in vivo* Assays

Um sicher zu stellen, dass die TDC, STR und SGD enzymatisch aktiv im lebenden *E. coli* vorlagen, wurden *in vivo* Enzymtests durchgeführt. Bei diesen Tests wurden die *E. coli*

3 h bei 37 °C in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) inkubiert, der entweder Tryptophan (A), Tryptophan und Secologanin (B), Tryptophan, Secologanin und Kupfersulfat (C) oder Tryptophan, Secologanin und Eisen(III)-sulfat (D) enthielt.

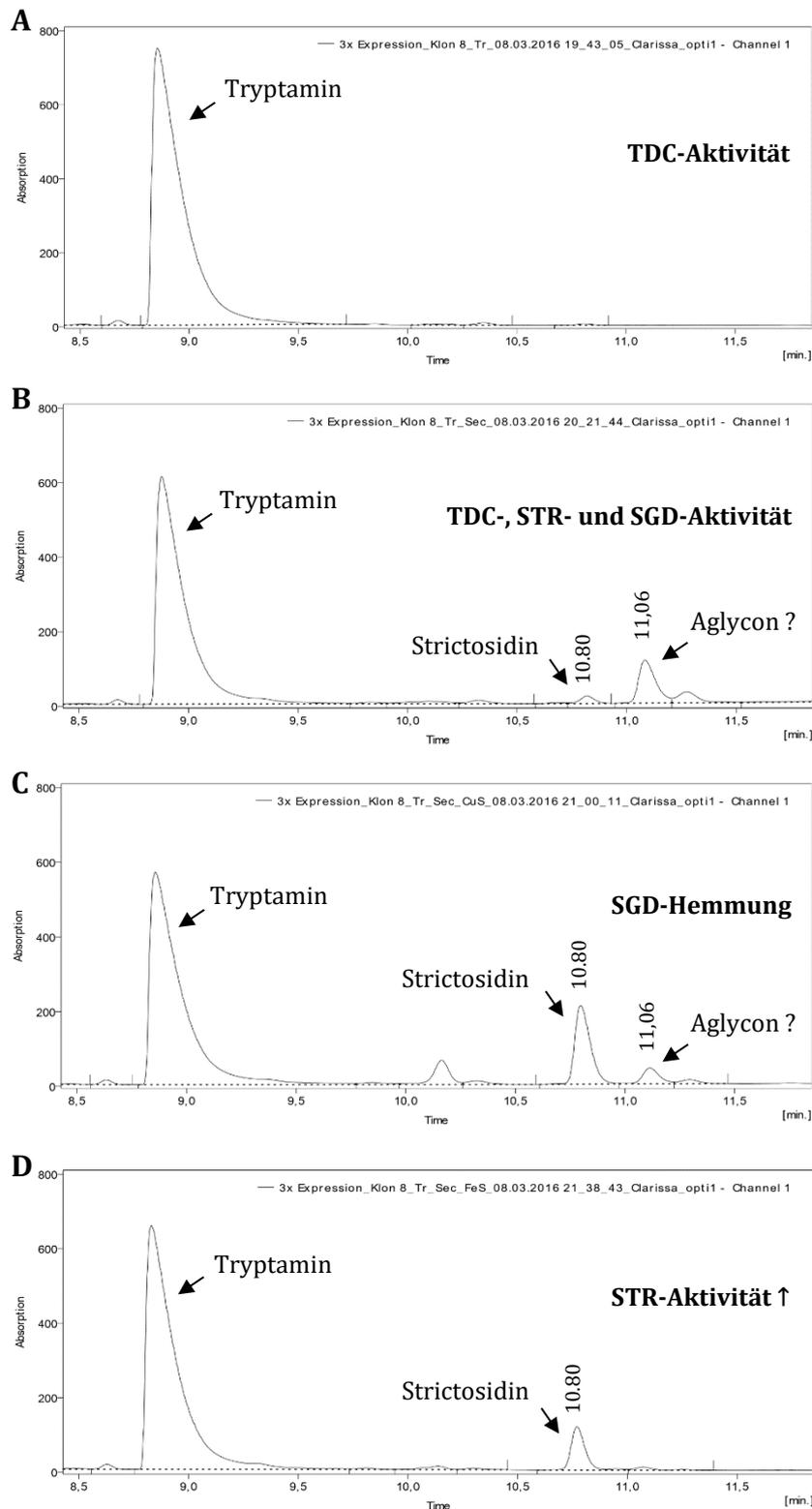
Ansatz (A) diente der alleinigen Überprüfung der TDC-Aktivität, Ansatz (B) der Überprüfung der gemeinsamen Aktivität der TDC, STR und SGD. In den Ansätzen (C) und (D) wurden zusätzlich zwei Substanzen eingesetzt, die in vorangegangenen Tests Auswirkungen auf die Enzymaktivität zeigten: 0,03 mM Kupfersulfat führten zur nahezu vollständigen Hemmung der SGD-Aktivität, zeigten jedoch geringere Auswirkung auf die Aktivität der TDC und STR. 3 mM Eisen(III)-sulfat hingegen erhöhten die Aktivität der STR, wohingegen es die Aktivität der SGD und TDC leicht hemmte. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen der unterschiedlichen Tests sind in Abbildung 56 dargestellt.

Alle vier HPLC-Chromatogramme (Abbildung 56A-D) zeigten deutliche Peaks nach einer Retentionszeit von etwa 9 min, die dem durch die TDC gebildeten Tryptamin entsprechen. Die Chromatogramme (B-D) zeigen zusätzliche Peaks nach 10,8 min, die dem durch die STR produzierten Strictosidin zugeordnet werden können. Die Peaks sowohl von Strictosidin als auch von Tryptamin zeigen je nach Ansatz unterschiedlich große Areas.

In Ansatz (A), in dem Tryptophan als einziges Substrat eingesetzt wurde, beträgt die Peak-Area von Tryptamin  $7348 \text{ mV.s} \pm 98$ . In Ansatz (B) hingegen, in dem zusätzlich Secologanin als Substrat für die STR vorlag, konnte nur noch eine Tryptamin-Area von  $5101 \text{ mV.s} \pm 319$  detektiert werden, da ein Teil des Tryptamin für die Produktion von Strictosidin verwendet wurde. Die Area des Strictosidin-Peaks beträgt hier  $94 \text{ mV.s} \pm 24$ . In Ansatz (C), in dem zusätzlich zu den beiden Substraten Tryptophan und Secologanin Kupfersulfat eingesetzt wurde, konnte mit  $5121 \text{ mV.s} \pm 401$  eine ähnliche Peak-Area für Tryptamin ermittelt werden, wie in Ansatz (B). Der Strictosidin-Peak zeigt jedoch mit  $1015 \text{ mV.s} \pm 170$  eine deutlich größere Area, da das von der STR produzierte Strictosidin nicht mehr durch die SGD umgewandelt werden konnte.

In Ansatz (D), in dem Tryptophan, Secologanin und Eisen(III)-sulfat vorlagen, zeigte der Tryptamin-Peak mit  $5702 \text{ mV.s} \pm 377$  eine etwas größere Peak-Area als in Ansatz (B) und (C), da dass Eisen(III)-sulfat weniger hemmend auf die TDC wirkt, als Kupfersulfat. Die Area des Strictosidin-Peaks hingegen ist mit  $458 \text{ mV.s} \pm 73$  deutlich kleiner als in Ansatz (C), aber im Vergleich mit Ansatz (B) sieht man eine deutliche Vergrößerung. Dies liegt daran, dass die SGD-Aktivität in Ansatz (D) durch das Eisen(III)-sulfat nicht so stark gehemmt wird, wie durch das Kupfersulfat in Ansatz (C). Zusätzlich hat man in Ansatz (D) die STR-Aktivität durch die Zugabe von Eisen(III)-sulfat erhöht.

Zusätzlich zu den Peaks von Tryptamin und Strictosidin konnte ein Peak mit einer Retentionszeit von ca. 11,06 min detektiert werden, bei dem es sich um das Strictosidin-Aglycon handeln könnte. Dieser Peak zeigt in Ansatz (B) (ohne Hemmung der SGD) eine deutlich größere Area, als in Ansatz (C) (Hemmung durch Kupfersulfat) ist jedoch in Ansatz (D) kaum noch zu detektieren.



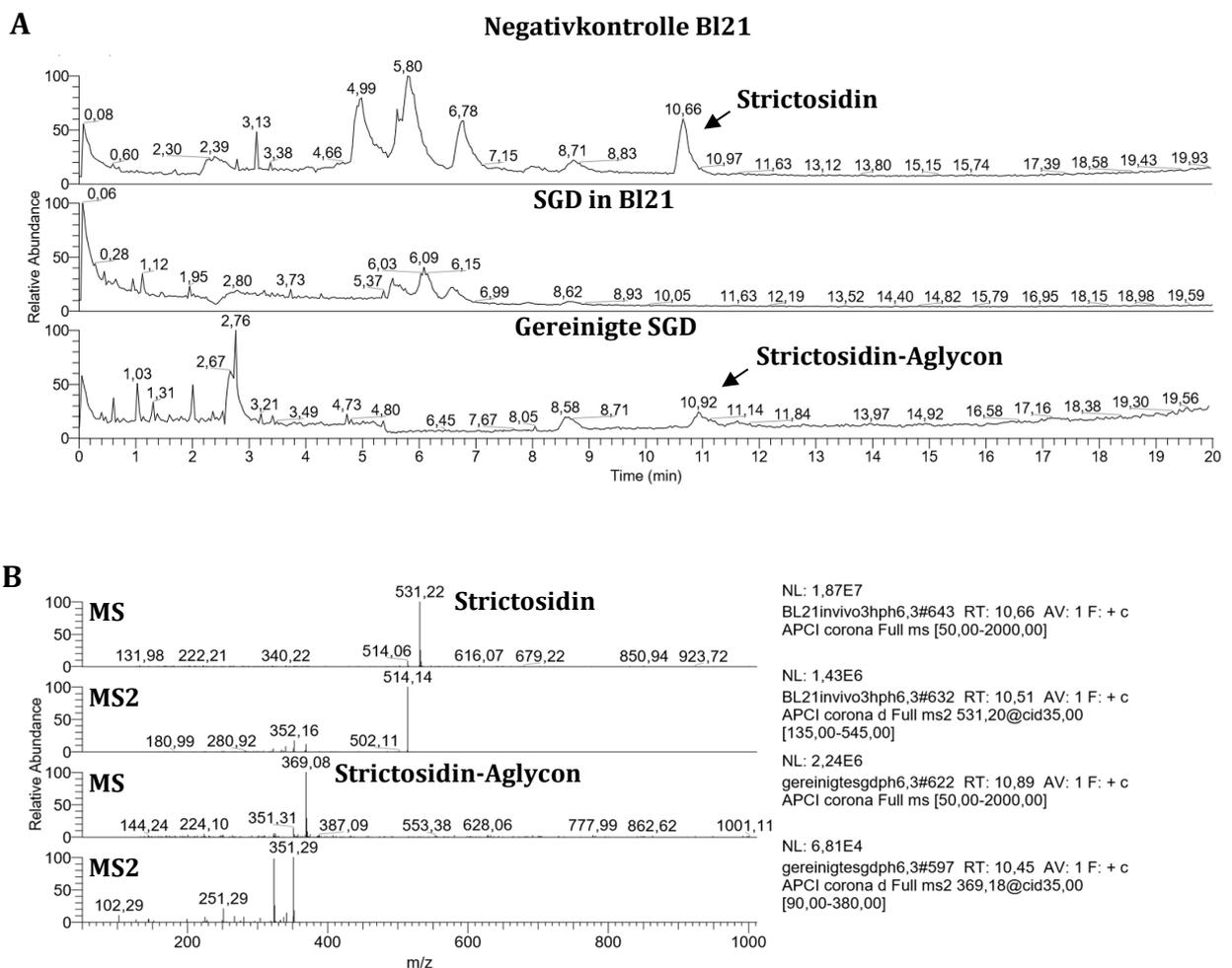
**Abbildung 56: HPLC-Chromatogramme der *in vivo* Enzymassays einer Dreifachexpression.** A: Enthält nur Tryptophan zur Überprüfung der TDC-Aktivität; B: Enthält Tryptophan und Secologanin zur Überprüfung der gemeinsamen Aktivität der TDC, STR und SGD; C: Enthält Tryptophan, Secologanin und 0,03 mM Kupfersulfat zur Hemmung der SGD-Aktivität; D: Enthält Tryptophan, Secologanin und 3 mM Eisen(III)-sulfat zur Erhöhung der STR-Aktivität.

#### 4.3.4.2 LC-MS-Analysen von *in vivo* Enzymassays

Da mit Hilfe der HPLC-Analysen keine klare Aussage über die Bildung des Strictosidin-Aglycons gemacht werden konnte, wurden zusätzlich LC-MS-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden zum einen Einzel-Enzymassays der SGD analysiert, zum anderen Enzymassays von Dreifachexpressionen.

##### 4.3.4.2.1 *In vivo* und *in vitro* Enzymassays der SGD

Da die enzymatische Aktivität der SGD bisher nur über die Abnahme ihres Substrates Strictosidin nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Versuche zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität der SGD durchgeführt. Zum einen wurden *in vivo* Enzymassays in *E. coli* BL21 durchgeführt, zum anderen Enzymassays mit der gereinigten Glukosidase. Bei beiden Assays wurde die SGD mit Strictosidin in Puffer (pH 6,3) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend der Reaktionsansatz über LC-MS analysiert. Die Ergebnisse der Analysen können Abbildung 57 entnommen werden.



**Abbildung 57: LC-MS-Analysen verschiedener Enzymtests der SGD. A:** Chromatogramme von zwei *in vivo* Enzymassays (BL21 ohne SGD und BL21 mit SGD) und einem Enzymassay mit gereinigter SGD. **B:** MS- und MS2-Daten ausgesuchter Massen-Peaks. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2=Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

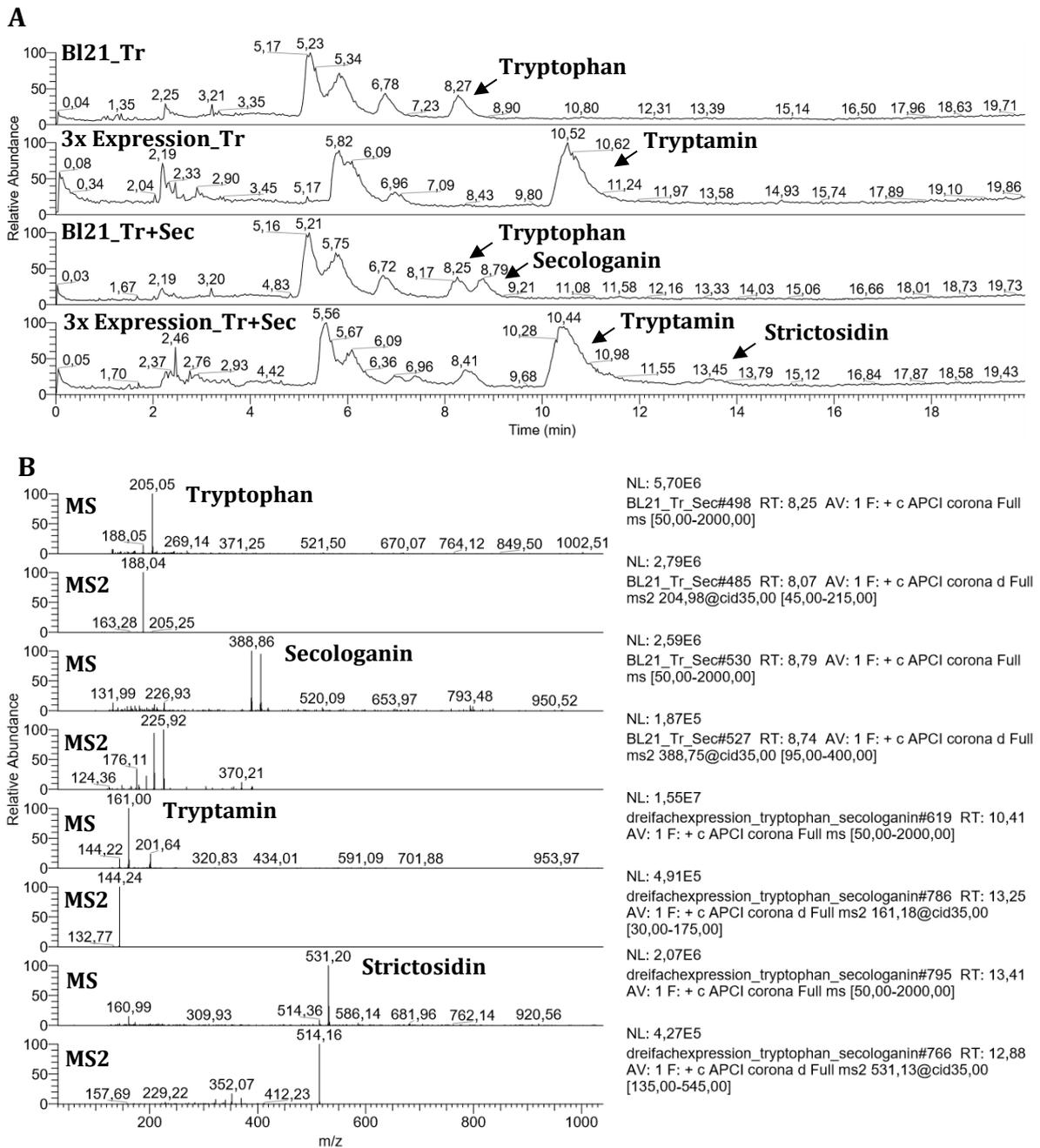
Die MS-Daten der Negativkontrolle mit Bl21 ohne SGD zeigten einen deutlichen Peak nach 10,66 min mit einer Masse von 531 (m/z), der das einfach protonierte Strictosidin (M+H)<sup>+</sup> darstellt. Dieser Massenpeak zeigt im MS2 das für Strictosidin typische Fragmentierungsmuster. Der *in vivo* Ansatz mit SGD zeigt im MS keinen Peak zu diesem Zeitpunkt, jedoch taucht auch kein neuer Peak mit einer für das Strictosidin-Aglycon beschriebenen Masse auf. Der Ansatz mit der gereinigten SGD zeigt ebenfalls keinen Peak mit der Masse von Strictosidin aber es konnte ein Peak nach einer Retentionszeit von 10,92 min detektiert werden. Dieser Peak besitzt eine Masse von 369 (m/z) und konnte dem Strictosidin-Aglycon (Dialdehyd) zugeordnet werden

#### 4.3.4.2.2 *In vivo* Enzymassays von Dreifachexpressionen

Neben den Einzel-Enzymassays der SGD wurden auch *in vivo* Enzymassays von Dreifachexpressionen über LC-MS analysiert. Als Substrat wurde nur Tryptophan bzw. Tryptophan und Secologanin eingesetzt. Um einen Einfluß von *E. coli* auf den Enzymassay auszuschließen, wurden Kontrollen nur mit Bl21 durchgeführt. Die Ergebnisse der LC-MS Analysen sind in Abbildung 58 dargestellt.

Die LC-MS Daten zeigen einen deutlichen Peak nach 8,27 min in der Negativkontrolle mit Bl21 und Tryptophan (Abbildung 58 A) mit einer Masse von 205 (m/z), was der Masse von einfach protoniertem Tryptophan (M+H)<sup>+</sup> entspricht. Dieser Massenpeak ist in der Probe der Dreifachexpression mit Tryptophan kaum noch zu detektieren. Hier tritt ein neuer Peak nach 10,52 min auf, mit einer Masse von 161 (m/z), was der Masse von einfach protoniertem Tryptamin (M+H)<sup>+</sup> entspricht. Das MS2 dieses Massenpeaks zeigt darüber hinaus das für Tryptamin typische Fragmentierungsmuster (Abbildung 58B).

Die Daten der Negativkontrolle mit Bl21 und Tryptophan + Secologanin zeigen neben dem schon in der Negativkontrolle mit Bl21 und Tryptophan beschriebenen Peak des Tryptophan einen zusätzlichen Peak nach 8,97 min mit einer Masse von 389 (m/z), was der Masse von einfach protoniertem Secologanin (M+H)<sup>+</sup> entspricht. In der Probe der Dreifachexpression mit Tryptophan + Secologanin kann zusätzlich zum Tryptaminpeak ein Peak nach 13,45 min detektiert werden, der eine Masse von 531 (m/z) besitzt, was der Masse von einfach protoniertem Strictosidin (M+H)<sup>+</sup> entspricht. Das MS2 dieses Massenpeaks zeigt das für Strictosidin typische Fragmentierungsmuster. Ein Massenpeak, der dem Strictosidin-Aglycon zugeordnet werden könnte, wurde nicht detektiert.

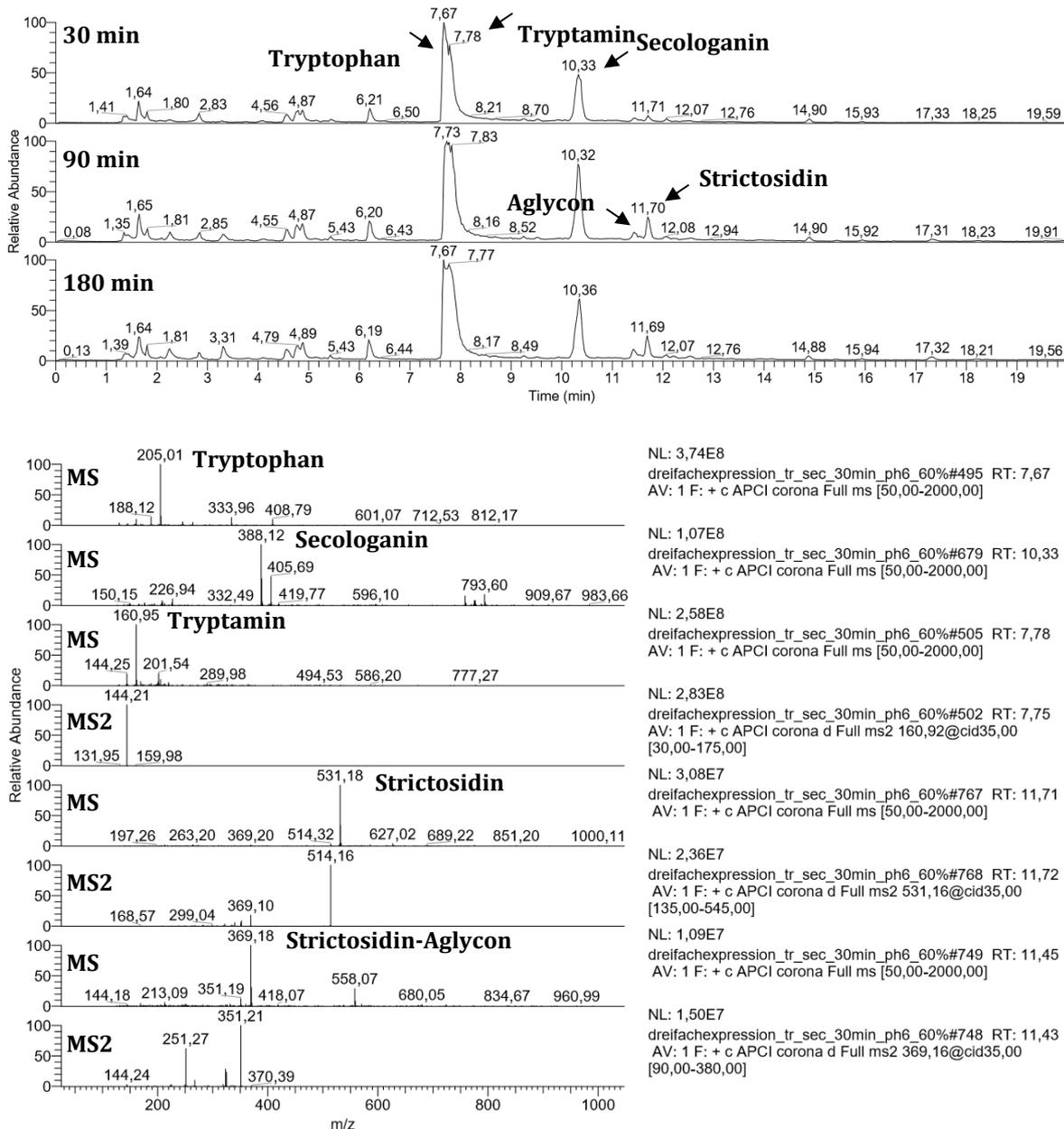


**Abbildung 58: LC-MS-Analysen von *in vivo* Enzymassays einer Dreifachexpression.** Als Substrat wurde einmal nur Tryptophan (Tr) eingesetzt, einmal Tryptophan und Secologanin (Tr+Sec). Bei diesem Versuch wurden zusätzlich Kontrollen mit BL21 ohne Insert durchgeführt, um einen Einfluß von *E. coli* auf den Enzymassay auszuschließen. **A:** LC-MS-Chromatogramme der Enzymassays, **B:** MS- und MS2-Daten ausgesuchter Massen-Peaks. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2=Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

#### 4.3.4.2.3 Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Detektion des Strictosidin-Aglycons bei *in vivo* Enzymassays

Da das instabile Strictosidin-Aglycon unter den bisherigen Bedingungen der *in vivo* Enzymassays nicht detektiert werden konnte, wurde versucht bessere Bedingungen für die Detektion zu schaffen. Zum einen wurde die Inkubationstemperatur von 37 °C auf 28 °C erniedrigt, um die Umwandlung des Aglycons zu verlangsamen, zum anderen

wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 30 min, 90 min, 180 min) der drei stündigen Inkubation Proben genommen. Darüber hinaus wurde anstelle des vorher verwendeten Lösungsmittelgradienten von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril, ein flacherer Gradient von 100 % Wasser zu 60 % Acetonitril verwendet, der eine bessere Auftrennung ermöglichen sollte. Die LC-MS-Analysen dieser Proben sind in Abbildung 59 dargestellt.

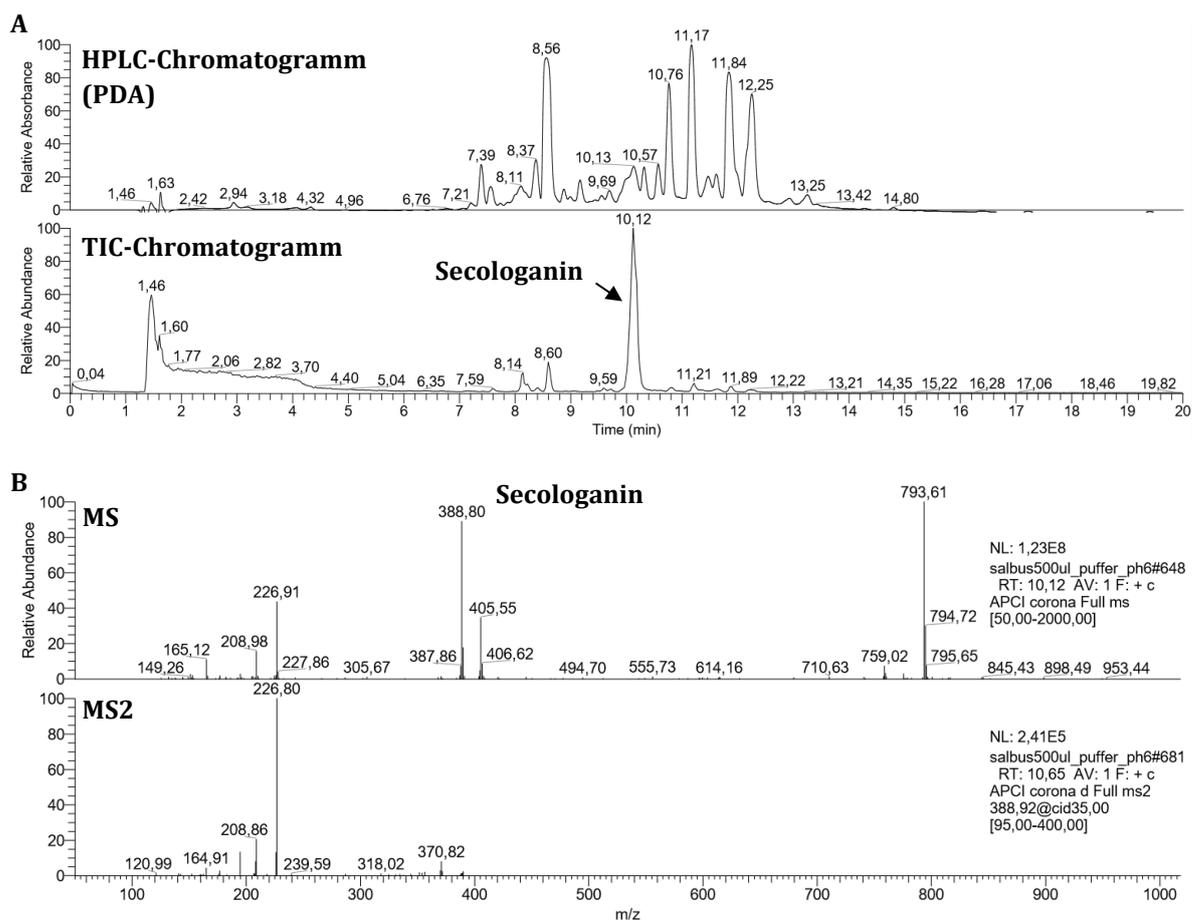


**Abbildung 59: LC-MS-Analysen zum Nachweis des Strictosidin-Aglycons in optimierten *in vivo* Enzymassays einer Dreifachexpression.** Die Inkubationstemperatur wurde auf 28 °C erniedrigt, um die Umwandlung des Aglycons zu verlangsamen. Die Messungen wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (30 min, 90 min, 180 min) durchgeführt. Darüber hinaus wurde anstelle des zuvor verwendeten Lösungsmittelgradienten von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril ein flacherer Gradient von 100 % Wasser zu 60 % Acetonitril verwendet. **A:** LC-MS-Chromatogramme der Enzymassays nach einer Inkubation von 30 min, 90 min und 180 min; **B:** MS- und MS2-Daten ausgesuchter Massen-Peaks. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2=Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

Nach 30 min konnten hauptsächlich die Peaks der Substrate Tryptophan (7,67 min) und Secologanin (10,33 min) detektiert werden, mit Massen von 205 (M+H)<sup>+</sup> bzw 189 (M+H)<sup>+</sup>. Darüber hinaus konnte Tryptamin (7,78 min), das enzymatische Produkt der TDC, mit einer Masse von 161 (M+H)<sup>+</sup> nachgewiesen werden. Da Tryptophan und Tryptamin nahezu zeitgleich von der Säule eluierten, konnte nur anhand der Massen unterschieden werden, ob es sich um das Substrat oder das Produkt der TDC handelte. Strictosidin (11,71 min) war zu diesem Zeitpunkt nur in Spuren detektierbar. Nach 90 min Inkubation konnte ein deutlicher Strictosidin-Peak nach 11,70 min detektiert werden, mit einer Masse von 531 (M+H)<sup>+</sup> sowie ein Peak des Strictosidin-Aglycons von 369 (M+H)<sup>+</sup>, das kurz vor Strictosidin von der Säule eluierte. Eine Längere Inkubation von 180 min zeigt keine Veränderung im Vergleich zur 90 min Inkubation.

#### 4.3.4.2.4 *Symphoricarpos albus* als Secologanin Quelle

Neben den zuvor beschriebenen Enzymassays, bei denen die Substrate Tryptophan und Secologanin in Reinform verwendet wurden, wurden auch Tests mit einem Methanol-Extrakt aus *S. albus* Beeren (Abbildung 60) durchgeführt.

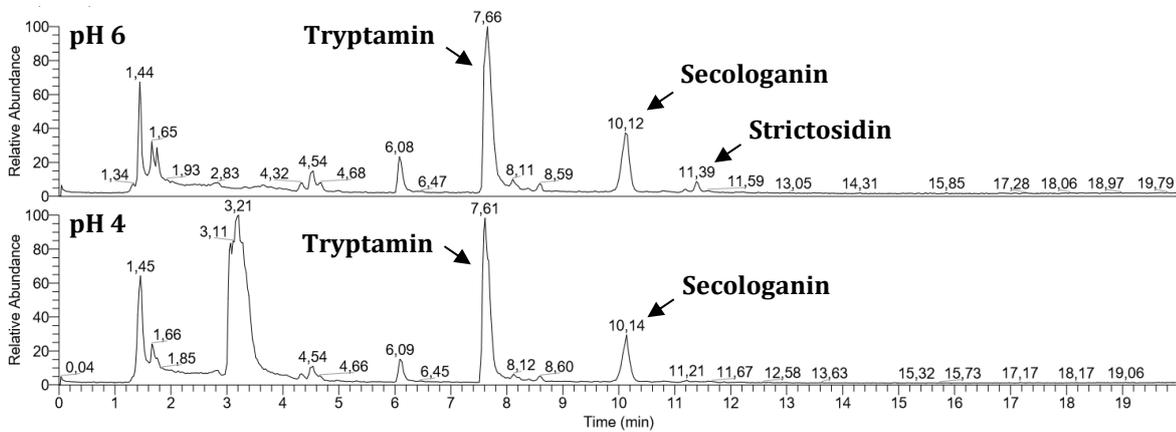


**Abbildung 60: LC-MS-Analyse eines Methanol-Extrakts aus *S. albus* Beeren und dem darin enthaltenen Secologanin. A: LC-MS-Chromatogramme des Extrakts. PDA= Photodiodenarray, TIC= Totaler Ionenfluss; B: MS- und MS2-Daten des Secologaninpeaks. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2=Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.**

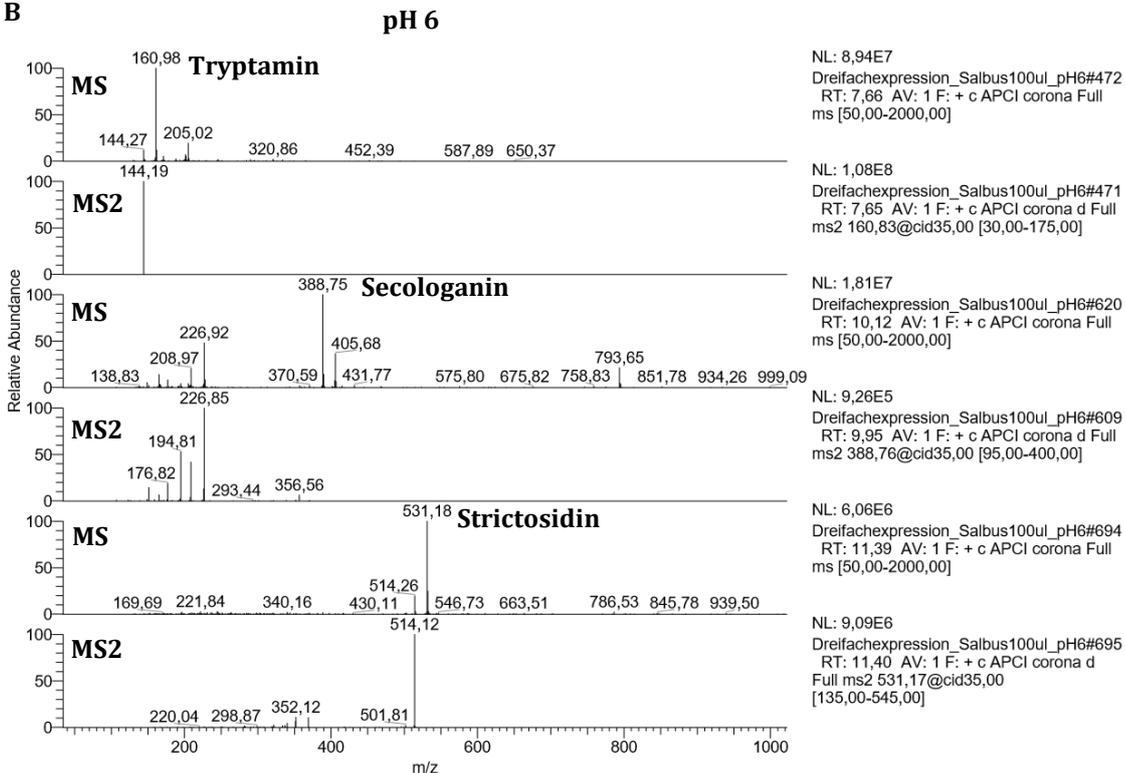
Hierbei sollte untersucht werden, ob die in diesem Extrakt enthaltene Menge an Secologanin als Substrat für die STR dienen kann. Der *S. albus* Extrakt zeigte im LC-MS einen deutlichen Massen-Peak nach 10,12 min mit einer Hauptmasse von 389 (m/z). Dieser Peak zeigt im MS2 das typische Fragmentierungsmuster von Secologanin.

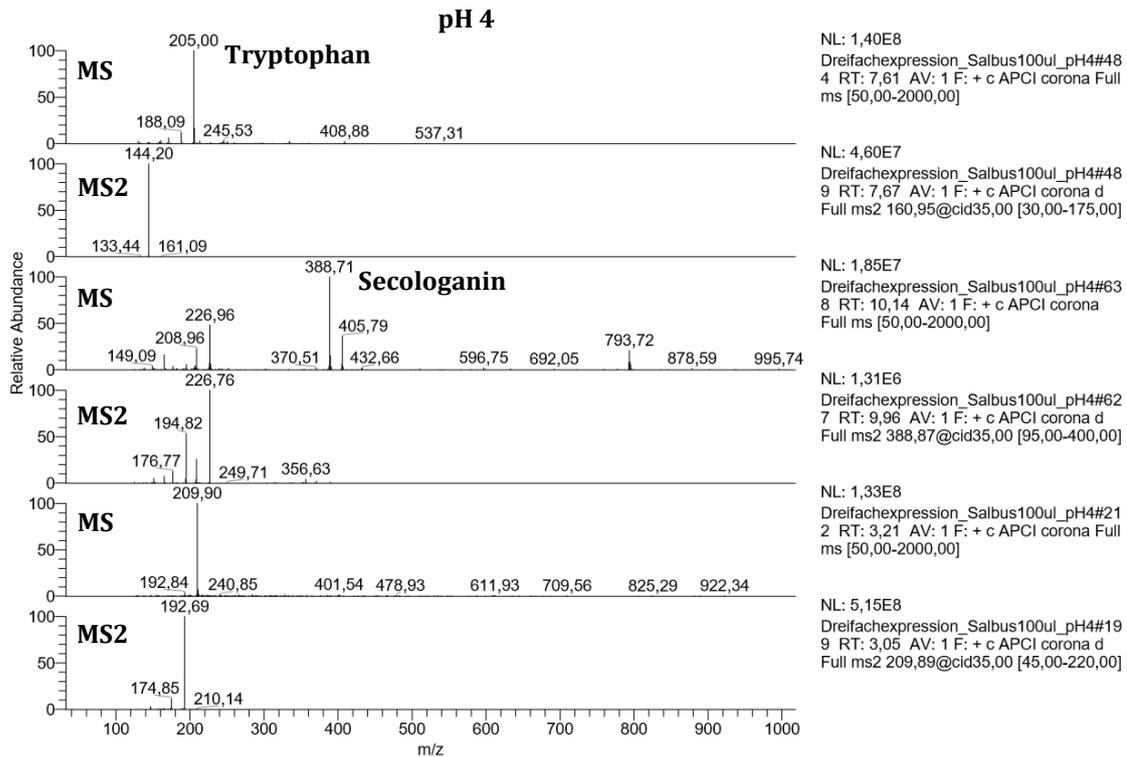
Mit dem *S. albus* Extrakt wurden *in vivo* Enzymassays wie unter 0 beschrieben durchgeführt. Anstelle des reinen Secologanin wurden 100 µL des Methanol-Extrakts aus *S. albus* in den Enzymassay eingesetzt. Nach drei-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde der Ansatz auf die Bildung von Tryptamin und Strictosidin hin über LC-MS untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Enzymtest, der bei pH 4 durchgeführt wurde. In diesem pH-Bereich sollte keine enzymatische Aktivität der drei untersuchten Enzyme vorliegen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt.

A



B





**Abbildung 61: LC-MS-Analyse von *in vivo* Enzymassays einer Dreifachexpression bei denen das Substrat Secologanin durch einen methanolischen Extrakt aus *S. albus* Beeren ersetzt wurde.** Der Enzymtest wurde einmal in einem pH-Bereich durchgeführt, in dem alle drei getesteten Enzyme aktiv sind (pH 6) und einmal in einem Bereich, wo keines der Enzyme Aktivität zeigt (pH 4). Es wurden 100  $\mu$ l des *S. albus* Extrakts eingesetzt, sowie 500  $\mu$ M Tryptophan als Substrat für die TDC. **A:** LC-MS-Chromatogramm, **B:** MS- und MS2-Daten ausgesuchter Massen-Peaks. MS=Masse des untersuchten Moleküls, MS2= Charakteristischer Zerfall des untersuchten Moleküls in Fragmente.

Die LC-MS-Daten des bei pH 6 durchgeführten Enzymtests zeigen einen deutlichen Peak nach einer Retentionszeit von 7,66 min, der eine Masse von 161 (m/z) besitzt, was der Masse von einfach protoniertem Tryptamin ( $M+H^+$ )<sup>+</sup> entspricht. Das MS2 dieses Massenpeaks zeigt darüber hinaus das für Tryptamin typische Fragmentierungsmuster. Neben dem Tryptaminpeak ist ein weiterer deutlicher Peak mit einer Retentionszeit von 10,12 min zu erkennen, der eine Hauptmasse von 389 (m/z) zeigt. Das MS2 des Peaks zeigt das typische Fragmentierungsmuster von Secologanin. Nach einer Retentionszeit von 11,39 min konnte ein weiterer kleiner Peak mit der Masse von einfach protoniertem Strictosidin (531 (m/z)) detektiert werden, der im MS2 das für Strictosidin typische Fragmentierungsmuster zeigt. Die LC-MS-Daten des bei pH 4 durchgeführten Enzymtests zeigen ähnlich wie bei pH 6 einen deutlichen Peak nach einer Retentionszeit von 7,61 min. Dieser Peak zeigt jedoch eine Masse von 205 (m/z) was der Masse von einfach protoniertem Tryptophan entspricht und auch die MS2-Daten dieses Massenpeaks zeigt das typische Fragmentierungsmuster von Tryptophan. Ein weiterer Peak mit einer Retentionszeit von 12,14 min zeigt die schon bei pH 6 beobachtete Masse von einfach protoniertem Secologanin (389 (m/z)), sowie den entsprechenden Zerfall. Anders als bei pH 6 konnte in diesem Ansatz kaum Strictosidin detektiert werden. Als weiteren Unterschied zeigt das Chromatogramm einen ausgeprägten Peak nach einer Retentionszeit von 3,21 min, dessen Masse (210 (m/z)) und Fragmentierungsmuster keiner der bisher detektierten Substanzen zugeordnet werden kann.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein System zur Co-Expression von drei Schlüsselgenen der *C. roseus* Monoterpenindolalkaloid Biosynthese entwickelt, das die gleichzeitige funktionelle Expression der TDC, STR und SGD in *E. coli* ermöglicht. Um dies zu erreichen, wurden zunächst verschiedene Vektorkonstrukte zur Einzelexpression der drei Gene hergestellt und deren Expression optimiert (Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen, Inkubation nach Induktion bei unterschiedlichen Temperaturen). Die Enzyme wurden anschließend gereinigt, charakterisiert (hinsichtlich pH- und Temperaturoptima, Km und Vmax, Hemmstoffe und Aktivatoren) und die besten Bedingungen für die spätere Co-Expression ermittelt. Die Co-Expression der drei Gene erfolgte durch die Herstellung von Doppeltransformanten, die zum einen den Vektor pET45b(+)\_TDC\_N-His und zum anderen den Vektor pCDFDuet1\_SGD\_STR enthielten. Der Erfolg der Expression aller drei Gene wurde über SDS-PAGE, die Funktionalität der gebildeten Enzyme über *in vivo* Enzymassays und anschließendem Nachweis der Edukte bzw. Produkte über HPLC und LC-MS überprüft. Erste Versuche im Rahmen dieser Arbeit, die Co-Expression in *P. pastoris* zu realisieren, zeigten nur geringe Erfolge, weshalb dieses System zu Gunsten des *E. coli* Systems verworfen wurde. Zusätzlich zu den Klonierungs- und Expressionsarbeiten wurde ein säulenbasiertes System zur *in vitro* Produktion von Strictosidin mittels rekombinanter STR etabliert.

### 5.1 Herstellung der Expressionskonstrukte, Expressionsoptimierung, Protein- ausbeuten und Enzymcharakterisierung

Zur Expression der *C. roseus*-Gene in *P. pastoris* und *E. coli* wurden diese in induzierbare Vektoren kloniert, die durch Variation der Induktorkonzentration eine Regulation der Genexpression ermöglichten. Darüber hinaus erlaubten sie über ihre multiplen Klonierungsstellen mit integrierten Tag-Sequenzen die Herstellung von His-Tag Proteinen für die spätere Reinigung über Nickelaffinitätschromatographie.

#### 5.1.1 Tryptophandecarboxylase (TDC)

Für die Expression in *P. pastoris* wurde das TDC-Gen (Gen Bank: M25151) über PCR mit C-terminalem His-Tag vom Vektor pPIC9\_TDC (Krüger, 2011) amplifiziert und in den Vektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Für die Expression in *E. coli* wurde das TDC-Gen ebenfalls mittels PCR vom Vektor pPIC9\_TDC amplifiziert und anschließend mit N-terminalem His-Tag in den Vektor pET45b(+) kloniert. Die zur Überprüfung der Gensequenz durchgeführten Sequenzierungen zeigten sowohl für das *P. pastoris*, als auch das *E. coli* Konstrukt eine Punktmutation an Position 433 im TDC-Gen, die zu einem frühzeitigen Stopp-Codon führte. Nach Entfernung dieser Mutation durch Oligonukleotid vermittelte Mutagenese konnte die TDC trotz vielfältiger Optimierungsversuche nur in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden, weshalb die *P. pastoris* Arbeiten mit der TDC zu diesem Zeitpunkt eingestellt und alle weiteren Versuche im *E. coli*-System durchgeführt wurden.

Hier zeigte die TDC nach Expression bei 37 °C und Analyse des Gesamtproteins eine Bande von etwa 60 kDa im SDS-Gel (siehe 4.2.2.1). Diese Masse entspricht in etwa der von Noè et al. beschriebenen Masse von 55 kDa für eine Untereinheit des dimeren Enzyms (Noe et al., 1984). Die etwas größere Masse lässt sich durch die Art der Klonierung erklären. Durch die gewählten Schnittstellen entstand ein 96 Bp langer Linker (~3,5 kDa) zwischen dem His-Tag (~1 kDa) und dem TDC-Gen.

Nach Reinigung des löslichen Proteins über Nickelaffinitätschromatographie konnten zunächst nur schwache Banden der TDC im SDS-Gel detektiert werden, da der Großteil des Proteins in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* im Zellpellet vorlag. Laut Rosano und Ceccarelli kann ein Herabsetzen der Expressionsrate durch niedrigere Expressionstemperaturen und/oder geringere Mengen an IPTG zu einer vermehrten Produktion an korrekt gefaltetem, löslichem Protein führen (Rosano und Ceccarelli, 2014). Durch Erniedrigung der Expressionstemperatur von 37 °C auf 22 °C und der IPTG-Konzentration von 0,2 mM auf 0,01 mM konnte die Ausbeute an löslicher TDC deutlich gesteigert werden. Die Menge an gereinigter TDC aus 1 L Kultur betrug  $0,96 \text{ mg} \pm 0,067 \text{ mg}$ . Es konnten keine Vergleichswerte zur Ausbeute an rekombinant in *E. coli* hergestellter TDC in der Literatur gefunden werden, aber diese Menge an gereinigtem rekombinantem Protein entspricht, mit einer Ausnahme, den in dieser Arbeitsgruppe üblichen Mengen für Expressionen in *E. coli* BL21(DE3): 1 mg/L Ranalexin (Aleinein et al., 2013), 3 mg/L Snakin2 (Herbel et al., 2015), 50 mg/L Ib-AMP4 (Fan et al., 2013).

Da es sich bei der TDC aus *C. roseus*, wie auch bei vielen anderen bisher untersuchten aromatischen L-Aminosäure-Decarboxylasen, um ein Pyridoxalphosphat abhängiges Enzym handelt (Kumar, 2016), wurde zunächst der Einfluss verschiedener Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$ ) dieses Kofaktors auf die TDC-Aktivität untersucht. Die Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$  Pyridoxalphosphat führte, im Vergleich zur Probe ohne Kofaktorzugabe (0  $\mu\text{M}$ ), zu einer deutlichen Steigerung der Tryptaminausbeute um etwa 50 %. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  Pyridoxalphosphat zu einer Erniedrigung der Tryptaminausbeute um 50 %. Der Einfluss von Pyridoxalphosphat auf die *C. roseus* TDC-Aktivität wurde das erste Mal 1984 von Noè et al. publiziert. Die Zugabe von Pyridoxalphosphat zu einer aus *C. roseus* isolierten TDC, führte hier, abhängig von ihrer Reinheit, zu einer 2 - 3 fachen Steigerung der Aktivität (Noe et al., 1984). Es wurden jedoch keine Angaben zu den eingesetzten Pyridoxalphosphat-Konzentrationen gemacht. Auch für die TDC aus *Vinca minor* wurde ein Einfluss von Pyridoxalphosphat auf die Enzymaktivität beschrieben. Molchan et al. behandelten Kalluskulturen von *Vinca minor* mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kofaktors (0,25 mM - 2 mM) und beobachteten eine deutliche Steigerung der TDC-Aktivität bei Zugabe von 1 mM Pyridoxalphosphat, gegenüber den niedrigeren Konzentrationen. Höhere Konzentrationen >1 mM führten auch hier zu einer Abnahme der TDC-Aktivität (Molchan et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse wurden für eine rekombinant in *E. coli* exprimierte TDC aus Reis berichtet. Das über einen C-terminalen His-Tag gereinigte Enzym zeigte nach Zugabe von 0,1 mM Pyridoxalphosphat eine etwa 9-fach höhere Aktivität als ohne Zugabe des Kofaktors (Park et al., 2008).

Neben dem Einfluss des Kofaktors wurde auch der Einfluss verschiedener anderer Substanzen auf die Enzymaktivität der TDC untersucht. Darunter Chelatoren wie EDTA und DIECA, das Reduktionsmittel DTT, sowie verschiedene Kationen. Von den untersuchten Substanzen zeigte nur Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) eine deutliche Hemmung der TDC-Aktivität, besonders in den beiden höheren getesteten Konzentrationen (0,3 mM und 3 mM). Hier war eine Abnahme der TDC Aktivität auf etwa 20 % zu erkennen. Eisen(III)-sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) und Eisen(II)-chlorid ( $\text{FeCl}_2$ ) zeigten in der höchsten eingesetzten Konzentration eine leichte Hemmung der TDC-Aktivität auf etwa 80 % wohingegen Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ) eine leichte Erhöhung der Aktivität auf bis zu 140 % (3 mM) zeigte.

Zur weiteren Charakterisierung der TDC wurden die Temperatur- und pH-Bedingungen ermittelt, unter denen das Enzym die höchste Aktivität zeigte. Hierzu wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 60 °C getestet sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 10. Die Tests ergaben ein Temperaturoptimum der TDC im Bereich von 30 °C - 40 °C sowie ein pH-Optimum von pH 8. Noè et al. berichteten für die TDC aus *C. roseus* ein pH-Optimum von pH 8,5 (Noe et al., 1984). Für die TDC aus *Vinca minor* wurden mit einem Temperaturoptimum von 35 °C und einem pH-Optimum von pH 6,5 - pH 7,5 vergleichbare Werte publiziert (Molchan et al., 2012). Diese Werte stimmen in etwa mit den in der Pflanzenzelle herrschenden Bedingungen überein, wo die TDC im Cytosol (~pH 7,2) lokalisiert ist.

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen für die TDC-Aktivität wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  der TDC für das Substrat Tryptophan bestimmt. Der für Tryptophan ermittelte  $K_m$ -Wert lag mit  $122 \mu\text{M} \pm 29 \mu\text{M}$  im Bereich der bisher für die TDC publizierten  $K_m$ -Werte. Noè et al. publizierten einen etwas geringeren  $K_m$ -Wert von  $75 \mu\text{M}$  für eine aus *C. roseus* isolierte TDC (Noe et al., 1984), wohingegen der von Torrens-Spence et al. beschriebene  $K_m$ -Wert von  $120 \mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$  für eine heterolog in *E. coli* exprimierte *C. roseus* TDC (Torrens-Spence et al., 2013) im gleichen Bereich wie der in dieser Arbeit ermittelte  $K_m$ -Wert liegt. Für eine TDC aus *Vinca minor* wurde ein deutlich höherer  $K_m$ -Wert von  $1300 \mu\text{M}$  publiziert, was für eine geringere Affinität dieser TDC für ihr Substrat Tryptophan spricht (Molchan et al., 2012). Der in dieser Arbeit ermittelte  $V_{max}$ -Wert ließ sich aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen, unter denen die Experimente durchgeführt wurden, nicht mit den Literaturdaten vergleichen.

### 5.1.2 Strictosidinsynthase (STR)

Für die Expression in *P. pastoris* wurde das STR-Gen aus *C. roseus* (Gen Bank: X53602) über PCR mit C-terminalem His-Tag vom Vektor pPIC9\_Cat1 (Uebbing, 2009) amplifiziert und erneut in den Vektor pPIC9 sowie in den Vektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Nach Analyse des Expressionsmediums und der Pellets zeigte nur das Konstrukt im Vektor pPICZ $\alpha$ A schwache STR-spezifische Banden im Westernblot (4.2.1.1), nicht aber nach Coomassie- oder Silberfärbung.

Die Funktionalität der in *P. pastoris* mit diesem Vektorkonstrukt hergestellten STR wurde über einen Aktivitätstest mit dem Expressionsmedium und anschließendem Nachweis des enzymatischen Produkts Strictosidin über HPLC überprüft. Als Negativkontrolle wurde hitzeinaktiviertes Enzym verwendet. Strictosidin konnte hierbei nur in der Probe mit aktivem Enzym detektiert werden, nicht aber in der Probe mit hitzeinaktivierter STR.

Da sich die produzierte STR weder durch Ammoniumsulfatfällung und anschließender Nickelaffinitätschromatographie noch durch direkte Reinigung über eine Nickelsäule aus dem *Pichia*-Medium aufreinigen ließ, wurden die Arbeiten mit dem *P. pastoris* System an dieser Stelle eingestellt und alle weiteren Arbeiten zur STR mit dem *E. coli* System durchgeführt.

Für die Expression in *E. coli* wurde das STR-Gen zunächst ebenfalls über PCR vom Vektor pPIC9\_Cat1 amplifiziert und mit einem N-terminalen His-Tag in den Vektor pET45b(+) kloniert. Da dieses Konstrukt, das die original Gensequenz aus *C. roseus* enthielt, nach Expression bei 37 °C und Analyse des Gesamtproteins keine Bande im SDS-Gel zeigte (4.2.2.1), wurde ein für *E. coli* Codon-optimiertes STR-Gen bei der Firma GenScript HK Limited in Auftrag gegeben. Dieses Codon-optimierte Gen wurde ohne die in *E. coli* nutzlose N-terminale Signalsequenz für den Transport der STR in die Vakuole synthetisiert. Im Hinblick auf die später geplante Co-Expression wurde die STR zusammen mit der SGD im Vektor pCDFDuet1 in Auftrag gegeben, der durch seine zwei multiplen Klonierungsstellen die gleichzeitige Expression der beiden Gene ermöglicht. Um die beiden Enzyme getrennt voneinander zu reinigen, wurde die SGD mit einem N-terminalen His-Tag kloniert, die STR mit einem C-terminalen S-Tag. Zur Analyse der Einzeldexpression der STR wurde der Vektor so konstruiert, dass das SGD-Gen durch Restriktion mit nur einem Restriktionsenzym aus dem Vektor entfernt werden konnte.

Da die erfolgreiche lösliche Expression eines Proteins in *E. coli* von unterschiedlichsten Faktoren abhängen kann, wie z. B. der Art des angefügten Tags oder der Kopienzahl des Vektors (Graslund et al., 2008, Rosano und Ceccarelli, 2014), wurden verschiedene Konstrukte der STR hergestellt, bei denen diese Faktoren variiert wurden. Der C-terminale S-Tag des Konstrukts in pCDFDuet1 wurde über Oligonukleotid vermittelte Mutagenese durch einen His-Tag ersetzt und zusätzlich ein weiteres Konstrukt hergestellt, das neben diesem C-terminalen His-Tag einen zweiten His-tag am N-Terminus besitzt. Ein zweiter His-Tag kann sowohl die Stabilität des Enzyms, als auch die Bindung an die Nickelsäule verbessern (Yang et al., 2010). Um den Einfluss der Kopienzahl auf die STR-Expression zu untersuchen, wurde das Codon-optimierte STR-Gen mit N- und C-terminalen His-Tag in den Vektor pET45b(+) kloniert, der anstelle des in pCDFDuet1 vorliegenden Replikationsursprungs (CloDF13) den Replikationsursprung (ColE1) besitzt. Da einige heterolog in *E. coli* exprimierte Proteine eine verbesserte Löslichkeit aufweisen, wenn sie mit einem N-terminalen Thioredoxin-Tag exprimiert werden (LaVallie et al., 1993), wurde die STR darüber hinaus in den Vektor pET32c(+) kloniert, der das Anfügen eines N-terminalen Thioredoxin-Tags ermöglicht. Die Funktionalität aller hergestellten STR-Konstrukte wurde zunächst über Expression bei 37 °C und

Analyse des Gesamtproteins über SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Hierbei zeigten alle Konstrukte die für die STR plus jeweiligem Tag erwarteten Banden (4.2.2.1).

Da die STR, wie schon von Roessner et al. publiziert, in *E. coli* fast ausschließlich in Form von *Inclusion Bodies* produziert wird (Roessner et al., 1992), wurde versucht, die Expressionsrate des rekombinanten Proteins zu verringern. Um das zu erreichen wurde zum einen die zur Induktion der Expression verwendete IPTG-Konzentration von 0,1 mM auf 0,01 mM reduziert, zum anderen die Inkubations-Temperatur von 37 °C auf 28 °C und 20 °C herabgesetzt. Zur Analyse der Expressionsoptimierung wurden *in vivo* Enzymassays mit allen Konstrukten durchgeführt und über HPLC auf die Bildung von Strictosidin hin untersucht. Es zeigte sich, dass eine geringere Konzentration (0,01 mM IPTG) im Vergleich zur höheren Konzentration (0,1 mM) bei allen Konstrukten zu einer deutlich höheren STR-Aktivität führte. Eine zusätzliche Erniedrigung der Temperatur nach erfolgter Induktion führte zu einer weiteren Steigerung der STR-Aktivität. Die höchsten Ausbeuten an Strictosidin wurden bei einer IPTG-Konzentration von 0,01 mM und einer Temperatur von 20 °C erreicht.

Bei separater Betrachtung der hergestellten STR-Konstrukte sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Das Konstrukt mit Thioredoxin-Tag zeigte im *in vivo* Assay kaum Aktivität, was daran liegen könnte, dass der Thioredoxin-Tag aufgrund seiner Größe (109 AS) die Faltung des Proteins beeinträchtigt. Da der Großteil der STR aber auch mit diesem Tag in Form von *Inclusion Bodies* produziert wurde (Daten nicht gezeigt), wurde dieses Konstrukt für die weiteren Arbeiten (Reinigung, Charakterisierung) nicht mehr in Betracht gezogen. Die drei Konstrukte im Vektor pCDFDuet1 führten vor allem nach Induktion mit 0,01 mM IPTG zu einer deutlich höheren Ausbeute an Strictosidin, als das Konstrukt in pET45b(+), was an der geringeren Kopienzahl des pCDF-Replikationsursprungs (20 - 40 Kopien vs. ~40 Kopien) liegen könnte. Sollte das der Fall sein, könnte die Expression von löslicher, aktiver STR in einem Vektor mit noch geringerer Kopienzahl (z. B. pACYCDuet: P15A-Replikon, 10 - 12 Kopien) weiter gesteigert werden. Von den Konstrukten in pCDFDuet1 zeigte das STR-Konstrukt mit C-terminalem His-Tag eine etwa 20 % höhere Strictosidin-Ausbeute als das Konstrukt mit C- und N-terminalem His-Tag und eine etwa 30 % höhere Ausbeute als das Konstrukt mit C-terminalem S-Tag. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der S-Tag durch seine Größe (15 AS + zusätzliche 24 AS durch Klonierung) einen stärkeren Einfluss auf die Proteinfaltung/Aktivität der STR hat, als der His-Tag (6 AS). Darüber hinaus scheint das Anfügen eines His-Tags an den N-Terminus die Aktivität zusätzlich herabzusetzen, was dafür spricht, dass die Expression der STR ohne Tag zu einer weiteren Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein führen könnte.

Obwohl das STR-Konstrukt mit nur einem C-terminalen His-Tag bei den *in vivo* Tests zur höchsten Ausbeute an Strictosidin führte, wurden alle späteren Enzymassays mit gereinigter STR mit dem zweitbesten Konstrukt (pCDFDuet1\_STR\_N-/C-His) durchgeführt, da sich dieses aufgrund des zweiten His-Tags besser reinigen ließ. Mit diesem Konstrukt wurde eine Ausbeute an löslicher STR von 0,70 mg ± 0,01 mg aus einem Liter

Expressionskultur erreicht. Ähnliche Ausbeuten von 0,152 - 0,727 mg/L wurden für die gereinigte STR1 aus *R. serpentina* publiziert, die in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen mit verschiedenen Chaperonen co-exprimiert wurde (Yang et al., 2010). Für die STR aus *C. roseus* wurde von Roessner et al. eine Ausbeute an löslicher STR von weniger als 1 mg (50 % gereinigtes Enzym) aus acht Litern Expressionskultur berichtet (Roessner et al., 1992). In beiden Arbeiten wurden deutlich höhere Konzentrationen an IPTG eingesetzt (0,6 mM bzw. 0,1 mM) und bei höheren Temperaturen exprimiert (25 °C bzw. 37 °C).

Zur Charakterisierung der STR wurde zunächst wie bei der TDC der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität untersucht. Von den untersuchten Substanzen zeigte nur Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) eine deutliche Hemmung der STR-Aktivität. Mit 0,3 mM und 3 mM  $\text{CuSO}_4$  wurde eine Hemmung der STR-Aktivität um etwa 50 % erreicht, wohingegen die niedrigste Konzentration (0,03 mM) zu keiner Hemmung führte. Im Gegensatz zum Kupfersulfat zeigte Eisen(III)-sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) in der höchsten getesteten Konzentration (3 mM) eine starke Erhöhung der STR-Aktivität auf fast 300 %.

Zur weiteren Charakterisierung der STR wurden die Temperatur- und pH-Bedingungen ermittelt, unter denen das Enzym die höchste Aktivität zeigte. Es wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 60 °C getestet sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 11. Die Tests ergaben ein Temperaturoptimum der STR im Bereich von 10 °C - 30 °C sowie ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 5 - pH 6. Diese Werte stimmen mit den in der Pflanzenzelle herrschenden Bedingungen überein, wo die STR in der Vakuole lokalisiert ist (McKnight et al., 1991), in der ein leicht saurer pH-Wert von pH 5 - pH 6 herrscht (Carqueijeiro et al., 2013).

Die pH- und Temperaturabhängigkeit der STR wurde bereits von mehreren Gruppen untersucht, jedoch findet man hauptsächlich Angaben zu aus Zellsuspensionskulturen isolierten STRs, die zum Teil nur 50 % Reinheit aufwiesen. Für die STR aus *C. roseus* wurden pH-Optima von pH 6,8 (Treimer und Zenk, 1979), pH 5 - pH 7,5 (Mizukami et al., 1979) bzw. pH 6 - pH 7,5 (de Waal et al., 1995) ermittelt, sowie ein Temperaturoptimum von 45 °C (Treimer und Zenk, 1979). Hampp und Zenk publizierten mit einem pH-Optimum von pH 6,5 und einem Temperaturoptimum von 45 °C ähnliche Werte für die STR aus *R. serpentina* (Hampp und Zenk, 1988). Beim Vergleich der bisher publizierten Daten mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten fällt auf, dass sich die Temperaturoptima stark unterscheiden. In dieser Arbeit wurde ein Optimum von 20 °C für die STR-Aktivität ermittelt, wohingegen Treimer und Zenk ein Optimum von 45 °C beschreiben. Die große Abweichung zwischen den beiden Werten könnte durch die unterschiedliche Herkunft (original Enzym aus *C. roseus* bzw. heterolog in *E. coli* exprimiertes Enzym mit His-Tags) und Reinheit der verwendeten STRs erklärt werden, wodurch sich die Temperaturstabilität verändert haben kann.

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen für die STR-Aktivität wurde der Km-Wert der STR für die Substrate Tryptamin und Secolganin bestimmt. Der in dieser Arbeit für Tryptamin ermittelte Km-Wert lag bei  $69 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$ , der für Secolganin bei  $2096 \mu\text{M}$

$\pm 579 \mu\text{M}$ . In der Literatur gibt es große Abweichungen zwischen den für die STR von *C. roseus* ermittelten  $K_m$ -Werten. Publierte  $K_m$ -Werte für Tryptamin reichen von  $1,4 \mu\text{M}$  bis  $2300 \mu\text{M}$  (Bernhardt et al., 2007, de Waal et al., 1995, Maresh et al., 2008, McCoy et al., 2006, Mizukami et al., 1979, Pfitzner und Zenk, 1982, Treimer und Zenk, 1979).  $K_m$ -Werte für Secologanin liegen zwischen  $460 \mu\text{M}$  und  $3400 \mu\text{M}$  (Maresh et al., 2008, Mizukami et al., 1979, Pfitzner und Zenk, 1982, Treimer und Zenk, 1979). Die große Diskrepanz kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die Bestimmung der  $K_m$ -Werte bei unterschiedlichen Temperatur- ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$  -  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und pH-Bedingungen (pH 6,5 - pH 7,5) durchgeführt wurde, zum anderen kann die Herkunft und Reinheit der verwendeten STRs eine Rolle spielen. Zum Teil wurde die STR aus *C. roseus* Zellsuspensionskulturen isoliert (de Waal et al., 1995, Mizukami et al., 1979, Pfitzner und Zenk, 1982, Treimer und Zenk, 1979), zum Teil heterolog in *E. coli* oder *S. cerevisiae* exprimiert und gereinigt (Bernhardt et al., 2007, Maresh et al., 2008, McCoy et al., 2006).

Bei der Ermittlung der kinetischen Konstanten wurde in dieser Arbeit eine starke Substrathemmung der STR durch Tryptaminkonzentrationen  $>1 \text{ mM}$  festgestellt. Ähnliche Konzentrationen von  $>1,2 \text{ mM}$  (Treimer und Zenk, 1979) und  $>0,9 \text{ mM}$  (Hampp und Zenk, 1988) wurden für die *C. roseus* STR bzw. die *R. serpentina* STR ermittelt. Im Gegensatz dazu publizierten de Waal et al., dass bis zu einer Tryptaminkonzentration von  $5 \text{ mM}$  keine Hemmung der STR detektiert werden konnte (de Waal et al., 1995)

### 5.1.3 Strictosidin-Glucosidase (SGD)

Das SGD-Gen aus *C. roseus* (GenBank: AF112888) wurde für *E. coli* Codon-optimiert mit N-terminalem His-Tag im Vektor pCDFDuet1 bei der Firma GenScript HK Limited in Auftrag gegeben (pCDFDuet1\_SGD). Die SGD zeigt nach Expression bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und Analyse des Gesamtproteins eine Bande von etwa  $64 \text{ kDa}$  im SDS-Gel (4.2.2.1). Diese Masse entspricht der von Luijendijk et al. (1998) beschriebenen Masse für eine aus einer *C. roseus* Zellsuspensionskultur gereinigten SGD von  $63 \text{ kDa}$ .

Die SGD konnte unter den für die TDC und STR optimalen Expressionsbedingungen (Induktion mit  $0,01 \text{ mM}$  IPTG und Expression bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in löslicher Form exprimiert werden. Die Ausbeute an gereinigtem Enzym betrug  $25,8 \text{ mg} \pm 4,6 \text{ mg}$  pro Liter Expressionskultur und war damit um einen Faktor 27 (TDC) bzw. 37 (STR) größer als die Ausbeute der anderen beiden in dieser Arbeit exprimierten Enzyme. Auch im Vergleich zu anderen heterolog exprimierten SGDs zeigt die in dieser Arbeit exprimierte SGD eine deutlich höhere Ausbeute: Barleben et al. berichteten die Herstellung von  $10 \text{ mg}$  *R. serpentina* SGD aus  $5 \text{ L}$  *E. coli*-Kultur (Barleben et al., 2005).

Zur Charakterisierung der SGD wurde, wie schon für die TDC und STR beschrieben, zunächst der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität untersucht. Von den untersuchten Substanzen zeigten nur Eisen(III)-sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) und Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) einen Einfluss auf die SGD-Aktivität. Eisen(III)-sulfat zeigte in der höchsten getesteten Konzentration ( $3 \text{ mM}$ ) eine Hemmung der SGD-Aktivität auf etwa  $60 \%$ . Im Gegensatz dazu bewirkte Kupfersulfat schon in der niedrigsten getesteten

Konzentration (0,03 mM) eine Hemmung der SGD-Aktivität von etwa 80 %. Die beiden höheren Konzentrationen (0,3 mM und 3 mM) führten zur vollständigen Hemmung der SGD. Eine etwas schwächere Inhibierung durch Kupfer (50 % Hemmung durch 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$ ) wurde für eine aus einer *C. roseus* Zellsuspensionskultur isolierten SGD publiziert (Luijendijk et al., 1998) und auch eine heterolog in *E. coli* exprimierte SGD aus *R. serpentina* wurde in geringem Maße (8,8 % Hemmung) durch Zugabe von 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  inhibiert (Gerasimenko et al., 2002). Die starke Anfälligkeiten der SGD gegenüber geringen Konzentrationen an Kupfersulfat wurde in späteren Enzymassays zur Dreifach-expression ausgenutzt, um die Aktivität der STR bzw. ihr enzymatisches Produkt Strictosidin, besser nachweisen zu können.

Zur weiteren Charakterisierung der SGD wurden die Temperatur- und pH-Bedingungen ermittelt, unter denen das Enzym die höchste Aktivität zeigte. Es wurden Temperaturen zwischen 10 °C und 80 °C getestet sowie pH-Bereiche zwischen pH 3 und pH 8. Die Tests ergaben ein deutliches Temperaturoptimum bei 50 °C sowie ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 6. Dieser Wert liegt etwas niedriger als erwartet, da die SGD in der Pflanzenzelle normalerweise im Kern lokalisiert ist (Guirimand et al., 2010, Stavrinides et al., 2015), wo ein eher neutraler pH-Wert von pH 7 herrscht, aber ein Vergleich mit Literaturdaten zeigt ähnliche Ergebnisse. Für aus *C. roseus* Zellsuspensionskulturen isolierte SGDs wurden pH-Werte von pH 6 - pH 8,5 (Luijendijk et al., 1998) bzw. pH 6,0 - pH 6,4 (Hemscheidt und Zenk, 1980) berichtet, sowie ein deutlich niedrigeres Temperaturoptimum (30 °C) als das in dieser Arbeit ermittelte (Hemscheidt und Zenk, 1980). Luijendijk et al. bemerkten darüber hinaus, dass die SGD bis zu einer Temperatur von 50 °C stabil bleibt, was mit den in dieser Arbeit ermittelten Temperaturoptimum von 50 °C und darauf folgenden starken Abfall der SGD-Aktivität übereinstimmt. Für eine heterolog in *E. coli* exprimierte SGD aus *R. serpentina* wurde ein pH-Optimum von pH 5,0 - pH 5,5 publiziert sowie ein Temperaturoptimum von 50 °C (Gerasimenko et al., 2002).

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen für die SGD-Aktivität wurde der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert für das Substrat Strictosidin bestimmt. Da in der Literatur keine einheitliche Meinung darüber herrscht, ob die Kinetik der SGD eher einer hyperbolischen Michaelis-Menten- oder einer sigmoidalen Kurvenform folgt (Yerkes et al., 2008), wurden unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung der kinetischen Parameter der SGD verwendet. Zum einen wurde eine Berechnung nach Michaelis-Menten (1913) und Lineweaver-Burk (1934) durchgeführt, zum anderen nach Hill (1910).

Der nach Michaelis-Menten ermittelte  $K_m$ -Wert für Strictosidin lag bei  $426 \mu\text{M} \pm 178 \mu\text{M}$ , der  $V_{max}$ -Wert bei  $81 \text{ nmol/min} \pm 25 \text{ nmol/min}$ . Die nach Lineweaver-Burk ermittelten Werte hingegen lagen bei  $193 \mu\text{M} \pm 143 \mu\text{M}$  bzw.  $38 \text{ nmol/min} \pm 44 \text{ nmol/min}$ . Bei Betrachtung der Werte fällt auf, dass die Auswertung nach Lineweaver-Burk zu deutlich kleineren Werten für  $K_m$  und  $V_{max}$  führte, die darüber hinaus eine sehr große Standardabweichung besaßen. Diese großen Unterschiede könnten zum Teil dadurch erklärt werden, dass die Auftragung nach Michaelis-Menten in dieser Arbeit zu einer eher sigmoidalen Kurvenform führte, für die die Auswertung

nach Lineweaver und Burk nicht ausgelegt ist und daher zu fehlerhaften Ergebnissen führte. Die nach Hill ermittelten Werte lagen mit  $245 \mu\text{M} \pm 104 \mu\text{M}$  für  $K_m$  und  $66 \text{ nmol/min} \pm 26 \text{ nmol/min}$  für  $V_{\text{max}}$  ebenfalls deutlich unterhalb der über Michaelis-Menten ermittelten Werte. Aber auch hier zeigten sich Schwankungen der einzelnen  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte, die zu relativ großen Standardabweichungen führten. Eine Erklärung für die großen Standardabweichungen bei allen drei verwendeten Methoden sind die aus Messung 3 erhaltenen deutlich höheren Werte, die sich stark von den drei anderen Messungen unterscheiden.

Ein Vergleich der nach Hill ermittelten  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte mit Literaturdaten zeigt, dass auch hier starke Schwankungen vorliegen. Die publizierten  $K_m$ -Werte der *C. roseus* SGD für Strictosidin liegen zwischen  $10 \mu\text{M}$  und  $220 \mu\text{M}$  (Bernhardt et al., 2009, Brandt et al., 2000, Hemscheidt und Zenk, 1980, Luijendijk et al., 1998, Yerkes et al., 2008). Wobei nur die von Bernhardt et al. und Yerkes et al. ermittelten  $K_m$ -Werte von  $150 \mu\text{M} \pm 30 \mu\text{M}$  und  $220 \mu\text{M}$  ebenfalls durch heterolog in *E. coli* exprimiertes, gereinigtes Enzym entstanden sind. Diese Werte stimmen gut mit dem in dieser Arbeit über Hill ermittelten  $K_m$ -Wert von  $245 \mu\text{M} \pm 104 \mu\text{M}$  überein, jedoch wurde nur der von Yerkes et al. publizierte  $K_m$ -Wert ebenfalls über die Methode von Hill ermittelt, der  $K_m$ -Wert von Bernhardt et al. wurde nach Michaelis-Menten bestimmt (Bernhardt et al., 2009, Yerkes et al., 2008). Abschließend lässt sich sagen, dass die Methode nach Hill, aufgrund des oligomeren Aufbaus der SGD und der in dieser Arbeit sigmoidalen Kurvenform der SGD-Kinetik, zur Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  am geeignetsten scheint.

## 5.2 Dreifachexpression von TDC, STR und SGD in *E. coli*

Nachdem die Einzelexpression aller drei Enzyme bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  über die Analyse des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE überprüft worden war, wurde eine Co-Expression der STR und SGD bzw. aller drei Gene durchgeführt. Für die Co-Expression der STR und SGD wurde der Vektor pCDFDuet1\_SGD\_STR, der zwei multiple Klonierungsstellen sowie zwei IPTG induzierbare T7lac-Promotoren besitzt, in *E. coli* Bl21(DE3) transformiert und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  exprimiert. Für die Dreifachexpression wurde die TDC im Vektor pET45b(+) zusammen mit der STR und SGD im Vektor pCDFDuet1, in *E. coli* transformiert und ebenfalls bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  exprimiert.

Bei der Auswahl der Vektoren wurde darauf geachtet, dass diese unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen angehörten, um ihre Stabilität und Co-Existenz in *E. coli* zu gewährleisten. Darüber hinaus wurden Vektoren ausgewählt, die unterschiedliche Antibiotikaresistenzen besaßen, damit eine gleichzeitige Selektion auf beide Vektoren erfolgen konnte. Die Analyse des Gesamtproteins der Doppel- bzw. Dreifachexpression über SDS-PAGE zeigte, dass die gemeinsame Expression der STR und SGD sowie die Co-Expression aller drei Gene in *E. coli* erfolgreich war (4.2.2.1).

Als nächstes wurde überprüft, ob alle drei Gene auch funktionell in *E. coli* vorlagen. Hierzu wurden Expressionen unter den schon für die Einzelexpressionen der drei Enzyme als optimal ermittelten Expressionsbedingungen durchgeführt: Induktion mit  $0,01 \text{ mM}$  IPTG und Inkubation bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $20 \text{ h}$ . Anschließend wurde die Aktivität der

Enzyme über *in vivo* Enzymassays untersucht. Da sich die drei Enzyme in ihren pH-Optima bzw. aktiven pH-Bereichen stark unterscheiden, wurde die STR, die bei den Einzeldisexpressionen die geringste Ausbeute an löslichem Enzym lieferte, als Maßstab gewählt und alle Enzymtests in 0,1 M Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer bei pH 6 durchgeführt. Als Substrate wurden Tryptophan und Secologanin eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation bei 37 °C für 3 h wurde der Kulturüberstand mittels HPLC und LC-MS auf die enzymatischen Produkte hin untersucht. Um sicher zu stellen, dass *E. coli* keinen größeren Einfluss auf den Enzymtest ausübte, z. B. durch Verstoffwechslung der eingesetzten Substrate bzw. der gebildeten Produkte, wurden zusätzliche Tests in *E. coli* BL21(DE3) ohne *Catharanthus*-Gene durchgeführt. Alle Tests zeigten hierbei, dass die eingesetzten Substrate in der für den Enzymtest angesetzten Zeit in *E. coli* stabil sind und das *E. coli* ohne die heterologen Gene nicht dazu in der Lage ist, die entsprechenden enzymatischen Produkte zu produzieren. Im Gegensatz dazu konnten in den Enzymtests mit *Catharanthus*-Genen alle drei enzymatischen Produkte (Tryptamin, Strictosidin und Strictosidin-Aglycon) nachgewiesen werden, wobei die direkte Detektion des Strictosidin-Aglycons aufgrund seiner Reaktivität nicht in allen Test möglich war. Die effektivste Methode zur Detektion des Aglycons scheint die Durchführung des Enzymtests bei etwas niedrigerer Temperatur (28 °C) für 1 - 3 h und die sofortige Analyse über LC-MS zu sein. Unter diesen Bedingungen konnten klare Massenpeaks von 369 m/z detektiert werden, die der Masse des Aglycons (368 m/z) plus einem Proton entsprechen.

In der Literatur zur SGD wurde deren Aktivität hauptsächlich über die Abnahme ihres Substrats Strictosidin (Barleben et al., 2007) oder die Detektion von Cathenamin (350 m/z) beschrieben (Geerlings et al., 2001). Es konnte jedoch keine Literatur zur Detektion des Strictosidin-Aglycons in seiner Dialdehyd-Form mit der Masse von 368 m/z gefunden werden. Der Nachweis von Cathenamin gelang in dieser Arbeit ausschließlich durch Enzymtests mit gereinigter SGD und dem Einsatz von höheren Konzentrationen an Strictosidin (siehe Anhang), die bei den *in vivo* Assays nicht erreicht wurden.

Zusätzlich zu den *in vivo* Assays, bei denen die Substrate Tryptophan und Secologanin in Reinform eingesetzt wurden, wurde eine kostengünstigere Variante untersucht, bei der anstelle des gekauften Secologanin-Standards ein Methanol-Extrakt aus *Symphoricarpos albus* Beeren verwendet wurde. Die Machbarkeit dieses Ansatzes wurde bereits für heterolog in *S. cerevisiae* exprimierte STR gezeigt (Geerlings et al., 2001). Als Negativkontrolle diente ein Enzymtest, der in einem pH-Bereich (pH 4) durchgeführt wurde, in dem keines der drei untersuchten Enzyme aktiv ist. Die LC-MS-Analyse der Enzymassays zeigte wie erwartet nur bei dem bei pH 6 durchgeführten Assay die Bildung der enzymatischen Produkte Tryptamin und Strictosidin. Es konnte jedoch kein Strictosidin-Aglycon detektiert werden.

Es gibt bereits Literatur zur Co-Expression der *C. roseus* TDC mit einer T5H aus Reis in *E. coli* zur Produktion von Serotonin (Park et al., 2011) sowie zur Co-Expression der STR und SGD in *E. coli* (Stöckigt et al., 2010) und in *S. cerevisiae* (Geerlings et al., 2001).

In den letzten Jahren wurde auf dem Gebiet der Co-Expression mehrerer Gene in einem rekombinanten Wirtsorganismus große Fortschritte gemacht. Während der Durchführung dieser Arbeit publizierten Brown et al. 2015 die *de novo* Produktion von 0,5 mg/L Strictosidin in *S. cerevisiae*. Um dies zu erreichen, war die Integration von 21 Genen, sowie drei Gendelektionen nötig (Brown et al., 2015). Es gibt jedoch keine Berichte über die gemeinsame funktionelle Expression der TDC, STR und SGD in *E. coli*. Während dieser Arbeit gelang die gemeinsame Expression dieser drei Gene aus der *Catharantus roseus* Monoterpenindolalkaloid-Biosynthese in *E. coli* sowie die *in vivo* Produktion aller drei enzymatischen Produkte.

### 5.3 Produktion von Strictosidin

In dieser Arbeit wurde Strictosidin nach einer modifizierten Methode von Pfitzner und Zenk (1982) hergestellt. Hierzu wurde die mit einem C- und N-terminalen His-Tag versehene STR an einer Nickel-Säule immobilisiert und gereinigt. Anschließend erfolgte die Verknüpfung der Substrate Tryptamin und Secologanin durch die an die Säulenmatrix gebundene STR. Das gebildete Strictosidin wurde von der Säule eluiert und über HPLC und LC-MS analysiert. Die Analysen zeigten, dass etwa 90 % der eingesetzten Substrate zu Strictosidin umgewandelt wurden. Die Ausbeute an reinem Strictosidin aus 10 mM Tryptamin und Secologanin betrug etwa 4,8 mg in einem 1 mL Ansatz. Pfitzner und Zenk erreichten mit ihrer Methode, bei der die STR an Bromcyan (CNBr)-aktivierter Sepharose immobilisiert vorlag, eine Ausbeute von 6 g in 12 Tagen. Bei diesem System handelte es sich jedoch um ein in größerem Maßstab betriebenes Durchlaufsystem, bei dem 15 mM Lösungen der beiden Substrate kontinuierlich über die Säule gepumpt wurden. Ein ähnliches Durchlaufsystem, bei dem die STR1 aus *R. serpentina* zur Produktion von 12-Azastrictosidin an einer Nickelsäule immobilisiert vorlag, wurde von Yang et al. beschrieben. Die Ausbeute bei diesem System lag bei 0,7 g nach über Nacht Inkubation mit 12,42 mM 7-Azatriptamin und 14,18 mM Secologanin (Yang et al., 2010).

### 5.4 Fazit/Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein System zur Co-Expression von drei Genen der *Catharantus roseus* Monoterpenindolalkaloidbiosynthese entwickelt, das die gemeinsame funktionelle Expression der TDC, STR und SGD in *E. coli* ermöglicht. Bisher ist noch kein solches System für *E. coli* beschrieben worden. Im Gegensatz dazu wurde erst vor kurzem ein System zur *de novo* Synthese von Strictosidin, dem enzymatischen Produkt der STR in *S. cerevisiae* publiziert, für dessen Verwirklichung die heterologe Expression von 21 Genen nötig war.

Die Machbarkeit einer *de novo* Synthese von pflanzlichen Sekundärstoffen in *E. coli* wurde bislang nur für wenige andere pflanzliche SM-Biosynthesewege nachgewiesen. Im Bereich der Benzylisoquinolinalkaloide z. B. wurde die *de novo* Synthese des Mor-

phinan-Alkaloids Thebain in *E. coli* publiziert (Nakagawa et al., 2016). Mit diesem System wurde eine etwa 300-fach höhere Ausbeute an Thebain erreicht, als mit einem zuvor entwickelten Hefesystem (Galanie et al., 2015). Dies zeigt, dass *E. coli* ein geeignetes Wirtssystem für die Synthese pflanzlicher Sekundärstoffe sein kann und in einigen Fällen deutliche Vorteile gegenüber dem häufig verendeten Hefesystem haben kann.

Es existieren bereits genetisch modifizierte *E. coli* Stämme zur *de novo* Produktion von SM, bei denen bestimmte Primärstoffwechselwege (Shikimat-, MEP oder MVA-Weg) hochreguliert wurden, um eine ausreichende Menge Substrat (Aminosäuren, Isoprenvorläufer) für die Produktion des gewünschten Sekundärmetabolits zur Verfügung zu stellen (Jiang et al., 2016, Yang et al., 2016). Darüber hinaus ist es bereits mehrfach gelungen pflanzliche Cytochrom P450-Enzyme, die häufig an der Biosynthese pflanzlicher SM beteiligt sind und die aufgrund ihrer ER-Lokalisation normalerweise bevorzugt in *S. cerevisiae* exprimiert wurden, funktionell in *E. coli* zu exprimieren (Biggs et al., 2016, Michener et al., 2012, Staniek et al., 2013). Damit ist es durchaus möglich, Strictosidin in Zukunft auch in *E. coli de novo* herzustellen, wozu die heterologe Dreifachexpression der TDC, STR und SGD in der vorliegenden Arbeit einen ersten Beitrag liefert.

## 6 Literatur

Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J. and D'Alessandro, U. (2011) "Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria." *Malar J* 10, 144, DOI: 10.1186/1475-2875-10-144.

Aleinein, R. A., Hamoud, R., Schäfer, H. and Wink, M. (2013). "Molecular cloning and expression of ranalexin, a bioactive antimicrobial peptide from *Rana catesbeiana* in *Escherichia coli* and assessments of its biological activities." *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 3535-3543.

Arnalsteen-Dassonville, E., Hermida, J. S., Kubala, M., Six, I., Quenum, S., Leborgne, L. and Jarry, G. (2010). "Ajmaline challenge for the diagnosis of Brugada syndrome: which protocol?" *Arch Cardiovasc Dis*, 103, 570-578.

Barleben, L., Ma, X., Koepke, J., Peng, G., Michel, H. and Stöckigt, J. (2005). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons." *Biochim Biophys Acta*, 1747, 89-92.

Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J. and Stöckigt, J. (2007). "Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family." *Plant Cell*, 19, 2886-2897.

Bernhardt, P., McCoy, E. and O'Connor, S. E. (2007). "Rapid identification of enzyme variants for reengineered alkaloid biosynthesis in periwinkle." *Chem Biol*, 14, 888-897.

Bernhardt, P., Yerkes, N. and O'Connor, S. E. (2009). "Bypassing stereoselectivity in the early steps of alkaloid biosynthesis." *Org Biomol Chem*, 7, 4166-4168.

Besseau, S., Kellner, F., Lanoue, A., Thamm, A. M., Salim, V., Schneider, B., Geu-Flores, F., Hofer, R., Guirimand, G., Guihur, A., Oudin, A., Glevarec, G., Foureau, E., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Werck-Reichhart, D., Burlat, V., De Luca, V., O'Connor, S. E. and Courdavault, V. (2013). "A pair of tabersonine 16-hydroxylases initiates the synthesis of vindoline in an organ-dependent manner in *Catharanthus roseus*." *Plant Physiol*, 163, 1792-1803.

Biggs, B. W., Lim, C. G., Sagliani, K., Shankar, S., Stephanopoulos, G., De Mey, M. and Ajikumar, P. K. (2016). "Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 3209-3214.

Blaskò, G. and Cordell, G. A. (1990). Isolation, structure elucidation, and biosynthesis of the bisindole alkaloids of *Catharanthus*. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Volume 37, 1-76, Academic Press.

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

- Brandt, V., Geerlings, A., Tits, M., Delaude, C., van der Heijden, R., Verpoorte, R. and Angenot, L. (2000). "New strictosidine  $\beta$ -glucosidase from *Strychnos mellodora*." *Plant Physiol Biochem*, 38, 187-192.
- Brown, S., Clastre, M., Courdavault, V. and O'Connor, S. E. (2015). "De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 3205-3210.
- Carqueijeiro, I., Noronha, H., Duarte, P., Geros, H. and Sottomayor, M. (2013). "Vacuolar transport of the medicinal alkaloids from *Catharanthus roseus* is mediated by a proton-driven antiport." *Plant Physiol*, 162, 1486-1496.
- Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Choi, O., Lee, J. K., Kang, S. Y., Pandey, R. P., Sohng, J. K., Ahn, J. S. and Hong, Y. S. (2014). "Construction of artificial biosynthetic pathways for resveratrol glucoside derivatives." *J Microbiol Biotechnol*, 24, 614-618.
- Costa, M. M., Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, L. G., Almeida, I., Leech, M., Memelink, J., Barcelo, A. R. and Sottomayor, M. (2008). "Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*." *Plant Physiol*, 146, 403-417.
- Courdavault, V., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B. and Burlat, V. (2014). "A look inside an alkaloid multisite plant: the *Catharanthus* logistics." *Curr Opin Plant Biol*, 19, 43-50.
- Cui, L., Ni, X., Ji, Q., Teng, X., Yang, Y., Wu, C., Zekria, D., Zhang, D. and Kai, G. (2015) "Co-overexpression of geraniol-10-hydroxylase and strictosidine synthase improves anti-cancer drug camptothecin accumulation in *Ophiorrhiza pumila*." *Sci Rep* 5, 8227 DOI: DOI:10.1038/srep08227.
- De Luca, V., Marineau, C. and Brisson, N. (1989). "Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2582-2586.
- De Luca, V., Salim, V., Thamm, A., Masada, S. A. and Yu, F. (2014). "Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation." *Curr Opin Plant Biol*, 19, 35-42.
- de Waal, A., Meijer, A. H. and Verpoorte, R. (1995). "Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms." *Biochem J*, 306, 571-580.
- Diamond, A. and Desgagne-Penix, I. (2016). "Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids." *Plant Biotechnol J*, 14, 1319-1328.
- Duge de Bernonville, T., Foureau, E., Parage, C., Lanoue, A., Clastre, M., Londono, M. A., Oudin, A., Houille, B., Papon, N., Besseau, S., Glevarec, G., Atehortua, L., Giglioli-

- Guivarc'h, N., St-Pierre, B., De Luca, V., O'Connor, S. E. and Courdavault, V. (2015). "Characterization of a second secologanin synthase isoform producing both secologanin and secoxyloganin allows enhanced *de novo* assembly of a *Catharanthus roseus* transcriptome." *BMC Genomics*, 16, 619. DOI 10.1186/s12864-015-1678-y
- El-Sayed, M. and Verpoorte, R. (2007). "*Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation." *Phytochem Rev*, 6, 277-305.
- Facchini, P. J. (2001). "Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 29-66.
- Facchini, P. J. and De Luca, V. (2008). "Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants." *Plant J*, 54, 763-784.
- Fan, X., Schäfer, H., Reichling, J. and Wink, M. (2013). "Bactericidal properties of the antimicrobial peptide Ib-AMP4 from *Impatiens balsamina* produced as a recombinant fusion-protein in *Escherichia coli*." *Biotechnol J*, 8, 1213-1220.
- Florini, J. R. and Vestling, C. S. (1957). "Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems." *Biochim Biophys Acta*, 25, 575-578.
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M. and Smolke, C. D. (2015). "Complete biosynthesis of opioids in yeast." *Science*, 349, 1095-1100.
- Geerlings, A., Ibanez, M. M., Memelink, J., van Der Heijden, R. and Verpoorte, R. (2000). "Molecular cloning and analysis of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*." *J Biol Chem*, 275, 3051-3056.
- Geerlings, A., Redondo, F. J., Contin, A., Memelink, J., van der Heijden, R. and Verpoorte, R. (2001). "Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast." *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 420-424.
- Gerasimenko, I., Sheludko, Y., Ma, X. and Stöckigt, J. (2002). "Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids." *Eur J Biochem*, 269, 2204-2213.
- Glenn, W. S., Runguphan, W. and O'Connor, S. E. (2013). "Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems." *Curr Opin Biotechnol*, 24, 354-365.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S. H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T. C., Kim, C. Y., Hung, L. W., Waldo, G. S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J. L., Stevens, R. C., Lesley, S. A., Wilson, I. A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M. I., Eschenfeldt, W. H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S. K., Emtage, J. S., Sauder, J. M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Fiser, A.,

Swaminathan, S., Studier, F. W., Chance, M. R., Sali, A., Acton, T. B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L. C., Hunt, J. F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C. K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G. T., Stuart, D. I., Owens, R. J., Daenke, S., Schutz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Bussow, K. and Gunsalus, K. C. (2008). "Protein production and purification." *Nat Methods*, 5, 135-146.

Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B. and Burlat, V. (2010). "Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"?" *BMC Plant Biol*, 10, 182.

Hait, W. N., Rubin, E., Alli, E. and Goodin, S. (2007). "Tubulin targeting agents." *Update Cancer Ther*, 2, 1-18.

Hampp, N. and Zenk, M. H. (1988). "Homogeneous strictosidine synthase from cell suspension cultures of *Rauvolfia serpentina*." *Phytochemistry*, 27, 3811-3815.

Hänsel, R. and Hölzl, J. (1996). *Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Hartmann, T. (2007). "From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism." *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.

Hawkins, K. M. and Smolke, C. D. (2008). "Production of benzyloquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Chem Biol*, 4, 564-573.

Hemscheidt, T. and Zenk, M. H. (1980). "Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures." *FEBS Lett*, 110, 187-191.

Herbel, V., Schäfer, H. and Wink, M. (2015). "Recombinant production of snak-in-2 (an antimicrobial peptide from tomato) in *E. coli* and analysis of its bioactivity." *Molecules*, 20, 14889-14901.

Hill, A. V. (1910). "The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves." *J Physiol*, 40, 4-7.

Hwang, E. I., Kaneko, M., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. (2003). "Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster." *Appl Environ Microbiol*, 69, 2699-2706.

Jiang, W., Fu, X., Pan, Q., Tang, Y., Shen, Q., Lv, Z., Yan, T., Shi, P., Li, L., Zhang, L., Wang, G., Sun, X. and Tang, K. (2016). "Overexpression of AaWRKY1 leads to an enhanced content of artemisinin in *Artemisia annua*." *Biomed Res Int*, 7314971, DOI: 10.1155/2016/7314971.

Kang, S.-Y., Lee, J. K., Choi, O., Kim, C. Y., Jang, J.-H., Hwang, B. Y. and Hong, Y.-S. (2014). "Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli*." *BMC Biotechnol.*, 14, DOI: 10.1186/1472-6750-14-67.

- Kim, H. K., Choi, Y. H., Luijendijk, T. J., Rocha, R. A. and Verpoorte, R. (2004). "Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* using <sup>1</sup>H-NMR." *Phytochem Anal*, 15, 257-261.
- Kim, M.-J., Kim, B.-G. and Ahn, J.-H. (2013). "Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 7195-7204.
- Kroneberg, G. (1958). "Pharmakologie des *Rauwolfia*-Alkaloids Raubasin ( $\delta$ -Yohimbin-Ajmalicin)." *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 233 72-97.
- Kumar, R. (2016) "Evolutionary trails of plant group II pyridoxal phosphate-dependent decarboxylase genes." *Front Plant Sci* 7, 1268 DOI: 10.3389/fpls.2016.01268.
- Kutchan, T. M. (1989). "Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli*." *FEBS Lett*, 257, 127-130.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M. (1993). "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm." *Biotechnology (N Y)*, 11, 187-193.
- Li, M., Kildegaard, K. R., Chen, Y., Rodriguez, A., Borodina, I. and Nielsen, J. (2015). "*De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*." *Metab Eng*, 32, 1-11.
- Li, Y. and Smolke, C. D. (2016). "Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast." *Nat Commun*, 7, DOI: 10.1038/ncomms12137.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). "The determination of enzyme dissociation constants." *J Am Chem Soc*, 56, 658-666.
- Liscombe, D. K. and O'Connor, S. E. (2011). "A virus-induced gene silencing approach to understanding alkaloid metabolism in *Catharanthus roseus*." *Phytochemistry*, 72, 1969-1977.
- Liu, X., Lin, J., Hu, H., Zhou, B. and Zhu, B. (2016). "*De novo* biosynthesis of resveratrol by site-specific integration of heterologous genes in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett*, 363, DOI: 10.1093/femsle/fnw061.
- Luijendijk, T. J. C., Stevens, L. H. and Verpoorte, R. (1998). "Purification and characterisation of strictosidine  $\beta$ -d-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures." *Plant Physiol Biochem*, 36, 419-425.
- Ma, Y. Y., Sun, L., Chen, X. J., Wang, N., Yi, P. F., Song, M., Zhang, B., Wang, Y. Z. and Liang, Q. H. (2016) "Vinpocetine attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells." *PLoS One* 11, e0162295. DOI: 10.1371/journal.pone.0162295.
- Maresh, J. J., Giddings, L. A., Friedrich, A., Loris, E. A., Panjikar, S., Trout, B. L., Stöckigt, J., Peters, B. and O'Connor, S. E. (2008). "Strictosidine synthase: mechanism of a Pictet-Spengler catalyzing enzyme." *J Am Chem Soc*, 130, 710-723.

- McCoy, E., Galan, M. C. and O'Connor, S. E. (2006). "Substrate specificity of strictosidine synthase." *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 2475-2478.
- McKnight, T. D., Bergey, D. R., Burnett, R. J. and Nessler, C. L. (1991). "Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants." *Planta*, 185, 148-152.
- McKnight, T. D., Roessner, C. A., Devagupta, R., Scott, A. I. and Nessler, C. L. (1990). "Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*." *Nucleic Acids Res*, 18, 4939-4939.
- Michaelis, L. and Menten, M. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung " *Biochem Z*, 49, 333-369.
- Michener, J. K., Nielsen, J. and Smolke, C. D. (2012). "Identification and treatment of heme depletion attributed to overexpression of a lineage of evolved P450 monooxygenases." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19504-19509.
- Miettinen, K., Dong, L., Navrot, N., Schneider, T., Burlat, V., Pollier, J., Woittiez, L., van der Krol, S., Lugin, R., Ilc, T., Verpoorte, R., Oksman-Caldentey, K. M., Martinoia, E., Bouwmeester, H., Goossens, A., Memelink, J. and Werck-Reichhart, D. (2014) "The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*." *Nat Commun* 5, 3606 DOI:10.1038/ncomms4606.
- Minami, H., Kim, J. S., Ikezawa, N., Takemura, T., Katayama, T., Kumagai, H. and Sato, F. (2008). "Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7393-7398.
- Mizukami, H., Nordlov, H., Lee, S. L. and Scott, A. I. (1979). "Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* cultured cells." *Biochemistry*, 18, 3760-3763.
- Molchan, O., Romashko, S. and Yurin, V. (2012). "L-tryptophan decarboxylase activity and tryptamine accumulation in callus cultures of *Vinca minor* L." *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 108, 535-539.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263-273.
- Nakagawa, A., Matsumura, E., Koyanagi, T., Katayama, T., Kawano, N., Yoshimatsu, K., Yamamoto, K., Kumagai, H., Sato, F. and Minami, H. (2016). "Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*." *Nat Commun*, 7, 10390. DOI: 10.1038/ncomms10390
- Noe, W., Mollenschott, C. and Berlin, J. (1984). "Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein." *Plant Mol Biol*, 3, 281-288.
- Paddon, C. J. and Keasling, J. D. (2014). "Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development." *Nat Rev Microbiol*, 12, 355-367.

Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D. R., Teoh, K. H., Reed, D. W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., Dorin, G., Ellens, K. W., Fickes, S., Galazzo, J., Gaucher, S. P., Geistlinger, T., Henry, R., Hepp, M., Horning, T., Iqbal, T., Jiang, H., Kizer, L., Lieu, B., Melis, D., Moss, N., Regentin, R., Secrest, S., Tsuruta, H., Vazquez, R., Westblade, L. F., Xu, L., Yu, M., Zhang, Y., Zhao, L., Lievens, J., Covello, P. S., Keasling, J. D., Reiling, K. K., Renninger, N. S. and Newman, J. D. (2013). "High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin." *Nature*, 496, 528-532.

Pan, Q., Mustafa, N. R., Tang, K., Choi, Y. H. and Verpoorte, R. (2016). "Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites." *Phytochem Rev*, 15, 221-250.

Park, M., Kang, K., Park, S. and Back, K. (2008). "Conversion of 5-hydroxytryptophan into serotonin by tryptophan decarboxylase in plants, *Escherichia coli*, and yeast." *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 2456-2458.

Park, S., Kang, K., Lee, S. W., Ahn, M. J., Bae, J. M. and Back, K. (2011). "Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, 89, 1387-1394.

Pennings, E. J., van den Bosch, R. A., van der Heijden, R., Stevens, L. H., Duine, J. A. and Verpoorte, R. (1989). "Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem*, 176, 412-415.

Pfützner, U. and Zenk, M. H. (1982). "Immobilization of strictosidine synthase from *Catharanthus* cell cultures and preparative synthesis of strictosidine." *Planta Med*, 46, 10-14.

Pfützner, U. and Zenk, M. H. (1989). "Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." *Planta Med*, 55, 525-530.

Qu, Y., Easson, M. L., Froese, J., Simionescu, R., Hudlicky, T. and De Luca, V. (2015). "Completion of the seven-step pathway from tabersonine to the anticancer drug precursor vindoline and its assembly in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6224-6229.

Roessner, C. A., Devagupta, R., Hasan, M., Williams, H. J. and Scott, A. I. (1992). "Purification of an indole alkaloid biosynthetic enzyme, strictosidine synthase, from a recombinant strain of *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif*, 3, 295-300.

Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014) "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." *Front Microbiol* 5, 172 DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Sambrook, J. and Russell, D. (2006). *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Schäfer, H. and Wink, M. (2009). "Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis." *Biotechnol J*, 4, 1684-1703.
- Schlittler, E. and Furlenmeier, A. (1953). "Vincamin, ein Alkaloid aus *Vinca minor* L. (Apocynaceae)." *Helv Chim Acta*, 36, 2017-2020.
- Sertel, S., Fu, Y., Zu, Y., Rebacz, B., Konkimalla, B., Plinkert, P. K., Kramer, A., Gertsch, J. and Efferth, T. (2011). "Molecular docking and pharmacogenomics of vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine." *Biochem Pharmacol*, 81, 723-735.
- Sneader, W. (2005). *Drug Discovery. A History*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Staniek, A., Bouwmeester, H., Fraser, P. D., Kayser, O., Martens, S., Tissier, A., van der Krol, S., Wessjohann, L. and Warzecha, H. (2013). "Natural products - modifying metabolite pathways in plants." *Biotechnol J*, 8, 1159-1171.
- Stavriniades, A., Tatsis, E. C., Foureau, E., Caputi, L., Kellner, F., Courdavault, V. and O'Connor, S. E. (2015). "Unlocking the diversity of alkaloids in *Catharanthus roseus*: nuclear localization suggests metabolic channeling in secondary metabolism." *Chem Biol*, 22, 336-341.
- Stöckigt, J., Antonchick, A. P., Wu, F. and Waldmann, H. (2011). "The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry." *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 8538-8564.
- Stöckigt, J., Hammes, B. and Ruppert, M. (2010). "Construction and expression of a dual vector for chemo-enzymatic synthesis of plant indole alkaloids in *Escherichia coli*" *Nat Prod Res*, 24, 759-766.
- Stöckigt, J. and Zenk, M. H. (1977). "Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids" *FEBS Lett*, 79, 233-237
- Szabo, L. F. (2008). "Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine." *Molecules*, 13, 1875-1896.
- Torrens-Spence, M. P., Liu, P., Ding, H., Harich, K., Gillaspay, G. and Li, J. (2013). "Biochemical evaluation of the decarboxylation and decarboxylation-deamination activities of plant aromatic amino acid decarboxylases." *J Biol Chem*, 288, 2376-2387.
- Treimer, J. F. and Zenk, M. H. (1979). "Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation." *Eur J Biochem*, 101, 225-233.
- Trenchard, I. J. and Smolke, C. D. (2015). "Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast." *Metab Eng*, 30, 96-104.
- van Wyk, B., Wink, C. and Wink, M. (2015). *Handbuch der Arzneipflanzen*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Vas, A. and Gulyas, B. (2005). "Eburnamine derivatives and the brain." *Med Res Rev*, 25, 737-757.

- Verpoorte, R., van der Heijden, R. and Moreno, P. R. H. (1997). Biosynthesis of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Cells. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Volume 49, 221-299, Academic Press.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. T. and Sim, G. A. (1966). "Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*." *J Am Chem Soc*, 88, 3888-3890.
- Wang, M. J., Liu, Y. Q., Chang, L. C., Wang, C. Y., Zhao, Y. L., Zhao, X. B., Qian, K., Nan, X., Yang, L., Yang, X. M., Hung, H. Y., Yang, J. S., Kuo, D. H., Goto, M., Morris-Natschke, S. L., Pan, S. L., Teng, C. M., Kuo, S. C., Wu, T. S., Wu, Y. C. and Lee, K. H. (2014). "Design, synthesis, mechanisms of action, and toxicity of novel 20(s)-sulfonylamidine derivatives of camptothecin as potent antitumor agents." *J Med Chem*, 57, 6008-6018.
- Wink, M. (2010a). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annu Plant Rev, Vol. 40, Wiley-Blackwell, Chichester.
- Wink, M. (2010b). *Function of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Annu Plant Rev, Vol. 39, Wiley-Blackwell, Chichester.
- Wink, M. (2015). "Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites." *Medicines*, 2, 251-286.
- Wink, M. (2016a). *Alkaloids-Properties and Determination*. *The Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 1, 97-105, Academic Press, Oxford.
- Wink, M. (2016b). *Alkaloids: Toxicology and Health Effects*. *The Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 1, 106-114, Academic Press, Oxford.
- Wink, M. (2016c). *Evolution of Secondary Plant Metabolism*. In: eLS, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Wink, M. (2016d). *Secondary Metabolites: Deterring Herbivores*. In: eLS, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Wink, M., Alfermann, A., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhövel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzadeh, A., Wildi, E. and Ripplinger, P. (2005). "Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents." *Plant Genet Resour*, 3, 90-100.
- Wu, J., Du, G., Chen, J. and Zhou, J. (2015). "Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*." *Scientific Reports*, 5, DOI: 10.1038/srep13477.
- Yamazaki, Y., Urano, A., Sudo, H., Kitajima, M., Takayama, H., Yamazaki, M., Aimi, N. and Saito, K. (2003). "Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants." *Phytochemistry*, 62, 461-470.

- Yang, L., Wang, C., Zhou, J. and Kim, S. W. (2016) "Combinatorial engineering of hybrid mevalonate pathways in *Escherichia coli* for protoilludene production." *Microb Cell Fact* 15, 14 DOI: 10.1186/s12934-016-0409-7.
- Yang, L., Zou, H., Zhu, H., Ruppert, M., Gong, J. and Stöckigt, J. (2010). "Improved expression of His(6)-tagged strictosidine synthase cDNA for chemo-enzymatic alkaloid diversification." *Chem Biodivers*, 7, 860-870.
- Yang, S.-M., Han, S. H., Kim, B.-G. and Ahn, J.-H. (2014). "Production of kaempferol 3-O-rhamnoside from glucose using engineered *Escherichia coli*." *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41, 1311-1318.
- Yang, W., Liu, M., Teng, J., Hao, Z., Wu, B., Wu, T. and Liu, G. J. (2011). "Almitrine-Raubasine combination for dementia." *Cochrane Database Syst Rev*, Cd008068. DOI: 10.1002/14651858.CD008068.pub2.
- Yerkes, N., Wu, J. X., McCoy, E., Galan, M. C., Chen, S. and O'Connor, S. E. (2008). "Substrate specificity and diastereoselectivity of strictosidine glucosidase, a key enzyme in monoterpene indole alkaloid biosynthesis." *Bioorg Med Chem Lett*, 18, 3095-3098.
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J. and Chen, J. (2014a). "Efficient Synthesis of Eriodictyol from L-Tyrosine in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol*, 80, 3072-3080.
- Zhu, X., Zeng, X., Sun, C. and Chen, S. (2014). "Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*." *Front Med*, 8, 285-293.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzdaten

#### Ausschnitt aus pET45b(+)\_TDC\_N-His:

1 TGCAGGTCGACAAGCTTGC GGCCGCTATGGGCAGCATTGATTCAACAAAT  
51 GTAGCCATGTCCAATTCTCCAGTTGGAGAATTTAAGCCACTTGAAGCTGA  
101 GGAATTCGGAAAACAAGCCCATCGTATGGTAGATTTTCATAGCCGATTATT  
151 ACAAAAATGTGGAAACATATCCGGTCCTTAGCGAAGTCGAACCTGGATAT  
201 CTCCGAAAACGTATCCCCGAAACCGCTCCTTACCTCCCCGAACCACTTGA  
251 CGACATCATGAAAGATATTCAGAAGGATATTATCCCAGGAATGACAAATT  
301 GGATGAGCCCTAATTTTTATGCATTTTTTCTGCCACTGTTAGTTCAGCT  
351 GCCTTTTTAGGAGAAATGTTGTCTACTGCCCTAAATTCAGTAGGCTTTAC  
401 TTGGGTTTCTTCACCAGCCGCCACCGAATTAGAAATGATTGTTATGGATT  
451 GGTTGGCTCAGATCCTTAAACTCCCCAAATCTTTCATGTTTTTCAGGTACC  
501 GGTGGCGGCGTCATCCAAAACACCACTAGCGAGTCCATTCTTTGTACAAT  
551 CATTGCCGCCCGGAAAGGGCCCTGGAGAAGCTCGGTCCCGATAGTATTG  
601 GAAAAC TTGTCTGTTACGGATCCGATCAAACCCATACCATGTTCCCCAAA  
651 ACTTGCAAATTTGGCGGGAATTTATCCGAATAATATTAGGTTAATACCTAC  
701 GACCGTCGAAACGGATTTCCGGCATCTCACCTCAAGTTCTACGAAAAATGG  
751 TCGAGGATGACGTGGCGGCCGGATATGTACCGCTGTTCTTATGCGCTACC  
801 CTGGGTACCACCTCGACCACGGCTACCGATCCTGTGGACTCACTTTCTGA  
851 AATCGCTAACGAGTTTGGTATTTGGATCCACGTGGATGCTGCTTATGCGG  
901 GAAGCGCCTGTATATGTCCCGAGTTTAGACATTACTTGGATGGAATCGAA  
951 CGAGTTGACTCACTGAGTCTGAGTCCACACAAATGGCTACTCGCTTACTT  
1001 AGATTGCACTTGCTTGTGGGTCAAGCAACCACATTTGTTACTAAGGGCAC  
1051 TCACTACGAATCCTGAGTATTTAAAAAATAAACAGAGTGATTTAGACAAA  
1101 GTTGTGGACTTCAAAAATTGGCAAATCGCAACGGGACGAAAATTTCCGGTC  
1151 GCTGAAACTTTGGCTCATTTTTACGTAGCTATGGAGTTGTTAATTTACAGA

1201 GTCATATTCGTTCTGACGTCGCAATGGCGAAAATGTTCGAAGAATGGGTT  
 1251 AGATCAGACTCCAGATTCGAAATTGTGGTACCGAGAACTTTTCTCTTGT  
 1301 TTGTTTTAGATTA AAAACCTGACGTTTCGAGTTTACATGTAGAAGAAGTGA  
 1351 ATAAGAACTTTTGGACATGCTTAACTCGACGGGACGAGTTTATATGACT  
 1401 CATACTATTGTGGGAGGCATATACATGCTAAGACTGGCTGTTGGCTCATC  
 1451 GCTAACTGAAGAACATCATGTACGCCGTGTTTGGGATTTGATTCAAAAAT  
 1501 TAACCGATGATTTGCTCAAAGAAGCT**TG**ACTCGAGTCTGGTAAAGAAACC

**pCDFDuet1\_SGD\_STR:**

1 GATCTCATGAGCCCGATCCTGAAGAAAATCTTTATTGAATCCCGTCCTA  
 51 CGCACCGAACGCATTTACGTTTACTCCACCGACAAAGGCTTCTATACCT  
 101 CGGTGCAGGATGGCCGTGTTATTAAATACGAAGGCCCGAACTCGGGTTTT  
 151 ACGGACTTCGCGTATGCCAGCCCGTTTTGGAACAAAGCATTCTGCGAAAA  
 201 TTCAACCGATCCGGAAAAACGTCCGCTGTGTGGTCGCACGTACGATATCT  
 251 CCTACGACTACAAAACTCACAGATGTACATCGTTGATGGCCATTACCAC  
 301 CTGTGCGTGGTTGGTAAAGAAGGCGTTATGCAACCCAGCTGGCTACGTC  
 351 TGTGCAAGGCGTTCCGTTTTAAATGGCTGTATGCCGTTACCGTCGATCAAC  
 401 GTACGGGTATTGTCTACTTCACCGACGTGAGCTCTATCCATGATGACTCT  
 451 CCGGAAGGCGTTGAAGAAATTATGAACACCAGTGATCGTACGGGTGCGCT  
 501 GATGAAATATGACCCGAGTACCAAAGAAACCACGCTGCTGCTGAAAGAAC  
 551 TGCACGTGCCGGGCGGTGCGGAAATTTCTGCCGATGGCAGTTTTGTCTGTG  
 601 GTTGCAGAATTCCTGTCCAACCGCATCGTTAAATACTGGCTGGAAGGCC  
 651 GAAAAAAGGTTTACGCTGAATTTCTGGTCACCATTCGAACCCGGGCAATA  
 701 TCAAACGTAATAGCGATGGTCATTTCTGGGTTAGCTCCTCAGAAGAAGTGA  
 751 GACGGCGGTCAGCACGGCTCCGTCGTGTACGCGGTATCAAATTTGATGG  
 801 CTTCGGTAACATTCTGCAAGTGATCCCGCTGCCGCCGCGTATGAAGGCG  
 851 AACATTTTGAACAGATTCAAGAACACGATGGCCTGCTGTACATCGGTTCT  
 901 CTGAGTCATTCGAGCGTCGGCATTCTGGTGTATGATGACCACGACAACAA  
 951 GGGTAATTCGTACGTTAGCCAGCTGGTCATTAATGCAGATCTCAATTGGA

1001 TATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCCTCGAGTCTGGTAAA  
1051 GAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAG  
1101CGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT  
1151 AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAACCT  
1201 CAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAAC  
1251 GGTA AACAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAAC  
1301 CGACGACCGGGTCATCGTGGCCGGATCTTGCGGCCCTCGGCTTGAACGA  
1351 ATTGTTAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTA  
1401 GTGGACAAATTCTTCCA ACTGATCTGCGCGGAGGCCAAGCGATCTTCTT  
1451 CTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATACTGG  
1501 GCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGAT  
1551 TTTGCCGGT TACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACAT  
1601 TTCGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCGGCGAGTTCATAGCGTTAAGGTT  
1651 TCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTT CAGGAACCGGATCAAAGAGTTC  
1701 CTCCGCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGCTTTTGTCA  
1751 GCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCA  
1801 AGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCAAATTGCAGTTCGCGCTTAGCTGG  
1851 ATAACGCCACGGAATGATGTCGTGTCGACACAACAATGGTGACTTCTACAG  
1901 CGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTG  
1951 TTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCACCGTAAC  
2001 CAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGC  
2051 CGTACAAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACG  
2101CCA ACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCT  
2151 CATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC  
2201 TCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGCT  
2251 AGCTCACTCGGTCGCTACGCTCCGGGCGTGAGACTGCGGCGGGCGCTGCG  
2301 GACACATACAAAGTTACCCACAGATTCCGTGGATAAGCAGGGGACTAACA  
2351 TGTGAGGCAAAACAGCAGGGCCGCGCCGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC  
2401 GCCCTCCTGCCAGAGTTCACATAAACAGACGTTTTTCCGGTGCATCTGTG  
2451 GGAGCCGTGAGGCTCAACCATGAATCTGACAGTACGGGCGAAACCCGACA

2501 GGACTTAAAGATCCCCACCGTTTCCGGCGGGTCGCTCCCTCTTGCGCTCT  
2551 CCTGTTCCGACCCTGCCGTTTACCGGATACCTGTTCCGCCTTTCTCCCTT  
2601 ACGGGAAGTGTGGCGCTTCTCATAGCTCACACACTGGTATCTCGGCTCG  
2651 GTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTAAGCAAGAACTCCCCGTTCA  
2701 GCCCCACTGCTGCGCCTTATCCGGTAACTGTTCACTTGAGTCCAACCCGG  
2751 AAAAGCACGGTAAAACGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACTGGGAGTTC  
2801 GCAGAGGATTTGTTTAGCTAAACACGCGGTTGCTCTTGAAGTGTGCGCCA  
2851 AAGTCCGGCTACACTGGAAGGACAGATTTGGTTGCTGTGCTCTGCGAAAG  
2901 CCAGTTACCACGGTTAAGCAGTTCCCCAACTGACTTAACCTTCGATCAAA  
2951 CCACCTCCCCAGGTGGTTTTTTTCGTTTACAGGGCAAAGATTACGCGCAG  
3001 AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACTGAACCGCTCT  
3051 AGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCC  
3101 ATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTCATGCCCCGCGCCACCCGG  
3151 AAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGG  
3201 TGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCG  
3251 CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA  
3301 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTTCTTT  
3351 TCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGA  
3401 GAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATC  
3451 CTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTAT  
3501 CGTCGTATCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCG  
3551 GTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCAT  
3601 CGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTGAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAAC  
3651 CGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGA  
3701 TTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGAC  
3751 AGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGA  
3801 CCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATA  
3851 CTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATT  
3901 AGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGT  
3951 TAATGATCAGCCCCTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCT

4001 TTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGC  
4051 ACCCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCG  
4101 CGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTG  
4151 CCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCAT  
4201 CGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGT  
4251 TCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACA  
4301 TCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTC  
4351 CGGGCGCTATCATGCCATAACGCGAAAGTTTTGCGCCATTCGATGGTGT  
4401 CCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAATTAAT  
4451 ACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTGTAGAAA  
4501 TAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCA  
4551 CCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGGCGCGCCTGATGG  
4601 GCTCCAAAGATGACCAATCACTGGTCGTGGCTATTTCCCCGGCGGCAGAA  
4651 CCGAATGGCAATCACAGCGTCCCGATCCCGTTTGCCTACCCGAGCATTCC  
4701 GATCCAGCCGCGTAAACATAACAAACCGATTGTGCACCGTCGCGATTTTC  
4751 CGTCGGACTTCATCCTGGGTGCGGGCGGTAGCGCATACCAATGCGAAGGT  
4801 GCCTATAACGAAGGCAATCGTGGTCCGAGCATTTGGGATACGTTTACCAA  
4851 TCGCTATCCGGCAAAAATTGCTGACGGCTCCAACGGTAATCAGGCAATCA  
4901 ACTCATAAACCTGTACAAAGAAGATATCAAATCATGAAACAAACCGGC  
4951 CTGGAATCCTACCGTTTCAGCATCTCTTGGAGTCGTGTGCTGCCGGGCGG  
5001 TAACCTGTCAGGCGGTGTGAACAAAGATGGCGTTAAATTCTACCATGATT  
5051 TCATCGACGAACTGCTGGCGAACGGTATCAAACCGTTTGCCACGCTGTTTC  
5101 CACTGGGATCTGCCGCAGGCACTGGAAGACGAATACGGCGGTTTTCTGTC  
5151 CGATCGCATTGTTGAAGACTTCACCGAATATGCTGAATTTTGCTTCTGGG  
5201 AATTTGGCGATAAAGTGAAATTTTGGACCACGTTCAATGAACCGCATACG  
5251 TATGTTGCAAGTGGCTACGCTACCGGTGAATTCGCACCGGGTCGTGGCGG  
5301 TGCTGATGGTAAAGGTGAACCGGGTAAAGAACCGTACATTGCGACCCATA  
5351 ACCTGCTGCTGTCTCACAAAGCGGCCGTTGAAGTCTACCGCAAAAACCTTC  
5401 CAGAAATGTCAAGGCGGTGAAATTGGTATCGTTCTGAACAGTATGTGGAT  
5451 GGAACCGCTGAATGAAACCAAAGAAGATATTGACGCACGTGAACGCGGCC

5501 TGGATTTTATGCTGGGTTGGTTCATCGAACCGCTGACCACGGGCGAATAT  
 5551 CCGAAATCTATGCGTGCGCTGGTGGTAGTCGCCTGCCGGAATTTTCCAC  
 5601 GGAAGTCTCAGAAAACTGACCGGCTGCTACGATTTTCATTGGTATGAACT  
 5651 ATTACACCACGACCTATGTGTCTAATGCAGATAAAAATCCCGGACACGCCG  
 5701 GGCTACGAAACCGATGCTCGTATCAACAAAAACATCTTCGTTAAAAAAGT  
 5751 CGACGGCAAAGAAGTTCGCATTGGTGAACCGTGCTATGGCGGTTGGCAGC  
 5801 ATGTGGTTCCGTCGGGTCTGTATAACCTGCTGGTCTACACCAAAGAAAA  
 5851 TATCACGTGCCGTTATCTATGTGAGCGAATGTGGCGTCGTGGAAGAAAA  
 5901 CCGTACGAATATTCTGCTGACGGAAGGTAAAACCAACATCCTGCTGACCG  
 5951 AAGCCCGTCATGATAAACTGCGCGTCGACTTTCTGCAGTCGCACCTGGCG  
 6001 AGCGTGCGTGATGCCATTGATGACGGCGTCAATGTGAAAGGCTTTTTTCGT  
 6051 TTGGAGCTTTTTTCGACAACTTTGAATGGAATCTGGGCTATATCTGTCTGT  
 6101 ACGGTATTATCCACGTTCGATTACAAAACCTTCCAACGCTATCCGAAAGAC  
 6151 TCTGCGATCTGGTACAAAACTTCATCAGTGAAGGTTTCGTGACGAATAC  
 6201 CGCCAAAAAACGCTTTTCGTGAAGAAGATAAACTGGTGGAACTGGTCAAAA  
 6251 AACAAAAATACTGAGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCATA  
 6301 ATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCG  
 6351 AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCC  
 6401 ATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGCA

**pCDFDuet1\_SGD:**

1 GATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCCT  
 51 CGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGG  
 101 ACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAG  
 151 CAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT  
 201 TTTGCTGAAACCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGG  
 251 TAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGA  
 301 CCCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTCATCGTGGCCGGATCTTGCGGCCCC  
 351 TCGGCTTGAACGAATTGTTAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCT  
 401 CGCCTTTCACGTAGTGGACAAATTCTTCCAACCTGATCTGCGCGCGAGGCC

451 AAGCGATCTTCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGAC  
501 GGGCTGATACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACAT  
551 CCTTCGGCGCGATTTTGGCCGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAAC  
601 GTAAGCACTACATTTTCGCTCATCGCCAGCCCAGTCGGGCGGGCAGTTCCA  
651 TAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCAGGAACCG  
701 GATCAAAGAGTTCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCT  
751 CTTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTC  
801 GAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTGCAGTT  
851 CGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATG  
901 GTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGT  
951 TTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTA  
1001 CGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCA  
1051 TCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATG  
1101 GCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGA  
1151 TCACCGCTTCCCTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTAT  
1201 CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA  
1251 TAAACAAATAGCTAGCTCACTCGGTCGCTACGCTCCGGGCGTGAGACTGC  
1301 GGCGGGCGCTGCGGACACATACAAAGTTACCCACAGATTCCGTGGATAAG  
1351 CAGGGGACTAACATGTGAGGCAAACAGCAGGGCCGCGCCGGTGGCGTTT  
1401 TTCCATAGGCTCCGCCCTCCTGCCAGAGTTCACATAAACAGACGCTTTTC  
1451 CGGTGCATCTGTGGGAGCCGTGAGGCTCAACCATGAATCTGACAGTACGG  
1501 GCGAAACCCGACAGGACTTAAAGATCCCCACCGTTTCCGGCGGGTTCGCTC  
1551 CCTCTTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTTACCGGATACCTGTTCC  
1601 GCCTTTCTCCCTTACGGGAAGTGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACACACTG  
1651 GTATCTCGGCTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTAAGCAAG  
1701 AACTCCCCGTTTCAGCCCGACTGCTGCGCCTTATCCGGTAACTGTTCACTT  
1751 GAGTCCAACCCGAAAAGCACGGTAAAACGCCACTGGCAGCAGCCATTGG  
1801 TAACTGGGAGTTCGCAGAGGATTTGTTTAGCTAAACACGCGGTTGCTCTT  
1851 GAAGTGTGCGCCAAAGTCCGGCTACACTGGAAGGACAGATTTGGTTGCTG  
1901 TGCTCTGCGAAAGCCAGTTACCACGGTTAAGCAGTTCCCCAACTGACTTA

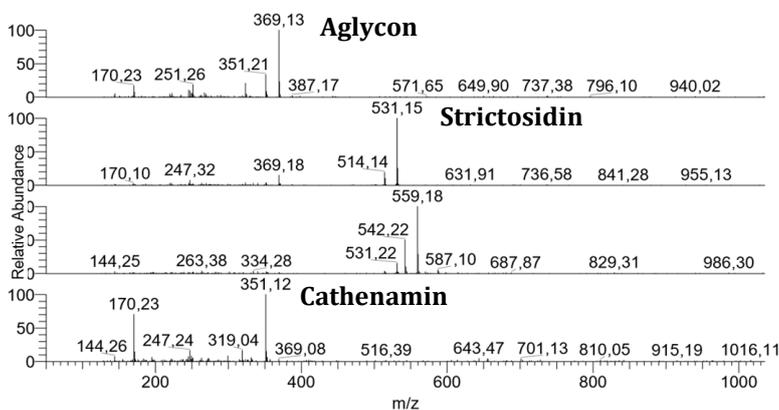
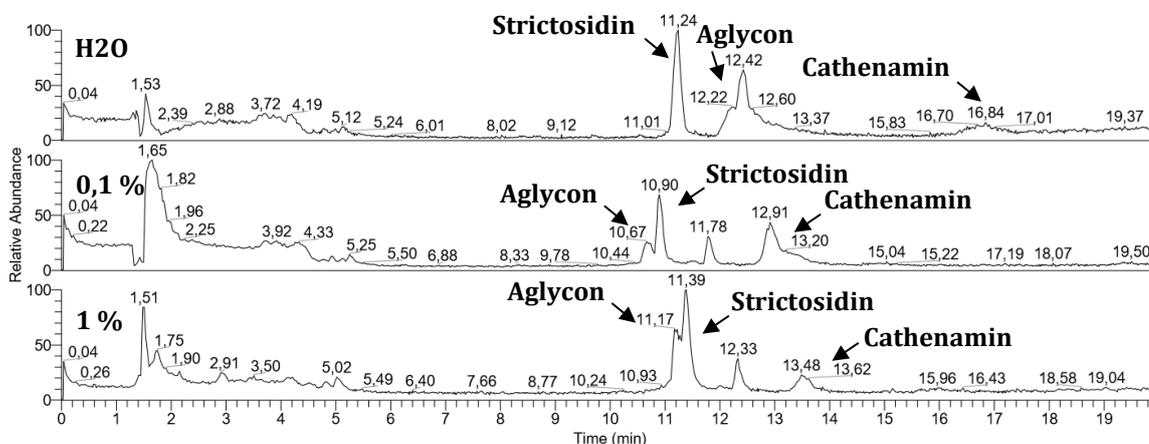
1951 ACCTTCGATCAAACCACCTCCCCAGGTGGTTTTTTTCGTTTACAGGGCAA  
2001 AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCT  
2051 ACTGAACCGCTCTAGATTTTCAAGTGAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACC  
2101 TGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTCATGCC  
2151 CCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCG  
2201 GTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTG  
2251 CGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA  
2301 ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGG  
2351 GTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTAC  
2401 CGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCA  
2451 GCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAG  
2501 CTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG  
2551 CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGT  
2601 TGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATG  
2651 GTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTAT  
2701 CGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCA  
2751 GACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGG  
2801 TGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATG  
2851 GGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATA  
2901 ACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCA  
2951 TCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATT  
3001 GTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACA  
3051 CCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACA  
3101 ATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAG  
3151 CAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAAT  
3201 TCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACG  
3251 TGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGC  
3301 AACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGA  
3351 ATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACCGGAAAGGTTTTGCGC  
3401 CATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCA

3451 TTAGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
3501 TCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGG  
3551 GCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCG  
3601 GCGCGCCTGATGGGCTCCAAAGATGACCAATCACTGGTCGTGGCTATTTT  
3651 CCCGGCGGCAGAACCGAATGGCAATCACAGCGTCCCGATCCCGTTTGGCT  
3701 ACCCGAGCATTCCGATCCAGCCGCGTAAACATAACAAACCGATTGTGCAC  
3751 CGTCGCGATTTTCCGTCGGACTTCATCCTGGGTGCGGGCGGTAGCGCATA  
3801 CCAATGCGAAGGTGCCTATAACGAAGGCAATCGTGGTCCGAGCATTTGGG  
3851 ATACGTTTACCAATCGCTATCCGGCAAAAATTGCTGACGGCTCCAACGGT  
3901 AATCAGGCAATCAACTCATAAACCTGTACAAAGAAGATATCAAAATCAT  
3951 GAAACAAACCGGCCTGGAATCCTACCGTTTCAGCATCTCTTGGAGTCGTG  
4001 TGCTGCCGGGCGGTAACCTGTCAGGCGGTGTGAACAAAGATGGCGTTAAA  
4051 TTCTACCATGATTTTCATCGACGAACTGCTGGCGAACGGTATCAAACCGTT  
4101 TGCCACGCTGTTCCACTGGGATCTGCCGCAGGCACTGGAAGACGAATACG  
4151 GCGGTTTTCTGTCCGATCGCATTGTTGAAGACTTCACCGAATATGCTGAA  
4201 TTTTGCTTCTGGGAATTTGGCGATAAAGTGAAATTTTGGACCACGTTCAA  
4251 TGAACCGCATACTGATGTTGCAAGTGGCTACGCTACCGGTGAATTCGCAC  
4301 CGGGTCGTGGCGGTGCTGATGGTAAAGGTGAACCGGGTAAAGAACCGTAC  
4351 ATTGCGACCATAACCTGCTGCTGTCTCACAAAGCGGCCGTTGAAGTCTA  
4401 CCGCAAAAACCTCCAGAAATGTCAAGGCGGTGAAATTGGTATCGTTCTGA  
4451 ACAGTATGTGGATGGAACCGCTGAATGAAACCAAAGAAGATATTGACGCA  
4501 CGTGAACGCGGCCTGGATTTTATGCTGGGTTGGTTCATCGAACCGCTGAC  
4551 CACGGGCGAATATCCGAAATCTATGCGTGCGCTGGTGGTAGTCGCCTGC  
4601 CGGAATTTTCCACGGAAGTCTCAGAAAACTGACCGGCTGCTACGATTTT  
4651 ATTGGTATGAACTATTACACCACGACCTATGTGTCTAATGCAGATAAAAT  
4701 CCCGGACACGCCGGGCTACGAAACCGATGCTCGTATCAACAAAAACATCT  
4751 TCGTTAAAAAAGTCGACGGCAAAGAAGTTCGCATTGGTGAACCGTGCTAT  
4801 GGCGGTTGGCAGCATGTGGTTCCGTCGGGTCTGTATAACCTGCTGGTCTA  
4851 CACCAAAGAAAAATATCACGTGCCGTTATCTATGTGAGCGAATGTGGCG  
4901 TCGTGGAAGAAAACCGTACGAATATTCTGCTGACGGAAGGTAAAACCAAC

4951 ATCCTGCTGACCGAAGCCCGTCATGATAAACTGCGCGTGCACCTTTCTGCA  
 5001 GTCGCACCTGGCGAGCGTGCGTGATGCCATTGATGACGGCGTCAATGTGA  
 5051 AAGGCTTTTTTCGTTTGGAGCTTTTTTCGACAACCTTTGAATGGAATCTGGGC  
 5101 TATATCTGTGCTTACGGTATTATCCACGTCGATTACAAAACCTTCCAACG  
 5151 CTATCCGAAAGACTCTGCGATCTGGTACAAAACTTCATCAGTGAAGGTT  
 5201 TCGTGACGAATACCGCCAAAAACGCTTTCGTGAAGAAGATAAACTGGTG  
 5251 GAACTGGTCAAAAAACAAAAATACTGAGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGC  
 5301 TTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACAC  
 5351 GGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGG  
 5401 ATAACAATTCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATA  
 5451 CATATGGCA

## 7.2 LC-MS-Daten

### Nachweis des Strictosidin-Aglycons und Catherenamins:



NL: 3,42E6  
 strictosidinaglycon\_wasser\_1%fa#691 RT:  
 11,17 AV: 1 F: + c APCI corona Full ms  
 [50,00-2000,00]

NL: 7,40E6  
 strictosidinaglycon\_wasser\_1%fa#707 RT:  
 11,39 AV: 1 F: + c APCI corona Full ms  
 [50,00-2000,00]

NL: 2,25E6  
 strictosidinaglycon\_wasser\_1%fa#761 RT:  
 12,33 AV: 1 F: + c APCI corona Full ms  
 [50,00-2000,00]

NL: 8,77E5  
 strictosidinaglycon\_wasser\_1%fa#834 RT:  
 13,48 AV: 1 F: + c APCI corona Full ms  
 [50,00-2000,00]

**Analyse des gekauften Strictosidin (Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd.):**