



Nicola Schneegans (Autor)

# **Mutationsanalysen und funktionelle Untersuchungen zur Rolle spezifizierender Proteine bei der Bildung von Allylthiocyanat, 3,4-Epithiobutannitril und But-3-ennitril nach Myrosinase-katalysierter Hydrolyse von Allylglucosinolat**



Institut für Pharmazeutische Biologie  
pharmazie in braunschweig



**Mutationsanalysen und funktionelle Untersuchungen zur Rolle spezifizierender Proteine bei der Bildung von Allylthiocyanat, 3,4-Epithiobutannitril und But-3-ennitril nach Myrosinase-katalysierter Hydrolyse von Allylglucosinolat**

Nicola Schneegans



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8308>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Brassicales .....	1
1.2 Spezifizierende Proteine.....	5
1.2.1 Produkte spezifizierender Proteine.....	5
1.2.2 Klassifizierung spezifizierender Proteine.....	7
1.2.3 Aktivität und Spezifität spezifizierender Proteine aus Pflanzen .....	9
1.2.4 Struktur spezifizierender Proteine aus Pflanzen .....	12
1.2.4.1 Entwicklung von molekularen Modellen spezifizierender Proteine.....	12
1.2.4.2 Kristallstruktur von TFP aus <i>Thlaspi arvense</i> (TaTFP) .....	13
1.2.4.3 Kristallstruktur von ESP aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtESP) .....	15
1.2.4.4 Strukturen von NSPs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtNSP1-AtNSP5).....	17
1.2.5 Hypothesen zu Mechanismen spezifizierender Proteine .....	20
1.3 Zielsetzung.....	22
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1 Qualität und Herkunft von Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmitteln.....	23
2.2 Bakterienstämme .....	24
2.2.1 <i>E. coli</i> XL1Blue.....	24
2.2.2 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS .....	24
2.3 Plasmide .....	25
2.4 Medien .....	27
2.5 Primer.....	29
2.6 Molekularbiologische Methoden .....	31
2.6.1 Mutagenese.....	31
2.6.1.1 Zielgerichtete Mutagenese.....	31
2.6.1.2 Deletionen .....	31
2.6.2 Klonierung von Produkten der <i>site-directed mutagenesis</i> -PCR.....	33
2.6.3 USER-Reaktion .....	34
2.6.4 Ligation .....	35
2.6.5 Agarosegelelektrophorese .....	35
2.6.6 Transformation.....	36
2.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA .....	36
2.6.8 Gehaltsbestimmung von DNA .....	37
2.6.9 Sequenzierung .....	37
2.7 Biochemische Methoden .....	38
2.7.1 Heterologe Expression .....	38

## Inhaltsverzeichnis

---

2.7.2	Proteinreinigung .....	39
2.7.3	SDS-PAGE .....	39
2.7.4	Proteinbestimmung .....	40
2.7.5	Bestimmung der Aktivität von rekombinanten spezifizierenden Proteinen .....	41
2.8	Analytische Methoden .....	43
2.8.1	GC-FID .....	43
2.8.2	GC-MS .....	43
2.9	Molekulare Modellierung .....	45
2.9.1	Proteinmodellierung .....	45
2.9.2	Proteindarstellung .....	45
2.10	Statistik .....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1	Charakterisierung von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	47
3.1.1	Untersuchung der Produktbildung von TaTFP .....	47
3.1.2	Untersuchung der Produktbildung von AtESP .....	49
3.1.3	Untersuchung der Produktbildung von AtNSP3 .....	51
3.1.4	Prüfung von Isothiocyanat als potentielles Substrat von TaTFP .....	52
3.1.5	Untersuchung der Stereospezifität der Epithionitrilbildung durch TaTFP .....	54
3.1.6	Einfluss von Eisen(II)/(III) auf die Aktivität von TaTFP .....	55
3.1.7	Einfluss von Eisenchelatoren auf die Aktivität von TaTFP und AtNSP3 .....	56
3.2	Auswahl von Positionen zur Mutation im TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	57
3.3	Einfluss von Deletionen der 4L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP .....	61
3.4	Einfluss des Aminosäuretripletts L151 N152 A153 der 3L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP .....	63
3.4.1	Analyse der Dreifachmutanten TaTFP LNA x TMN und TaTFP LNA x VQS .....	63
3.4.2	Einfluss von Einzelmutationen an den Positionen L151, N152 und A153 auf die Aktivität von TaTFP .....	66
3.5	Einfluss von Substitutionen einzelner Aminosäuren auf die Aktivität von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	70
3.5.1	Einfluss von Mutationen der 1L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	70
3.5.2	Einfluss der Mutation L98R in der 2L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP .....	75
3.5.3	Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in der 3L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	77
3.5.4	Einfluss von Aminosäuresubstitutionen der 4L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP .....	81
3.5.5	Einfluss von Aminosäuresubstitutionen der 5L2-Schleife auf die Aktivität von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	86
3.5.6	Untersuchung einer TaTFP-Doppelmutante mit Mutationen in der 3L2 und 5L2-Schleife ..	90
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
4.1	Oxidationszustand des Cofaktors Eisen im aktiven Zentrum spezifizierender Proteine .....	92
4.2	Mechanismen der Produktbildung in spezifizierenden Proteinen .....	94
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>CVIII</b>

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>CXIX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>CXXII</b>
<b>ANHANG</b> .....	<b>CXXIII</b>
A.1 Aminosäuresequenz-Alignments.....	CXXIII
A.1.1 Aminosäuresequenz-Alignment von TaTFP, AtESP und AtNSP3 .....	CXXIII
A.1.2 Aminosäuresequenz-Alignment von TaTFP und LsTFP .....	CXXIV
A.1.3 Aminosäuresequenz-Alignment von TaTFP und AtESP .....	CXXV
A.1.4 Aminosäuresequenz-Alignment von 19 spezifizierenden Proteinen .....	CXXVI
A.2 Übersicht der Produktprofile von TaTFP-Mutanten [10 µg] .....	CXXX
A.3 Übersicht der Produktprofile von TaTFP-Mutanten [30 µg] .....	CXXXI
A.4 Übersicht der Produktprofile von AtESP-Mutanten [2/10 µg] .....	CXXXII
A.5 Übersicht der Produktprofile von AtNSP3-Mutanten [1/10 µg] .....	CXXXIII
A.6 Hydrolyseprodukt-Bildung [nmol] bei Untersuchungen zur Reaktion von TaTFP mit Allylthiocyanat .....	CXXXIV
A.7 Signifikanzunterschiede bei der Gesamtmenge gebildeter Hydrolyseprodukte zwischen Wildtyp AtESP und Mutanten .....	CXXXV
A.8 SDS-PAGE-Analyse von TaTFP und Mutanten mit Substitutionen an den Positionen L151, N152 und A153 der 3L2-Schleife .....	CXXXVI
Abbildungsverzeichnis Anhang.....	CXXXVII