



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Bestimmung der Enzymaktivität von Metalloproteinen in
verschiedenen Blütenmaterialien“

Verfasserin

Barbara Janka, BSc.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Biologische Chemie UG2002

Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. Annette Rompel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Menschen danken, die mir den Abschluss meines Studiums und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zunächst danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biophysikalische Chemie für die moralische und fachliche Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei HR. MAG. STEPHAN MAURACHER, ohne dessen fachlichen Rat diese Arbeit nicht abgeschlossen wäre.

FR. UNIV-PROF ANNETTE ROMPEL danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und die freundliche und kompetente Betreuung.

FR. DR. HEIDRUN HALBWIRTH danke ich für die freundliche Kooperation und die fachliche Unterstützung.

Meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, danke ich von ganzem Herzen für diese Möglichkeit.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich, für den moralischen Beistand während des Studiums. Besonders danke ich meinem Lebensgefährten für sein Verständnis und seine aufbauenden Worte während der schwierigsten Phasen dieser Ausbildung.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Kupferproteine	1
1.1.1 Typ-III-Kupferzentren	2
1.2 Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen	2
1.2.1 Substrate der Aureusidinsynthase	4
1.3 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen	4
1.3.1 2-ODs in der Flavonoid Biosynthese	6
1.3.2 Flavon Synthase	7
2. Zielsetzung	9
2.1 Aureusidinsynthase	9
2.2 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen	9
3. Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen	10
3.1 Aktivitätstest	10
3.2 UV/Vis spektroskopische Detektion	11
3.2.1 Umsetzung von Butein mittels HPLC	13
3.2.1.1 Probenvorbereitung HPLC	14
3.3 Isolierung aus <i>Antirrhinum majus</i>	16
3.3.1 Isolierungsprotokoll I	16
3.3.1.1 Zweiphasentrennung mit Triton X-114	16
3.3.1.2 Zweiphasentrennung PEG 4000	18
3.3.1.3 Fällung mit Ammoniumsulfat	19
3.3.2 Isolierungsprotokoll II	21
3.3.2.1 Gelfiltration	23
3.3.3 Isolierungsprotokoll III	23
3.3.4 Säulenchromatographie	25
3.3.4.1 Size Exclusion Chromatography SEC	25
3.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie SP Sepharose fast flow	27

II Inhaltsverzeichnis

3.3.4.3	Ionenaustauschchromatographie Mono S	28
3.4	Vergleich der Enzymaktivität mit Aureusidinsynthese aus anderen Quellen	29
4.	Flavon Synthase	31
4.1	Isolierung	31
4.2	Reinigung durch fraktionierte AS Fällung.....	33
4.3	Säulenchromatographie	34
4.4	UV/Vis spektroskopische Detektion	35
4.4.1	Aktivitätstest I.....	35
4.4.2	Aktivitätstest II.....	37
5.	Diskussion.....	41
5.1	Aureusidinsynthese	41
5.2	Flavon Synthase.....	42
6.	Experimenteller Teil	45
6.1	Aureusidinsynthese	45
6.1.1	verwendete Blütenmaterialien	45
6.1.2	Aktivitätstest.....	45
6.1.2.1	UV/Vis.....	45
6.1.2.2	HPLC.....	46
6.1.3	Isolierung	47
6.1.3.1	Isolierungsprotokoll I.....	47
6.1.3.2	Isolierungsprotokoll II.....	48
6.1.3.3	Isolierungsprotokoll III.....	49
6.1.4	Säulenchromatographie	50
6.1.4.1	SEC	50
6.1.4.2	SP Sepharose	51
6.1.4.3	Mono S.....	51
6.2	Flavon Synthase.....	52
6.2.1	verwendetes Pflanzenmaterial.....	52
6.2.2	Isolierung	52
6.2.2.1	Isolierungsprotokoll A	52
6.2.2.2	Isolierungsprotokoll B.....	53
6.2.3	Reinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	53
6.2.4	Säulenchromatographie	53
6.2.5	Aktivitätsmessung FNS-I	54
6.2.5.1	Aktivitätstest I.....	54

6.2.5.2	Aktivitätstest II.....	55
6.3	verwendete Chemikalien.....	57
7.	Literaturverzeichnis.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: das Typ-III-Kupferzentrum	2
Abbildung 1.2: Umsetzung von THC und PHC	3
Abbildung 1.3: Das aktive Zentrum von BphC [nach Lit. 22].....	5
Abbildung 1.4: Mechanismus der Sauerstoffaktivierung	5
Abbildung 1.5: Der Flavonoid Biosyntheseweg	7
Abbildung 1.6: UV/Vis Spektrum Naringenin und Apigenin	8
Abbildung 3.1: Umsetzung von Butein.....	10
Abbildung 3.2: Differenzspektrum Butein.....	12
Abbildung 3.3: Differenzspektrum PHC	13
Abbildung 3.4: Chromatogramm HPLC Standards	15
Abbildung 3.5: Chromatogramm HPLC	15
Abbildung 3.6: Triton X-114.....	17
Abbildung 3.7: Polyethylenglykol	18
Abbildung 3.8: Isolierschema I.....	20
Abbildung 3.9: Isolierschema II.....	22
Abbildung 3.10: Isolierschema III.....	24
Abbildung 3.11: Aktivität der Aureusidinsynthase	25
Abbildung 3.12: Elutionsprofil Entsalzung.....	26
Abbildung 3.13: Elutionsprofil SP Sepharose	28
Abbildung 3.14: Elutionsprofil Mono S	29
Abbildung 3.15: Vergleich der Enzymaktivität.....	30
Abbildung 4.1: Isolierschema A	32
Abbildung 4.2: Isolierschema B	33

Abbildung 4.3: Elutionsprofil SP Sepharose	35
Abbildung 4.4: Absorption 370 nm.....	36
Abbildung 4.5: UV/Vis Spektren Aktivitätstest II	38
Abbildung 4.6: UV/Vis Spektren Aktivitätstest II	39
Abbildung 4.7: UV/Vis Spektrum Feststoffe.....	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 6.1: UV/Vis Messung mit Butein.....	45
Tabelle 6.2: UV/Vis Messung mit PHC	46
Tabelle 6.3: Methode HPLC	47
Tabelle 6.4: Puffer Isolierungsprotokoll III.....	49
Tabelle 6.5: Methode SEC.....	51
Tabelle 6.6: Methode SP Sepharose	51
Tabelle 6.7: Methode Mono S.....	52
Tabelle 6.8: Aktivitätstest I, verwendete Enzymproben	54
Tabelle 6.9: Aktivitätstest I, Messungen	55

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Gewichts-/Volumenverhältnis
2-OD	2-Oxoglutarat abhängige Deoxygenase
abs.	absolut
ANS	Anthocyanidin Synthase
BphC	Biphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
F3H	Flavanon 3 β -Hydroxylase
FeSOD	Eisen Superoxid-Dismutase
FLS	Flavanol Synthase
FNS	Flavon Synthase
FNS-I	Flavon Synthase-I
FNS-II	Flavon Synthase-II
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPNS	Isopenicillin N-Synthase

VIII Abkürzungsverzeichnis

Da	Dalton
konz.	konzentriert
LOX	Lipoxygenase
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
P4H	Prolyl-4-Hydroxylase
pI	isoelektrischer Punkt
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sp.	<i>species</i>
TyrH	Tyrosine-Hydroxylase
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Ein großer Teil der Proteine, enthält ein oder mehrere Metalle in seinem aktiven Zentrum. Die biologische Chemie beschäftigt sich mit der Aufklärung der Struktur, sowie der Untersuchung der Funktionen dieser Metalloproteine [Lit. 1].

Die Metalle sind für sehr unterschiedliche Aufgaben notwendig. Sie helfen Strukturen aufzubauen, dienen als Ladungsträger für schnelle Informationsübertragung, spielen bei der Elektronenübertragung und –speicherung eine essentielle Rolle und sind auch am Auf- und Abbau organischer Verbindungen beteiligt. Aufgrund der unterschiedlichen Oxidationsstufen, die Metalle wie z. B Eisen und Kupfer einnehmen können, erfüllen sie oft die Funktion eines Redoxreagents [Lit. 2].

1.1 Kupferproteine

Kupfer zählt im menschlichen Körper zu den essentiellen Spurenelementen, obwohl die Gesamtmenge im Körper mit ca. 150 mg relativ gering ist. Die größte Bedeutung spielen Kupferproteine in der Atmungskette als Elektronentransferproteine, als Beispiel sei hier die terminale Cytochrom-c-Oxidase erwähnt. Aus diesem Grund kann akuter Kupfermangel bei Neugeborenen zu ungenügender Sauerstoffverwertung im Gehirn und damit zu bleibenden Schäden führen.

In ihrer Funktion ähneln Kupferproteine oft entsprechenden Eisenproteinen. Das Kupferprotein Hämocyanin kann O_2 reversibel binden und erfüllt damit dieselbe Funktion wie das Eisen-haltige Protein Hämerythrin. Auch für Peroxidasen und hämhaltige Nitrit-Reduktasen lassen sich Kupfer-haltige Proteine mit analoger Funktion finden.

Die Einteilung der Kupferproteine erfolgt nach spektroskopischen und strukturellen Aspekten in drei verschiedene Typen. Während die Typ-I- und Typ-II-Kupferzentren ein mononukleares Kupferzentrum besitzen, ist das Zentrum der Typ-III-Kupferproteine dinuklear aufgebaut [Lit. 2].

1.1.1 Typ-III-Kupferzentren

Im Typ-III-Kupferzentrum koordinieren zwei Kupferatome mit jeweils drei Stickstoffatomen der Histidinreste der Proteinseitenketten. Das Zentrum kann dabei drei verschiedene Formen einnehmen (siehe Abb. 1.1).

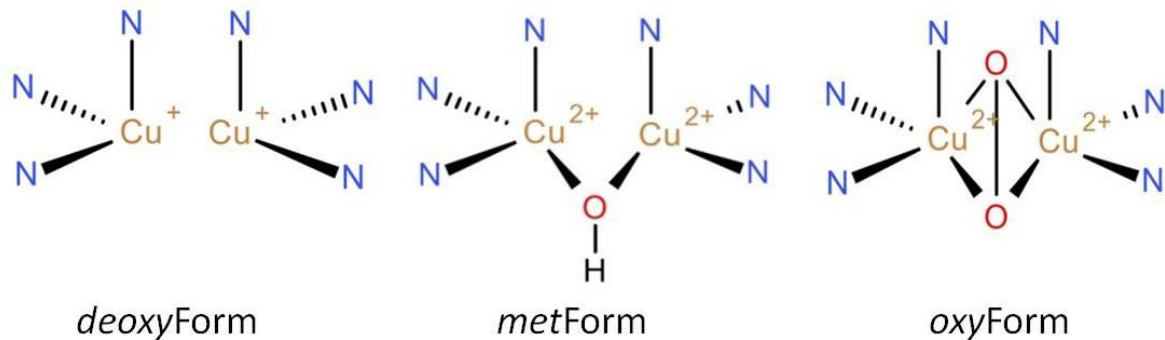


Abbildung 1.1: das Typ-III-Kupferzentrum in den 3 unterschiedlichen Zuständen

Sowohl in der *metForm* Cu(II)-Cu(II) als auch in der *oxyForm* Cu(II)-O₂-Cu(II) befinden sich die Kupferatome in der Oxidationsstufe 2+. In dieser Oxidationsstufe koppeln die beiden Ionen antiferromagnetisch wodurch sie EPR (*electron paramagnetic resonance*) inaktiv sind. Mittels EPR kann dieses Zentrum nur unter Bedingungen bestimmt werden, bei welchen ein Kupferion in der Oxidationsstufe 2+ und eines reduziert vorliegt. In der reduzierten *deoxyForm* haben die Kupferionen die Oxidationsstufe 1+. In der *metForm* ist ein Hydroxyligand zwischen den beiden Kupferionen koordiniert, dieser Zustand des Kupferzentrums zeichnet sich durch einen charakteristischen schwachen d-d-Übergang bei 600-700 nm aus. Für die *oxyForm*, in welcher zwischen den Kupferionen O₂ koordiniert ist, ist ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 343$ nm und bei $\lambda = 580$ nm charakteristisch [Lit. 3, 4].

Typ-III-Kupferzentren wurden neben der Aureusidinsynthese in Hämocyaninen, Catecholoxidasen und Tyrosinasen charakterisiert.

1.2 Aureusidinsynthese aus Löwenmäulchen

Die Aureusidinsynthese aus *Antirrhinum majus* ist die bisher am besten untersuchte Aureusidinsynthese. Es handelt sich hierbei um ein 39 kDa großes Glykoprotein, mit einem Typ-III-Kupferzentrum, das aufgrund seiner Funktion und der Homologien in der DNA Sequenz zu den pflanzlichen Polyphenoloxidasen eingeordnet wird [Lit. 5]. Die bekannten pflanzlichen Polyphenoloxidasen werden generell als 65 kDa *precursor* Proteine synthetisiert und dann nach Abspaltung der Transit Sequenz am N-Terminus, sowie eines 15 kDa Peptids am C-Terminus

in das reife Protein überführt. Sie katalysiert die Synthese von Auronen aus den entsprechenden Chalkonen. Bei den Auronen handelt es sich um pflanzliche Flavonoide, deren Glucoside, die in verschiedenen Zierpflanzen wie z.B. Löwenmäulchen oder Dahlie vorkommen, für die Gelbfärbung der Blüten verantwortlich sind. Mutanten des *Anthirrinum majus*, die keine Aurone enthalten, bilden weiße Blüten, was diese Annahme bestärkt hat.

Die Aureusidinsynthese katalysiert dazu eine Hydroxylierung und eine anschließende Oxidation, wobei es zur Cyclisierung kommt und wird deshalb als bifunktionelle Polyphenoloxidase eingestuft. Die katalysierten Reaktionen führen ausgehend von 2', 4', 6', 4-Tetrahydroxychalkon (THC) bzw. 2', 4', 6', 3, 4-Pentahydroxychalkon (PHC) zu dem entsprechenden Aureusidin bzw. zu Aureusidin und Bracteatin [Lit. 5].

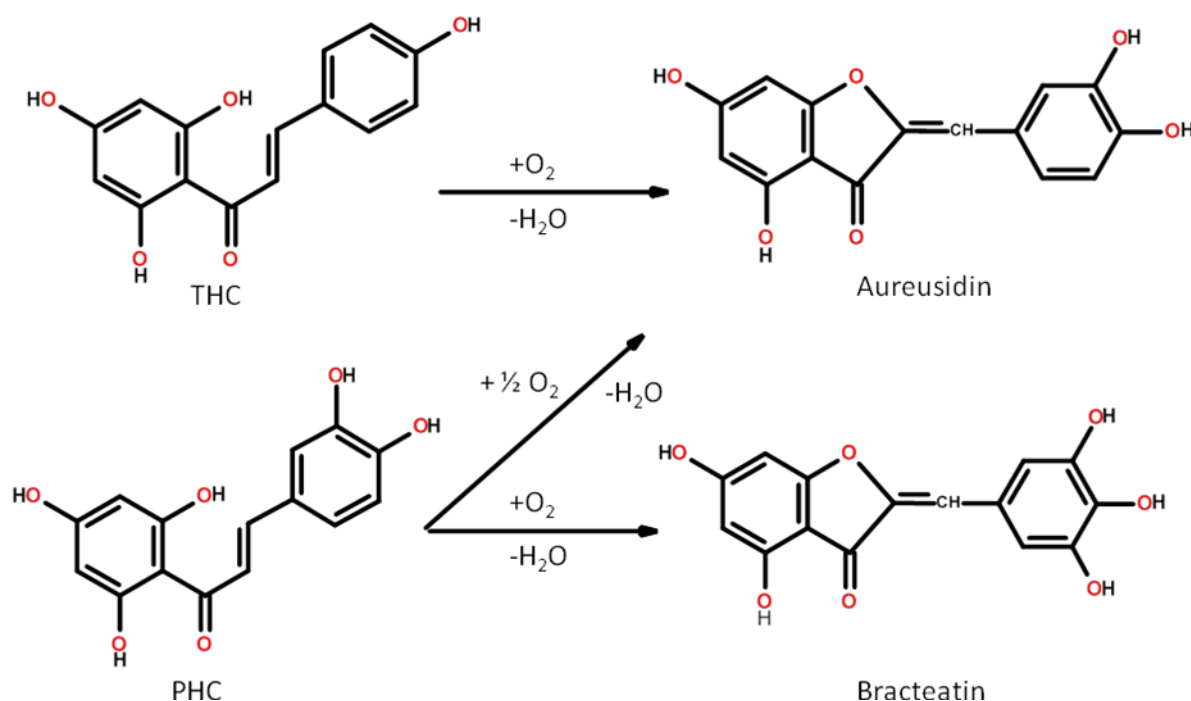


Abbildung 1.2: Umsetzung von THC und PHC zum Aureusidin bzw. Aureusidin und Bracteatin durch die Aureusidinsynthase [Lit. 5]

Auch im Mädchenauge konnte eine Aureusidinsynthaseaktivität nachgewiesen werden [Lit. 6]. Aufgrund vorangegangener Arbeiten in der Arbeitsgruppe von FR. UNIV-PROF. ANNETTE ROMPEL wird auch in der Dahlie Aureusidinsynthase vermutet.

1.2.1 Substrate der Aureusidinsynthese

Wie bereits erwähnt, dienen sowohl THC als auch PHC sowie die entsprechenden 4'-O-Glucoside als Substrate für die durch Aureusidinsynthese katalysierte Reaktion.

PHC zeigt als Substrat deutlich höhere Umsatzraten als THC, wobei hier H_2O_2 die Aktivität vermindert, während im Fall von THC die Aktivität durch die Zugabe von H_2O_2 gesteigert wird. Trotz der hohen Umsatzraten, erweist PHC sich nicht als praktikables Substrat, da es in wässriger Lösung zur Autooxidation neigt und dadurch instabil wird. Außerdem ist es käuflich nicht erhältlich [Lit. 6]. Zu diesem Zweck wurde nach alternativen Substraten gesucht.

Analysen mit gereinigtem Protein haben gezeigt, dass die Aureusidinsynthese ausschließlich mit Chalkonen interagiert, die an der 2'- und 4-Position hydroxyliert sind. Butein hat sich *in vitro* als geeignetes Substrat dargestellt. Es wird zu dem 3', 4', 6-Trihydroxyauron Sulfuretin umgesetzt, welches bei 415 nm ein Absorptionsmaximum zeigt [Lit. 14].

1.3 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen

Oxygenasen katalysieren den Einbau von Sauerstoff in organische Substrate, wobei die Dioxygenasen beide Sauerstoffatome des O_2 benutzen. Pflanzliche Dioxygenasen lassen sich grob in 2 Kategorien einteilen, in die Lipooxygenasen (LOXs) und die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODs). Die 2-ODs katalysieren unterschiedliche Reaktionen wie Hydroxylierungen, Epoxydierungen und das Einführen von Doppelbindungen an gesättigten Kohlenstoffen. Alle 2-ODs sind im Cytoplasma gelöste Proteine, die 2-Oxoglutarat als Co-Substrat benötigen, weshalb sie auch nach ihrer Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat in diese Gruppe eingeordnet werden. Sie zeigen aber nicht nur im Hinblick auf ihre biochemischen Eigenschaften Übereinstimmung. In Clustern der C-Terminus-Seite des Proteins lassen sich konservierte Sequenzhomologien in allen 2-ODs finden [Lit. 7]. Auch die Eisenbindende Domäne zeigt sich hoch konserviert. Das aktive Zentrum zeichnet sich durch ein sogenanntes *2-His-1-carboxylate facial triad motif* aus, in dessen Mitte ein Eisenion im Oxidationszustand 2+ koordiniert ist [Lit. 8].

Dieses Metallzentrum lässt sich in vielen Nicht-Häm Eisen(II) Zentren finden. Am besten wurde es charakterisiert in der Catechol Dioxygenase Biphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase (BphC) [Lit. 23]. In der BphC wird das aktive Zentrum durch ein Eisen (II) gebildet, welches durch die Stickstoffatome von zwei Histidin und einem Glutamin in quadratisch pyramidalen Konformation koordiniert ist. Die Koordinationssphäre wird dann durch zwei Lösungsmittelmoleküle komplettiert

(siehe Abbildung 1.4) [Lit. 22]. Kristallographisch wurde auch noch das aktive Zentrum von Tyrosine-Hydroxylase (TyrH) [Lit. 24], Lipoxygenase aus Sojabohnen (SLO-1) [Lit. 25], Eisen Superoxid-Dismutase (FeSOD) [Lit. 26] und Isopenicillin N-Synthase (IPNS) [Lit. 27] aufgeklärt.

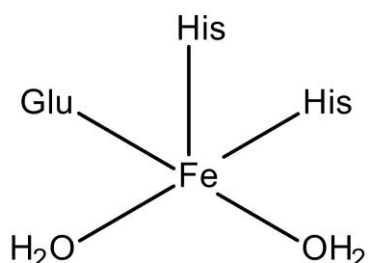


Abbildung 1.3: Das aktive Zentrum von BphC [nach Lit. 22]

Das 2-Oxoglutarat ist wie bereits erwähnt absolut notwendig für die von den 2-ODs katalysierten Reaktionen. Der bisher plausibelste Mechanismus für die Interaktion des Protein mit dem Substrat und dem Co-Substrat wird am Beispiel Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) beschrieben (siehe Abbildung 1.5).

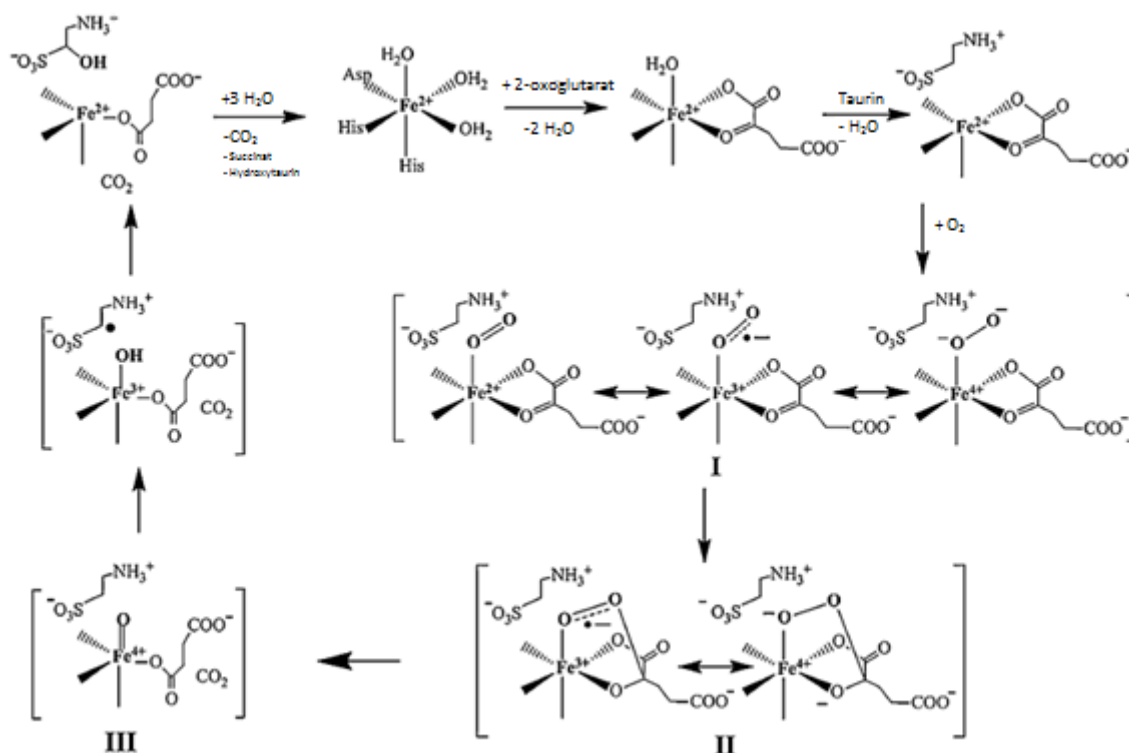


Abbildung 1.4: Mechanismus der Sauerstoffaktivierung [bearbeitet nach Lit. 9] durch das Fe(II)-Zentrum und 2-Oxoglutarat am Beispiel Prolyl-4-Hydroxylase mit dem Substrat Taurin

Das Co-Substrat 2-Oxoglutarat bindet an das aktive Zentrum und das Substrat (in diesem Beispiel Taurin) in der Nachbarschaft des aktiven Zentrums, wodurch

der Wasserligand abgespalten wird. Die Zugabe von Sauerstoff führt schließlich zum Fe(IV)-oxo Intermediat, wobei CO₂ abgespalten wird. Die Fe(IV)-oxo Species reagiert schließlich mit dem Substrat und wird dabei zum Fe(II) reduziert [Lit. 9].

In vitro brauchen diese Enzyme neben dem Substrat und dem 2-Oxoglutarat gelöstes Fe²⁺ und in vielen Fällen Ascorbat, um die volle Aktivität zu erreichen. Das Ascorbat hat hierbei nicht immer eine definierte Funktion, meist dient es dazu, die Autooxidation des Fe(II) Zentrums im Enzym zu verhindern. Außerdem hat sich die Zugabe von Katalase in hohen Dosierungen (bis zu 1mg/ml) bei der Isolierung als sinnvoll gezeigt, da die Katalase das Enzym vor H₂O₂ schützt [Lit. 7].

1.3.1 2-ODs in der Flavonoid Biosynthese

Flavonoide zählen zu den pflanzlichen Sekundärstoffen und werden in allen höheren Pflanzen synthetisiert. Sie dienen einerseits als Blütenfarbstoffe, sowie als Farbstoffe in den Früchten und Samen von Pflanzen, andererseits dienen sie als Signalstoffe und haben antimikrobielle Wirkung und schützen die Pflanzen vor den Einflüssen des UV-Lichts. Die Flavonoide lassen sich in 6 Gruppen einteilen: Chalkone, Flavone, Flavonole, Flavandiole, Anthocyanine und Proanthocyanidine. Die siebte Gruppe der Aurone ist zwar weiterverbreitet, lässt sich jedoch nicht in allen Pflanzen finden, außerdem synthetisieren manche Pflanzen spezielle Formen der Flavonoide (meist als Isoflavonoide bezeichnet). Für viele Flavonoide, vor allem Isoflavonoide, wird tumorhemmende Wirkung vermutet, was die Erforschung dieser sekundären Pflanzenstoffen sowie der zugehörigen Proteine interessant macht [Lit. 10].

Der Biosyntheseweg, in dem Flavonoide synthetisiert werden ist sehr umfangreich. In Abbildung 1.6 ist ein kleiner Auszug gezeigt, der die Rolle der 2-ODs in der Biosynthese zeigt. Prinzipiell werden die Reaktionen entweder durch 2-ODs oder durch unlösliche P-450-abhängige Enzyme durchgeführt [Lit. 7].

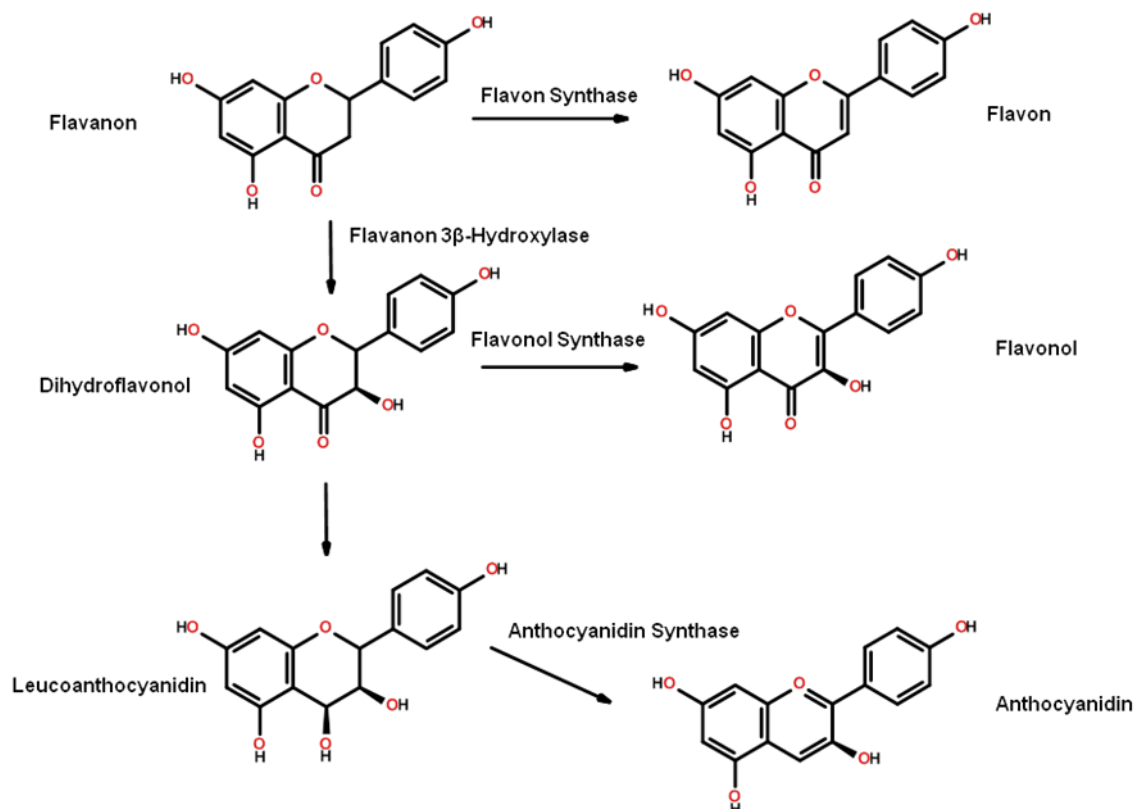


Abbildung 1.5: Der Flavonoid Biosyntheseweg dargestellt wurden die beteiligten 2-ODs [Lit. 7]

Die vier in Abbildung 1.5 gezeigten Proteine sind alle zu den 2-ODs einzuordnen. Flavanone 3 β -Hydroxylase (F3H) wurde bereits aus unterschiedlichen Species isoliert und konnte auch in *E. coli* expremiert werden. Flavonol Synthase (FLS) wurde aus *Petunia hybrida* kloniert und in Hefe expremiert. Der Reaktionsmechanismus, der durch Anthocyanidin Synthase (ANS) katalysiert wird, ist nicht genau bekannt, sie scheint jedoch an der Konversion von *cis*-Leucoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen beteiligt zu sein [Lit. 7].

1.3.2 Flavon Synthase

Die Flavon Synthasen führen in Flavanone eine Doppelbindung zwischen dem C-2 und C-3 des C Rings ein. Zwei Proteine katalysieren diese Reaktion, die Flavon Synthase I (FNS-I) und Flavon Synthase II (FNS-II) genannt werden. Die FNS-II ist eine NADPH- und Sauerstoffabhängige Cytochrom P-450 Monooxygenase, die an die Membran gebunden ist und in den meisten Pflanzen zu finden ist. Im Gegensatz dazu ist die in dieser Arbeit untersuchte FNS-I eine 2-OD und dementsprechend ein im Cytoplasma gelöstes Protein. Sie konnte bisher nur in *Apiaceae* charakterisiert werden [Lit. 11].

Die cDNA der FNS-I wurde aus einer Zelllinie der *Petroselinum crispum* isoliert und in Hefe expremiert. Durch Vergleich mit der cDNA der F3H aus dem selben Organismus konnte, neben der für 2-ODs üblichen Sequenzhomologie, hohe Übereinstimmung in der Basensequenz gezeigt werden. Obwohl diese beiden Enzyme unterschiedliche Reaktionen katalysieren, geht man hier von einer nahen Verwandtschaft mit der F3H aus, was darauf schließen lässt, dass das Gen der FNS-I durch wenige Mutationen aus dem der F3H hervorgegangen ist [Lit. 12].

Die Substrate der FNS-I sind die Flavanone. Jedoch zeigt die FNS-I eine sehr hohe Substratspezifität, auch im Bezug auf chirale Selektivität. In der Pflanze wird nur das Substrat (2S)-Naringenin gebildet, eine Umsetzung von (2R)-Naringenin konnte bisher nicht gezeigt werden [Lit. 13].

Bisher konnte noch kein photometrischer Aktivitätstest ermittelt werden, alle bisherigen Aktivitätsbestimmungen beruhen auf HPLC Messungen. Es zeigt sich jedoch, dass es bei der Umsetzung von Naringenin zu Apigenin durch die Einführung der Doppelbindung zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums im sichtbaren Bereich kommt (siehe Abb. 1.6).

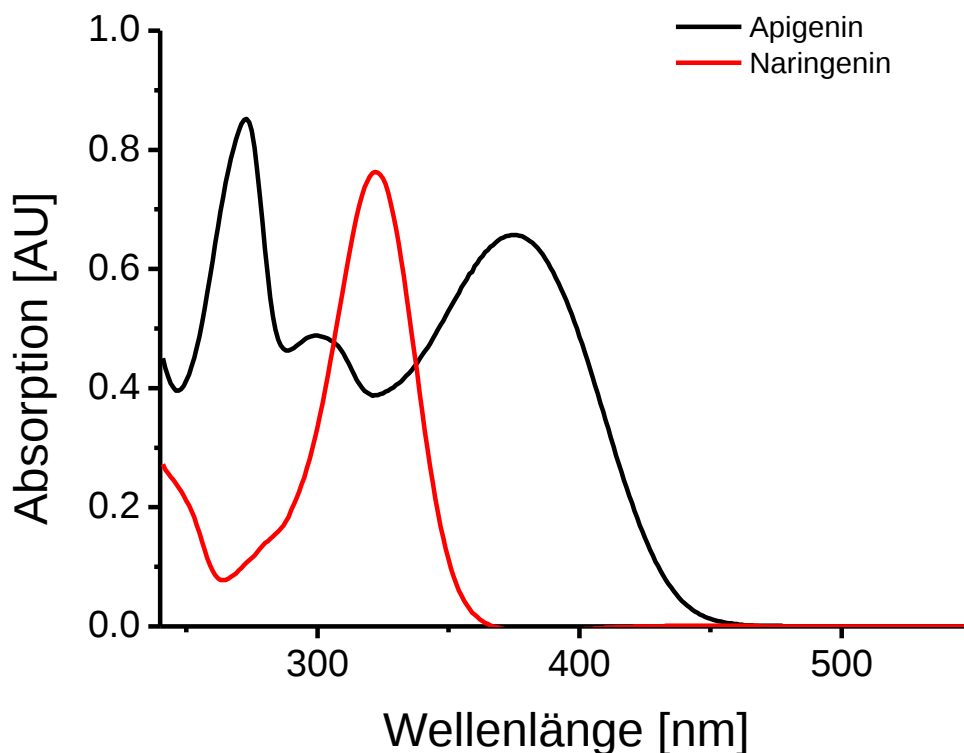


Abbildung 1.6: UV/Vis Spektrum Naringenin und Apigenin gemessen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 bei RT

Dieser Effekt kann für die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität ausgenutzt werden durch Messung des Anstiegs der Absorption bei 370 nm.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollen zwei Typen von Metalloproteinen isoliert und deren Aktivität in unterschiedlichen Pflanzenmaterialien photometrisch untersucht werden.

2.1 Aureusidinsynthese

Zur Aureusidinsynthese werden in dieser Arbeit zwei Schwerpunkte gesetzt. Einerseits soll dieses Protein aus *Antirrhinum majus* isoliert und charakterisiert werden. Dazu muss ein geeignetes Isolierungsprotokoll gefunden und optimiert, sowie die Enzymaktivität positiv bestimmt werden. Durch Reinigung mittels Zweiphasenextraktion und säulenchromatographischen Techniken soll die Aureusidinsynthese von phenolischen Bestandteilen und Proteinen abgetrennt und dabei aufkonzentriert werden um eine Charakterisierung zu ermöglichen. Die Charakterisierung soll im Hinblick auf den isoelektrischen Punkt und die Proteingröße sowie die Enzymaktivität erfolgen.

Im zweiten Schwerpunkt soll die Enzymaktivität der Aureusidinsynthese in verschiedenen Blütenmaterialien verglichen werden. Dazu stehen neben der *Antirrhinum majus* (Löwenmäulchen) die *Dahlia sp.* (Dahlie) und die *Coreopsis lanceolata* (Mädchenauge) zur Verfügung.

Weiters soll die Eignung von Butein als Substrat für diese Proteine getestet werden.

2.2 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen

Für diese Arbeit wurde die Flavon Synthase, ein Protein der Flavonoid Biosynthese ausgewählt. Es soll zunächst ein photometrischer Aktivitätstest entwickelt werden. Dazu werden auf Basis der aktuellen Literatur unterschiedliche Konzentrationen der Co-Substrate getestet. Ziel ist es, die durch das Enzym katalysierte Reaktion durch einen *shift* im Absorptionsmaximum direkt messen zu können (siehe 1.3.2). In Folge soll auch für dieses Protein ein geeignetes Isolierungsprotokoll erarbeitet werden. Auch hier steht die Abtrennung störender Bestandteile des Rohextrakts im Mittelpunkt, bevor eine säulenchromatographische Auftrennung erfolgen kann.

3. Aureusidinsynthese aus Löwenmäulchen

3.1 Aktivitätstest

Um die Aktivität der Aureusidinsynthese in einem Proteinextrakt messen zu können, wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums durch die Konversion des Substrates in das Produkt ausgenutzt. Prinzipiell kann die Aureusidinsynthese alle Chalkone umsetzen, die an der 2' und 4-Position hydroxyliert sind. PHC zeigt sehr hohe Umsatzraten und wird deswegen bevorzugt für die photometrische Detektion als Substrat eingesetzt. Nachdem es aber in wässriger Lösung instabil ist, ist es für eine Bestimmung des Umsatzes mittels HPLC nicht geeignet. Weiters ist PHC nur schwer käuflich zu erwerben. Nachdem das in der Arbeitsgruppe von FR. UNIV-PROF. ANNETTE ROMPEL synthetisierte PHC nur in geringen Mengen zu Verfügung stand wurde nach Abschluss der Messungen des Rohextraktes aus der Dahlie und dem Mädchenauge Butein als Substrat verwendet. Butein wird durch die Aureusidinsynthese in Sulfuretin und 3', 4', 5', 8-Tetrahydroxyauron umgesetzt, wobei Sulfuretin mit 96 % als Hauptprodukt entsteht (siehe Abbildung 3.1) [Lit. 14].

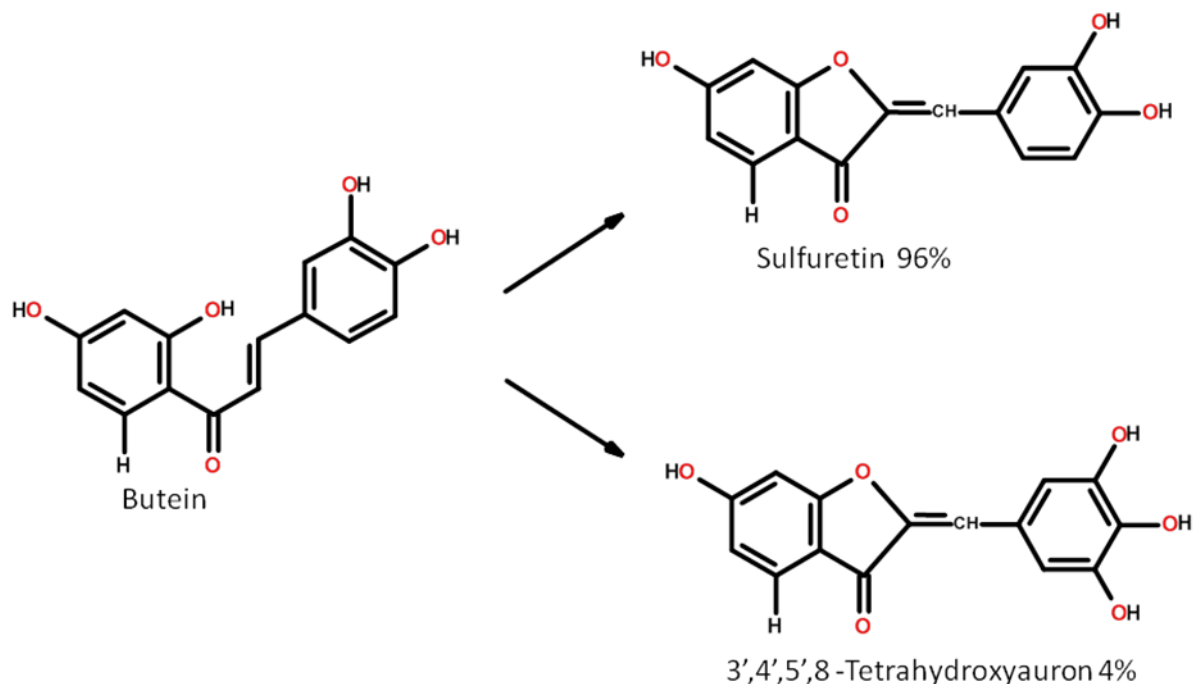


Abbildung 3.1: Umsetzung von Butein durch die Aureusidinsynthese in Sulfuretin und 3', 4', 5', 8-Tetrahydroxyauron [Lit. 14]

3.2 UV/Vis spektroskopische Detektion

In der UV/Vis Spektroskopie wird die Abnahme der Lichtintensität beim Durchgang durch eine Probenlösung gemessen und so die Absorption des Analyten bestimmt. Die meisten Flavonoide sind gefärbt und können deshalb mit dieser Methode bestimmt werden. Wenn das konjugierte π -Elektronensystem so einer Verbindung, durch eine Hydroxylierung, Dehydrierung oder vergleichbare Reaktion verändert wird verändert sich das Absorptionsverhalten des Moleküls, das Absorptionsmaximum verschiebt sich. Dieser Effekt wird zur photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität genutzt, indem entweder die Zunahme der Absorption bei $\lambda_{\max}$ des Produkts, oder die Abnahme der Absorption bei $\lambda_{\max}$ des Substrates gemessen wird.

Im Fall der durch Aureusidinsynthase katalysierten Reaktion mit Butein kann mittels UV/Vis Spektroskopie ein *shift* im Absorptionsmaximum beobachtet werden, wobei das Absorptionsmaximum des gebildeten Sulfuretins bei 415 nm liegt. Die Konzentration des Nebenprodukts 3', 4', 5', 8-Tetrahydroxyaurons ist dabei, bei der eingesetzten Substratmenge zu niedrig um bestimmt zu werden. Um diesen Umsatz zu zeigen wurde aus 30 g gefrorenen Löwenmäulchenblüten isoliert (siehe Abbildung 3.10 Isolierschema III) und nach der Entsalzung über *Size Exclusion Chromatography* (SEC) mit 50 μ l Rohextrakt und Butein als Substrat ein Differenzspektrum aufgenommen.

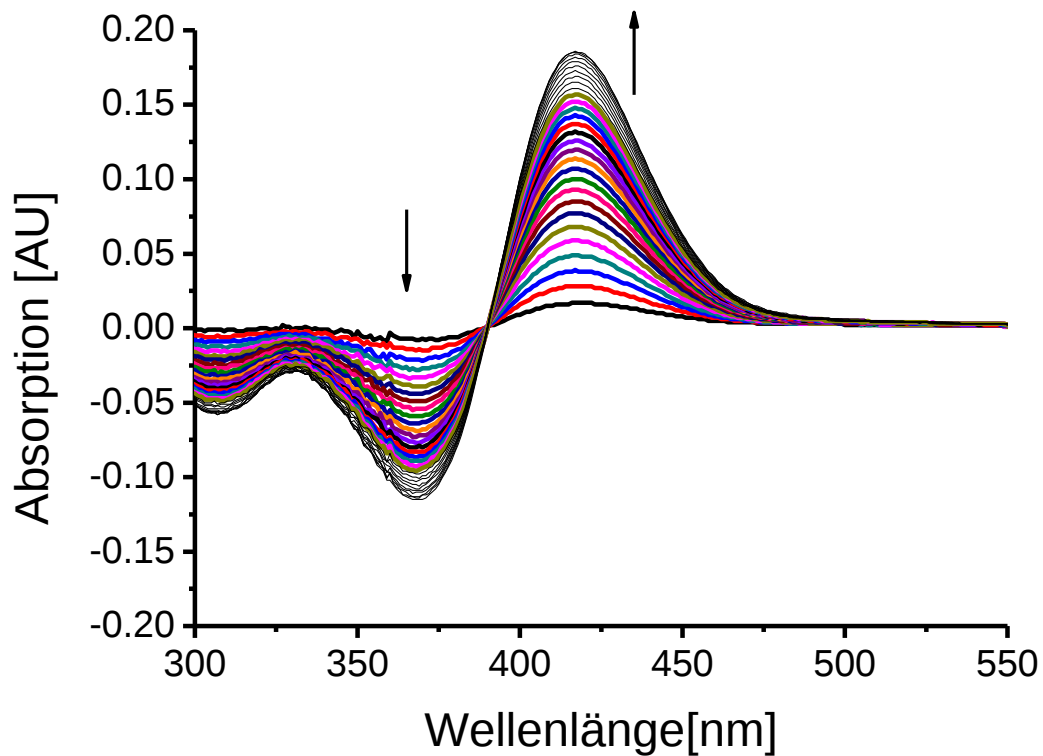


Abbildung 3.2: Differenzspektrum Butein umgesetzt durch Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen in 125 mM Natriumcitratpuffer bei pH 5.4

Wie hier zu sehen ist, zeigt das Spektrum eine Abnahme der Absorption bei 370 nm und eine Zunahme bei 415 nm. Dies zeigt, dass hier Aureusidinsynthase aktiv ist und Butein zu Sulfuretin umsetzt.

Auch bei der Verwendung von PHC als Substrat, wird die Menge des gebildeten Produkts Aureusidin bei 415 nm bestimmt. Das folgende Differenzspektrum aufgenommen von HR. DIPL-CHEM. CHRISTIAN MOLITOR mit Aureusidinsynthase aus Mädchenauge und PHC zeigt auch hier eine Zunahme der Absorption bei entsprechender Wellenlänge.

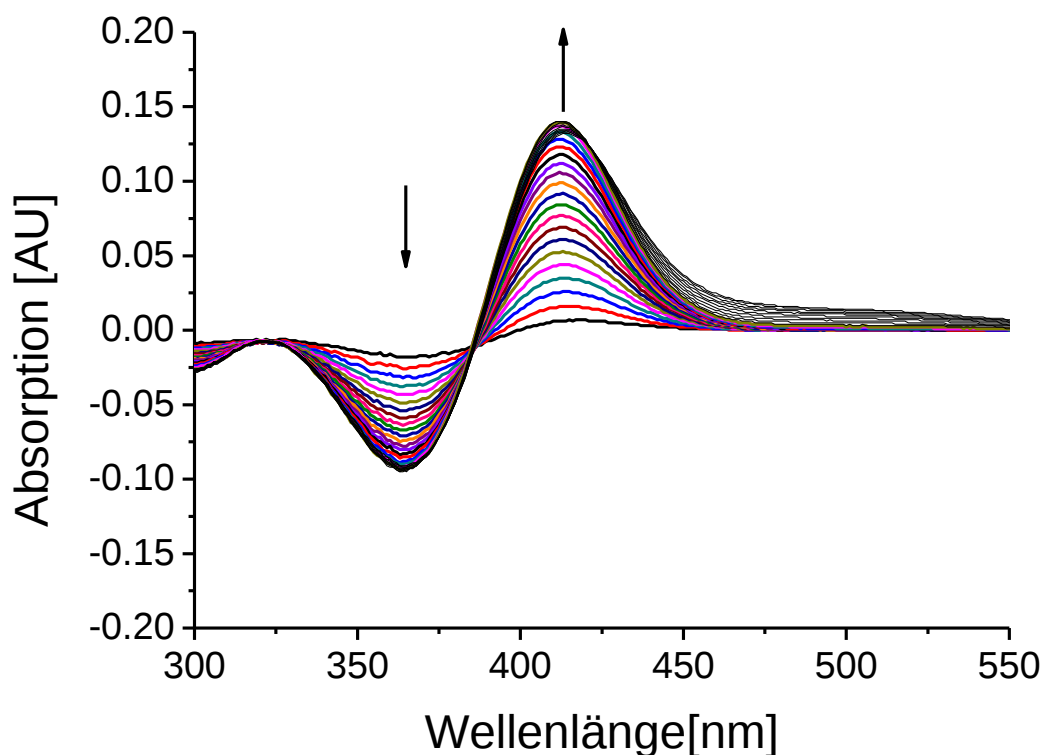


Abbildung 3.3: Differenzspektrum PHC umgesetzt von Aureusidinsynthase aus Mädchenauge in 125 mM Natriumcitratpuffer bei pH 5.4

Aufgrund dieser vor Beginn der Masterarbeit ermittelten Daten, wurde PHC als geeignetes Substrat zur Bestimmung der Enzymaktivität identifiziert und für die vergleichenden Messungen der Enzymaktivität (siehe Kapitel 3.4) verwendet.

3.2.1 Umsetzung von Butein mittels HPLC

Die Isolierung von Aureusidinsynthase aus dem Löwenmäulchen erwies sich im Laufe der Masterarbeit als schwierig, da nach Verwendung der bereits in der Gruppe etablierten Isolierungsprotokolle keine Aktivität photometrisch bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von DR. HEIDRUN HALBWIRTH am Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften an der Technischen Universität Wien die Aktivität des in dieser Arbeit eingesetzten Blütenmaterials mittels HPLC bestimmt. DR. HEIDRUN HALBWIRTH konnte mit dieser Methode bereits Enzymaktivität der Aureusidinsynthase einer anderen *Antirrhinum majus* Sorte messen.

In der *high performance liquid chromatography* kurz genannt HPLC werden die zu untersuchenden Substanzen nach Kriterien wie Größe und Polarität getrennt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten *reversed phase* HPLC werden die Analyten in einer polaren mobilen Phase gelöst und durch eine Kapillare mit unpolarer stationärer Phase geleitet. Je nach Polarität interagieren die Moleküle länger oder kürzer mit der stationären Phase und werden dementsprechend zu unterschiedlichen Zeiten eluiert, wobei polarere Substanzen als erstes eluieren. Durch Verwenden eines Gradienten, bei dem die Polarität der mobilen Phase mit der Zeit erhöht wird, wird die Peakverbreiterung, die direkt proportional zur Retentionszeit ist, verringert. Zur Charakterisierung einer Substanz mittels HPLC muss ein Standard verwendet werden, dessen Retentionszeit unter den selben Bedingungen ermittelt wird, um diesen Wert anschließend mit dem Analyten zu vergleichen. In diesem Fall wurden Butein und Sulfuretin als Standards eingesetzt [Lit. 15].

Um einen direkten Vergleich ziehen zu können, wurde auch die Isolierung an das Schema von FR. DR. HALBWIRTH angepasst (siehe Abbildung 3.9). Dazu wird das Blütenmaterial mit Quarzsand und Polyvinylpolypyrrolidone und 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 im Mörtel verrieben und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird über eine zuvor in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 äquilibrierte Sephadex G25 Säule gefiltert.

3.2.1.1 *Probenvorbereitung HPLC*

Nun wurde in vorbereitete Eppendorfgefäße das Butein vorgelegt und mit 80 µl Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 und 20 µl des Rohextrakts versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol und konzentrierter Essigsäure gestoppt und die Reaktionsmischung in *vials* transferiert.

Diese Mischung wurde nun in die HPLC injiziert und gemessen.

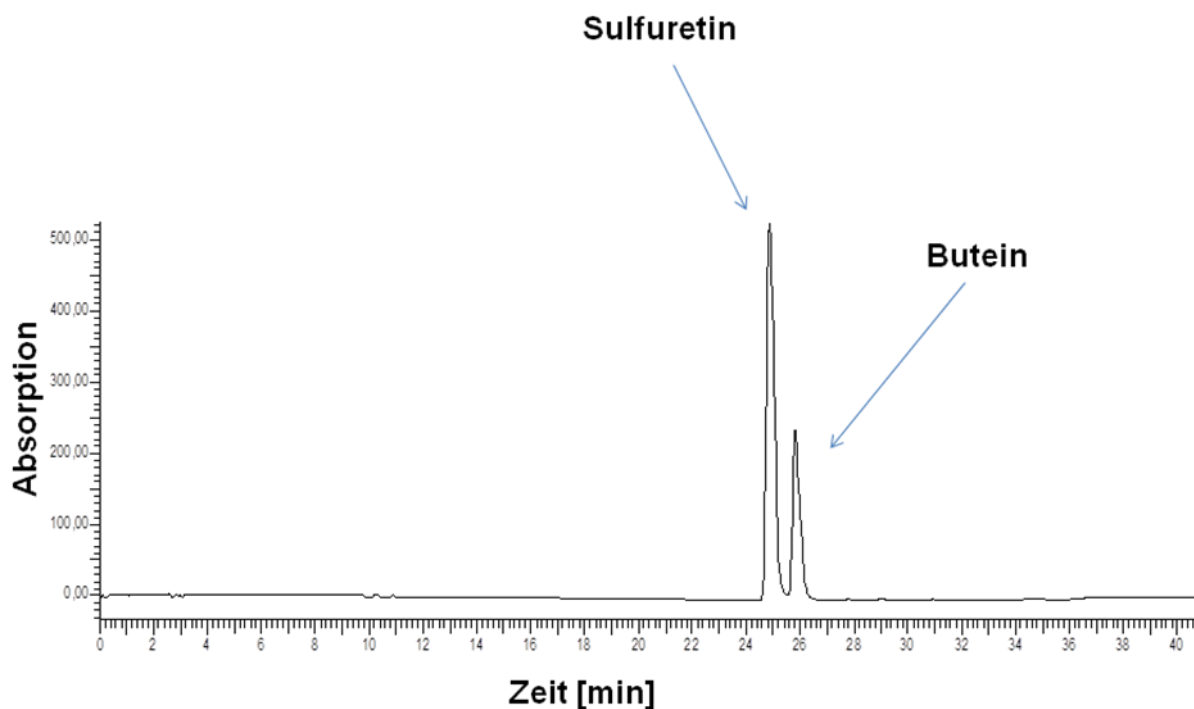


Abbildung 3.4: Chromatogramm HPLC Standards Sulfuretin und Butein

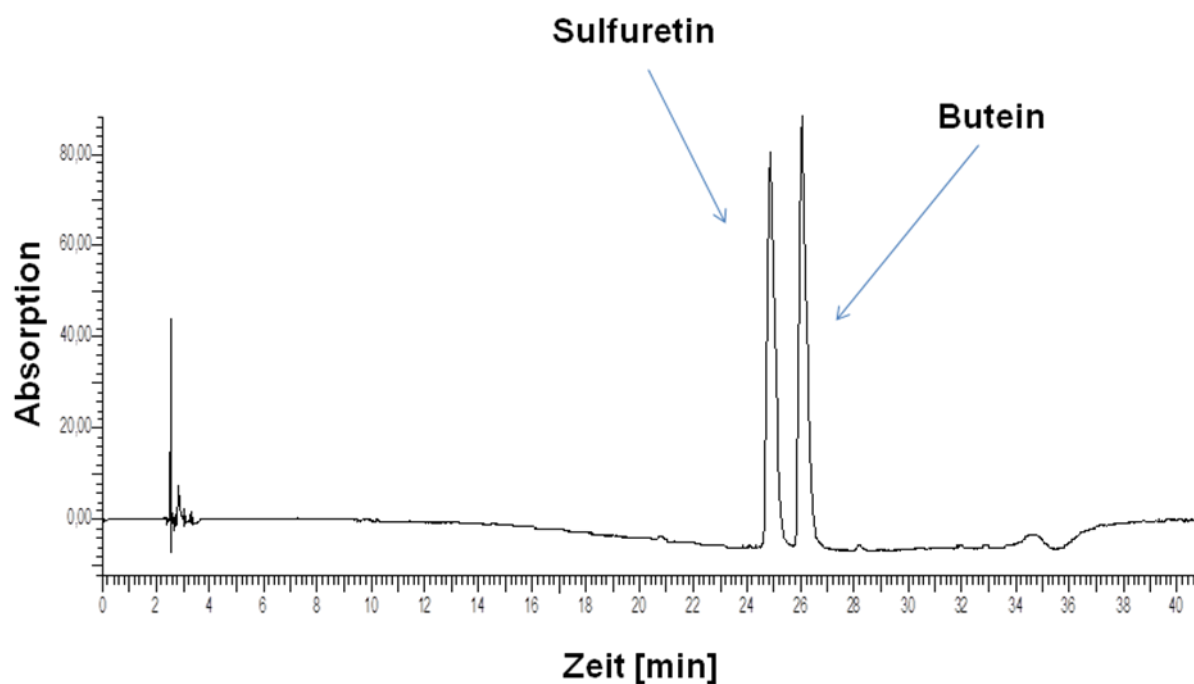


Abbildung 3.5: Chromatogramm HPLC des Rohextrakts aus Löwenmäulchen mit Butein als Substrat

Im ersten Chromatogramm sind die Standards von Butein und Sulfuretin aufgetragen, eindeutig zu sehen ist, dass bei der *rp*-HPLC in der Reaktionsmischung Sulfuretin zuerst eluiert wird. In Abbildung 3.5 ist das Chromatogramm der Probe mit Butein als Substrat zu sehen. Es wurde Sulfuretin gebildet, was auf aktive Aureusidinsynthase hinweist. Nun konnte

ausgeschlossen werden, dass sich in der *Antirrhinum majus* Golden Rocket keine Aureusidinsynthase befindet und das Isolierungsprotokoll wurde weiterhin angepasst.

3.3 Isolierung aus *Antirrhinum majus*

Durch den Zellaufschluß werden die Membranen und Zellwände zerstört, die die Kompartimente in der intakten Zelle trennen. Dadurch kann es passieren, dass Substanzen, vor allem die phenolischen Verbindungen, Proteine durch Anbindung inaktivieren bzw. das aktive Zentrum für das eigentliche Substrat unzugänglich machen. Aus diesem Grund ist es notwendig, bereits vor der Abtrennung der verschiedenen Proteine im Rohextrakt, alle störenden Verbindungen zu entfernen. Aufgrund der Komplexität der biologischen Systeme ist die Entwicklung eines geeigneten Isolierungsprotokolls oft zeitaufwändig und erfordert viele Experimente, um die Ausbeute des gewünschten Proteins zu erhöhen. Um Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen zu isolieren wurden verschiedene Isolierungsprotokolle getestet und anschließend photometrische Aktivitätstests durchgeführt.

3.3.1 Isolierungsprotokoll I

Begonnen wurde die Arbeit mit dem bereits etablierten Protokoll, welches auch für die Isolierung der Aureusidinsynthase aus Mädchenauge verwendet wird. Nach dieser Arbeitsvorschrift, wurde aus gefrorenem Blütenmaterial mit einem 125 mM Natriumcitratpuffer bei pH 5.4, der 0.5 % (w/v) Natriumascorbat und 4 % (v/v) Triton X-114 enthält, das Rohextrakt isoliert und in mehreren Schritten, mit Hilfe wässriger Zweiphasensysteme, die Farbstoffe und andere phenolische Substanzen abgetrennt.

3.3.1.1 Zweiphasentrennung mit Triton X-114

Triton ist ein nichtionisches Detergenz, welches durch Polymerisation von Octylphenol mit Ethylenoxid hergestellt. Triton X-114 enthält 7 bis 8 Ethylenoxideinheiten (siehe Abb. 3.6) [Lit. 16].

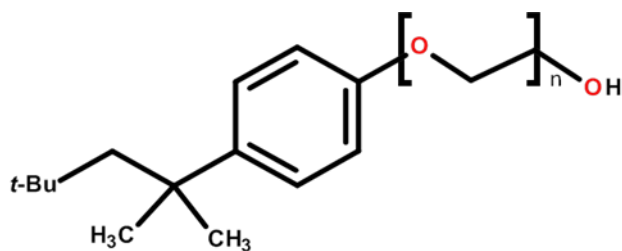


Abbildung 3.6: Triton X-114 $n=7-8$

Wie die meisten nichtionischen Detergenzien interagiert Triton X-114 mit der hydrophoben Region von Membranproteinen und führt so zur Mizellenbildung, wodurch das Protein aus der Membran gelöst wird. Wasserlösliche, hydrophile Proteine, wie z.B. die Aureusidinsynthase, werden durch Triton X-114 nicht beeinflusst und verbleiben in der wässrigen Lösung. Mit steigender Temperatur werden die Mizellen größer, bis zum so genannten *cloud point*, bei dem die Lösung trüb wird. Wird die Temperatur weiter gesteigert, kommt es zur Phasentrennung, wobei die Membranproteine bevorzugt in der Triton-reichen Phase, die löslichen Proteine bevorzugt in der wässrigen Phase verbleiben. Triton X-114 führt nicht wie andere Detergenzien, wie etwa Natriumdodecylsulfat (SDS), zur Denaturierung und ist aus diesem Grund für eine Vorreinigung bestens geeignet [Lit. 17]. Eine wässrige Lösung mit 1 % (v/v) Triton X-114 hat einen *cloud point* von 23 °C, eine Temperatur bei der Proteasen aktiv sind, welche Proteine abbauen. Durch die Zugabe von Elektrolyten wie z.B. Ammoniumsulfat sinkt der *cloud point* und eine Phasentrennung kann dadurch bei niedrigeren und damit für das Protein schonenderen Temperaturen erreicht werden. Bei Zugabe von 20 g/L Ammoniumsulfat zu einer 4 % (v/v) Tritonlösung stellt sich eine Phasentrennung bei ca. 8-12 °C ein. Dieser Effekt wurde bei der Isolierung ausgenutzt. Die Proteine werden zwischen den beiden Phasen verteilt, je hydrophiler ein Protein ist, desto eher orientiert sein Verteilungskoeffizient das Protein in Richtung wässrige Phase. Polyphenole zählen zu den hydrophoben Verbindungen und werden dementsprechend in der Tritonphase angereichert und anschließend abgetrennt. Um die Phenole möglichst quantitativ zu entfernen, wird nach dem Abtrennen der Triton-reichen Phase zur wässrigen Phase wieder 4% (v/v) Triton zugesetzt und so eine zweite und anschließend dritte Phasentrennung durchgeführt.

3.3.1.2 Zweiphasentrennung PEG 4000

Polyethylenglykol (PEG) ist ein Polymer, dass in vielen Bereichen Anwendung findet. Es ist chemisch inert, nicht-toxisch und wasserlöslich.

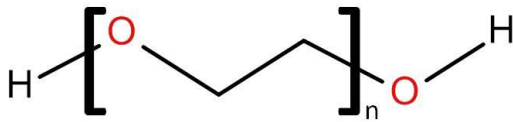


Abbildung 3.7: Polyethylenglykol

Aufgrund dieser Eigenschaften wird es zur Zweiphasenextraktion eingesetzt. Wässrige Zweiphasensysteme werden entweder durch Verwendung zweier unterschiedlicher Polymere (z.B. PEG und Dextran) oder mit Hilfe eines Polymers und Salzes (z.B. PEG und Ammoniumsulfat) hergestellt. Im Fall des PEG/Salz Systems wird ab einer bestimmten Salz- bzw. PEG-Konzentration in wässriger Lösung eine PEG-reiche Oberphase und eine salzreiche untere Phase ausgebildet. Neben der Konzentration sind pH Wert, Temperatur und das Molekulargewicht des Polymers entscheidende Parameter für die Ausbildung solcher Phasen [Lit. 18].

Proteine werden aufgrund sterischer Effekte aus der PEG-haltigen Phase ausgeschlossen und so in die detergenzarme, salzhaltige Phase verdrängt. Dieser Effekt wird auch benutzt um Proteine abhängig von der PEG Konzentration auszufällen. Sowohl die Größe des Proteins als auch die des Polymers spielen dabei eine wichtige Rolle. Im Zweiphasensystem verdrängt PEG die Proteine, während die Phenole Großteils in der PEG-reichen Phase verbleiben [Lit. 19].

Zur Zweiphasentrennung wurde hier PEG 4000, also Polyethylenglykol mit mittlerer Molmasse 4000 g/L, verwendet. An diesem Punkt der Isolierung beläuft sich die Salzkonzentration auf 30 % Sättigung Ammoniumsulfat. Bei dieser Salzkonzentration kommt es, bei der Arbeitstemperatur von 4 °C und einer PEG 4000 Konzentration zwischen 5 und 3 % (w/v), zur Phasentrennung.

Um diesen Effekt zu nutzen und die Phenole möglichst quantitativ zu entfernen wurden drei aufeinanderfolgende Phasentrennungen durchgeführt, wobei die PEG Konzentration von zunächst 5 % (w/v) im zweiten Schritt auf 4 % (w/v) und im letzten Extraktionsschritt auf 3 % (w/v) herabgesenkt wurde.

3.3.1.3 Fällung mit Ammoniumsulfat

Die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat ist eine gängige Methode um Proteinmischungen einer Vorreinigung zu unterziehen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass durch Erhöhen der Salzkonzentration die Hydrathülle der Proteine entfernt wird, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen verstärkt werden. Ab einer, für das Protein spezifischen, Salzkonzentration, fällt es aus. Ammoniumsulfat wird dabei bevorzugt als Salz genutzt, da es Wasserstoffbrücken nicht bricht und so nicht denaturierend auf das Protein wirkt. Generell wird Ammoniumsulfat bis zu einem bestimmten Sättigungsgrad zur Proteinlösung zugegeben, gerührt und schließlich durch Zentrifugation das Pellet abgetrennt. Die Aureusidinsynthase fällt im Sättigungsbereich 30 % bis 70 % aus [Lit. 20]. Es wurde nach den Tritonphasentrennungen eine erste Fällung bei 30 % Sättigung durchgeführt um eine Vorreinigung zu erwirken. Außerdem konnte bei dieser Salzkonzentration eine optimale PEG-Salz-Phasentrennung erreicht werden (siehe Kapitel 3.3.1.2). Am Ende der Zweiphasenextraktionsschritte wurde mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung gefällt und dieses Pellet in 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 aufgenommen. Durch diesen Schritt wurde außerdem das Natriumascorbat entfernt, welches als Antioxidanz bei der Isolierung absolut notwendig ist, jedoch den Aktivitätstest stört.

In Abbildung 3.8 ist das Isolierschema kurz zusammengefasst.

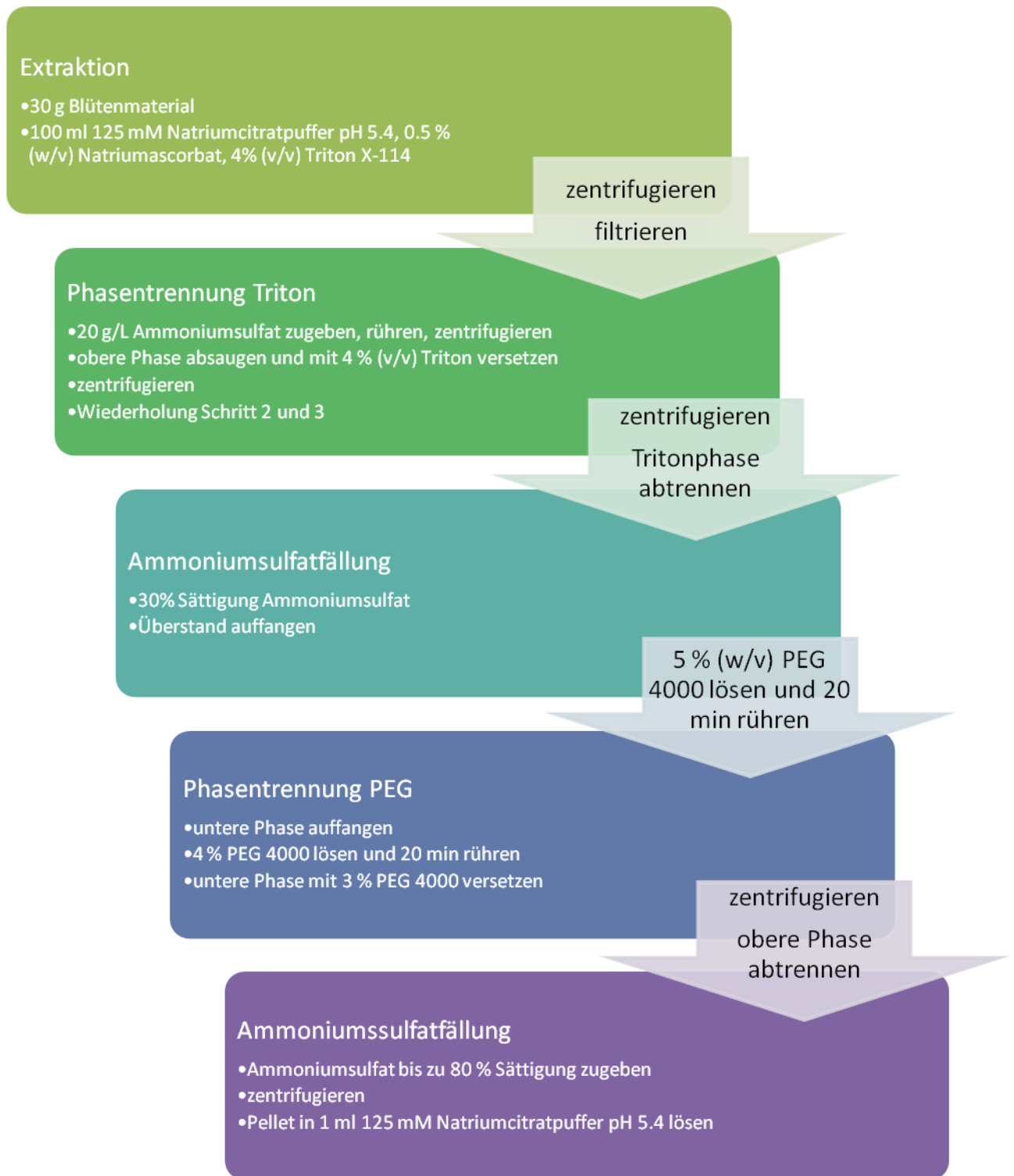


Abbildung 3.8: Isolierschema I

Es konnte auch nach dem mehrmaligen Wiederholen dieser Isolierungsmethode keine Aktivität im erhaltenen Rohextrakt gefunden werden. Auch die Abtrennung der Farbstoffe war nicht zufriedenstellend. Selbst nach der letzten PEG Zweiphasentrennung war die Proteinlösung eindeutig noch gelb gefärbt. Es wurden in Folge einzelne Schritte des Protokolls geändert, zum Beispiel wurden

andere PEG 4000 Konzentrationen getestet. Jedoch führten die Änderungen in Bezug auf die Abtrennung der Farbstoffe zu schlechteren Ergebnissen und konnten dennoch nicht zu einer positiv nachgewiesenen Aktivität führen.

Von einer säulenchromatographischen Reinigung wurde abgesehen, da hierfür nahezu farbloses Rohextrakt notwendig ist. Nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung wurde das Protein in maximal 1 ml Puffer aufgenommen und anschließend ein Aktivitätstests mit bis zu 50 µl Rohextrakt durchgeführt. Auch die Verwendung unterschiedlicher Substrate führte hierbei nie zu einem positiven Ergebnis.

3.3.2 Isolierungsprotokoll II

Zur Vorbereitung für die Aktivitätsbestimmung in der HPLC wurde nach dem Konzept von FR. DR. HALBWIRTH isoliert. Die Methode ist in Abbildung 3.9 kurz zusammengefasst.

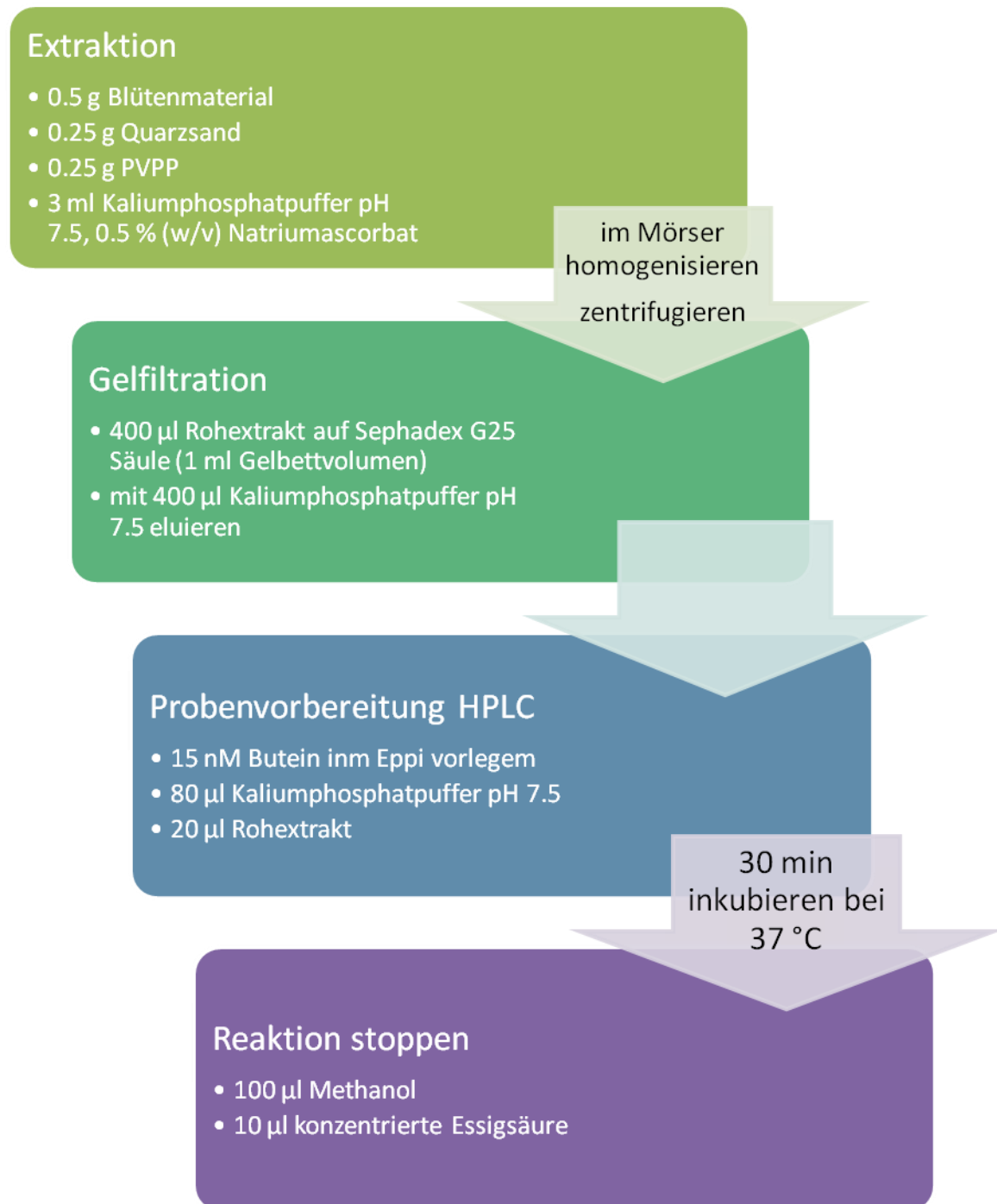


Abbildung 3.9: Isolierschema II

Das Verreiben mit Quarzsand ist eine beliebte, mechanische Aufschlußmethode. Durch die scharfkantigen Sandteilchen werden die Zellwände der Pflanzenzellen beim homogenisieren zerstört. Polyvinylpolypyrrolidon ist ein unlösliches Polymer, dass Phenole bindet und anschließend abzentrifugiert wird.

3.3.2.1 Gelfiltration

Um nach dem Zentrifugationsschritt weiter Phenole abzutrennen wurde vor der Probenvorbereitung noch ein Reinigungsschritt über *size exclusion chromatography*, auch Gelfiltration genannt, durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde Sephadex G25 eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Dextranpolymer, welches durch Quervernetzung der organischen Seitengruppen der Polysaccharidketten eine dreidimensionale Struktur erhält. Im Gel entstehen so Poren mit, je nach Vernetzungsgrad, definierter Porengröße. Ist ein Molekül (wie z. B. Biomoleküle) zu groß um in diese Poren einzudringen, wird es nicht retardiert und eluiert somit sobald das Volumen der mobilen Phase, das des *interparticle* Säulenvolumens (meist ca. 35 % des Säulenvolumens) überschreitet. Die kleineren Bestandteile der aufgetragenen Lösung, können in die Poren eindringen und werden somit erst eluiert wenn das Volumen der mobilen Phase größer als die Summe des *interparticle* Volumens und Porenvolumens ist. Es werden in diesem Beispiel auf eine Säule mit 1 ml Säulenvolumen 400 µl der Probelösung aufgetragen, was in etwa dem *interparticle* Säulenvolumen entspricht. Durch Zugabe von 400 µl Puffer wird das Protein eluiert, während Farbstoffe und das Salz auf dem Säulenmaterial verbleiben. Diese Methode wird also gleichzeitig zur Entsalzung und zur Abtrennung der niedermolekularen Verbindungen genutzt.

Die Menge Blütenmaterial pro Isolierung ist bei dieser Methode jedoch stark begrenzt, da für die Gelfiltration Schritt hier eine vergleichsweise hohe Menge Säulenmaterial verwendet werden muss. Dies gestaltet sich als teuer und außerdem erhöht sich die Zeit, in der sich das Protein im Rohextrakt befindet erheblich. Nachdem im kleinen Maßstab keine Aktivität photometrisch bestimmt werden konnte wurde an diesem Protokoll nicht mehr weitergearbeitet. Für die viel empfindlichere HPLC reichen diese kleinen Proteinmengen zwar aus, jedoch ist das Ziel der Arbeit Aureusidinsynthese in für die Charakterisierung ausreichenden Mengen zu isolieren, was einen größeren Maßstab voraussetzt. Auch in bisherigen Arbeiten, wurden große Mengen Blütenmaterial eingesetzt, so konnten Nakayama *et al.* ausgehend von 32 kg Blütenmaterial ca. 90 µg reines Protein isolieren [Lit. 5].

3.3.3 Isolierungsprotokoll III

Das Prinzip des Isolierungsprotokolls II, das gleich zu Beginn der Extraktion möglichst viele niedermolekulare Substanzen aus dem Rohextrakt entfernt, wurde übernommen und gemeinsam mit MAG. STEPHAN MAURACHER ein anderes Isolierungsprotokoll erarbeitet, dass diese Eigenschaft ebenfalls besitzt. Im Gegensatz zu allen bisherigen Methoden, wird hierbei zu Beginn nicht das Protein in Lösung gebracht. Die PEG 4000 Konzentration wurde über der Ausfallgrenze des Proteins eingestellt, so gehen nur die niedermolekularen Bestandteile in Lösung. Durch mehrmaliges Waschen des Pellets, wird gleich zu Beginn ein

Großteil der Farbstoffe und redoxaktiven Substanzen entfernt, wodurch spätere Interferenzen mit dem Protein im Voraus unterbunden werden.

Nachdem das Blütenmaterial inzwischen begrenzt war, wurde zunächst ein kleiner Ansatz mit 30 g Blütenmaterial gestartet.

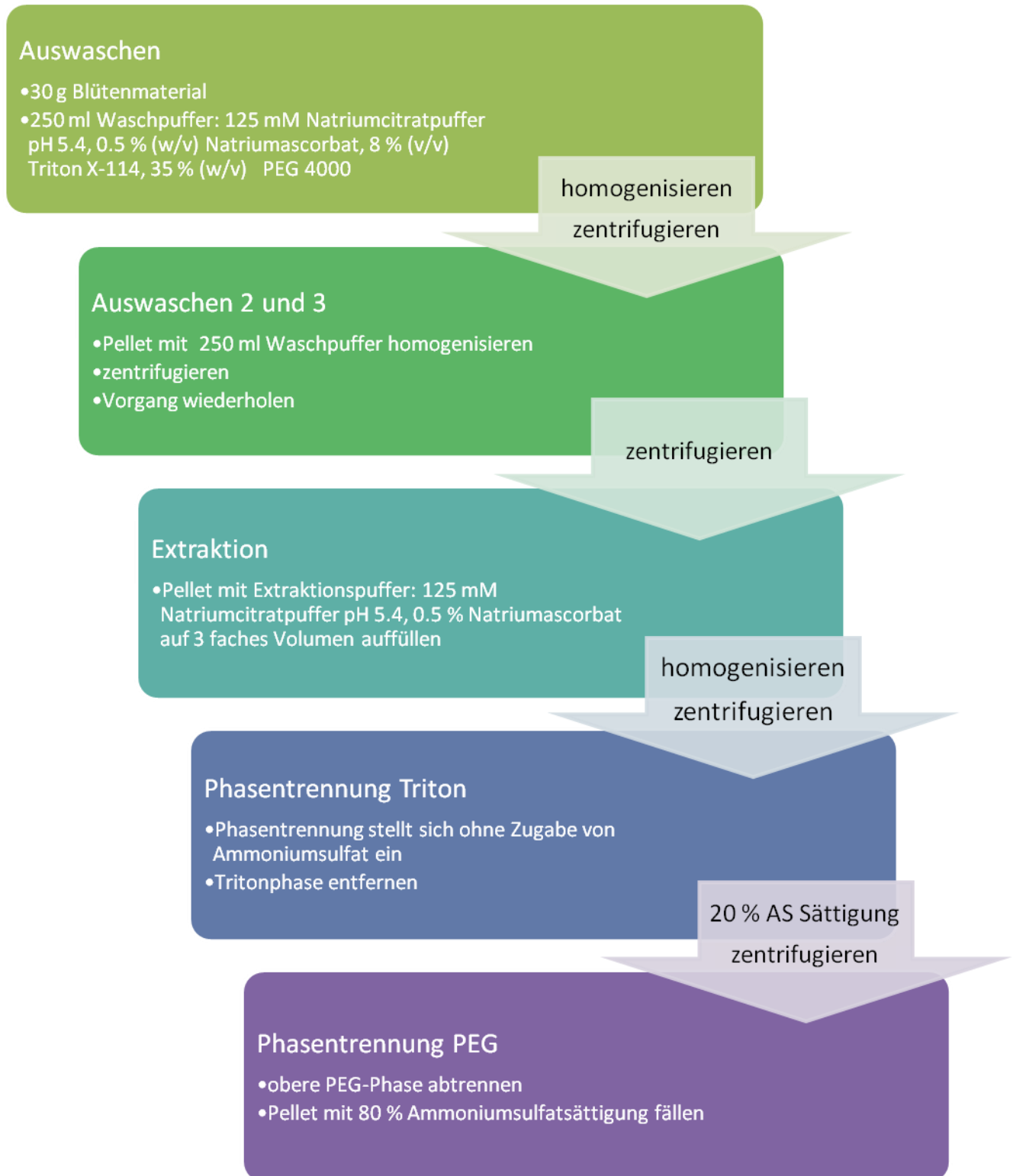


Abbildung 3.10: Isolierschema III

Nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung wurde über eine Mini-SEC das Salz entfernt und dabei das Protein von niedermolekularen Substanzen getrennt (siehe Abbildung 3.12).

Die Fraktion wurde nun für einen Aktivitätstest eingesetzt und es konnte nun photometrisch Enzymaktivität mit Butein gemessen werden. Es wurden unterschiedliche Mengen der Proteinlösung eingesetzt.

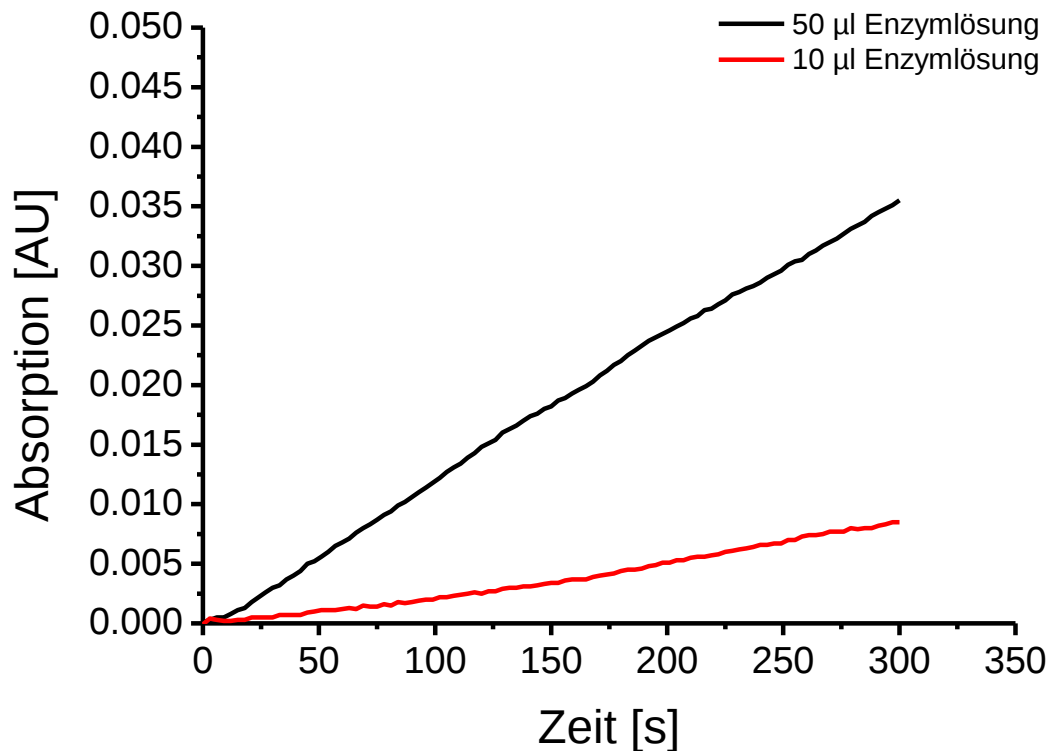


Abbildung 3.11: Aktivität der Aureusidinsynthase mit Butein als Substrat in 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4

3.3.4 Säulenchromatographie

3.3.4.1 *Size Exclusion Chromatography SEC*

Das Prinzip der SEC wurde bereits unter 3.3.2.1 erklärt. Im Unterschied zur dort genannten Methode, wurde hier die Probe mit Hilfe der FPLC aufgetragen und eluiert (siehe Abbildung 3.12).

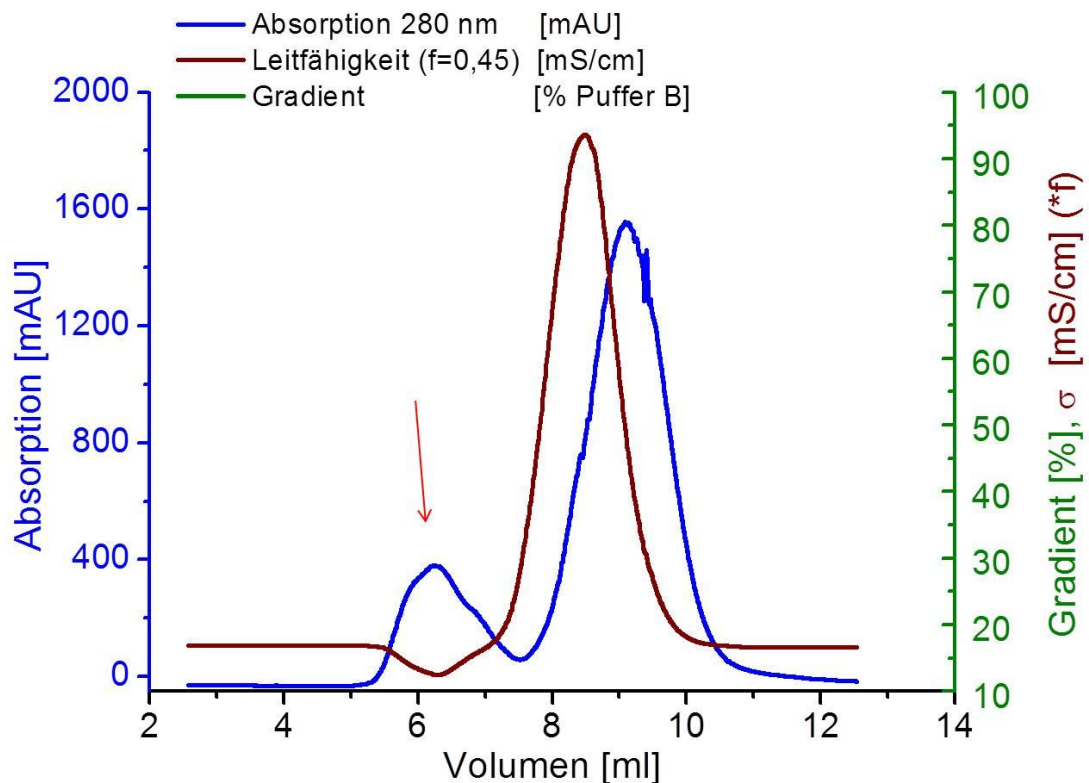


Abbildung 3.12: Elutionsprofil Entsalzung des Rohextrakts aus Löwenmäulchen mittels SEC

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, steigt die Absorption bei 280 nm vor dem Salzpeak an (siehe Markierung Pfeil). Diese Fraktion wurde gesammelt und photometrisch Enzymaktivität gemessen (siehe Abb. 3.11). Nachdem nun ein erfolgreiches Isolierungsprotokoll gefunden war, wurde die Isolierung umgehend in größerem Maßstab wiederholt. Das Verhältnis Blütenmaterial zu Waschpuffer musste unbedingt beibehalten werden, um die selben Bedingungen reproduzieren zu können. Die größtmögliche Zentrifuge, die zur Verfügung stand, konnte maximal 3 L Volumen in einem Schritt zentrifugieren. In mehreren Schritten zu zentrifugieren, hätte die Gesamtdauer der Isolierung erheblich gesteigert, was in einem Aktivitätsverlust resultiert. Aus diesem Grund wurden maximal 300 g Blütenmaterial pro Isolierung eingesetzt um weiterhin die Durchführung in je einem Zentrifugationsschritt pro Isolierungsschritt zu gewährleisten.

Auf die Entsalzung über die SEC wurde bei diesem Ansatz verzichtet. Stattdessen wurde die Probe umgepuffert und bis zu einer für die SP Sepharose Säule geeigneter Leitfähigkeit verdünnt.

3.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie SP Sepharose fast flow

Die *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) bietet die Möglichkeit, Proteine nach den unterschiedlichsten Eigenschaften zu trennen. Neben der bereits erwähnten SEC, wo die Größe als Trennparameter verwendet wird, werden in der Ionenaustauschchromatographie Proteine aufgrund ihrer, durch die Aminosäuresequenz determinierten, Nettoladung bei definierten pH Werten unterschieden.

Sepharose besteht aus den quervernetzten Polysacchariden Agarose und ist ein in der Chromatographie häufig eingesetztes Trägermaterial. Die SP Sepharose zählt zu den starken Kationenaustauschern und trägt Sulfopropylgruppen, die die Anbindung von positiv geladenen Proteinen ermöglicht. Die Proteinlösung wird in einem Puffer mit geringer Ionenstärke aufgetragen. Liegt der pI des Proteins nun in einem basischeren Bereich als der pH Wert der mobilen Phase, weist das Protein eine positive Nettoladung auf und kann an die stationäre Phase binden. Eluiert wurde durch Erhöhung des Salzanteils im Puffer, im Regelfall durch graduelle Erhöhung des Anteils Puffer B (Natriumacetatpuffer 30 mM pH 5.4 1M NaCl). Die Natriumionen weisen stärkere Affinität zu den Ankergruppen der SP Sepharose auf und verdrängen so das gebundene Protein. Die Proteine werden abhängig von ihrer Bindungsstärke und damit abhängig von ihrer Nettoladung nacheinander eluiert.

Mit Hilfe der Aminosäuresequenz eines Proteins, lässt sich der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins näherungsweise berechnen. Im Fall der Aureusidinsynthese auf Löwenmäulchen ergibt sich ein theoretischer pI von ca. 6.29.

Die Leitfähigkeit der nach 3.3.4.1 erhaltenen Probe wurde, durch Verdünnen mit 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4, vor der Auftragung auf die Säule auf 7 mS/cm² abgesenkt.

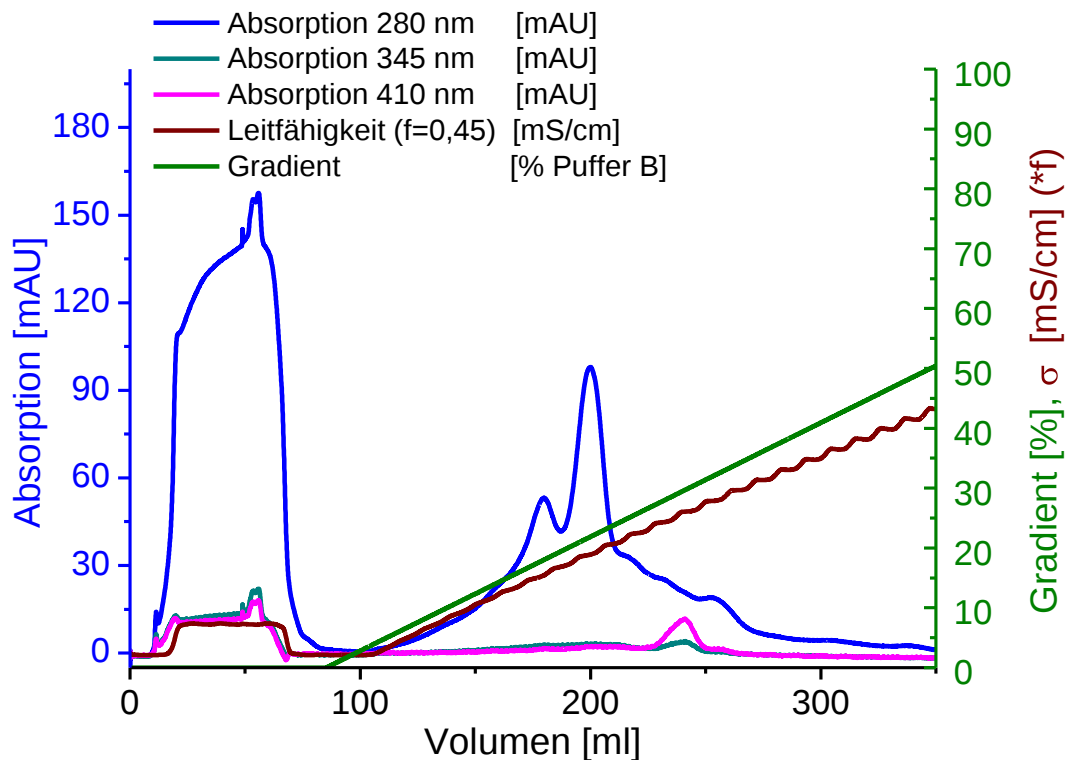


Abbildung 3.13: Elutionsprofil SP Sepharose des Rohextrakts aus Löwenmäulchen in 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4 bei 4°C

In den Proteinfractionen die erst bei höherer Leitfähigkeit eluierten, konnte keine Aktivität festgestellt werden. Es wurde bereits vor der graduellen Erhöhung der Salzkonzentration Protein eluiert (siehe Abbildung 3.13). Diese Fraktionen wurden gesammelt und zeigten am UV/Vis Spektrophotometer Aktivität. Anschließend wurde aufkonzentriert und auf 20 mM Natriumascorbatpuffer pH 5.4 umgepuffert. Das Probenvolumen wurde auf 1 ml eingeeengt und zur weiteren Auftrennung auf die Mono S aufgetragen.

3.3.4.3 Ionenaustauschchromatographie Mono S

Mono S ist wie die SP Sepharose ein Kationenaustauschermaterial und trägt Sulfonylgruppen als Ankergruppen. Der größte Unterschied zur SP Sepharose besteht im Trägermaterial. Dieses besteht aus Polystyrol-Divinylbenzol-Kunsthäuten den *MonoBeads*. Diese Partikel ermöglichen durch ihren geringen Durchmesser hohe Flussraten ohne zu einem Überdruck in der Säule zu führen. Mono S Säulen ermöglichen im Vergleich zu SP Sepharose höhere Trennleistungen.

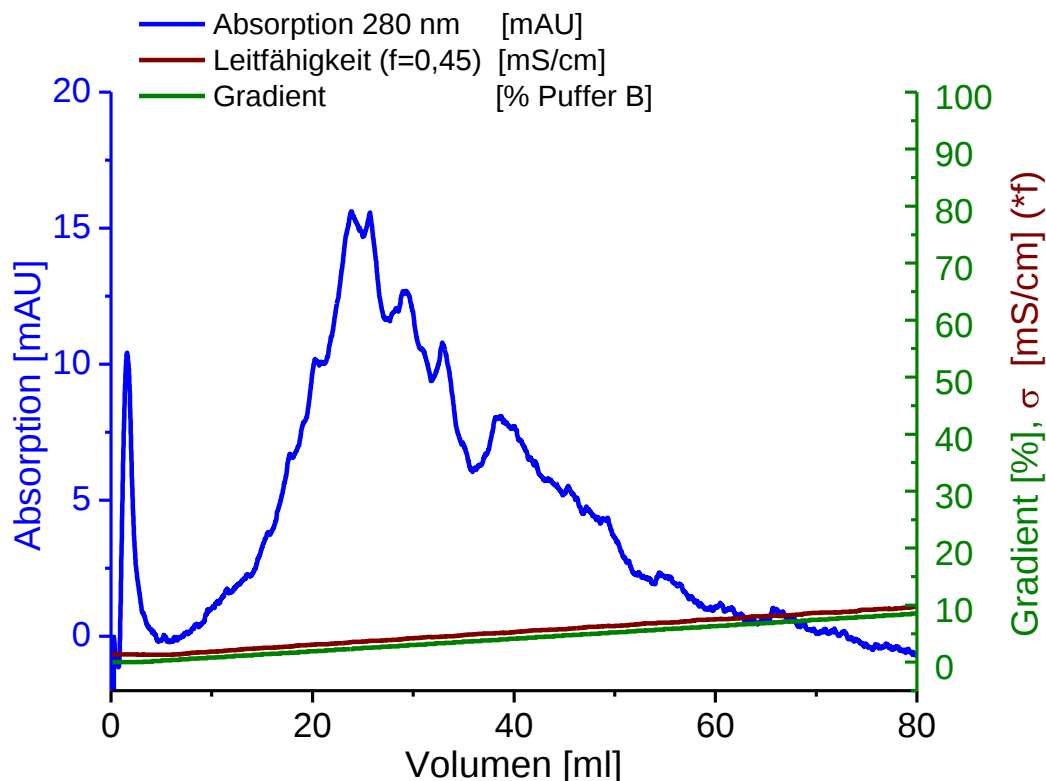


Abbildung 3.14: Elutionsprofil Mono S des Rohextrakts aus Löwenmäulchen in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4 bei 4 °C

Die Trennung über die Mono S konnte nicht zufriedenstellend realisiert werden. In Abbildung 3.14 ist zu sehen, dass keine eindeutige Auflösung der Peaks erreicht werden konnte. Die Aktivität aller erhaltenen Fraktionen wurde photometrisch bestimmt.

In keiner der Fraktionen konnte Aktivität photometrisch bestimmt werden. Durch die wiederholten Reinigungsschritte war die Konzentration des Zielproteins unter die detektierbare Menge abgesunken.

3.4 Vergleich der Enzymaktivität mit Aureusidinsynthase aus anderen Quellen

Neben der Isolierung und Charakterisierung der Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen, sollten noch Enzymaktivitäten in anderen Blütenmaterialien verglichen werden, um potentielle neue Quellen zu finden.

Zunächst wurden zum Vergleich der Enzymaktivität gefrorene Blütenmaterialien der *Coreopsis lanceolata* und *Dahlia sp.* eingesetzt. Die Isolierung wurde nach dem Isolierungsprotokoll I (siehe Abb. 3.8) durchgeführt. Die Reinigung wurde

aus Zeitgründen bereits nach erfolgter Tritonphasentrennung abgebrochen und hier die Aktivität photometrisch bestimmt. Im Mädchenauge und in der Dahlie konnte bereits an diesem Schritt Aktivität im Rohextrakt gemessen werden, während das Löwenmäulchen wie erwähnt keine Aktivität zeigte. Als Substrat wurde hier PHC bei pH 5.4 verwendet, da dieses für die Aureusidinsynthese aus Mädchenauge und Dahlie gute Umsatzraten zeigte.

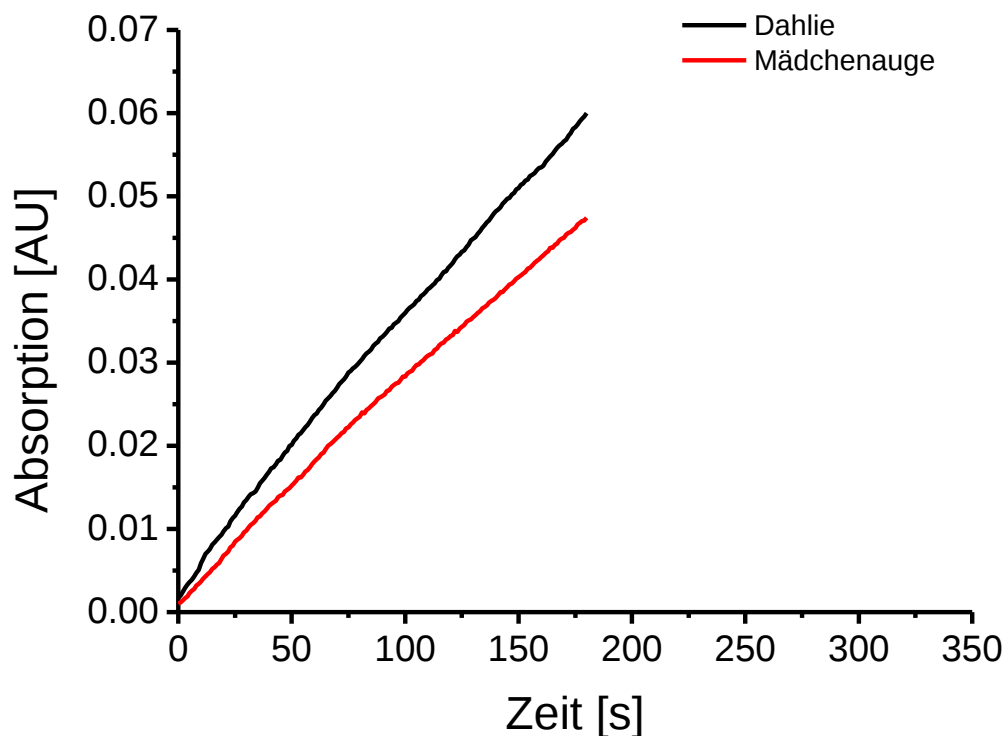


Abbildung 3.15: Vergleich der Enzymaktivität der Aureusidinsynthese aus Dahlie und Mädchenauge, mit PHC als Substrat in 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 gemessen

Die Isolierung erfolgte parallel und es wurden gleiche Blüten- und Puffermengen eingesetzt. Wie hier zu sehen ist, zeigt die Dahlie etwas höhere Aktivität im Rohextrakt. Um zu klären ob die Aureusidinsynthese in der *Dahlia sp.* höhere Aktivität zeigt, oder ob der stärkere Anstieg durch größere Enzymmengen begründet ist, muss eine chromatographische Auftrennung der Enzyme durchgeführt werden. Nach diesen Erkenntnissen, stellt die Dahlie eine geeignete Aureusidinsynthesequelle dar.

4. Flavon Synthase

Die Flavon Synthase aus Petersilie zu isolieren erwies sich als am sinnvollsten. Die Existenz der FNS-I in diesem Organismus war bereits bestätigt und vieles bereits charakterisiert. In der aktuellen Literatur konnte kein Isolierungsprotokoll für die Isolierung aus dem Pflanzenmaterial gefunden werden, jedoch wurde FNS-I bereits erfolgreich aus mit UV-Licht bestrahlten Zelllinien der *Petroselinum crispum* isoliert. Bisher konnte bei der Isolierung aus dem Zellmaterial keine zufriedenstellende Ausbeute erreicht werden (aus 2.3 kg Zellmaterial wurden ca. 150 µg homogener FNS-I gewonnen) was einerseits an der geringen Verfügbarkeit und andererseits an der relativen Instabilität des Proteins liegt [Lit. 13, Lit. 21]. Um in Zukunft ein optimiertes Isolierungsprotokoll entwickeln zu können sollte nun eine Möglichkeit gefunden werden, die Proteinaktivität photometrisch zu messen. Dazu wurde die unter 1.3.2 bereits erwähnte Reaktion als Grundlage verwendet.

4.1 Isolierung

Als lösliches Protein, welches im Cytoplasma der Zellen vorkommt wurde der pH 7.5 als möglichst native Bedingung zu Isolierung ausgewählt. Außerdem wurde der stabilisierende Effekt von Ascorbat im Isolierungspuffer bereits festgestellt und aus diesem Grund auch hier dem Extraktionspuffer zugegeben. Es wurde immer frisch gepflücktes Material verwendet, da der Prozeß des Einfrierens und Auftauens ebenfalls zu Proteinverlusten führt. Das schock frieren mit flüssigen Stickstoff wirkt sich negativ auf die Ausbeute aus. Um den Zellaufschluß zu optimieren wurden 4 % (v/v) Triton zugegeben, vor allem weil diese Konzentration bei der späteren Ausbildung einer Phasentrennung hilfreich ist (siehe dazu 3.3.1.1). Nun wurde das Material mit dem Isolierungspuffer gemixt und nach dem Abzentrifugieren durch Zugabe von 20 g/L Ammoniumsulfat eine Tritonphasentrennung erreicht. Anschließend wurden durch Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration bis zur 30 % Sättigung Farbstoffe ausgefällt und anschließend bei 80 % Sättigung das Protein ausgefällt und für die weiteren Tests in wenig Puffer aufgenommen (siehe Abbildung 4.1).

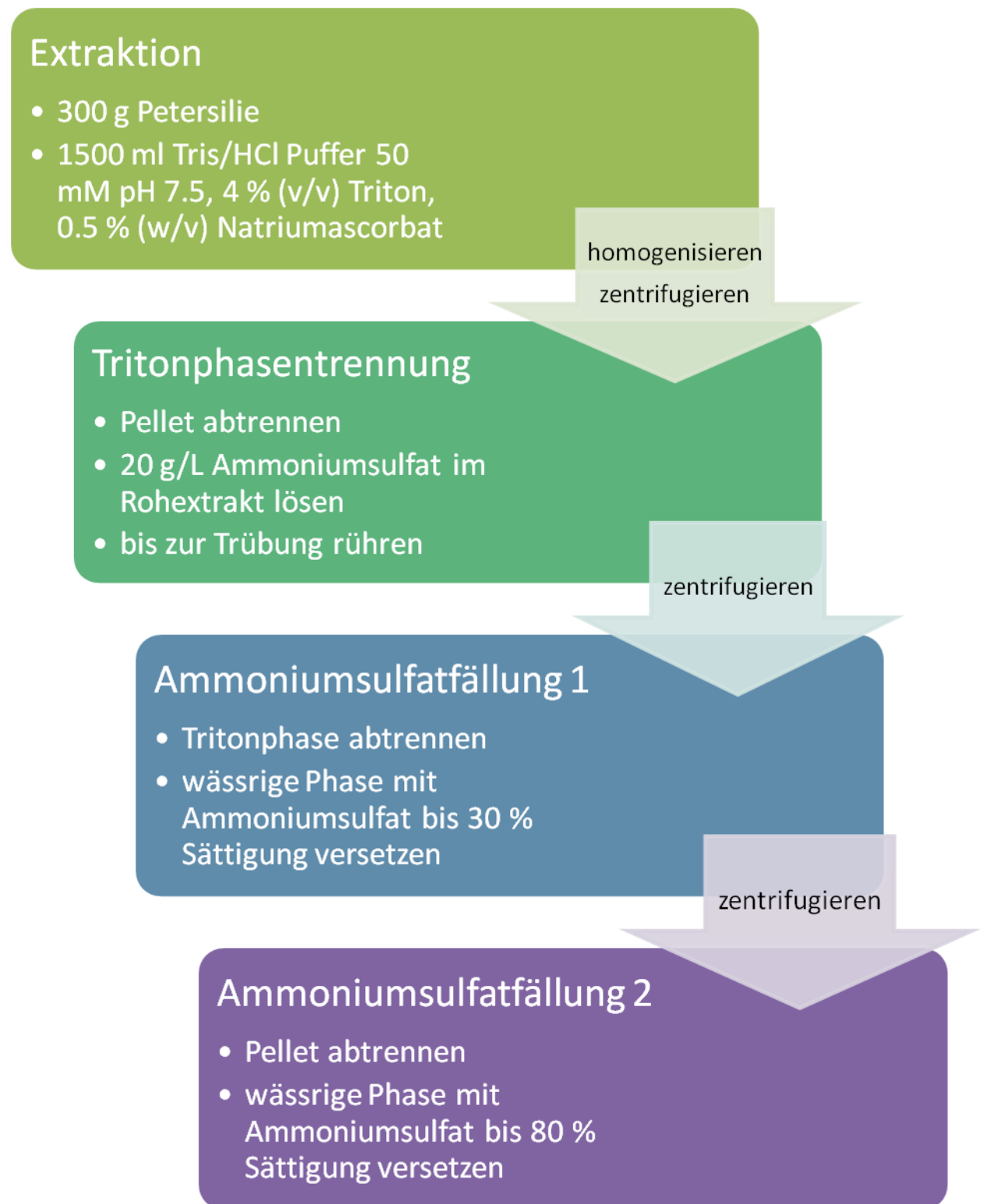


Abbildung 4.1: Isolierschema A

Nachdem auch nach der weiteren Reinigung und Aufkonzentrierung keine Aktivität bestimmt werden konnte (siehe Kapitel 4.4.1) wurde als zweite Isolierungsmethode das Prinzip der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode auch für die Petersilie angewandt. Auf die Gelfiltration wurde allerdings verzichtet und gleich das Rohextrakt zur Bestimmung der Aktivität nach der Methode Aktivitätstest II (siehe auch 4.4.2) eingesetzt. Durch die kurze Dauer dieser

Isolation und die Verwendung von Sand beim Aufschluß wurden bessere Ausbeuten erwartet.

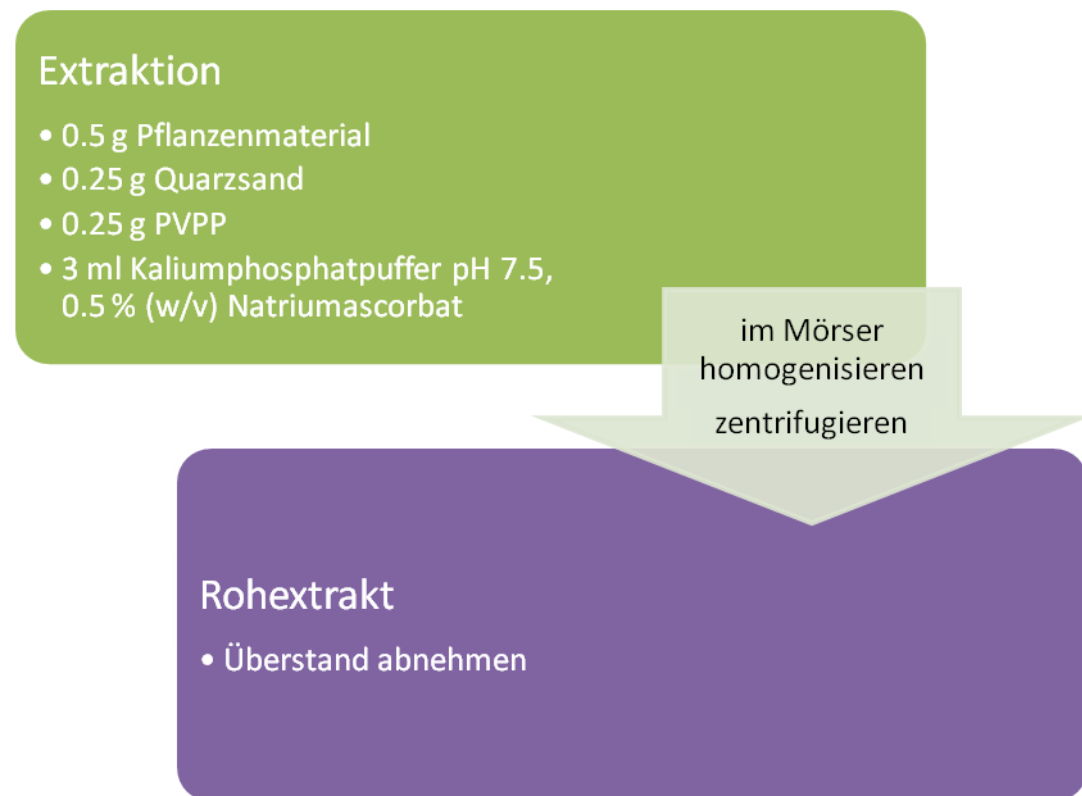


Abbildung 4.2: Isolierschema B

4.2 Reinigung durch fraktionierte AS Fällung

Viele Proteine der Flavonoid Biosynthese gehören zu der Klasse der 2-ODs. Nachdem die Co-Faktoren für alle 2-ODs nahezu gleich sind, lässt sich nicht verhindern, dass in einem Proteingemisch mehrere Proteine der Flavonoid Biosynthese gleichzeitig aktiv sind. Diese verwenden zum Teil die gleichen Substrate, was die Messung der Aktivität weiter erschwert. Wie bereits mehrfach erwähnt spielt der Faktor Zeit bei der Isolierung eine große Rolle. Deswegen wurde eine Methode gesucht um bereits vor der säulenchromatographischen Reinigung möglichst viele Fremdproteine abzutrennen und auf diese Weise erfolgreich Enzymaktivität bestimmen zu können. Als schnelle Methode wurde dazu die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat ausgewählt (siehe auch 3.3.1.3). In diesem Experiment wurde dem Isolierungspuffer kein Triton X-114 zugegeben, da auf eine zeitaufwändige Phasentrennung verzichtet werden sollte und Triton X-114 bei photometrischen Messungen störend sein kann. Es wurde mit 30 %iger Ammoniumsulfatsättigung begonnen und anschließend nach Abtrennung der Pellets die Sättigung jeweils um 10 % erhöht. Alle Pellets wurden in 300 µl 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5 aufgenommen und die Änderung der

Absorption bei 370 nm gemessen. Die Konzentrationen der Co-Faktoren wurden wie in 4.4.1 beschrieben gewählt. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch keine Katalase zugegeben, da die Rolle dieses Enzyms für den Aktivitätstest erst zu einem späteren Zeitpunkt erkannt wurde. Aufgrund der allgemein schlechten Ausbeuten bei diesem Fällungsexperiment, wobei meist kaum sichtbare Pellets entstanden, wurde dieses Experiment auch später nicht mehr wiederholt.

Beobachtet wurde, dass unter den eingestellten Bedingungen eine Reaktion auch ohne Zugabe von Rohextrakt stattfindet, die zu einer Zunahme der Absorption bei 370 nm führt. Es wurden alle gewonnenen Pellets in Puffer aufgenommen und es konnte keine Zunahme des Absorptionsanstiegs nach Zugabe des entsprechenden Rohextrakts gemessen werden.

4.3 Säulenchromatographie

Um eine höhere Konzentrierung des FNS-I zu erreichen und weiter andere, um das Substrat konkurrierende Enzyme zu entfernen wurde nun die Auftrennung über eine SP Sepharose *fast flow* Säule durchgeführt. Die Sequenz der FNS-I aus *Petroselinum crispum* war bereits bekannt und der isoelektrische Punkt des Proteins wurde aus der Aminosäuresequenz als 5.7 näherungsweise berechnet. Aus diesem Grund wurde ein Kationenaustauscher gewählt (siehe dazu auch 3.3.4.2). Die hohe Salzkonzentration im Rohextrakt wurde verdünnt, bis eine Leitfähigkeitsmessung einen Wert unter 3 mS/cm^2 ergab. Die Trennung über die SP Sepharose Säule wurde in 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5 durchgeführt.

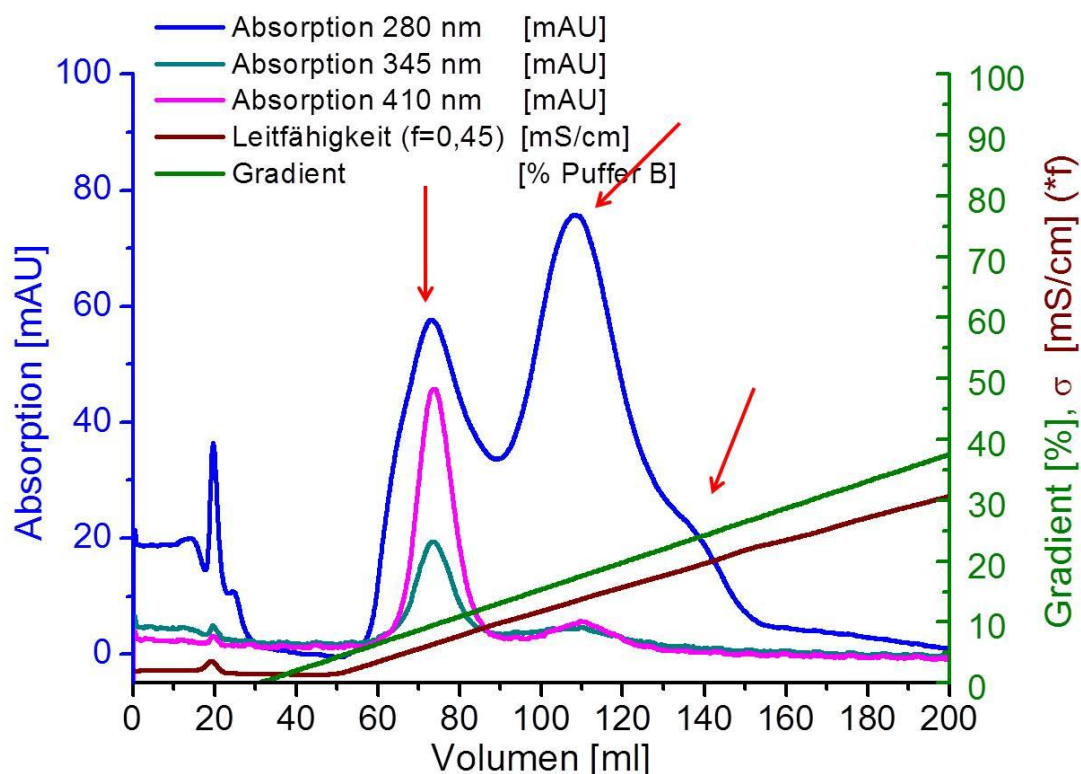


Abbildung 4.3: Elutionsprofil SP Sepharose Rohextrakt aus Petersilie in 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5

Die Fraktionen zu jedem Proteinpeak wurden gesammelt (siehe Pfeilmarkierungen) und über Zentrifugation in *VivaSpins* bis zu 1 ml aufkonzentriert. Die so erhaltenen Proteinlösungen wurden Probe 1, 2 und 3 benannt und die in Kapitel 4.4.2 als Aktivitätstest II bezeichnete Methode zur Bestimmung der Aktivität angewandt.

4.4 UV/Vis spektroskopische Detektion

4.4.1 Aktivitätstest I

Um photometrisch die Umsetzung von Naringenin in Apigenin messen zu können, ist es notwendig eine Änderung in der Absorption zu erreichen, die die Empfindlichkeit des UV/Vis Spektrometers übersteigt.

Die bis jetzt in der Literatur dokumentierten Aktivitätsmessungen beruhen auf der Verwendung der HPLC um die Bildung von Apigenin zu verfolgen. Für den positiven Nachweis von Aktivität *in vitro* sind, neben dem Protein und dem Substrat, 2-Oxoglutarat, Ascorbat und Fe^{2+} Ionen in der Reaktionsmischung notwendig. Die Rolle des 2-Oxoglutarats wurde in Kapitel 1.3 bereits geklärt. Das

Ascorbat in der Lösung verhindert die Autooxidation des Fe(II)-Zentrums, was zur Inaktivierung des Proteins führen würde. Die genaue Rolle des gelösten Fe^{2+} bei der *in vitro* Umsetzung ist nicht geklärt, jedoch wurde gezeigt, dass ohne Fe^{2+} keine Aktivität messbar ist. Grund hierfür mag die labile Bindung des Fe (II) im aktiven Zentrum sein, welche durch das gelöste Eisenion stabilisiert wird.

Die höchsten Aktivitäten konnten an der HPLC mit 1 mM Natriumascorbat, 50 μM Fe(II)SO_4 , 160 μM 2-Oxoglutarat und 60 μM S-Naringenin erreicht werden [Lit. 13]. Um erste photometrische Messungen durchzuführen, wurden diese Konzentrationen gewählt und die Reaktionsmischung mit unterschiedlichen Mengen des jeweiligen Rohextrakts versetzt. Es wurden alle isolierten Rohextrakte, die wie in Kapitel 4.1 und 4.2 gewonnen wurden, eingesetzt. Die Absorption wurde jeweils bei 370 nm verfolgt.

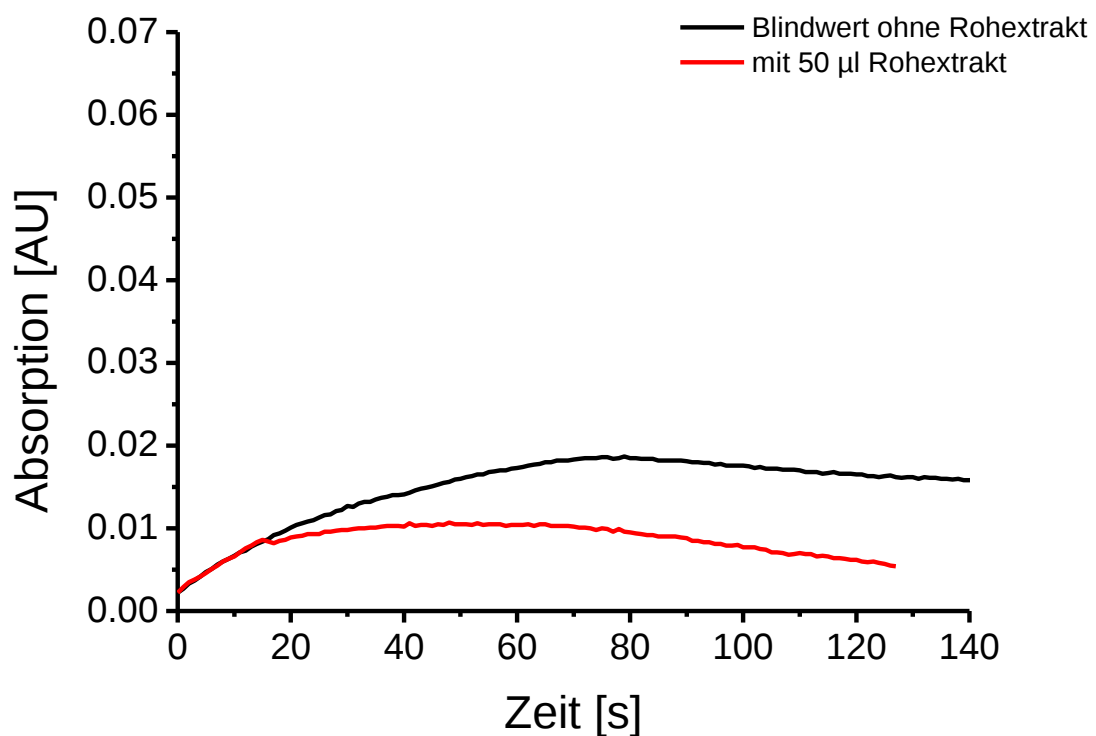


Abbildung 4.4: Absorption 370 nm Vergleich Blindwert mit Rohextrakt bei 1 mM Natriumascorbat, 50 μM Fe(II)SO_4 , 160 μM 2-Oxoglutarat und 120 μM Naringenin in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5

Nach Zugabe des Rohextrakts wurde eine Abnahme des Absorptionsanstiegs im Vergleich zu Messung ohne Rohextrakt beobachtet. Vermutet wurde, dass Naringenin durch andere in dem Rohextrakt enthaltene 2-ODs umgesetzt wurde und so die Verfügbarkeit für die hier beobachtete Reaktion gesenkt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Konzentrationen der verschiedenen Komponenten verändert und die Messungen am UV/Vis Spektrometer wiederholt

(siehe 6.2.5.1). Auch nach Änderung der Konzentrationen konnte keine, für den photometrischen Aktivitätstest geeignete, Konstellation gefunden werden.

4.4.2 Aktivitätstest II

Als Folge der bisherigen Ergebnisse (siehe 4.4.1) wurde nun eine andere Vorgehensweise gewählt. Dazu wurde nach Zugabe des Rohextrakts zu der Reaktionsmischung ein UV/Vis Spektrum aufgenommen und anschließend 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde wiederum ein Spektrum aufgenommen und mit dem vor der Inkubationszeit aufgenommenem verglichen. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischung wurde wieder wie in Lit. 13 beschrieben gewählt, wobei zusätzlich 100 mg/ml Katalase beigefügt wurde. Aufgrund der langen Inkubationszeit besteht die Gefahr, dass die FNS-I durch in der Reaktionsmischung gebildetes H_2O_2 inaktiviert wird. Die Katalase entfernt das Wasserstoffperoxid, indem es die Umsetzung in molekularen Sauerstoff und Wasser katalysiert. Außerdem wurde die eingesetzte Menge Substrat verdoppelt, da in dieser Arbeit die Enantiomerenmischung eingesetzt wurde und das Protein stereoselektiv ist.

Als Enzymproben wurden sowohl die, nach der säulenchromatographischen Reinigung erhaltenen Proteinlösungen, als auch das nach Isolierschema B erhaltene Rohextrakt verwendet.

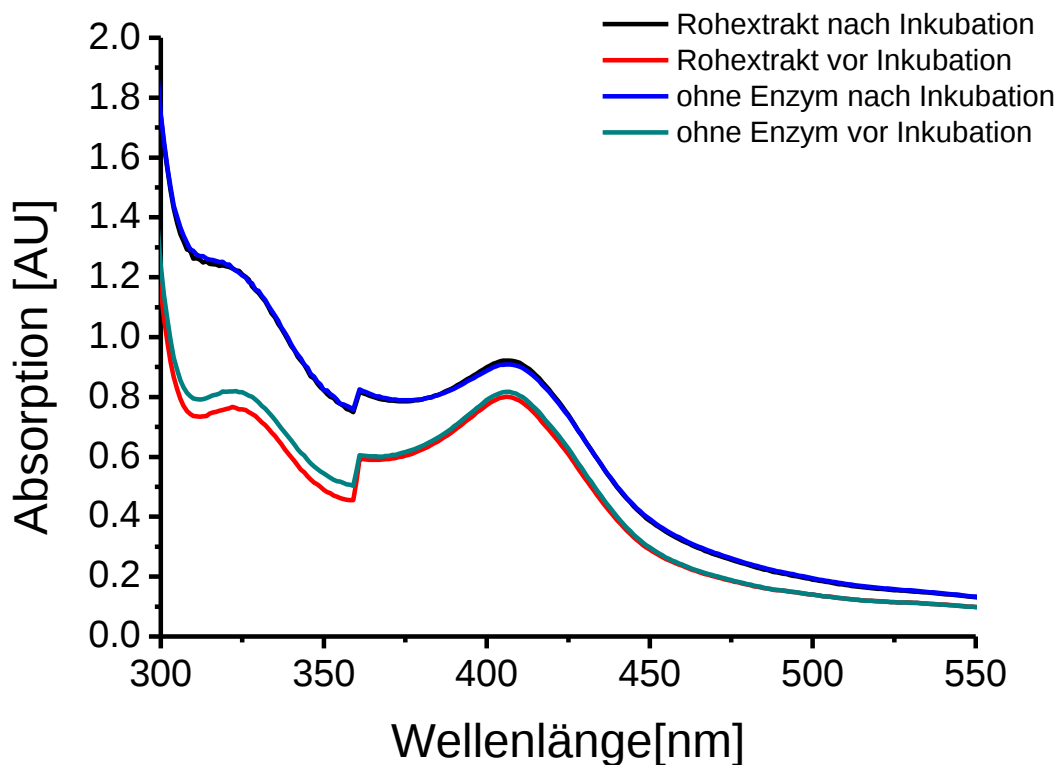


Abbildung 4.5: UV/Vis Spektren Aktivitätstest II mit Rohextrakt und Blindwert ohne Rohextrakt bei 1 mM Natriumascorbat, 50 μM Fe(II)SO_4 , 160 μM 2-Oxoglutarat, 1 mg/ml Katalase und 120 μM Naringenin in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8

In Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass die Reaktionsmischung vor und nach der Inkubationszeit, unterschiedliche Spektren zeigen. Diese Änderung wurde jedoch auch beobachtet, wenn kein Rohextrakt zu der Reaktionsmischung beigefügt wurde. Damit wurde gezeigt, dass die Reaktionsmischung unter den gegebenen Bedingungen nicht stabil ist und keine messbare enzymatische Reaktion stattfindet.

Auch die, nach der säulenchromatographischen Trennung aufkonzentrierten, Enzymlösungen (siehe Abbildung 4.3) zeigten kein anderes Verhalten. Als Beispiel ist in Abbildung 4.6 das Ergebnis der Probe 2 abgebildet.

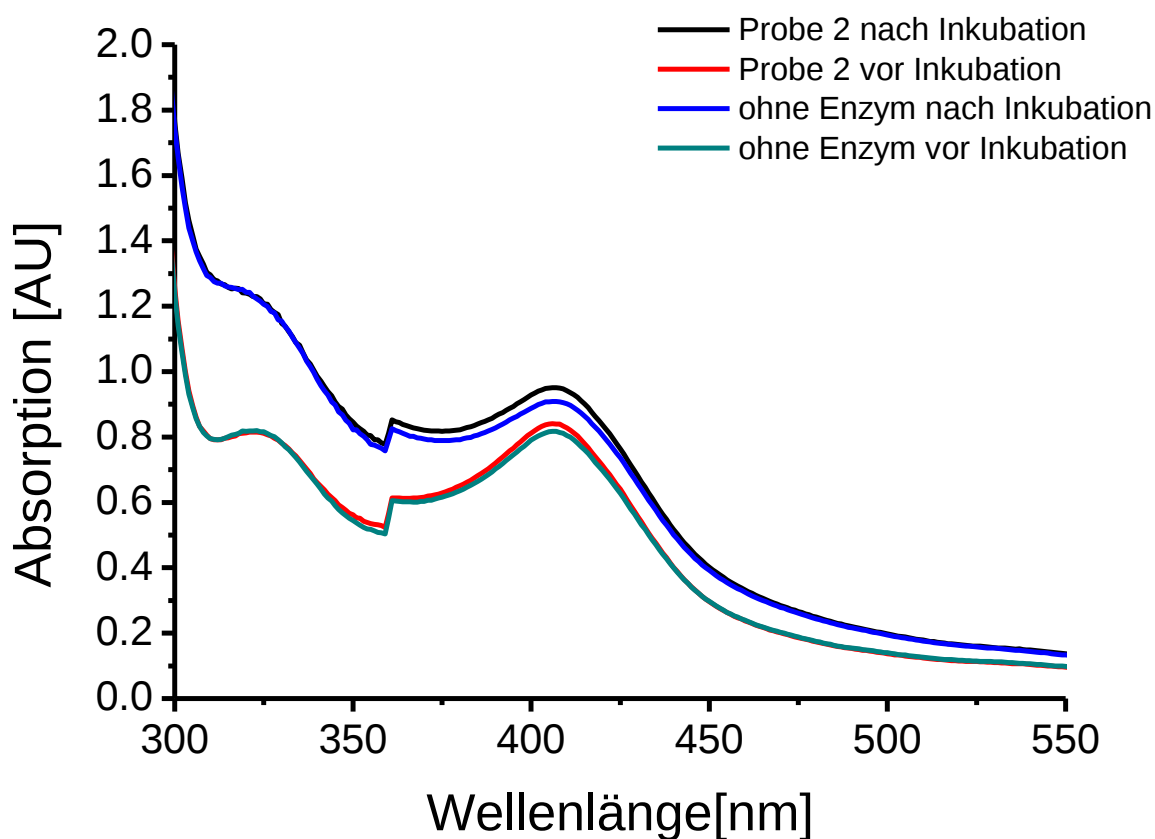


Abbildung 4.6: UV/Vis Spektren Aktivitätstest II mit Probe 2 und Blindwert ohne Rohextrakt 1 mM Natriumascorbat, 50 μM Fe(II)SO_4 , 160 μM 2-Oxoglutarat, 1mg/ml Katalase und 120 μM Naringenin in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8

Nach 30 min Inkubationszeit wurde in der Reaktionsmischung die Bildung von Feststoff beobachtet. Apigenin ist eine schwerlösliche Verbindung. Der Verdacht lag nahe, dass bei erfolgreicher Umsetzung des Naringenins, Apigenin durch die Erhöhung der Konzentration in der Lösung ausfällt. Der Feststoff wurde abzentrifugiert, das Pellet vom Überstand abgetrennt und in DMSO gelöst. Ein Spektrum im Messpuffer wurde aufgenommen. Abbildung 4.7 zeigt ein Spektrum als Beispiel.

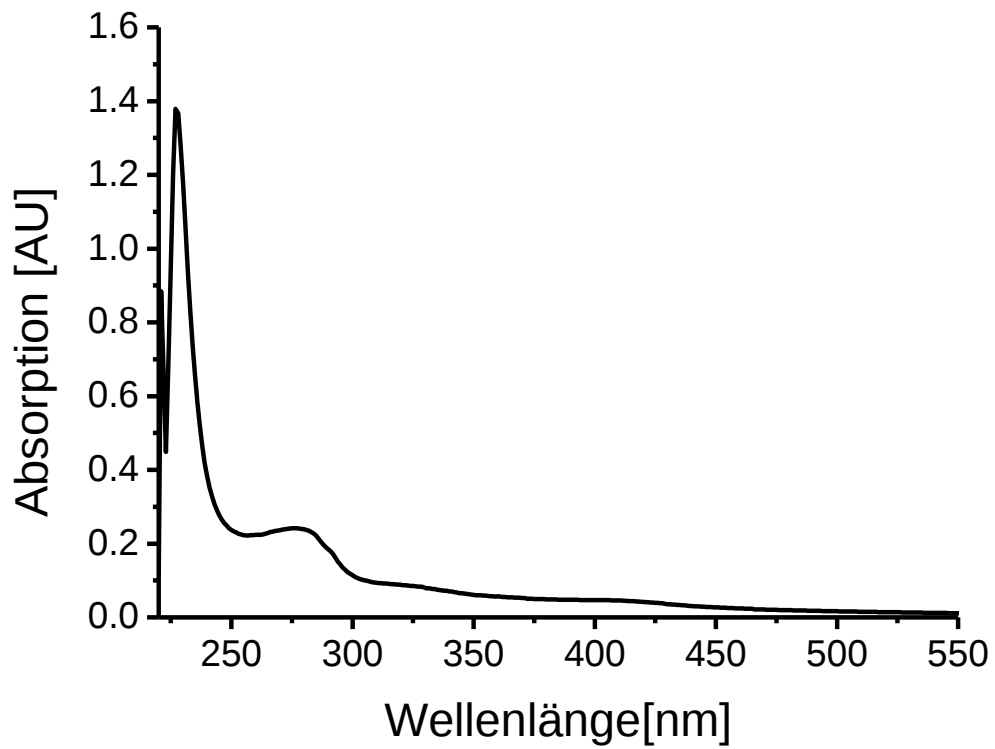


Abbildung 4.7: UV/Vis Spektrum Feststoffe in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8

Das Spektrum zeigt kein Absorptionsmuster, dass dem des Apigenin ähnlich wäre. Die Absorption bei 280 nm lässt auf ausgefallenes Protein schließen.

5. Diskussion

5.1 Aureusidinsynthese

Es konnte gezeigt werden, dass für die Isolierung der Aureusidinsynthese aus Löwenmäulchen, die Entfernung der niedermolekularen Substanzen aus dem Rohextrakt eine entscheidende Rolle spielt. Nur die aus Isolierungsprotokoll II und Isolierungsprotokoll III erhaltenen Rohextrakte zeigten Aktivität. In beiden Protokollen wurde der erste Schritt der Isolierung so gewählt, dass Farbstoffe und andere Phenole sowie weitere redoxaktive Verbindungen quantitativ entfernt wurden. Sowohl die Zugabe des unlöslichen PVPP, als auch die Verwendung einer hohen Konzentration PEG 4000 sind dafür geeignete Methoden. Das für das Mädchenauge entwickelte Isolierungsprotokoll I brachte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Es zeigte sich, dass die quantitative Entfernung der Farbstoffe im Rohextrakt des Mädchenauges nach dieser Methode gut funktioniert. Im Löwenmäulchen konnte damit keine deutliche Entfärbung beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass zum Zeitpunkt der Zweiphasenextraktion bereits ein Großteil der phenolischen Verbindungen an Proteine gebunden hat, wodurch eine Abtrennung erschwert wurde. Außerdem wird Aureusidinsynthese durch die Interaktion mit diesen Verbindungen inaktiviert, was erklärt, weshalb zum Ende der Isolierung keine Aktivität bestimmt werden konnte.

Bestätigt wurde die Existenz der Aureusidinsynthese in *Antirrhinum majus* Golden Rocket einerseits durch die Bestimmung der Umsatzraten von Butein in der HPLC sowie andererseits durch den photometrisch gemessenen Absorptionsanstieg bei $\lambda = 415 \text{ nm}$. Die HPLC bietet dabei die empfindlichere Methode, was die Messung der Aktivität auch in kleinen Rohextraktmengen ermöglicht, die photometrische Bestimmung schafft jedoch, durch die Möglichkeit der sehr schnellen Messung ohne langer Probenvorbereitung, die besseren Bedingungen für die weitere Optimierung des Isolierungsprotokolls. Durch Messung zwischen den Trennschritten, können Reinigungsschritte, die zu hohe Verluste mitbringen, schnell gefunden und eliminiert werden.

Die säulenchromatographische Reinigung des Zielproteins gestaltete sich schwierig. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist, konnte das Protein nicht an die SP Sepharose binden. Grund hierfür ist die zu hoch gewählte Salzkonzentration in der Probe. Weiteres Verdünnen und die Wahl eines salzärmeren Puffers werden bessere Bedingungen schaffen. Auch die Wahl eines niedrigeren pH Werts, würde die Anbindung an das Säulenmaterial verbessern und so eine bessere Trennleistung erzielt. Mit Hilfe der SP Sepharose konnte ein Teil des

Fremdproteins abgetrennt werden, diese Methode ist also generell für diese Aufgabenstellung geeignet. Die Parameter müssen noch besser an das Verhalten des Zielproteins angepasst werden, um die Trennleistung zu optimieren.

Eine effektive Auftrennung an der Mono S Säule (siehe Abbildung 3.14) konnte nicht erreicht werden. Die Einstellung der Salzkonzentration, sowie des pH Werts führte zwar zur Anbindung des Proteins an die Säule, jedoch konnte nach der Elution keine Aktivität mehr bestimmt werden. Dies liegt an der inzwischen niedrigen Enzymkonzentration, die sich auch in der Abnahme der Absorption bei 280 nm um den Faktor 10 zeigt.

Nach diesen Erkenntnissen, ist die Mono S mit der gewählten Methode nicht zur Reinigung des Zielproteins geeignet. Ein anderer pH Wert, oder die Verwendung eines hochauflösenden Kationenaustauschers werden hier zu besseren Ergebnissen führen.

Die Enzymaktivität der *Dahlia sp.* Kelvin Floodlight war vergleichbar mit der, der *Coreopsis lanceolata*. In den wiederholten vergleichenden Messungen konnte für die Dahlie stets eine etwas höhere Aktivität beobachtet werden, wodurch sie sich als geeignete Quelle zur Isolierung der Aureusidinsynthase darstellt.

5.2 Flavon Synthase

Die Entwicklung eines photometrischen Aktivitätstests stand im Mittelpunkt dieser Arbeit um im Anschluss ein optimiertes Protokoll zur Isolierung entwickeln zu können. Wie in 1.3.2 beschrieben, wurde die Enzymaktivität bisher nur mittels HPLC bestimmt, auf Grundlage dieser Messergebnisse wurden die Bedingungen für den photometrischen Aktivitätstest angepasst. Um Flavon Synthase photometrisch bestimmen zu können musste zunächst Protein aus Petersilie isoliert werden. Die Isolierung von Protein und Trennung mittels SP Sepharose konnte realisiert werden. In Abbildung 4.3 ist eine Auftrennung der Proteinmischung zu beobachten. Um weiter Fremdproteine, durch aufeinanderfolgende säulenchromatographische Läufe, abzutrennen, ist die positive Bestimmung der Aktivität zwingend notwendig, da sonst die das Zielprotein enthaltende Fraktion nicht ermittelt werden kann. Eine Aussage über den Reinigungsgrad sowie die Ausbeute nach dieser ersten Trennung konnte nicht getroffen werden, da die Enzymaktivität photometrisch nicht bestimmt werden konnte.

Versucht wurde, eine Änderung im Absorptionsverhalten, durch Zugabe von Rohextrakt zu dem Substrat Naringenin und dessen Co-Faktoren, zu messen. Verschiedene Faktoren beeinflussen das Gelingen solch einer Messung und werden aus diesem Grund im Anschluss diskutiert.

➤ Das Zielprotein:

Ist, wie im Fall der Flavon Synthase, wenig über das Verhalten des Proteins während der Isolierung aus seiner natürlichen Quelle bekannt, sind mögliche Fehlerquellen mannigfaltig. Es kann angenommen werden, dass möglichst native Bedingungen für die Stabilität des Proteins am günstigsten sind, weshalb der pH mit 7.5 festgesetzt wurde. Proteasen sind bei niedrigen Arbeitstemperaturen nicht aktiv, weshalb bei 4 °C isoliert wurde. Wie gezeigt wurde, konnten Proteine erfolgreich isoliert werden, also liegt die Problematik in für das Zielprotein spezifischen Eigenschaften, oder in einem der folgenden Punkte.

➤ Das UV/Vis Spektrophotometer:

Bisherige Untersuchungen der Enzymaktivität wurden mit der empfindlicheren HPLC durchgeführt. Die Proteinmengen beliefen sich dabei auf ca. 80 µg sauberes, rekombinant dargestelltes Protein pro Messung, was vergleichsweise viel ist. Die Enzymaktivität der Flavone Synthase ist somit gering einzuschätzen, was eine photometrische Detektion sehr schwierig macht.

➤ Die Reaktionsmischung:

Es gibt bereits Studien, die sich mit der Ermittlung, der idealen Konzentrationen der Co-Substrate beschäftigt haben [Lit. 13]. Diese Messungen wurden jedoch mit sauberer, rekombinant erzeugter Flavon Synthase durchgeführt. Die Konzentration der FNS-I im Rohextrakt ist vermutlich um einiges niedriger. Außerdem konkurriert die FNS-I mit anderen 2-ODs um die Co-Substrate und das Naringenin, wodurch die Endkonzentration der Komponenten, die der FNS-I zur Verfügung steht, abgesenkt wird. Die Auftrennung bis zur homogenen FNS-I lässt sich jedoch ohne vorhergehende Aktivitätsbestimmung nicht realisieren.

Weiters tragen alle Komponenten der Reaktionsmischung zur Absorption bei. Nachdem diese im Überschuss vorliegen müssen, um Aktivität des Zielproteins zu gewährleisten, kann deren Absorption so groß sein, dass eine Absorptionsänderung in Folge der Umsetzung des Substrats, im Vergleich zu gering ist um detektiert zu werden. Die Reaktionsmischung ist nicht stabil, was entweder auf die Oxidation der gelösten Fe^{2+} Ionen und Bildung gefärbter Komplexe, oder auf eine Nebenreaktion mit Katalase hinweist. Nachdem diese beiden Komponenten für die Aktivitätsbestimmung *in vitro* unerlässlich sind, kann auf deren Zugabe nicht verzichtet werden. Auch eine Konzentrationssenkung, kann zu einem Aktivitätsverlust führen. Es gilt also, eine Konstellation zu finden, die einerseits ausreichende Mengen der Co-Faktoren enthält, um die Reaktion ablaufen zu lassen, die aber andererseits keine zu große Hintergrundabsorption erzeugt. Dieser Punkt ist jener, mit dem meisten Optimierungspotential.

Die Entwicklung einer optimalen Methode, konnte in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr erreicht werden. Gezeigt wurde, dass der Umsatz von Naringenin zu Apigenin prinzipiell photometrisch bestimmt werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass bei der verwendeten Methodik, nicht ausreichend Apigenin entsteht, da auch in den ausgefallenen Feststoffen keine für Apigenin typischen Absorptionsmaxima gemessen wurden.

6. Experimenteller Teil

6.1 Aureusidinsynthese

6.1.1 verwendete Blütenmaterialien

Zur Isolierung der Aureusidinsynthese wurden Blüten der *Antirrhinum majus* Golden Rocket verwendet. Für den Vergleich der Enzymaktivität in Mädchenauge und Dahlie (siehe Kapitel 3.4) wurde *Coreopsis lanceolata* und *Dahlia sp.* Kelvin Floodlight eingesetzt. Das Blütenmaterial wurde nach dem Ernten umgehend bei -80 °C eingefroren und bis zur Isolierung bei dieser Temperatur aufbewahrt.

6.1.2 Aktivitätstest

6.1.2.1 UV/Vis

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde das UV Spektrometer der Firma SHIMADZU UV-1800 eingesetzt. Die Steuerung und Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SHIMADZU UVProbe 2.33.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt der *Antirrhinum majus* wurde eine 200 mM Butein-Stammlösung in DMSO hergestellt. Es wurden 1 ml Einmal-küvetten der Firma PLASTIBRAND eingesetzt. Als Messpuffer wurde 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 verwendet.

Referenzküvette	Messküvette
0.5 µl Butein-Stammlösung	0.5 µl Butein-Stammlösung
999.5 µl Messpuffer	989.5 µl Messpuffer
-	10 µl Rohextrakt

Tabelle 6.1: UV/Vis Messung mit Butein

Bei einzelnen Messungen wurden aufgrund der niedrigen Enzymaktivität 50 µl Rohextrakt eingesetzt und die Menge Messpuffer dementsprechend reduziert.

Die photometrischen Messungen die in Kapitel 3.4 beschrieben sind wurden mit PHC als Substrat durchgeführt. Dazu wurde eine 400 mM PHC-Stammlösung hergestellt und wie folgt in die Küvetten pipettiert.

Referenzküvette	Messküvette
0.25 µl PHC-Stammlösung	0.25 µl PHC-Stammlösung
999.75 µl Messpuffer	997.75 µl Messpuffer
-	2 µl Rohextrakt

Tabelle 6.2: UV/Vis Messung mit PHC

Auch hier wurde 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 eingesetzt, der Absorptionsanstieg wurde bei 415 nm verfolgt.

6.1.2.2 HPLC

Die Probenvorbereitung ist unter 6.1.3.2 beschrieben. Zur Messung wurde eine HPLC Anlage der Firma *PERKIN ELMER (Series 200 HPLC)* mit einer Säule der Firma *THERMO SCIENTIFIC (BDS HYPERSIL C18 HPLC Column)*. Als Lösungsmittel A wurde 5 % Ameisensäure und als Lösungsmittel B Methanol gewählt. Die Methode wurde wie folgt programmiert.

Zeit [min]	Flow [ml/min]	Lösungsmittel A	Lösungsmittel B
0,5	1	93 %	7 %
2	1	93 %	7 %
6	1	85 %	15 %
17	1	25 %	75 %
2	1	20 %	80 %
2	1	20 %	80 %
2	1	93 %	7 %
10	1	93 %	7 %

Tabelle 6.3: Methode HPLC

Es wurden jeweils 100 µl der nach 6.1.3.2 erhaltenen Probe injiziert und die Absorption bei λ 405 nm und 370 nm bestimmt.

6.1.3 Isolierung

Alle zur Isolierung verwendeten Puffer wurden frisch maximal 12 h vor der Isolierung hergestellt, wobei Natriumascorbat immer erst direkt vor dem Einsatz des Puffers zugegeben wurde, und bis zur Isolierung auf 4 °C gekühlt. Es wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser zum Lösen der Feststoffe verwendet. Der pH Wert der Puffer wurde vor Beginn der Arbeiten nochmals mit einer pH Elektrode der Firma *HAMILTON (Flushrode P)* geprüft und bei Abweichungen neu eingestellt.

Rohextrakte wurden, wenn nicht anders angegeben, stets bei 4 °C aufbewahrt.

6.1.3.1 Isolierungsprotokoll I

30 g des gefrorenen Blütenmaterials wurden mit 100 ml Isolierpuffer (125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4, 0.5 % (w/v) Natriumascorbat, 4 % (v/v) Triton X-114) versetzt und mit Hilfe eines handelsüblichen Stabmixers zerkleinert, bis eine homogene Masse entstand. Die Suspension wurde in 50 ml Falconröhrchen überführt und in einer Zentrifuge der Firma *EPPENDORF (Centrifuge 5810 R)* 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Faltenfilter von Schwebstoffen abgetrennt und in einem Becherglas gesammelt. Diese Lösung wurde mit 20 g/L Ammoniumsulfat versetzt und bei RT gerührt, bis das Salz gelöst war. Es wurde bis zur Trübung der Lösung weitergerührt (ca. 3 min) und anschließend 15 min bei 4000 rpm und 12 °C zentrifugiert. Die obere, detergentarme Phase wurde abgesaugt und mit 4 % (v/v) Triton X-114 versetzt. Nun wurde wieder 15 min bei 4000 rpm und 12 °C zentrifugiert und die detergentarme Phase ein zweites Mal mit 4 % (v/v) Triton X-114 versetzt. Nach dem Absaugen der detergentarmen Phase, wurden darin 156 g/L Ammoniumsulfat (30 % Sättigung) gelöst und die Lösung 20 min bei 4 °C stehen gelassen. Nun wurde zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 15 min) und der Überstand filtriert (Faltenfilter). 5 % (w/v) PEG 4000 wurden unter Rühren bei 4 °C gelöst und anschließend 20 min weiter gerührt. Nach der Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 15 min) wurde die untere, wässrige Phase abgesaugt und 4 % (w/v) PEG 4000 darin gelöst und 20 min bei 4 °C gerührt. Wiederum wurde zentrifugiert, die wässrige Phase abgetrennt und schließlich mit 3 % (w/v) PEG 4000 versetzt und 20 min bei 4 °C gerührt. Die durch Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 15 min) erhaltene untere Phase wurde abgesaugt, mit 351 g/L Ammoniumsulfat versetzt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 15 min), der Überstand weitestgehend abgenommen und das Pellet in 1 ml 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 gelöst. Das so erhaltene Rohextrakt wurde zur photometrischen Messung der Aktivität verwendet. Für die vergleichenden Aktivitätsmessungen der Aureusidinsynthase aus Mädchenauge und Dahlie wurde nach der ersten Tritonphasentrennung abgebrochen und bereits dieses Rohextrakt verwendet.

6.1.3.2 Isolierungsprotokoll II

0.5 g gefrorene Blüten wurden in einem Mörser mit 0.25 g Quarzsand, 0.25 g PVPP und 3 ml Isolierungspuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5) versetzt und bis zur Homogenisierung verrieben. Die Suspension wurde in Eppendorfgefäße überführt und in einer Zentrifuge der Firma *EPPENDORF (Centrifuge 5417 R)* 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 400 µl davon auf eine Säule, mit Gelbettvolumen 1 ml des Säulenmaterials Sephadex G25, gebracht. Nun wurde mit 400 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 eluiert. In Eppendorfgefäße wurden 15 nM Butein (gelöst in 20 µl abs. Methanol) vorgelegt und das Methanol im Vakuumexsikkator

entfernt. Zu diesem Substrat wurden 80 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 zugegeben und mit 20 µl Rohextrakt versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf einem Wasserbad bei 37 °C 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Methanol und 10 µl konz. Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt und das so gewonnene Rohextrakt für die Messungen an der HPLC in *vials* transferiert.

6.1.3.3 Isolierungsprotokoll III

Der Wasch- und Extraktionspuffer wurden wie in Tabelle 6.4 hergestellt, wobei zunächst alle Feststoffe eingewogen und anschließend auf das gewünschte Volumen aufgefüllt wurde. Die Puffer wurden bis zur Isolierung auf 4 °C gekühlt und Natriumascorbat erst unmittelbar vor deren Einsatz zugegeben.

Waschpuffer	Extraktionspuffer
125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4	125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4
35 % (w/v) PEG 4000	0.5 % (w/v) Natriumascorbat
8 % (v/v) Triton X-114	-
0.5 % (w/v) Natriumascorbat	-

Tabelle 6.4: Puffer Isolierungsprotokoll III

30 g des gefrorenen Blütenmaterials wurden mit 250 ml Waschpuffer versetzt und homogenisiert durch Zerkleinern mit einem Stabmixer. Anschließend wurde in der Zentrifuge von *EPPENDORF (Centrifuge 5810 R)* in 50 ml Falconröhrchen 20 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Sowohl das schwimmende, als auch das am Boden befindliche Pellet wurden gesammelt und noch zweimal auf diese Weise behandelt. Das zum Schluss erhaltene Pellet wurde mit Extraktionspuffer auf ein Volumen von 250 ml gebracht und nochmals gründlich homogenisiert. Nach dem folgenden Zentrifugationsgang (4 °C, 4000 rpm, 20 min) stellte sich eine Tritonphasentrennung ein. Die wässrige Phase wurde abgesaugt und mit 176 g/L Ammoniumsulfat versetzt und bei 4 °C 10 min gerührt. Nun wurde wiederum zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 20 min) und die obere Phase verworfen. Im Rohextrakt wurden 351 g/L Ammoniumsulfat gelöst und die Lösung bei 4 °C eine Stunde stehen gelassen.

Das erhaltene Proteinpellet wurde über das *Whatman Klari-Flex Tube filtration system* der Firma *GE HEALTHCARE* filtriert und in 1 ml 125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4 gelöst und über eine SEC Säule entsalzen (siehe 6.1.4.1).

Diese Isolierung wurde auch als 10facher Ansatz durchgeführt. Dabei wurden die selben Puffer und Chemikalien verwendet und auch die Vorgehensweise beibehalten. Aufgrund des großen Volumens wurde eine Zentrifuge von *BECKMAN COULTER (Avanti J-26 XP)* und passende Zentrifugenbecher benutzt. Nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung wurde über das *Whatman Klari-Flex bottle top filtration system* der Firma *GE HEALTHCARE* abgesaugt, das Pellet in 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4 aufgenommen und bis zur Leitfähigkeit von 7 mS/cm² verdünnt. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Leitfähigkeitsmesser (*WTW LF521*) bestimmt. Diese Probe wurde direkt auf die SP Sepharose-Säule gebracht (siehe 6.1.4.2).

6.1.4 Säulenchromatographie

Alle für die Säulenchromatographie benötigten Puffer wurde frisch hergestellt und steril filtriert. Anschließend wurden sie 30 min unter Rühren am Hochdruckvakuum entgast. Alle Puffer wurden stets auf 4 °C gekühlt. Die Trennung mittels SP Sepharose und Mono S wurde bei 4 °C durchgeführt.

6.1.4.1 SEC

Die Entsalzung wurde mit Hilfe des *ÄKTA FPLC* der Firma *GE HEALTHCARE* durchgeführt. Als Säule wurde die *HiTrap Desalting* Säule der Firma *GE HEALTHCARE* mit einem Gelbettvolumen von 5 ml und einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Die Probe wurde mit einer 1ml Spritze in das System injiziert. Während der Elution wurden die Leitfähigkeit und die Absorption ($\lambda = 280 \text{ nm}$) gemessen und dokumentiert.

Der Lauf wurde manuell gesteuert und die Proteinprobe nach Ansteigen der Absorption bis zum Anstieg der Leitfähigkeit in einem 50 ml Falcon gesammelt.

Säule	HiTrap Desalting von GE Healthcare
Gelbettvolumen	5 ml
Säulenvolumen	1 ml
Flussrate	0.5 ml/min
Probenvolumen	1 ml
Puffer	125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4
Fraktionierung	manuell

Tabelle 6.5: Methode SEC**6.1.4.2 SP Sepharose**

Die aus Kapitel 6.1.3.2 erhaltene Probe des 10fach Ansatzes wurde mit Hilfe der Probenpumpe des *ÄKTA Purifiers* auf eine SP Sepharose Säule. Um eine Auftrennung der Proteine zu realisieren wurde ein Salzgradient benutzt, bei dem die Konzentration an Puffer B (125 mM Natriumcitratpuffer pH 5.4, 1 M NaCl) in linearem Verhältnis gesteigert wurde. Dieser Lauf wurde an dem Gerät *ÄKTA Purifier* der Firma *GE HEALTHCARE* realisiert. Die Fraktionierung erfolgte automatisch gesteuert in 5 ml Fraktionen. Zum Auffangen der Fraktionen wurden 18 mm Tubes verwendet.

Säule	SP Sepharose
Flussrate	1 ml/min
Probenvolumen	ca. 250 ml
Puffer A	30 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4
Puffer B	30 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4, 1M NaCl
Gradient	Linear über 35 Säulenvolumen 0-100 % B
Fraktionierung	5 ml Fraktionen

Tabelle 6.6: Methode SP Sepharose**6.1.4.3 Mono S**

Auch für diesen Trennvorgang wurde die FPLC *ÄKTA Purifier* der Firma *GE HEALTHCARE* verwendet. Das Säulenvolumen der verwendeten *Mono S 5/50 GL* der Firma *GE HEALTHCARE* betrug 1 ml, weswegen die nach Kapitel 6.1.4.2 erhaltene Probe aufkonzentriert werden musste. Dazu wurden *Vivaspins* der Firma *SARTORIUS STEDIM* mit einer Membran mit 10f000 MWCO PES eingesetzt. Durch Zentrifugation in der Zentrifuge *Centrifuge 5810 R* bei 4 °C und 4000 rpm wurde das Volumen auf 200 µl eingengt. Anschließend wurden 5 mal je 5 ml des Laufpuffers 20 mM Natriumacetat pH 5.4 zur Probe hinzugefügt und

wieder bis zur Konzentrierung auf 200 µl zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm) um die Umpufferung zu gewährleisten. Diese Probe wurde auf 1 ml aufgefüllt und über einen *loop* in die FPLC injiziert. Die Fraktionen wurden in 96 well Platten aufgefangen.

Säule	Mono S
Flussrate	0,5 ml/min
Probenvolumen	1 ml
Puffer A	20 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4
Puffer B	20 mM Natriumacetatpuffer pH 5.4, 1M NaCl
Gradient	Linear über 120 Säulenvolumen 0-11 % B
Fraktionierung	1 ml Fraktionen

Tabelle 6.7: Methode Mono S

6.2 Flavon Synthase

6.2.1 verwendetes Pflanzenmaterial

Im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterialien wurde hier auf das Einfrieren verzichtet. *Petroselinum crispum* Aphrodite wurde direkt vor Beginn jeder Isolierung geerntet und umgehend weiterverarbeitet. Es wurden ca. 5 cm hohe Pflanzen ohne Blüten verwendet.

6.2.2 Isolierung

6.2.2.1 Isolierungsprotokoll A

300 g der frisch geernteten *Petroselinum crispum* Aphrodite wurden mit 1500 ml des auf 4 °C gekühlten Extraktionspuffers (50mM Tris/HCl pH 7.5, 4 % (v/v) Triton, 0.5 % (w/v) Natriumascorbat) versetzt und mit dem Stabmixer zerkleinert bis eine homogene Masse entstand. Dieser dickflüssige Brei wurde in Zentrifugenbecher abgefüllt und in der großen Zentrifuge *BECKMAN COULTER* (*Avanti J-26 XP*) zentrifugiert (4 °C, 8000 rpm, 20 min). Der Überstand wurde

vorsichtig abdekantiert und mit 20 g/L Ammoniumsulfat bis zur Trübung bei RT gerührt. Nun wurde bei 12 °C und 8000 rpm 20 min zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase abgesaugt. In dieser wurden 156 g/L Ammoniumsulfat gelöst (30 % Sättigung) und nach 20 min wiederum zentrifugiert (4 °C, 8000 rpm, 20 min). Der Überstand wurde abdekantiert und 351 g/L Ammoniumsulfat darin gelöst. Nach 1 h bei 4 °C wurde das Pellet über das *Whatman Klari-Flex bottle top filtration system* vom Puffer getrennt und anschließend in 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5 aufgenommen und bis zur Leitfähigkeit von 3 mS/cm² verdünnt.

6.2.2.2 Isolierungsprotokoll B

Nach dieser Methode wurden 0.5 g Pflanzenmaterial mit 0.25 g Quarzsand und 0.25 g PVPP in 3 ml Extraktionspuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5, 0.5 % Natriumascorbat) aufgenommen und im Mörser verrieben. Die homogene Masse wurde in Eppendorf-Gefäße transferiert und in einer Zentrifuge der Firma *EPPENDORF (Centrifuge 5417 R)* zentrifugiert (4 °C, 14000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abpipettiert und für die folgenden Experimente direkt verwendet.

6.2.3 Reinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Für dieses Experiment wurden 30 g der frischen Petersilie in 150 ml Extraktionspuffer (50mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 % (w/v) Natriumascorbat) mit dem Stabmixer zerkleinert und die homogene Masse in 50 ml Falcons überführt. Nach der Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 15 min) wurde das Rohextrakt abdekantiert, 176 g/L Ammoniumsulfat zugegeben, 20 min auf 4 °C gestellt und das Pellet abzentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde auf 4 °C gestellt und mit der schrittweisen Ammoniumsulfatfällung fortgefahren. Es wurde die Ammoniumsulfatsättigung jeweils um 10 % erhöht, 20 min stehengelassen, abzentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 15 min), das Pellet auf 4 °C gestellt und mit dem Überstand weitergearbeitet.

Nach Erreichen einer Sättigung von 100 % Sättigung wurden die Pellets in je 300 µl 50mM Tris/HCl pH 7.5 aufgenommen und deren Enzymaktivität nach Aktivitätstest I bestimmt.

6.2.4 Säulenchromatographie

Zur Trennung der Proteine in der nach Isolierschema A gewonnenen Probe wurde dieselbe Methode wie in Kapitel 6.1.4.2 beschrieben eingesetzt (siehe Tabelle 6.6). Als Puffer A wurde hier 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5 und als Puffer B 30 mM Natriumacetatpuffer pH 5, 1 M NaCl verwendet. Das

Probenvolumen belief sich auf ca. 300 ml und wurde wiederum über die Probenpumpe auf die Säule gebracht.

6.2.5 Aktivitätsmessung FNS-I

Alle photometrischen Messungen wurden am UV Spektrometer der Firma SHIMADZU UV-1800 bei RT durchgeführt. Es wurden 1 ml Quarzküvetten sowohl für die Messung der Spektren, als auch für die Messung der Absorptionsänderung mit der Zeit verwendet.

6.2.5.1 Aktivitätstest I

Es wurden unterschiedliche Zusammensetzungen der Reaktionslösung getestet, wobei mit jeder Reaktionsmischung alle erhaltenen Proteinproben getestet wurden. In Tabelle 6.8 wurden die verwendeten Proteinproben, in Tabelle 6.9 die unterschiedlichen Konzentrationen der Komponenten in der Küvette angeführt. Als Messpuffer wurde 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5 eingesetzt. Das Absorptionsverhalten wurde bei 370 nm über 240 Sekunden verfolgt. Die Co-Substrate wurden in 990 µl in der entsprechenden Konzentration gelöst und mit jeweils 10 µl Rohextrakt in einer 1 ml Quarzküvette gemessen. Als Referenz wurde 1 ml derselben Mischung ohne Rohextrakt eingesetzt.

	Isolierung
Probe A	Isolierschema A vor säulenchromatographischer Reinigung
Probe B	fraktionierte AS-Fällung Pellet 30 %
Probe C	fraktionierte AS-Fällung Pellet 40 %
Probe D	fraktionierte AS-Fällung Pellet 50 %
Probe E	fraktionierte AS-Fällung Pellet 60 %
Probe F	fraktionierte AS-Fällung Pellet 70 %
Probe G	fraktionierte AS-Fällung Pellet 80 %
Probe H	fraktionierte AS-Fällung Pellet 90 %
Probe I	fraktionierte AS-Fällung Pellet 100 %

Tabelle 6.8: Aktivitätstest I, verwendete Enzymproben

	Oxoglutarat [μM]	Fe(II)SO ₄ [μM]	Ascorbat [μM]	Naringenin [μM]
Messung 1	160	50	1000	120
Messung 2	320	50	1000	120
Messung 3	80	50	1000	120
Messung 4	160	25	1000	120
Messung 5	320	25	1000	120
Messung 6	80	25	1000	120
Messung 7	160	100	1000	120
Messung 8	320	100	1000	120
Messung 9	80	100	1000	120
Messung 10	160	50	500	120
Messung 11	320	50	500	120
Messung 12	80	50	500	120
Messung 13	160	25	500	120
Messung 14	320	25	500	120
Messung 15	80	25	500	120
Messung 16	160	100	500	120
Messung 17	320	100	500	120
Messung 18	80	100	500	120
Messung 19	160	50	2000	120
Messung 20	320	50	2000	120
Messung 21	80	50	2000	120
Messung 22	160	25	2000	120
Messung 23	320	25	2000	120
Messung 24	80	25	2000	120
Messung 25	160	100	2000	120
Messung 26	320	100	2000	120
Messung 27	80	100	2000	120

Tabelle 6.9: Aktivitätstest I, Messungen

6.2.5.2 Aktivitätstest II

Um die Änderung des Absorptionsspektrums nach längerer Inkubationszeit feststellen zu können wurde die Reaktionsmischung nach Vorlage der Messung 1 (Tabelle 6.9) hergestellt. Dazu wurde zu jeder Probe eine 500 μl Lösung hergestellt, die neben 10 μl des Rohextrakts, alle Chemikalien in entsprechender Konzentration enthielt. Als Reaktionspuffer wurde dabei 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 verwendet. 100 μl jedes Ansatzes wurden 10fach verdünnt mit 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8, die Lösung in 1 ml Quarzküvetten transferiert und das UV/Vis Spektrum gemessen. Der Rest der Lösung wurde bei 37 °C in einem

Thermomixer der Firma *EPPENDORF (Thermomixer comfort)* 3 h bei Schütteln mit 350 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung abzentrifugiert (RT, 14000 rpm, 10 min) um die Bildung von Feststoffen zu kontrollieren und das Pellet gegebenenfalls bei 4 °C aufbewahrt. Der Überstand wurde zur Messung des Spektrums 10 fach mit 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 verdünnt und 1 ml dieser Lösung in eine 1 ml Quarzküvette transferiert.

Die Pellets wurde in jeweils 10 µl DMSO gelöst und mit 990 µl 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 das UV/Vis Spektrum aufgenommen.

Alle Spektren wurden zwischen 220 nm und 800 nm mit dem UV Spektrometer der Firma *SHIMADZU UV-1800* gemessen. Als Referenz wurde 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 eingesetzt.

6.3 verwendete Chemikalien

(+) Sodium L-ascorbate	Sigma
Ammonium sulfate	Sigma
Catalase from bovine liver	Sigma
Citronensäure	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Iron (II) Sulfate heptahydrate	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumphosphat dibasisch	Sigma
Naringenin	Molekula
Poly(ethylen glycol) average Mn 4000	Sigma
Polyvinylpolypyrrolidon	Appli Chem
Sodium acetate	Sigma
Sodium chloride	Sigma
Tri-Sodium citrate Dihydrate	Fluka
Triton X-114	Sigma
Trizma Base	Sigma
α -Ketoglutaric acid	Fluka

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. Reedijk
Naturwissenschaften, **1987**, 74, 71
- [2] W. Kaim, B. Schwederski
Bioanorganische Chemie, **1995**
- [3] B. G. Malmström
Annual Review of Biochemistry, **1982**, 51, 21
- [4] S. Mauracher
Diplomarbeit, Universität Wien, **2010**
- [5] T. Nakayama, K. Yonekura-Sakakibara, T. Sato, S. Kikuchi, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, T. Ueda, M. Nakao, Y. Tanaka, T. Kusumi, T. Nishino;
Science, 2000, 290, 1163
- [6] C. Molitor
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **2009**
- [7] A. G. Prescott, P. John
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **1996**, 47, 245
- [8] A. G. Prescott, M. D. Lloyd
Natural Product Reports, **2000**, 17, 367
- [9] S. Ye, C. Riplinger, A. Hansen, C. Krebs, J. M. Bollinger, F. Neese
Chemistry a European Journal, **2012**, 18, 6555
- [10] B. Winkel-Shirley
Plant Physiology, **2001**, 126, 485
- [11] S. Martens, A. Mithöfer
Phytochemistry, **2005**, 66, 2399
- [12] S. Martens, G. Forkmann, L. Britsch, F. Wellmann, U. Matern, R. Lukačín
FEBS Letters, **2003**, 544, 93
- [13] Y. J. Lee, J. H. Kim, B. G. Kim, Y. Lin, J.H. Ahn
BMB Reports, **2008**, 41, 68
- [14] T. Nakayama;
Journal of Bioscience an Bioengineering, **2002**, 94, 487
- [15] M. Otto
Analytische Chemie, **2000**
- [16] <http://www.sigmaaldrich.com>

- [17] C. Bordier
The Journal of Biological Chemistry, **1981**, 256, 1604
- [18] E. V. C. Cunha, M. Aznar
Journal of Chemical and Engineering Data, **2009**, 54, 3242
- [19] D. H. Atha, K. C. Ingham
The Journal of Biological Chemistry, **1981**, 256, 12108
- [20] F. Fischer, S. Bauer
Chemie unserer Zeit, **2009**, 43, 376
- [21] R. Lukačín, Z. Matern, K. T. Junghanns, M. Heskamp, L. Britsch,
G. Forkmann, S. Martens
Archives of Biochemistry an Biophysics, **2001**, 393, 177
- [22] E. L. Hegg, L. J. Que
European Journal of Biochemistry, **1997**, 250, 625
- [23] S. Han, L. D. Eltis, K. N. Timmis, S. W. Muchmore, J. T. Bolin
Science, **1995**, 270, 976
- [24] K. E. Goodwill, C. Sabatier, C. Marks, R. Raag, , P. F. Fitzpatrick, R. C.
Stevens
Natural Structural Biology, **1997**, 4, 578
- [25] W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J. T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod
Biochemistry, **1996**, 35, 10687
- [26] M. S. Lah, M. M. Dixon, K. A. Pattridge, W. C. Stallings, J. A. Fee,
M. L. Ludwig
Biochemistry, **1995**, 34, 1646
- [27] P. L. Roach, I. J. Clifton, V. Filop, K. Harlos, G. J. Barton, J. Hajdu,
I. Andersson, C. J. Schofield, J. E. Baldwin
Nature, **1995**, 375, 700

Zusammenfassung (Deutsch)

Im Zuge dieser Masterarbeit wurden zwei Themen behandelt.

Zunächst wurde das Typ-III-Kupferprotein Aureusidinsynthase aus Löwenmäulchen isoliert. Dazu wurden verschiedene Isolierungsprotokolle entwickelt und getestet. Anschließend wurde dieses Protein ersten Reinigungsschritten unterzogen und seine Aktivität photometrisch und mittels HPLC bestimmt. Außerdem wurde Butein, in Bezug auf seine Eignung als Substrat zur photometrischen Bestimmung getestet. In weiterer Folge wurden die Enzymaktivitäten der Aureusidinsynthase in *Dahlia sp.* und *Coreopsis lanceolata* verglichen.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Entwicklung eines photometrischen Aktivitätstests für die Bestimmung der Enzymaktivität des Eisenproteins Flavon Synthase. Dazu wurden aus *Petroselinum crispum* Proteinproben gewonnen und mittels Ionenaustauschchromatographie getrennt. Auf Basis der aktuellen Literatur wurden zwei Protokolle für die Verfolgung der durch FNS katalysierten Reaktion entwickelt und getestet. Neben der Variation der Parameter des Aktivitätstests wurde auch die Isolierung aus Petersilie den spezifischen Eigenschaften des Zielproteins angepasst.

Abstract (English)

The focus of this thesis was on two different topics. First, the type-III-copper protein aureusidin synthase was isolated. Therefore different isolation protocols have been developed and tested. Subsequently, this protein was first subjected to purification steps, and its activity was then determined photometrically and by HPLC. In addition, butein was examined for its suitability as a substrate for the photometric determination. Finally the enzyme activities of aureusidin synthase in *Dahlia sp.* and *Coreopsis lanceolata* were compared.

The aim of the second part of this work was to develop a photometric activity assay for the determination of the enzyme activity of the iron protein flavone synthase. The protein samples were obtained from *Petroselinum crispum* and then separated by ion exchange chromatography. Based on current literature, two protocols for the observation of the reaction catalyzed by FNS were developed and tested. In addition to the variation of the parameters of the activity tests, the isolation from parsley has been adapted to the specific properties of the target protein.

Lebenslauf

Persönliche Daten



Name:	Barbara Janka, BSc
Geburtsdatum:	13.11.1983
Geburtsort:	Wien
Familienstand:	ledig
Adresse:	Geiselbergstraße 60/1/6, 1110 Wien
Telefonnummer:	0681/10518092
e-mail:	barbara.janka1@gmail.com

Schul Ausbildung

1989 – 1993	Volksschule, 1100 Wien
1993 – 2002	Gymnasium, 1100 Wien
Juni 2002	Reifeprüfung

Studium

Oktober 2002	Beginn Diplomstudium Chemie
September 2011	Abschluss Bachelorstudium Chemie
Oktober 2011	Beginn Masterstudium Biologische Chemie

berufliche Laufbahn

Sommer 2003	Assistentin der EDV, Airliquid Schwechat
2003 - 2006	Freier Dienstnehmer, IFES Wien
Sommer 2006	Ferialpraktikum, Securitas Wien
2006 - 2011	Angestellte im tel. Kundendienst, Stv. Teamleitung, GIS Wien
2011 - 2012	Studienassistentin am Institut für biophysikalische Chemie, Universität Wien
2012 - heute	Angestellte tel. Kundendienst, GIS Wien

weitere Qualifikationen

Fremdsprachen	Englisch fließend
Kurse/Seminare	Seminare zum Thema Kommunikation und Mentoring (firmenintern GIS)
sonstiges	Führerschein B, MS Office

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig erstellt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Hilfsmittel verwendet. Literaturstellen, die aus anderen Werken entnommen oder sinngemäß zitiert sind, habe ich entsprechend gekennzeichnet.

Wien, August 2012

Barbara Janka, BSc.