



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN

## Diplomarbeit

### Untersuchungen zur Reaktion der Chalkonsynthese

Ausgeführt am

**Institut für Verfahrenstechnik,**

**Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften**

**der Technischen Universität Wien**

Unter der Anleitung von

**Associate Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heidi Halbwirth**

**Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Christian Molitor**

durch

**Matthias Schöpf BSc**

Wien, 2022

Unterschrift

## Danksagung

Das erste Dankeschön widme ich Associate Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heidi Halbwirth, die mir diese Diplomarbeit ermöglicht hat, obwohl ich nicht vom „Fach“ bin. Sie hat für mich ein Thema vorgeschlagen, in dem ich meinen biotechnologischen Horizont beträchtlich erweitern konnte und das dennoch relevant zu meinem Synthesehintergrund ist. Selbst nach meiner mehrjährigen Pause wurde ich mit offenen Armen zurück empfangen und mir großartige Unterstützung angeboten. Des Weiteren danke ich Ao.Univ.Prof.i.R. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Karl Stich, der mich durch seine hochinteressante Vorlesung „Phytochemie“ erst auf die Idee gebracht hat, eine Diplomarbeit in der Forschungsgruppe der Pflanzenbiochemie durchzuführen.

Vielen Dank gebührt meinem Betreuer Projektass. (FWF) Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Christian Molitor, der mich sehr darin unterstützte ein ca. 20h pro Woche Diplomarbeitprojekt neben meinem Beruf zu strukturieren. Ich hatte immer das Gefühl, dass er genauso interessiert an meinen Ergebnissen und meinem Fortschritt ist, wie ich selbst. Ich habe mich nie alleingelassen, oder hoffnungslos gefühlt und habe viel aus unseren Gesprächen gelernt.

Meinen damaligen KollegInnen Barbara Roth MSc und Julia Weissensteiner MSc, die mir viele Tricks und Kniffe zeigten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen als ich nicht weiterwusste.

Zu guter Letzt möchte ich Samira El-Shamy danken. Ich bin durch unsere Beziehung enorm gewachsen und auch wenn es so schien, als ob die Diplomarbeit nie fertig gemacht werden würde, rechne ich dir hoch an, dass du bis zum Schluss an mich geglaubt hast. Ich habe durch dich gelernt meine Prioritäten besser zu setzen und dass ich höhere Ziele in meinem Leben anstreben will.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Flavonoide .....	1
1.1.1	Flavonoid-Biosynthese .....	2
1.2	Phlorizin/Phloretin .....	4
1.2.1	Pharmakodynamik von Phlorizin/Phloretin .....	4
1.3	CHS .....	5
1.4	CHI .....	8
1.5	Enzymkinetik .....	9
1.5.1	Die Michaelis-Menten-Gleichung [19] .....	9
1.5.2	Enzyminhibition.....	11
1.6	Chromatographie .....	12
1.6.1	Einteilung chromatographischer Methoden .....	13
1.6.2	FPLC .....	13
2	Zielsetzung.....	15
3	Experimenteller Teil .....	16
3.1	Materialien .....	16
3.1.1	Liste der Gerätschaften .....	16
3.1.2	Liste der verwendeten Chemikalien.....	17
3.2	Rekombinante Expression von CHS und CHI .....	19
3.2.1	CHS in pGEX6-P1-Plasmid.....	19
3.2.2	CHS in pTrcHis2-TOPO-Plasmid .....	21
3.2.3	CHI in pTrcHis2-TOPO-Plasmid .....	21
3.3	Isolation und Reinigung der Enzyme .....	21
3.3.1	Zelllyse mittels Lysozyms.....	21
3.3.2	Zelllyse durch Ultraschall.....	22
3.3.3	SDS-Page.....	22
3.3.4	Reinigung mittels FPLC .....	24
3.4	Enzymassays - Charakterisierung der CHS.....	25
3.5	Detektion mittels HPLC und UV/Vis-Detektor .....	26
3.6	Sequenzvergleich und Homologie Modell.....	26
4	Ergebnisse.....	27
4.1	Optimierung der Expression.....	27

4.1.1	Variation der IPTG-Konzentration .....	27
4.1.2	Umstieg auf den pTrc-Vektor .....	29
4.2	Aufschluss .....	30
4.3	Proteinreinigung.....	31
4.4	Ausbeuten .....	35
4.5	Enzymcharakterisierung .....	36
4.5.1	Quantifizierung der Produkte.....	36
4.5.2	Kinetische Messungen von CHS mit <i>p</i> -Coumaroyl-CoA als Substrat .....	37
4.5.3	Kinetische Messungen von CHS mit <i>p</i> - Dihydrocoumaroyl-CoA als Substrat.....	39
4.6	Enzymkinetische Parameter der CHS und deren Interpretation.....	41
5	Diskussion und Ausblick .....	45

## Zusammenfassung

Die Diplomarbeit befasst sich mit der Expression und Reinigung des Enzyms Chalkonsynthase (CHS) und der Charakterisierung und Optimierung der von ihr katalysierten Bildung von Naringeninchalkon mit anschließender Zyklisierung zum stabilen Naringenin durch Zugabe von Chalkonisomerase (CHI). Überdies wurde die Akzeptanz der CHS gegenüber einem weiteren Substrat, dem *para*-Dihydrocoumaroyl-CoA untersucht und auch dieses mit Malonyl-CoA zum Produkt – Phloretin – umgesetzt. Phloretin, ein Dihydrochalkon, ist ungewöhnlich hoch konzentriert im Apfel vorzufinden. Beide Reaktionen wurden charakterisiert und deren Kinetik miteinander verglichen.

Ein CHS-Klon aus dem Kulturapfel (*Malus domestica*) war bereits in einem pGEX-Plasmid für die Expression in *E. coli* verfügbar, jedoch wurde trotz hoher Expressionsraten nur wenig aktives Enzym gewonnen. Die Variation von Expressionsparametern (IPTG Menge, Temperatur, Dauer) lieferte keine entscheidenden Verbesserungen. Die Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 könnte eine weitere Optimierung darstellen, jedoch wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, da der Wechsel des Plasmids von pGEX zu pTrc einen so gewaltigen Verbesserungsschritt darstellte, dass die Expression bereits zufriedenstellend war. Weitere Optimierungsschritte wie Induktormenge und Abkühlen der Kulturen vor der Induktion, sodass die Expression nicht startet, bevor die Kulturen die erforderlichen 28°C erreichen, lieferte hohe Mengen an aktivem Enzym, die für alle durchgeführten Untersuchungen ausreichte.

Mit einer gereinigten Enzymlösung definierter Konzentration wurden die oben genannten, im pflanzlichen Organismus ablaufenden Reaktionen *in-vitro* durchgeführt und kinetische Parameter wie die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  in Bezug auf beide Reaktionsteilnehmer bei der Naringenin- bzw. Phloretinbiosynthese ermittelt. Der Vergleich der kinetischen Größen weist nicht darauf hin, dass die CHS aus dem Apfel spezielle Eigenschaften in Bezug auf die Phloretinsynthese besitzt. Die Sonderstellung, die der Apfel im Pflanzenreich aufgrund der großen gebildeten Phloretinmenge einnimmt, muss daher einen anderen Grund haben.

## Abstract

This thesis focuses on the expression and purification of the enzyme chalcone synthase (CHS) and the characterization of its reactions with two substrates. On the one hand, the formation of naringenin chalcone from *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA was studied, as part of the prominent flavonoid pathway, on the other hand, the formation of phloretin from *p*-dihydrocoumaroyl-CoA and malonyl-CoA, which is most prominent in apple. To the assays forming naringenin chalcone a second enzyme, chalcone isomerase (CHI) was added to promote the formation of the stable naringenin for detection purposes. Both reactions were compared to each other to gain insight into the rare ability of the apple to produce predominantly dihydrochalcones like phloretin and its derivatives.

A CHS gene cloned into a pGEX plasmid from the cultivated apple (*Malus domestica*) was available in the research group. Although high expression rates could be obtained, most of the formed CHS was insoluble due to the formation of inclusion bodies and was therefore inactive. The variation of various expression parameters did not result in the production of active enzyme. Another CHS clone available in the research group, cloned into a pTrc plasmid provided better results. Large amounts of active enzyme were expressed, purified, and stored for later use in the enzyme assays.

A series of enzyme assays were conducted, and the formed products quantified by HPLC. Kinetic parameters like the Michaelis-Menten-constant  $K_M$  and the maximum reaction velocity  $V_{max}$  for both cinnamoyl derivatives were determined and compared to each other. The results do not indicate that the apple CHS is the key enzyme responsible for the formation of large amounts of dihydrochalcones in its tissues. Even though the CHS prefers *p*-dihydrocoumaroyl-CoA as a substrate,  $V_{max}$  was considerably lower. In the end, the catalytic efficiency  $k_{cat}$  of both reactions are quite similar. The unusually high polyphenol content of apple tissues must therefore have other reasons.

# 1 Einleitung

## 1.1 Flavonoide

Flavonoide sind in höheren Pflanzen weitverbreitete sekundäre Metabolite, die eine Reihe von wichtigen Funktionen für das Pflanzenwachstum und deren Entwicklung erfüllen. Unter anderem geben Flavonoide den Blüten ihre Farbe, die zur Anlockung von Bestäubern oder Abschreckung von Fressfeinden dienen. Weiters erfolgt durch sie die Stimulation von *Rhizobium*-Bakterien in der Erde und erhöhen dadurch deren Stickstofffixierung. Hohe Absorptionskoeffizienten im Wellenlängenbereich um 250 nm aller Flavonoide aufgrund des B-Rings und um 350 nm aufgrund der konjugierten Carbonylgruppe (Sisa et al., 2010) verleihen den Pflanzen Schutz vor ultravioletter Strahlung. Des Weiteren können Flavonoide in der Pflanze auch als Substrat herangezogen werden, um rasch Derivate herzustellen um auf Bedrohungen wie Infektionen, erhöhte UV-Intensität, Herbivoren, oxidativen Stress oder anderen Stressoren wie atypisch hohe Konzentrationen von z.B. Schwermetallen oder Sulfaten im Boden reagieren zu können (Taylor and Grotewold, 2005; Hassan and Mathesius, 2012; Nakabayashi et al., 2014; Kuhn et al., 2016).

Strukturell leiten sich das Grundgerüst der Flavonoide von Flavan (Abbildung 1-1) ab, einem Molekül, das aus zwei C<sub>6</sub>-Aromaten und einem sechsgliedrigen O-Heterozyklus besteht.

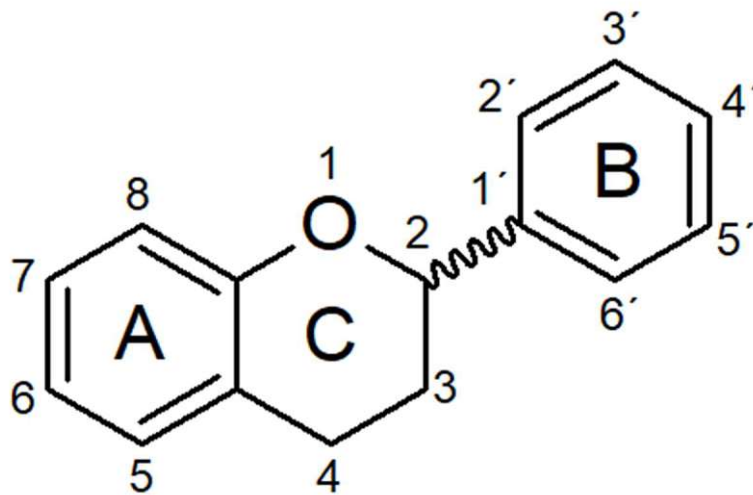


Abbildung 1-1 Flavan ist die zugrundeliegende Struktur der Flavonoide. Substitutionen – vor allem Hydroxylgruppen – an den unterschiedlichen Ringpositionen teilen die daraus resultierenden Moleküle in die unterschiedlichen Flavonoidgruppen, z.B. Flavanole, Flavonole, Flavone, Flavanone, Anthocyanidine, etc. ein.

Das erste Flavonoid des pflanzlichen Flavonoid-Biosynthesepfads ist das Flavanon Naringenin, das selbst Substrat einiger Enzyme ist um die zahlreichen unterschiedlichen Derivate der Flavonoide, wie z.B. Flavonole, Anthocyanidine oder Polyphenole in den Pflanzen herzustellen. Naringenin entsteht aus

der Zyklisierung von Naringeninchalkon, welches wiederum aus der Reaktion von *para*-Coumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA, katalysiert durch das Enzym Chalkonsynthase (CHS) entsteht.

### 1.1.1 Flavonoid-Biosynthese

Die Flavonoid-Biosynthese beginnt mit der CHS-katalysierten Reaktion von *p*-Coumaroyl-CoA, welches im Phenylpropanoid-Biosyntheseweg aus der Aminosäure Phenylalanin entsteht, und drei Molekülen Malonyl-CoA, welche durch Carboxylierung aus Acetyl-CoA entstehen, zum Naringeninchalkon (Austin, Noel, 2003). Die Zyklisierung des C-Rings, in der die 2'-OH-Gruppe des A-Rings mit der *p*-Coumaroyl-Doppelbindung eine Michael-Addition ausführt, passiert mit Hilfe des Enzyms CHI stereospezifisch. Daraus resultiert das Flavanon Naringenin. Diese Zyklisierung findet jedoch auch ohne Enzym – vor allem im basischen Milieu – unspezifisch statt. Aus den Flavanonen leiten sich dann alle weiteren Flavonoide ab.

Die oxidative Zyklisierung des Chalkons kann jedoch unter Einwirkung eines anderen Enzyms, der Aureusidinsynthase auch einen fünfgliedrigen Ring ergeben, wodurch die Substanzklasse der Aurone gebildet wird (Toru Nakayama et al., 2001).

In den Abbildung 1-2 sieht man im oberen Rechteck die Entstehung von *p*-Coumaroyl-CoA im Phenylpropanoidweg, das daraufhin mit drei Molekülen Malonyl-CoA die Reaktion eingeht, die zum Chalkon und dem Ursprung des Flavonoid-Biosynthesewegs (unteres Rechteck) führt (Yu and Jez, 2008). Die Abkürzungen der Enzyme sind in Tabelle 1-1 alphabetisch sortiert einsehbar.

4CL	4-Coumarat-CoA-Ligase
ANS	Anthocyanidin-Synthase
AUS	Auron-Synthase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CHI	Chalkon-Isomerase
CHR	Chalkon-Reduktase
CHS	Chalkon-Synthase
DFR	Dihydroflavanol 4-Reductase
F3'5'H	Flavonoid-3'5'-Hydroxylase
F3H	Flavonoid-3-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
FLS	Flavonol-Synthase
FNS	Flavon-Synthase
HID	2-Hydroxyisoflavanon-Dehydratase
IFS	2-Hydroxyisoflavanon-Synthase
LCR	Leukoanthocyanidin-Reduktase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase

Tabelle 1-1 Abkürzungen der im Flavonoid-Biosynthesewegs beteiligten Enzyme



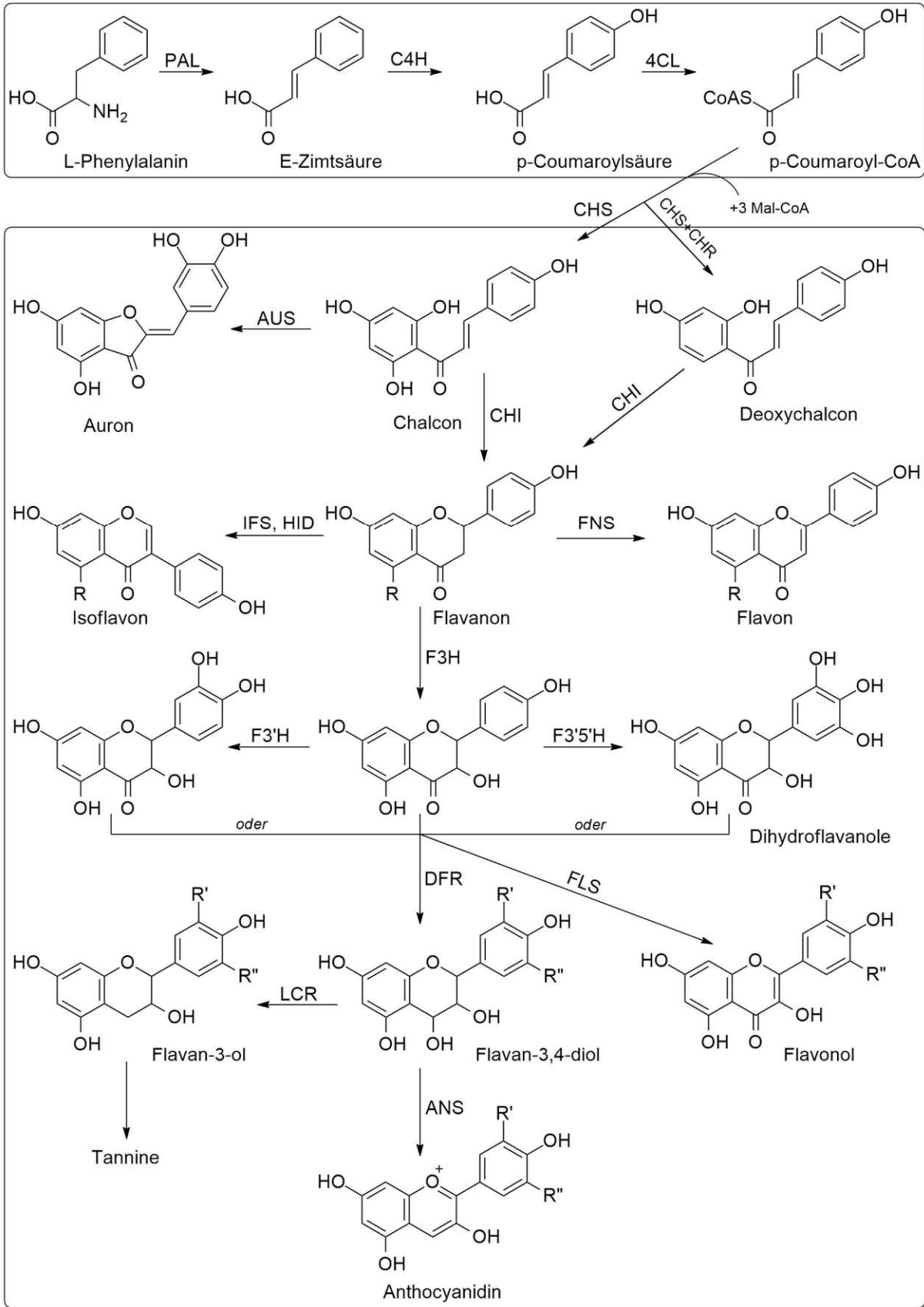


Abbildung 1-2 Flavonoid-Biosynthese. Aus dem Phenylpropanoidweg (oberes Rechteck) entsteht 4-Coumaroyl-CoA, welches mit 3x Malonyl-CoA, das Naringeninchalkon bildet. R, R' and R'' entsprechen -H oder -OH. Die Abkürzungen der Enzyme sind in Tabelle 1-1 nachzulesen

## 1.2 Phlorizin/Phloretin

Phloretin, und sein 2'-OH-Glycosid Phlorizin, sind Dihydrochalkone, eine Unterklasse der Flavonoide, die in der Natur nur selten vorzufinden ist. Eine bedeutende Ausnahme stellt der Apfel dar. In *Malus* kann der Phloretingehalt in manchen Geweben bis zu 90% aller löslichen Phenole ausmachen (Gosch et al., 2009; Gosch et al., 2010a).

Dihydrochalkone unterscheiden sich von den Chalkonen durch die Sättigung der  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung, einem Merkmal, dass eine Zyklisierung, wie sie bei den Chalkonen geschieht unmöglich macht. Die Debatte bei welchem Schritt der Biosynthese diese Doppelbindung reduziert wird ist mittlerweile abgeschlossen. Phloretat-CoA oder *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA, die reduzierte Form von *p*-Coumaroyl-CoA, entsteht unmittelbar aus dieser, da Phloretinbildung in *in-vitro* Experimenten durch Inkubation von Pflanzenextrakten gelang, wenn *p*-Coumaroyl-CoA anwesend war (Gosch et al., 2009; Gosch et al., 2010a). Die Hypothese, dass die Chalkonsynthese für die Bildung von Phloretin verantwortlich ist, ist naheliegend aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu den Chalkonen. Dies konnte zuletzt auch in dieser Arbeit demonstriert werden. Die Suche nach dem Enzym, das diese Reduktion zu Phloretat-CoA katalysiert ist jedoch weiterhin Gegenstand aktiver Forschung. Da die CHS aber ein weit verbreitetes Enzym in der Flora ist, aber fast nur der Apfel Phloretin erzeugt scheint diese Reduktase eine Schlüsselstelle in der Biosynthese von Phloretin einzunehmen.

### 1.2.1 Pharmakodynamik von Phlorizin/Phloretin

#### 1.2.1.1 Renale Glukosurie

Phlorizin konnte bei intravenöser Gabe als Auslöser von renaler Glukosurie (Anwesenheit von Glucose im Urin) identifiziert werden (Booth et al., 1958). Das bedeutet, dass Phlorizin (jedoch nicht Phloretin), die Wiederaufnahme von Glucose aus dem Primärharn unterbindet und die Glucose somit über den Urin ausgeschieden wird (Shapiro, 1947). Injektion von Phloretin, Naringenin oder Naringin sowie die orale Gabe von Phlorizin wiesen diese physiologische Wirkung nicht auf (Booth et al., 1958).

Da die IV Gabe von Phlorizin den Blutzuckerspiegel senkt, sind potenzielle Anwendungen in der Therapie von Diabetes oder Adipositas denkbar (Najafian et al., 2012).

#### 1.2.1.2 Osteoporose

Osteoporose ist eine Krankheit der Knochen, die deren Masse und Festigkeit beeinträchtigt und deren Brüchigkeit erhöht. Eine Ursache für Osteoporose sind u.a. Entzündungsreaktionen, die z.B. in postmenopausalen Frauen aufgrund von erhöhter proinflammatorischer Cytokinproduktion vermehrt auftreten (Ralston, 1994; Pacifici, 1998). Orale Gabe von Phlorizin verminderte die Gewichtszunahme, die man manchmal mit dem Abfall der Sexualhormonproduktion nach der Menopause in Verbindung bringt, jedoch auch die Gewichtsabnahme, die mit Entzündungsreaktionen einhergeht. Es ist daher möglich, dass Phlorizin gegen Osteoporose postmenopausalen Frauen, die keine Hormonersatztherapie durchführen wollen, hilfreich ist. Da Phloretin auch als Phytohormon schwache Wechselwirkung mit dem Östrogenrezeptor aufweist (Miksicek, 1993), könnte dies eine weitere Ursache für die schützende Wirkung gegen Osteoporose nach der Menopause sein. Die

Zusammenhänge werden jedoch noch in Frage gestellt (Patisaul and Jefferson, 2010). Die antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden im Allgemeinen, die freie Radikale, die auch den Knochenabbau fördern, abfangen, sind wahrscheinlich ebenfalls an der Prävention von Knochenabbau beteiligt (Puel et al., 2005).

### 1.3 CHS

Die Chalkonsynthese ist ein in höheren Pflanzen allgegenwärtiges Enzym, das zu der Familie der Polyketidsynthasen (PKS) gehört, im speziellen zu der Typ III PKS. Die Polyketidsynthasen stammen vermutlich von den Fettsäurensynthasen (FAS) ab, und teilen mit ihnen die  $\beta$ -Ketosynthaseaktivität die die Kopf-Schwanz-Verknüpfung von  $-\text{CH}_2\text{-CO}-$  Bausteinen in einer wachsenden Polyketidkette katalysieren. Während in den FAS diese Polyketidkette reduziert und dehydriert wird, um lange inerte Kohlenwasserstoffketten zu produzieren, bleiben bei der Reaktion in den PKS-Enzymen diese Reduktionen aus um mit den verbleibenden polaren Ketogruppen eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen, wie zum Beispiel Zyklisierungen zu ermöglichen.

Die CHS liegt als Homodimer vor, mit einer Monomergröße von 42 – 45 kDa. Die beiden Monomere agieren unabhängig voneinander, da es selbst bei Inaktivierung eines aktiven Zentrums zur Produktbildung kommt (S. Tropf, B. Kärcher et al, 1995). Aus Untersuchungen der Kristallstruktur von CHS konnte man drei konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum identifizieren die eine essenzielle Rolle für dessen Funktion darstellen (siehe Abbildung 1-3, nachgezeichnet aus Austin, Noel, 2003, S-88). Cys164 ist aufgrund einer Säure-Basenreaktion mit dem räumlich nahen His303 deprotoniert und sorgt als starkes Nucleophil dafür, dass das Startsubstrat – z.B. *p*-Coumaroyl-CoA – an der Carbonylgruppe unter Abgang des SCoA-Rests kovalent gebunden wird. His303 und Asn336 orientieren das Substrat räumlich durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff und stabilisieren den tetrahedralen Übergangszustand bei der Erstsitution, sowie bei den folgenden Angriffen der Acetylcarbanionen bei der Kettenverlängerung. Das Zweitsubstrat – Malonyl-CoA – wird über den Sauerstoff des Thioesters via Wasserstoffbrückenbindung von His303 und Asn336 stabilisiert und zur Decarboxylierung am C<sub>3</sub> bewegt. Das entstandene Acetylenolat attackiert die Carbonylbindung des am Cys164 gebundenen Startermoleküls und das nun um 2 C-Atome verlängerte Intermediat eliminiert das Cys164-Thiolat. Ohne nochmal dazwischen protoniert zu werden attackiert das Thiolat von Cys164 die neue endständige Carbonylgruppe des Thioesters und „hantelt“ sich somit ans neue Kettenende weiter. Dieser Prozess der Kettenverlängerung wird zwei Mal wiederholt, bis die CHS Bindungstasche voll ist. (Austin, Noel, 2003) Schlussendlich zyklisiert das lineare Tetraketid in einer intramolekularen C6 -> C1 Claisen-Kondensation zu einem „Cyclohexantrion“-Ring, der sich unverzüglich in seine tautomere aromatische Form umlagert. Bei pH-Werten <8 liegt Phloroglucinol rein aromatisch vor und zwischen pH 8 und 14 zum Teil in einer 2,5-Cyclohexadienon Form. In <sup>13</sup>C-NMR und UV-VIS Versuchen kann in freier Lösung auf der gesamten pH-Skala keine Hexantrion-Spezies detektiert werden (D. Wang, K. Hildenbrand et al., 1993). Innerhalb der Bindungstasche eines Enzyms könnte dies jedoch anders sein.

Untersuchungen an Mutanten, die die Zyklisierungsaktivität der CHS hemmen, ergaben, dass weiterhin Tetraketide entstehen: Ein Beleg, dass das Ende der Kettenverlängerung nicht von der Zyklisierung

abhängt. Hinweise deuten darauf hin, dass die Zyklisierung spontan erfolgt, jedoch gibt es in der CHS – nicht jedoch in allen Typ III PKSen – einige weitere konservierte, inerte Aminosäuren im aktiven Zentrum, die für die sterische Orientierung der Tetraketidkette und dadurch Begünstigung der Zyklisierung eine große Bedeutung spielen könnten.

Folgende Tatsachen deuten darauf hin, dass CoA-gebundene Intermediate dieser Kettenwachstumsreaktion das katalytische Zentrum der CHS verlassen:

- Mit höherer Konzentration von Mercaptoethanol oder anderen reduzierenden Thiolen bei in-vitro Assays wird beobachtet, dass weniger Chalkon und mehr trunkierte Produkte entstehen. Da die Bindungstasche der CHS sehr schwer zugänglich ist, ist es wahrscheinlich, dass solche Nebenprodukte außerhalb des Enzyms entstehen, wo ihre CoA-Bindung gespalten werden kann und sie hiermit inert für die CHS werden.
- Lineare Polyketide bilden im sauren Milieu Lactone. Die Ansäuerung von Assays mit CHS-Mutanten, die in ihrer Fähigkeit zur Zyklisierung eingeschränkt wurden, ergeben einen höheren Anteil von Lacton-Produkten.
- Weitere Hinweise für die Ein- und Ausdiffusion von Intermediaten liefern Untersuchungen von der Biosynthese von reduzierten Chalkonen in Assays die CHS und CHR enthalten. Zum Ersten wird Chalkon selbst nicht als Substrat der CHR (daher spricht man heute zumeist von einer PKR, statt einer CHR) akzeptiert, daher muss das Substrat die lineare Polyketidkette oder das nicht-aromatisierte Trion sein. Des Weiteren ist es der CHR in einem mixed assay mit CHS nur möglich einen Teil der Chalkone zu reduzieren, wie es zu erwarten wäre, wenn die Reduktion der CHR sowie Zyklisierung und Aromatisierung der CHS miteinander konkurrieren. (Austin, Noel, 2003)

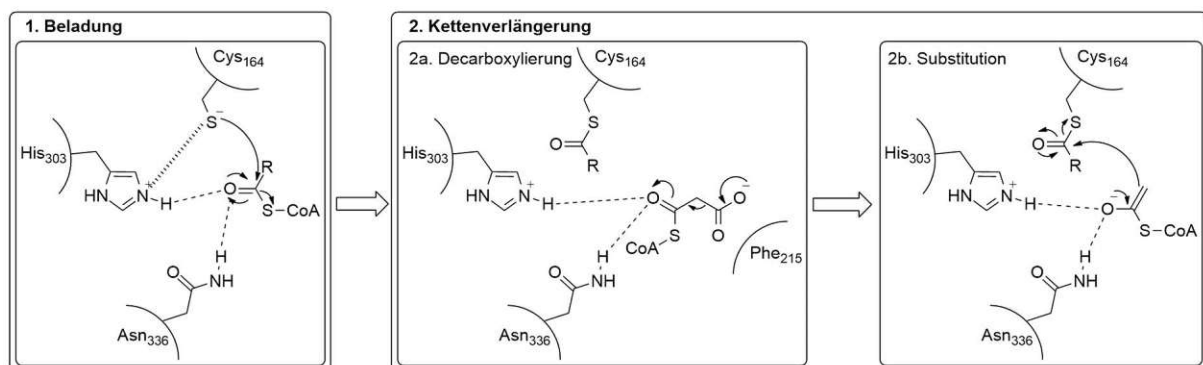


Abbildung 1-3 Der gegenwärtig akzeptierte Reaktionsmechanismus der CHS, mit Beladung (R entspricht dem Rest der p-Coumaroyl Spezies), Malonyl-CoA-Decarboxylierung, und Kettenverlängerung mit einem  $-CH_2C=O-$  Baustein unter Eliminierung der Cys<sub>164</sub>. Bei der Synthese von Naringenchalkon wird Schritt 2 dreimal wiederholt.

Neuere Publikationen schlagen aufgrund der Kristallstruktur der CHR und in-silico modellierten Docking-Szenarien des Substrats vor, dass das cyclische Trion das Substrat der CHR sei (E. K. Bomati et al., 2005).

In der nachfolgenden Abbildung 1-4 sieht man die Reaktionsabfolgen, die von der CHS katalysiert werden. Es entsteht Naringeninchalkon, dass mit CHI zu Naringenin reagiert, oder, bei Anwesenheit von CHR zum Isoliquiritigenin, bzw. dem CHI katalysierten ringgeschlossenen Produkt Liquiritigenin.

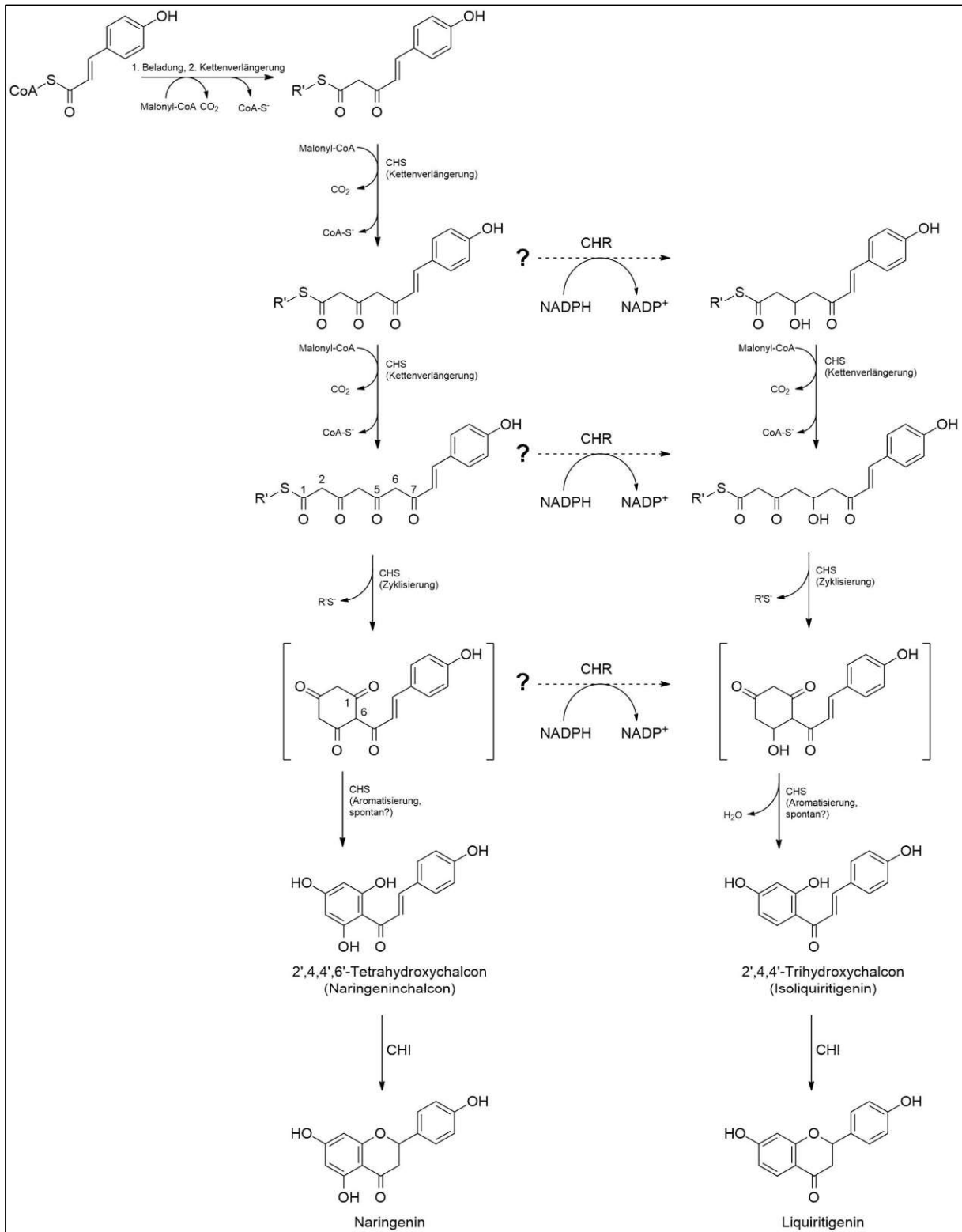


Abbildung 1-4 Reaktionsintermediate und -produkte der CHS mit potenziellen Pfaden zu reduzierten Produkten via CHR. R' entspricht entweder Coenzym A oder Cys<sub>164</sub> der CHS.

## 1.4 CHI

Die Chalkonisomerase (CHI) ist ein monomeres Enzym bestehend aus ca. 220-240 Aminosäuren, das die stereospezifische, intramolekulare Ringschlussreaktion von Naringenchalkon bzw. 6'-Desoxychalkon (Isoliquiritigenin) zu den jeweiligen Flavanonen (2S)-Naringenin und (2S)-Liquiritigenin katalysiert (Jez et al., 2000).

Das aktive Zentrum der CHI ist eine schmale Spalte, die vorwiegend apolare Reste auf ihrer Oberfläche aufweist und dafür sorgt, dass das Chalkon auf eine spezielle Weise räumlich angeordnet vorliegt und freie Rotation sterisch unterbindet, sodass nur das biologisch relevante (S)-Enantiomer entstehen kann. Val110 unterbindet eine Rotation des Trihydroxyrings, sodass die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung nicht von der „falschen“ Seite attackiert werden kann und Leu38 und Lys109 fixieren den Coumaroylteil. Co-Kristalle für die Kristallstrukturanalyse gelangen nur mit dem (S)-Enantiomer von Naringenin (Jez et al., 2000).

Das Substratmolekül wird von zwei Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert, eine zwischen Thr190 und der 7-Hydroxylgruppe von Naringenin und die zweite von Tyr106 (es sind jedoch weitere Aminosäuren an diesem H-Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt) über ein Wassermolekül zu dem Keton vom Chalkon, welche bei der sterischen Orientierung helfen und den tetragonalen Übergangszustand zu stabilisieren. In Assays mit CHI-Mutanten bei denen Tyr106 mit Phe ersetzt wurde, ist eine 100-fache Abnahme der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) zu verzeichnen. Nichtsdestotrotz verläuft die Reaktion mit solch einem Mutanten schneller als die unkatalysierte Zyklisierung, wobei die Wichtigkeit der sterischen Einflüsse aufgezeigt wird (Jez et al., 2000).

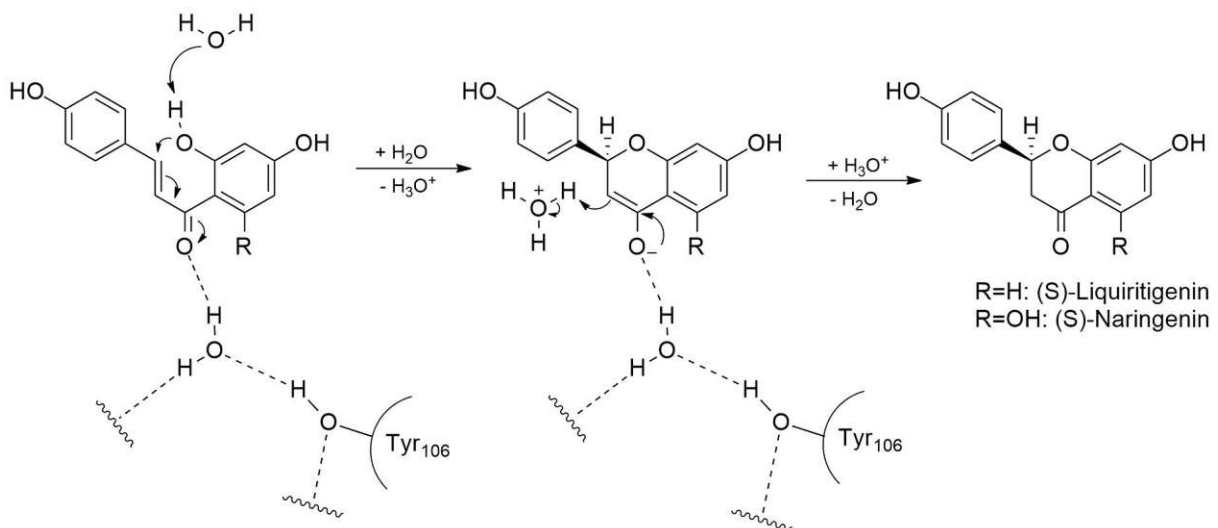


Abbildung 1-5 Reaktionsmechanismus des von der CHI katalysierten Ringschlusses von Naringenchalkon zu Naringenin (Jez et al., 2000).

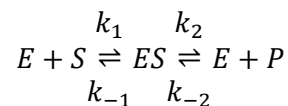
## 1.5 Enzymkinetik

Die Kinetik ist das Teilgebiet der physikalischen Chemie, das sich mit der Untersuchung der Geschwindigkeiten chemischer Reaktionen befasst. Die Enzymkinetik ist im speziellen die Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen. In chemischen Reaktionen erster und höherer Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängig. Dies gilt auch für die Enzymkinetik, jedoch beobachtet man, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nur bei niedrigen Substratkonzentrationen einen linearen Zusammenhang mit dem Substrat aufweist. In einem Diagramm in dem man die Anfangsgeschwindigkeit  $V_0$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  aufträgt weicht der lineare Bereich einer sukzessiv abflachenden Kurve – einer Sättigungshyperbel. Die Kurve nähert sich asymptotisch einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  die – auf die eingesetzte Enzymkonzentration bezogen – für das gegebene Enzym charakteristisch ist. Die Diffusion der Edukte in das Enzym, die chemische Umwandlung zu den Produkten und deren Diffusion aus dem Enzym, wirken limitierend, da kein freies Enzym mehr vorliegt, sodass durch weitere Substratzugabe die Produktbildungsrate nicht weiter gesteigert werden kann.

Zur Beschreibung solcher Reaktionen haben im Jahr 1913 Leonor Michaelis und Maud Menten ein Modell entwickelt, um das kinetische Verhalten von Enzymen zu beschreiben.

### 1.5.1 Die Michaelis-Menten-Gleichung [19]

Der entscheidende Punkt ihrer Überlegungen beruht auf der Bildung eines Enzym-Substratkomplexes  $[E] + [S] = [ES]$ , der die Reaktion von Substrat zu Produkt über das Zwischenprodukt  $[ES]$  zerteilt. Die Bildung dieses Komplexes geht rasch vonstatten, sodass der Schritt des Zerfalls von  $[ES]$  in das Produkt  $[P]$  und das freie Enzym  $[E]$  geschwindigkeitsbestimmend ist.



Zu Beginn der Reaktion, wenn noch kein Produkt gebildet wurde, ist die Rückreaktion von  $E + P$  zu  $ES$  vernachlässigbar und die Geschwindigkeit der Produktbildung ist einzig von  $[ES]$  (und der Konstante  $k_2$ ) abhängig:

$$V_0 = k_2[ES] \quad (1)$$

Die Michaelis-Konstante  $K_M$  wurde als der Quotient aus der Summe der Geschwindigkeitskonstanten mit der der  $[ES]$ -Komplex zerfällt bezogen auf die Geschwindigkeitskonstante, mit der er sich bildet, definiert.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2)$$

$K_M$  hat die Einheit der Konzentration und ist ein wichtiger Parameter für Enzyme der Auskunft über die Enzym-Substrat-Wechselwirkung gibt.  $K_M$  ist von der Substrat- und Enzymkonzentration unabhängig.

Eine wichtige Annahme in der Entwicklung der Michaelis-Menten-Gleichung wurde von George Briggs und John Haldane postuliert. Die Annahme des Fließgleichgewichts bedeutet das die Konzentration des Zwischenprodukts [ES] zu Beginn der Reaktion, bei hoher [S], konstant bleibt, auch wenn sich die Konzentrationen der Edukte und Produkte laufend ändern. Man kann dies folgend ausdrücken:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

In Worten: Die Geschwindigkeiten mit der der Enzym-Substrat-Komplex [ES] gebildet wird und mit der er zerfällt sind gleich.

Durch Umstellen der Gleichung und Einsetzen unseres Ausdrucks (2) für  $K_M$  erhält man:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (4)$$

Da die Konzentration des Substrats die des Enzyms im Normalfall bei weitem übersteigt, kann man die Konzentration des ungebundenen Substrats mit der Anfangskonzentration gleichsetzen. Die Konzentration an freiem Enzym [E] entspricht der Enzymgesamtanzahl  $[E_T]$  minus [ES].

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (5)$$

Wenn man Gleichung (5) in (4) einsetzt, erhält man:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_M} \quad (6)$$

Nun wurde die unbekannte Konzentration des freien Enzyms eliminiert. Durch Umstellung der Gleichung um alle [ES] auf einer Seite zu haben, ergibt sich:

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (7)$$

Auch [ES] ist nicht zugänglich, man kann es jedoch durch die Beziehung in Gl. (1) substituieren. Es folgt:

$$V_0 = \frac{k_2[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Als letzte Vereinfachung, setzen wir  $V_{max}$  für  $k_2[E_T]$  ein, da die Reaktionsgeschwindigkeit dann maximal ist, wenn das Enzym gesättigt ist, also [ES] gleich  $[E_T]$  ist, eine Voraussetzung, die bei hoher Substratkonzentration gegeben ist.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Gleichung 9 ist die **Michaelis-Menten-Gleichung**, die Geschwindigkeitsgleichung einer enzymkatalysierten Reaktion. Bei geringen Substratkonzentrationen, also wenn  $K_M \gg [S]$ , kann man



[S] im Nenner vernachlässigen und es zeichnet sich der lineare Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich niedriger [S] mit Anstieg  $V_{\max}/K_M$  ab:

$$V_0 = \frac{V_{\max}}{K_M} [S] \quad (10)$$

Bei sehr hoher Substratkonzentration [S], kann man  $K_M$  vernachlässigen, und es folgt  $V_0 = V_{\max}$ , dass die Situation widerspiegelt, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem [S] asymptotisch einem konstanten Wert nähert, der durch weitere Substratzugabe nicht weiter gesteigert werden kann.

Ein interessanter Zusammenhang zwischen  $K_M$  und [S] ergibt sich auch, wenn man genau die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit betrachtet:  $V_0 = \frac{V_{\max}}{2}$ . Dann resultiert aus der Michaelis-Menten-Gleichung  $K_M = [S]$ , das eine sehr nützliche Definition von  $K_M$  darstellt:  $K_M$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit der Hälfte des Maximums entspricht und dieser Wert dient als Maß für die Affinität eines Substrats zu einem Enzym.

$V_{\max}$  und  $K_M$  sind enzyspezifische Kennzahlen, die von großem Interesse für den Biotechnologen sind. Sie sind für eine Vielzahl von Enzymen in Datenbanken eingepflegt, sodass diese Werte leicht zugänglich, einsehbar und vergleichbar sind.

## 1.5.2 Enzyminhibition

Enzyminhibitoren sind Stoffe, die eine enzymatische Reaktion störend eingreifen und die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen oder sogar ganz zum Stillstand bringen. Viele wichtige Arzneistoffe sind Inhibitoren, die gewisse zelluläre Prozesse verlangsamen oder zum Stillstand bringen.

Folgende Arten der Enzyminhibition unterscheidet man:

- Reversible Hemmung
  - Kompetitive
  - Unkompetitive
  - Gemischte (nicht-kompetitive)
- Irreversible Hemmung

### 1.5.2.1 Kompetitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms. Diese Inhibitoren ähneln den Substraten oft chemisch. In der Michaelis-Menten-Gleichung äußert sich das durch eine Multiplikation von  $K_M$  mit einem Faktor  $\alpha > 1$  und setzt daher scheinbar die Affinität des Enzyms für sein Substrat herab. Dies ergibt somit einen höheren Wert für die neue „scheinbare“  $K_M$ . Typisch für die kompetitive Hemmung ist daher die höhere benötigte Substratkonzentration [S] bei der

$V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$  erreicht wird, während  $V_{max}$  unbeeinflusst bleibt.

#### 1.5.2.2 Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung, bindet der Inhibitor an eine allosterische Stelle des ES-Komplexes, bildet dadurch einen ESI-Komplex, der die Umsetzung zum Produkt stört. Rechnerisch äußert sich das durch die Multiplikation von einem Faktor  $\alpha'$  mit [S] im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung. Bei hohen [S], wird  $V_0$  in der Beziehung  $V_0 = V_{max}/\alpha'$  herabgesetzt. Die scheinbare  $K_M$  wird erniedrigt, da nun eine kleinere [S] notwendig ist, um  $V_{max}$  zu erreichen.

#### 1.5.2.3 Gemischte Hemmung

Gemischte Inhibitoren binden ebenfalls an einer allosterischen Stelle, jedoch sowohl am freien Enzym und am ES-Komplex. Die Michaelis-Menten-Gleichung wird sowohl mit  $\alpha$  (mal  $K_M$ ) und mit  $\alpha'$  (mal [S]) angepasst. Im Spezialfall der nicht-kompetitiven Hemmung gilt  $\alpha = \alpha'$ .

#### 1.5.2.4 Substratüberschusshemmung

Ein Spezialfall einer reversiblen Hemmung ist die Substratüberschusshemmung, bei der es bei hohen [S] zur Bindung von zwei Molekülen Substrat an das Enzym zu einem ESS-Komplex kommt.  $V_0$  folgt einer Optimumkurve, die ein lokales Maximum erreicht bevor  $V_0$  mit steigender [S] wieder abnimmt.

#### 1.5.2.5 Irreversible Hemmung

Die irreversible Hemmung deaktiviert ein Enzym permanent durch die Bildung einer zumeist kovalenten Bindung. Die irreversible Hemmung stellt ein nützliches Werkzeug für die Aufklärung von enzymatischen Reaktionsmechanismen dar. So lassen sich z.B. wichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum identifizieren, ohne deren Wirkung die Reaktion verlangsamt oder gänzlich deaktiviert wird.

Einen Sonderfall der irreversiblen Hemmung durch sogenannte „Selbstmordinhibitoren“ oder „Suizidsubstraten“ sind in der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung bedeutsam. Sie werden vom Enzym als Substrat akzeptiert bilden jedoch im Laufe der katalysierten Reaktion eine feste, irreversible Bindung, die das Enzym inaktiviert.

## 1.6 Chromatographie

Die Chromatographie ist ein mächtiges analytisches und präparatives Werkzeug, dass täglich in vielen distinktiv ausgeprägten Formen in Laboratorien rund um die Welt eingesetzt wird, um Analyten zu identifizieren und voneinander zu trennen. Diesem Verfahren liegt das Prinzip zugrunde, dass sich einzelne Stoffe in einem Gemisch, durch unterschiedlich starke Wechselwirkung zwischen einer

mobilen und einer stationären Phase auftrennen lassen. Der Analyt bewegt sich in der mobilen Phase entlang einer stationären und tritt mit dieser, je nach seiner chemisch-physikalischen Beschaffenheit, unterschiedlich stark in Wechselwirkung mit dieser, wodurch er verzögert wird. Durch diese unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit unterschiedlicher Substanzen, erfolgt eine zeitliche Auftrennung. Chromatographische Methoden lassen sich aufgrund gewisser Kriterien, wie z.B. die Beschaffenheit der stationären bzw. mobilen Phase oder dem Prinzip der Trennung, einteilen.

### 1.6.1 Einteilung chromatographischer Methoden

Man kann die unterschiedlichen chromatographischen Methoden anhand gewisser Charakteristika einteilen. (Camman, 2001, 6-3)

- Form der stationären Phase
  - Planar: Papier-, Dünnschichtchromatographie (DC)
  - Packung oder Beschichtung in einer Säule: Säulenchromatographie
- Aggregatzustand der stationären Phase
  - Fest: (eher) Adsorptionschromatographie
  - Flüssig: Verteilungschromatographie
- Aggregatzustand der mobilen Phase
  - Flüssig: Flüssigchromatographie (LC, HPLC, IC)
  - Gas: Gaschromatographie (GC)
  - Überkritisches Fluid: Überkritische Fluid Chromatographie (SFC)
- Art der Wechselwirkung zwischen Analyten und stationärer Phase
  - Adsorption
  - Verteilung
  - Ionisch: Ionen-, Ionenaustauschchromatographie (IC, IEC)
  - Siebwirkung: Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)
  - Spezifisch: Affinitätschromatographie (Reinigung von Enzymen, Nukleinsäuren, Antikörpern, ...)
  - Enantiomere: chirale Chromatographie

Dies sind keineswegs alle Eigenschaften der verschiedenen chromatographischen Methoden, und weitere Einteilungen sind möglich, wie z.B. chemische Beschaffenheit der stationären Phase (Normal- und Umkehrphase). Des Weiteren kommen die Trennwirkungen durch Adsorption und durch Verteilung in den jeweiligen Methoden nicht isoliert vor, sondern tragen in unterschiedlichen Anteilen immer zum Trennmechanismus bei.

### 1.6.2 FPLC

Die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), ist eine chromatographische Methode, die in der Proteinpräparation und der Proteanalytik breite Anwendung findet. Eine spezielle Methode der FPLC ist die sogenannte IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), die gerne bei der Reinigung

von Proteinen verwendet wird. Mit Affinität ist in diesem Zusammenhang die spezifische Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase zu verstehen. Bei der Expression eines rekombinanten Proteins kann dieses mit einem Marker, oder „Tag“ versehen werden. Dieses sogenannte Fusionsprotein kann aufgrund der spezifischen Wechselwirkung dieses Tags mit der stationären Phase der Säule gut von anderen Fremdproteinen ohne diese Markierung abgetrennt werden. Ein Beispiel dafür wäre ein His-tag, eine mehrfache (oft sechsfache) Wiederholung der Aminosäure Histidin am Sequenzanfang oder -ende des gesuchten Proteins. In der stationären Phase einer Metall-Chelat-Affinitätssäule, befinden sich Metallionen, wie z.B.  $Ni^{2+}$  die über Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert vorliegen. Dieser NTA- $Ni^{2+}$ -Komplex ist über einen Spacer an der stationären Phase gebunden und kann mit den Stickstoffatomen der Imidazolringe des Histidin-Tags eine feste, jedoch reversible Chelat-Bindung eingehen. Nachdem man die Säule von Fremdprotein gewaschen hat, kann man das gebundene Zielprotein mit einem Puffer der Imidazol als konkurrierenden Liganden enthält eluieren und isolieren. Eine Änderung des pH-Werts des Puffers kann auch zur Elution eingesetzt werden (Crowe et al., 1994).

## 2 Zielsetzung

Der Hauptteil der gestellten Aufgabe ist die Charakterisierung des Enzyms Chalkonsynthase (CHS), sodass die Reaktionsparameter, wie pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentration für den optimalen Umsatz der Substrate eingestellt werden können. Es wurden zwei Reaktionen untersucht und gegenübergestellt. Die „klassische“ CHS katalysierte Reaktion von *p*-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA zu Naringeninchalkon mit anschließender Zyklisierung zum Naringenin, und einer Reaktion die fast ausschließlich im Apfel stattfindet, die Reaktion von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA und Malonyl-CoA zu Phloretin.

Zu diesem Zweck soll ein Prozess entwickelt werden, um schnell und einfach große Mengen eines sehr aktiven CHS Isozyms zu produzieren. Daher soll zunächst die Expression des Enzyms optimiert werden, um eine hohe Ausbeute an aktivem Enzym sicherzustellen, insbesondere durch die Verhinderung der Bildung von Inclusion Bodies. In weiterer Folge soll das Prozedere des Aufschlusses, der Isolierung und Reinigung so eingestellt werden, dass möglichst viel des exprimierten Enzyms gewinnbar sind, die Verluste minimieren werden und lange Lagerstabilität gewährleistet ist.

Die gleichen Ziele sollen auch bei der Expression und Reinigung der Chalkonisomerase (CHI) aus *Petunia hybrida* verfolgt werden. Die CHI soll bei den enzymatischen Messungen zugesetzt werden, um das entstehende Naringeninchalkon schnell und zuverlässig in Naringenin umzusetzen, um zum einen eine eindeutige Detektion des Reaktionsprodukts und zum anderen eine mögliche Produktinhibierung zu vermeiden. Durch die geringe Stabilität des Naringeninchalkons sind die potenziellen Einflüsse dieser beiden Faktoren nur sehr schwer einzuschätzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Einblicke gewonnen werden, wieso der Apfel die einzige Pflanze ist, die nennenswerte Mengen Phloretin herstellt und damit eine Sonderstellung in der Flora einnimmt. Dafür soll mit einer CHS gearbeitet werden dessen codierende cDNA aus dem Kulturapfel *Malus x domestica* gewonnen wurde, um zu sehen, ob sich das einzigartige Flavonoidprofil des Apfels auf eine Eigenschaft ihrer Chalkonsynthase(n) zurückführen lässt.

Ermittelte kinetische Daten wie  $K_M$ ,  $V_{max}$  und aus ihnen abgeleitete Größen sollen bestimmt werden, um diese beiden Reaktionen zu beschreiben.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Liste der Gerätschaften

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	GLA 30	Gössner GmbH
Eismaschine	AF80	Scotsman
Elektrophorese	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories
FPLC	ÄKTApurifier	GE Healthcare
Gasabflammer	Fireboy	Technomara AG
Gel Scanner	Amersham Typhoon	GE Healthcare
GE-Netzteil	EPS 600	Pharmacia Biotech
Geschirrspüler	Mielabor G7783	Miele
Heizblock	Accublock™	Labnet Int.
HPLC	UltiMate 3000	ThermoFischer Scientific
Kolbenhubpipetten	Reference (1000, 100, 10, 2,5 µl)	Eppendorf
pH-Elektrode	SenTix 61	WTW
pH-Meter	Microprocessor pH/ION Meter pMX 3000	WTW
Querstromlamina	C 630 H	Ceag Schirp Reinraumtechnik
Schüttler (Expression)	Certomat BS-1	B. Braun Biotech
Schüttler (Gel)	KS 125 basic	IKA Labortechnik
Tiefkühler -20°C	-	Whirlpool
Tiefkühler -80°C	Dairei Ult TF	VWR Catalyst
Trockenschrank	Modell 600	Memmert
UV/Vis Spektrometer	DU 800	Beckman Coulter
	SPECTROstar nano	BMG Labtech
Vortex	VV3	VWR

Waage	R 200 D	Sartorius
	PJ 3600	Mettler
Wasserbad	MP-RA/KÜ	Julabo
Zentrifuge	Avanti J-26 XP Centrifuge	Beckman Coulter
	Biofuge 13	Heraeus Sepatech
	Biofuge 22R	Heraeus Sepatech
	1-14	Lindner Labortechnik

Tabella 3-1 Liste der verwendeten Laborgerätschaften

### 3.1.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikaliename	Hersteller	Qualität
Acetonitril	Merck	p.a.
Acrylamid Lösung (37,5:1)	Roth	30% in H <sub>2</sub> O
Ameisensäure	Merck	p.a.
Ammoniumpersulfat	Merck	p.a.
Ampicillin	Sigma- Aldrich	-
Coomasie Brilliantblau R 250	Merck	-
Dithiothreitol	Sigma- Aldrich	>98%
DNase 1u/μl	Promega	-
Dodecylsulfat-Na	Sigma- Aldrich	~95%
EDTA	Sigma- Aldrich	p.a.
Essigsäure	Merck	p.a.
Glycerol	Sigma- Aldrich	86%
Glycin	Sigma- Aldrich	99%
H <sub>2</sub> O dest.	-	-
Hefeextrakt	Merck	-
Imidazol	Acros Organics	99%
Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside	Acros Organics	99%
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	p.a.
Laufmarker	?	?
Lysozym	-	-
Magnesiumsulfat	Merck	p.a.

Malonyl-CoA Li-Salz	Sigma-Aldrich	>90%
Methanol	Merck	p.a.
MgCl <sub>2</sub>	Merck	p.a.
Molekularmassenstandard #P7719	New England BioLabs	-
NaCl	Merck	p.a.
Naringenin	TransMIT	>98%
<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	TransMIT	>90%
Phloretin	Sigma-Aldrich	>99%
Salzsäure 37%	Merck	p.a.
tert. Butanol	Merck	p.a.
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich	99%
Tris/HCl	Merck	p.a.
Trypton	Roth	-

Tabelle 3-2 Liste der verwendeten Laborchemikalien



## 3.2 Rekombinante Expression von CHS und CHI

### 3.2.1 CHS in pGEX6-P1-Plasmid

#### 3.2.1.1 Herstellung des Mediums

Für die Herstellung des flüssigen Expressionsmediums wurden ca.

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

10 g Trypton

4 ml 50 % w/w Glycerol Lsg. und

1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> Lsg.

in 1000 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt, in zwei 500 ml Pyrex Schraubverschlussflaschen überführt und anschließend bei 120 °C und ca. 2 bar im Heißdampf autoklaviert. Danach erfolgt die Zugabe von je 0,05 g Na-Ampicillin pro Gefäß.

#### 3.2.1.2 Vorbereitung der IPTG-Lösungen

Es wurde eine 1 M Stammlösung hergestellt und bei -20 °C gelagert. Dafür wurden 2,383 g in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und auf die 10 ml Marke einer Mensur aufgefüllt. Diese Lösung wurde steril via Spritzenvorsatzfilter in 1,5 ml autoklavierte Mikroreaktionsgefäße (von hier an als Eppendorf-Gefäße bezeichnet) überführt.

#### 3.2.1.3 Anzucht der *E. coli*-Kultur

Aus einer Dauerkultur (Hergestellt aus 300 µl einer Übernachtskultur und 300 µl sterilem Glycerol, bei -80 °C aufbewahrt) wurden nach dem Auftauen 100 µl dieser in 5 ml Expressionsmedium in sterilen Epprouvetten überführt und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 160 - 180 rpm über Nacht (ca. 16 h) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden je 400 µl der Übernachtskultur in je 100 ml Medium die je in vier sterile 500 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt wurden inokuliert. Die Kolben wurden mit steriler Alufolie abgedeckt und im Schüttelinkubator bei denselben Parametern für ca. 4 h inkubiert. Die optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm (OD<sub>600</sub>), die über die Extinktion der Hauptkultur in einer 1 cm langen Küvette in einem Photospektrometer ermittelt wurde, lag bei der Induktion im Bereich zwischen OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8.

#### 3.2.1.4 Induktion

Den vier Kulturen CHS-1 bis CHS-4 wurden unterschiedliche Mengen 1 M IPTG-Lösung zur Induktion zugeführt. In der Tabelle 3-3 sind die daraus resultierenden IPTG-Konzentrationen am Beispiel der MLS-2 Expression dargestellt. Die Konzentration des Induktors wurde bei den verschiedenen

Expressionen variiert, um den Einfluss auf das Verhältnis von unlöslicher zu löslicher CHS zu untersuchen.

Kultur	conc. IPTG [mM]	Volumen der 1 M IPTG Stock-Lsg. [ $\mu$ l]
CHS-1	1	100
CHS-2	0,5	50
CHS-3	0,25	25
CHS-4	0,1	10

*Tabelle 3-3 Induktion der MLS-2*

Daraufhin wurde für 3h in einem auf 28 °C temperierten Schüttelinkubator exprimiert. Nach der Expression wurde die OD<sub>600</sub> in einer 1:10 Verdünnung der Kultur gemessen.

Kultur	OD <sub>600</sub> 1:10 verd.
CHS-1	0,1596
CHS-2	0,1460
CHS-3	0,1518
CHS-4	0,1644

*Tabelle 3-4 OD<sub>600</sub> post-Expression der Kulturen bei 1:10 Verdünnung*

Es wurde berechnet welches Volumen der jeweiligen Suspensionskulturen in Eppendorf-Gefäße pipettiert werden muss, damit die Zellmenge „OD<sub>6</sub>“ (für die SDS-PAGE) entspricht (z.B. werden für eine OD<sub>600</sub> 1:10 verd. von 0,1596 genau 3,76 ml Suspensionskultur pelletiert ( $6/(0,1596 \times 10)$ ). Das Pelletieren geschah in mehreren Schritten, da das errechnete Volumen, jenes des Gefäßes von 1,5 ml überstieg. Nach jedem Schritt wurde die Suspension bei 10.000×g, 5 Minuten lang zentrifugiert und das überstehende Medium entfernt. Die Zellpellets wurden auf Eis gelegt. Der Rest der Kulturen wurde in je 50 ml konische Zentrifugationsgefäße des Typs Falcon (von hier an als Falcons bezeichnet) in mehreren Schritten überführt, bei 5445×g je 10 Minuten lang zentrifugiert und das überstehende Medium gesammelt, autoklaviert und verworfen. Alle Zellkultur enthaltende Gefäße wurden bei -80 °C eingefroren.

## 3.2.2 CHS in pTrcHis2-TOPO-Plasmid

### 3.2.2.1 Herstellung des Mediums

Als Medium diente das gleiche Medium wie bereits in 3.1.1.1 beschrieben.

### 3.2.2.2 Anzucht der *E. coli*-Kultur

Die Übernachtskultur wurde auf dieselbe Art und Weise angesetzt wie unter der Expression aus pGEX angeführt, jedoch wurde in drei 2l-Erlenmeyerkolben zu je ca. 750 ml Medium gearbeitet und mit 6 ml Übernachtskultur inokuliert. Die Expression wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1 geführt.

### 3.2.2.3 Induktion

Bevor die Induktion durchgeführt wurde, wurde eine Wartepause von ca. 30 Minuten eingelegt, um der Expressionskultur Zeit zu geben sich von 37 °C auf 28 °C abzukühlen. Dann wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugeführt, um die Proteinexpression zu induzieren und für drei Stunden bei 28 °C exprimiert.

Aufgrund des großen Volumens der Ansätze wurden die Expressionen auf mehrere Etappen in 200 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 5000×g für 10 Minuten pelletiert. Das Medium wurde nach jeder Zentrifugation in einen Glaskolben dekantiert und für die Autoklavierung gesammelt. Das Zellpellet wurde in ein Falcon überführt und die Reste mit ein wenig Medium resuspendiert und mit dem Pellet im Falcon vereinigt. Die Falcons wurden nochmals bei 5445×g für 10 Minuten zentrifugiert und das überstehende Medium entfernt. Das Zellpellet wurde im Falcon bei -80 °C aufbewahrt.

## 3.2.3 CHI in pTrcHis2-TOPO-Plasmid

Die CHI aus *Petunia Hybrida* (Laborkollektion Nr. CG\_221) wurde mittels des pTrcHis2 TOPO Vektors in der Expression MLS-19 exprimiert. Medium, Expressionsführung, Induktion, Abtrennung der Biomasse, Aufschluss und Reinigung wurden exakt wie bei der CHS in pTrc durchgeführt.

## 3.3 Isolation und Reinigung der Enzyme

Da die exprimierten Enzyme entweder in der Zellmembran oder im Cytosol des Mikroorganismus vorliegen, können diese nur durch Zerstörung der Zellen in Lösung gebracht werden. Dies passiert durch den Zellaufschluss bzw. der Lyse der Zelle.

### 3.3.1 Zelllyse mittels Lysozyms

Das bei -80 °C gelagerte Zellpellet wurde in etwa mit demselben Volumen Lysepuffer (30 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8, steril filtriert zur Aufbewahrung) versetzt und zuerst mit einem Spatel aufgelockert

und dann abwechselnd am Vortex und mit einer 5 ml Kolbenhubpipette resuspendiert. Nach der Homogenisierung erfolgte die Zugabe von Lysozym, sodass sich eine Konzentration von 1 g/l einstellte und die Suspension wurde wiederum mittels Pipette homogenisiert.

Nach 45 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte eine Zugabe von  $MgCl_2$  und DNase Stammlösung, sodass sich eine Endkonzentration von je 10 mM bzw. 0,02 g/l einstellte und das Falcon wurde für weitere 20 min. auf Eis gestellt.

Anschließend wurde das Lysat mittels Zentrifugation bei  $5445\times g$  von den unlöslichen Bestandteilen getrennt.

### 3.3.2 Zellyse durch Ultraschall

Um die Ausbeute an Enzym zu verbessern, wurde die festen Überreste der Lysozym-Lyse einer weiteren Lyse durch eine Ultraschallsonde unterworfen. Dabei wurde der feste Rückstand, Zellfragmente und unlysierte Zellen auf die oben beschriebene Weise resuspendiert und auf Eis gestellt. Aufgrund der Wärmeentwicklung durch die Ultraschallsonde blieben während des Aufschließens die Falcons im Eis, die Ultraschallsonde wurde nur gepulst statt im Dauerbetrieb eingesetzt, und der gesamte Aufschluss wurde in drei 40-Sekunden-Etappen durchgeführt.

### 3.3.3 SDS-Page

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden jeweils das abzentrifugierte Pellet der Lyse sowohl als auch das überstehende Lysat separat aufgetrennt, um zwischen löslichen und unlöslichen Proteinen unterscheiden zu können.

Dazu mussten zuerst die Gele gegossen werden. Dafür wurde genug Trenn- und Sammelgel für vier Gele angefertigt. Die benötigten Mengen wurden mit Hilfe eines online Tools<sup>1</sup> bestimmt und sind in Tabelle 3-5 angegeben. Das Trenngel wurde in die dafür aufgebaute Gelkammer pipettiert, mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Grenze zum Sammelgel zu haben und Sauerstoffeintrag zu vermeiden und der Abschluss der Polymerisation abgewartet. Nach dem Ausgießen der Überschichtung und Aufsaugen der Alkoholreste mit Filterpapier wurde die Lösung für das Sammelgel durch die Zugabe von APS und TEMED fertiggestellt und auf das feste Trenngel pipettiert und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Die Gele wurden in die Elektrodenvorrichtung eingespannt (bei einem Gel wurde statt dem zweiten Gel eine Dummyplatte verwendet), in die Gelbox gestellt und der Zwischenraum zwischen den Gelen mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgefüllt.

---

<sup>1</sup> <http://changbioscience.com/calculator/sdspc.htm>

	Sammelgel 5%ig [ml]	Trenngel 10%ig [ml]
30%ige Acrylamid-Lsg.	2,04	6,666
1 M Trispuffer (pH 6,8)	1,5	-
1,5 M Trispuffer (pH 8,8)	-	5
10%ige SDS-Lsg.	0,12	0,2
H <sub>2</sub> O dest.	8,16	7,933
10%ige Ammoniumpersulfat-Lsg.	0,12	0,2
TEMED	0,012	0,008
Gesamtvolumen	12	20

*Tabelle 3-5 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele*

Je 50 µl der Überstände der Zelllyse wurden 1:10 mit Lysispuffer verdünnt und die spektrale Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette ermittelt (Lysispuffer als Blank). Mit dem erhaltenen Wert kann man grob berechnen wie viel dieser Lösung für die SDS-PAGE eingesetzt werden muss. Dabei nimmt man an, dass eine Absorptionseinheit (AU) in etwa einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml entspricht. Pro Geltasche sollen in etwa 100 - 150 µg Protein aufgetragen werden, um gut auswertbare Banden zu erhalten, das Gel jedoch nicht zu überladen.

Danach wurde das ermittelte, einzusetzende Volumen des Lyseüberstands mit 10 µl, sowie der unlösliche, abzentrifugierte Rückstand mit je 50 µl reduzierendem Puffer vermischt bzw. resuspendiert und bei 95 °C fünf Minuten lang am Heizblock erhitzt.

Von den Lyse-Überständen wurde jeweils das ganze Volumen, von den unlöslichen Rückständen (im reduzierenden Puffer jedoch aufgelöst) jeweils 2 µl nebeneinander in die Geltaschen pipettiert. In eine Geltasche am Rand wurde 5 µl Proteinmarker pipettiert, der eine Zuordnung der Banden mit einer Molekularmasse erlaubte. Die Box wurde außerhalb der Elektrodenvorrichtung mit dem Rest des Laufpuffers befüllt, um entstehende Wärme schneller abführen zu können, der Deckel aufgesetzt und die Elektrophoresebox mit 200 V, 15 mA pro Gel, und 10 W mit einem Netzteil versorgt. Nach Eintreten der Lauffront in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 40-45 mA erhöht, um die Auftrennung zu beschleunigen.

Hat der Frontmarker (Bromphenolblau im reduzierenden Puffer) die Unterseite des Gels erreicht, wurden die Auftrennung beendet, die Gele ihren Kammern entnommen und mit einer Coomassie-Blau-Lösung angefärbt, um die Banden sichtbar zu machen. Anschließend wurden sie in einem flachen Gefäß mit Entfärbelösung 1 (40 % MeOH, 7 % HOAc in H<sub>2</sub>O dest.) überschichtet und in einem Rüttler entfärbt. Die Lösung wurde mehrere Male gewechselt und zur Wiederverwendung über Aktivkohle

filtriert. Schlussendlich wurden die Gele mit Entfärbelösung 2 (5 % MeOH, 7 % HOAc in H<sub>2</sub>O dest.) überschichtet und für mehrere Stunden bis Tage unter sanftem Rütteln entfärbt).

Die Gele wurden zwecks Aufbewahrung in Plastikfolie eingeschweißt, mit dem Amersham Typhoon eingescannt und für die spätere Auswertung abgespeichert.

### 3.3.4 Reinigung mittels FPLC

#### 3.3.4.1 Herstellung der Elutionspuffer

Für die Isolierung des Zielproteins an der FPLC werden zwei Puffer benötigt, die einfach in der Reihenfolge ihrer Anwendung Puffer A und B genannt wurden. In Puffer A wird die Probe verdünnt und auf die Säule aufgetragen und diese dann damit gewaschen und mit Puffer B wird die Probe eluiert und in Fraktionen gesammelt.

- Puffer A: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0
- Puffer B: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0

Die Pufferbestandteile wurden in ein Becherglas eingewogen, in Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH-Lösung eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in eine Mensur überführt und Wasser bis zum Endvolumen hinzugefügt und die Puffer filtriert.

Dabei wurde eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe eingesetzt und ein 0,2 µm-Membranfilter auf einer Glasfritte sitzend, um die Puffer von Schwebstoffen und Keimen zu befreien. Da keine Ansprüche auf Sterilität bestehen, wurde das Filtrat in Schraubflaschen dekantiert.

#### 3.3.4.2 Äquilibrieren der Trennsäule

Vor der Aufbringung der Probe auf die Histrap FF Säule (5 ml Säulenvolumen (CV)) wurde diese mit den Puffern in der Reihenfolge A – B – A äquilibriert. Die Puffer wurden nacheinander durch die Säule gepumpt, bis die Chromatogramme keine Änderung mehr zeigten.

#### 3.3.4.3 Reinigung

Das Lysat, wurde mit Puffer A ein wenig verdünnt, um es leichter in den Superloop (=50 ml Probenschlaufe; Glashohlzylinder, der an beiden Enden verschlossen werden kann) zu füllen. Das Falcon in dem das Lysat aufbewahrt wurde, wurde mit Puffer A gespült und mit dem Lysat im auf einer Seite verschlossenen Superloop vereinigt. Ein Teflonstempel wurde in den Superloop eingesetzt gegen das Lysat gepresst um Luftbläschen aus der Leitung, über die die Probe auf die Trennsäule gepumpt wird, auszutreiben. Das zweite Hälfte des Loops, jenseits des Stempels wurde mit Puffer A aufgefüllt und mit dem Schraubdeckel verschlossen. Der Superloop wurde an die FPLC angeschlossen und die Probe mit 5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Es wurde nach der Aufbringung der Probe so lange mit Puffer A gewaschen, bis die Absorption des Durchlaufs bei 280 nm konstant war. Die Elution durch Imidazol verlief über eine Gradientenelution. Der Anteil von Puffer B wurde auf 5 % gehoben und auf diesem Plateau für 5 CV gehalten. Danach wurde der Anteil von Puffer B linear über ein Volumen von

7 CV auf 100 % erhöht. Auf dem Plateau von 100 % B wurde für drei Minuten gehalten, um die Säule von allen Proteinresten sauber zu waschen.

#### 3.3.4.4 Aufkonzentrieren / Umpuffern

Die gereinigte CHS muss für die Lagerung und ihrem späteren Einsatz in katalytischen Reaktionen aufkonzentriert und umgepuffert werden, damit sie lagerstabil wird. Dazu wurde die CHS Lösung mit  $KP_i$ -Puffer auf pH 7,0 eingestellt und 10 mM DTT hinzugefügt, um die Oxidation von Cysteinseitenketten und die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Dann wurde die CHS in den vereinigten Fraktionen der FPLC mittels zentrifugaler Ultrafiltration mit 5000×g umgepuffert. Für diese Aufgabe wurde ein Vivaspin Zentrifugalkonzentrator eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein modifiziertes Zentrifugationsgefäß (Typ Falcon 50 ml), das durch einen Membranfilter in ein oberes und unteres, abnehmbares, Kompartiment getrennt wird. Die Enzymlösung wird dabei in das obere Kompartiment pipettiert und die Pufferbestandteile passieren während der Zentrifugation die Membran, während große Moleküle wie Enzyme im Retentat verbleiben. Dieser Schritt wurde mehrfach mit maximal 12 ml im oberen Kompartiment wiederholt, bis das Enzym im Retentat auf 0,5 – 0,1 ml eingengt wurde. Das Filtrat wurde photometrisch auf den Proteingehalt überprüft (falls eventuelle Schäden an der Membran die Proteine passieren lassen) und bei Abwesenheit verworfen. Mit ein paar ml eines frischen Puffers aus 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM DTT auf pH 8,0 wurde die hochkonzentrierte CHS abwechselnd gewaschen und erneut eingengt. Dieser Zyklus wurde 3-mal wiederholt. Zu guter Letzt wird die CHS-Lösung mit Glycerol (20 % Endgehalt) versetzt. Je nach gewonnener CHS Menge wurde eine Konzentration im Bereich von 1 – 2 mg/ml eingestellt. Die CHS ist nun für langzeitige Tieftemperaturlagerung aufbereitet und wird in low-bind Eppendorfergefäße in kleinen Aliquoten aufgeteilt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.4 Enzymassays - Charakterisierung der CHS

Zur Orientierung unter welchen Bedingungen die ersten Enzymassays angesetzt werden, wurde eine Publikation (Yahyaa et al., 2017) zu Rate gezogen. Durch die durchgeführten Vorversuche wurden die Parameter noch abgeändert und feiner eingestellt. Konstant blieb jedoch immer ein 0,1 M  $KP_i$ -Puffersystem bei pH 7, ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l, eine Zugabe von 2  $\mu$ g CHI, eine Inkubation bei 30 °C für 30' und ein Reaktionsstopp mit 20  $\mu$ l einer 50% (v/v) Lösung von AcOH in Acetonitril.

Die CHS wurde in Konzentrationen von 0,2 – 0,6  $\mu$ g pro 100  $\mu$ l Assay eingesetzt und es wurden die enzymkinetischen Parameter für *p*-Coumaroyl-CoA und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA (und jeweils Malonyl-CoA) bestimmt. Dafür musste ein weiter Konzentrationsbereich abgedeckt werden, um den linearen Bereich aufzuspüren.

Für die Enzymassays wurden die CHS aus der Expression MLS-18 (Laborkollektion Nr. CG\_14) und die CHI aus der Expression MLS-19 (Laborkollektion Nr. CG\_221) herangezogen.

Die CHS wurde in ein 1,5 ml Eppendorfergefäß pipettiert, in dem bereits 10  $\mu$ l 1 M  $KP_i$ -Puffer vorgelegt und mit dem errechneten (je nach eingesetzter Substratkonzentration des Assays unterschiedlichen)

H<sub>2</sub>O dest.-Volumen verdünnt wurde. Es folgte die Zugabe des Ersts substrats und der CHI. Schlussendlich wurde das Co-Substrat (Malonyl-CoA) hinzugefügt und somit die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im 30 °C Wasserbad wurden die einzelnen Reaktionsmischungen in der Reihenfolge, in der sie gestartet wurden, gestoppt und am Vortex homogenisiert. Durch eine Kanüle wurde das Reaktionsvolumen in eine Einwegspritze gesogen. Die Kanüle wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter getauscht und der Inhalt der Spritze in ein HPLC-Vial überführt.

### 3.5 Detektion mittels HPLC und UV/Vis-Detektor

Die Quantifizierung der gebildeten Produkte der Enzymassays wurde mittels einer HPLC durchgeführt. Der Name des verwendeten Gerätemodells lautet „UltiMate 3000“ der Firma ThermoFisher Scientific. Die Gradientenelution wurde mit zwei unterschiedlichen Laufmittel durchgeführt,

- A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure
- B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure

bei 25 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,2 ml/min. Dabei ist das Mischverhältnis der Puffer in Abhängigkeit der Zeit in nachfolgender Tabelle 3-6 einzusehen.

Zeit [min]	Konzentration [%B]
-6	Equilibrierung
	20
0	Injektion
	20
9	53
14	95
18	95
	20
	End of Run

Tabelle 3-6 Gradientenprogramm der HPLC Analyse

Detektiert wurde nahe dem Absorptionsmaximum von Naringenin und Phloretin (je ca. 285 nm) bei 290 nm. Für die Umrechnung von der Peakfläche der Einheit mAU in Stoffmenge der Einheit pmol wurde mit Naringenin und Phloretin als Referenzsubstanz eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration in H<sub>2</sub>O dest. hergestellt.

### 3.6 Sequenzvergleich und Homologie Modell

Die Aminosäuresequenzen wurden mit Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt und das Homologie Modell wurde mit MODELLER v10.2 (Webb and Sali 2016) erstellt. Die graphische Darstellung wurde mit PyMOL (<https://pymol.org>) erstellt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Optimierung der Expression

#### 4.1.1 Variation der IPTG-Konzentration

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Optimierung der Ausbeute an aktivem, rekombinant exprimiertem Enzym. Dazu wurde ein begrenztes Expressionsscreening mit bereits vorhandenen CHS-Konstrukten durchgeführt, wobei im Wesentlichen die Konzentration des Induktionsmittels variiert wurde. In Tabelle 4-1 können die Expressionsparameter des hier beispielhaft durchgeführten Screenings der Induktionskonzentration (interne Versuchsbezeichnung: MLS-4; Expressionsdauer 3 h) eingesehen werden. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Expressionen wurden für vorherige Expressionen noch höhere IPTG-Konzentrationen verwendet. Das darauffolgende Screening MLS-5 hat die Induktorkonzentration weiter gesenkt, in der Hoffnung weniger Inclusion Bodies zu bilden, siehe Tabelle 4-2.

<b>MLS-4; CHS in TOP10 pGEX (GST-Tag)</b>			
Versuchsnummer	IPTG (mM)	OD <sub>600</sub> vor der Induktion	OD <sub>600</sub> post-Expression (verd. 1:10)
MLS4-CHS-1	0,1	0,6977	0,1769
MLS4-CHS-2	0,05	0,6675	0,1920
MLS4-CHS-3	0,025	0,6612	0,2052
MLS4-CHS-4	0,01	0,6672	0,2016

Tabelle 4-1 Expressionsparameter der Versuchsreihe MLS-4.

<b>MLS-5; CHS in TOP10 pGEX (GST-Tag)</b>			
Versuchsnummer	IPTG (mM)	OD <sub>600</sub> vor der Induktion	OD <sub>600</sub> post-Expression (verd. 1:10)
MLS5-CHS-1	0,01	0,6274	0,1890
MLS5-CHS-2	0,005	0,6292	0,1824
MLS5-CHS-3	0,002	0,5969	0,1711
MLS5-CHS-4	0	0,5863	0,1635

Tabelle 4-2 Expressionsparameter der Versuchsreihe MLS-5

In den folgenden Gelen (Abbildung 4-1 bis 4-3) sind die Aufschlüsse der Expressionen MLS-4 und -5 abgebildet.

Die sehr kräftigen Banden zwischen der fünften (72 kDa) und sechsten (55 kDa) Bande des Standards treten stets in den Pellets auf und sind auf unlösliche Einschlusskörper (Inclusion Bodies) des Fusionsproteins (CHS+GST: ~69 kDa) zurückzuführen. Diese Proteine sind lediglich durch Denaturierung (z.B. durch Harnstoff) löslich und könnten nur durch aufwändige und nicht garantierte Renaturierungsversuche funktionell aktives Enzym liefern. In den jeweiligen Lysaten findet sich an der

Position entweder keine oder nur eine sehr schwache Bande, was auf eine nur sehr geringe Expression von löslichem und funktionell aktivem Fusionsprotein schließen lässt.

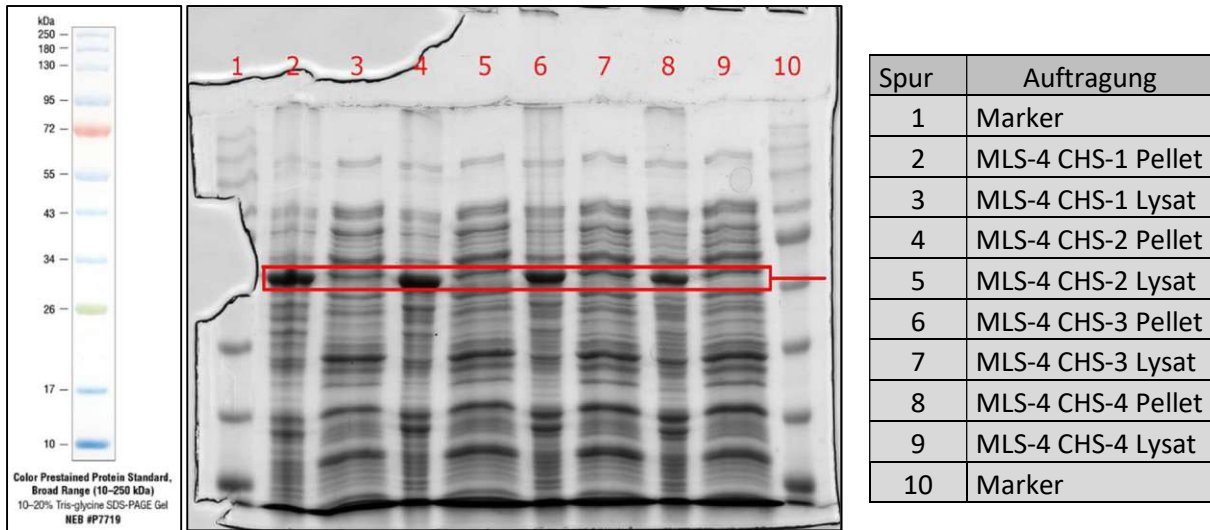


Abbildung 4-1 links: Molekularmassenstandard #P7719 (<https://international.neb.com/>); Mitte: SDS-PAGE des Aufschlusses der MLS-4; rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse der Expression MLS-4

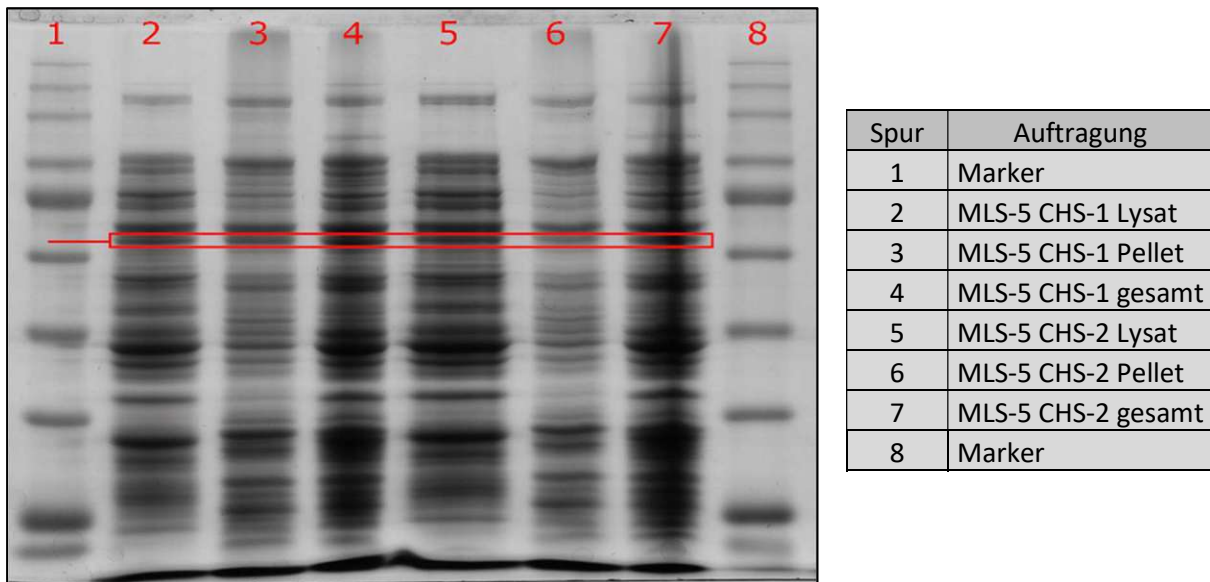
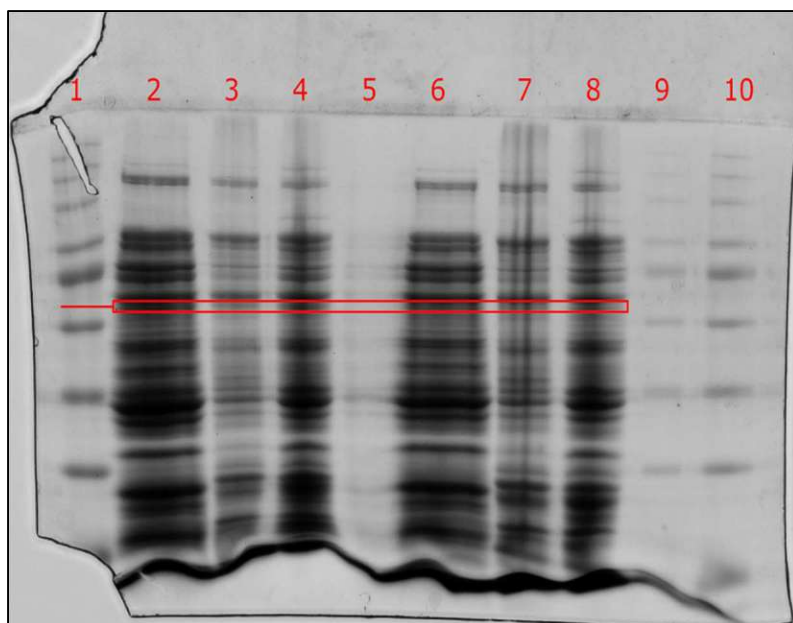


Abbildung 4-2 links: SDS-PAGE des Aufschlusses der Expression MLS-5 Gel#1, rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse CHS-1 und -2 der Expression MLS-5



Spur	Auftragung
1	Marker
2	MLS-5 CHS-3 Lysat
3	MLS-5 CHS-3 Pellet
4	MLS-5 CHS-3 gesamt
5	-
6	MLS-5 CHS-4 Lysat
7	MLS-5 CHS-4 Pellet
8	MLS-5 CHS-4 gesamt
9	Marker
10	-

Abbildung 4-3 links: SDS-PAGE des Aufschlusses der Expression MLS-5 Gel#2, rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse CHS-3 und -4 der Expression MLS-5

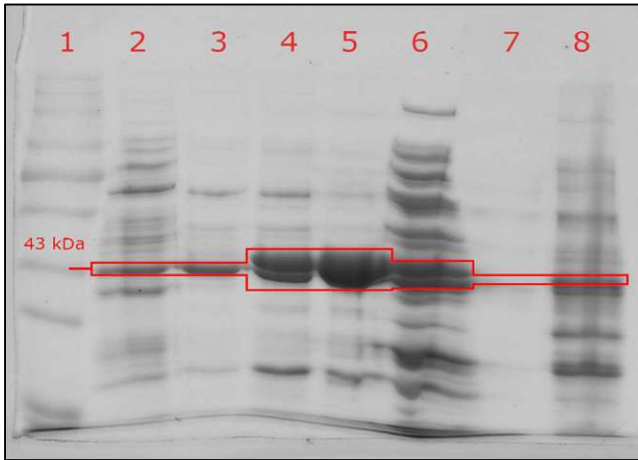
Die Expression MLS-5 wurde mit einer noch deutlicheren Reduktion der IPTG-Konzentration geführt. Vor der Induktion sind die Kulturen der MLS-5 jedoch abgekühlt worden, sodass der Beginn der Expression nicht oberhalb von 28 °C startet. Die Spuren 3 und 2 in der Abbildung 4-2 entsprechen denselben Expressionsparametern wie die Spuren 8 und 9 der MLS-4 (Abbildung 4-1), man sieht eine geringere Expressionsrate, und eine Verbesserung im Verhältnis von löslicher zu unlöslicher CHS, jedoch ist die absolute Menge an potenziell gewinnbarer CHS gering.

#### 4.1.2 Umstieg auf den pTrc-Vektor

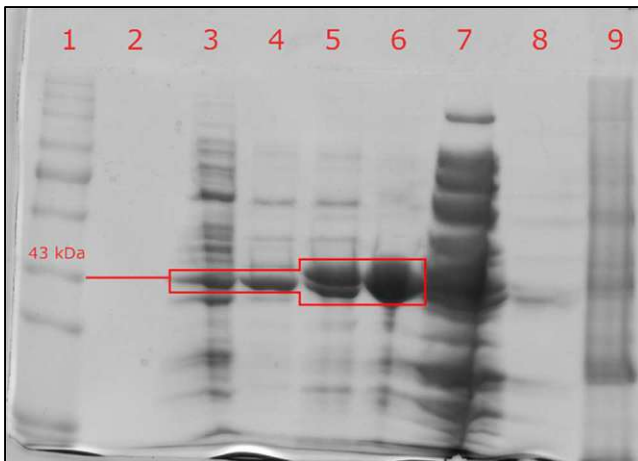
Aufgrund des nur mäßigen Erfolgs der Optimierung der Expression des GST-CHS-Fusionsproteins wurde die Entscheidung getroffen einen anderen Vektor zu testen. Der Vektor pTrcHis2-TOPO ist so konzipiert, dass das Zielprotein einen C-terminalen His-Tag aufweisen kann, der im Gegensatz zu dem recht großen GST-Tag (ca. 26 kDa) sehr klein ist (ca. 1 kDa). Im Übrigen existieren zwar dokumentierte Beispiele, dass GST die Löslichkeit des Zielproteins erhöhen kann, dies ist jedoch keineswegs immer so und muss individuell getestet werden. Außerdem besitzt der Vektor den deutlich schwächeren Trc Promotor im Gegensatz zu dem sehr starken T7 Promotor des pGEX-Vektors auf, was sich positiv auf das Verhältnis von löslich exprimiertem Protein zu Inclusion Bodies auswirken kann.

Im folgenden Gel (Abbildung 4-4) ist der Aufschluss und das mit FPLC gereinigt Enzym der Expression MLS-17 (Laborkollektion Nr. CG\_14) zu sehen. Man bemerke die unterschiedliche Molekularmasse zu den GST-Fusionsproteinen. Da der His-Tag eine Masse von ca. 1 kDa hat, findet man die CHS Banden im Bereich um 45 kDa. Methoden, die sich vor dem Umstieg auf den pTrc-Vektor bewährt haben, wie z.B. das Abkühlen der Kulturen vor der Induktion wurden beibehalten.

X2 ist die gesammelte Vorfraktion (Elutionsvolumen 5 – 25 ml, vgl. Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6). A2-4 (Elutionsvolumen 45 ml – 60 ml) sind die Sammelfraktionen aus dem linearen Gradienten, in denen das Produkt vermutet wird.



Spur	Auftragung
1	Marker
2	X2
3	A2
4	A3
5	A4
6	Lysat
7	-
8	Pellet



Spur	Auftragung
1	Marker
2	-
3	X2
4	A2
5	A3
6	A4
7	Lysat
8	-
9	Pellet

Abbildung 4-4 oben: Gel#1 der Expression MLS-17 (Ultraschallaufschluss) und Pipettierschema; unten: Gel#2 der Expression MLS-17 (Lysozymbaufschluss) und Pipettierschema

Das obere Gel 1 unterscheidet sich vom unteren Gel 2 lediglich in der Art des Aufschlusses (Ultraschall und Lysozym). An den Spuren des Lysats und des Pellets erkennt man einen hohen Grad des Aufschlusses, mit wenig Gesamtprotein im Pellet und viel CHS im Lysat, was auch auf ein deutlich verbessertes Verhältnis von löslicher CHS zu Inclusion Bodies hinweist.

Die Spur auf die X2 aufgetragen wurde enthält den Großteil des E. Coli Fremdproteins, jedoch auch einen Teil der CHS. Die A-Fraktionen enthalten sehr reine CHS mit geringen Verunreinigungen.

## 4.2 Aufschluss

Die Qualität der beiden Aufschlussverfahren schwankte leider erheblich, daher wurde ein zweigeteiltes Aufschlussverfahren entwickelt. Bei der Expression MLS-17 (siehe Gele in Abbildung 4-4), wurden ca. zwei Drittel der Biomasse mittels Ultraschalls aufschlossen (oberes Gel) und ein Drittel mit Lysozym.

Sowohl im Gel als auch in den Chromatogrammen (Abbildung 4-5 und 4-6) ist ersichtlich, dass die Proteinmengen in beiden Aufschlüssen ähnlich sind, obgleich beim Ultraschallaufschluss in etwa die doppelte Menge Biomasse eingesetzt wurde. Daher wurden beide Aufschlussmethode miteinander kombiniert, und zwar so, dass eine unbeabsichtigte Denaturierung der CHS durch Ultraschall vermieden wurde. Die Zellen wurden zuerst nach der Lysozymmethode lysiert und nach Abtrennung des Lyseüberstandes wurde der feste Zellrückstand erneut resuspendiert und der Ultraschalllyse unterworfen. Die beiden Aufschlüsse wurden getrennt gereinigt.

Dieses Verfahren wurde bei der Expression MLS-18 und MLS-19 (Expression der CHI) ebenfalls durchgeführt. Bei der MLS-19 wurden die Lysate jedoch vereinigt und gesammelt gereinigt.

### 4.3 Proteinreinigung

Bei der Entwicklung des Gradientenprogramms, also mit welcher Pufferzusammensetzung wie lange eluiert wird, hat es sich als sehr vorteilhaft herausgestellt, 5 CV mit 5 % Puffer B zu eluieren, bevor man den Anteil an Puffer B stetig hebt. Denn auch *E. coli*-Proteine, die mit keinem His-Tag versehen sind, können unspezifisch an die Säule binden, lassen sich aber auch mit einer geringen Imidazol-Konzentration im Eluent leicht von der Säule spülen, während der stärkere Komplex zwischen dem His-Tag und der stationären Phase erst bei höheren Anteilen an Puffer B gebrochen wird.

Der Durchlauf bei der Auftragung und die Elution mit 5 % B wurden gesammelt aber eine Gelelektrophorese zeigte keine oder kaum Anwesenheit von CHS. Ein breiter, jedoch isolierter Peak über drei Fraktionen im Chromatogramm wurde als CHS vermutet. Die Fraktionen wurden einzeln via SDS-PAGE analysiert, die eine hohe Konzentration an CHS und geringfügige Verunreinigung durch Fremdproteine bestätigt (Abbildung 4-4). Danach wurden die Fraktionen vereinigt.

Man sieht in der Abbildung 4-5 bei ca. 12 ml Elution den Peak der vorwiegend aus *E. coli*-Proteinen besteht und den Peak der CHS (Peakmaximum bei 59 ml), der jedoch bei ca. 50 ml eine kleine Schulter besitzt, die vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführen ist.

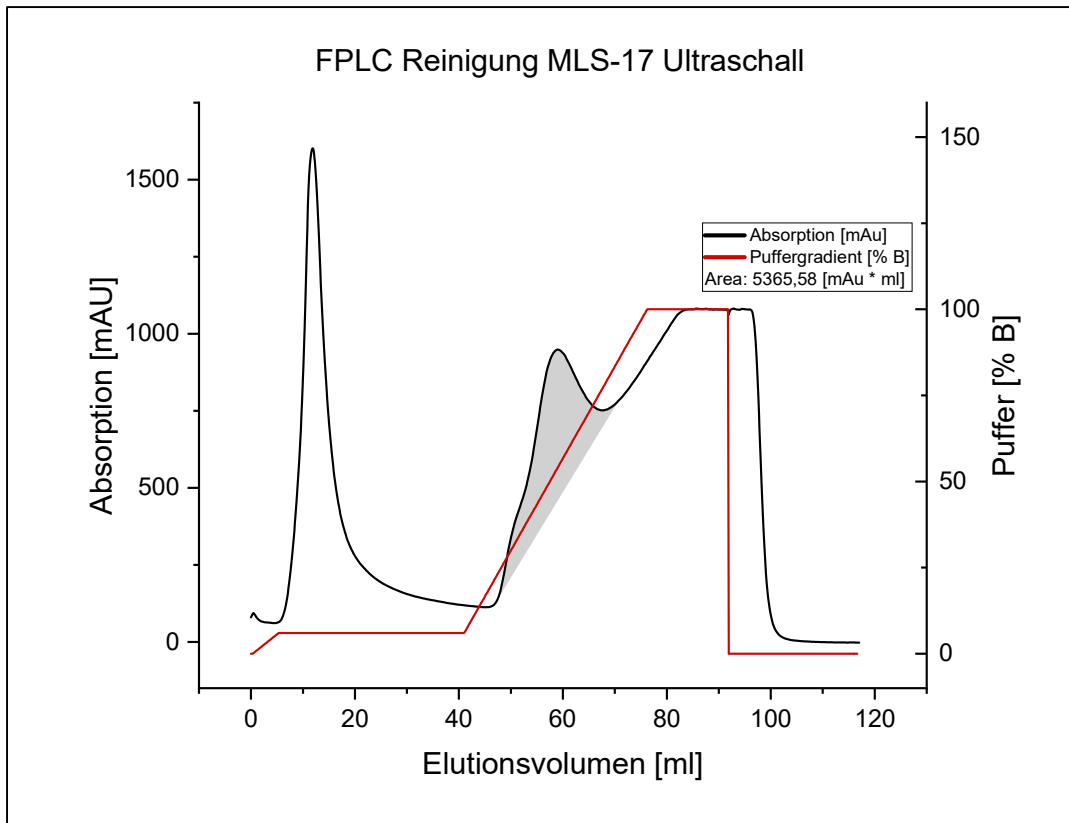


Abbildung 4-5 FPLC Chromatogramm der MLS-17 mit Ultraschallaufschluss. Nicht sauber getrennter Produktpeak.

Im Vergleich dazu kann man in Abbildung 4-6 die mit Lysozym aufgeschlossene Fraktion der MLS-17 Expression einsehen. Es soll nochmal erwähnt werden, dass bei dem Ultraschallaufschluss ca. 2/3 der Biomasse verwendet wurde, bei der Lyse mit Lysozym jedoch ca. 1/3. Trotz allem ist das Flächenintegral im Chromatogramm mit dem Lysozymbaufschluss bei 5335 mAU\*ml verglichen mit 5365 mAU\*ml bei der Ultraschalllyse ähnlich groß.

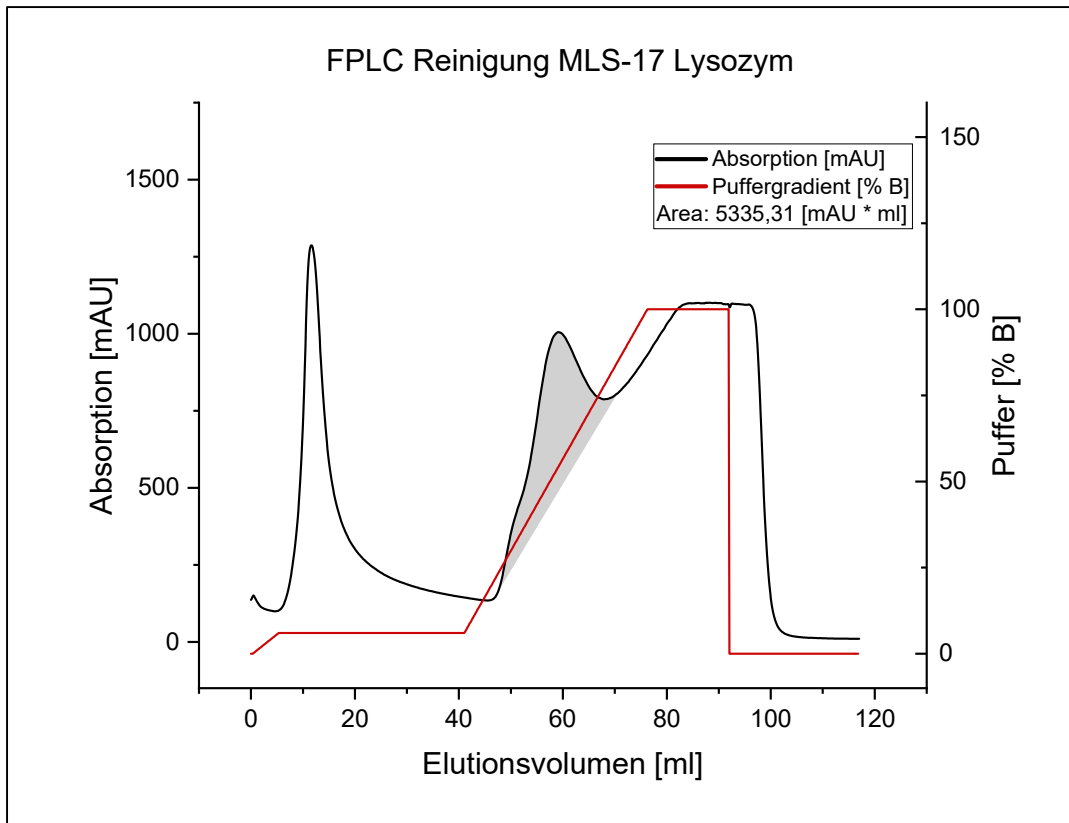


Abbildung 4-6 FPLC Chromatogramm der MLS-17 mit Lysozymbaufschluss. Nicht sauber getrennter Produktpeak.

Bei der Aufreinigung der Expression MLS-18 stellte sich das Tris-Puffersystem bei pH 8 als sehr erfolgreich heraus. Die zwei ineinander übergehenden Peaks der MLS-17 (Trennung mit  $KP_i$  bei pH 7), die dafür sorgten, dass Fremdprotein in den Sammelfractionen und CHS in der Vorfraktion zu finden ist (siehe Abbildung 4-4), konnten in der MLS-18 sauber getrennt werden. Offensichtlich ist dies auf eine veränderte Selektivität der Säulenmatrix bzw. des Imidazols bei höherem pH-Wert zurückzuführen. Aufgrund der besseren Resultate bei der Lyse mit Lysozym bei der MLS-17 Reinigung, wurde die gesamte Biomasse mit Lysozym aufgeschlossen. Die Peakflächen im Chromatogramm deuten jedoch auf einen mangelhaften Aufschluss hin.

Deshalb wurde der feste Rückstand der Lysozymlyse nochmals mit der Ultraschallsonde aufgeschlossen, und in einem zweiten Run ebenfalls gereinigt. Beachtlich ist dabei, dass bei der zweiten Lyse von bereits lysiertem Zellmaterial wesentlich mehr Protein als beim ersten Durchgang freigesetzt wurde.

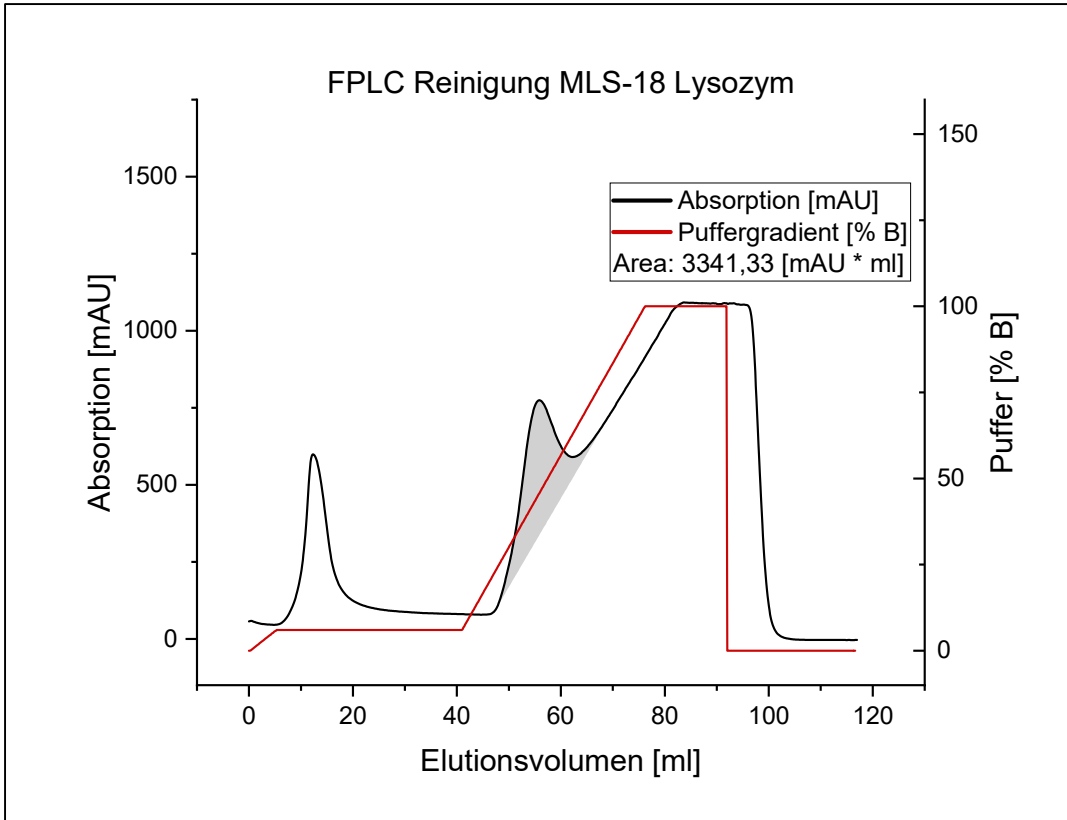


Abbildung 4-7 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-18 (erster Run: Lysozym). Schöner Produktpeak aber unvollständiger Aufschluss

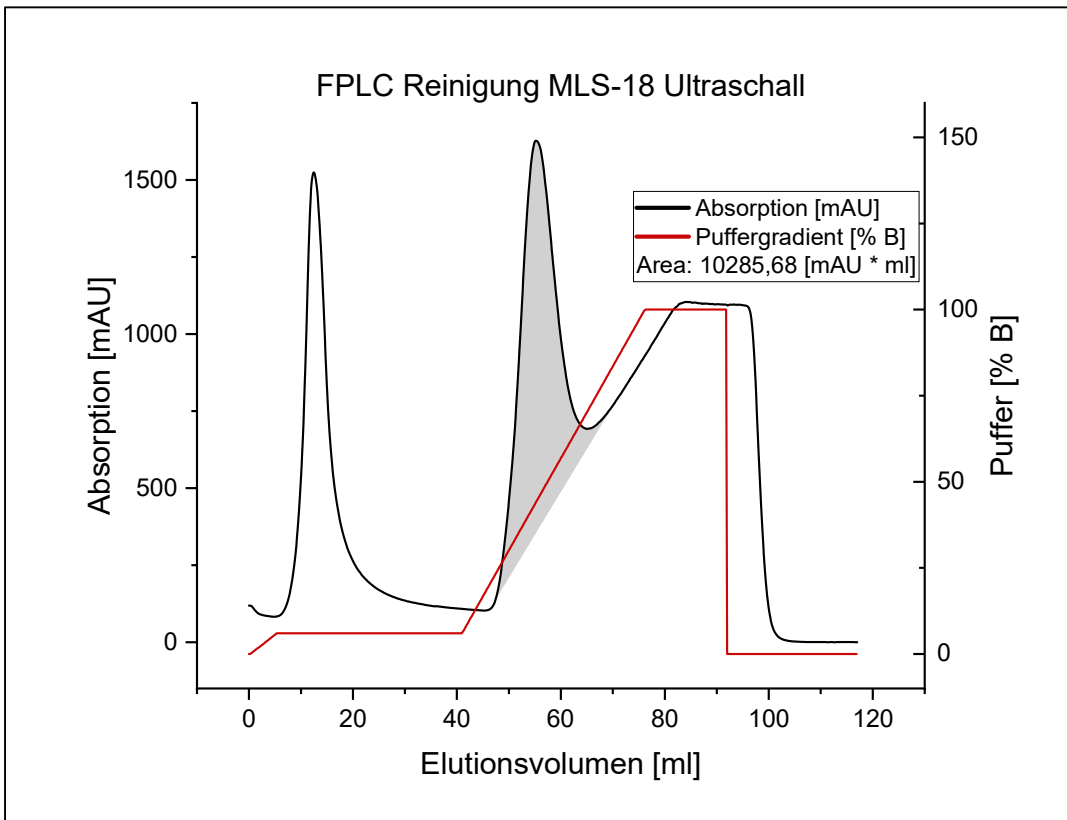


Abbildung 4-8 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-18 (zweiter Run: Ultraschall). Schöner Produktpeak und guter Aufschluss



Die Reinigung der CHI wurde wie die Reinigung der Expression MLS-18 durchgeführt, außer, dass die beiden Lysate vereinigt aufgetragen wurden.

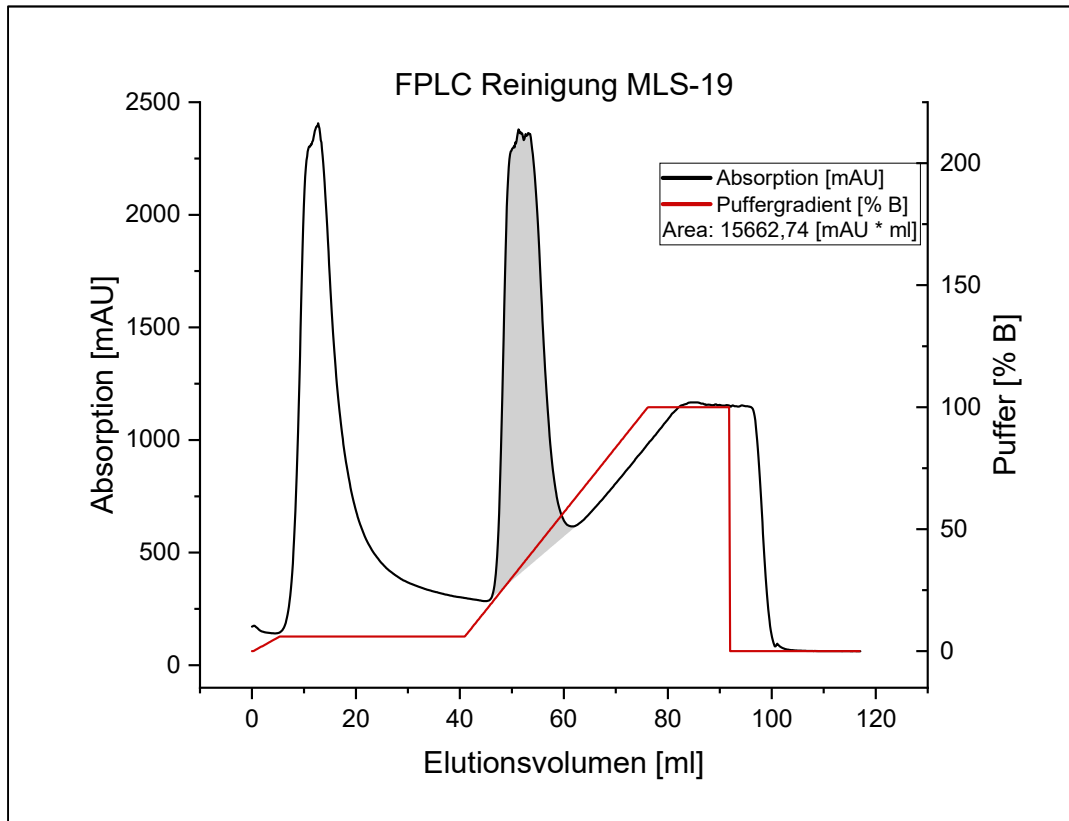


Abbildung 4-9 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-19 (CHI)

#### 4.4 Ausbeuten

Schlussendlich konnten aus den drei Expressionen MLS-17, MLS-18 und MLS-19 mit je 2,3 l Zellkulturvolumen folgende Mengen Enzym gewonnen werden:

	Gewonnenes Enzym [mg]
MLS-17 (CHS)	1,7
MLS-18 (CHS)	1,8
MLS-19 (CHI)	20,6

Tabelle 4-3 Enzymausbeuten der drei Expressionen MLS-17, -18 und -19.

## 4.5 Enzymcharakterisierung

### 4.5.1 Quantifizierung der Produkte

Für die Quantifizierung der Produkte wurden Standardreihen mit bekannter Konzentration mittels Referenzsubstanzen hergestellt und diese mittels HPLC vermessen. Aus der Auftragung der Absorptionswerte gegen die Stoffmenge konnte aus dem Geradenanstieg der Absorptionskoeffizient von Naringenin bzw. Phloretin bestimmt werden. In Tabelle Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5 sind die Standardreihen und die dazugehörigen integrale der Peaks in den Chromatogrammen angegeben. In Tabelle 4-6 stehen die Absorptionskoeffizienten der beiden Substanzen, die für die verwendete HPLC-Methode ermittelt wurden und mit denen eine Umrechnung von Absorption in Stoffmenge ermöglicht wird.

Stoffmenge [pmol]	Abs. [mAU]
0,25	0,0259
1,25	0,1302
1	0,1018
5	0,4908
10	0,926
20	1,8046
50	4,2693
100	8,3261

Tabelle 4-4 Kalibration Naringenin

Stoffmenge [pmol]	Abs. [mAU]
0,1	0,0056
0,5	0,0312
1	0,0626
5	0,3232
10	0,6412
20	1,2788

Tabelle 4-5 Kalibration Phloretin

	Absorptionskoeffizient $\epsilon$ (290 nm) [l/(mol*cm)]
Naringenin	0,0831
Phloretin	0,0640

Tabelle 4-6 Spektrale Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  (290 nm) von Naringenin und Phloretin für die verwendete HPLC-Methode

#### 4.5.2 Kinetische Messungen von CHS mit *p*-Coumaroyl-CoA als Substrat

Für sämtliche Messungen mit *p*-Coumaroyl-CoA wurde die Chalkonisomerase als zusätzliches Enzym eingesetzt, um die Detektion von Naringenin reproduzierbar zu halten, da das Naringeninchalkon, welches das eigentliche Reaktionsprodukt der enzymatisch katalysierten Reaktion ist, in wässriger Lösung zwar von selbst zum Naringenin isomerisiert, die Geschwindigkeit jedoch von vielen Parametern wie zum Beispiel dem pH-Wert abhängt.

Bei der Bestimmung der enzymatischen Parameter mit zwei Substraten wird die Konzentration eines Substrates konstant gehalten, während die andere variiert wird. Dabei ist es wichtig die fixierte Konzentration iterativ anzupassen, um zu gewährleisten, dass dieses nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Anfangs wurde die Malonyl-CoA Konzentration der Assays mit variierendem *p*-Coumaroyl-CoA entsprechend den Graphen der Literatur (Yahyaa et al., 2017) auf 50  $\mu\text{M}$  fixiert und aus den Resultaten die Konzentration für *p*-Coumaroyl-CoA von 6  $\mu\text{M}$  abgeschätzt, um  $V_{\text{max}}$  zu erreichen. Bei der anschließenden Bestimmung von Malonyl-CoA wurde jedoch eine starke Substrathemmung oberhalb einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  festgestellt (siehe Abbildung 4-11). Daher konnte die Malonyl-CoA Konzentration nicht beliebig hoch eingesetzt werden, um sicher an  $V_{\text{max}}$  zu sein, weil sonst wieder eine Abnahme der Produktbildung herbeigeführt wird, was wiederum die Bestimmung von  $V_{\text{max}}$  des Co-Substrats verhindert. In weiterer Folge wurden die Assays mit variierendem *p*-Coumaroyl-CoA wiederholt, bei denen die Malonyl-CoA Konzentration bei 5  $\mu\text{M}$  fixiert wurde, wobei tendenziell eine 100%ige Steigerung der  $V_0$ -Werte beobachtet wurde. Weiterhin wurde eine Substrathemmung von *p*-Coumaroyl-CoA festgestellt, die jedoch deutlich schwächer und erst bei Konzentrationen ab 50  $\mu\text{M}$  zu beobachten war (siehe Abbildung 4-12).

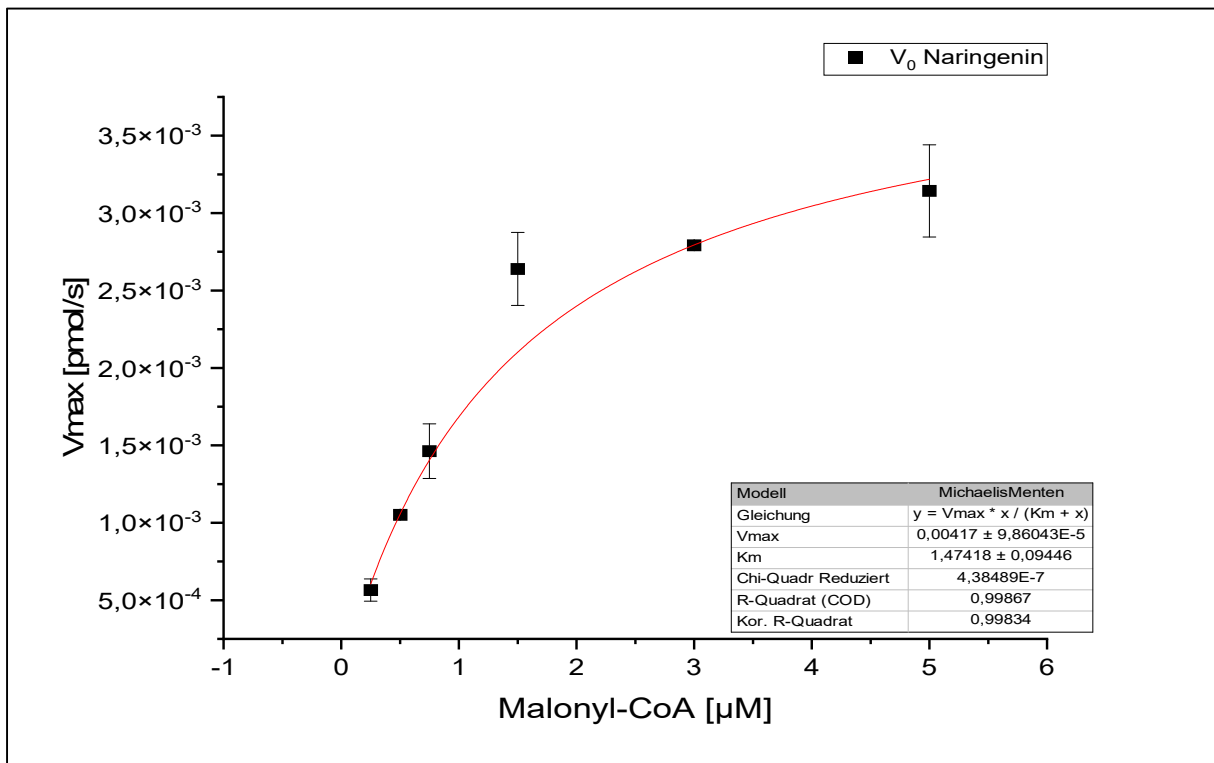


Abbildung 4-10 Naringeninbildung in Abhängigkeit von Malonyl-CoA, bei 6  $\mu\text{M}$  fixiertem *p*-Coumaroyl-CoA

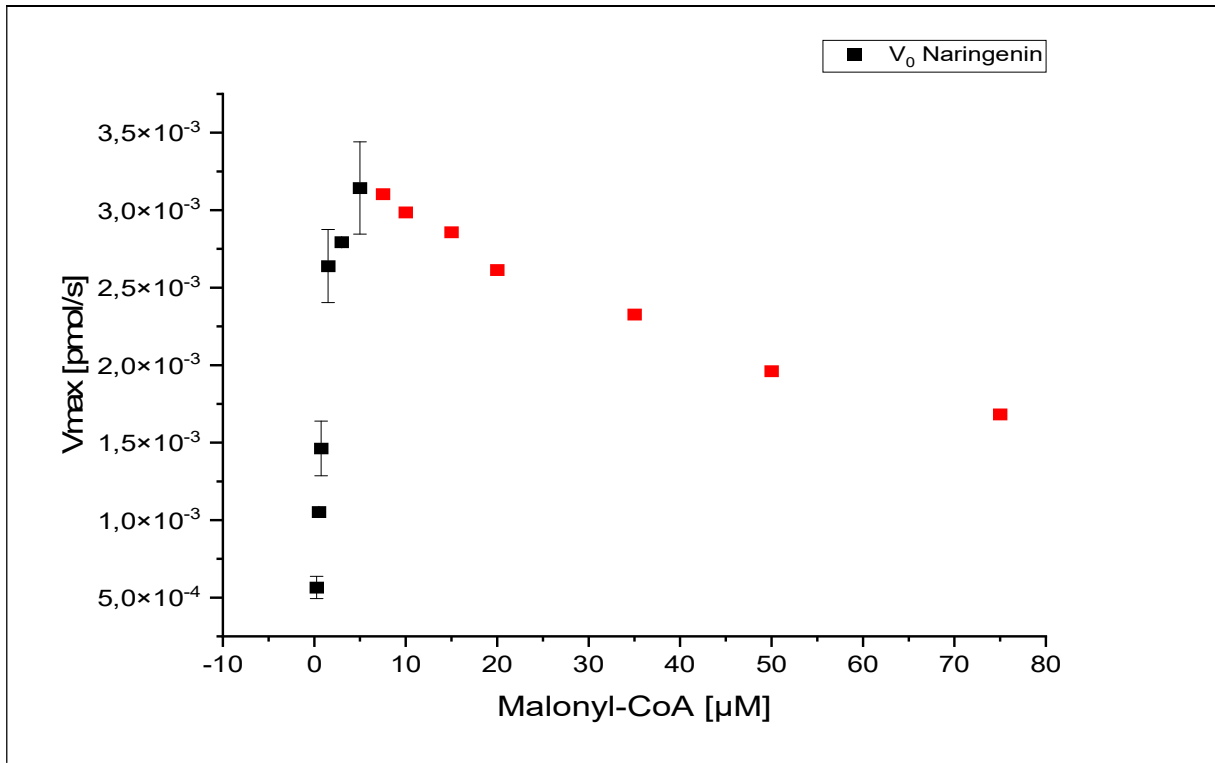


Abbildung 4-11 Substrathemmende Wirkung mit zunehmender Malonyl-CoA Konzentration bei der Naringeninbildung.

Wie aus Abbildung 4-12 ersichtlich ist, ist die Maximalgeschwindigkeit noch nicht vollständig bei  $6 \mu\text{M}$  *p*-Coumaroyl-CoA erreicht (blauer Pfeil). Diese Konzentration wurde allerdings zur Bestimmung der kinetischen Parameter von Malonyl-CoA gewählt. Daher ist zwar die vorangegangene Bestimmung der kinetischen Parameter für Malonyl-CoA mit einem gewissen Fehler behaftet, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Parameter für *p*-Coumaroyl-CoA, denen das Hauptinteresse gilt.

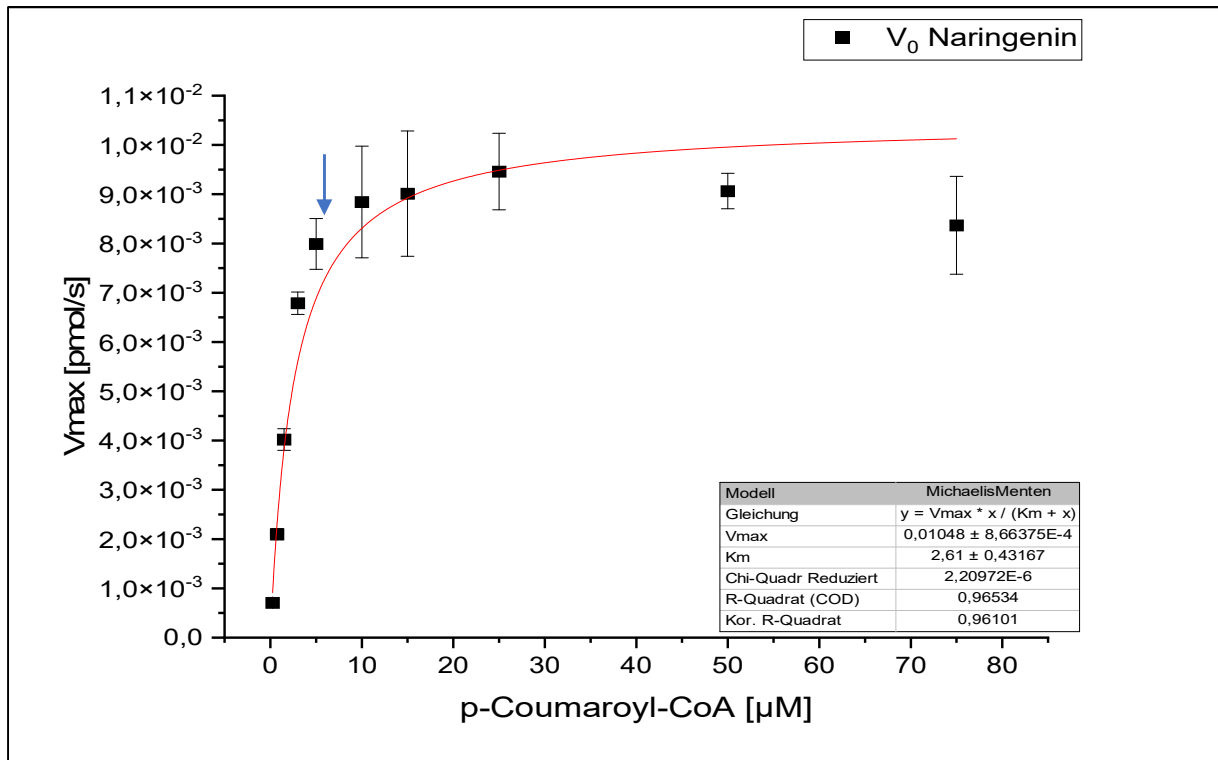


Abbildung 4-12 Naringeninbildung in Abhängigkeit von *p*-Coumaroyl-CoA, bei 5 µM fixiertem Malonyl-CoA

#### 4.5.3 Kinetische Messungen von CHS mit *p*- Dihydrocoumaroyl-CoA als Substrat

Bei den ersten Versuchen der Phloretinsynthese wurde Malonyl-CoA wieder bei 50 µM gehalten, und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA zwischen 0,25 und 25 µM variiert. Aufgrund hoher Schwankungen der Messwerte wurde die eingesetzte CHS-Menge verdreifacht und auch der untersuchte Konzentrationsbereich erweitert. Eine Dreifachbestimmung mit 0,6 µg CHS und einem Substratkonzentrationsbereich von 0,25 – 100 µM lieferten sehr gut zueinanderpassende Verläufe und wurden für die Auswertung in Abbildung 4-12 herangezogen. Die detektierten Produktmengen wurden gedrittelt, um sie auf 0,2 µg CHS zu normieren und mit den Naringeninassays vergleichbar zu machen.

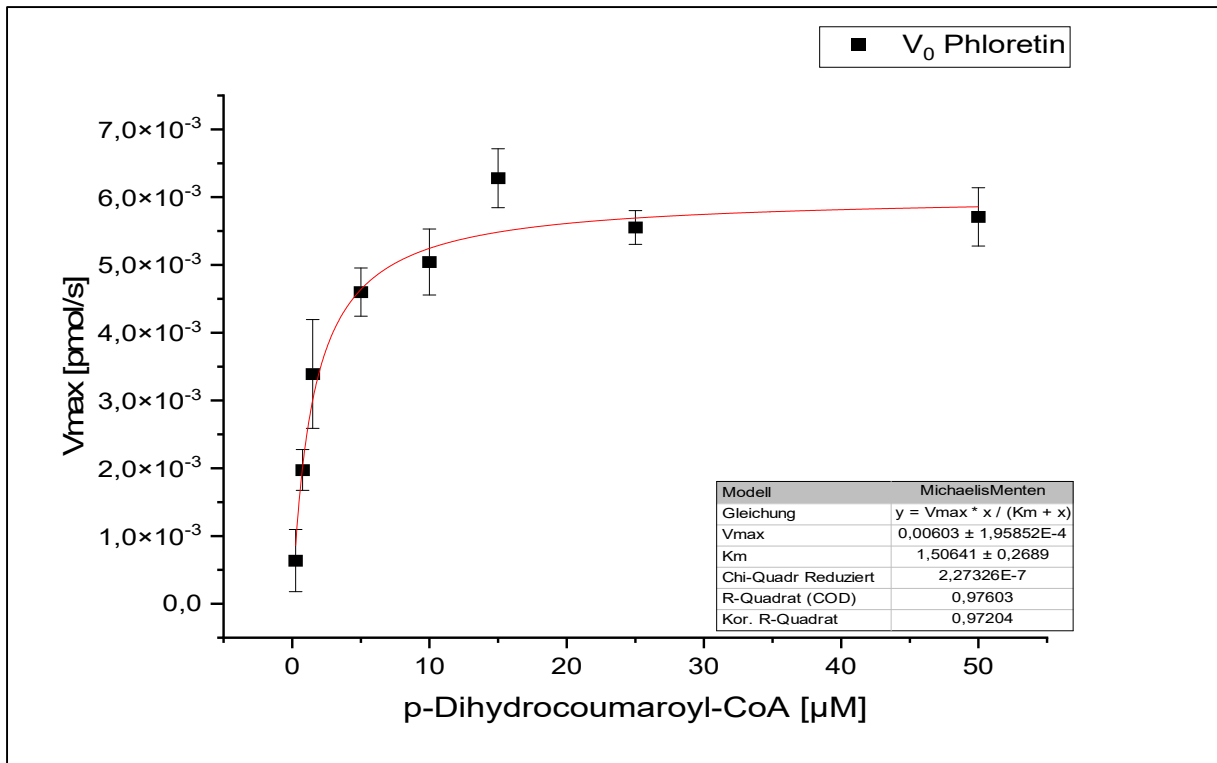


Abbildung 4-13 Bildung von Phloretin in Abhängigkeit von p-Dihydrocoumaroyl-CoA, bei 50 µM fixiertem Malonyl-CoA

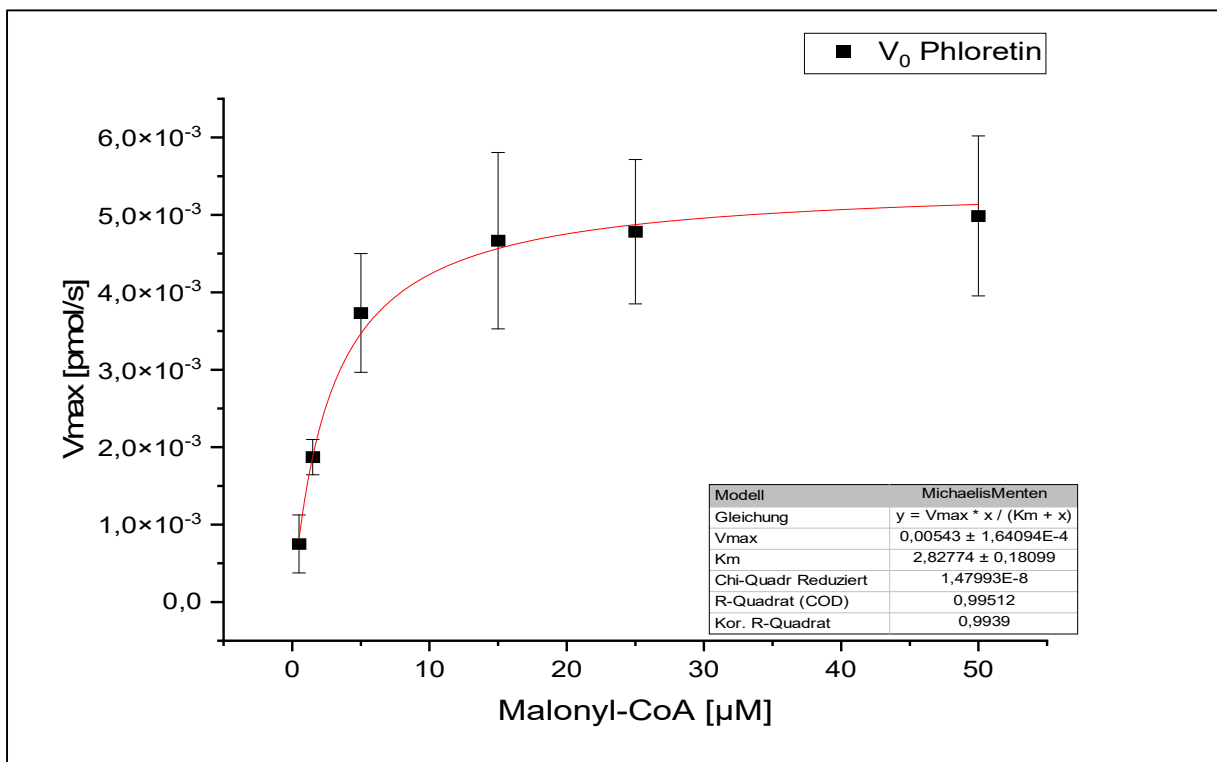


Abbildung 4-14 Bildung von Phloretin in Abhängigkeit von Malonyl-CoA, bei 40 µM fixiertem p-Dihydrocoumaroyl-CoA

Die Phloretinbildung wies ebenfalls eine Substrathemmung in Abhängigkeit der Malonyl-CoA Konzentration auf, jedoch erst bei  $[S] > 50 \mu\text{M}$ . Der Abfall in der Produktbildungsrate ist jedoch nicht so abrupt wie in den Naringeninassays. Bis dorthin sind aber bereits drei Datenpunkte (15, 25 und 50

$\mu\text{M}$ , siehe Abbildung 4-14), im flachen Bereich der Kurve. Für einen besseren Vergleich, sind in Abbildung 4-15 die Reaktionsgeschwindigkeiten der Substrate *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA und *p*-Coumaroyl-CoA – bei jeweils optimaler Malonyl-CoA Konzentration – in Abhängigkeit der Konzentration in einem Graphen dargestellt.

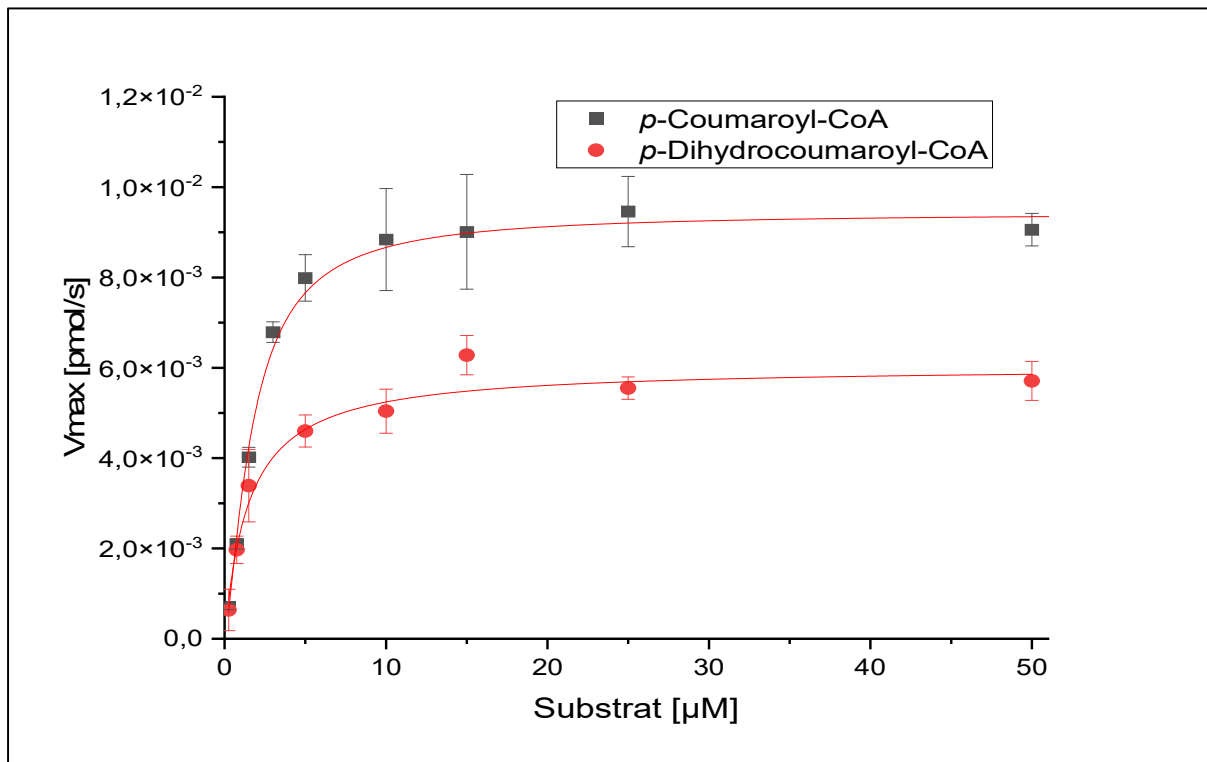


Abbildung 4-15 Bildung von Naringenin (schwarz) und Phloretin (rot) in Abhängigkeit des Phenylpropanoidsubstrats, bei jeweils optimaler Malonyl-CoA Konzentration.

#### 4.6 Enzymkinetische Parameter der CHS und deren Interpretation

Aus den erfolgten enzymatischen Messungen konnten die kinetischen Parameter der CHS berechnet werden und sind in Tabelle 4-7 aufgeführt.

	Naringenin		Phloretin	
	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	Malonyl-CoA	<i>p</i> -Dihydro-coumaroyl-CoA	Malonyl-CoA
$V_{\text{max}}$ [mol/s] ( $\times 10^{-14}$ )	$1,05 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,02$
$K_m$ [M] ( $\times 10^{-6}$ )	$2,61 \pm 0,43$	$1,47 \pm 0,09$	$1,51 \pm 0,27$	$2,83 \pm 0,18$
$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/n(\text{CHS})$ [ $\text{s}^{-1}$ ] ( $\times 10^{-1}$ )	$2,36 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,02$
$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] ( $\times 10^4$ )	$9,05 \pm 1,53$	$6,37 \pm 4,56$	$9,01 \pm 1,75$	$4,32 \pm 3,46$

Tabelle 4-7 Errechnete kinetische Parameter der CHS in den Reaktionen zu Naringenin und Phloretin

Interessanterweise zeigt *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA einen mehr als 40 % niedrigeren  $K_M$ -Wert, also eine höhere Affinität zur CHS als *p*-Coumaroyl-CoA. Allerdings ist der  $V_{max}$ -Wert ebenfalls um mehr als 40 % niedriger, weshalb die katalytische Effizienz, der Quotient aus  $k_{cat}$  und  $K_M$ , für beide Substrate praktisch gleich sind. Außerdem ist der  $K_M$ -Wert für Malonyl-CoA bei der Reaktion von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA fast doppelt so hoch wie der  $K_M$ -Wert von *p*-Coumaroyl-CoA.

Die  $V_{max}$ -Werte von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA und Malonyl-CoA stimmen sehr gut überein, was zeigt, dass die Messungen in sich stimmig sind. Die  $V_{max}$ -Werte von *p*-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA weichen voneinander ab, was zum Teil darauf zurückzuführen ist, dass – wie bereits oben beschrieben – die Maximalgeschwindigkeit bei 6  $\mu$ M *p*-Coumaroyl-CoA noch nicht ganz erreicht ist. Würde man die zwei Messungen mit den höchsten Konzentrationen nicht zur Berechnung hinzuziehen, was jedoch nicht zulässig ist, da man dann den  $K_M$ -Wert nicht überschreitet, erhält man einen  $V_{max}$ -Wert von  $1,03 \pm 0,11 \times 10^{-14}$  mol/s ( $K_M = 4,37 \mu$ M). Dies wäre in perfekter Übereinstimmung mit dem  $V_{max}$ -Wert von *p*-Coumaroyl-CoA.

Für einen besseren Vergleich mit bereits veröffentlichten kinetischen Parametern (Yahyaa et al., 2017) wurden diese in Tabelle 4-8 auf gleiche Einheiten umgerechnet und fehlende Fehlergrenzen für die katalytische Effizienz (rot) berechnet.

	Naringenin		Phloretin	
	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	Malonyl-CoA	<i>p</i> -Dihydrocoumaroyl-CoA	Malonyl-CoA
$K_M$ [M] ( $\times 10^{-6}$ )	5,09 $\pm$ 1,26	0,95 $\pm$ 0,41	5,07 $\pm$ 2,46	0,75 $\pm$ 0,24
$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ] ( $\times 10^{-1}$ )	0,398 $\pm$ 0,051	0,348 $\pm$ 0,038	0,446 $\pm$ 0,060	0,810 $\pm$ 0,313
$k_{cat}/K_M$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ] ( $\times 10^4$ )	0,78 $\pm$ <b>0,29</b>	3,66 $\pm$ <b>1,98</b>	0,88 $\pm$ <b>0,55</b>	10,80 $\pm$ <b>7,63</b>

Tabelle 4-8 Publierte kinetische Parameter der MdCHS3 in den Reaktionen zu Naringenin und Phloretin (Yahyaa et al., 2017). Rot markierte Standardabweichungen wurden neu berechnet, da sie in der Publikation nicht angegeben waren.

Aus den von Yahyaa et al. publizierten Daten geht hervor, dass *p*-Coumaroyl-CoA und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA sowohl nahezu identische  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte aufweisen. Daraus ergibt sich, dass die katalytische Effizienz ebenfalls innerhalb ihrer Standardabweichung nahezu identisch für diese beiden Substrate ist. Allerdings sind die  $K_M$ -Werte für beide Phenylpropanoid-Substrate deutlich höher und die  $k_{cat}$ -Werte liegen zwischen 17 - 66 % unterhalb der in die in dieser Arbeit bestimmten Werte.

Laut Publikation haben die Autoren außerdem eine potenzielle engere Substratspezifität der MdCHS3 beobachtet, indem sie relative Umsatzraten von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA, *p*-Coumaroyl-CoA und Zimtsäure-CoA-Ester, die jeweils eine Konzentration von 15  $\mu$ M hatten, in Anwesenheit von 56  $\mu$ M Malonyl-CoA bestimmt haben. Die publizierten Umsatzraten sind in Tabelle 4-9 wiedergegeben. Laut der Publikation, wurde die Aktivität von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA auf 100 % Umsatz gesetzt, jedoch



zeigt die Tabelle für dieses Substrat und der Verwendung von *MdCHS2* aus unbekanntem Gründen lediglich eine Umsatzrate von 93 %.

Substrat	Relative Umsatzrate [%]		
	<i>MdCHS1</i>	<i>MdCHS2</i>	<i>MdCHS3</i>
<i>p</i> -Dihydrocoumaroyl-CoA	100 ± 0,81	93 ± 1,90	100 ± 3,53
<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	82 ± 1,05	30 ± 2,70	69 ± 1,41
Zimtsäure-CoA-Ester	94 ± 1,63	100 ± 2,17	10 ± 1,17

Tabelle 4-9 Publierte Umsatzraten von *MdCHS1*, *MdCHS2* und *MdCHS3* mit *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA, *p*-Coumaroyl-CoA und Zimtsäure-CoA-Ester (jeweils 15 µM) in Anwesenheit von 56 µM Malonyl-CoA (Yahya et al., 2017). Die Aktivität von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA wurde laut Autoren auf 100 % gesetzt.

Aus den Daten geht hervor, dass *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA für alle drei CHS das beste Substrat ist, mit der Ausnahme, dass *MdCHS2* Zimtsäure-CoA-Ester noch etwas mehr bevorzugt (ca. 7 % Unterschied). Die Umsatzraten für *p*-Coumaroyl-CoA liegen zwischen 30 (*MdCHS2*) und 82 % (*MdCHS1*), wobei *MdCHS3* eine Umsatzrate von ca. 69 % aufweist. Zimtsäure-CoA-Ester zeigt nahezu 100 % Umsatz, mit Ausnahme von *MdCHS3* welches lediglich 10 % Umsatz aufweist. Aufgrund einer angeblich beobachteten engeren Substratspezifität der *MdCHS3* – wobei unklar bleibt was die Autoren darunter verstehen – wurde dieses Enzym von den Autoren für eine enzymkinetische Charakterisierung ausgewählt.

Die in der gleichen Publikation veröffentlichten kinetischen Daten (siehe Tabelle 4-8) widersprechen den veröffentlichten Umsatzraten. Die Substrate *p*-Coumaroyl-CoA und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA besitzen, wie bereits erwähnt, für *MdCHS3* nahezu identische  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte. Daraus folgt, dass beide Substrate über den gesamten Konzentrationsbereich die gleichen Umsatzgeschwindigkeiten haben, außer es kommt zur Substrathemmung, was die Autoren jedoch nicht beobachtet haben.

Um ausschließen zu können, dass die Autoren mit einer CHS gearbeitet haben, die aufgrund von Mutationen eine andere Substratspezifität hat wurde ein Sequenzvergleich durchgeführt, welcher in Abbildung 4-16 dargestellt ist.

CG14_MalCHS1	1	10	20	30	40	50	60	67				
MdCHS3	MVTVEE	VRKAQRAE	GPATVLA	IGTATP	NCVDDQATY	PDYVFR	ITNSEHKT	VELKEK	FFORMCDKSMIK			
MdCHS1	MVTVEE	VRKAQRAE	GPATVLA	IGTATP	NCVDDQATY	PDYVFR	ITNSEHKT	TELKEK	FFORMCDKSMIK			
MdCHS2	MVTVEE	VRKAQRAE	GPATVLA	IGTATP	NCVDDQATY	PDYVFR	ITNSEHKT	TELKEK	FFORMCDKSMIK			
CG14_MalCHS1	70	80	90	100	110	120	130	134				
MdCHS3	RMYMLTEE	LKENP	SVCEYMAPS	L	DARQDMVVVEVP	R	LGKEAATKA	IKEWGQPKS	ITHLVFCTTSG			
MdCHS1	RMYMLTEE	LKENPT	VCEYMAPS	L	DARQDMVVVEVP	R	LGKEAATKA	IKEWGQPKS	ITHLVFCTTSG			
MdCHS2	RMYMLTEE	LKENPT	VCEYMAPS	L	DARQDMVVVEVP	R	LGKEAATKA	IKEWGQPKS	ITHLVFCTTSG			
CG14_MalCHS1	140	150	160	170	180	190	200	201				
MdCHS3	VDMPGADY	QLTKLL	GLRPSVKRL	MMYQQGCF	FAGGTVLR	LAKDLAENN	KGARVLVVC	SEITAVTFRGP				
MdCHS1	VDMPGADY	QLTKLL	GLRPSVKRL	MMYQQGCF	FAGGTVLR	LAKDLAENN	KGARVLVVC	SEITAVTFRGP				
MdCHS2	VDMPGADY	QLTKLL	GLRPSVKRL	MMYQQGCF	FAGGTVLR	LAKDLAENN	KGARVLVVC	SEITAVTFRGP				
CG14_MalCHS1	210	220	230	240	250	260	268	268				
MdCHS3	SDTHLDS	LVGOAL	FGDGA	AAVIG	ADDPV	PEVEKPLFEL	VSA	AQTI	LPDSDGA	IDGHLREVGLTFHLL		
MdCHS1	SDTHLDS	LVGOAL	FGDGA	AAVIG	ADDPV	PEVEKPLFEL	VSA	AQTI	LPDSDGA	IDGHLREVGLTFHLL		
MdCHS2	SDTHLDS	LVGOAL	FGDGA	AAVIG	ADDPV	PEVEKPLFEL	VSA	AQTI	LPDSDGA	IDGHLREVGLTFHLL		
CG14_MalCHS1	270	280	290	300	310	320	330	335				
MdCHS3	KDVPGL	ISKNI	EKSL	NFAFKP	IGISD	WNLSFW	IAHPGGPA	ILDQV	SS	KLALKPEKLEATRQVLS	DYD	
MdCHS1	KDVPGL	ISKNI	EKSL	NFAFKP	IGISD	WNLSFW	IAHPGGPA	ILDQV	SS	KLALKPEKLEATRQVLS	DYD	
MdCHS2	KDVPGL	ISKNI	EKSL	NFAFKP	IGISD	WNLSFW	IAHPGGPA	ILDQV	SS	KLALKPEKLEATRQVLS	DYD	
CG14_MalCHS1	340	350	360	370	380	390	392	392				
MdCHS3	NMSSACV	LF	LDEVRR	RS	AEKGL	TTT	EGLEWGV	LF	FGFGP	GLTVETV	VVLH	SVGLTA
MdCHS1	NMSSACV	LF	LDEVRR	RS	AEKGL	TTT	EGLEWGV	LF	FGFGP	GLTVETV	VVLH	SVGLTA
MdCHS2	NMSSACV	LF	LDEVRR	RS	AEKGL	TTT	EGLEWGV	LF	FGFGP	GLTVETV	VVLH	SVGLTA

Abbildung 4-16 Sequenzvergleich der in dieser Arbeit verwendeten CHS (CG14\_MalCHS1) und den drei CHS Sequenzen die in der Publikation von Yahyaa et al., 2017 verwendet wurden. Sämtliche Mutationen zwischen den jeweiligen Formen wurden rot umrandet.

Darüber hinaus wurde ein Homologiemodell basierend auf der Kristallstruktur der CHS von *Malus domestica* (pdb: 5UC5) erstellt. In Abbildung 4-17 ist zu sehen, dass sämtliche Positionen der Mutationen auf der Außenseite des Enzyms, fernab des aktiven Zentrums, zu finden sind. Im Übrigen befinden sich keine Mutationen innerhalb des Interfaces des Homodimers.

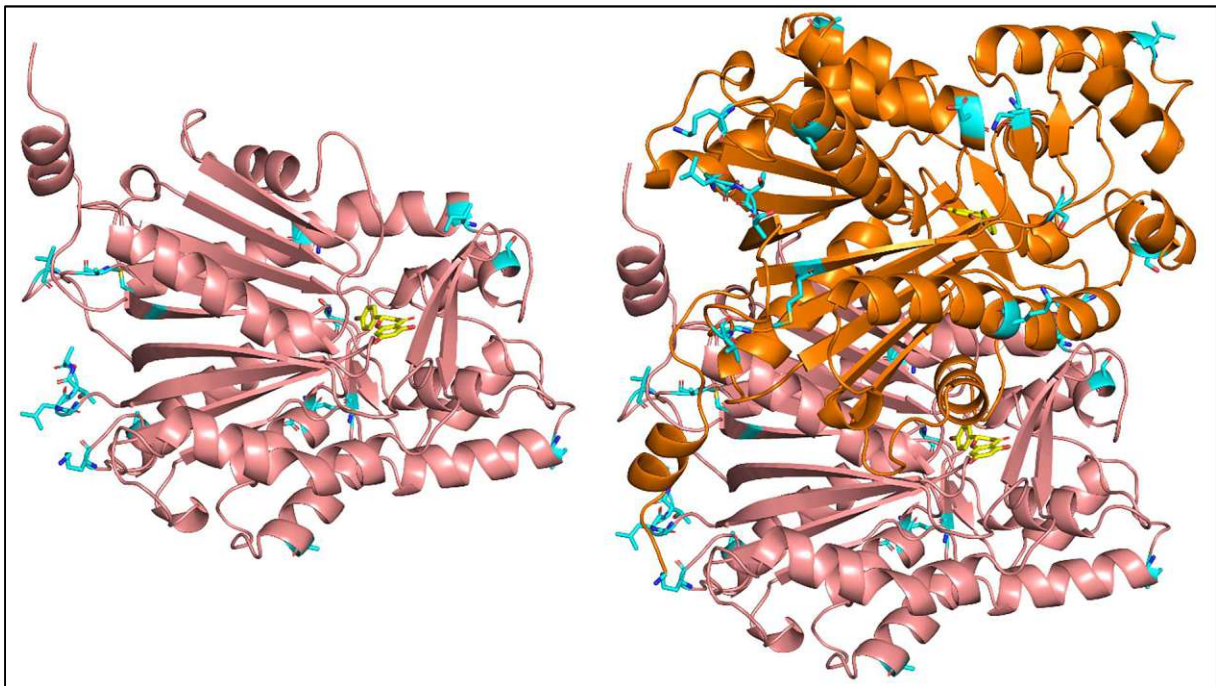


Abbildung 4-17 Homologiemodell der in dieser Arbeit verwendeten CHS. Links: CHS-Monomer; rechts: CHS-Dimer. Sämtliche Positionen der Mutationen zwischen den Varianten sind hellblau hervorgehoben und das Produkt Naringenin ist gelb dargestellt.

Damit lässt nahezu vollständig ausschließen, dass sich die jeweiligen CHS-Varianten in ihrer Substratspezifität unterscheiden.

## 5 Diskussion und Ausblick

Die Produktion von Dihydrochalkonen aus *in-vitro* Versuchen von Gosch et al. (2009) in denen *p*-Coumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA und NADPH in Rohextrakten aus Apfelblätter inkubiert wurden, weisen auf eine Reduktase-Aktivität hin, die *p*-Coumaroyl-CoA zu *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA reduziert. Der Umsatz zu Phloretin geschieht dann vermutlich durch die CHS. Die CHS katalysiert diese Reaktion, wie nicht zuletzt in dieser Arbeit gezeigt. Berichten von Dare et al. aus 2013a zufolge beobachtet man eine bis zu 90%ige Abnahme der Phlorizin-Konzentration in *Malus*-Mutanten in denen drei CHS Gene durch RNAi-Silencing abgeschaltet wurden. Darüber hinaus gibt es dramatische Unterschiede im Phänotyp der Apfelpflanze wie fehlende Pigmentation in Blüten, kürzeren Sprossachsen, stark reduziertes Wachstum, kleinere Blätter und Früchte. Veränderungen die man in diesem Ausmaß in anderen CHS-supprimierten Pflanzen, wie *Petunia x hybrida*, *Zea mays*, oder *Arabidopsis* nicht beobachten kann. Eine negative Korrelation zwischen Flavonoidgehalt und Auxintransport werden für diese Veränderungen vermutet.

Ähnliche phänotypische Veränderungen wurden durch Silencing der Phloretin-glycosyltransferase (MdPGT1), die die Glykosylierung von Phloretin zu Phlorizin katalysiert, beobachtet, obwohl die Abnahme der Phlorizinkonzentrationen in diesen Mutanten eher im Bereich 50% lagen (Dare et al., 2017).

Um die Funktionalität der CHS in der Flavonoid- und der Dihydrochalkon-Biosynthese besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit zwei von ihr katalysierten Reaktionen untersucht und miteinander verglichen. Für diesen Zweck wurden, nach einigen Optimierungsschritten eine in einen pTrcHis2-TOPO Vektor klonierte *MdCHS* exprimiert, durch ein optimiertes Aufschlussverfahren aus dem Wirt gewonnen, und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Nach einem Pufferwechsel und Aufkonzentrieren wurde die CHS aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Diese CHS wurde für die Enzymcharakterisierung der zwei untersuchten Reaktionen zum Naringenin und Phloretin eingesetzt, in denen die kinetischen Parameter der Substrate untersucht und verglichen wurden.

Die Expressionen konnten zu einem hohen Grad optimiert werden. Zwar war das begrenzte Expressionsscreening der CHS im pGEX6-P1 Vektor nur mäßig erfolgreich, doch der Umstieg auf den pTrcHis2-TOPO Vektor zusammen mit der vorherigen Optimierung konnten nicht nur das Verhältnis von löslichem Enzym zu Inclusion Bodies, sondern auch die Ausbeute an Enzym erheblich verbessern. Diese Verbesserung geht vermutlich auf eine Kombination von unterschiedlichen Gründen zurück. Zum einen ist der His-Tag deutlich kleiner als der GST-Tag, bei welchem eine potenzielle Erhöhung der Löslichkeit des Fusionsproteins stets individuell getestet werden muss. Zum anderen besitzt der pTrcHis2 Vektor einen Trc-Promotor, der deutlich schwächer als der starke T7-Promoter des pGEX6-P1 Vektors ist, was in der Regel das Verhältnis von löslichem Zielprotein zu Inclusion Bodies deutlich verbessert. Mit einer Expression von ca. 2,3 l ließ sich so rund 2 mg lösliches Enzym gewinnen, eine Menge, die für hunderte Assays ausreicht. Eine Möglichkeit, um die Expression weiter zu verbessern, bestünde in der Verwendung eines dedizierten Expressionsstamm wie BL21-AI, der mit dem pTrc-Vektor kompatibel ist, die Temperatur während der Expression zu erniedrigen und die Expressionszeit zu erhöhen.

Ein Bereich, in dem ebenfalls noch Optimierungen möglich sind, ist der Zellaufschluss. Wie demonstriert wurde, konnten einheitliche Aufschlüsse nicht erreicht werden und die beiden Methoden – Lysozym und Ultraschall – zeigten abwechselnd bessere Resultate gegenüber der anderen. Idealerweise verwendet man eine Methode (oder entwickelt ein Kombinationsprotokoll, anstatt beide Methoden sequenziell durchzuführen) die einen hohen Grad an Aufschluss garantiert.

Die Reinigung der CHS konnte insofern optimiert werden, als dass das Auftreten einer Schulter im Chromatogramm, welche vermutlich durch Fremdproteine verursacht wird, durch eine Erhöhung des pH-Werts von pH 7 auf pH 8 des Eluens verhindert werden konnte. Die Ursache liegt vermutlich weniger in einer potenziell geänderten Spezifität der Säulenmatrix, als vielmehr in der Wirkung des pH-Werts auf das Imidazol. Imidazol besitzt einen  $pK_A$ -Wert von 6,95 und liegt daher bei pH 7 in etwa in einem Verhältnis von 1:1 der protonierten und deprotonierten Form vor. Bei pH 8 ist das Imidazol hingegen zum größten Teil deprotoniert und die deprotonierte Form kann die Proteine effektiver von der Säulenmatrix eluieren. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die höhere Reinheit durch das Verschwinden der Schulter im Chromatogramm nur eine Vermutung und keinen Beweis darstellt. Zu einer weiteren Reinigung der CHS könnte man weiterführende Reinigungsschritte nach der Affinitätschromatographie durchführen, wie etwa eine chromatographische Abtrennung weiterer Fremdproteine durch den Einsatz einer Mono Q™ Anionenaustauschsäule oder einer Größenausschlusschromatographie. Durch eine höhere Reinheit ist bei den Enzymassays die eingesetzte CHS-Menge exakter bekannt.

Beim Aufkonzentrieren und Umpuffern verschiedener CHS-Expressionen konnten erhebliche Unterschiede im Zeitaufwand beobachtet werden. Es ist nicht restlos klar wie die zustände kamen, aber ein Verdacht liegt auf der Oxidation von oberflächennahen Cysteinen und intermolekularer Disulfidbrückenbildung. Sollte die CHS im Vivaspin zum Teil unlöslich werden, könnte durch eine Belegung der Membran die Dauer der Aufkonzentrierung erhöht werden. Um dies zu verhindern, wird oft ein Reduktionsmittel wie zum Beispiel DTT zugegeben. Sollte die Reduktionswirkung jedoch nachlassen – die Halbwertszeit von DTT liegt je nach pH-Wert nur bei wenigen Stunden, ist es denkbar, dass eine Disulfidbrückenbildung nicht ausreichend unterbunden werden kann. Darüber hinaus kann oxidiertes DTT (ein ringgeschlossenes Disulfid) selbst wieder als Oxidationsmittel wirken und dadurch die Ausfällung der CHS vielleicht sogar noch beschleunigen.

Mit dem gereinigten Enzym konnten kinetische Daten von den Substraten *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA, *p*-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA erhalten werden, wobei einige Faktoren eine korrekte Messung der CHS katalysierten Reaktionen erschwerten. So wurde im Laufe dieser Arbeit zum Beispiel festgestellt, dass das Malonyl-CoA über längere Zeit begrenzte Lagerstabilität aufweist. Auch die Produkte scheinen eine begrenzte Stabilität bzw. Löslichkeit zu haben, da Proben, die längere Zeit im Autosampler der HPLC standen einen deutlichen Trend der Produktabnahme / -degradation zeigten.

Obwohl die katalytische Effizienz für die Substrate *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA und *p*-Coumaroyl-CoA identisch sind, zeigen beide Substrate deutliche Unterschiede in ihren  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Werten. *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA zeigt eine fast doppelt so hohe Affinität zur CHS als *p*-Coumaroyl-CoA, jedoch ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit nur etwas mehr als halb so hoch (siehe Abbildung 4-15). Sehr bemerkenswert ist die Beobachtung einer Substrathemmung durch Malonyl-CoA ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M bei der Reaktion mit *p*-Coumaroyl-CoA, nicht aber bei der Reaktion mit *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA. Das bedeutet, dass sich die Reaktion von *p*-Coumaroyl-CoA mit ab 5  $\mu$ M

steigenden Malonyl-CoA Konzentrationen verlangsamt, während sich die Reaktion von *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA weiter beschleunigt. Dadurch, dass die Substrathemmung nur für eines der beiden Phenole stattfindet, lässt sich der Rückschluss ziehen, dass die Hemmung erst im weiteren Verlauf der Kettenverlängerung erfolgt und das Enzym ohne *p*-Coumaroyl-CoA im aktiven Zentrum ungehemmt ist. Das wiederum bedeutet, dass die einseitige Hemmung auch bei gleichzeitigem Vorliegen von *p*-Coumaroyl-CoA und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA zu beobachten sein sollte. Diese Hypothese müsste jedoch noch verifiziert werden. Ob die Substrathemmung von Malonyl-CoA physiologische Bedeutung hat, ist unklar. Normalerweise ist die cytosolische Malonyl-CoA Konzentration streng, und auf niedrigem Niveau durch die cytosolischen Varianten der Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase, Aufbau Malonyl-CoA) und Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD, Abbau von Malonyl-CoA), geregelt. Eine Substrathemmung für *p*-Coumaroyl-CoA wurde bereits vor langer Zeit beschrieben (Hrazdina et al., 1976) und deckt sich mit den Resultaten, die in dieser Arbeit erzielt wurden.

Die Ergebnisse der Publikation Yahyaa et al., (2017), an der sich diese Arbeit orientiert hat, stehen im Kontrast zu den hier gewonnenen Resultaten. Yahyaa et al. (2017) kamen über Messungen von Umsatzraten zu dem Schluss, dass drei aus dem Apfel gewonnenen CHS Isozyme, Phloretin schneller als Naringenchalkon bilden, und ein Enzym (*Md*CHS3) eine engere Substratspezifität hat, wobei offen bleibt, was die Autoren damit meinen, da es in der Publikation nicht weiter erläutert wird. Die von den Autoren durchgeführten kinetischen Untersuchungen der *Md*CHS3 stützen auch nicht die Behauptung, dass die CHS eine höhere Umsatzrate für *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA hat, da das Substrat identische kinetische Parameter ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) wie *p*-Coumaroyl-CoA aufweist. Die in dieser Arbeit festgestellte Substrathemmung durch Malonyl-CoA liefert die Erklärung, warum die Autoren unterschiedliche Umsatzraten feststellen konnten. Laut Publikation haben die Autoren 56  $\mu$ M Malonyl-CoA eingesetzt, was offensichtlich dazu führt, dass die Reaktion von *p*-Coumaroyl-CoA so stark inhibiert wurde, dass *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA eine schnellere Umsatzgeschwindigkeit aufwies. Allerdings ist eine Substrathemmung in der Publikation weder erwähnt noch aus den Graphen ersichtlich, obwohl sie Konzentrationen bis 30  $\mu$ M einsetzen. Weitere Aussagen über die kinetischen Daten von Yahyaa et al. (2017) lassen sich leider nicht treffen, da nicht erwähnt wird, wie hoch die Konzentration von Malonyl-CoA bei der Bestimmung der enzymatischen Parameter von *p*-Coumaroyl-CoA und *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA war.

Eine potenziell unterschiedliche Substratspezifität durch das Auftreten von Mutationen in den CHS Sequenzen konnte ebenfalls mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da sich alle Positionen, an denen die Aminosäuren variieren auf der Außenseite der CHS, fernab des aktiven Zentrums und des Interfaces des Homodimers befinden. CHS aus anderen Pflanzen sind ebenfalls in der Lage *p*-Dihydrocoumaroyl-CoA umzusetzen (Lehka et al., 2017), weshalb diese Funktionalität vermutlich generell bei Chalkonsynthesen anzutreffen ist.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Bildung von hohen Mengen an Phloretin-Derivaten im Apfel nicht an einer speziellen CHS liegt, sondern dass eine bis dato nicht identifizierte Oxidoreduktase, die den Precursor für die Phloretinbildung bereitstellt. Die Identifikation dieses Schlüsselenzyms könnte den Grundstein für weitere Forschung legen wie man zum Beispiel Dihydrochalkone ebenfalls in anderen Pflanzen produzieren lassen kann.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Flavan ist die zugrundeliegende Struktur der Flavonoide. Substitutionen – vor allem Hydroxylgruppen – an den unterschiedlichen Ringpositionen teilen die daraus resultierenden Moleküle in die unterschiedlichen Flavonoidgruppen, z.B. Flavanole, Flavonole, Flavone, Flavanone, Anthocyanidine, etc. ein..... 1

Abbildung 1-2 Flavonoid-Biosynthese. Aus dem Phenylpropanoidweg (oberes Rechteck) entsteht 4-Coumaroyl-CoA, welches mit 3x Malonyl-CoA, das Naringeninchalkon bildet. R, R' and R'' entsprechen -H oder -OH. Die Abkürzungen der Enzyme sind in Tabelle 1-1 nachzulesen..... 3

Abbildung 1-3 Der gegenwärtig akzeptierte Reaktionsmechanismus der CHS, mit Beladung (R entspricht dem Rest der p-Coumaroyl Spezies), Malonyl-CoA-Decarboxylierung, und Kettenverlängerung mit einem -CH<sub>2</sub>C=O- Baustein unter Eliminierung der Cys<sub>164</sub>. Bei der Synthese von Naringeninchalkon wird Schritt 2 dreimal wiederholt. .... 6

Abbildung 1-4 Reaktionsintermediate und -produkte der CHS mit potenziellen Pfaden zu reduzierten Produkten via CHR. R' entspricht entweder Coenzym A oder Cys<sub>164</sub> der CHS. .... 7

Abbildung 1-5 Reaktionsmechanismus des von der CHI katalysierten Ringschlusses von Naringeninchalkon zu Naringenin (Jez et al., 2000). .... 8

Abbildung 4-1 links: Molekularmassenstandard #P7719 (<https://international.neb.com/>); Mitte: SDS-PAGE des Aufschlusses der MLS-4; rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse der Expression MLS-4 .. 28

Abbildung 4-2 links: SDS-PAGE des Aufschlusses der Expression MLS-5 Gel#1, rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse CHS-1 und -2 der Expression MLS-5..... 28

Abbildung 4-3 links: SDS-PAGE des Aufschlusses der Expression MLS-5 Gel#2, rechts: Pipettierschema der Aufschlüsse CHS-3 und -4 der Expression MLS-5..... 29

Abbildung 4-4 oben: Gel#1 der Expression MLS-17 (Ultraschallaufschluss) und Pipettierschema; unten: Gel#2 der Expression MLS-17 (Lysozymbaufschluss) und Pipettierschema..... 30

Abbildung 4-5 FPLC Chromatogramm der MLS-17 mit Ultraschallaufschluss. Nicht sauber getrennter Produktpeak. .... 32

Abbildung 4-6 FPLC Chromatogramm der MLS-17 mit Lysozymbaufschluss. Nicht sauber getrennter Produktpeak. .... 33

Abbildung 4-7 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-18 (erster Run: Lysozym). Schöner Produktpeak aber unvollständiger Aufschluss ..... 34

Abbildung 4-8 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-18 (zweiter Run: Ultraschall). Schöner Produktpeak und guter Aufschluss ..... 34

Abbildung 4-9 FPLC Chromatogramm der Expression MLS-19 (CHI) ..... 35

Abbildung 4-10 Naringeninbildung in Abhängigkeit von Malonyl-CoA, bei 6µM fixiertem p-Coumaroyl-CoA ..... 37

Abbildung 4-11 Substrathemmende Wirkung mit zunehmender Malonyl-CoA Konzentration bei der Naringeninbildung. .... 38

Abbildung 4-12 Naringeninbildung in Abhängigkeit von p-Coumaroyl-CoA, bei 5µM fixiertem Malonyl-CoA ..... 39

Abbildung 4-13 Bildung von Phloretin in Abhängigkeit von p-Dihydrocoumaroyl-CoA, bei 50 µM fixiertem Malonyl-CoA ..... 40

Abbildung 4-14 Bildung von Phloretin in Abhängigkeit von Malonyl-CoA, bei 40  $\mu$ M fixiertem p-Dihydrocoumaroyl-CoA ..... 40

Abbildung 4-15 Bildung von Naringenin (schwarz) und Phloretin (rot) in Abhängigkeit des Phenylpropanoidssubstrats, bei jeweils optimaler Malonyl-CoA Konzentration..... 41

Abbildung 4-16 Sequenzvergleich der in dieser Arbeit verwendeten CHS (CG14\_MalCHS1) und den drei CHS Sequenzen die in der Publikation von Yahyaa et al., 2017 verwendet wurden. Sämtliche Mutationen zwischen den jeweiligen Formen wurden rot umrandet..... 44

Abbildung 4-17 Homologiemodell der in dieser Arbeit verwendeten CHS. Links: CHS-Monomer; rechts: CHS-Dimer. Sämtliche Positionen der Mutationen zwischen den Varianten sind hellblau hervorgehoben und das Produkt Naringenin ist gelb dargestellt. .... 44

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Abkürzungen der im Flavonoid-Biosynthesewegs beteiligten Enzyme.....	2
Tabelle 3-1 Liste der verwendeten Laborgerätschaften .....	17
Tabelle 3-2 Liste der verwendeten Laborchemikalien .....	18
Tabelle 3-3 Induktion der MLS-2 .....	20
Tabelle 3-4 OD <sub>600</sub> post-Expression der Kulturen bei 1:10 Verdünnung .....	20
Tabelle 3-5 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele .....	23
Tabelle 3-6 Gradientenprogramm der HPLC Analyse.....	26
Tabelle 4-1 Expressionsparameter der Versuchsreihe MLS-4.....	27
Tabelle 4-2 Expressionsparameter der Versuchsreihe MLS-5.....	27
Tabelle 4-3 Enzymausbeuten der drei Expressionen MLS-17, -18 und -19.....	35
Tabelle 4-4 Kalibration Naringenin.....	36
Tabelle 4-5 Kalibration Phloretin.....	36
Tabelle 4-6 Spektrale Absorptionskoeffizienten $\epsilon$ (290 nm) von Naringenin und Phloretin für die verwendete HPLC-Methode .....	36
Tabelle 4-7 Errechnete kinetische Parameter der CHS in den Reaktionen zu Naringenin und Phloretin .....	41
Tabelle 4-8 Publierte kinetische Parameter der MdCHS3 in den Reaktionen zu Naringenin und Phloretin (Yahyaa et al., 2017). Rot markierte Standardabweichungen wurden neu berechnet, da sie in der Publikation nicht angegeben waren. ....	42
Tabelle 4-9 Publierte Umsatzraten von MdCHS1, MdCHS2 und MdCHS3 mit p-Dihydrocoumaroyl-CoA, p-Coumaroyl-CoA und Zimtsäure-CoA-Ester (jeweils 15 $\mu$ M) in Anwesenheit von 56 $\mu$ M malonyl-CoA (Yahyaa et al., 2017). Die Aktivität von p-Dihydrocoumaroyl-CoA wurde laut Autoren auf 100 % gesetzt. ....	43



## Literaturverzeichnis

- Austin, M.B., Noel, J.P., 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20, 79–110. <https://doi.org/10.1039/b100917f>
- Bomati, E.K., Austin, M.B., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P., 2005. Structural Elucidation of Chalcone Reductase and Implications for Deoxychalcone Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 280, 30496–30503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502239200>
- Booth, A.N., Jones, F.T., DeEds, F., Robbins, D.J., Kupferer, B., 1958. Metabolic and Glucosuria Studies on Naringin and Phloridzin. *Journal of Biological Chemistry* 233, 280–282. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64749-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64749-0)
- Camman, K., 2001. *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., Henco, K., 1994. 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification, in: *Protocols for Gene Analysis*. Humana Press, New Jersey, pp. 371–388. <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371>
- Dare, A.P., Tomes, S., Jones, M., McGhie, T.K., Stevenson, D.E., Johnson, R.A., Greenwood, D.R., Hellens, R.P., 2013. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus × domestica*). *The Plant Journal* 74, 398–410. <https://doi.org/10.1111/tpj.12140>
- Dare, A.P., Yauk, Y.-K., Tomes, S., McGhie, T.K., Rebstock, R.S., Cooney, J.M., Atkinson, R.G., 2017. Silencing a phloretin-specific glycosyltransferase perturbs both general phenylpropanoid biosynthesis and plant development. *The Plant Journal* 91, 237–250. <https://doi.org/10.1111/tpj.13559>
- Eichenberger, M., Lehka, B.J., Folly, C., Fischer, D., Martens, S., Simón, E., Naesby, M., 2017. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. *Metabolic Engineering* 39, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.019>
- Gosch, C., Halbwirth, H., Kuhn, J., Miosic, S., Stich, K., 2009. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Science* 176, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.10.011>
- Gosch, C., Halbwirth, H., Stich, K., 2010. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 838–843. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.003>
- Hassan, S., Mathesius, U., 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interaction. *Journal of experimental botany* 63, 3429–44. <https://doi.org/10.1093/jxb/err430>
- Hrazdina, G., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., Grisebach, H., 1976. Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175, 392–399. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90526-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90526-9)

- Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P., 2000. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Mol Biol* 7, 786–791. <https://doi.org/10.1038/79025>
- Kuhn, B.M., Errafi, S., Bucher, R., Dobrev, P., Geisler, M., Bigler, L., Zažímalová, E., Ringli, C., 2016. 7-Rhamnosylated Flavonols Modulate Homeostasis of the Plant Hormone Auxin and Affect Plant Development \*. *Journal of Biological Chemistry* 291, 5385–5395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701565>
- Miksicek, R., 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Molecular pharmacology* 44, 37–43.
- Najafian, M., Jahromi, M.Z., Nowroznejhad, M.J., Khajeaian, P., Kargar, M.M., Sadeghi, M., Arasteh, A., 2012. Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Biol Rep* 39, 5299–5306. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1328-7>
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A.J., Tohge, T., Yamazaki, M., Saito, K., 2014. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal* 77, 367–379. <https://doi.org/10.1111/tpj.12388>
- Nakayama, T., Sato, T., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Hayashi, H., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., 2001. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Letters* 499, 107–111. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02529-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02529-7)
- Nelson, D., Cox, M., 2009. *Lehninger Biochemie*, 4. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pacifici, R., 1998. Editorial: Cytokines, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis—The Second Decade. *Endocrinology* 139, 2659–2661. <https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6087>
- Patisaul, H.B., Jefferson, W., 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology, Neuroendocrine Disruptors* 31, 400–419. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.003>
- Puel, C., Quintin, A., Mathey, J., Obled, C., Davicco, M.J., Lebecque, P., Kati-Coulibaly, S., Horcajada, M.N., Coxam, V., 2005. Prevention of Bone Loss by Phloridzin, an Apple Polyphenol, in Ovariectomized Rats under Inflammation Conditions. *Calcif Tissue Int* 77, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s00223-005-0060-5>
- Ralston, S.H., 1994. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: Evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 883–890. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090614>
- Shapiro, B., 1947. The mechanism of phloridzin glucosuria. *Biochemical Journal* 41, 151–154. <https://doi.org/10.1042/bj0410151>
- Sisa, M., Bonnet, S.L., Ferreira, D., Van der Westhuizen, J.H., 2010. Photochemistry of Flavonoids. *Molecules* 15, 5196–5245. <https://doi.org/10.3390/molecules15085196>

- Taylor, L.P., Grotewold, E., 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology, Physiology and metabolism* 8, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.005>
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., Schröder, J., 1995. Reaction Mechanisms of Homodimeric Plant Polyketide Synthases (Stilbene and Chalcone Synthase) A SINGLE ACTIVE SITE FOR THE CONDENSING REACTION IS SUFFICIENT FOR SYNTHESIS OF STILBENES, CHALCONES, AND 6'-DEOXYCHALCONES. *J. Biol. Chem.* 270, 7922–7928. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7922>
- Wang, D., Hildenbrand, K., Leitich, J., Schuchmann, H.-P., Sonntag, C. von, 1993. pH-Dependent Tautomerism and pKa Values of Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzene), Studied by <sup>13</sup>C NMR and UV Spectroscopy. *Zeitschrift für Naturforschung B* 48, 478–482. <https://doi.org/10.1515/znb-1993-0413>
- Webb, B., Sali, A., 2016. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* 54, 5.6.1-5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
- Yahyaa, M., Ali, S., Davidovich-Rikanati, R., Ibdah, Muhammad, Shachtier, A., Eyal, Y., Lewinsohn, E., Ibdah, Mwafaq, 2017. Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Phytochemistry* 140, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.022>