

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
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
2 MATERIAL UND METHODEN	23
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 Agarosegelektrophorese	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

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
3	ERGEBNISSE	47
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
4	DISKUSSION	92
4.1	Oxidationszustand des Cofaktors Eisen im aktiven Zentrum spezifizierender Proteine	92
4.2	Mechanismen der Produktbildung in spezifizierenden Proteinen	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	CVIII

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	CXIX
TABELLENVERZEICHNIS.....	CXXII
ANHANG.....	CXXIII
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 Allylisothiocyanat	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