

**Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen
in *Linum album* –
Biochemie und Molekularbiologie
der „späten“-Schritte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katja Federolf
aus Kehl
(Baden-Württemberg)

Düsseldorf, 2007

Aus dem Institut für Botanik IV,
Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Abteilung -
pflanzliche Zellkulturen, der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent. Prof. Dr. A. W. Alfermann

Koreferent: Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2007

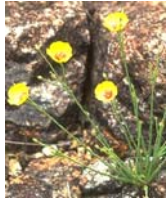


Abb.: Vielfalt der Linaceae.

Linum flavum, *L. bienne*, *L. hirsutum*, *L. suffruticosum*,
L. capitatum, *L. hudsonioides*, *L. grandiflorum*, *L. usitatissimum*,
L. collinum, *L. viscosum*, *L. alpinum*, *L. album* (großes Bild Mitte), *L. tenuifolium*, *L. rigidum*,
L. hirsutum, *L. campanulatum*, *L. austriacum*, *L. usitatissimum*, *L. campanulatum*,
L. lewisii, *L. narbonense*, *L. trigynum*, *L. grandiflorum*, *L. arboreum*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Forschungsobjekt: <i>Linum album</i> Kotschy	1
1.1.1.	Systematische Einordnung des weißen Leins	2
1.1.2.	Beschreibung und Vorkommen	2
1.2.	Zellkulturen	3
1.3.	Lignane	4
1.3.1.	Pharmakologische Eigenschaften von Lignanen	6
1.3.2.	Podophyllotoxin (und 6-Methoxypodophyllotoxin)	7
1.4.	Biosynthese der Aryltetralin-Lignane	8
1.4.1.	Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel	8
1.4.2.	Aryltetralin-Lignan Biosynthese	8
1.5.	Typische Enzymklassen in der Sekundärmetabolit-Synthese	12
1.5.1.	Hydroxylasen	12
1.5.1.1.	Cytochrom P450 Monooxygenasen	12
1.5.1.2.	Dioxygenasen / Peroxidasen	15
1.5.2.	O-Methyltransferasen	17
1.5.3.	Glycosyltransferasen	18
1.6.	Ziele dieser Arbeit	19

2. Material

2.1.	Chemikalien	21
2.1.1.	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2.	Hemmstoffe	22
2.1.3.	Substrate / Co-Substrate für DC und HPLC	22
2.2.	Material für die Dünnschichtchromatographie	23
2.3.	Material für die Säulenchromatographie	23
2.4.	Material für die HPLC	23
2.5.	Pflanzenmaterial	24
2.6.	Medien	24
2.7.	Bakterienstämme	25
2.8.	Plasmide	25
2.9.	Enzyme für die Molekularbiologie	25
2.10.	Oligonukleotide	26
2.11.	Kits für die Molekularbiologie	26

3. Methoden

3.1.	Anzucht der Zellsuspensionskulturen	27
3.2.	Gewinnung der Vorstufe Deoxypodophyllotoxin	27
3.2.1.	DOP-Extraktion aus <i>Anthriscus sylvestris</i>	27
3.2.2.	DOP-Synthese aus PTOX	27
3.3.	Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen	28
3.3.1.	Bestimmung der Mediumsparameter	28
3.3.2.	Bestimmung der Wachstumsparameter	28
3.3.3.	Enzymaufarbeitungen	28
3.3.3.1.	Enzymaufarbeitungen für lösliche Proteine	28
3.3.3.2.	Enzymaufarbeitungen für mikrosomale Proteine	29
3.3.4.	Enzymteste	29
3.3.4.1.	Enzymteste für lösliche Proteine	29
3.3.4.2.	Enzymteste für mikrosomale Proteine	30
3.3.5.	Bestimmung der Lignangehalte	31

3.4.	Biochemische Charakterisierung der DOP6H	31
3.4.1.	Bestimmung allgemeiner Parameter	31
3.4.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für DOP und NADPH	32
3.4.3.	Bestimmung der Inhibition der DOP6H	33
3.5.	Biochemische Charakterisierung der β P6OMT	33
3.5.1.	Bestimmung allgemeiner Parameter	33
3.5.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für β -Peltatin und SAM	34
3.5.3.	Bestimmung der Inhibition der β P6OMT	34
3.6.	Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen	35
3.6.1.	Biotransformation in Zellkulturen von <i>L. album</i> und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen	35
3.6.1.1.	Vorversuch zur Lösungsmittelverträglichkeit	35
3.6.1.2.	Biotransformation von PTOX und DOP	35
3.6.1.3.	Biotransformation von DOP und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen	35
3.6.1.4.	Behandlung der Zellen mit hohen Hemmstoffkonzentrationen	36
3.6.1.5.	Vitalitätstest nach Towill und Mazur	36
3.6.2.	Enzymatische Suche nach unbekanntem Hydroxylierungsreaktionen	37
3.6.2.1.	Enzymaufarbeitungsvarianten	37
3.6.2.2.	Puffervarianten	38
3.6.2.3.	Enzymtestvarianten	38
3.6.2.4.	Elicitierung der Zellkultur	39
3.6.2.5.	Konzentrierung der Proteinlösung durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40
3.6.2.6.	UDP-Glucosyltransferase	40
3.6.3.	Proteinanalytik	41
3.6.3.1.	Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	41
3.6.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	41
3.6.3.3.	Vergleichende Mikrosomenanalyse der Zelllinien 6M und PT	42
3.6.3.4.	2D-Gelelektrophorese	42
3.7.	Molekularbiologische Methoden	44
3.7.1.	Isolierung von Gesamt-RNA	44
3.7.2.	Ermittlung der Nukleinsäure Konzentration	45
3.7.3.	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	45
3.7.4.	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.7.5.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
3.7.6.	Klonierung von PCR-Fragmenten	47
3.7.7.	Restriktionshydrolyse	47
3.7.8.	Plasmidpräparation	47
3.7.9.	Kultivierungs-/Stammhaltungsbedingungen der Bakterien	48
3.7.10.	Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)	48
3.7.10.1.	Isolierung von Gesamt-RNA	48
3.7.10.2.	cDNA Synthese	48
3.7.10.3.	Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	49
3.7.11.	Macroarray - Experimente	51
3.7.12.	Sequenzanalyse	52
3.8.	HPLC - Analytik	53
3.9.	LC/MS - Analytik	53

4. Ergebnisse

4.1.	Gewinnung von Deoxydopodophyllotoxin	55
4.2.	Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen	57
4.2.1.	Mediumsparameter	57
4.2.2.	Wachstumsparameter	58
4.2.3.	Enzymatische Aktivitäten über den Kulturverlauf	59
4.2.3.1.	Enzyme des „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels“	59
4.2.3.2.	Enzyme der „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese	61
4.2.4.	Lignangehalte	62

4.3.	Biochemische Charakterisierung der DOP6H	65
4.3.1.	Bestimmung allgemeiner Parameter	65
4.3.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für DOP und NADPH	66
4.3.3.	Bestimmung der Inhibition der DOP6H	68
4.4.	Charakterisierung der β -Peltatin 6-O-Methyltransferase	72
4.4.1.	Bestimmung allgemeiner Parameter	72
4.4.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für β -Peltatin und SAM	74
4.4.3.	Bestimmung der Inhibition der β P6OMT	75
4.5.	Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen	76
4.5.1.	Biotransformation in Zellkulturen von <i>L. album</i> und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen	76
4.5.1.1.	Vorversuch zur Lösungsmittelverträglichkeit	76
4.5.1.2.	Biotransformation von DOP und PTOX	78
4.5.1.3.	Biotransformation von DOP und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen	81
4.5.1.4.	Behandlung der Zellen mit hohen Hemmstoffkonzentrationen	83
4.5.2.	Enzymatische Suche	86
4.5.2.1.	DOP7H eine Cytochrom P450 Monooxygenase?	86
4.5.2.2.	DOP7H eine Dioxygenase?	88
4.5.2.3.	DOP7H eine Peroxidase?	92
4.5.2.4.	PAM7H - Cytochrom P450 Monooxygenase oder Dioxygenase?	92
4.5.2.5.	Versuche zur Auffindung weiterer Hydroxylierungen	92
4.5.2.6.	Glucosidase- bzw. Glucosyltransferaseaktivität	93
4.5.3.	Proteinanalytik	94
4.5.3.1.	Vergleichende Proteomanalyse der Zelllinien 6M und PT	94
4.5.3.2.	Vergleichende Mikrosomenanalyse der Zelllinien 6M und PT	96
4.5.3.3.	2D-gelelektrophoretische Auftrennung von mikrosomalen Proteinen	102
4.5.4.	Molekularbiologie	103
4.5.4.1.	Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)	103
4.5.4.2.	Aktin	103
4.5.4.3.	Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)	104
4.5.4.4.	Macroarray Experimente	105
5.	Diskussion	
5.1.	Gewinnung von Deoxypodophyllotoxin	113
5.2.	Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen	113
5.2.1.	Wachstums- und Mediumsparameter	113
5.2.2.	Enzymatische Aktivitäten über den Kulturverlauf	115
5.2.3.	Lignangehalte	117
5.3.	Biochemische Charakterisierung der DOP6H	120
5.4.	Biochemische Charakterisierung der β P6OMT	122
5.5.	Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen	123
5.5.1.	Phytochemische Suche	123
5.5.2.	Enzymatische Suche	127
5.6.	Proteinanalytik	132
5.7.	Molekularbiologie	134
6.	Ausblick	141
7.	Zusammenfassung	143

8.	Literaturverzeichnis	145
9.	Veröffentlichungen	156
10.	Anhang	
10.1.	HPLC-Standards	VII
10.2.	Berechnung und Auswertung der Enzymaktivitäten	VII
10.2.1.	Berechnung der Enzymaktivitäten nach HPLC-Auswertung	VII
10.2.2.	Berechnung der Enzymaktivitäten nach photometrischen Testen	VII
10.2.3.	Graphische Auswertung nach SigmaPlot2001	VIII
10.3.	DOP-Synthese	VIII
10.4.	LC/MS-Analyse der DOP6H Produkte	XI
10.5.	Bestimmung der Inhibition der DOP6H	XV
10.6.	LC/MS-Analyse der β P6OMT Produkte	XVI
10.7.	LC/MS-Analyse der DOP7H Produkte	XIX
10.8.	LC/MS-Analyse der UDP-Glucosyltransferase Produkte	XXIII
10.9.	LC/MS-Analyse der 6MPTOX- und PTOX-Glucoside	XXV
10.10.	cDNA Teilsequenz von Aktin aus <i>L. album</i> Linie 6M	XXVII
10.11.	cDNA Teilsequenz einer putativen 4-CL aus <i>L. album</i> Linie 6M	XXVII
10.12.	cDNA Teilsequenz einer putativen β -Amyrin Synthase aus <i>L. album</i> Linie PT	XXVII
10.	Schlussworte	XXIX

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume (Volumen/Volumen)
(w/v)	weight per volume (Gewicht/Volumen)
4CL	Hydroxyzimtsäure CoA-Ligase
6MPTOX	6-Methoxypodophyllotoxin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLAST	Basic Local Alignment Tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C3H	Zimtsäure 3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAD	Coniferylalkohol Dehydrogenase
CCoAOMT	Kaffeoyl-CoA O-Methyltransferase
CCR	Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
COMT	Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DOP	Deoxypodophyllotoxin
DOP6H	Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase
DOP7H	Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase
dscDNA	double stranded cDNA (doppelsträngige cDNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	elution buffer (Elutionspuffer)
EC-Nr.	Enzymklassen-Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titrplex III)
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (Titrplex VI)
ER-Membran	Membran des endoplasmatischen Retikulums
F5H	Ferulat 5-Hydroxylase
FG	Frischgewicht
FGs	Frischgewichte
g	Gramm
G ₂ -Phase	zweite Ruhephase (Gap 2-Phase)
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KPi-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
<i>L. album</i>	<i>Linum album</i>
<i>L. flavum</i>	<i>Linum flavum</i>
<i>L. nodiflorum</i>	<i>Linum nodiflorum</i>
LB-Medium	lysogeny broth medium, Medium nach Bertani (1951)
m/z	Masse/Ladung
mAU	milli Absorptionseinheit
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Medium nach Murashige und Skoog, 1962
Mw	molecular weight (Molekulargewicht)

NAA	Naphtylessigsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMT	O-Methyltransferase
<i>P. hexandrum</i>	<i>Podophyllum hexandrum</i>
<i>P. peltatum</i>	<i>Podophyllum peltatum</i>
p.A.	pro analysi (zur Analyse)
PAL	Phenylalanin Ammonium-Lyase
PAM	β-Peltatin-A-Methylether
PAM7H	β-Peltatin-A-Methylether 7-Hydroxylase
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PLR	Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Primer F	forward Primer
Primer R	reverse Primer
PS	Pinoresinol Synthase
PTOX	Podophyllotoxin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Retentionszeit
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDH	Secoisolariciresinol Dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
S-Phase	Synthese Phase
sscDNA	single stranded cDNA (Einzelstrang cDNA)
SSH	suppression subtractive hybridization (Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung)
SSPE	sodium chloride dihydrogen phosphate with EDTA
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat EDTA Puffer
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TENS-Plasmidpräparation	Tris-EDTA-NaOH-SDS Plasmidpräparation nach Zhou et al. (1990)
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TG	Trockengewicht
TGs	Trockengewichte
T _m	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	Octophenolpoly(ethylenglycolether) _n
UDP-Glucose	Uridin-diphosphat Glucose
Upm	Umdrehungen pro Minute
V _{max}	maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion
x-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
α- ³² P-dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat, radioaktiv markiert am Phosphor
βP6OMT	β-Peltatin 6-O-Methyltransferase

Anmerkung:

Für einige Bezeichnungen wurden die gebräuchlichen englischen Benennungen verwendet (z.B. anstelle **Desoxy**-podophyllotoxin - **Deoxy**podophyllotoxin). Bei der Bezeichnung der PAL wurde die Benennung Phenylalanin Ammonium-Lyase nach Weissenböck (1972) anstelle der wörtlichen Übersetzung Phenylalanin Ammoniak-Lyase gewählt. Der Begriff ‚accession no.‘ bei der Angabe von DNA- oder Proteinsequenzen wurde nicht übersetzt, sondern als solcher beibehalten.

1. Einleitung

Pflanzen produzieren eine Vielfalt an chemischen Stoffen, die einer Pflanzenart das Überleben in ihrer Umwelt sichern können. Diese sog. Sekundärstoffe dienen der Pflanze für zahlreiche Aufgaben und sind im Zuge der Evolution unter dem Selektionsdruck der Natur entstanden. Sekundärmetabolite stellen, neben dem Nutzen für die Pflanze, ein großes Reservoir von „Wirkstoffen“ aller Art dar, die von Tieren und Menschen genutzt werden können (Hartmann und Ober, 2003). Da die Biosyntheseleistung für die Gewinnung pharmazeutisch wichtiger Wirkstoffe mitunter vergleichsweise gering ist, versucht man durch gezielte Eingriffe oder künstliche Nachbildung des Syntheseweges, diese zu verbessern. Dies ist jedoch nur möglich, wenn man die komplexen Zusammenhänge in der Biosynthese eines jeden Stoffes kennt. Die folgende Arbeit liefert einen Beitrag zur Aufklärung der Synthese von Aryltetralin-Lignanen aus *Linum album*.

1.1. Forschungsobjekt: *Linum album* Kotschy



Abb. 1.1.: *Linum album* Kotschy
blühende Pflanzen und Pflanzen mit
noch geschlossenen Blüten;
[Fotos: aufgenommen von S. Hemmati
2001 (rechts) und Dr. A. Mohagegzadeh
1999 (oben)]

1.1.1. Systematische Einordnung des weißen Leins

Der weiße Lein wird taxonomisch wie folgt eingeordnet (Tab. 1.1.):

Tab. 1.1: Systematische Einordnung des weißen Leins
(nach Strasburger, 2002)

Reich (Regnum)	Eukarya
Unterreich	Chlorobionta
Abteilung	Streptophyta
Unterabteilung	Spermatophyta
Klasse	Magnoliopsida
Unterklasse	Rosidae (Rosiden)
Ordnung	Linales
Familie	Linaceae
[Sektion]	[Syllinum]
Genus	<i>Linum</i>
Spezies	<i>Linum album</i> (weißer Lein)

Die Familie der Linaceae zählt ca. 200 Vertreter der Gattung *Linum*. Engler (1931) unterteilte nach taxonomischen Gesichtspunkten in die Sektionen – *Eulinum*, *Linastrum*, *Cathartolinum*, *Syllinum* und *Cliococca*, während Davis (1970), Ockendon und Walters (1968) morphologisch – phytochemisch in die Sektionen *Linum*, *Syllinum*, *Dasyllinum*, *Linastrum* und *Cathartolinum* unterteilten. Unter Berücksichtigung molekulargenetischer Daten, gewonnen durch ITS-Analysen (Internal Transcribed Spacer sequence analysis) wird derzeit eine neue Phylogenie erarbeitet (Prof. Dr. J. Kadereit und M. Replinger, persönliche Mitteilung). Der Sektion *Syllinum*, die sich neben taxonomischen und morphologischen Gesichtspunkten besonders phytochemisch von den anderen Sektionen unterscheidet, wurden bisher 13 Vertreter zugeordnet. Vor allem die Produktion und Akkumulation von Lignanen des Podophyllotoxin-Typs sind für diese Gruppe kennzeichnend und stehen für diese Arbeit im Fokus (Petersen und Alfermann, 2001).

1.1.2. Beschreibung und Vorkommen

Linaceae sind weltweit vertreten. Einige Leinarten bevorzugen gemäßigte und subtropische Regionen, während der weiße Lein fast ausschließlich im Iran und einigen benachbarten Regionen zu finden ist (Abb. 1.2.).

Abb. 1.2.: Verbreitungskarte/Fundorte von *Linum album* Kotschy im Iran

Grüne Umrandung markiert das Verbreitungsgebiet des weißen Leins (die roten Sterne markieren das endemische Vorkommen einer weiteren Leinart – *Linum persicum*; Karte zur Verfügung gestellt von S. Hemmati, 2003)



Linum album ist eine mehrjährige, krautige Pflanze, mit 20 - 50 cm hohen aufrechten Stängeln (Abb. 1.1.), alternierend angeordneten, einnervigen, spitz zulaufend-lanzettlichen Blättern mit glattem knorpeligem Rand. Die oberen Blätter sind zumeist größer als die unteren (11 - 20 mm lang, 2 - 4 mm breit). Manchmal können drüsenartige Nebenblätter auftreten. Die Blütenstände sind dichasial verzweigt und tragen blattwinkelständig 5 - 8 gestielte, heterostyle Blüten, mit weißen Petalen (25 - 35 mm lang), umgeben von einnervigen, lineal-lanzettlichen Sepalen mit bewimperten Rändern (10 - 12 mm lang, 1,5 - 2,5 mm breit). Die sphärischen Kapseln enthalten je einen Samen pro Fach (Sharifnia und Assadi, 2001).

1.2. Zellkulturen

Viele Pflanzen, wie auch der weiße Lein, kommen nur endemisch vor. Als Alternative für die Untersuchung von Stoffwechselwegen können Zellkulturen verwendet werden. Unabhängig von politischen, ökonomischen, klimatischen und geographischen Gegebenheiten, jahreszeitlich bedingten Schwankungen und Verlusten von Zellmaterial an Herbivore oder Pathogene, kann in kurzer Zeit sehr viel genetisch einheitliche Zellmasse produziert werden. Neben der kurzen Generationszeit sind die Kulturen kontaminationsfrei und werden unter definierten Bedingungen gehalten. Einzelne Zellaggregate stellen zumeist ein einfacheres Untersuchungssystem dar. Im Vergleich zu ganzen Pflanzen weisen sie keine verholzten Zellwände auf und enthalten z.T. (wenn sie wie *L. album* Zellkulturen im Dunkeln kultiviert werden) kein Chlorophyll.

Die Gewinnung von Zellkulturen kann aus Samen erfolgen, die auf Festmedium unter sterilen Bedingungen zur Keimung gebracht werden. Beigebrachte Verletzungen am Keimling führen zu Kallusbildung, einem undifferenzierten Gewebe zum schnellen Wundverschluss. Dieses Wundgewebe kann auf Festmedium mit bestimmter Hormonkonzentration (meist Auxine und Cytokinine) über mehrere Jahre kultiviert werden und kann als Ausgangskultur für die meist feiner wachsenden Zellsuspensionskulturen dienen (Empt et al., 2000; Seidel et al., 2002; Smollny et al., 1998). Zellen in Suspension müssen allerdings zur Sicherung der Sauerstoffzufuhr permanent geschüttelt werden (Alfermann und Petersen, 1993; Hulst et al., 1989; Schuler, 1981).

Ein bedeutender Nachteil bei der Arbeit mit Zellsuspensionskulturen ist ihre eventuelle genetische Instabilität im Vergleich zu Kalluskulturen, besonders in Bezug auf die Sekundärmetabolitproduktion (Alfermann und Petersen, 1993; Deus-Neumann und Zenk, 1984). Diese Veränderungen sind vermutlich in der Reorganisation des genetischen Materials begründet. Neben Veränderungen der Chromosomenzahl wurden DNA-Methylierungen, Genom-Umlagerungen und die Entstehung von Punktmutationen beobachtet (Bayliss, 1973; Phillips et al., 1994; Sunderland, 1977). Es ist daher notwendig, Zellkulturen in regelmäßigen Abständen auf ihren Inhaltstoffgehalt und die Aktivität, der an dem Stoffwechselweg involvierten Enzyme, zu überprüfen (Charakterisierung der Kultur).

Bei der Arbeit an pflanzlichen Sekundärstoffwechselwegen ist ebenfalls zu bedenken, dass die Synthese der Metabolite manchmal nicht in undifferenzierten Zellen und ihren Kompartimenten möglich ist, sondern bestimmte Reaktionen z.T. nur in bestimmten Pflanzenorganen ablaufen. So können z.B. die meisten Gewebe von *Catharanthus roseus* Indol-Alkaloide synthetisieren, jedes Organ scheint aber ein charakteristisches Spektrum zu akkumulieren. So finden die letzten drei Schritte der Vindolin-Synthese überwiegend in den oberirdischen Pflanzenorganen statt (DeLuca and Cutler, 1987; St-Pierre et al., 1999).

Neben der Aufklärung eines Biosyntheseweges versucht man gleichzeitig auf eine hohe Produktion an Sekundärstoffen zu selektieren, wie z.B. auf Aryltetralin-Lignane. Das Fernziel ist es, diese Wirkstoffe fermentativ herzustellen. Im Hinblick auf Übersammlung bzw. Erschöpfung der natürlichen Ressourcen könnte dies für einige Pflanzen notwendig werden (*Podophyllum hexandrum*, siehe Abschnitt 1.3.2.). Die großtechnische Herstellung einiger Naturstoffe ist bereits gelungen, wie z.B. die Produktion von Shikonin aus *Lithospermum erythrorhizon* (Vertrieb durch Mitsui Petrochemical), von Ginsenosiden aus *Panax ginseng* (Vertrieb durch Nitto Denko Corp.) und Taxol (Paclitaxel[®]) aus *Taxus spec.* (Vertrieb durch Phyton Biotech) (Alfermann und Petersen, 1993; Eibl, 2002; Fujita et al., 1982; Ushiyama, 1991). Außer Suspensionskulturen werden neuerdings auch „hairy root“- und Embryokulturen für Fermentationsprozesse genutzt. Außerdem versucht man durch Immobilisierungstechniken oder Zugabe von Elicitoren die Produktbildung zu steigern (Eibl, 2002).

1.3. Lignane

Pflanzen unterhalten z.T. einen sehr energieaufwendigen Sekundärstoffwechsel. „Sekundär“ stellt dabei keine Wertung dar, sondern ist eine Sammelbezeichnung für Stoffe, die nicht jedem Zellplasma eigen, sondern die für bestimmten Arten, Gattungen oder Familien charakteristisch sind. Die Grenzen zwischen „Primär-“ und „Sekundär-“ Stoffwechsel sind fließend und die Funktionen dieser Stoffe vielfältig (Nultsch, 2001; Abb. 1.5.).

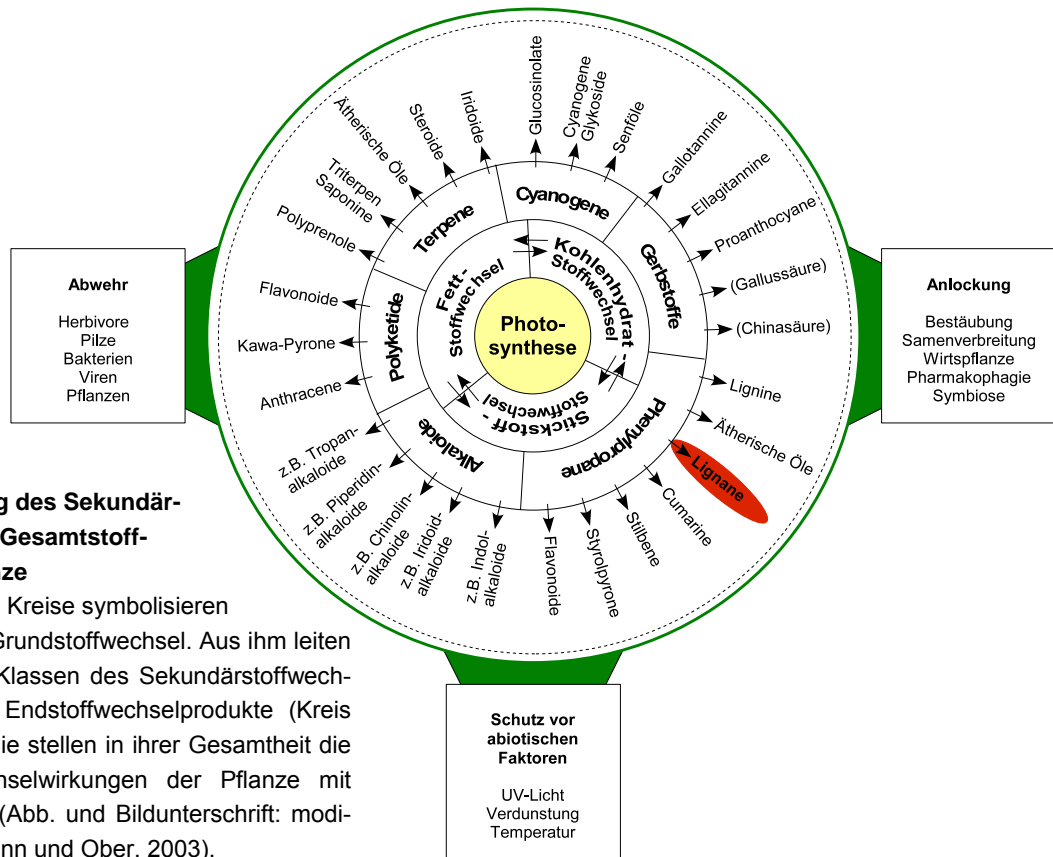


Abb. 1.3.: Stellung des Sekundärstoffwechsels im Gesamtstoffwechsel der Pflanze

Die beiden inneren Kreise symbolisieren den Primär- oder Grundstoffwechsel. Aus ihm leiten sich die diversen Klassen des Sekundärstoffwechsels, bzw. deren Endstoffwechselprodukte (Kreis ganz außen) ab. Sie stellen in ihrer Gesamtheit die chemischen Wechselwirkungen der Pflanze mit ihrer Umwelt dar. (Abb. und Bildunterschrift: modifiziert nach Hartmann und Ober, 2003).

Lignane sind Abkömmlinge des Phenylpropanstoffwechsels (1.4., Abb. 1.4. und 1.5.). Das Grundgerüst besteht aus Zimtsäurederivat-Dimeren, die über ihre 8 - 8' Atome stereospezifisch miteinander verknüpft sind. Erfolgt die Verknüpfung auf andere Art und Weise und/oder zwischen Allyl- und/oder Propenylphenyl-Monomeren, so spricht man von Neolignanen (Moss, 2000).

Die Lignan-Grundstrukturen können durch Ringschlüsse, Ringspaltungen und/oder Substitutionsreaktionen so verändert werden, dass die Lignane in acht Gruppen unterteilt werden können – die Furane, Furofurane, Dibenzylbutane, Dibenzylbutyrolactone, Aryltetraline, Arylnaphthaline, Dibenzocyclooctadiene und Dibenzylbutyrolactole (Umezawa, 2003). Umezawa (2003) unterteilt Furane, Dibenzylbutane, Aryltetraline und Dibenzocyclooctadiene in Gruppen mit bzw. ohne gebundenen Sauerstoff an den Positionen 9 und 9' nochmals. Tabelle 1.2. gibt einen Einblick in die Vielfalt der Lignanstrukturen, dabei ist jeweils nur eine der Subgruppen mit oder ohne 9(9')-Sauerstoffatome gezeigt.

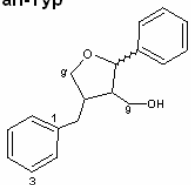
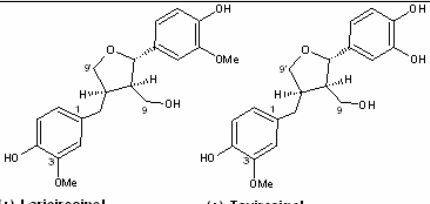
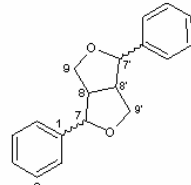
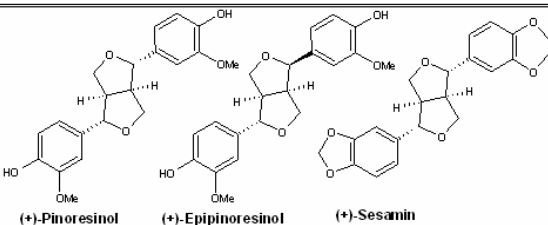
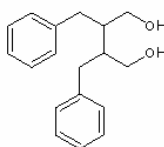
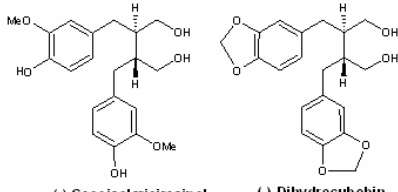
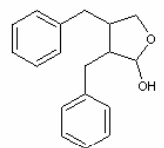
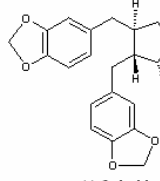
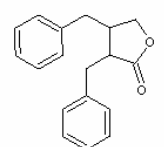
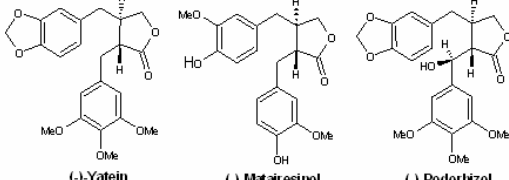
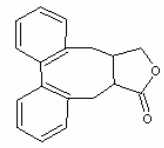
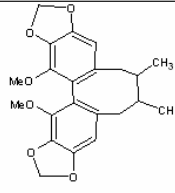
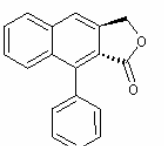
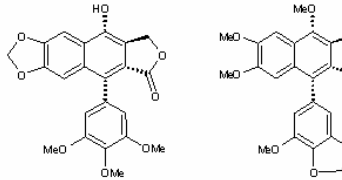
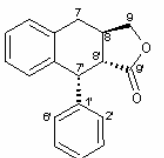
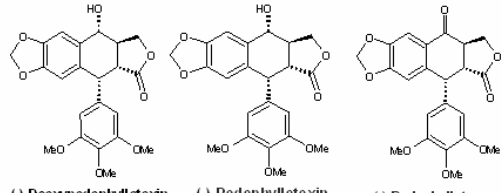
Neben der großen Strukturdiversität ist auch das Vorkommen in der Pflanzenwelt sehr vielfältig. Bisher wurden Lignane in etwa 55 Pflanzengruppen gefunden, darunter Gymnospermen*, Angiospermen, Moose und Farne (Lewis und Davin, 1999) [* nach Strasburger, 2002, unterteilt sich die Klasse der Gymnospermen neuerdings in Coniferopsida, Cycadopsida, Gnetopsida und Gingkopsida]. Je nach Pflanzenart können dabei unterschiedliche Mengen von Lignanen verschiedener Grundstrukturtypen akkumuliert werden. Eine Übersicht über das Vorkommen einzelner Grundstrukturtypen wurde von Umezawa (2003) beschrieben. Innerhalb einer Pflanze konnten sie in Rhizomen, Wurzeln, Blättern, Blüten, Früchten und Samen gefunden werden (MacRae und Towers, 1984).

Tab.1.2.: Strukturdiversität der Lignane

Unterteilung der Lignane in Untergruppen mit jeweiligem Beispiel (nach Umezawa, 2003)

* Subgruppen mit 9(9')-Sauerstoffatom

** Subgruppe der Lactone

Lignan-Untergruppe	Beispiel
<p>Furan-Typ*</p> 	 <p>(+)-Lariciresinol (+)-Taxiresinol</p>
<p>Furofuran-Typ</p> 	 <p>(+)-Pinoresinol (+)-Epipinoresinol (+)-Sesamin</p>
<p>Dibenzylbutan-Typ*</p> 	 <p>(-)-Secoisolariciresinol (-)-Dihydrocubebin</p>
<p>Dibenzylbutyrolactol-Typ</p> 	 <p>(-)-Cubebin</p>
<p>Dibenzylbutyrolacton-Typ</p> 	 <p>(-)-Yatein (-)-Matairesinol (-)-Podofiltol</p>
<p>Dibenzocyclooctadien-Typ*</p> 	 <p>(-)-Wuweizisu C</p>
<p>Arylnaphthalin-Typ</p> 	 <p>Dehydropodophyllotoxin Justicidin A</p>
<p>Aryltetralin-Typ**</p> 	 <p>(-)-Deoxy-podophyllotoxin (-)-Podophyllotoxin (-)-Podophyllotoxon</p>

1.3.1. Pharmakologische Eigenschaften von Lignan

In Japan und China werden getrocknete Wurzeln und Stängel von *Kadsura coccinea* (Schisandraceae) gegen rheumatoide Arthritis, Gastritis, Magen- und Darmgeschwüre verabreicht. Früchte von *Schisandra* spec. werden als Hepatoprotektivum bei chronisch viraler Hepatitis eingesetzt [Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997] (Lee und Xiao, 2003; Rios et al., 2002). Für die antivirale und hepatoprotektive Aktivität werden vor allem die Dibenzocyclooctadiene, wie das Schisantherin D und C, Gomisin C und N, Wuweizisu C und Kadsuranin verantwortlich gemacht, wobei man den leberschützenden Effekt in der verminderten Bildung von Fettperoxiden vermutet (Kiso et al., 1985; Lee und Xiao, 2003). Getrocknete Rinden von *Fraxinus mandshurica* und *Fraxinus japonica* (Oleaceae) finden Einsatz als Diuretikum, Antipyretikum, Analgetikum und Antirheumatikum. Sie enthalten eine Mischung aus Pinoresinol (Furofuran), Olivil (Furan) und Cycloolivil (Aryltetralin) (Lee und Xiao, 2003; Westcott und Muir, 2003).

Lignanen aus Leinsamen (*L. usitatissimum*), vor allem Matairesinol, Secoisolariciresinol und deren Glykoside, werden eine krebisprotektive Wirkung und eine positive Wirkung auf Menopausen-bedingte Beschwerden nachgesagt. Sie werden im Zuge der Verdauung durch Darmbakterien in Enterolacton bzw. Enterodiol umgewandelt und zeigen in dieser Form eine erhöhte Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor β . Diese sog. Phytoestrogene bewirken im menschlichen Organismus eine dem Sexualhormon Estrogen ähnliche Wirkung und besitzen somit möglicherweise einen vorbeugenden Effekt auf die Entstehung hormonabhängiger Tumore wie z.B. Brust- oder Prostatakrebs bzw. ersetzen das in der Menopause fehlende Estrogen. Noch sind die Ergebnisse jedoch widersprüchlich und zumindest beim Verzehr großer Mengen kann ein umgekehrter Effekt nicht ausgeschlossen werden (Kulling und Watzl, 2003).

Bereits vor 500 Jahren wurden von Bewohnern der Himalayaregion und Indianern aus der Region Maine (Nordamerika) alkoholische Extrakte aus den Wurzeln und Rhizomen von *Podophyllum* spec. (Podophyllaceae) zur Behandlung von Schlangenbissen, Verstopfung, Wurmbefall und Blasen hergestellt, die auch bei rituellen Selbsttötungen Verwendung fanden (Lee und Xiao, 2003; Westcott und Muir, 2003). Als Hauptinhaltsstoff wurde das Podophyllotoxin (PTOX) identifiziert, ein Aryltetralin mit der chemischen Bezeichnung - (7 α ,7' α ,8 α ,8' β)-7-Hydroxy-3',4',5'-trimethoxy-4,5-methylenedioxy-2,7'-cyclo-lignano-9',9'-lacton (Schomburg, 2005). Es handelt sich um ein Spindelgift, welches analog zu Colchicin an α/β -Tubulin-Dimere bindet und somit den Aufbau der Mikrotubuli verhindert, während die Depolymerisation ungehindert abläuft. Dadurch kann die Teilungsspindel nicht ausgebildet werden. Die betroffene Zelle arretiert in der G₂-Phase des Teilungszyklus und stirbt ab (Canel et al., 2000; Lloyd, 1910; Petersen und Alfermann, 2001; Stähelin und Von Wartburg, 1991). Aufgrund dieser hohen Toxizität kann PTOX nur bedingt medizinisch eingesetzt werden und findet transdermale Anwendung in Cremes (Wartec[®]) oder Gelen (Condylox[®]) gegen Genitalwarzen (*Condyloma acuminata*), die durch den Human-Papilloma-Virus verursacht werden.

Semisynthetische Derivate des PTOX wie z.B. Teniposid, Etoposid oder Etopophos[®] sind etablierte Chemotherapeutika zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, von Testikularkarzinomen und des sog. Kaposi Sarkoms (Damayanthi und Lown, 1998). Die Wirkungsweise der Derivate beruht auf der Hemmung der Topoisomerase II, was zu DNA-Strangbrüchen und der Arretierung der Zellen in der späten S- oder frühen G₂-Phase führt und schließlich das Absterben der Zelle zur Folge hat (Canel et al., 2000). Weitere Derivate des PTOX befinden sich derzeit in der klinischen Forschung (z.B. GL 331 oder Top 53), wobei nicht nur auf Einsatz in der Chemotherapie, sondern auch bei rheumatoider Arthritis (z.B. PH 82, Rheumacon[®]) und HIV untersucht wird (Lee und Xiao, 2003; Svensson und Pettersson, 2003). Die selektive HIV-Therapie von PTOX-Analogen beruht vor allem auf der Hemmung der viralen reversen Transkriptase und Integrase (Apers et al., 2002).

1.3.2. Podophyllotoxin (und 6-Methoxypodophyllotoxin)

Da PTOX-Derivate wegen ihrer medizinisch kommerziellen Nutzung von Bedeutung sind, besteht eine ständige Nachfrage an PTOX. Eine Totalsynthese der Derivate wäre möglich, jedoch unökonomisch und so wird PTOX als Synthesestartpunkt bis heute aus Rhizomen von *Podophyllum hexandrum* (einer Art, die nur in einigen Regionen des Himalaya beheimatet ist) und *P. peltatum* (einer nordamerikanischen Art) isoliert (Canel et al., 2000). Dies führt dazu, dass *P. hexandrum* inzwischen als bedrohte Art gilt [Appendix II der „Convention for international trades in endangered species“ (Cites; World Conservation Monitoring Centre, 2001)] (Giri and Narasu, 2000; Imbert, 1998).

Die Gehalte an PTOX in *P. hexandrum* Rhizomen liegen etwa bei 1 - 5 % des TG (Chatterjee, 1952; Jackson and Dewick, 1984). van Uden et al. (1989) gelang es Suspensionskulturen von *P. hexandrum* und Kalluskulturen von *P. peltatum* mit PTOX-Gehalten zwischen 0,09 bzw. 0,38 % des Trockengewichtes (TG) zu etablieren. Allerdings wuchsen die Kulturen sehr langsam und zeigten eine braune Verfärbung (Chattopadhyay et al., 2003; Giri and Narasu, 2000; Kadkade, 1982). Als alternative PTOX-Quelle wurde 1975 die Sektion *Syllinum* aus der Familie der Linaceae entdeckt (Berlin et al., 1986; Broomhead and Dewick, 1990; Weiss et al., 1975). *L. album* Pflanzen enthalten etwa 0,0005 % ihres Frischgewichtes an PTOX, wohingegen Suspensionskulturen bis zu 0,35 % ihres TG an PTOX akkumulieren können (Empt et al., 2000; Fuss, 2003; Petersen und Alfermann, 2001; Weiss et al., 1975). Neben PTOX kommt in *L. album* und anderen Leinarten 6-Methoxypodophyllotoxin (6MPTOX) als weitere Hauptlignankomponente vor. Der Gehalt an 6MPTOX kann in Suspensionskultur-Zellen mit etwa 0,8 % des TG hoch sein (Fuss, 2003). Die Toxizität von 6MPTOX ist mit der des PTOX vergleichbar. Dennoch wird 6MPTOX bisher nicht medizinisch genutzt (Middel et al., 1995). In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten zehn Jahren zwölf verschiedene Zellkulturen etabliert und untersucht. Zwei der untersuchten Zelllinien akkumulierten weder PTOX noch 6MPTOX, zwei Linien synthetisierten bis zu 0,35 % PTOX und acht Linien reicherten bis zu 0,8 % 6MPTOX bezogen auf das TG an (Empt et al., 2000; Federolf et al., 2006; Fuss et al., 2003; Petersen und Alfermann, 2001). Die unterschiedlichen Lignan-Akkumulierungsmuster kommen vermutlich dadurch zustande, dass die Kulturen aus verschiedenen individuellen Keimlingen, die unterschiedliche Genotypen aufwiesen, initiiert wurden. Da „hairy root“ Kulturen von *L. album* ebenfalls hauptsächlich 6MPTOX (bis zu 3,5 % ihres TG) anreichern können, kann man davon ausgehen, dass 6MPTOX das eigentliche Hauptlignan in *L. album* in-vitro Kulturen ist (Dr. J. Windhövel, persönliche Mitteilung). PTOX als Hauptkomponente scheint eher die Ausnahme zu sein (Empt et al., 2000; Federolf et al., 2006; Fuss, 2003; Petersen und Alfermann, 2001).

Neben der gezielten Selektion von Zellkulturen wird angestrebt die Biosyntheseleistung der Pflanze für PTOX in naher Zukunft durch gezielte Eingriffe oder künstliche Nachbildung des PTOX-Syntheseweges so zu verbessern, dass eine PTOX Akkumulation von über 2 % des Trockengewichtes erreicht werden kann. Dies ist jedoch nur möglich, wenn man die komplexen Zusammenhänge in der Biosynthese des PTOX kennt. Im folgenden Abschnitt werden daher die bereits bekannten und die noch hypothetischen Syntheseschritte der Aryltetralin-Lignane vorgestellt.

1.4. Biosynthese der Aryltetralin-Lignane

1.4.1. Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel

Als Phenylpropanoide werden im Allgemeinen Substanzen bezeichnet, die aus einer Phenolgruppe mit gebundener C₃-Seitenkette bestehen und sich von Phenylalanin oder Tyrosin ableiten (Heldt, 1999). Phenylalanin und Tyrosin werden über den Shikimat-Chorismat-Weg angeliefert und über den „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel“ in verschiedene Intermediate umgewandelt, die ihrerseits Ausgangspunkte für komplexere Phenole wie z.B. Flavonoide, Stilbene, Styrolpyrone, Cumarine, Lignine und Lignane sind (Abb. 1.4.).

Da für die Synthese der Aryltetralin-Lignane die Bildung des Coniferylalkohols entscheidend ist, wird ausschließlich dieser Syntheseweg beschrieben (in Abb. 1.4. mit blau markierten Pfeilen gekennzeichnet). Phenylalanin wird nicht-oxidativ durch die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL; E.C. 4.3.1.5.) in *trans*-Zimtsäure überführt. Dabei handelt es sich um ein stressinduzierbares, lösliches Tetramer, dessen Untereinheiten zwischen 77 bis 83 kDa groß sind. Die PAL scheint direkt mit der Zimtsäure 4-Hydroxylase assoziiert zu sein (Dixon und Reddy, 2003; Heldt, 1999; Messner et al., 1991; van Fürden et al., 2005). Bei der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H; EC 1.14.13.11) handelt es sich um ein Cytochrom P450 Enzym, das in *para*-Position der *trans*-Zimtsäure eine Hydroxylgruppe einführt. Die entstandene *p*-Cumarsäure kann entweder über *p*-Cumaroyl-CoA und Kaffeoil-CoA zu Feruloyl-CoA oder über Kaffesäure und Ferulasäure zu Feruloyl-CoA umgewandelt werden. Alternativ ist auch eine Synthese über Kaffesäure und Kaffeoil CoA möglich. Die in Abb. 1.4. fett gedruckten Pfeile kennzeichnen die Schritte, die bisher in *L. album* Suspensionskulturen nachgewiesen werden konnten (Neumetzler, 2003; Schönell, 1996; Schwelm, 2001; Windhövel, 2002).

Der tatsächliche Syntheseweg zu Coniferylalkohol ist noch nicht vollständig geklärt, aber man diskutiert, dass möglicherweise einerseits alternative, parallel existierende Synthesewege in ein und derselben Pflanze bestehen und zum anderen, je nach Pflanzenart, unterschiedliche Wege beschritten werden könnten (Dixon und Reddy, 2003). Die Umsetzung von *p*-Cumarsäure zu Kaffesäure scheint von der Cumarsäure 3-Hydroxylase (Trans-5-O-(4-Cumaroyl)-D-Chinasäure, C3H; E.C. 1.14.13.36) katalysiert zu werden. Allerdings bevorzugt dieses Cytochrome P450 Enzym in-vitro Cumaroylshikimat anstelle von *p*-Cumarat. Daher postuliert man einen Syntheseweg von *p*-Cumaroyl CoA über Cumaroylshikimat zu Kaffeoilshikimat und schließlich zu Kaffeoil-CoA (Abb. 1.4. *; Dixon und Reddy, 2003). Die jeweiligen Zimtsäurederivate, wie z.B. *p*-Cumarsäure, Kaffesäure oder Ferulasäure werden von der Hydroxymimtsäure CoA-Ligase (4CL; E.C. 6.2.1.12) unter ATP Verbrauch und Bildung einer Thioesterbindung zwischen Carboxylgruppe und Coenzym A in ihre CoA Ester überführt. Diese können von der Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase (CCR; E.C. 1.2.1.44) in die entsprechenden Zimtaldehyde überführt werden, die von der Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD; E.C. 1.1.1.195) in die korrespondierenden Zimtalkohol-Derivate umgesetzt werden. Hydroxylgruppen können von O-Methyltransferasen wie der Kaffesäure OMT (COMT; E.C. 2.1.1.68) oder Kaffeoil-CoA OMT (CCoAOMT; E.C. 2.1.1.104) methyliert werden. Durch Polymerisierung der entstandenen Monolignole *p*-Cumaroyl-, Sinapyl- und Coniferylalkohol können in Pflanzen Lignine gebildet werden, die jedoch in Zellsuspensionskulturen von *L. album* nur eine untergeordnete Rolle spielen (van Fürden, 2004).

1.4.2. Aryltetralin-Lignan Biosynthese

Die Biosynthese der Aryltetralin-Lignane PTOX und 6MPTOX ist noch weitestgehend unbekannt. Der in Abb. 1.5. dargestellte hypothetische Syntheseweg wurde basierend auf Fütterungsexperimenten radioaktiv markierter Stoffwechselintermediate zu Zellkulturen und Pflanzen unterschiedlicher Spezies aufgestellt.

Zwei Moleküle Coniferylalkohol werden von der Pinoresinol Synthase zu Pinoresinol verbunden. Es handelt sich um eine Oxidase, die mit Hilfe des sog. dirigierenden Proteins die Coniferylalkohole stereospezifisch zu (+)-Pinoresinol koppelt (Davin et al., 1997). Nachfolgend überführt die Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (+)-Pinoresinol in einer Zwei-Schritt Reaktion über (+)-Lariciresinol in (-)-Secoisolariciresinol (Katayama et al., 1992; von Heimendahl et al., 2005). (-)-Secoisolariciresinol wird durch die Secoisolariciresinol Dehydrogenase in Matairesinol überführt (Umezawa et al., 1990; 1991). Diese Schritte wurden zunächst in *Forsythia intermedia* durch Fütterungsexperimente aufgeklärt (Erdtman, 1933). Jahre später konnten die beteiligten Enzyme charakterisiert und ihre cDNAs kloniert werden (Dinkova-Kostova et al., 1996; Gang et al., 1999; Umezawa et al., 1990; Umezawa, 2003). Während in *Podophyllum peltatum* cDNAs isoliert werden konnten, die für ein dirigierendes Protein und die Secoisolariciresinol Dehydrogenase kodieren, wurden in *L. album* bisher cDNAs für die Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase und die Secoisolariciresinol Dehydrogenase gefunden, aber nicht für das dirigierende Protein (Dr. E. Fuss, persönliche Mitteilung; von Heimendahl et al., 2005; Xia et al., 2001).

Die Zugabe radioaktiv markierter Vorstufen von Phenylalanin, Zimtsäure, oder Ferulasäure zu Wurzeln oder Blättern von *Podophyllum hexandrum* oder *P. peltatum* resultierten in deren Einbau in PTOX, 4'-Demethyl-PTOX, β -Peltatin, α -Peltatin und 4'-Demethyl-Deoxypodophyllotoxin, mit Matairesinol als Intermediat. Sinapinsäure, 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure und 3,4-Methylendioxyzimtsäure wurden nur bedingt inkorporiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Substitutionen an Position 3 und 4 des Benzolringes und die Bildung der Methylendioxygruppe erst relativ spät in der Synthese erfolgen (Broomhead et al., 1991; Jackson und Dewick, 1984). Stöckigt und Klischies (1977) fanden bei *Forsythia intermedia* ebenfalls keinen Einbau von 3,4-Methylendioxyzimtsäure, wohingegen Seidel et al. (2002) einen Einbau bei *L. album* Zellsuspensionskulturen beobachten konnten. Dies führt zu der Frage, ob die Synthese in allen Pflanzenspezies gleich abläuft, die Synthesereihenfolge je nach Spezies unterschiedlich sein kann oder ob pflanzliche Zellkulturen möglicherweise flexibler in ihrer Substratumsetzung sind. Sakakibara et al. (2003) fütterten Sprosse von *Anthriscus sylvestris* mit methoxy-deuteriertem Matairesinol, welches zum einen in Pluviatolid und Bursehernin (nicht dargestellt in Abb. 1.5.) und zum anderen über Thujaplicatin, 5-Methylthujaplicatin und 4,5-Dimethylthujaplicatin in Yatein überführt wurde. Für *L. album* wurden hierfür jedoch noch keine Hinweise gefunden. Dies gilt auch für die Umsetzung von Yatein in Deoxypodophyllotoxin (DOP), die in keiner der untersuchten Pflanzenspezies eindeutig gezeigt werden konnte.

Die Zugabe von DOP zu Zellkulturen von *Podophyllum hexandrum* resultierte in der Bildung von PTOX, während die Zugabe zu Zellkulturen von *L. flavum* in der Bildung von 6MPTOX endete (van Uden et al., 1995). Die Gabe von PTOX zu *L. flavum* Kulturen führte zur Synthese des PTOX-Glucosids und nicht zur Bildung von 6MPTOX (van Uden et al., 1995). Auch in Zellkulturen von *L. album* scheinen 6MPTOX- und PTOX-Glucosid die Endstoffwechselprodukte zu sein (Smolny et al., 1998). DOP könnte somit ein Verzweigungspunkt für die Bildung von PTOX bzw. 6MPTOX sein, dies konnte für *L. spec* jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Die Umsetzung von DOP zu β -Peltatin konnte in *L. flavum* und *L. nodiflorum* enzymatisch gezeigt werden. Die Hydroxylgruppe an Position 6 wird durch ein Cytochrom P450 Enzym eingefügt, der sog. Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H; Kuhlmann et al., 2002; Molog et al., 2001). Die Methylierung der noch freien OH-Gruppe erfolgt im Anschluss durch die β -Peltatin 6-O-Methyltransferase (β P6OMT), die ebenfalls in *L. nodiflorum* gefunden und charakterisiert wurde (Kranz und Petersen, 2003). Noch fehlen Hinweise auf die Enzyme, die für die Hydroxylierung an Position 7 des DOP zu PTOX bzw. des β -Peltatin-A-Methylethers zu 6MPTOX verantwortlich sind [bezeichnet als β -Peltatin-A-Methylether 7-Hydroxylase (PAM7H) und Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase (DOP7H)]. A. Henges (1999) fand Hinweise, dass es sich bei der DOP7H um ein Cytochrom P450 Enzym handeln könnte, aber aufgrund von Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Enzymteste, sind diese Ergebnisse nicht eindeutig.

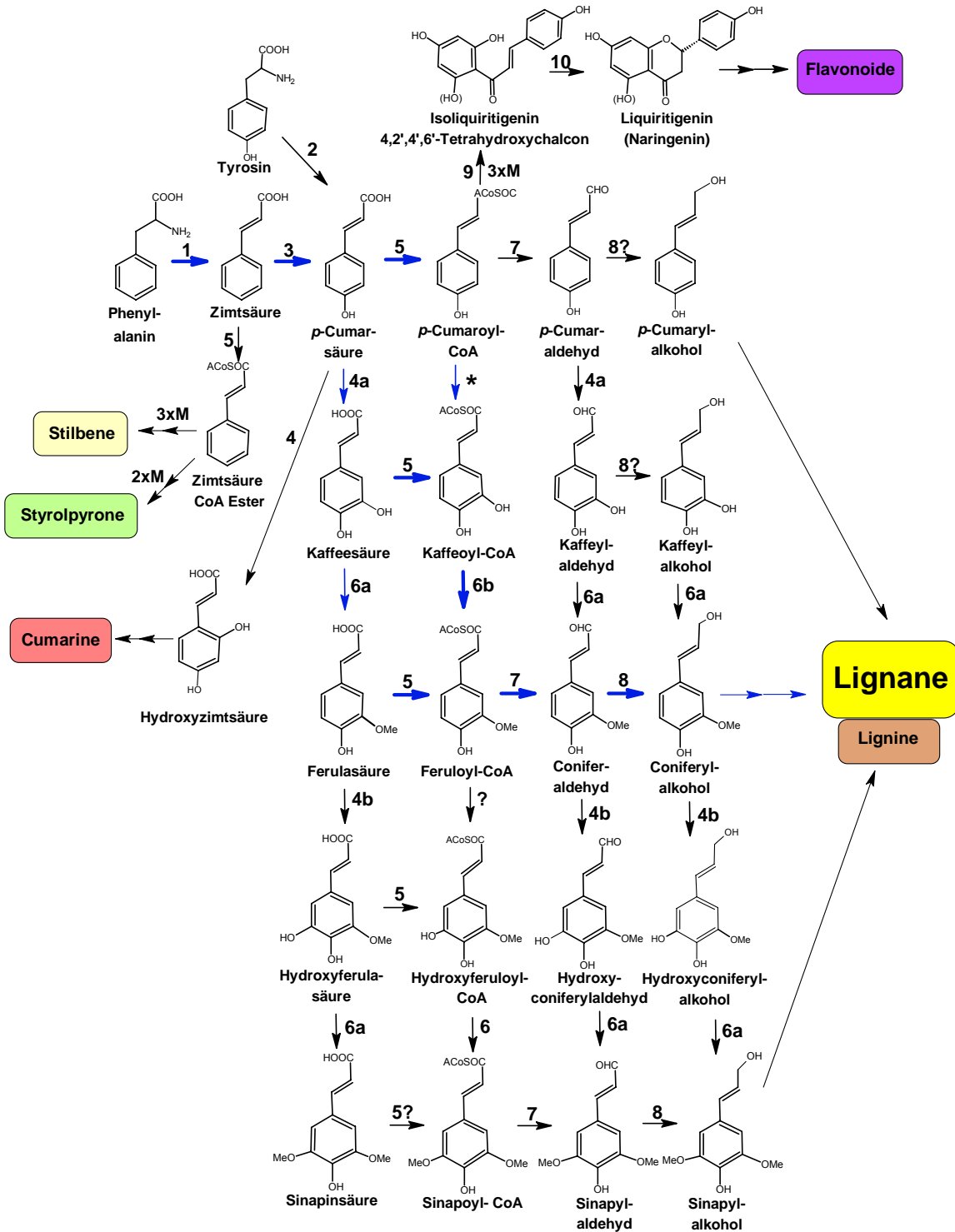


Abb.1.4.: Hauptelemente des „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels“

Blau markierte Pfeile kennzeichnen den vermuteten Hauptsyntheseweg zu Coniferylalkohol, dem Ausgangsmolekül der Aryltetralin-Lignan Synthese. Nicht alle dargestellten Schritte wurden bisher in *L. album* nachgewiesen, die bekannten sind durch fett gedruckte Pfeile dargestellt. 1: Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL); 2: Tyrosin Ammonium Lyase (einige Gräser); 3: Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H); 4: Hydroxylasen (z.T. noch unbekannt); 4a: Zimtsäure 3-Hydroxylase (C3H); 4b: Ferulat 5-Hydroxylase (F5H); 5: Hydroxyzimtsäure CoA-Ligase (katalysiert vermutlich alle angegebenen Reaktionen) (4CL); 6: O-Methyltransferasen (z.T. noch unbekannt); 6a: Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure O-Methyltransferase (COMT); 6b: Kaffeyl-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT); 7: Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase (CCR); 8: Zimtalkohol oder Sinapylalkohol Dehydrogenase (CAD/SAD); 9: Chalcon Synthase; 10: Chalcon Isomerase; 2xM: Reaktion benötigt zwei Moleküle Malonyl-CoA; 3xM: Reaktion benötigt drei Moleküle Malonyl CoA; ?: Enzymreaktion spekulativ; *: möglicherweise Umweg über den Chinasäure/Shikimat-Weg; (Abb. modifiziert nach Humphreys und Chapple, 2002; Lewis et al., 1998)

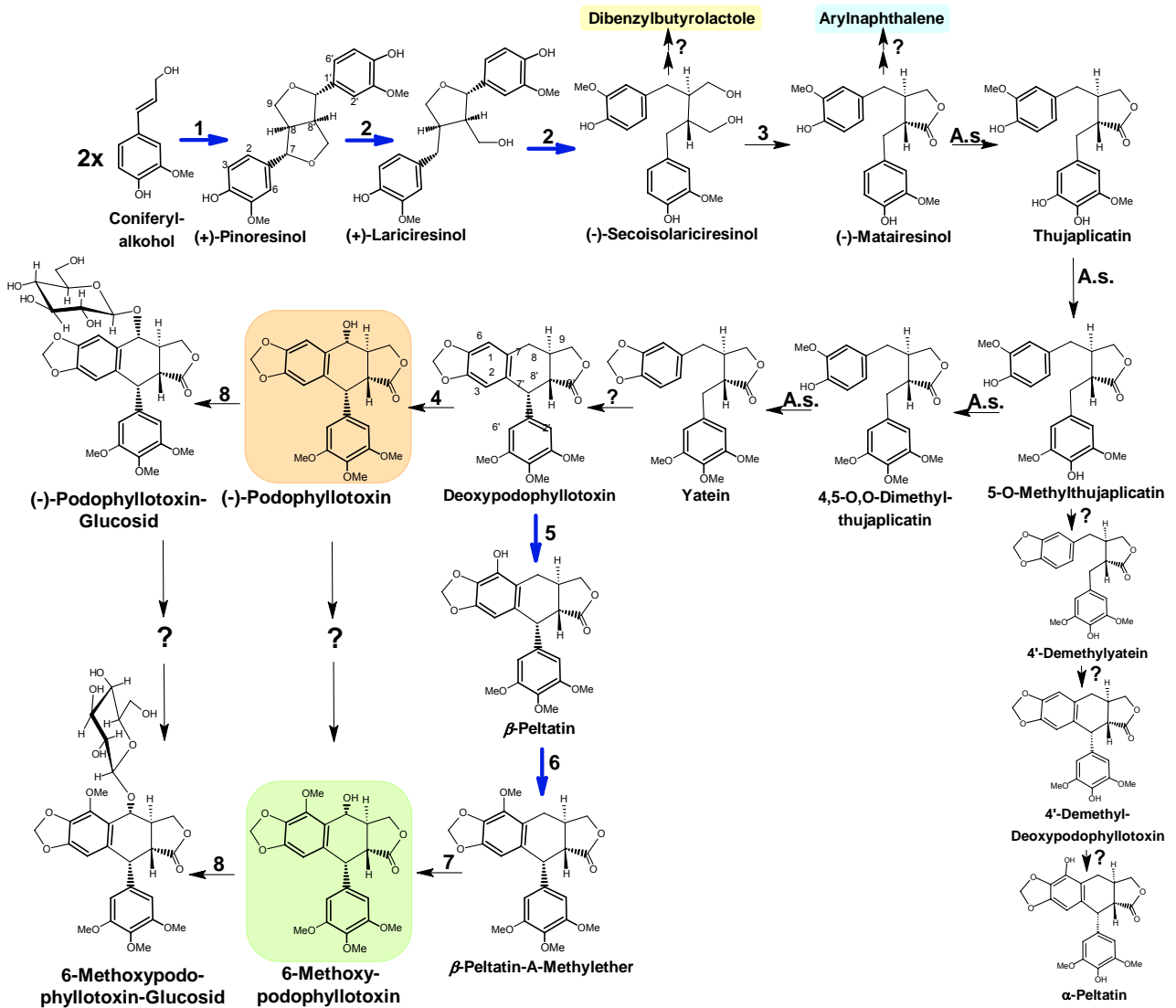


Abb. 1.5.: Hypothetischer Biosyntheseweg von PTOX und 6MPTOX

Zwei Moleküle Coniferylalkohol werden benötigt, um die Aryltetralinsynthese zu initiieren. Die meisten dargestellten Schritte wurden in *Forsythia intermedia* (Coniferylalkohol bis Matairesinol) und *Anthriscus sylvestris* (Matairesinol bis Yatein) gefunden. Blau gedruckte Pfeile kennzeichnen Reaktionsschritte, die in *L. album* (1,2), *L. flavum* (5) und *L. nodiflorum* (6) detektiert wurden. 1: Pinoresinol Synthase (PS); 2: Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (PLR); 3: Secoisolariciresinol Dehydrogenase (SDH); 4: postulierte Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase (DOP7H); 5: Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H); 6: β -Peltatin 6-O-Methyltransferase (β P6OMT); 7: postulierte β -Peltatin-A-Methylether 7-Hydroxylase (PAM7H); 8: Glycosyltransferase (unbekannt); A.s.: Schritte gefunden in *Anthriscus sylvestris*; ?: spekulative Umsetzung (Abb. modifiziert nach Fuss, 2003; Umezawa, 2003).

1.5. Typische Enzymklassen in der Sekundärmetabolit-Synthese

An der Synthese der Aryltetralin-Lignane PTOX und 6MPTOX sind neben CoA-Ligasen, Reduktasen und Dehydrogenasen, vor allem Hydroxylasen, Methyltransferasen und Glycosyltransferasen beteiligt. Auf letztere wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.5.1. Hydroxylasen

1.5.1.1. Cytochrom P450 Monooxygenasen

Die Bezeichnung Cytochrom P450 (CYP; E.C. 1.14.13., 1.14.14., 1.14.15.) kennzeichnet eine große Familie von Häm-thiolierten, mischfunktionellen Monooxygenasen, die neben Hydroxylierungsreaktionen, Methylendioxybrücken- und Ringschlussbildungen, Epoxydierungen, N-, S- und O-Dealkylierungen, N-Oxidierungen, Sulfoxidierungen, Dehydrogenierungen und Deaminierungen katalysieren können.

Hydroxylierungsreaktionen werden im Fall der Aryltetralin-Lignan Biosynthese von der C4H, C3H und DOP6H katalysiert. Zusätzlich kann vermutet werden, dass die Umsetzungen von Matairesinol zu Thujaplicatin (Hydroxylierung), 4,5-O,O-Dimethylthujaplicatin zu Yatein (Methylendioxybrückenbildung) und Yatein zu DOP (Ringschluss) möglicherweise CYP abhängig verlaufen. Die Frage, ob die Synthese von DOP zu PTOX und PAM zu 6MPTOX ebenfalls CYP abhängig ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Bei der Namensgebung steht „P“ für Pigment und „450“ gibt an, dass bei 450 nm in Anwesenheit von CO eine starke Absorptionsbande („Soret-Peak“) existiert (Kleinig und Mayer, 1999; Omura und Sato, 1964). Bei den zu katalysierenden Reaktionen handelt es sich um komplexe Elektronenübertragungen, die über mehrere Proteinkomponenten erfolgen. Je nach Elektronentransfer kann man CYPs in vier verschiedene Klassen unterteilen. Klasse I umfasst lösliche bakterielle und mitochondriale CYPs aus Wirbeltieren, die die Elektronen von NAD(P)H über eine FAD-haltige Redoxin Reduktase und ein Redoxin auf das CYP übertragen. In Klasse II werden mikrosomale, membrangebundene eukaryotische und einige bakterielle CYPs eingeordnet, die die Elektronen von NADPH über die NADPH: Cytochrom P450 Reduktase (FAD- und FMN-haltig; E.C. 1.6.2.4), oder in manchen Fällen über Cytochrom b₅, erhalten. Klasse III beinhaltet eukaryotische CYPs, die ohne Elektronendonator und Sauerstoff auskommen und Klasse IV pilzliche CYPs, die die Elektronen direkt von NAD(P)H erhalten (Nelson et al., 1993; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000; <http://metallo.scripps.edu/promise>). Bei mikrosomalen CYPs (Klasse II) der ER-Membran (Membran des endoplasmatischen Retikulums) der menschlichen Leber nimmt man an, dass sechs bis acht CYPs ein „Cluster“ um eine zentrale Reduktase bilden können (Abb. 1.6.).

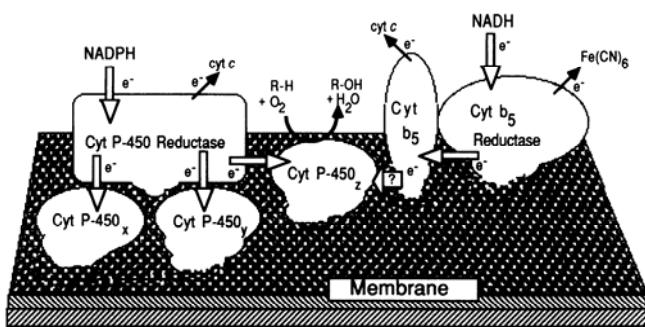


Abb. 1.6.: Elektronentransportkette membrangebundener, mikrosomaler, CYPs der Klasse II

Dargestellt ist der möglicher Elektronenfluss an der ER-Membran von NADPH über die NADPH: Cytochrom P450 Reduktase zu CYP, oder alternativ über NADH, Cytochrom b₅ und die NADH: Cytochrom b₅ Reduktase (aus Donaldson und Luster, 1991).

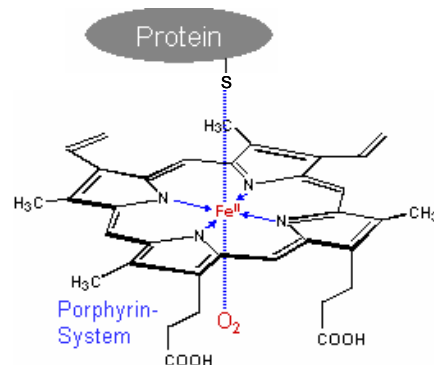


Abb. 1.7.: Eisen-Protoporphyrin IX

bestehend aus vier Pyrrolringen, die ein Eisen-Ion komplexieren. Das Eisen ist mit zwei weiteren Liganden an der fünften und sechsten Koordinationsstelle an einen Cystein-Rest des Apoproteins und Sauerstoff gebunden. (Abb. modifiziert nach Gasteiger und Schunk, 2003)

Ein Eisen-Protoporphyrin IX (Häm-Chromophor Typ b), welches über ein hoch konserviertes Cystein gebunden ist, ist Empfänger der Elektronen am CYP-Protein (Abb. 1.7.). Die Verankerung in der ER-Membran erfolgt N-terminal über 17 - 29 hydrophobe Aminosäuren.

Die Benennung und Einteilung von CYPs erfolgt zusätzlich nach ihrer Aminosäure-Sequenz in Familien und Unterfamilien. Sequenzhomologien über 40 % kennzeichnen Familien-, über 55 % Unterfamilien-zugehörigkeit und über 97 % allelische Varianten (Nelson et al., 1996; Werck-Reichhart et al., 2002). Es gibt ca. 711 verschiedene Familien, die mehr als 6051 CYP-Sequenzen enthalten, davon 97 pflanzliche Familien mit ca. 1932 CYP-Sequenzen (<http://drnelson.utmem.edu/P450.stats.2006.htm>).

Die Sequenzidentität innerhalb der pflanzlichen CYPs (Mw 45 - 65 kDa) ist äußerst gering (< 20 %). Die ersten 17 - 29 Aminosäuren des N-Terminus sind hydrophob und dienen der Verankerung des Proteins in die ER-Membran (Abb. 1.8.). Es folgt die sog. „Hinge“-Region, bestehend aus einem „Cluster“ basischer und Prolin-reicher Aminosäuren [Konsensussequenz (P/I)PGPx(G/P)xP], die I-Helix, die „ERR“-Triade und die Häm-Binderegion (Durst und Nelson, 1995; Schuler, 1996; Werck-Reichhart et al., 2002). Die I-Helix kodiert die Sauerstoffbinde- und -aktivierungsstelle [Konsensussequenz (A/G)Gx(E/D)T(T/S)]. Die „ERR“-Triade [Konsensussequenz ExxR.....R] hilft vermutlich bei der Stabilisierung und Positionierung des Häms in der Bindetasche und beinhaltet die Aminosäuren Glutaminsäure und Arginin aus der Konsensussequenz „KETLR“ und Arginin aus der Konsensussequenz „PERF“ (Hasemann et al., 1995; Werck-Reichhart et al., 2002). Die Häm-Binderegion [Konsensussequenz FxxGxRxCxG] enthält das absolut konservierte Cystein zur Bindung des Eisen-Protoporphyrins.

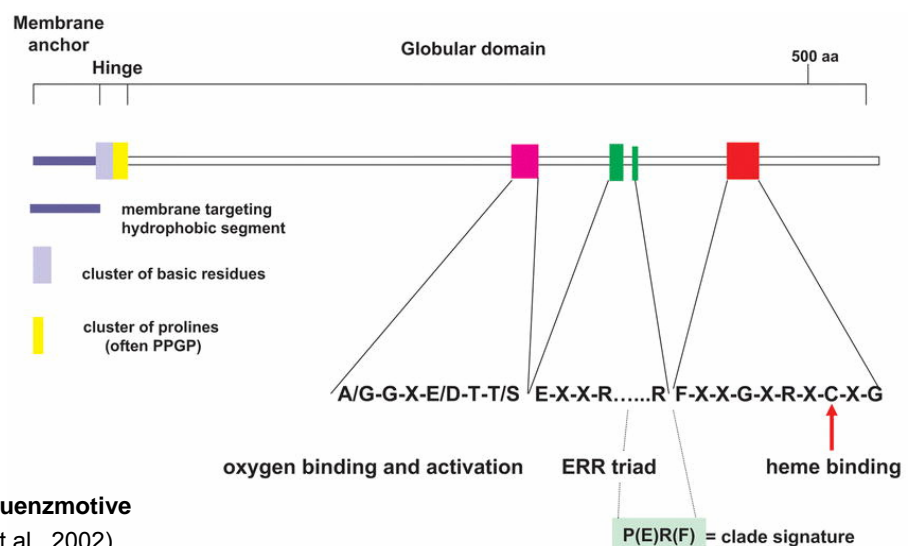


Abb. 1.8. Konservierte Sequenzmotive in CYPs (Werck-Reichhart et al., 2002).

Mittels Röntgenkristallographie konnten mehrere CYPs strukturell aufgeklärt werden, darunter die bakteriellen: P450_{cam} (CYP101) aus *Pseudomonas putida*, P450_{BM-3} (CYP102) aus *Bacillus megaterium* und P450_{terp} (CYP108) aus *Pseudomonas spec.*; und die eukaryotischen: P450_{eryF} (CYP107A1) aus *Saccharomyces erythraea*, CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus* (Abb. 1.9. a)), CYP2C9 aus *Homo sapiens* und P450_{nor} (CYP55) aus *Fusarium oxysporum* (Cupp-Vickery und Poulos, 1995; Hasemann et al., 1994; Poulos et al., 1987; Ravichandran et al., 1993; Williams et al., 2000; Williams et al., 2003). Die Topologie der P450_{cam}, P450_{terp} und P450_{BM-3} wurden miteinander verglichen. Das Faltungsmuster, die Häm-Bindestelle und die Interaktionsstelle zur NADPH:Cytochrom P450 Reduktase sind hoch konserviert (Abb. 1.9. b)). In der I-Helix konnten lediglich geringe lokale Unterschiede gefunden werden (Hasemann et al., 1995).

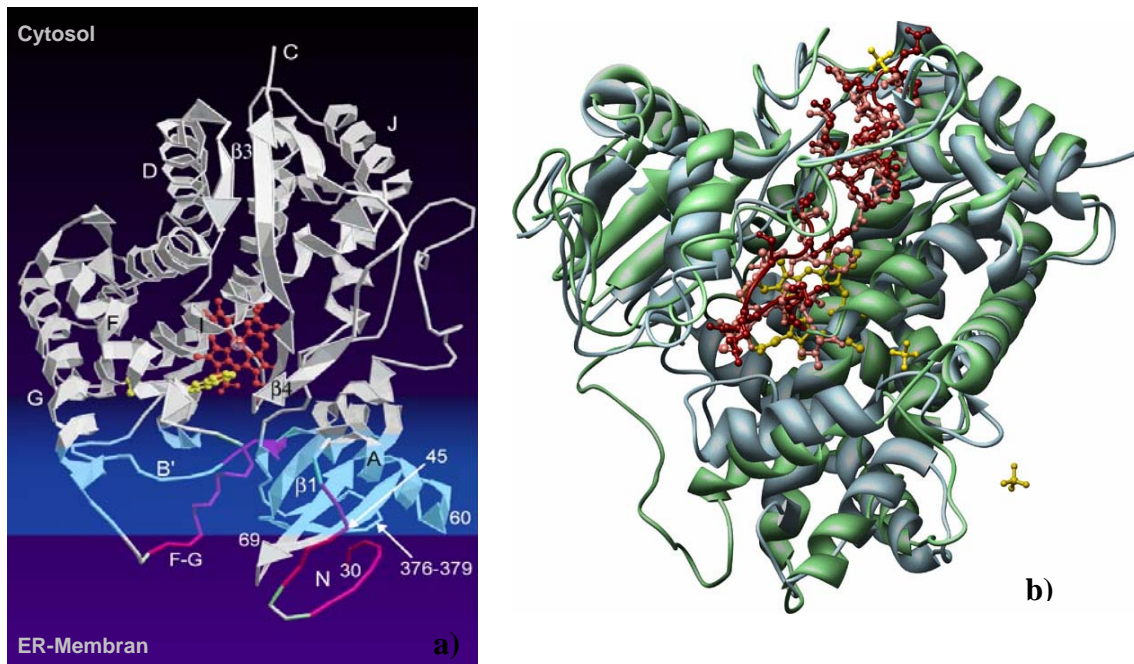


Abb. 1.9.: Tertiärstruktur zweier CYPs

a) CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus*: β -Faltblätter liegen hauptsächlich an der ER-Membran, während die α -Helices in Richtung Cytosol zeigen; der Transmembranbereich fehlt in dieser Abb. (wurde zur Kristallisation abgespalten); die I-Helix liegt nahe der Substratbindestelle; Häm ist in orange abgebildet und ein potentielles Substrat in gelb; die Rückseite des Proteins vermittelt den Kontakt zu Redoxpartnern und dem Elektronentransfer; der Substratzugang erfolgt vermutlich nahe der ER-Membran an den Helices G und F (Werck-Reichhart et al., 2002); **b) Konsensusvergleich** eines theoretischen Modells des CYP83B1 aus *Arabidopsis thaliana* (berechnet mit CPHmodels 2.0) und CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus*; CYP83B1 ist in grün dargestellt, CYP2C5 in blau; rote (CYP83B1) bzw. pinkfarbene (CYP2C5) „ball and stick“-Bereiche kennzeichnen die P_xR_x, K-Helix und Häm-Binderegionen; gebundene Liganden an CYP2C5 sind gelb markiert (Häm, Samarium-Ion und Sulfat-Ion); (<http://www.p450.kvl.dk/gallery/>).

Substrat-„Docking“ Studien an Modellen zeigen, dass die Position des aktiven Zentrums ebenfalls konserviert ist. Ferner kann man darauf schließen, dass ein gemeinsamer katalytischer und Substratbindender Mechanismus existiert (Rupasinghe et al., 2003). Hydroxylierende Reaktionen können wie folgt formuliert werden:



Ein Sauerstoffatom wird über Radikalbildung von molekularem Sauerstoff auf das Substrat übertragen und eines auf Wasser. Der katalytische Reaktionszyklus ist dabei komplex (Abb. 1.10.).

Im Ruhezustand (I) liegt das Eisen als Fe(III)-„low-spin“-Komplex vor. Durch Bindung des Substrates an Fe³⁺ geht dieses in den „high-spin“-Zustand (II) über und wird zu Fe²⁺ reduziert. Das fehlende Elektron wird von NADPH über die NADPH:Cytochrom P450 Reduktase nachgeliefert (III). Die Bindung von molekularem Sauerstoff führt zur Bildung eines CYP-Dioxygen Komplexes (IV), der durch ein zweites Reduktionsäquivalent aktiviert und zu einem Peroxo-Fe²⁺ (VI) wird. Protonierung und Spaltung der O-O Bindung setzt ein Molekül Wasser frei und hinterlässt den reaktiven Fe³⁺-O-Komplex (VII). Dieser greift radikalisch am gebundenen Substrat an, überträgt sein O-Radikal unter Übernahme eines H-Radikals des Substrates und bildet so die alkoholische Gruppe aus (Abb. 1.10.).

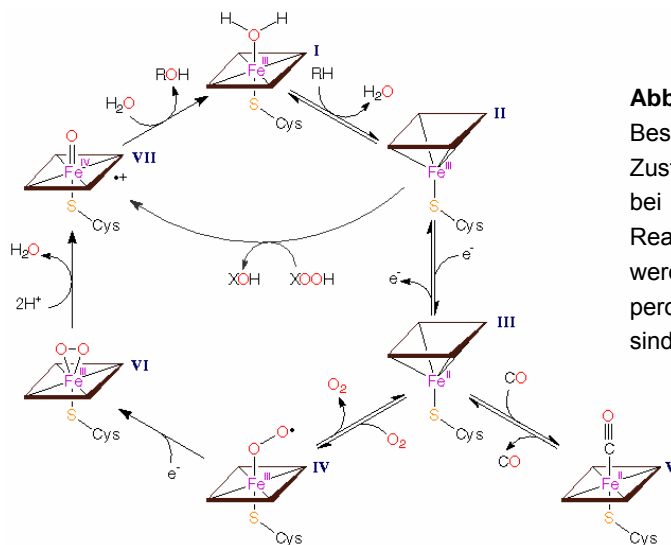


Abb. 1.10.: Katalytischer Reaktionszyklus von CYPs

Beschreibung der Zustände I - IV, VI - VII siehe Text; Zustand V wird unter Anwesenheit von CO („Soret-Peak“ bei 450 nm) erreicht (Groves und Han, 1995); seltene Reaktionswege (von II nach VII) können beschriftet werden, wenn z.B. Alkyl-Hydroperoxide, Hydrogenperoxide, Peroxysäuren, NaIO_4 oder NaClO_2 anwesend sind; (<http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html>)

1.5.1.2. Dioxygenasen / Peroxidasen

A. Henges postulierte (1999), dass die Hydroxylierung an Position 7 des DOP zu PTOX möglicherweise von einem CYP Enzym katalysiert wird. Ausgehend von bekannten CYP-Hydroxylierungsreaktionen (z.B. C4H, C3H, F5H oder Tabersonin 16-Hydroxylase) bevorzugen CYPs C-Atome mit Doppelbindungen zu benachbarten C-Atomen für eine substratspezifische Umsetzung. Es lässt sich daher vermuten, dass die DOP7H Reaktion auch von einer anderen Enzymklasse katalysiert werden könnte, wie z.B. Nicht-Häm-abhängigen Monooxygenasen, Cu-abhängigen Monooxygenasen, flavin-abhängigen Monooxygenasen, Dioxygenasen oder Peroxidasen. Dioxygenasen und Peroxidasen werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Dioxygenasen sind eine äußerst heterogene Enzymklasse. Sie katalysieren Reaktionen, bei denen beide Atome von molekularem Sauerstoff in ein Substrat eingebaut werden. Während intramolekulare Dioxygenasen beide Sauerstoffatome in das gleiche Substrat einbauen, werden bei intermolekularen die Sauerstoffatome auf zwei verschiedene Substrate übertragen. Die Heterogenität dieser Gruppe bezieht sich auf die unterschiedlichen Reaktionen die katalysiert werden, die Sequenzunterschiede und die Erfordernisse an prosthetischen Gruppen, Cofaktoren oder Metallionen. Neben Hydroxylierungen können Aromatspaltungen, Oxidationen von ungesättigten Fettsäuren, Ringschlüsse und Etherspaltungen katalysiert werden. Als prosthetische Gruppen kommen Fe-S-Cluster (z.B. Rieske Oxidasen aus Bakterien), Häm- (z.B. Tryptophan-2,3-Dioxygenase) oder Flavin-Gruppen (z.B. 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carboxyl-Dioxygenase), Cosubstrate/Cofaktoren wie z.B. α -Ketoglutarat und/oder Metallionen wie Kupfer, Mangan, Kobalt oder Eisen zum Einsatz (Ishimura et al., 1970; Sparrow et al., 1969; Westendorf, 2005). Daher kann man Dioxygenasen grob in drei Kategorien einteilen: Dioxygenasen mit Häm-koordinierten Metallionen, Dioxygenasen ohne Häm-koordinierte Metallionen und Dioxygenasen ohne Metallionen [z.B. 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* (Bauer et al., 1994)].

In die Gruppe der Dioxygenasen ohne Häm-koordinierte Metallionen gehören beispielsweise die Lipoxygenasen und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen. Die Reaktionsbreite der zu katalysierenden Reaktion ist innerhalb einer Kategorie sehr groß, ebenso wie die Koordination der assoziierten Metallionen. Bei den Lipoxygenasen (Fe^{3+}) erfolgt die Bindung über drei Histidine, ein Isoleucin und ein Asparagin, während sie bei den α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen über zwei Histidine und einen Asparaginsäure-Rest erfolgt (Boyington et al., 1990; Elkins et al., 2002; Hegg et al., 1999; Minor et al., 1996). Der Reaktionsmechanismus kann entweder über einen nukleophilen (z.B. bei extradiolischen Catechol-Dioxygenasen), elektrophilen (z.B. bei intradiolischen Catechol-Dioxygenasen) oder radikalischen Angriff (z.B. bei Lipoxygenasen) erfolgen (Egmond et al., 1977).

FLS	-----MKTAQGVSAITLMEVARVQAIASLSKCMDTIP-----SEYIRSENEQPAATTLHG-----VVLQVPEVVDLR--DPDENK	67
ANS	-----MVAVERVESLAKSG--IISIP-----KEYIRPKEELESINDVPLEEKKEDGQVPTDIDKNIESDDEK	61
Gi3H	-----MPSRISDSFRAHSQKHLDLN-----SIKELPESHAWTSSNDYPSSENSCNFESIFVDDIDNYINNNI	62
De4H	FLPNSEQERKMKDLNFHAATLSEESLRELKAFDETKAGVKGIVDTGITKIPRIFIDQPKNLDRI SVCRGKSDIKIIVNINNGLSNSSEI	90
Hy6H	-----MATFVSNWSTKSVSESFIA-----PLQKRAEKDVVPGN-----DVFIDIQ--QHHHL	61
F3H	-----IPRVPSTLTALAEKTLQT-----SFIRDEDERPKVAYNQFSN-----ETIISSEGIDDETKG	61
FLS	M---VKLIADSKENGIIFQLINIGIPDEAIALDQKVGKEFFEHVPQEEKELIAKTPGSNDIEGYGTSLQKEVEGK-----KGVVDHL	146
ANS	IRENCIELEKKQSLDWVMHLINIGIPADLMERVKKAGEEFPF--LSVEEKEKYANDQATGKIQGYGSKLANNASGQ-----LEMEDYF	143
Gi3H	-N--VLEHIGQCKKWGAFQIININISERLLQDIELACKSLFSLPMQQKKAARSP--EGVTGYGVARISFFFSK-----LMWSEG-	138
De4H	RR--EIVEKIGENSEKYGFFQIVNIGIPQDVMDKMVDGVRKFFHEQDDQIKRQYYSRDRFNKNFL--YSSNYVLIPIGIA-----CNRDRT-	170
Hy6H	L---VQGITKACQDFGLFQVINIGPPEELMETMEVCKEFPALPAEEKKPKPKGEAAKFELPLEQKAKLYVEGEQLSNEEFLYKDKTL	132
F3H	R-AEICDKIVKACEDWGVQVVDLGVDAEVI SQMTTFAKEFPALPPEE-KLRFDMSGGKKGGFIVSSHLQGEVVQD-----LREIV	134
FLS	FHKIWPPSAVNYRYWPKNPPSYREANEENCKRMREVVDRIKFSLSLGLSLEGHEMIEAAGG---DEIVYLLKINYYEPCREDELALGVV	232
ANS	FHLAYPEEKRDLSIWEKTPSDYIEATSEAKCLRLLATKVKALKSVGLSLEPDRLEKEVGG---EELLQMKNINYEPCREDELALGVE	230
Gi3H	FTIVGSPLEHARQIWHDYQKFCVDIEEREMEKLAGRLMWMLGSLGITKEEVKWAVC PKGESKGGSAALQLNSYACACEDDRAMGLA	228
De4H	MECIMNSNQDDPQEFF---DVCRDILMKSNYVRNLGLILFLLSEALCLKNHLEEMDCAEG-----LILGHYRACQPELTFRTS	251
Hy6H	AHGCHPLDQDLVNSWPEKPAKYREVVAKSVSEVRKLTMRMLDYICEGLLKLKGYFDNELSQIQ-----MMLTNYEPCREDESSTLCSG	215
F3H	TYFSYPTRRARYSRWPKPEGWI AVTQKSEKLMELACKLLDVLSEAMELEKEALTKACVDMD-----QKVVVNFYRCKSEDELTLGLK	218
FLS	AITMSYITLILVPEVQGLVFKDC--HYVDVKYIPNALIVHIGDQVEILSNCKYKSVYHRTTVNKKDTEMLWPFLEPPESEHVG---316	
ANS	AHTVSAIIFLHNMVPGLOLFYEG--KVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNCKYKSLRGLVNLKKEVRLSVAWVCEPPKDKIVLK---315	
Gi3H	AHTSTIITLILHQNNTSGLVFKEGS--GVTVPPFPALVNVGDLHLILSNGLYPSVLRRAVNVNRRHLSVAIYLYGPPSRVKS---313	
De4H	KESDSGFLITLMDQIQGLGILLEN--QIDVFPFIPGALVINIADLLQLITNDKFKSVEHRVLANKVGPRISVAVAFGLKQTQEGVSPR	339
Hy6H	GYDGNLITLILQDLPGLQLIVKDA-TIAVQPIPTAFVVKLGLTLKVIITNEKPEGSIHRVVTDPTRDRVSIATLIGEDYSCTIE---300	
F3H	RTDTPGTITLILQDQVGGLOATKDNKGTITITVQVVEGAFVVKLGDHGHFSLNGRKFNADHQAVVNSNSSELSIATFQNPAPAEIIVYPLKI	308
FLS	---PIPKLLE--ANPPKFKTKKYKDYVYCKLNKLPQ-----348	
ANS	---PLPEMVSV--ESPAKEPPTFAQIHBEKLFGEQEELVSEKND-----356	
Gi3H	---PLAKLVDQ--RHPPLYRAVTWSEYLGTKARHFDKALSSVRLCAPLSGFTDAKDHNQVVG	371
De4H	LYGPIKELISE--ENPPIYKEVTVDFITIRFAKRFDDSSLSPPRLNN-----386	
Hy6H	---PAKELLNQ--DNPPLYKPYSEYFADYLSKDSYDYGKPYKINV-----344	
F3H	R--EGEKSIMDEPITFAEMVRRKMSKDLLELARLKKQAKEQQLQAEVAEAKAKLESKPIEELLA--369	

Abb. 1.11.: Sequenzvergleich (ClustalW) von sechs pflanzlichen Dioxygenasen

FLS - Flavonol Synthase aus *Petunia hybrida* (accession no. Q07512), ANS - Anthocyanidin Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (accession no. 1GP6_A), Gi3H - Gibberellin β -Hydroxylase aus *Nicotiana tabacum* (accession no. BAA89316), De4H - Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* (accession no. AAC49827), Hy6H - Hyoscyamin 6β -Hydroxylase aus *Hyoscyamus niger* (accession no. BAA05630), F3H - Flavonon 3-Hydroxylase aus *Petunia hybrida* (accession no. Q07353); rot markierte Bereiche - identische Aminosäuren, gelb markierte Bereiche - Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz.

α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen sind bei der Protein Modifikation (z.B. Proyl 4-Hydroxylase), der Reparatur alkylierter DNA oder RNA (z.B. ALKB aus *Escherichia coli*), der Biosynthese von Antibiotika (z.B. Clavaminate Synthase), dem Lipidmetabolismus (z.B. ϵ -N-Trimethyl-L-Lysin-Hydroxylase aus dem Carnitinstoffwechsel) oder dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel involviert (Hausinger, 2004). Mehrere Enzyme, die an der Flavonoid- (Flavanon- β -Hydroxylase, Flavon Synthase I, Flavonol Synthase, Anthocyanidin Synthase, Flavonoid 6-Hydroxylase), Gibberellin- (Gibberellin 7-Oxidase, Gibberellin 20-Oxidase, Gibberellin 3-Hydroxylase) und Alkaloidsynthese (Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase, Hyoscyamin- 6β -Hydroxylase) involviert sind, wurden bisher kloniert (Britsch et al., 1992; Frey et al., 2003; Hausinger, 2004; Hedden, 1999; Itoh et al., 1999; Kanegae et al., 1994; Martens et al., 2001; Prescott et al., 2002; Vazquez-Flota et al., 1997; Wilmouth et al., 2002). Abb. 1.11. gibt einen Überblick über die Ähnlichkeit einiger der soeben erwähnten Proteinsequenzen.

Peroxidasen lassen sich in zwei Großgruppen unterteilen. In Thiolperoxidasen (Peroxiredoxine), die phylogenetisch in fünf Untergruppen eingeteilt werden (1-Cys, 2-Cys, Typ II, Typ Q und Glutathion Peroxidase) und Häm-Peroxidasen (Rouhier und Jacquot, 2005). Thiolperoxidasen sind intrazellulär zu finden, auch in Chloroplasten und Mitochondrien. Sie sind am Schutz des Photosynthese- und Atmungsapparates vor reaktiven Sauerstoffspezies und möglicherweise an der Signalübertragung bei biotischem oder abiotischem Stress, in dem Peroxide, Peroxynitrite, Hydroperoxide oder Lipidperoxide reduziert werden können, beteiligt (Dietz, 2003).

Häm-Peroxidasen gliedern sich in die Gruppe der tierischen und die Gruppe der Pilz/Bakterien/Pflanzen Peroxidasen. Die zuletzt genannte Gruppe wird phylogenetisch in die Klassen I - III aufgeteilt (Passardi et al., 2005; Welinder et al., 2002). Klasse I umfasst intrazelluläre Peroxidasen, wie die mitochondriale Cytochrom c Peroxidase aus Hefe (E.C. 1.11.1.5), die in Chloroplasten und Cytosol vorkommende Ascorbat Peroxidase aus Pflanzen (E.C. 1.11.1.6) und die Catalase Peroxidase aus Bakterien (E.C. 1.11.1.11). Sie haben vor allem die Aufgabe Peroxide zu entfernen und so den jeweiligen Organismus vor toxischen Peroxiden zu schützen (Welinder et al., 2002; <http://metallo.scripps.edu/promise/FPBPEROXIDASE.html>). In Klasse II sind verschiedene Lignin-abbauende und Mangan-abhängige Häm-Peroxidasen aus Pilzen eingeordnet. In Klasse III befinden sich die pflanzlichen Peroxidasen, die überwiegend extrazellulär wirksam sind. Sie katalysieren z.B. die Oxidation von toxischen Substanzen und sind an der Lignin Polymerisierung, dem Zellwandaufbau und dem Auxin Katabolismus beteiligt. In *Arabidopsis thaliana* wurden 71 Gene gefunden, die eine N-terminale ER-Zielssequenz für den Transport in das extrazelluläre Lumen tragen, während 10 Gene eine C-terminale Sequenz zum Transport in die Vakuole haben. Dabei handelt es sich zumeist um Monomere Glykoproteine, die vier konservierte Disulfidbrücken und zwei komplexierte Ca^{2+} -Ionen enthalten. Neben dem Protoporphyrin IX mit zentralem Fe^{3+} Zentralion, können auch Cytochrom c Häm-Typen mit zentralem Selen- oder Vanadium-Zentralion vorkommen (Welinder et al., 2002; <http://metallo.scripps.edu/promise/FPBPEROXIDASE.html>).

Die 3D-Strukturen mehrerer Peroxidasen sind inzwischen bekannt - z.B. die Cytochrome c Peroxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Goodin und McRee, 1993), die Mangan Peroxidase aus *Arthromyces ramosus* (Kunishima et al., 1993), die Peroxidase aus *Arachis hypogaea* (Schuller et al., 1996), die Peroxidase aus *Armoracia rusticana* (Meerrettich Peroxidase; Carlsson et al., 2005) und die Lignin Peroxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* (Blodig et al., 2001). Sie lassen eine gemeinsame Architektur erkennen, welche aus einer distalen H_2O_2 -Bindetasche mit den konservierten Aminosäuren Arginin (Bereich 38 - 52), Tryptophan/Phenylalanin (Bereich 41 - 55) und Histidin (Bereich 42 - 56) und der proximal liegenden Häm-Bindetasche mit den Aminosäuren Histidin (Bereich 163 - 184), Phenylalanin/Leucin/Tryptophan (Bereich 190 - 221) und Asparaginsäure (Bereich 208 - 247) besteht (<http://metallo.scripps.edu/promise/FPBPEROXIDASE.html>). Das Eisen-Protoporphyrin IX (Häm-Chromophor Typ b) ist über den Histidin-Rest gebunden. Die Bindung von Substrat erfolgt bei Peroxidasen (im Vergleich zu CYPs) relativ nah an der Oberfläche des Proteins, wodurch z.B. Hydroxylierungsreaktionen mehr oder weniger substrat-unspezifisch katalysiert werden könnten (Li und Poulos, 1994). Dabei ist anzumerken, dass Hydroxylierungen durch Peroxidasen noch relativ wenig untersucht sind. Mason et al. (1957) beschreiben die Aktivierung von molekularem Sauerstoff und dessen anschließendem Einbau in Form einer unspezifischen aromatischen Hydroxylierung durch Peroxidasen. Außer Sauerstoff benötigt diese Reaktion zusätzlich Dihydroxyfumarat als Elektronendonator.

1.5.2. O-Methyltransferasen

O-Methyltransferasen (OMTs) sind Enzyme, die meist stereospezifisch eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die Hydroxylgruppen des Akzeptormoleküls übertragen, wobei ein Methylether-Derivat und S-Adenosyl-Homocystein (SAH) entstehen. Akzeptormoleküle sind im Fall der Aryltetralin-Lignan Synthese die Phenylpropanoide, wie Kaffesäure, Kaffeoyl-CoA, Kaffeylalkohol oder -aldehyd, möglicherweise die Thujaplicatine (Thujaplicatin, Methylthujaplicatin) und β -Peltatin.

Ibrahim et al. (1998) teilten die Methyltransferasen nach ihrer Substratspezifität und nach dem Grad der Sequenzübereinstimmung in drei verschiedene Klassen mit Untergruppen ein. Bei dieser Gruppierung, bei der 26 Methyltransferasen verglichen wurden, ist nicht berücksichtigt, dass es bi- bzw. multifunktionelle Enzyme gibt (Gauthier et al., 1998; Frick und Kutchan et al., 1999; Schröder et al., 2002). So können die Kaffesäure/5-Hydroxyferularsäure (COMT) und Kaffeoyl-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT)

ein relativ großes Substratspektrum methylieren. Mit variabler Aktivität können z.B. von der COMT an aromatischen Ringen die freien Säuren (z.B. Kaffeesäure), Aldehyde (z.B. Hydroxyconiferylaldehyd) und 3-Hydroxy- oder 3,5-Dihydroxyalkohole (z.B. Kaffeylalkohol) umgesetzt werden (Eckardt, 2002). Joshi und Chiang (1998) und Noel et al. (2003) teilen pflanzliche OMTs in zwei Klassen ein. Klasse I enthält Mg^{2+} -abhängige OMTs mit niedrigen Molekulargewichten (23 - 28 kDa), die als Homodimere vorliegen. In diese Klasse sind vor allem CCoAOMTs eingeordnet. Klasse II setzt sich aus OMTs zusammen, deren Molekulargewichte zwischen 38 - 43 kDa liegen und die keine zweiwertigen Kationen für die katalytische Aktivität benötigen. Sie liegen ebenfalls als Homodimere vor und ihre Einordnung erfolgte vor allem auf Grund von Sequenz-Ähnlichkeiten, ihrer Länge und den Abständen zwischen den konservierten Bereichen. Insgesamt wurden dabei 43 OMTs aus verschiedenen Pflanzen verglichen und drei konservierte Sequenzbereiche, die vermutlich an der SAM-Bindung beteiligt sind, im C-Terminus gefunden (Joshi und Chiang, 1998). Ibrahim et al. (1998) bezogen für ihre Aufstellung OMT-Sequenzen aus dem Lignin-, Flavonoid-, Furanocumarin- und Alkaloidstoffwechsel ein, zusammen mit einigen OMTs aus Bakterien, Pilzen und Säugern. Sie postulierten ihrerseits fünf hoch konservierte Regionen im Bereich des C-Terminus. Die Kristallisation der Chalcon, Isoflavon und Kaffesäure/5-Hydroxyferulasäure OMTs aus *Medicago sativa* lieferte weitere Hinweise auf die Bindestellen für SAM und Substrat und die katalytischen Reste (He und Dixon, 1996; Maxwell et al., 1992; Zubieta et al., 2001; Zubieta et al., 2002). Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung erfolgt vermutlich über zwei konservierte Methionin-, einen Histidin- und zwei Glutaminsäure-Reste. Die Methionin-Seitenketten orientieren das aromatische Ringgerüst des Substrates in Richtung des SAM und der katalytischen Domäne, während das Histidin, das mit den beiden Glutaminsäuren über Wasserstoffbrücken interagiert, die Hydroxylgruppe deprotoniert. Über einen nukleophilen Angriff des Phenolat-Anions an der positiv geladenen Methylgruppe des SAM kommt es zur Übertragung dieser auf das Substrat (Zubieta et al., 2001).

1.5.3. Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen sind Enzyme, die ein Nucleotid-aktiviertes Monosaccharidmolekül auf ein Substratmolekül übertragen können, wobei ein glycosyliertes Produkt, Diphosphat und Wasser entstehen.

Glycosyltransferasereaktionen erfolgen hauptsächlich an freien Hydroxyl- oder Carboxylgruppen, können aber auch an S-, N-, oder C-Atomen erfolgen. Als Monosaccharideinheiten können Glucose, Rhamnose, Galactose, Xylose, Rutinose oder Neohesperidosen mit dem Akzeptormolekül glykosidisch verbunden werden (Lorenc-Kukula et al., 2004). Akzeptormoleküle können im Fall der Aryltetralin-Lignansynthese prinzipiell alle Substanzen mit freien OH-Gruppen sein, wie z.B. die Verbindungen des Phenylpropanstoffwechsels, Pinoresinol, Lariciresinol, Secoisolariciresinol, Matairesinol, PTOX, β -Peltatin und 6MPTOX. Durch die Glycosylierung wird die Wasserlöslichkeit erhöht, was vor allem bei Substanzen wichtig ist, die in bestimmten Kompartimenten akkumuliert werden (z.B. der Vakuole), aber sie kann auch bei der Stabilisierung von z.B. flüchtigen Substanzen oder der Regulierung einiger pflanzlicher Hormone (z.B. Indoleessigsäure) bedeutend sein.

Glycosyltransferasen werden auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeiten, Signaturmotive und der Stereochemie der glycosidischen Verbindung, sowie deren Zielspezifität, in etwa 78 Familien eingeordnet (Kim et al., 2006; EC 2.4.1.x.). Es handelt sich, abgesehen von wenigen Ausnahmen, um lösliche Enzyme mit einem Molekulargewicht von etwa 45 - 60 kDa.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Die „späten“-Schritte in der Biosynthese der Aryltetralin-Lignane sind noch weitestgehend unbekannt. Von DOP ausgehend konnten bisher nur die Enzyme DOP6H und β P6OMT in *L. nodiflorum* und *L. flavum* biochemisch charakterisiert werden. In dieser Arbeit werden die „späten“-Schritte der Aryltetralin-Lignanbiosynthese zweier Zellsuspensionskulturen von *L. album* biochemisch, phytochemisch und molekularbiologisch vergleichend untersucht. Dabei lag der Hauptfokus dieser Arbeit auf der Suche nach den DOP7H und PAM7H Reaktionen.

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene *L. album* Zellsuspensionskulturen verwendet. Von der Zelllinie 6M war bekannt, dass sie überwiegend 6MPTOX akkumuliert (Neumetzler, 2003), während Linie PT überwiegend PTOX bildet (Garden, 2004). Eine vergleichende Charakterisierung sollte zunächst klären, wie das unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster zustande kommt.

Enzymatik

Die enzymatischen Aktivitäten der DOP6H und β P6OMT sollten in Zellkulturen von *L. album* erstmals nachgewiesen, sowie ihre spezifischen enzymatischen Aktivitäten über den Kulturverlauf verfolgt werden. Desweiteren sollten ihre spezifischen Eigenschaften wie pH- und Temperaturabhängigkeit und die Michaelis-Menten Kinetiken in Proteinrohfraktionen ermittelt werden.

Phytochemie / Enzymatik

Die Enzyme PAM7H und DOP7H, die für die Hydroxylierung an Position 7 des DOP zu PTOX bzw. des β -Peltatin-A-Methylethers zu 6MPTOX verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund sollten Hinweise auf die Art dieser Hydroxylierungsreaktionen bzw. der dabei involvierten Enzyme gefunden werden. Die bisherigen Ergebnisse von A. Henges sollten dabei als Startpunkt für umfangreiche Biotransformationsexperimente und enzymatische Tests dienen.

Proteomics

Die Tatsache, dass Linie 6M bzw. PT unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster aufweisen, deutet darauf hin, dass zumindest einige wesentliche Unterschiede auf enzymatischer Ebene bestehen. Die beiden Zelllinien sollten aus diesem Grund proteinanalytisch untersucht werden und differentielle Proteinbanden einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden. Dies sollte dazu dienen, Sequenzinformationen von Enzymen zu erhalten, die an diesen Sekundärstoffwechselprozessen beteiligt sein könnten.

Molekularbiologie

Das unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster beider Zelllinien sollten auch molekularbiologisch untersucht werden. Mit Hilfe der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) sollten die Genexpressionsprofile der beiden Zelllinien vergleichend untersucht werden. Eine anschließende Macroarray-Analyse sollte dabei zur Verifizierung der Daten dienen. Auch in diesem Fall galt der Fokus dem Auffinden von Sequenzinformationen von Genen für Sekundärstoffwechselprozesse.

2. Material

2.1. Chemikalien

2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2,3,5-Triphenyl-tetrazolium Chlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Agar-Agar	Duchefa, Haarlem, Holland
Agarose	Invitrogen Life Technologies, Paisley, Schottland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Ampicillin	Grünenthal GmbH, Aachen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto®-Trypton	DIFCO laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva GmbH & Co, Heidelberg
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Celluloseacetatfilter (0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Coomassie G250	Merck KgaA, Darmstadt
Coomassie R250	Merck KgaA, Darmstadt
Coronalon	Stoffsammlung Prof. Dr. Boland, Jena
Coronalon	Stoffsammlung, Prof. Dr. Boland, Jena
Denhardt's Lösung (100x)	Eppendorf, Netheler
DIECA (Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat)	Merck KgaA, Darmstadt
Digitonin	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
dNTPs	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Dowex 1x2 prakt.	Serva GmbH & Co, Heidelberg
DTT (1,4-Dithiothreitol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA (Ethylendinitrilotetraacetat - Titriplex III)	Merck KgaA, Darmstadt
EGTA [Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure - Titriplex VI]	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Fischsperma-DNA	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Riedel-de-Haen, Seelze
Formamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Invitrogen Life Technologies, Paisley, Schottland
IPTG (Isopropyl-β-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Kaliumdichromat	Merck KgaA, Darmstadt
Methyljasmonat	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Miraclon	Calbiochem-Novabiochem Corp., USA
MOPS (3-Morpholino-1-propansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
myo-Inosit	Merck KgaA, Darmstadt
Naphtylessigsäure (NAA)	Merck KgaA, Darmstadt
Natrium-Ascorbat	Merck KgaA, Darmstadt
Nicotinsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Nylonmembran (Hybond™-N+)	Boehringer, Ingelheim
o-Phosphorsäure (85 %)	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
PD 10 Säulen	Amersham Biosciences, Ge Healthcare, München
Pd-C-OH	Acros Organics, Geel, Belgien
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Polyklar AT	ISP Technologies INC., Wayne, New Jersey
Pyridoxolhydrochlorid	Merck KgaA, Darmstadt

Quarzsand	Merck KgaA, Darmstadt
RNaseA	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
RNasin (RNase Inhibitor)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Saccharose	Kölner Raffinade Zucker, Pfeifer & Langen, Köln
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Serva Blue G	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
TEMED	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Thiaminchloridhydrochlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Titriplex III (Na ₂ -EDTA)	Merck KgaA, Darmstadt
Tris (Trizma Base)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Trypsin	Promega, Mannheim
x-GAL	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
α - ³² P-dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
β -Glucosidase aus Mandeln (7,1 U/mg)	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
ϵ -Aminocaprinsäure	Serva GmbH&Co, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien, wie z.B. Salze zur Medienherstellung, DC- oder HPLC-Laufmittel, wurden von den üblichen Herstellern wie Roth, Sigma Aldrich, T.J. Baker, Serva, Merck oder Fischer in p.A. Qualität bezogen.

2.1.2. Hemmstoffe

Aminobenzotriazol (ABT; Lösungsmittel: MeOH)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Clotrimazol (CLOT; Lösungsmittel: MeOH)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytochrom c aus Pferdeherz (Cyt c; Lösungsmittel: H ₂ O)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Pyridindicarboxylsäure 2,4 (PCA 2,4; Lösungsmittel: DMSO)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Pyridindicarboxylsäure 2,5 (PCA 2,5; Lösungsmittel: DMSO)	Aldrich, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
S-Adenosyl-Homocystein (SAH; Lösungsmittel: H ₂ O)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Tetacyclasis (NDA; Lösungsmittel: DMSO)	Dr. W. Rademacher, BASF AG, Ludwigshafen
Trinexapac-ethyl (Trinex; Lösungsmittel: MeOH)	Riedel-de-Haen, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3. Substrate / Co-Substrate / Standards für DC und HPLC

(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ (Ammoniumeisen(II)-sulfat-6-hydrat; Mohr'sches Salz)	Stoffsammlung, Prof. Dr. J. Schröder, Freiburg
4'-Demethyl-DOP	Naturstoffsammlung, Prof. Dr. A.W. Alfermann
6MPTOX	Naturstoffsammlung, Dr. J. Windhövel
Coniferylalkohol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
DOP I (für Standards eingesetzt)	Naturstoffsammlung, Prof. Dr. A.W. Alfermann
DOP II	eigene Synthese (3.2.2.)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus Hefe (372 U/mg Protein, 3,1 mg Protein/ml)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Glucose-6-Phosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Guajacol	Merck KgaA, Darmstadt
H ₂ O ₂ (Perhydrol)	Merck KgaA, Darmstadt
L(+)-Ascorbat(Na)Salz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Merck KgaA, Darmstadt
Matairesinol	Prof. Dr. R. Sjöholm, Turku, Finnland
NADP ⁺ -Dinatriumsalz	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
NADPH	Merck KgaA, Darmstadt
PAM	Naturstoffsammlung, Prof. Dr. A.W. Alfermann
PTOX I (für Standards eingesetzt)	Molecular Biosciences, Boulder, USA
PTOX II (für die Synthese eingesetzt), Reinheitsgrad p.A. (98 %)	China Dragon, Xi'an, China
S-Adenosylmethionin (SAM; Lösungsmittel: H ₂ O)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
UDP-Glucose	Boehringer, Ingelheim
Yatein	Prof. Dr. M. Medarde, Salamanca, Spanien
Zimtsäure	Serva GmbH & Co, Heidelberg
α-Ketoglutarat(Na)Salz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α-Ketoglutarensäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α-Peltatin	Naturstoffsammlung, Prof. Dr. A.W. Alfermann
β-Peltatin	Herb Standards, Lemont, Illinois, USA

Die Naturstoffe DOP, β-Peltatin, PAM, 6MPTOX, PTOX, Zimtsäure, Matairesinol und Yatein wurden in 100 % MeOH p.A. gelöst, Coniferylalkohol in 50 % MeOH (50 % H₂O), L-Phenylalanin in 0,1 M KPi-Puffer pH 8,0 und SAM, NADPH und NADP⁺ in H₂O.

2.2. Material für die Dünnschichtchromatographie (DC)

Kieselgelplatten 60:

F₂₅₄ (mit Fluoreszenzindikator), Aluminium-beschichtet,
0,2 mm Schichtdicke

Merck, Darmstadt

Laufmittel:

Ethylacetat : n-Hexan (1:2) oder (1:1)

2.3. Material für die Säulenchromatographie

Glassäulen:

mit Fritte (Porengröße: 1), Länge 20 - 30 cm, Ø 2,5 oder 5 cm

Glasbläserei, Uni-Düsseldorf

Kieselgel 60:

0,04 - 0,063 mesh

2.4. Material für die HPLC

Thermoquest, Thermo Separation[®] Products, Egelsbach mit: Laufmittelentgaser, Probengeber (Spektra SYSTEM AS1000), Detektor (Sektra SYSTEM UV6000LP) und Pumpe (Sektra SYSTEM P2000).

HPLC-Säule: GROM-SIL 120 ODS-5 ST(250 x 4 mm, 5 µm) mit Vorsäule (200 x 4 mm, 5 µm), GROM, Herrenberg-Kayh

Laufmittel: hochreines, filtriertes Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B);

Filter: Celluloseacetat Filter, Porendurchmesser 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen

2.5. Pflanzenmaterial

Die getrockneten Wurzelstücke von *Anthriscus sylvestris* wurden von Dr. A. Koulman (Universität Groningen, Niederlande) gespendet. Die *Linum album* Zellsuspensionskulturen entstammen einer eigenen Anzucht aus Samenmaterial (Seitz et al., 1985; Smolny, 1993), wobei das Samenmaterial von Dr. A. Shamsavari (Research Institute of Forests and Rangelands, Teheran, Iran) gesammelt wurde.

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich die *L. album* Zellsuspensionslinien PT und 6M verwendet und für einige wenige Experimente die Kultur NO [Laborbezeichnungen: Linie PT = HermA; Linie 6M = 1-1-4; Linie NO = X4SF].



Abb. 2.1.: Zellsuspensionskulturen von *Linum album*
links: *Linum album* Zellsuspensionskulturen in Medium und von Medium befreite Zellaggregate (Petrischale) - Linien NO, PT und 6M;
rechts: vergrößerte Abb. der Zellaggregate - Linien NO, PT und 6M;

2.6. Medien

Alle Medien wurden für 20 min bei 118°C sterilisiert (Autoklav: Webeco Typ No. 5, Lüdenscheid). Die Komponenten für das **MS-Medium** für *L. album* Zellsuspensionskulturen sind in Tab. 2.1. aufgeführt. Dabei handelt es sich um ein verändertes Grundmedium nach Murashige und Skoog (1962).

Tab. 2.1.: Zusammensetzung des veränderten MS-Mediums für *L. album* Zellsuspensionskulturen

	Mediumskomponente	Konzentration [mg/l]
Makroelemente	KNO ₃	1900,0
	NH ₄ NO ₃	1650,0
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440,0
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
Mikroelemente	Na ₂ -EDTA	37,3
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8
	MnSO ₄ x H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,9
	H ₃ BO ₃	6,2
	KJ	0,83
	Na ₂ MoO ₄ x 5 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
Vitamine	Nicotinsäure	0,5
	Pyridoxolhydrochlorid	0,5
	Thiaminchloridhydrochlorid	0,1
Hormone	NAA (Naphtyllessigsäure)	0,4
Sonstiges	myo-Inosit	100,0
	Saccharose	30,0
	Glycin	2,0
pH-Wert	mit KOH auf 5,6 einstellen	

LB-Medium für *E. coli* Kulturen (1000 ml; pH 7,0):

10,0 g Bacto[®]-Trypton
5,0 g Bacto[®]-Hefeextrakt
10,0 g NaCl

LB-Medium fest für *E. coli* Kulturen (1000 ml; pH 7,0):

10,0 g Bacto[®]-Trypton
5,0 g Bacto[®]-Hefeextrakt
10,0 g NaCl
1,5 % (w/v) Agar-Agar

2.7. Bakterienstämme (*E. coli*)

DH5 α F⁻, gyrA96, (Nal^r), recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17, (rk-mk+), glnV44, deoR,
 Δ (lacZYA-argF)U169, [Φ 80d Δ (lacZ)M15];
(Hanahan, 1983; Biolabs, Schwalbach)

2.8. Plasmide

pGEM[®]-T:

T7-Promotor, LacZ-Startcodon,
Lac-Operon, Amp^r, 3 kb
(Promega, Madison, USA)

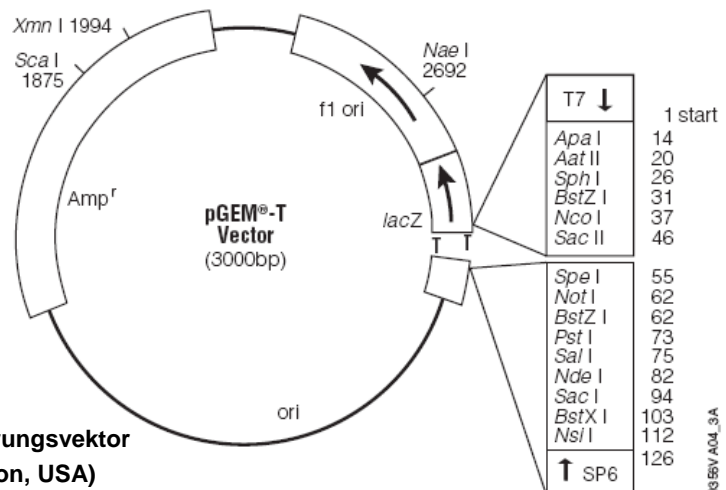


Abb. 2.2.: pGEM[®]-T Klonierungsvektor der Firma Promega (Madison, USA)

2.9. Enzyme für die Molekularbiologie

Apa I (10 U/ μ l)

MuLV Reverse Transkriptase (Minus H)

Pst I (10 U/ μ l)

RNase A (Ribonuclease A, bovine pancreas)

Sac II (10 U/ μ l)

Spe I (*Bcu I*; 10 U/ μ l)

Taq-Polymerase

Xba I (*fr 421*; 10 U/ μ l)

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Serva GmbH & Co, Heidelberg

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Herstellung Arne Schwelm, 2000

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Für die angegebenen Enzyme wurden die jeweils mitgelieferten Puffer verwendet, mit Ausnahme der „eigenen“ Taq-Polymerase [Puffer von Invitrogen für Taq-Polymerase; 10X: 200 mM Tris/HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] und der RNase A (wurde in H₂O verdünnt).

2.10. Oligonukleotide

Die Synthese der Primer wurde von der Firma MWG Biotech (München) angefertigt, mit Ausnahme des Oligo dT Primers. Dieser wurde dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche (Nr. 1483188) entnommen.

C4H	Primer F1 (5') - 5'-GGNAA(C/T)TGG(C/T)TICA(A/G)GTIGGNGA(C/T)G-3' Primer R1 (5') - 5'-AA(A/G)TC(A/G)TTICC(A/G)TTNGC(C/T)TC-3'
C4H nested	Primer F2 (5') - 5'-GGNAA(A/G)GGICA(A/G)GA(C/T)ATGG-3' Primer R2 (5') - 5'-GG(A/G)TT(A/G)TTIGCIA(A/G)CCACCANGC-3'
Aktin	Primer F (5') - 5'-ATGGA(G/A)AA(G/A)ATNTGGCATC-3' Primer R (3') - 5'-ACATCTG(C/A)TGGAANGTGC-3'
T7	Primer F (5') - 5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6 modifiziert	Primer R (3') - 5'-TAGGTGACACTATAGAATACTC-3'
Oligo dT Primer	Primer F (5') - 5'-dTAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
LAPLRI	Primer R (3') - 5'-GGAATTCATATGGGTTCCCTGGGGAAAGTG-3' Primer R (5') - 5'-CCGCTCGAGCTAGACGTAACGCTTTAGATATTCC-3'

Sonderbezeichnungen: I - Inosin; N - A, T, C oder G;

2.11. Kits für die Molekularbiologie

Advantage™ cDNA PCR Kit Polymerase Mix	BD Biosciences, Heidelberg
BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences, Heidelberg
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Applied Science, Mannheim
Nick Translation PCR Kit	Invitrogen Life Technologies, Paisley, Schottland
pGEMT®-T Vector Kit	Promega, Madison, USA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3. Methoden

3.1. Anzucht der Zellsuspensionskulturen

Die Zellsuspensionskulturen von *L. album* Kotschy werden bereits seit mehreren Jahren in unserem Labor kultiviert. Sie werden in permanenter Dunkelheit, 25°C und 120 Upm auf einem Rundschtüttler (G53, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) mit 5 cm Auslenkung in 250 oder 300 ml Erlenmeyerkolben gehalten. Diese Kulturen wurden nach Standardverfahren aus Samen, über Spross- und Kalluskulturen gewonnen (Seitz et al., 1985; Smolny, 1993). Zur Erhaltung werden im Abstand von sieben Tagen je 5 g Zellen in 50 ml frisches MS-Medium (verändertes Grundmedium nach Murashige und Skoog, 1962; 2.6.) steril überführt. Die vorhandenen Zelllinien sind genetisch nicht einheitlich und wurden hinsichtlich ihres PTOX- bzw. 6MPTOX-Gehaltes ausgewählt (2.5.).

3.2. Gewinnung der Vorstufe Deoxypodophyllotoxin

3.2.1. DOP-Extraktion aus *Anthriscus sylvestris*

In Anlehnung an van Uden et al. (1997) sollte DOP möglichst effektiv und mit wenig Zeitaufwand mit einer stark vereinfachten Methode aus *Anthriscus sylvestris* Wurzeln extrahiert werden. 4 g getrocknete und zerkleinerte Wurzelstücke wurden über Nacht in einer Extraktionshülse mit ca. 110 - 120 ml Methanol inkubiert und am folgenden Tag unter kontinuierlichem Rückfluss in einer Soxhlet-Apparatur für 12 Stunden extrahiert. Reste des für die Inkubation verwendeten Methanols wurden am Ende zu den Extrakten zugegeben. Der Extrakt wurde unter Vakuum bis auf einen zähflüssigen braunen Rückstand zur Trockne eingeeengt, in 5 ml Aceton:n-Hexan (1:2) aufgenommen und in einen Spitzkolben überführt. Am Grund des Rundkolbens blieb eine relativ feste zähflüssige Masse zurück, die nicht resuspendierbar war. DC-Analyse (dünnschichtchromatographische Analyse) ergab, dass in dieser Masse kein DOP enthalten war, sondern lediglich im löslichen Extrakt. Dieser Rohextrakt wurde mit einer Pasteurpipette auf eine Kieselgelsäule (ca. 30 cm lang, Ø 2,5 cm) aufgetragen, Reste im Kolben mit 5 - 10 ml Laufmittel [Aceton:n-Hexan (1:2)] nachgespült, ebenfalls aufgetragen, die Lösung mit weiteren 10 - 15 ml Laufmittel überschichtet und nach dem Absetzen des leicht aufgewirbelten Materials 21 Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen 1 und 18 enthielten je 20 ml, die Fraktion 12 8 ml, die Fraktionen 2 - 11 und 13 - 17 je 10 ml und die Fraktionen 20 und 21 je 30 ml. Die DC-Analyse ergab, dass die Fraktionen 11 - 21 DOP enthalten könnten, was mittels HPLC-Analytik (3.8.) überprüft wurde.

3.2.2. DOP-Synthese aus PTOX

Die DOP-Synthese wurde nach Jackson und Dewick (1984) modifiziert durchgeführt. 50 oder 500 mg PTOX (China Dragon, Xi'an, China) wurden in einen Rundkolben mit etwa der gleichen Menge an Pd-C-OH (Palladiumhydroxid auf Kohlenstoffpulver) und 10 bzw. 100 ml Essigsäure p.A. versetzt und unter Rühren und ständiger H₂-Begasung für ca. 16 - 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Länge der Inkubation war von der Menge an eingesetztem PTOX bzw. dessen vollständiger Umsetzung abhängig. Die Umsetzungsraten wurden mittels DC-Analysen kontrolliert. Zeigte die Analyse, dass kein PTOX mehr vorhanden war, wurde die Synthese beendet, im Verhältnis 1:1 Ethylacetat (Entstehung eines azeotropen Gemisches) zugegeben und zur Trockne eingeeengt. Der Syntheseansatz wurde in 5 - 10 ml Laufmittel [Ethylacetat:n-Hexan (1:1)] resuspendiert, auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und nach Eindringen des Laufmittels mit weiterem Laufmittel überschichtet. Es wurden Fraktionen von 25 bzw. 50 ml aufgefangen. Die Größe der Kieselgelsäule richtete sich nach der zu reinigenden Menge an DOP, zwischen 10 - 20 cm Länge und 2,5 oder 5 cm Durchmesser. Jede Fraktion wurde mittels DC auf ihren DOP-Gehalt getestet. Die DOP-enhaltende Fraktionen wurden zur Trockne eingeeengt, in 0,5 - 50 ml Methanol resuspendiert (in Abhängigkeit von der DOP-Substanzmenge, sichtbar als weißer Pulverrückstand) und je nach Bedarf verdünnt. Nach HPLC Analyse (3.8.) wurden die DOP-enhaltenden Fraktionen mit einer Reinheit von

≥ 80 % vereinigt und in trockenem Zustand bei -20°C gelagert. Die chemische Synthese wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. K. Knorr und Prof. Dr. G. Wulff am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Fachgebiet Chemie (HHU Düsseldorf) durchgeführt. Von den vereinigten Fraktionen wurde ein Aliquot zur NMR-Spektroskopie gegeben, die von Prof. Dr. Schmidt (Institut für Pharmazeutische Biologie, ehemals HHU Düsseldorf, jetzt Westfälische Wilhelms-Universität Münster) am Institut für Anorganische Chemie (Abteilung Prof. Dr. Frank) durchgeführt wurde. Es wurden ein ¹H-NMR und ein ¹³C-NMR Spektrum unter Deuteriochloroform (CDCl₃) als Lösungsmittel bei 500 MHz bzw. 125 MHz aufgenommen (Bruker Spektrometer DRX 500 NMR, Rheinstetten).

3.3. Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen

Die Zellsuspensionskulturen 6M und PT wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Im Verlauf von 16 Tagen wurden die Aktivitäten der PAL, CAD, C4H, DOP6H und βP6OMT ermittelt. Parallel dazu wurden über 21 Tage die Mediumsparameter, wie Zuckergehalt, pH-Wert und Leitfähigkeit des Mediums, sowie die Wachstumsparameter, bestehend aus Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) und die Lignangehalte bestimmt.

Die Ernte der Zellen erfolgte täglich, um etwa die gleiche Zeit, indem das Medium über einen Büchnertrichter (versehen mit Miracloth als Filter) unter Vakuum filtriert wurde. Das Absaugen des Mediums erfolgte möglichst kurz (nicht länger als 1 min), um vorhandene Enzymaktivitäten nicht durch Trockenstress zu verlieren. Das FG wurde bestimmt, 30 - 40 g des Zellmaterials für die Aufarbeitung der mikrosomalen Enzyme (C4H und DOP6H) in eine eisgekühlte Reibschale, 6 g Zellen in Zentrifugenröhrchen (Sorvall) für die Aufarbeitung der löslichen Enzyme (PAL, CAD und βP6OMT) und 8 bis maximal 20 g in tarierte Petrischalen für die Bestimmung der Lignangehalte und Trockengewichte überführt.

3.3.1. Bestimmung der Mediumsparameter

Die Leitfähigkeit, der pH-Wert und der Zuckergehalt wurden in von Zellen befreitem Medium bestimmt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode (Mettler Toledo, Udorf Schweiz; InLab[®] Mikro pH-Einstabmessskette 412; WTW pH-Meter 646, Knick, Weilheim) bestimmt. Die Leitfähigkeit, als ein Maß für die Ionenkonzentration wurde mittels Leitfähigkeitselektrode (Batteriekonduktometer LF 91 mit Standardmesszelle KLE 1/T, WTW Weilheim) und der Zuckergehalt über den Brechungsindex, mittels Handrefraktometer (Krüss, Hamburg) ermittelt.

3.3.2. Bestimmung der Wachstumsparameter

FGs-Gehalte wurden direkt nach dem Befreien der Zellen vom Medium bestimmt und in FG/g Kolben angegeben. Die abgewogenen 8 - 20 g Zellmaterial in den tarierten Petrischalen wurden zunächst bei -20°C eingefroren, gefriergetrocknet (Gefriertrockner: Alpha 1-4, Christ Osterode; Vakuumpumpe: Pfeiffer, Balzers Gruppe, Vaduz) und anschließend die TG ermittelt.

3.3.3. Enzymaufarbeitungen

3.3.3.1. Enzymaufarbeitungen für lösliche Proteine

6 g Zellen der Linie 6M wurden mit je 1 ml/g FG Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM DIECA) versetzt, während Zellen der Linie PT (um eine homogene Masse erzeugen zu können) 6 bis 8 ml mehr Puffer erhielten (3.3.3.2.). Nach Zugabe von 1/5 des FGs an Polyklar AT, erfolgte der Zellaufschluss mit

einem Schlagmesserhomogenisator auf Stufe 4 (Ultraturrax TP 18/10, Janke & Kunkel, Staufen) für dreimal 30 sec. auf Eis. Das Homogenat wurde für 20 min bei 20.000 Upm und 4°C (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B) zentrifugiert. Der Überstand wurde über Glaswolle filtriert und das Volumen in einem graduierten Röhrchen bestimmt. Ein Teil der Proteinlösung wurde für die Aktivitätsbestimmung der β P6OMT auf Eis aufbewahrt, während der Rest bei -20°C gelagert wurde. Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte zusammen mit den mikrosomalen Proteinen.

3.3.3.2. Enzymaufarbeitungen für mikrosomale Proteine

Die jeweils in die Reibschalen eingewogenen Zellen wurden mit je 1 ml/g FG Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM DIECA) versetzt. Bei Linie PT wurde je nach Bedarf 4 - 10 ml Puffer zusätzlich zugegeben, damit der Zellbrei eine flüssige homogene Masse beim Zerreiben ergab. Zu dem mit Puffer versetzten Zellmaterial wurden 1/5 des FGs Polyklar AT und 0,17 g/g FG Quarzsand zugegeben. Unter ständiger Kühlung wurden die Zellen zu einem einheitlichen Brei zerrieben (ca. 5 min). Nach Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 8.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B) wurden die Volumina der Überstände bestimmt. 1 M $MgCl_2$ Lösung wurde langsam und tropfenweise so zugegeben, dass die Endkonzentration in der Proteinlösung 50 mM betrug. Anschließend wurde für 20 min auf Eis gerührt. Diese Lösung wurde für 20 min bei 4°C und 20.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B) ungebremst zentrifugiert. Die Pellets wurden in Aufarbeitungspuffer resuspendiert und in einem Glas-Homogenisator vier- bis fünfmal homogenisiert. Nach Volumenbestimmung wurden je 2,5 ml der Mikrosomenlösung mittels PD10-Säulen entsalzt. Die PD10-Säulen wurden zuvor mit ca. 50 ml Aufarbeitungspuffer äquilibriert. Die Mikrosomenlösung wurde mit 3,0 ml eluiert und der Proteingehalt nach Bradford (1976) unter Verwendung einer BSA-Lösung (1 mg/ml) als Standard bestimmt.

3.3.4. Enzymteste

3.3.4.1. Enzymteste für lösliche Proteine

Die Enzymaktivitäten der PAL und CAD wurden photometrisch nach Zimmermann und Hahlbrock (1975) bzw. Wyrambik und Grisebach (1975) gemessen. Dafür wurden die Proteinlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

PAL:

Die Photometerkammer (Uvikon 930 Spektrometer, Kontron Instruments, Tegimenta, Schweiz) wurde eine Stunde vor Beginn auf ca. 36°C erwärmt. Die Enzymteste wurden in Plastik UV-Küvetten (Sarstedt) wie folgt zusammengesetzt:

**Tab. 3.1.: PAL -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes**

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M KPi Puffer pH 8,0	650 μ l	50 - 220 μ g 20 mM
Proteinlösung	150 μ l	
0,1 M L-Phenylalanin (in 0,1 M KPi Puffer pH 8,0)	200 μ l	
Testvolumen	1000 μ l	

Die entsprechenden Referenzen enthielten anstelle von L-Phenylalanin das entsprechende Volumen Puffer. Nach 10-minütiger Vorinkubation des Testansatzes im Photometer wurde die Extinktionszunahme der gebildeten *trans*-Zimtsäure ($\epsilon = 10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei $\lambda = 290 \text{ nm}$ über einen Zeitraum von 20 min verfolgt. Die Proteinlösungen mussten je nach Alter der Zellen z.T. bis zu fünffach verdünnt werden (Dreifachproben).

CAD:

Die Photometerkammer wurde auf 30°C vorgewärmt und die Enzymteste in Plastik UV-Küvetten wie folgt zusammengesetzt:

**Tab. 3.2.: CAD -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes**

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 8,8 Puffer	900 µl	
2 mM NADP ⁺ (in H ₂ O)	50 µl	100 µM
Proteinlösung	25 µl	20 - 130 µg
Testvolumen	1000 µl	

Die Proteinlösung wurde unverdünnt eingesetzt. Nach 5 minütiger Vorinkubation im Photometer wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 4 mM Coniferylalkohol (in 2 % Methanol; Endkonzentration - 100 µM), bzw. die Referenz mit 25 µl 2 % Methanol gestartet. Die Zunahme der Coniferaldehydmenge ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ über 15 min beobachtet (Doppelproben).

Standardenzymtest der β P6OMT:

Die Enzymteste der β P6OMT wurden in Anlehnung an Kranz und Petersen (2003) wie folgt durchgeführt:

**Tab. 3.3.:
 β P6OMT -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes**

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 7,5 Puffer (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA)	x µl	
Proteinlösung	y µl	ca. 100 µg
2 mM SAM (in H ₂ O)	10 µl	80 µM
2,5 mM β -Peltatin (in Methanol)	8 µl	80 µM
Testvolumen	250 µl	

Die Inkubationsdauer betrug 0 bzw. 60 min bei 37°C, wobei die 0-Kontrollen direkt nach β -Peltatin Zugabe mit 25 µl 6N HCl abgestoppt wurden (Dreifachproben). Nach dem Abstoppen aller Ansätze wurden diese dreimal mit je 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die mittels Vakuumverdampfer (Speed-Vac Concentrator) eingetrockneten Reste wurden mit je 150 µl Methanol resuspendiert, Schwebstoffe für 5 min bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) abzentrifugiert und 120 µl des jeweiligen Überstandes für die HPLC-Analyse (3.8.) verwendet.

3.3.4.2. Enzymteste für Mikrosomale Proteine

Die Aufarbeitung und Enzymteste der mikrosomalen Proteine wurden nach Anleitung von Prof. Dr. M. Petersen und Dr. S. Kuhlmann durchgeführt (Molog et al., 2001).

C4H:

Bei den C4H-Enzymtesten wurden die einzelnen Komponenten wie folgt zugegeben. Die Inkubationsdauer betrug 0 bzw. 5 min bei 30°C.

**Tab. 3.4.: C4H -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes**

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 7,5 Puffer (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA)	x µl	
Mikrosomensuspension	y µl	ca. 50 µg
10 mM NADPH (in H ₂ O)	5 µl	500 µM
5 mM Zimtsäure (in Methanol)	2 µl	100 µM
Testvolumen	100 µl	

DOP6H:

Die DOP6H Testansätze wurden für 0 bzw. 30 min bei 30°C inkubiert und wie in Tabelle 3.5. beschrieben zusammengesetzt. Nach Abstoppen der Testansätze (Dreifachproben) mit 25 µl 6N HCl wurden diese jeweils dreimal mit 200 µl Ethylacetat extrahiert, nach dem Eintrocknen mittels Vakuumverdampfer (Speed-Vac Concentrator) die Rückstände in 150 µl Methanol resuspendiert, Schwebstoffe für 5 min bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge) pelletiert und die Proben mittels HPLC analysiert (3.8.).

**Tab. 3.5.: DOP6H
- Zusammen-
setzung des
Enzymtestes**

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 7,5 Puffer (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA)	x µl	
Mikrosomensuspension	y µl	ca. 50 µg
10 mM NADPH (in H ₂ O)	5 µl	500 µM
1,5 mM DOP (in Methanol)	2 µl	30 µM
Testvolumen	100 µl	

3.3.5. Bestimmung der Lignangehalte

Die Extraktion der Lignane erfolgte nach Empt et al. (2000). Dabei wurden 0,2 g der gefriergetrockneten Zellen zu einem feinen Pulver zerrieben, mit 2 ml Methanol p.A. versetzt, zweimal je 30 sec. im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 103 H, Bandelin Electronics, Berlin) inkubiert, zwischendurch auf Eis abgekühlt und mit 6 ml bidest. Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit verdünnter *o*-Phosphorsäure auf 5 eingestellt und je 1 mg β -Glucosidase aus Mandeln (in 100 µl H₂O) zugegeben. Die Zugabe der β -Glucosidase bewirkt die Freisetzung glucosilierter Lignane. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 35°C im Wasserbad inkubiert und abschließend mit 12 ml Methanol versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation im Ultraschallbad bei 70°C wurden die Zellfragmente pelletiert (5 min, 4.500 Upm, Raumtemperatur; Eppendorf Zentrifuge 5804 R), die Volumina der Überstände bestimmt und Aliquots für die Bestimmung der Lignangehalte entnommen. Die Aliquots wurden für 5 min bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) von Schwebstoffen befreit und mittels HPLC analysiert (3.8.).

3.4. Biochemische Charakterisierung der DOP6H

3.4.1. Bestimmung allgemeiner Parameter

Untersucht wurden pH- und Temperaturoptimum, Protein- und Zeitabhängigkeit der DOP6H aus der Zelllinie 6M. Die Enzymaufarbeitungen erfolgten wie unter 3.3.3.2. beschrieben (mikrosomale Proteine) mit 5 Tage alten Zellen, mit Ausnahme der Untersuchung des **pH-Optimums**. Dabei erfolgten die Enzymaufarbeitungen direkt in verschiedenen Pufferlösungen. Verwendet wurden 0,1 M Tris/HCl Puffer mit pH-Werten von 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 und 9,0. Die Testansätze wurden nach dem Standardenzymtest der DOP6H (siehe unten) zusammengestellt, enthielten aber als Pufferlösung die jeweils für die Aufarbeitung verwendete.

Bei der Untersuchung der **Proteinabhängigkeit** wurden in einem Vorversuch zunächst die Proteinmengen 0, 50, 150, 100, 200, 300, 400 und 500 µg eingesetzt und für 30 min inkubiert. Bei der Wiederholung dieses Experimentes wurden in den jeweiligen Testansätzen 0, 50, 100, 200, 300, 400, 600 und 800 µg Protein verwendet.

Bei der Untersuchung der **Zeitabhängigkeit** wurden die Enzymteste nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 oder 60 min abgestoppt und die Bildung des Produktes analysiert.

Zur Bestimmung des **Temperaturoptimums** der DOP6H Reaktion, wurden die einzelnen Testansätze

bei 0, 4, 20, 26, 28, 30 34, 37, 40, 50, 60 oder 100°C im Wasserbad für 20 min inkubiert.

Die Experimente für die Ermittlung des Temperatur- und pH-Optimums und der Protein- und Zeitabhängigkeit wurden für jede Zelllinie zweimal unabhängig voneinander in Form von Doppelproben durchgeführt. Zusätzlich wurde das entstandene Produkt β -Peltatin mittels LC/MS im Vergleich zu einer Standard- β -Peltatin Lösung (1,036 mg/ml) auf seine Identität überprüft. Hierzu wurden 60 Testansätze parallel zueinander nach dem Standardenzymtest pipettiert, 30 direkt mit 50 μ l 6N HCl abgestoppt und die Restlichen nach 60 min. Die „Positiv“- (für 60 min inkubiert) bzw. „Negativ“- (0 min inkubiert) Ansätze wurden in einem Glasröhrchen vereinigt und jeweils dreimal mit je 7,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfer in einem tarierten Spitzkolben eingetrocknet (Rotavapor RE 111). Die Gesamtmenge an Extrakt von 14,7 bzw. 13,9 mg wurde à 0,2 μ g/ μ l resuspendiert und nach 10-facher Verdünnung zur Analyse gegeben (3.9.).

Standardenzymtest der DOP6H:

Die Inkubation des Standardenzymtestes erfolgte bei 30°C.

Tab. 3.6.: DOP6H - Zusammensetzung des Enzymtestes

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 7,5 Puffer * (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA)	x μ l	
Mikrosomensuspension **	y μ l	338 μ g
50 mM NADPH (in H ₂ O)	5 μ l	500 μ M
2,5 mM DOP (in Methanol)	10 μ l	50 μ M
Testvolumen	500 μ l	

- * - bei der Bestimmung des pH-Optimums variierten die pH-Werte des Puffers zwischen 6 - 9
- ** - bei der Bestimmung der Proteinabhängigkeit variierten die Werte zwischen 0 - 800 μ g Protein

3.4.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für DOP und NADPH

Untersucht wurden die Cosubstrat- (NADPH) und Substrat- (DOP) Abhängigkeit der DOP6H aus 5 Tage alten Zellen der Linie 6M. Die Enzymaufarbeitung erfolgte wie unter 3.3.3.2 beschrieben. Es wurde der Standardenzymtest der DOP6H (3.4.1.) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 20 min im Wasserbad, wobei die Proben nach 15 min geschüttelt wurden. Die NADPH und DOP Konzentrationen variierten je nach Enzymtest (siehe Tabellen unten).

Tab. 3.7.: DOP und NADPH Konzentrationen der verschiedenen Enzymteste

eingesetzte NADPH-Lösung	NADPH-Endkonzentration
0 mM	0 mM
1 mM	0,01 mM
2,5 mM	0,025 mM
5 mM	0,05 mM
10 mM	0,1 mM
25 mM	0,25 mM
50 mM	0,5 mM
75 mM	0,75 mM
100 mM	1 mM

eingesetzte DOP-Lösung	DOP-Endkonzentration
0 mM	0 μ M
0,05 mM	1 μ M
0,1 mM	2 μ M
0,15 mM	3 μ M
0,2 mM	4 μ M
0,25 mM	5 μ M
0,3 mM	6 μ M
0,4 mM	8 μ M
0,5 mM	10 μ M
2,5 mM	50 μ M
5 mM	100 μ M
10 mM	200 μ M
20 mM	400 μ M

Die Bestimmung der K_M - und v_{max} - Werte erfolgte fünfmal unabhängig voneinander (Doppelproben). Im Anschluss wurden die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten für NADPH und DOP sowie v_{max} graphisch mit dem Programm SigmaPlot 2001 (10.2.3.) und rechnerisch nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard ermittelt.

3.4.3. Bestimmung der Inhibition der DOP6H

CYP Enzyme sind durch verschiedene spezifische Hemmstoffe inhibierbar. Der Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die DOP6H wurde in-vitro getestet. Neben den Cytochrom P450 Hemmstoffen Tetcyclasis (NDA), Clotrimazol (CLOT) und Aminobenzotriazol (ABT) wurden die Dioxygenase Hemmstoffe Pyridindicarboxylsäure 2,4 (PCA 2,4), Pyridindicarboxylsäure 2,5 (PCA 2,5) und Trinexapac-Ethyl (Trinex) in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-5} M zu den Standardenzymtesten zugegeben. Da ABT keine Hemmung der DOP6H zeigte, wurde die Zugabe einmalig auf 5×10^{-4} M erhöht.

Nach diesen Vorversuchen wurde der Einfluss der CYP Hemmstoffe CLOT und NDA durch Gabe verschiedener Konzentrationen im Standardenzymtest genauer untersucht. Zusätzlich wurde Cytochrom c als weiterer Inhibitor von Cytochrom Enzymen verwendet. Für CLOT und NDA wurden die Inhibitionsexperimente dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, für Cyt c zweimal (Doppelproben à 2,5 µl NDA oder CLOT-Hemmstofflösung/Enzymtest; bzw. 10 µl Cyt c/Enzymtest).

Tab. 3.8.: NDA, CLOT und Cyt c Konzentrationen der verschiedenen Enzymteste

eingesetzte Hemmstofflösung- (NDA oder CLOT)	Hemmstoff-Endkonzentration	eingesetzte Hemmstofflösung- (Cyt c)	Hemmstoff-Endkonzentration
0 mM	0 mM	0 mM	0 mM
0,2 mM	0,001 mM	12,5 µM	0,25 µM
0,4 mM	0,002 mM	25 µM	0,5 µM
1 mM	0,005 mM	37,5 µM	0,75 µM
2 mM	0,01 mM	50 µM	1 µM
10 mM	0,05 mM	62,5 µM	1,25 µM
20 mM	0,1 mM	75 µM	1,5 µM
40 mM	0,2 mM	87,5 µM	1,75 µM
100 mM	0,5 mM	100 µM	12 µM
		112,5 µM	2,25 µM
		125 µM	2,5 µM

Die kinetischen Eigenschaften der Enzyme bei Gabe dieser Hemmstoffe wurden durch Hemmkinetiken genauer untersucht. Dabei wurden zu den Standardenzymtesten variable Konzentration an Hemmstoff und DOP zugegeben und bei 30°C für 20 min inkubiert (Konzentrationen der Stocklösungen siehe oben, eingesetzt wurden 2,5 µl Hemmstoff bzw. 10 µl DOP und Cyt c/Standardenzymtest).

Tab. 3.9.: NDA, CLOT und DOP Konzentrationen der verschiedenen Enzymteste

eingesetzte Hemmstofflösung- (NDA oder CLOT)	Hemmstoff-Endkonzentration	eingesetzte DOP-Lösung	DOP-Endkonzentration
0 mM	0 mM	0 mM	0 µM
0,4 mM	0,002 mM	0,05 mM	1 µM
2 mM	0,01 mM	0,1 mM	2 µM
10 mM	0,05 mM	0,15 mM	3 µM
20 mM	0,1 mM	0,25 mM	5 µM
40 mM	0,2 mM	0,4 mM	8 µM
		2,5 mM	50 µM
		5 mM	100 µM

Die Durchführung der Experimente erfolgte zweimal unabhängig voneinander (Doppelproben). Im Anschluss wurden die Ergebnisse wie unter 3.4.2. beschrieben ausgewertet. K_i -Werte wurden graphisch nach Dixon bestimmt (Dixon und Webb, 1964).

3.5. Biochemische Charakterisierung der β P6OMT

3.5.1. Bestimmung allgemeiner Parameter

Temperatur- und pH-Optimum, Protein- und Zeitabhängigkeit der β P6OMT aus den Zelllinien 6M und PT wurden untersucht. Die Enzymaufarbeitungen mit 5 Tage alten Zellen erfolgten wie unter 3.3.3.1. (lösliche Proteine) beschrieben. Bei der Untersuchung des **pH-Optimums** erfolgte die Enzymaufarbeitung direkt in verschiedenen Pufferlösungen. Es wurde ein 0,1 M Tris/HCl Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten von 5,4; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 und 8,8 verwendet. Die Enzymtestansätze

wurden nach dem Standardenzymtest der β P6OMT (3.3.4.1.) zusammengestellt, enthielten aber als Pufferlösung die jeweils für die Aufarbeitung verwendete.

Bei der Untersuchung der **Proteinabhängigkeit** wurden in den jeweiligen Testansätzen verschiedene Proteinmengen von 0, 15, 25, 50, 80, 100, 150 und 200 μ g eingesetzt und für 30 min inkubiert.

Bei der Untersuchung der **Zeitabhängigkeit** wurden die Enzymteste nach 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 oder 300 min abgestoppt und die Bildung des Produktes analysiert.

Zur Bestimmung des **Temperaturoptimums** der β P6OMT Reaktion, wurden die einzelnen Testansätze bei 0, 4, 21, 31, 35, 37 40, 50, 60 oder 100°C für 30 min inkubiert.

Die Experimente für die Ermittlung des Temperatur- und pH-Optimums und der Protein- und Zeitabhängigkeit wurden für jede Zelllinie zweimal unabhängig voneinander in Form von Doppelproben durchgeführt. Zusätzlich wurde das entstandene Produkt β -Peltatin-A-Methylether (PAM) mittels LC/MS im Vergleich zu einer Standard-PAM Lösung (1,071 mg/ml) auf seine Identität überprüft. Die Vorgehensweise erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben. Die Gesamtmenge an Extrakt von 7,6 bzw. 3,3 mg wurde à 0,2 μ g/ μ l resuspendiert und nach 10-facher Verdünnung zur Analyse gegeben (3.9.).

3.5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für β -Peltatin und SAM

Die Cosubstrat- [SAM (S-Adenosyl-Methionin)] und Substrat (β -Peltatin)-Abhängigkeit der β P6OMT aus Linie 6M und PT wurden parallel zueinander untersucht. Die Enzymaufarbeitung erfolgte wie unter 3.3.3.2. beschrieben. Der Standardenzymtest der β P6OMT (3.3.4.1.) wurde unter Einsatz variabler Substrat- bzw. Cosubstrat-Konzentrationen verwendet (Tab 3.10.). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min im Wasserbad. Die Bestimmung der apparenten K_M - und v_{max} - Werte wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt (Doppelproben). Die Auswertungen erfolgten wie unter 3.4.2. beschrieben.

Tab. 3.10.: β -Peltatin und SAM Konzentrationen der verschiedenen Enzymteste

eingesetzte β -Peltatin-Lösung	β -Peltatin-Endkonzentration	eingesetzte SAM-Lösung	SAM-Endkonzentration
0 mM	0	0 mM	0
0,16 mM	0,005 mM	0,31 mM	0,01 mM
0,31 mM	0,01 mM	0,78 mM	0,025 mM
0,55 mM	0,0175 mM	1,56 mM	0,05 mM
0,78 mM	0,025 mM	2,5 mM	0,08 mM
1,56 mM	0,05 mM	3,13 mM	0,1 mM
2,5 mM	0,08 mM	4,69 mM	0,15 mM
3,13 mM	0,1 mM	6,25 mM	0,2 mM
4,69 mM	0,15 mM		
6,25 mM	0,2 mM		

3.5.3. Bestimmung der Inhibition der β P6OMT

O-Methyltransferasen sind durch das entstehende Coprodukt SAH (S-Adenosyl-Homocystein) reversibel hemmbar. Der Einfluss von SAH wurde durch Gabe verschiedener Konzentrationen im Standardenzymtest ermittelt. Die Inhibitionsexperimente wurden mit jeweils 10 μ l Hemmstofflösung dreimal unabhängig voneinander (Doppelproben) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse wie unter 3.4.2. beschrieben ausgewertet.

Tab. 3.11.: SAH Konzentrationen der verschiedenen Enzymteste

eingesetzte SAH-Lösung	SAH-Endkonzentration
0 mM	0 mM
0,25 mM	0,01 mM
0,625 mM	0,025 mM
1,25 mM	0,05 mM
2 mM	0,08 mM
2,5 mM	0,1 mM
3,75 mM	0,15 mM
5 mM	0,2 mM

3.6. Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen

3.6.1. Biotransformation in Zellkulturen von *L. album* und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen

3.6.1.1. Vorversuch zur Lösungsmittelverträglichkeit

In einem ersten Vorversuch wurde die Lösungsmittelverträglichkeit der Zellen getestet. Dazu wurden jeweils 20 Mediumskolben (300 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml sterilem MS-Medium; 2.6. Tab. 2.1.) mit 5 g Zellen der Linien 6M und PT angezogen. An Tag 3 der Kultivierung wurden jeweils zwei Kolben mit folgenden Mengen Methanol bzw. DMSO Lösungsmittel versetzt: 250 µl, 500 µl, 1000 µl und 2000 µl. Je zwei Kolben jeder Zelllinie blieben unbehandelt (0-Kontrolle). An Tag 7 wurden die Zellen vom Medium durch Vakuumfiltration befreit, anschließend in tarierte Petrischalen überführt, das Frischgewicht bestimmt und die Schalen bei -20°C eingefroren. Nach Gefriertrocknung wurden die TG ermittelt, die Lignane wie unter 3.3.5. beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert (3.8.). Neben der Leitfähigkeit, den pH-Werten und den Zuckergehalten in den von Zellen befreiten Medien wurden zusätzlich die Lignangehalte der Medien ermittelt (3.3.1./3.3.5.). Nach Lagerung der Medien für einige Tage bei -20°C wurden sie bei 30°C im Wasserbad aufgetaut und jeweils 10 ml je zweimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 4.500 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5804 R) zentrifugiert. Nach dem Trocknen der vereinigten Ethylacetatphasen wurden die Rückstände in 500 µl Methanol resuspendiert, Schwebstoffe durch Zentrifugation (5 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge) pelletiert und die Extrakte mittels HPLC analysiert (3.8.).

3.6.1.2. Biotransformation von PTOX und DOP

Für die Biotransformationsexperimente wurden die Zellen in einem kleineren Maßstab kultiviert. Dafür wurden 2,5 g Zellen in 25 ml frisches MS-Medium steril überführt. Anstelle von 250 oder 300 ml Erlenmeyerkolben wurden 100 ml Kolben verwendet und die Zellen auf einem Rundschüttler von Infors (Uvitron HT, Infors, Basel, Schweiz) im Dunkeln bei 25°C und 120 Upm inkubiert. Die Zugabe der Lösungsmittel, PTOX und DOP erfolgte unter sterilen Bedingungen an Tag 5 der Kultivierung. Dabei wurden je vier Kolben der Zelllinie 6M und PT mit je 250 µl Methanol, 250 µl 25 mM DOP bzw. PTOX versetzt. Je zwei dieser vier Kolben wurden an Tag 7 geerntet, während die restlichen Kolben der Linie 6M an Tag 12 und die der Linie PT an Tag 14 geerntet wurden. D.h. die Zellen wurden wie bereits unter 3.6.1.1. beschrieben behandelt und die Mediumsparameter bestimmt. Die Lignanextraktion der Zellen erfolgte nach Methode A (wie bereits unter 3.3.5. beschrieben) und nach einer modifizierten Methode B:

Lignanextraktionsmethode B (modifiziert nach Empt et al. 2000): 0,2 g gefriergetrocknete Zellen wurden zu einem feinen Pulver zerrieben, mit 2 - 4 ml Methanol p.A. versetzt, zweimal je 30 sec. im Ultraschallbad inkubiert, zwischendurch auf Eis abgekühlt und anschließend mit 12 ml Methanol p.A. versetzt. Die Ansätze wurden für eine halbe Stunde bei 35°C im Wasserbad und für 10 Minuten bei 70°C im Ultraschallbad inkubiert. Die Zellfragmente wurden pelletiert (5 min, Raumtemperatur, 4.500 Upm; Eppendorf Zentrifuge 5804 R), die Volumina der Überstände bestimmt und Aliquots für die Bestimmung der Lignangehalte entnommen. Die Aliquots wurden für 5 min bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) von Schwebstoffen befreit und mittels HPLC analysiert (3.8.).

3.6.1.3. Biotransformation von DOP und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen

Für die Biotransformations- und Hemmstoffexperimente wurden die Zellen wie unter 3.6.1.2. beschrieben kultiviert. Die Zugabe der Hemmstoffe und Lösungsmittel erfolgte unter sterilen Bedingungen an Tag 4 der Kultivierung. Dabei wurden die Hemmstoffe NDA, PCA2,4 und PCA2,5 zu 20 mM in DMSO gelöst. ABT, CLOT und Trinex wurden zu 10 mM in Methanol gelöst und sterilfiltriert. Die Zugabe von DOP

erfolgte an Tag 5 (250 µl 25 mM Lösung). Die Endkonzentration der Hemmstoffe pro Kolben betrug 10^{-4} M, die des DOPs $2,26 \times 10^{-4}$ M ($\equiv 2,25$ mg/Kolben, bei einem DOP Reinheitsgrad von ≥ 80 %). Die genaue Zugabe kann dem nebenstehenden Schema entnommen werden. An Tag 7 wurden die Zellen vom Medium befreit und wie unter 3.6.1.1. und 3.3. beschrieben die Wachstums-, Mediumsparameter und Lignangehalte bestimmt.

Tab. 3.12.: Zugabeschemata der Lösungsmittel, Hemmstoffe und DOP an den verschiedenen Tagen

Kolben Nr.	Bezeichnung	Zugabe an Tag 4	Zugabe an Tag 5
1 2	0-Kontrolle	/	/
3 4	Methanol	500 µl Methanol	
5 6	Methanol + DMSO	250 µl Methanol + 125 µl DMSO	
7 8	DOP	/	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
9 10	NDA	10^{-4} M NDA	/
11 12	NDA + DOP	10^{-4} M NDA	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
13 14	CLOT	10^{-4} M CLOT	/
15 16	CLOT + DOP	10^{-4} M CLOT	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
17 18	ABT	10^{-4} M ABT	/
19 20	ABT + DOP	10^{-4} M ABT	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
21 22	PCA2,4	10^{-4} M PCA2,4	/
23 24	PCA2,4 + DOP	10^{-4} M PCA2,4	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
25 26	PCA2,5	10^{-4} M PCA2,5	/
27 28	PCA2,5 + DOP	10^{-4} M PCA2,5	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP
29 30	Trinex	10^{-4} M Trinex	/
31 32	Trinex + DOP	10^{-4} M Trinex	$2,26 \times 10^{-4}$ M DOP

3.6.1.4. Behandlung der Zellen mit hohen Hemmstoffkonzentrationen

Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 3.6.1.2. beschrieben. Getestet wurde der Einsatz von höheren NDA- und Trinex-Konzentrationen auf die Zellen der Linie 6M und PT. Dabei wurden 5×10^{-4} M NDA und 1×10^{-3} M Trinex an Tag 4 verabreicht und die Mediumsparameter, die Lignangehalte und Trockengewichte der Zellen an Tag 7 bestimmt.

3.6.1.5. Vitalitätstests nach Towill und Mazur

2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) kann durch intakte Zellen zu Formazan reduziert werden, welches dann photometrisch bei 485 nm gemessen werden kann (Towill und Mazur, 1974); tote Zellen

können dies nicht. 150 mg Zellen der Linie 6M und PT wurden mit 3 ml 1 %iger (w/v) TTC-Lösung (gelöst in 0,05 M NaPO₄-Puffer pH 7,5) versetzt und über Nacht (18 - 22 h) im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 15 min bei 5.000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5804 R) zentrifugiert und die pelletierten Zellen mit je 3 ml H₂O (bidest.) gewaschen und erneut zentrifugiert. Größere Zellaggregate wurden mit einem Spatel zerkleinert und die Pellets mit 10 ml 96 %igem Ethanol versetzt. Alle Proben wurden für 15 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert, abgekühlt und solange geschüttelt, bis die Zellen nicht mehr rot aussahen. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 5.000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5804 R) wurden die Überstände entnommen, deren Volumina bestimmt und gegebenenfalls auf 10 ml aufgefüllt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 485 nm (Uvikon 930 Spektrometer, Kontron Instruments, Tegimenta, Schweiz). Zwischen den Kultivierungstagen wurden täglich Kontrollen mit DMSO oder Methanol, sowie Zellen, die mit NDA (gelöst in DMSO) oder Trinex (gelöst in Methanol) behandelt wurden, geerntet. Die photometrisch ermittelten Werte wurden in Prozent der Gesamtvitalität der Zellen, bezogen auf die jeweiligen Methanol/DMSO-Kontrollen der jeweils gleichen Tage, berechnet.

3.6.2. Enzymatische Suche nach unbekanntem Hydroxylierungsreaktionen

Für die biochemische Suche nach der Hydroxylierungsreaktion an Position 7 der Substrate PAM und DOP wurden über 40 verschiedene Enzymaufarbeitungen durchgeführt. Dafür wurden 5 - 7 Tage alte Zellen der Linien 6M und PT und 5 Tage alte Zellen der Linie NO verwendet. Die Enzymaufarbeitungen und -teste wurden in Anlehnung an folgende Referenzen konzipiert: Britsch et al., 1981; DeCarolis et al., 1990; DeCarolis und DeLuca, 1994; Federolf, 2001; Grand, 1984; Haefelé et al., 1997; Hallahan et al., 1994; Katayama et al., 1992; Krochko et al., 1998; Madyastha et al., 1976; Moriguchi et al., 2002; Schoch et al., 2001; Schröder et al., 1999; Yamamoto et al., 2001;).

3.6.2.1. Enzymaufarbeitungsvarianten

Rohprotein:

- A:** 10 - 30 g Zellen wurden mit je 1 ml/g FG Puffer und 1/5 des FGs an Polyklar AT versetzt und mittels Schlagmesserhomogenisator (Stufe 4 für dreimal 30 sec.) oder Mörsern (mit 0,17 g/g FG Quarzsand) auf Eis aufgeschlossen.
- B:** Anstelle Polyklar AT wurde in einigen Fällen die Rohproteinfraktion nach Zellaufschluss mit 0,17 g/g FG Dowex 1x2 (äquiliert im jeweiligen Aufarbeitungspuffer - Tabelle 3.13.) gerührt, um phenolische Bestandteile zu entfernen.

Die Entfernung der groben Zelltrümmer, des Polyklars und Dowex 1x2 erfolgte für 20 min bei 4°C und 8.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B).

Lösliche Proteine:

Die Aufarbeitung der löslichen Proteine wurde wie für die Rohproteine beschrieben durchgeführt, aber die Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 18.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B).

Mikrosomale Proteine:

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.3.3.2. beschrieben, mit verschiedenen Aufarbeitungspuffern (Tabelle 3.13.). Bei einer Aufarbeitung wurden anstelle der MgCl₂-Fällung die mikrosomalen Proteine für 45 min bei 4°C und 44.000 Upm in der Ultrazentrifuge (80Ti-Rotor, Beckmann Ultrazentrifuge) pelletiert.

Zusätzliche Proteinbehandlung:

Zur Entfernung störender Salze, unbekannter Substanzen und großer Lignanmengen wurden die Proteinfraktionen z.T. mittels PD10 Säulen entsalzt. Einige Fraktionen wurden 4 - 12 h in 2 - 4,5 l 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (+ 5 mM DTT) bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch: 3.000 kDa, AG Strothmann).

3.6.2.2. Puffervarianten

In der folgenden Tabelle sind die für die Proteinaufarbeitung verwendeten Puffer und Pufferzusätze aufgeführt.

Tab. 3.13.: Puffer und Pufferzusätze

Pufferlösung	pH-Wert	Zusätze
0,1 M Tris/HCl	7,0	10 mM DTT, 10 mM DIECA
0,1 M Tris/HCl	7,5	10 mM DTT, 10 mM DIECA
0,1 M Tris/HCl	8,0	10 mM DTT, 10 mM DIECA
0,1 M Tris/HCl	6,0	10 mM DTT
0,1 M Tris/HCl	7,5	10 mM DTT
0,1 M Tris/HCl	8,8	10 mM DTT
0,1 M Tris/HCl	8,0	10 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM EDTA pH 8,0 0,5 M Saccharose, 5 mM DTT, 20 mM Na-Ascorbat
0,1 M KPi	7,25	10 mM DTT, 10 mM DIECA
0,1 M KPi	7,25	10 mM DIECA, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5 M Mannit
0,1 M KPi	7,5	10 mM EDTA pH 8,0, 0,5 M Saccharose, 5 mM DTT 20 mM NA-Ascorbat
0,1 M KPi	6,0	10 mM DTT
0,1 M KPi	6,5	10 mM DTT
0,1 M KPi	7,0	10 mM DTT
0,1 M KPi	8,0	10 mM DTT
0,1 M HEPES	6,5	10 mM DTT
0,1 M HEPES	7,5	10 mM DTT
0,1 M HEPES	8,5	10 mM DTT
0,1 M MOPS	6,0	10 mM DTT
0,1 M MOPS	7,0	10 mM DTT
0,1 M MOPS	8,0	10 mM DTT
0,1 M MES	5,0	10 mM DTT, 1 mg/ml Leupeptin, 17,4 mg/ml PMSF

3.6.2.3. Enzymtestvarianten

Als Substrate wurden 2,5 mM Lösungen von DOP, PAM, Yatein, Matairesinol, α -Peltatin oder β -Peltatin verwendet. Die Inkubationsdauer der einzelnen Enzymteste variierte zwischen 1 - 6 und 12 h (über Nacht) bei 30 °C im Wasserbad oder im Inkubator. Wobei die 0-Kontrollen direkt nach Substratzugabe mit 25 μ l (250 μ l Testansätze) oder 50 μ l (500 μ l Testansätze) 6N HCl abgestoppt wurde. Es wurden jeweils Doppelproben pipettiert und nach dem Abstoppen aller Ansätze diese dreimal mit je 500 μ l Ethylacetat extrahiert. Die getrockneten Rückstände sowie die Analyse der Proben erfolgte wie unter 3.3.4.1./3.3.4.2. beschrieben.

Enzymteste für CYPs [Standardenzymtest für die DOP6H (3.4.1.)]:

Bei Inkubationszeiten von mehr als 5 h wurde zur Regeneration von NADPH regenerierendes System zu den Enzymtesten zugegeben. Dieses bestand aus 100 mM Glucose-6-Phosphat (gelöst in H₂O), 1,75 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (in 25 μ l (NH₄)₂SO₄) und 100 mM DTT. Die Endkonzentration pro Testansatz betrug 10 mM Glucose-6-Phosphat, 0,07 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und 4 mM DTT. Bei der Durchführung der CYP-Enzymteste wurde in fast allen Fällen zur Kontrolle die Aktivität der DOP6H oder der C4H getestet, um einen systemischen Fehler bei der Proteinpräparation auszuschließen.

Enzymteste für Dioxygenasen:

In der folgenden Tabelle (3.14.) sind die Enzymteste für Dioxygenasen aufgeführt. Um zu überprüfen, ob die Dioxygenasereaktion andere oder höher konzentrierte Reduktionsäquivalente benötigte, wurde in einigen Fällen NADPH (Endkonzentration 500 μ M) und in Anlehnung an Bouwmeester et al. (1998) FAD und FMN zugegeben. Ebenso wurde Natrium-Ascorbat gegen Ascorbinsäure und α -Ketoglutarat gegen α -Ketoglutarat ausgetauscht. Einige Enzyme reagieren sensitiv auf Methanol (Lösungsmittel für die Substrate), aus diesem Grund wurde teilweise das Substrat vor dem Ansetzen der Enzymteste in die Reaktionsgefäße überführt, anschließend zur Trockne eingeeengt und dann erst die Enzymtestkomponenten zugegeben. Einige Enzymteste wurden mittels LC/MS im Vergleich zu einer Standard-PTOX Lösung (1,036 mg/ml) analysiert (3.9.).

Tab. 3.14.:
Enzymteste
für Dioxyge-
nasen

Substanz (Lösung)	Endkonzentration
Puffer (siehe Tab. 3.13.)	
Protein	100 - 800 µg
α-Ketoglutar säure	0,2, 10, 20 oder 40 mM
Natrium-Ascorbat	7,5, 10, 15 oder 100 mM
Eisen-Sulfat	100 oder 200 µM
2,5 mM Substrat	50 oder 100 µM
Testvolumen	250 oder 500 µl

Enzymteste für Peroxidasen:

Bei den Enzymtesten auf Peroxidaseaktivität wurden neben dem zu testenden Substrat H₂O₂ als Cofaktor zugegeben (Tab. 3.15.).

Tab. 3.15.:
Enzymteste
für Peroxi-
dasen

Substanz (Lösung)	Endkonzentration
Puffer (siehe Tab. 3.13.)	
Protein	10 - 800 µg
H ₂ O ₂ (Perhydrol)	1 oder 2 mM
2,5 mM Substrat	50 oder 100 µM
Testvolumen	250 µl oder 500 µl

Photometrischer Test auf allgemeine Peroxidaseaktivität (nach Baier und Dietz, 1999):

Die Enzymteste wurden in Plastik UV-Küvetten wie folgt zusammengesetzt:

Tab. 3.16.: Peroxi-
daseaktivität -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M KPi Puffer pH 6,5	650 µl	
Proteinlösung	x µl	
100 mM H ₂ O ₂ (Perhydrol) (in 0,1 M KPi Puffer pH 6,5)	5 µl	0,5 mM
200 mM Guajacol	5 µl	1 mM
Testvolumen	1000 µl	

Die Referenzen enthielten anstelle von H₂O₂ das entsprechende Volumen Puffer. Die Extinktionszunahme der gebildeten Guajacol-Tetramerisierung ($\epsilon = 2550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde bei $\lambda = 436 \text{ nm}$ über einen Zeitraum von 15 min verfolgt. Die Proteinlösungen und Mediumsproben wurden z.T. bis zu 20-fach verdünnt.

3.6.2.4. Elicitierung der Zellkulturen

In Anlehnung an die Veröffentlichungen von van Fürden et al. (2005) und Berim et al. (2005) wurden zur Steigerung der Lignanakkumulation die Elicitoren Methyljasmonat und Coronalon zugegeben. Die Zugabe von 100 µM Methyljasmonat [gelöst in Ethanol 0,1 % (v/v)] erfolgte 5 oder 42 h vor der Aufarbeitung zu Zellen der Linie NO an Tag 5 bzw. 3. Coronalon wurde an Tag 3 zu Zellen der Linie PT in einer Konzentration von 25 µM (gelöst in Aceton) zugegeben. Die Enzymaufarbeitung wurde an Tag 6 durchgeführt.

3.6.2.5. Konzentrieren der Proteinlösung durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Zur Konzentrierung der Proteinlösung wurden in einzelnen Fällen die Proteine zunächst mit einer eiskalten gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung von 0 - 80 % gefällt, in geringem Puffervolumen resuspendiert (3.6.3.1) und mittels PD10 Säulen entsalzt.

3.6.2.6. UDP-Glucosyltransferase (Sucrose Synthase)

Die Enzymteste für UDP-Glucosyltransferasen wurden mit Proteinen aus Zellen der Linie PT durchgeführt und setzten sich wie folgt zusammen:

Tab. 3.17.:
UDP-Glucosyl-
transferase -
Zusammen-
setzung des
Enzymtestes

Substanz (Lösung)	Volumen	Endkonzentration
0,1 M Tris/HCl pH 8,0 Puffer (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA)	x μl	
Proteinlösung	y μl	ca. 100 μg
20 mM UDP-Glucose (in H_2O)	20 μl	1,6 mM
2,5 mM PTOX (in Methanol)	10 μl	100 μM
Testvolumen	250 μl	

Die Inkubationsdauer betrug 0 bzw. 120 min bei 30°C. Als 0-Kontrollen dienten Enzymteste ohne UDP-Glucose Zugabe.

3.6.3. Proteinanalytik

3.6.3.1. Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung

Das Proteom von 5 Tage alten Zellen der Linien 6M und PT wurde verglichen. 40 - 110 g Zellen der Linie 6M und 20 - 110 g Zellen der Linie PT wurden durch Vakuumfiltration vom Medium befreit, mit 1 ml/g FG Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1 mM DIECA), 1/5 des FGs Polyklar AT versetzt und mittels Schlagmesserhomogenisator auf Stufe 4 viermal 30 sec. auf Eis homogenisiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 8.000 Upm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B) wurde das Volumen des Überstandes bestimmt und ein Aliquot von 3 - 4 ml entnommen. Dieses wurde über Glaswolle filtriert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde mit einer eiskalten, gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung fraktioniert gefällt. Dazu wurden bei jedem Fällungsschritt die entsprechende Menge an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ langsam und tropfenweise innerhalb von 10 min zu den Überständen zugegeben. Die mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzten Überstände wurden für weitere 20 - 30 min auf Eis gerührt. Fällungsschritte wurden von 0 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 - 70 und 70 - 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchgeführt. Nach dem Rühren der jeweiligen Fraktionen wurde für 20 min bei 4°C und 20.000 Upm zentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B). Die erhaltenen Pellets wurden in 3 - 6 ml Aufarbeitungspuffer resuspendiert und mittels PD10 Säulen, die zuvor mit je 50 ml Aufarbeitungspuffer äquilibriert wurden, entsalzt. Die entsalzten Fraktionen wurden auf ihre C4H, DOP6H und β P6OMT Aktivität getestet. Gleichzeitig wurden Aliquots der entsalzten Fraktionen elektrophoretisch analysiert. Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde nach Bradford (1976) unter Verwendung einer BSA-Lösung (1 mg/ml) als Standard bestimmt.

Die enzymatischen Aktivitäten der DOP6H (3.4.1.), C4H (3.3.4.2.) und β P6OMT (3.3.4.1.) wurden nach den Standardenzymtesten durchgeführt, wobei die C4H Enzymteste ebenfalls in einem Testvolumen von 500 μ l zusammengesetzt wurden. Anstelle 338 μ g enthielten die Testansätze für DOP6H und C4H 400 μ g Protein. Die Testansätze der DOP6H und C4H mit Proteinextrakten der 0 - 20 und 20 - 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung der Linie 6M enthielten jeweils etwa 800 μ g Protein. Die Enzymteste zur Ermittlung der β P6OMT Aktivität enthielten 100 μ M β -Peltatin anstelle 80 μ M und 150 μ g Protein anstelle 100 μ g. Die Enzymteste der Proteinextrakte der 0 - 20 und 20 - 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung der Linie 6M enthielten 300 μ g Protein.

3.6.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese erfolgte modifiziert nach Lämmli (1970) in Apparaturen von LKB Bromma 2001 (Vertical Electrophoresis UnitTM, Bromma, Schweden). Das Standardgel bestand aus einem 10 %igen Trenn- und einem 6 %igen Sammelgel.

Trenngelzusammensetzung: 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,01 % (v/v) TEMED, 0,1 % (v/v) APS;

Sammelgelzusammensetzung: 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 6 % (v/v) Acrylamid/ Bisacrylamid 30/0,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,01 % (v/v) TEMED, 0,1 % (v/v) APS.

Die Proteinproben wurden kurz vor Applikation mit zweimal Dissoziationspuffer [124 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und für 5 - 10 min auf 95°C erhitzt. Der Lauf erfolgte im Kühlraum bei 4°C tagsüber für 4 - 6 Stunden bei 37 - 38 mA/Gel im Sammelgel und 45 - 46 mA/Gel im Trenngel, oder über Nacht für 10 - 12 Stunden bei etwa 15 mA/Gel. Für einen Taglauf wurden 5 l Elektrophoresepuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS], für einen Nachtlauf 2,5 l verwendet. Nach Beendigung des Laufes erfolgte das Anfärben in Coomassie-Blau-Färbelösung (3,6 g/l Coomassie R250 in 12 % Essigsäure, 30 % Ethanol) für etwa 30 min. Die Gele wurden einmal in Blitzentfärber (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) und drei- bis viermal in Entfärber (10 % Ethanol, 5 % Essigsäure) von überschüssiger Färbelösung befreit.

3.6.3.3. Vergleichende Mikrosomenanalyse der Zelllinie 6M und PT

Die Aufarbeitung der mikrosomalen Proteine wurde wie unter 3.3.3.2. beschrieben durchgeführt. Nach Auftrennung mittels SDS-Page (3.6.3.2.) wurden Proteinbanden, die unterschiedliche Intensitäten in den 6M und PT Extrakten zeigten, mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und in einem 8 %igen SDS-Gel erneut analysiert (3.6.3.2.). Fünf Banden wurden ausgewählt, tryptisch verdaut und spektrometrisch analysiert.

Der **tryptische Verdau** von Proteinen im Gel wurde nach einem Protokoll von Dr. M. Piotrowski (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zweimal mit 400 µl H₂O/Acetonitril (1:1) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurden 100 µl Acetonitril zugegeben und für 5 min inkubiert, das Acetonitril entfernt, 50 µl 100 mM NH₄HCO₃ zugegeben, kräftig geschüttelt und erneut für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 50 µl Acetonitril wurden die Proben für 15 min geschüttelt und zur Trockne eingengt. Zu den trockenen Gelstücken wurden 10 µl Trypsin (10 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃) zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Dies wurde ca. fünf- bis siebenmal wiederholt, bis alle Gelstücke vollständig gequollen und mit Flüssigkeit bedeckt waren. Der Trypsinüberstand wurde schließlich entfernt, die Gelstücke mit ca. 50 µl 25 mM NH₄HCO₃ überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (Tischzentrifuge, Eppendorf) wurden die Peptide wie folgt aus den Gelstücken extrahiert. Die Proben wurden für 2 min im Ultraschallbad inkubiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und die Gelrückstände mit je 50 µl 25 mM NH₄HCO₃ versetzt. Nach Inkubation für weitere 20 min unter ständigem Schütteln, wurden 50 µl Acetonitril zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 2 minütiger Inkubation im Ultraschallbad wurden die Überstände entnommen, die Gelrückstände mit 50 µl 5 % Ameisensäure/Acetonitril (1:1) behandelt und 15 min unter Schütteln inkubiert. Nach Entnahme der Überstände wurde die ebengenannte Prozedur wiederholt und nochmals die Überstände entnommen. Die vereinigten Überstände wurden bei 60°C zur Trockne eingengt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Peptide wurden von Dr. Henze (Institut für Botanik III, HHU Düsseldorf) mittels Nanoelektrospray Tandem-Massenspektrometrie analysiert (Q-TOF2 und QSTAR XL; Micromass MS Technologies, Eschborn; Applied Biosystems, Darmstadt; PROXEON Biosystem, Odense, Dänemark).

3.6.3.4. 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von mikrosomalen Proteinen

Zellen der Linie 6M und PT wurden wie unter 3.3.3.2. beschrieben aufgearbeitet und mittels Blue-Native/SDS-Page analysiert. Die Durchführung dieser Methode erfolgte modifiziert nach dem Praktikumsskript „Genetik und Molekularbiologie der Pflanzen“ Abteilung Westhoff (2005), entnommen aus Schägger (1994), Plücker et al. (2002) und Rokka et al. (2005).

86 µg der mikrosomalen Proteinfractionen wurden mit 0,5 % (w/v) Digitonin und 0,5 % (v/v) Triton X100 versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe von mindestens 10 % Probenpuffer (750 mM ε-Aminocaprinsäure, 5 % (w/v) Serva Blue G, 50 mM Bis-Tris pH 7,0, 30 % (w/v) Saccharose) wurden die Proben für weitere 20 min gerührt. Als Marker wurden 4 µg BSA verwendet, welches in gleicher Weise wie die mikrosomalen Proben behandelt wurde. Die Elektrophorese wurde in einem 15,8 %igen Trenn- und 6 %igen Sammelgel in Apparaturen von LKB Bromma 2001 durchgeführt.

Trenngelzusammensetzung: 15,8 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8, 20,9 % sechsmal Gelpuffer (3 M ε-Aminocaprinsäure, 0,3 M Bis-Tris pH 7,0), 0,05 % (v/v) TEMED, 0,1 % (v/v) APS;

Sammelgelzusammensetzung: 6 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8, 16,3 % sechsmal Gelpuffer [3 M ε-Aminocaprinsäure, 0,3 M Bis-Tris pH 7,0], 0,01 % (v/v) TEMED, 0,1 % (v/v) APS

Der Elektrophoreselauf wurde bei 4°C, ca. 30 mA/Gel für 8 Stunden durchgeführt. Zunächst wurde der Kathodenpuffer A (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris pH 7,0, 0,02 % (w/v) Coomassie G) verwendet, der nach ca. 4 Stunden gegen den Kathodenpuffer B (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris pH 7,0) ausgetauscht wurde. Als Anodenpuffer wurde 50 mM Bis-Tris pH 7,0 verwendet. Nach Beendigung des Laufes wurden

die einzelnen Spuren mit einem Skalpell voneinander getrennt und für 10 min in Solubilisierungspuffer (66 mM Na₂CO₃, 2 % (w/v) SDS, 0,67 % (v/v) β-Mercaptoethanol) inkubiert. Die beiden Spuren mit mikrosomalen Proteinen der Linien 6M und PT wurden mittels SDS-Page weiter aufgetrennt (3.6.3.2.). Als Marker wurde ein „Prestained Protein Marker“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) verwendet und die Gele mit Silbernitrat gefärbt. Dafür wurden die Gele für 20 min fixiert (Fixierer: 50 % Methanol, 12 % Essigsäure), zweimal 5 min gewaschen (10 % Ethanol, 5 % Essigsäure), 5 min in Kaliumdichromat-Lösung [1 % (w/v) Kaliumdichromat, 0,31 % (v/v) 65 %ige Salpetersäure, 1:10 verdünnt vor Gebrauch] gefärbt und solange in H₂O (bidest.) gewaschen, bis die Gelbfärbung verschwand (ca. 10 - 15 min). Danach wurde mit Silbernitrat [2,04 % (w/v), AgNO₃, vor Gebrauch 1:10 verdünnt] nachgefärbt, ca. 1 min mit H₂O (bidest.) gewaschen und dreimal mit Entwickler [2,96 % (w/v) Na₂CO₃, 0,0185 % (w/v) Paraformaldehyd] behandelt. Die Inkubation in der Entwicklerlösung erfolgte so lange, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Danach wurde die Färbereaktion mit Stopplösung (10 % Ethanol, 5 % Essigsäure) beendet.

3.7. Molekularbiologische Methoden

Die verwendeten molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die im Umgang mit DNA und RNA verwendeten Materialien, wie Plastik- und Glaswaren sowie alle Lösungen, wurden durch Autoklavieren (20 min bei 118°C; Autoklav: Webeco Typ No. 5, Lüdenscheid) sterilisiert. In seltenen Fällen wurden Glaswaren für 3 h bei 180°C ausgeheizt. Lösungen, wie z.B. Antibiotika, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden sterilfiltriert (Sartorius, Einwegfilter; Porengröße 0,2 µm). Die Angabe H₂O bezieht sich in allen Fällen auf hochreines Wasser, das mit Hilfe einer E-Pure-Reinstwasseranlage (Barnsted, W.W. GmbH, Wete A wasser-technische Anlagen, Leverkusen) über Filterkartuschen von Ionen befreit wurde und anschließend für den Umgang mit DNA einmal bzw. für den Umgang mit RNA zweimal autoklaviert wurde.

3.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellen der *L. album* Suspensionskulturen 6M und PT der Tage 4 - 6 geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Isolierung von geringen Mengen (< 20 mg) an Gesamt-RNA wurde das RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen verwendet, dabei wurde nach den Anweisung des Herstellers vorgegangen. Die Menge wurde photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA mittels Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese (3.7.3.) analysiert. Die mit dieser Methode isolierte RNA wurde für die cDNA Synthese mittels ‚First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)‘, oder mittels ‚MuLV Reverse Transkriptase‘ (Sondenherstellung/Macroarray-Experimente, 3.7.11.) und als Ausgangsmaterial für das ‚BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit‘ verwendet.

Größere Mengen an RNA wurden mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion nach Rosche und Westhoff (1995) und Westhoff et al. (1991) gewonnen. Dafür wurden 18 - 20 g Zellen je Zelllinie unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Zellpulver wurde mit 16 ml Extraktionspuffer (33 mM Sorbit, 200 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, pH 9,0) unter Rühren vermischt und 8 ml puffergesättigtes Phenol (0,5 M Tris/HCl pH 8,0) zugegeben. Beide Lösungen wurden zuvor auf 50°C erwärmt. Im Anschluss wurde für 10 - 20 min bis zur vollständigen Resuspension gerührt. Nach Zugabe von 8 ml Chloroform wurde die Suspension für 20 min gerührt und zur Phasentrennung für 10 min bei Raumtemperatur und 7.000 Upm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R, F34-6-38 Rotor). Die wässrige Phase wurde mit einer Pipette entnommen und mit jeweils 8 ml Phenol und Chloroform unter Rühren versetzt. Nach 10 - 15 min wurde erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 10 min, 7.000 Upm; Eppendorf Zentrifuge 5804 R, F34-6-38 Rotor), die wässrige Phase entnommen und diese mit 8 ml Phenol unter Rühren versetzt. Nach 10 min Inkubation erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation und Vermischung der wässrigen Phase mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat Lösung (pH 6,0) und 1 Volumen Isopropanol. Nach mehrfachem vorsichtigem Invertieren wurden die Proben bei -20°C über Nacht gelagert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden am nächsten Tag bei 10.000 Upm und 4°C für 10 min pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R, F34-6-38 Rotor). Die Überstände wurden entfernt und die Pellets in 0,5 ml Boratpuffer (80 mM Tris, 5 mM EDTA, pH eingestellt mit Borsäure) resuspendiert. Nach etwa 3 h wurden 1,5 ml Boratpuffer hinzugefügt, gut gemischt und für 10 min bei 10.000 Upm und 4°C (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R, F34-6-38 Rotor) zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 12 ml Gefäße überführt, die Volumina bestimmt und die RNA durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M LiCl-Lösung über Nacht auf Eis präzipitiert. Nach Pelletieren der RNA (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R, F34-6-38 Rotor, 10 min, 10.000 Upm, 4°C) wurde diese zweimal mit je 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift für 5 min bei 10.000 Upm zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden vollständig entfernt und die getrockneten RNA-Pellets in sterilem Wasser auf Eis gelöst. Die mit dieser Methode isolierten RNA wurde für die cDNA Synthese mittels ‚MuLV Reverse Transkriptase‘ (Sondenherstellung/Macroarray-Experimente, 3.7.11.) verwendet.

3.7.2. Ermittlung der Nukleinsäure Konzentration

RNA oder DNA Mengen wurden entweder photometrisch mit Hilfe des „GeneQUANT II“ der Firma Pharmacia (Pharmacia Biotech) bestimmt, wobei es durch die Berechnung des Quotienten aus der Absorption bei 280 und 260 nm möglich ist, eine Aussage über die Reinheit der DNA-Präparation zu treffen, oder über Agarose-Gelelektrophorese, bei der die Bandenintensitäten der aufgetrennten DNA-Fragmente mit einem DNA-Massenstandard (Low DNA MassTM Ladder, Invitrogen) verglichen wurden.

3.7.3. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Bei dieser denaturierenden Gelelektrophorese verhindert der Zusatz von Formaldehyd die Bildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenausbildung der RNA-Moleküle durch Reaktion zwischen den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin und der Aldehydgruppe des Formaldehyds unter Ausbildung Schiff'scher Basen.

Vorbereitend wurde die Gelkammer über Nacht mit einer 0,1 % (w/v) SDS-Lösung inkubiert und am nächsten Tag gründlich mit zweifach autoklaviertem H₂O ausgespült. Für ein 0,9 %iges Gel (Gesamtvolumen 40 ml) wurde 0,5 g Agarose in 10 ml 5 x MOPS-Puffer (0,2 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) und 30 ml H₂O durch Aufkochen gelöst. Diese Agaroselösung wurde auf ca. 50°C abgekühlt und 8 ml auf 37°C vorgewärmtes deionisiertes Formaldehyd zugegeben. Nach dem Gießen wurde das Gel innerhalb einer Stunde verwendet. 1 - 2 µg RNA wurden mit 30 µl Auftragsmix - bestehend aus 15 µl deionisiertem Formamid, 6 µl deionisiertem Formaldehyd, 6 µl 5 x MOPS, 3 µl 10 x Farbmix [0,5 mM EDTA, 0,125 % Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin in 10 x TBE-Puffer (0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 31,8 mM EDTA, pH 8,2)] - vermischt. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben für 10 min auf 95°C im Heizblock erhitzt und in Eiswasser abgekühlt. Die Elektrophoresekammer wurde zunächst bis zur Geloberkante mit 1 x MOPS-Puffer befüllt und die Elektrophorese für 10 min bei 70 Volt gestartet. Danach wurde die Kammer vollständig befüllt und das Gel mit Puffer bedeckt. Als Marker wurden 2 µl „High Range RNA Ladder“ (MBI Fermentas) in 10 µl Auftragsmix aufgetragen.

3.7.4. Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele von 0,8 - 2 % (w/v) wurden in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0 eingestellt mit Essigsäure) angesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 bis 1/10 des Probenvolumens mit DNA-Probenpuffer (50 % (w/v) Saccharose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in TAE) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 80 - 90 V. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Gele in einem TAE-Ethidiumbromid Färbepad (TAE mit 0,3 mg/ml Ethidiumbromid) für 20 - 30 min gefärbt und auf einem UV-Tisch photographiert. Als Größenmarker wurden 5 µl 1 Kb PLUS DNA Ladder (1:10-Verdünnung; Invitrogen Life Technologies) aufgetragen oder im Fall der DNA-Mengen Bestimmung der DNA-Massenstandard (Low DNA MassTM Ladder, Invitrogen) verwendet.

3.7.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Alle durchgeführten PCRs wurden nach dem Standardansatz (Tab. 3.18.) durchgeführt. Die jeweiligen Programme sind in Tabelle 3.19. und 3.20. zu finden.

Alle PCRs wurden in einem Thermocycler von Biometra (UNO, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Zur Erhöhung der spezifischen Primerbindungen wurden die PCR-Reaktionen der C4H in einem „Touch-down“-Programm durchgeführt (Tab. 3.19.). Während die Amplifikation der SSH-Fragmente in einem einfachen PCR-Programm erfolgte (Tab. 3.20.).

**Tab. 3.18.: Zusammen-
setzungen eines PCR-Standard-
ansatzes**

Substanz (Lösung)	Menge
10 x PCR-Puffer*	5 µl
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
je 5 mM dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase**	1 µl
cDNA	3 µl
Primer F (10 pmol/µl)	3 µl
Primer R (10 pmol/µl)	3 µl
H ₂ O	31,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

- * - PCR-Puffer: 10 x Reaktionspuffer (ohne MgCl₂) Invitrogen Life Technologies
 ** - Taq-Polymerase: wurde von Arne Schwelm im Rahmen eines Praktikums mit Hilfe eines Taq-Polymerase überexprimierenden *E. coli* Stammes hergestellt

Tab. 3.19.: PCR-Programme

C4H- und C4H nested - „touch-down“-Programm, die Annealing-Temperatur* wird dabei in jedem Zyklus um 0,5°C erniedrigt

Programm	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
C4H	120	94	1
	30	94	8
	30	46 ← 50 (-0,5)*	
	75	72	
	30	94	24
	30	46	
	75	72	
	180	72	1
	∞	20	
	C4H nested	120	94
30		94	8
30		50 ← 54 (-0,5)*	
60		72	
30		94	24
30		50	
60		72	
180		72	1
∞		20	

Tab. 3.20.: PCR-Programme

Aktin-PCR, Analyse der Adapterligation (PLR) und SSH-Programm

- einfache PCR;
 ** - semiquantitative PCR

Programm	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Aktin	120	94	1
	30	94	25
	30	46	
	30	72	
	120	72	1
∞	20		
Analyse der Adaptorligation PLR	300	75	1
	30	94	27
	30	65	
	150	68	
Analyse der Subtraktions-effizienz** PLR	120	94	1
	30	94	18
	30	60	
	120	72	
	30	94	23 / 28 / 33
	30	60	
	120	72	
SSH	180	94	1
	30	94	30
	30	55	
	120	72	
	300	72	1
	∞	20	

Die Reinigung der Fragmente erfolgte mittels des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) und/oder mittels eines Low Melt Agarosegel gelelektrophoretisch. Die elektrophoretisch aufgetrennten Banden wurde ausgeschnitten und mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt.

3.7.6. Klonierung von PCR-Fragmenten

Die DNA Fragmente wurden zur weiteren Analyse (Sequenzierung oder Macroarray Experimente) in den **pGEMT[®]-T Vektor** (Promega) nach Angaben des Herstellers kloniert. Anschließend wurden die ligierten Fragmente in kompetente *E. coli* Zellen (DH5 α) transformiert.

Die **Herstellung kompetenter Bakterien** erfolgte nach Hanahan (1983). 5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden mit 100 ml frischem LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ (Uvikon 930 Spektrometer, Kontron Instruments, Tegimenta, Schweiz) von 0,6 kultiviert. Das Wachstum wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt und die Zellen bei 4°C und 3.000 Upm (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und in 30 ml TFBII-Lösung (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH auf 5,8 mit Essigsäure p.A. eingestellt) resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurde für weitere 10 min bei 3.000 Upm und 4°C zentrifugiert (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC5B). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml TFBII-Lösung (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH auf 7,0 mit NaOH eingestellt) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots à 200 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur **Transformation** wurde der Ligationsansatz zu 200 μ l kompetenten DH5 α Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min invertiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium wurde für weitere 45 min bei 37°C inkubiert und zwischendurch gemischt. 100 μ l des Transformationsansatzes wurden direkt auf eine LB/Amp/X-Gal/IPTG-Platte (100 μ g/ml Ampicillin, 125 μ g/ml X-Gal, 0,5 μ M IPTG; Blau-Weiß-Selektion) gegeben und ausgestrichen. Der restliche Transformationsansatz wurde für 1 min bei 7.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) pelletiert und in 100 μ l Überstand resuspendiert. Dieser konzentrierte Ansatz wurde auf einer zweiten LB/Amp/X-Gal/IPTG-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bis zum nächsten Tag (12 - 14 h) bei 37°C inkubiert.

3.7.7. Restriktionshydrolyse

Die Restriktionshydrolyse wurde in der Regel mit 5 - 7 μ l der Plasmidpräparation, 1 μ l der/des jeweiligen Enzyme/s (*ApaI* und *PstI*; *SpeI*; *SacII* und *XbaI*), 2 μ l des jeweiligen Puffers und 3 - 5 μ l H₂O angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 - 4 h bei 37°C. Die Analyse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.7.4.).

3.7.8. Plasmidpräparationen

Die für die Klonierungsexperimente und zur Sequenzanalyse benötigte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Plasmidpräparationen, bei denen die Reinheit des Plasmides weniger bedeutend war (Identifizierung von positiven Transformanden) wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit der TENS-Methode nach Zhou et al. (1990) durchgeführt. 1,5 - 2 ml der über Nacht gewachsenen transformierten *E. coli* Kulturen wurden in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (30 sec 8.000 Upm, Tischzentrifuge, Eppendorf) pelletiert und die Überstände bis auf 50 - 100 μ l verworfen. Nach Resuspendieren wurde die Bakteriensuspension mit je 300 μ l TENS-Lösung (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0, 0,1 M NaOH, 0,5 % (w/v) SDS) vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l Kaliumacetat (3M, pH 5,2) wurden die Reaktionsansätze kurz gemischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte 5 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf), Überführen der Überstände in neue Reaktionsgefäße und Zugabe von 900 μ l Ethanol p.A.. Die Proben wurden durch Invertieren gemischt und gefällte DNA durch Zentrifugation (13.000 Upm, 3 min, Tischzentrifuge, Eppendorf) pelletiert. Die Pellets wurden mit 0,5 ml 70 % Ethanol p.A. gewaschen und nach erneuter

Zentrifugation (13.000 Upm, 3 min, Tischzentrifuge, Eppendorf) und Entfernen der Überstände Luft getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 50 µl TE-RNaseA-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4, 20 µg/ml RNase A).

3.7.9. Kultivierungs-/Stammhaltungsbedingungen der Bakterien

Bakterienstämme wurden auf Agarplatten bei 37°C für 14 h angezogen. Einzelkolonien wurden von diesen Platten in Reagenzgläser überführt und in 2 - 4 ml LB/Amp-Medium über Nacht bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Diese Bakteriensuspensionen waren Ausgangspunkt für die Plasmidpräparation und für die Herstellung von Glycerinstocks.

Für die Glycerinstocks wurden 1 - 2 ml der angezogenen Bakteriensuspension (siehe oben) für 30 sec bei 7.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert, die Überstände entfernt, die Pellets in 500 µl LB/Glycerin (LB-Medium mit 60 % Glycerin) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.7.10. Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)

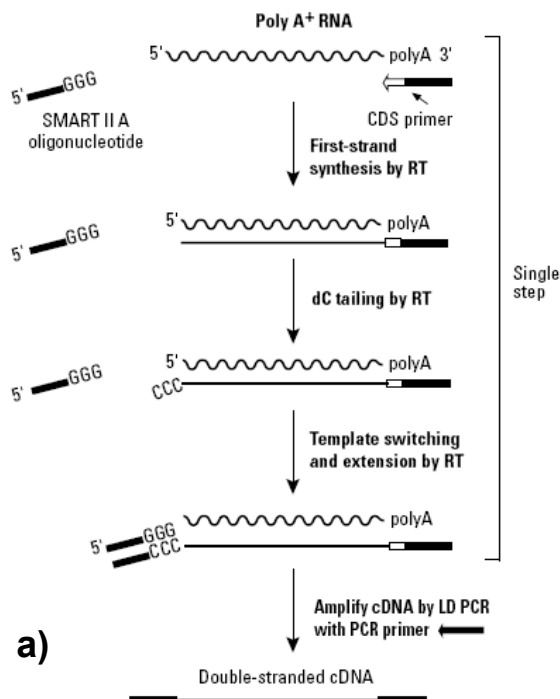
Mit Hilfe der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) sollten die Genexpressionsprofile der beiden Zelllinien vergleichend untersucht werden. Eine anschließende Macroarray-Analyse sollte dabei zur Verifizierung der Daten dienen. Die cDNA-Synthese und SSH wurden unter Benutzung der Kits: BD SMART™ PCR cDNA Synthesis und Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit der Firma Clontech durchgeführt. Alle durchgeführten Schritte erfolgten strikt nach Herstellerangaben.

3.7.10.1. Isolierung von Gesamt-RNA

RNA wurde aus 4 - 6 Tage alten Zellen der Linien 6M und PT mit Hilfe des RNeasy Plant Kits von Qiagen isoliert und die Qualität der RNA mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese (3.7.3.) analysiert.

3.7.10.2. cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit von BD Biosciences verwendet, welches im Hinblick auf das folgende Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit dscDNA mit spezifischen flankierenden cDNA Sequenzen lieferte.



SMART II™ A Oligonucleotide

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
Rsa I

3' SMART™ CDS Primer II A

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎V N-3'
Rsa I

5' PCR Primer II A

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

(N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)

b)

Abb. 3.1.: Anleitung des BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit von BD Biosciences

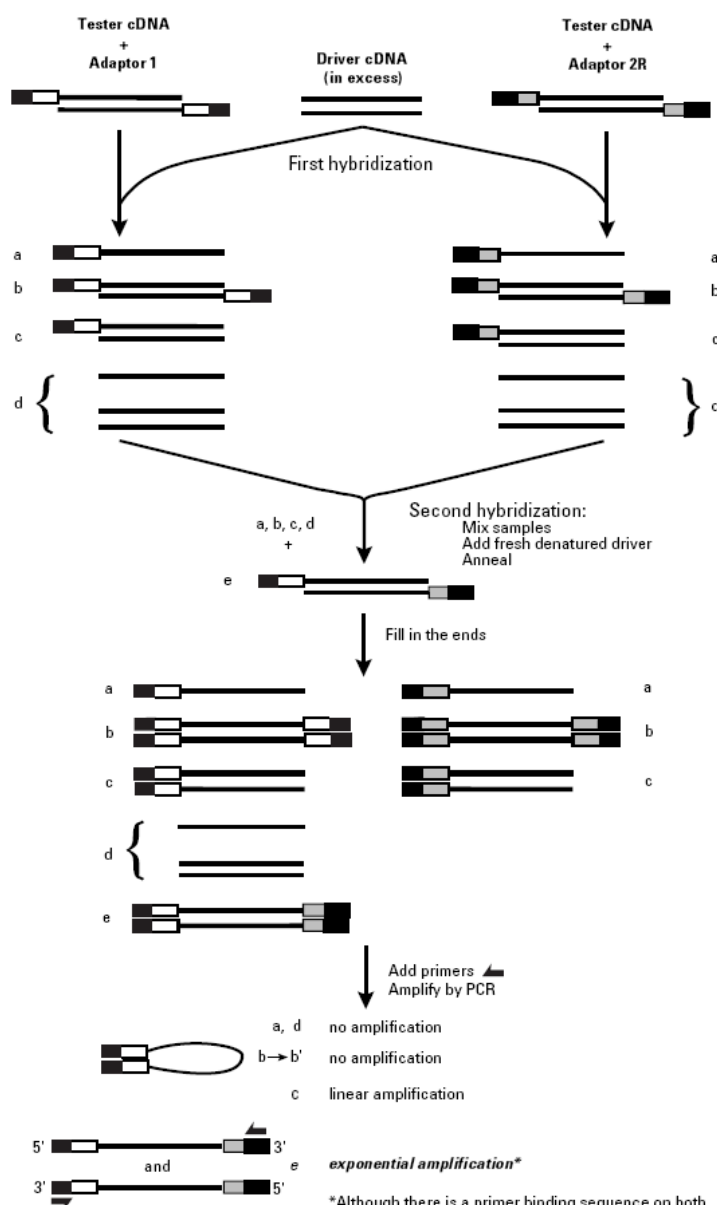
a) Einzelschritte der Anleitung

b) verwendete spezifische Primer für die Bildung der flankierenden Bereiche der cDNA Sequenzen

Aus der Gesamt RNA wurden nur die RNAs mit polyA Anhang (mRNAs) durch die Reverse Transkriptase und den zugegebenen Primer 3' SMART™ CDS II A in sscDNA überführt (Abb. 3.1.). An die sscDNAs wurden durch die Reverse Transkriptase dC Basen angehängt. Diese so verlängerte sscDNA bildete das Template für die Bildung des komplementären Stranges. Die dscDNA wurde mittels LD PCR (long distance PCR) durch Zugabe des Advantage™ cDNA PCR Polymerase Mix (BD Biosciences) und des 5' PCR Primer II A amplifiziert. Nach Reinigung der PCR-Produkte mittels Chroma Spin 1000 Säulen (BD Biosciences) wurden die cDNA Moleküle mit *Rsa* I hydrolysiert, um verkürzte Einzelstrangenden zu erhalten, die dadurch eine Adapterligation ermöglichten. Die Adapterligation bildete den Ausgangspunkt für das Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Abb. 3.2.). Vor der Ligation wurde der Hydrolyseansatz mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt.

3.7.10.3. Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

Die gereinigten cDNA Fragmente der Linie 6M und PT wurden jeweils getrennt voneinander mit Adapter 1 und 2 ligiert (Abb. 3.2. und 3.3.).



*Although there is a primer binding sequence on both ends of the type e molecules, the shorter overall homology at the two ends effectively negates the suppression PCR effect—except for very short molecules. See Appendix A for more details on suppression PCR.

Abb. 3.2.: Prinzip der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung

Zwei Tester Populationen werden mit zwei verschiedenen Adaptoren versehen, während die „Driver“ cDNA keinen erhält. Bei der ersten Hybridisierung werden differenziell exprimierte Sequenzen egalisiert und angereichert. Bei der zweiten Hybridisierung werden die Templates der differenziell exprimierten Sequenzen generiert. Nur mit e bezeichnete Sequenzen werden bei der anschließenden PCR Amplifikation exponentiell vermehrt. Die folgende zweite PCR (in der Abb. nicht mehr dargestellt) bewirkt die Reduzierung des Hintergrundes und die weitere Anreicherung von differentiellen Sequenzen (Abb. entnommen aus der Kitanleitung).

Ein Aliquot aus beiden Ligationsansätzen der Linie 6M und PT wurde als Ligationskontrolle entnommen, während die übrigen Proben für die erste und zweite Hybridisierung mit dem entsprechenden „Driver“ (cDNA Fragmente gewonnen aus der jeweils anderen Zelllinie) versetzt wurden. D.h. cDNAs der Linie 6M ligiert mit Adaptor 1 und 2 wurden unabhängig voneinander mit cDNA der Linie PT (ohne Adapter) hybridisiert („forward subtraction“ 1 und 2). Im Gegenzug wurden die cDNAs der Linie PT ligiert mit Adaptor 1 bzw. 2 mit cDNA der Linie 6M (ohne Adapter) hybridisiert („reverse subtraction“ 1 und 2; Abb. 3.3.). Im Anschluss wurden jeweils die Hybridisierungsansätze der „forward subtraction“ 1 mit der „forward subtraction“ 2 vermischt und weitere „Driver“ cDNA zugegeben. In einer anschließenden PCR wurden nur die cDNA Doppelstränge amplifiziert, deren Einzelstränge komplementär zueinander mit den Adaptern 1 und 2 versehen waren (Abb. 3.2. e).

Wie in Abb. 3.3. vermerkt, wurde als Kontroll-Subtraktion (C) die Skelettmuskel-cDNA mit dem zugehörigen *Rsa I* Hydrolyseansatz hybridisiert. Zusätzlich wurde auch die Kontrolle des BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits (Human Placenta RNA) mit dem zugehörigen *Rsa I* Hydrolyseansatz hybridisiert. Beide Kontrollen dienten zur Identifikation, ob das SSH-Experiment erfolgreich durchgeführt wurde.

Zusätzlich zu den beschriebenen Hybridisierungskontrollen, wurden **Kontrollen zur Adapterligation- und Subtraktionseffizienz** nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Analyse der Adapterligation der Humanen cDNA Kontrollen wurden die G3PDH 3', 5' und der PCR 1 (≡ T7) Primer verwendet, sowie das dafür beschriebene Cycler-Programm (3.7.5.). Für die Analyse der Adapterligation der 6M und PT cDNAs wurden die Primer für das Gen LAPLRI 3' und 5' (Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase aus *L. album*, von Heimendahl et al., 2005) in Kombination mit dem PCR 1 (≡ ZAPT7) Primer verwendet. Für die Analyse der Subtraktionseffizienz der 6M und PT cDNAs wurden die Primer LAPLRI 3' und 5' verwendet (3.7.5.).

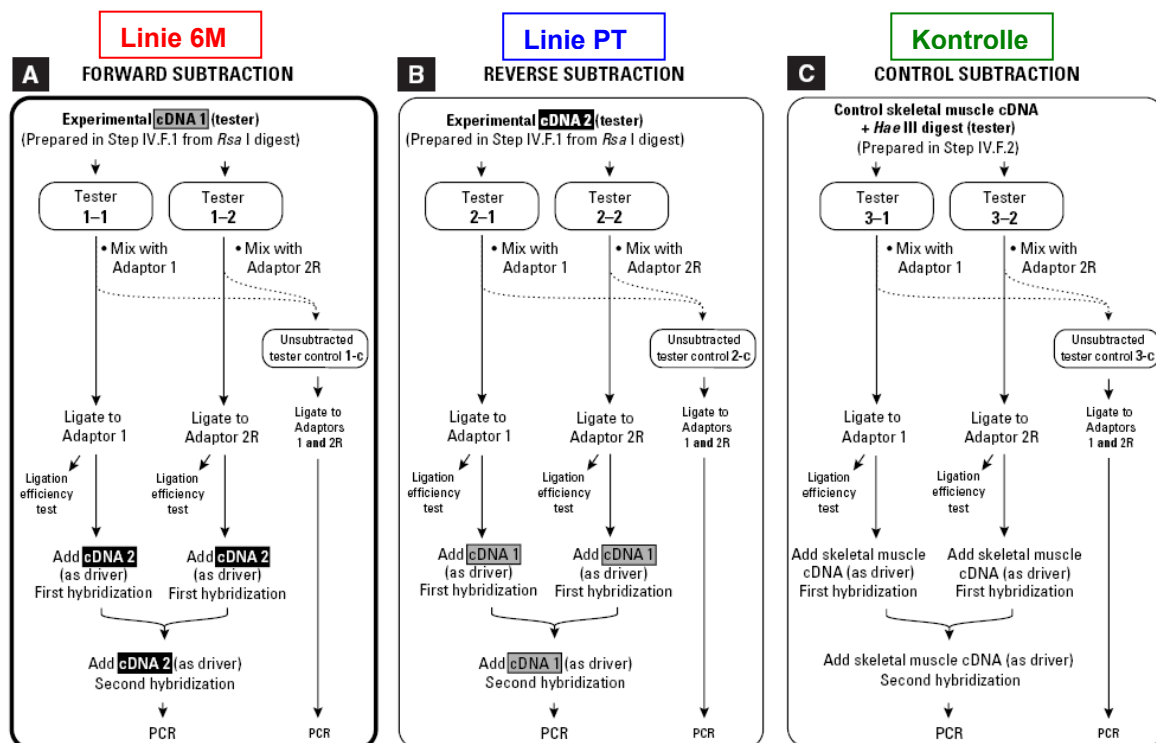


Abb. 3.3.: Anleitung des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits von BD Biosciences

Die „forward subtraction“ wurde mit cDNAs der Linie 6M als Tester und cDNAs der Linie PT als „Driver“ durchgeführt. Die „reverse subtraction“ wurde mit cDNAs der Linie PT als Tester und cDNAs der Linie 6M als „Driver“ durchgeführt. Die Kontroll-Subtraktion C erfolgte mit Skelettmuskel-cDNA als „Tester“ und dem *Rsa I* Hydrolyseansatz als „Driver“.

Je ein Aliquot der subtrahierten cDNA Ansätze wurde in den pGEMT[®]-T Vektor (Promega) ligiert und in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (3.7.6.). Von diesen transformierten Bakterien wurden insgesamt 671 Klone mit differentiellen SSH cDNA Fragmenten der Linie 6M und 563 Klone mit differentiellen SSH cDNA Fragmenten der Linie PT gepickt und in je 300 μ l LB/Amp (100 μ g/ml Ampicillin) im 96 Well-Plattenformat (Brand GmbH + Co KG, Wertheim) über Nacht bei 200 Upm und 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die z.T. etwas eingetrockneten Bakterienkulturen mit 100 - 150 μ l Glycerin (100 % p.A.) versetzt. Sie bildeten die Glycerinstocks für die folgenden Macroarray-Experimente.

3.7.11. Macroarray - Experimente

Die Verifizierung, d.h. der Ausschluss von Falsch-Positiv differentiell exprimierter cDNA Fragmente der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung wurde nach Rebrikov (2003) durchgeführt. In einem Vorversuch wurden je 95 Klone mit SSH cDNA Fragmenten der Linie 6M und PT aus den Glycerinstocks in 2 ml LB/Amp-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) über Nacht vermehrt. Am Folgetag wurden die Plasmide mittels TENS-Präparation (3.7.8.) isoliert und die SSH cDNA Fragmente mittels PCR amplifiziert (3.7.5.).

Nach gelelektrophoretischer Analyse in einem 2 %igen Gel (3.7.4.) wurden die PCR-Produkte mit einem **DOT-Blot** Replikator (96 pins, \varnothing 1,58, 0,2 μ l; V&P Scientific IC., San Diego, CA, USA) auf Nylonmembran (Hybond[™]-N⁺, positively charged; Boehringer, Ingelheim) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Membranen wurden sie für 15 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), 15 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,5), 10 min in 2 x SSC-Lösung (0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7,0) und 30 min bei 80°C inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit **Prähybridisierungslösung** [5 x SSPE (0,75 M NaCl, 0,05 M Na₃PO₄, 5 mM EDTA, pH 7,7), 5 x Denhardt's Lösung (0,2 % (w/v) BSA, 0,2 % (w/v) Ficoll[™], 0,2 % (w/v) PVP), 0,5 % (v/v) SDS, 100 μ g/ml denaturierte Fischsperma-DNA (Roche, Mannheim)] für ca. 1 h bei 65°C abgesättigt. Nach der Prähybridisierung wurde die Hälfte der Lösung verworfen und die radioaktiv markierte Sonden-DNA zugegeben (Herstellung siehe unten). Die **Hybridisierung** erfolgte über Nacht bei 64 - 66 °C. In mehreren Waschschritten bei der genannten Hybridisierungstemperatur wurden überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden-DNA von der Membran entfernt. Dabei wurde für 10 - 15 min in 2 x SSPE (0,3 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 2 mM EDTA, pH 7,7) mit 0,1 % SDS, für 10 - 15 min in 1 x SSPE (0,1 M NaCl, 0,01 M Na₃PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,7) mit 0,1 % SDS und für 2 x 10 min in 0,2 x SSPE (30 mM NaCl, 2 mM Na₃PO₄, 0,2 mM EDTA, pH 7,7) mit 0,1 % SDS inkubiert. Abschließend wurden die Blots kurz in 2 x SSPE mit 0,1 % SDS abgespült, abgetrocknet und die markierten Spots mittels **Autoradiographie** detektiert. Der Röntgenfilm wurde zusammen mit den in Frischhaltefolie eingeschlagenen Membranen in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie für 1 - 2 Tage bei -80°C inkubiert. Die Filmentwicklung erfolgte jeweils für etwa 2 - 4 min in Entwicklerlösung (Kodak), H₂O und Fixierer.

Die **Sondenmarkierung mit radioaktivem α^{32} P-dATP für die Detektion der differentiellen cDNA Fragmente** wurde wie folgt durchgeführt. 2 μ g RNA der Linie 6M bzw. PT wurden mit 2 μ l 100 μ M Oligo dT-Primer und H₂O (ad. 6 μ l) vermischt, für 10 min bei 70°C inkubiert und danach für 5 min im Eiswasserbad abgekühlt. Zu diesem Ansatz wurden 5 μ l 5 x PCR-Puffer (RevertAid[™] H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase Puffer, Fermentas), 2 μ l dNTPs (0,04 mM dATP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP, 5 mM dTTP) und 1 μ l RNasin (RNase Inhibitor, Fermentas) zugegeben und nach Vermischen für 1 min bei 42°C im Thermocycler (Biometra) inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 μ l RevertAid[™] H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/ μ l, Fermentas), 5 μ l α^{32} P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham Buchler) und Inkubation für 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C. Nach Zugabe von 0,5 μ l RNase A (Fermentas) wurde für weitere 30 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Die Sondenreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangabe unter zusätzlicher Verwendung von 35 % (w/v) Guanidinhydrochlorid. Die Sonden wurden mit 100 μ l Puffer (QIAquick[®] PCR Purification Kit) eluiert und zur Hybridisierungslösung gegeben.

Die Sondenmarkierung für die Herstellung spezifischer Sonden erfolgte mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP mit Hilfe des Nick Translation PCR Kits (Invitrogen Life Technologies) nach Herstellangaben. Die Sondenreinigung erfolgte mittels des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangabe.

Die Auswertung der ersten DOT-Blots mit je 95 SSH cDNA Fragmenten ergab, dass zwei der Sequenzen sehr häufig vertreten waren. Die Sequenzanalyse (3.7.12.) ergab Hinweise auf eine putative Catalase. Aus den kodierenden Plasmiden wurden die betreffenden Sequenzen mittels Restriktionshydrolyse (*Spe I*; *Sac II* und *Xba I*, 3.7.7.) herausgetrennt, mittels QIAquick[®] PCR Purification (Qiagen) gereinigt und je 300 ng dieser DNA für die Sondenmarkierung mit radioaktiven $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP mit Hilfe des Nick Translation PCR Kits (Invitrogen Life Technologies) verwendet.

Im Anschluss daran wurden die restlichen Klone der Linie 6M (576) und PT (468) angezogen, die Plasmide isoliert, die SSH cDNA Fragmente amplifiziert, auf Nylon-Membranen gespottet und mit radioaktiven Sonden hybridisiert (siehe oben). Nach Auswertung dieser ersten Hybridisierung wurden die Blots für 30 min bei 80°C in 0,5 % (w/v) SDS-Lösung inkubiert, um die Sonden zu entfernen. Nach weiteren Waschschrritten für 2 x 15 min in 2 x SSPE (0,3 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄, 2 mM EDTA, pH 7,7) mit 0,1 % SDS bei Raumtemperatur wurden die Blots mit Prähybridisierungslösung behandelt und schließlich die spezifischen Sonden der putativen Catalase zugegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie zuvor beschrieben.

3.7.12. Sequenzanalyse

Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) wurden die DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt und die Plasmide an die Firma Macrogen (Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, Korea) für die Sequenzierung gegeben. Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen ‚ClustalW‘ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>; Version 1.82; nach EMBL-EBI Einstellungen) und ‚Emboss Pairwise Alignment Algorithms‘ (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>; Method Emboss - needle (global), Gap open - 10,0, Gap extend - 0,5, Matrix - Blossum 62) durchgeführt. Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden über eine NCBI-Blast Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) durchgeführt. Die Analyse der Peptide (+TOF MS Produkte) erfolgte mittels der Blast - Proteindatenbank (search for short and nearly exact matches) und die Analyse der cDNA Sequenzen mittels ‚blastx‘-Datenbank (translated query versus protein database). In fast allen Fällen wurde die Suche zunächst auf die Datenbank der Viridiaeplantae eingegrenzt. Konnte unter Maßgabe dieser Einschränkung kein Ergebnis erhalten werden, so wurde die Suche auf ‚all organism‘ ausgeweitet. Die ‚accession no.‘ der Sequenzen wurden jeweils angegeben.

3.8. HPLC - Analytik

Die HPLC-Analysen (high performance liquid chromatography) wurden mittels Umkehrphasen Chromatographie durchgeführt. Als Laufmittelsystem wurde hochreines Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %) (Laufmittel A), welches zuvor partikelfrei filtriert wurde, und Acetonitril 100 % (Laufmittel B) verwendet. Tabelle 3.21. gibt einen Überblick über die verwendeten Programme und damit analysierten Proben. Die Detektion der Lignane erfolgte bei $\lambda = 230$ nm, die Detektion von *p*-Cumar- und Zimtsäure bei 309 nm. Die Identifizierung der einzelnen Proben erfolgte anhand der Retentionszeiten und Spektren von Standards (Tab. 6.1.).

Tab. 3.21.: Übersicht über die verwendeten HPLC-Programme und analysierten Proben

zu analysierende Proben	Programm				
	Programmbezeichnung	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Konzentration Laufmittel A [%]	Konzentration Laufmittel B [%]
Lignane - DOP, β -Peltatin, PAM, 6MPTOX, PTOX, PTOX-Glucosid, 6MPTOX-Glucosid;	Podo1b	0	0,8	60	40
		17	1,0	33	67
		18	1,0	60	40
		24	0,8	60	40
<i>p</i> -Cumar- und Zimtsäure	C4H	0	0,8	65	35
		30	1,0	45	55
		32	1,0	20	80
		34	0,8	65	35
		38	0,8	65	35
Lignane - Matairesinol, Hydroxymatairesinol, Yatein;	20040324	0	0,8	75	25
		10	0,8	62	38
		28	1,0	57	43
		33	1,0	45	55
		44	1,0	75	25
		48	0,8	75	25

3.9. LC/MS - Analytik

Die LC/MS Analysen wurden im Labor Prof. Dr. Schmidt von Dr. R. Ebel und Dr. R. Edrada durchgeführt (Institut für Pharmazeutische Biologie; HHU Düsseldorf, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) [HPLC-ESI/MS: Finnigan LCQ Deca XP Massenspektrometer (Thermo Finnigan, Dreieich); Agilent 1100 Series HPLC System (Waldbronn); Knauer Eurosphere RP C18 HPLC-Säule (250 x 2 mm, i.d. 5 μ m; Berlin); Laufmittel: Acetonitril (mit 0,1 % Formiat) / Wasser].

4. Ergebnisse

4.1. Gewinnung von Deoxypodophyllotoxin

Fütterungsexperimente radioaktiver Vorstufen und biochemische Untersuchungen zur Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H) weisen auf Deoxypodophyllotoxin (DOP) als Vorstufe für die Biosynthese des Podophyllotoxins (PTOX) und 6-Methoxypodophyllotoxins (6MPTOX) hin (Kuhlmann et al., 2002; Molog et al., 2001; van Uden et al., 1995). Es mussten daher für die Untersuchung der „späten“-Schritte der Aryltetralin-Lignan Synthese, insbesondere der DOP6H und Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase (DOP7H) Reaktionen, ausreichende Mengen an DOP zur Verfügung stehen. Da DOP jedoch nicht kommerziell erhältlich ist, musste es zunächst isoliert oder synthetisiert werden. Zwei Verfahren zur Gewinnung, die in der Literatur beschrieben werden - die Isolierung und Anreicherung aus *Anthriscus sylvestris* Wurzeln (van Uden et al., 1997) und die chemische Synthese aus PTOX (Jackson und Dewick, 1984), wurden getestet.

Die **Extraktion aus getrockneten *Anthriscus sylvestris* Wurzelstücken** wurde stark vereinfacht durchgeführt (3.2.1). Aus den eingesetzten 4 g getrockneten Pflanzenmaterials konnten nach säulenchromatographischer Reinigung insgesamt etwa 7,8 mg DOP extrahiert werden, was einem Anteil von etwa 0,2 % des Trockengewichtes (TG) entspricht. Nach van Uden et al. (1997) sind in Rohextrakten etwa 0,39 % des TG DOP enthalten. Da die DOP enthaltenden Fraktionen nach einfacher Kieselgelreinigung noch zu viele weitere Substanzen enthielten (Abb. 4.1.), was eine weiterführende Reinigung notwendig gemacht hätte, wurde die chemische Synthese zur Gewinnung vorgezogen.

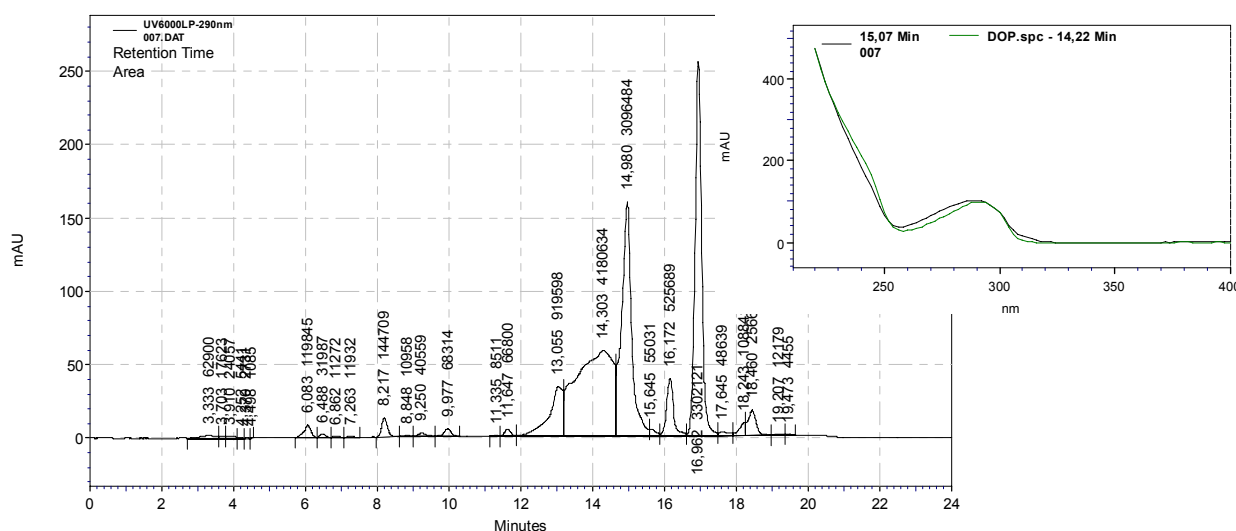


Abb. 4.1.: HPLC-Chromatogramm der vereinigten Fraktionen 11, 12 und 17 der säulenchromatographischen Anreicherung - Gezeigt sind die Signalintensität (in der Einheit mAU = Milli Absorption Units = Milliextinktionen) gegen die Zeit (in Minuten) bei **290 nm**. Die Retentionszeit von DOP liegt bei dieser HPLC-Methode (Podo1b - 3.8.) bei etwa 14,9 min. Das Vorhandensein weiterer Peaks lässt auf einige Verunreinigungen in der Probe schließen. **Kleines Bild oben rechts** - Spektrum des DOP-Standards (schwarz), Spektrum des DOPs aus *Anthriscus sylvestris* (grün)

Im Gegensatz zu DOP ist PTOX käuflich erhältlich und kann in einer **chemischen Reaktion** in DOP überführt werden. Dabei handelt es sich um eine katalytische Hydrierung, bei der die Hydroxylgruppe an C7 im Austausch gegen Wasserstoff abgespalten wird (Abb. 4.2.). Da das Erhitzen von molekularem Wasserstoff ein Explosionsrisiko darstellt, wurden die Originalreaktionsbedingungen (95 °C für eine Stunde) dahingehend modifiziert, dass die Reaktion bei Raumtemperatur mit einem reaktiveren Katalysator [Pd-C-OH (Palladiumhydroxid auf Kohlenstoffpulver) anstelle Pd-C] durchgeführt wurde, bis eine nahezu vollständige Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie detektiert werden konnte (3.2.2.).

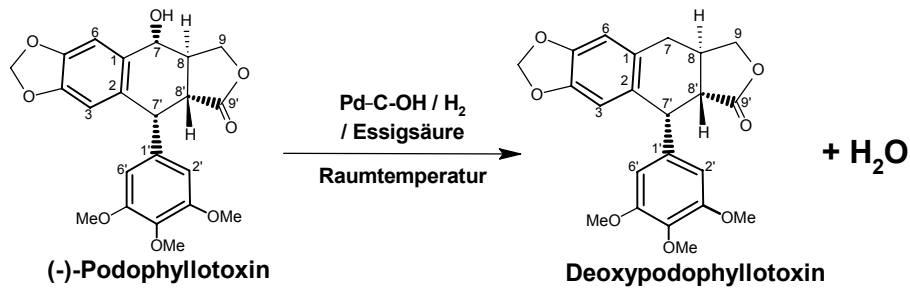


Abb. 4.2.: DOP-Synthese - Reaktionsgleichung der Hydrogenolyse

Die Hydroxylgruppe an C7 von PTOX wird abgespalten (vermutlich möglich durch eine Mesomerie-stabilisierung des System) im Austausch gegen Wasserstoff, wobei DOP und Wasser entstehen.

Nach Beendigung der Synthese und Entfernen der Essigsäure wurde das erhaltene DOP mittels Kieselgel-Säulenchromatographie gereinigt. Die HPLC-Analyse nach Anreicherung ergab eine durchschnittliche DOP Ausbeute von ca. 46 %, wobei die Fraktionen z.T. noch etwa 0,1 % PTOX enthielten (Durchschnittswerte aus insgesamt 7 unabhängigen Synthesen) (Abb. 4.3.). Das Abwiegen der gewonnenen DOP-Menge im Vergleich zu den - anhand von Standards - berechneten Werten nach HPLC-Analyse, ergab eine Differenz von ca. 20 %. Diese Differenz wurde als „Verunreinigungsgrad“ angenommen. Der DOP-Reinheitsgrad liegt somit bei etwa 80 %. Die von Prof. Dr. T. Schmidt durchgeführte NMR-Analyse bestätigte, dass es sich bei der gebildeten Substanz tatsächlich um DOP handelt, und dass der Reinheitsgrad vermutlich etwas höher als 80% einzustufen ist (Prof. Dr. T. Schmitt, persönliche Mitteilung, Spektren Anhang 10.3.). Die chemische Synthese ermöglichte die Gewinnung von insgesamt 500 mg der Vorstufe DOP auf einfachem Wege.

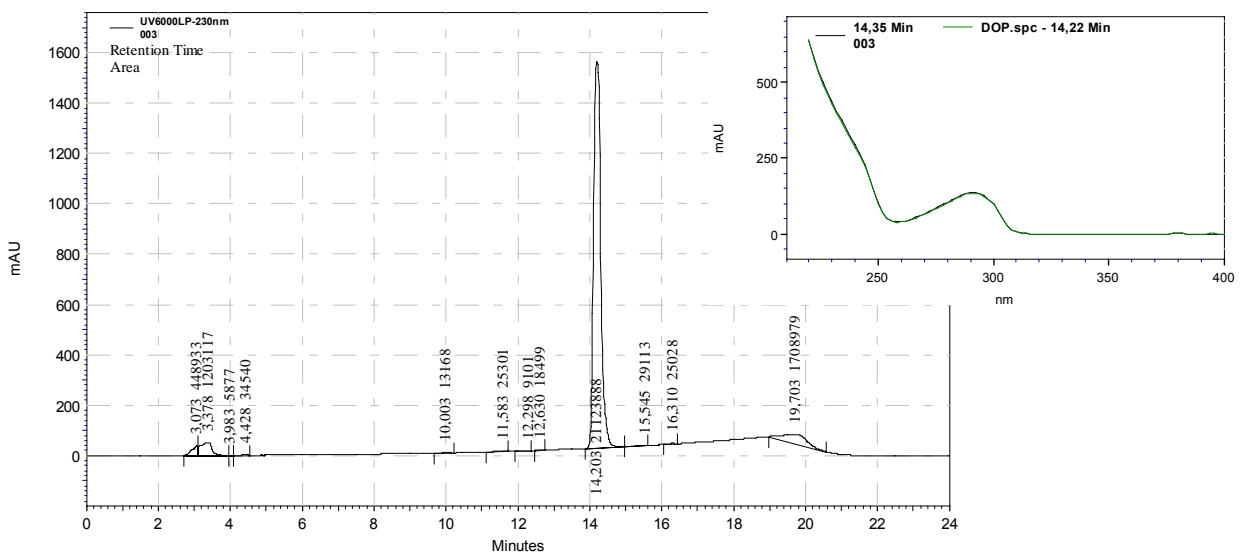


Abb. 4.3.: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 8 nach säulenchromatographischer Anreicherung

Gezeigt sind die Signalintensität (in der Einheit mAU = Milli Absorption Units = Milliextinktionen) gegen die Zeit (in Minuten) bei **230 nm**. Die Retentionszeit von DOP liegt bei 14,2 min. Neben DOP sind einige wenige weitere Substanzen in der Probe enthalten, deren Peakhöhen aber äußerst gering sind. Die Retentionszeit von PTOX würde bei dieser HPLC-Methode im Bereich von 9,3 min liegen, in dieser Fraktion ist aber kein Edukt mehr erkennbar.

Kleines Bild oben rechts Spektrum des DOP-Standards (schwarz), Spektrum des synthetisierten DOPs (grün)

4.2. Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen

Zwei Zellsuspensionskulturen von *L. album* wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Akkumulation von Aryltetralinen ausgewählt. Linie 6M synthetisiert fast ausschließlich 6MPTOX, während Linie PT überwiegend PTOX, aber auch geringe Mengen an 6MPTOX akkumuliert (4.2.4.; Garden, 2004; Neumetzler, 2003). Zellkulturen können sich aufgrund von z.B. somaklonaler Variation in Bezug auf Aussehen, Wachstum und Sekundärstoffwechselproduktion ändern. Diese Änderungen können spontan auftreten oder durch bereits geringste Veränderungen der Mediumszusammensetzung, der Kultivierungstemperatur oder der Schüttelgeschwindigkeit ausgelöst werden. Deshalb ist es notwendig, bestimmte Parameter, wie Wachstum (Frisch- und Trockengewichte; FG und TG), Medium (pH-Werte, Leitfähigkeit, Brechungsindex) und Aktivität einiger Enzyme im Kulturverlauf von Zeit zu Zeit zu überprüfen (3.3.).

Charakterisierungsergebnisse liefern desweiteren wichtige Informationen über optimale Erntezeitpunkte in Bezug auf maximale Lignangehalte, enzymatische Aktivitäten, Proteingehalte und mRNA-Spiegel von Genen für die Lignanbiosynthese. Eine vergleichende Charakterisierung sollte außerdem klären, wie das unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster zustande kommt.

4.2.1. Mediumsparameter

Neben dem pH-Wert wurden die Leitfähigkeit und der Zuckergehalt des Mediums ermittelt (Abb. 4.4.).

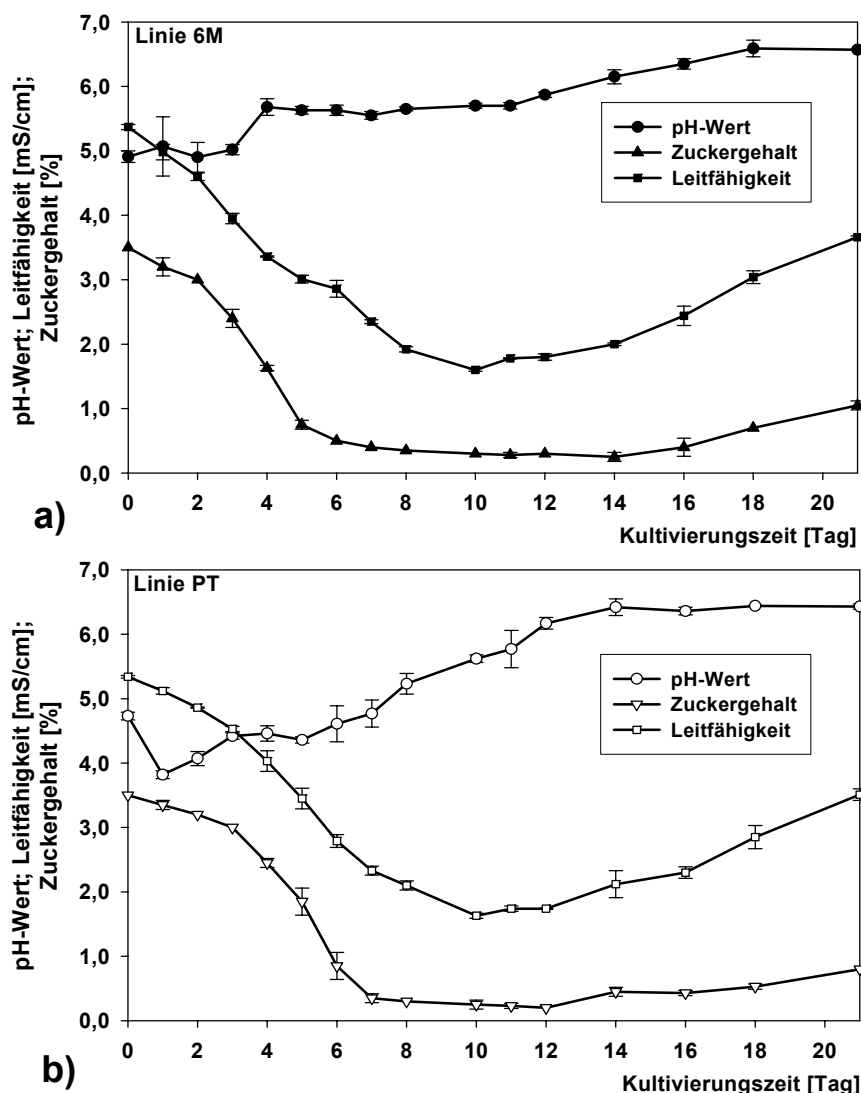


Abb. 4.4.: Mediumsparameter der Zelllinien 6M (a) und PT (b)

Gezeigt sind pH-Werte, Zuckergehalte in % und Leitfähigkeitswerte in mS/cm im Verlauf einer Kultivierungsperiode von 21 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen].

Der **pH-Wert** des Mediums wird vor dem Autoklavieren auf 5,6 eingestellt und beträgt nach dem Abkühlen etwa 4,2. Nach Zugabe von 5 g Zellen und anschließender direkter Ernte lagen die Werte für Linie 6M bei etwa 4,9 bzw. 4,7 für Linie PT. Der Mediums-pH-Wert der Linie 6M veränderte sich zunächst kaum, stieg ab Tag 4 auf etwa 5,8 an, um danach bis Tag 11 relativ konstant bei 5,6 - 5,7 zu bleiben. Ab Tag 12 stieg der pH-Wert kontinuierlich bis zum letzten Erntetag auf 6,5. Der Mediums-pH-Wert der Linie PT sank zunächst um fast eine pH-Einheit ab, stieg danach langsam und kontinuierlich bis Tag 14 auf pH 6,5 und blieb dann bei etwa 6,4 konstant.

Die **Leitfähigkeit** des Mediums ist ein Maß für die Ionenkonzentration, wobei der Hauptanteil an Ionen im Medium Nitrat ist (NO_3^- : 1,9 g/l KNO_3 und 1,65 g/l NH_4NO_3 ; 2.6., Tab. 2.1.; Garden, 2004). Das bedeutet, dass die Leitfähigkeitswerte überwiegend Aufschluss über die Menge an Nitrat und Ammonium im Medium geben können. Die Leitfähigkeit des Mediums betrug an Tag 0 in beiden Zelllinien 5,4 mS/cm und sank danach bis Tag 10 kontinuierlich auf 1,6 mS/cm ab. Die Abnahme der Ionenkonzentration erfolgte in Linie PT sigmoidal, während sie in Linie 6M fast linear verlief. Nach Tag 10 stieg die Leitfähigkeit im Verlauf von 11 Tagen auf 3,4 bzw. 3,7 mS/cm in den Linien PT bzw. 6M.

Der **Zuckergehalt** wurde näherungsweise über den Brechungsindex bestimmt. Denn neben Zucker enthält das Medium noch störende lichtbrechende Substanzen. So zeigte der Brechungsindex vor dem Autoklavieren des Mediums 3 %, während er danach 3,2 % betrug. Beim Autoklaviervorgang werden vermutlich Teile des Mediums bereits verändert, wie z.B. die Hauptkohlenstoffquelle Saccharose, die leicht karamelisiert wird (Maillard Reaktion). Der Brechungsindex sank zunächst auf etwa 3 % innerhalb von 2 bzw. 3 Tagen in beiden Linien. Innerhalb der folgenden 4 Tage fiel der Brechungsindex auf 0,3 % ab und blieb bis Tag 12 (Linie 6M) bzw. Tag 13 (Linie PT) bei diesem Wert. Ab dem 14. Kultivierungstag stiegen die Gehalte an lichtbrechenden Substanzen in Linie 6M auf 0,8 % und in Linie PT ab dem 12. Kultivierungstag auf 1,0 % an.

4.2.2. Wachstumsparameter

Die in Abb. 4.5. dargestellten Verläufe von Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) zeigen das typische Wachstumsprofil pflanzlicher Suspensionskulturen, bestehend aus lag-, log-, linearer, stationärer und Sterbephase (Empt et al., 2000; Henges, 1999; Windhövel, 2002). Beim Überimpfen wurden 5 g Zellen steril in frisches Medium überführt, wobei an den Zellen meist noch Medium „haftete“, welches mitüberführt wurde. Dadurch lag die tatsächliche Frischmasse bei 2,7 - 3 g.

Bei den Zellen der Linie 6M dauerte die Anlaufphase in der sich die Zellen an die neuen Mediumsbedingungen anpassen lediglich einen Tag. Sie wuchsen dabei geringfügig um 0,5 g/Kolben, während die Trockenmasse um 0,1 g/Kolben zunahm. Zwischen Tag 1 und 2 befanden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, in der das FG bis etwa 4,5 +/- 0,3 g/Kolben zunahm. Ab Tag 2 bis Tag 7 befanden sich die Zellen in der linearen Phase ihres Wachstums. In dieser Zeit stieg das FG auf 14,9 +/- 0,5 g/Kolben, während das TG bereits an Tag 5 sein Maximum mit 0,8 +/- 0,0 g/Kolben erreicht hatte. Die nun einsetzende stationäre Phase setzte sich bis etwa Tag 14 fort und endete mit der Sterbephase, bei der das FG auf ca. 6,0 +/- 2,0 g/Kolben absank. Die Zunahme der Trockenmasse verlief zunächst parallel zu der der Frischmasse, aber um einen Tag nach vorne versetzt. Sie stieg von 0,2 +/- 0,0 g/Kolben auf maximal 0,9 +/- 0,0 g/Kolben an den Tagen 5 und 6 an. Ab Tag 7 sank die Menge an Trockenmasse langsam bis auf etwa 0,4 +/- 0,0 g/Kolben. Wie in Abb. 4.5. zu erkennen ist, sind gerade an den letzten Tagen, die ermittelten Standardabweichungen der FG sehr hoch. Dies liegt darin begründet, dass das Wachstum in jeder Kultivierungszeit mehr oder weniger stark variiert. So kann die maximale FG- oder TG-Menge z.T. um bis zu zwei Tage verschoben sein.

Die Zellen der Linie PT benötigten etwas länger für die Eingewöhnung in das neue Medium. Sie wuchsen bis Tag 3 lediglich um 0,3 g/Kolben und gingen dann langsam ab Tag 4 in die lineare Phase über, in der das FG von 5,7 +/- 1,0 auf 13,2 +/- 1,0 g/Kolben bis Tag 7 zunahm. Von Tag 7 bis 10 näherte sich die

Frischmasse ihrem Maximum von $18,2 \pm 0,4$ g/Kolben und sank dann sukzessiv, ohne in einer eindeutigen stationären Phase zu verweilen, auf etwa $10,1 \pm 3,0$ g/Kolben ab. Die Zunahme der Trockenmasse verlief auch in diesem Fall parallel zur Frischmasse, aber um einen Tag nach vorne versetzt. Die Trockenmasse stieg von $0,2$ auf $0,9 \pm 0,0$ g/Kolben bis Tag 6 und 7 an. Bereits an Tag 7 war das Maximum mit $0,9 \pm 0,0$ g/Kolben erreicht und die Absterbephase begann. Am Ende der Charakterisierung (Tag 21) wurde ein TG von $0,5 \pm 0,0$ g/Kolben erreicht.

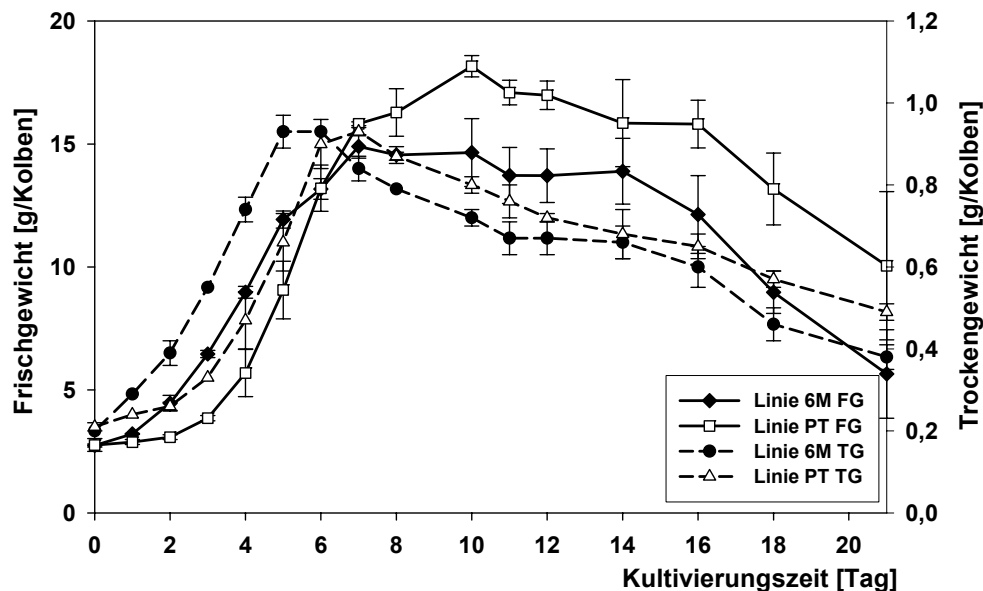


Abb. 4.5.: Frisch- und Trockengewichte der Linien 6M und PT über eine Kultivierungsperiode von 21 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen]

4.2.3. Enzymatische Aktivitäten über den Kulturverlauf

Die Enzymaktivitäten der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL), Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und Coniferylalkohol Dehydrogenase (CAD) des „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels“ sowie der Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H) und β -Peltatin 6-O-Methyltransferase (β P6OMT) der „späten“-Schritte der Aryltetralin-Lignan Synthese wurden über einen Kultivierungszeitraum von 16 Tagen ermittelt (3.3.3.; 3.3.4.). Da für die meisten Enzyme nach Tag 16 fast keine Aktivität mehr feststellbar war, wurde die Charakterisierung auf diesen Zeitraum verkürzt. Die gemessenen spezifischen enzymatischen Aktivitäten in $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein geben Aufschluss über die Leistungsfähigkeit der jeweiligen Kultur in Bezug auf verschiedene Stoffwechselprodukte. Für den Fall der „späten“-Schritte wäre dies die Produktion des 6-Methoxypodophyllotoxin (6MPTOX), bzw. im Fall der PAL, C4H und CAD die Produktion des Coniferylalkohols. Letztere wurden gezielt für die Charakterisierung ausgewählt: die PAL als sog. „Eingangsenzym“ in den Phenylpropanstoffwechsel, die C4H als direktes Folgeenzym und Vertreter der Cytochrom P450 Enzymklasse und die CAD als „Endenzym“ dieses Stoffwechselweges. Zudem sind ihre enzymatischen Aktivitäten gut detektierbar bzw. die Enzyme PAL und CAD lassen sich für längere Zeit bei -20°C lagern.

4.2.3.1. Enzyme des „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels“

Durch die **PAL** wird Phenylalanin nichtoxidativ in *trans*-Zimtsäure überführt. Die spezifische enzymatische Aktivität der PAL stieg in beiden Zelllinien an Tag 1 zunächst an (Abb. 4.6.). Dies konnte durch Überimpfstress ausgelöst werden, wobei die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte sehr

groß waren. Dies wiederum kann daran liegen, dass die Stressantwort unterschiedlich stark ausfallen und die maximale Aktivität um ein bis zwei Tage verschoben sein kann. Die spezifische enzymatische Aktivität stieg in Linie 6M zunächst von etwa 71 ± 24 auf 94 ± 11 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein. Sie fiel in den folgenden Tagen auf 65 ± 14 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein ab, um im Anschluss (Tag 5 - 6) auf ein Maximum von 210 ± 20 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein zu steigen. Danach sank die Enzymaktivität der PAL relativ schnell, bis sie an Tag 14 nicht mehr detektierbar war. In Linie PT stieg die spezifische enzymatische PAL Aktivität (vermutlich) stressinduziert von 125 ± 24 auf etwa 209 ± 34 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein an. Sie fiel in Folge geringfügig ab, um an Tag 5 das Hauptmaximum von 212 ± 27 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein zu erreichen. Danach nahm die Enzymaktivität schnell ab, bis an Tag 12 keine Aktivität mehr detektierbar war.

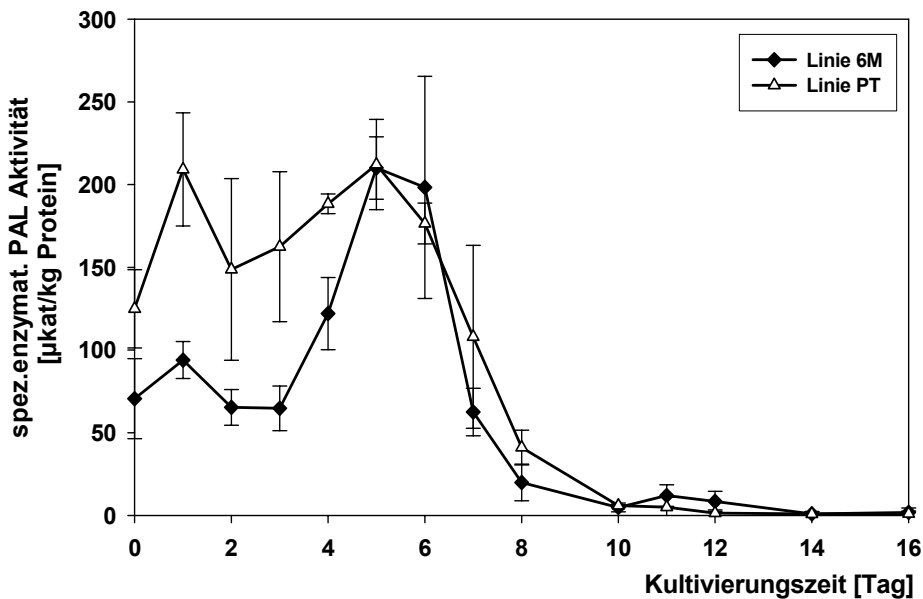


Abb. 4.6.: Spezifische enzymatische PAL Aktivität der Linien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Dreifachproben]

Bei der **C4H** handelt es sich um ein CYP Enzym, das in *para*-Position der *trans*-Zimtsäure eine Hydroxylgruppe einführt und möglicherweise direkt mit der PAL assoziiert ist (Dixon und Reddy, 2003). Die C4H Aktivitäten der Linie 6M waren zunächst relativ konstant mit ungefähr 62 ± 16 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein, sanken an Tag 3 auf 40 ± 7 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein ab, um an den Tagen 4 - 6 81 ± 52 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein zu erreichen (Abb. 4.7.). Im Folgenden fiel die spezifische enzymatische Aktivität bis Tag 16 auf den Nullwert ab. Im Vergleich dazu blieb die C4H Aktivität in Linie PT nur bis Tag 1 auf einem Wert von 63 ± 15 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein, fiel bis Tag 3 auf 35 ± 1 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein ab und stieg danach nochmals auf etwa 51 ± 13 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein. Ab Tag 4 sank die Enzymaktivität bis sie an Tag 14 nicht mehr detektierbar war.

Die **CAD** kann Coniferaldehyd in Coniferylalkohol überführen, wobei im Falle dieses photometrischen Tests, das bei der Rückreaktion von Coniferylalkohol in Coniferaldehyd entstehende NADPH bei 400 nm, detektiert wird. In Zellen der Linie 6M sank die enzymatische Aktivität, nachdem sie an Tag 1 von 146 ± 15 auf 166 ± 10 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein angestiegen war, auf 99 ± 6 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein (Tag 3) ab (Abb. 4.8.). In Folge stieg sie an Tag 10 bis zu einem Maximum von 248 ± 8 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein an. Im Vergleich zu den PAL, C4H, DOP6H und βP6OMT Aktivitäten war an Tag 16 noch immer eine Aktivität von 159 ± 34 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein detektierbar. Linie PT zeigte hingegen einen völlig anderen Aktivitätsverlauf. Ausgehend von ca. 87 ± 10 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein sank die Aktivität vermutlich geringfügig ab (aufgrund des sehr großen Fehlerbalkens ist keine eindeutige Aussage hierzu zu treffen) und stieg dann im Verlauf des dritten Tages auf das Maximum von etwa 176 ± 45 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein. Nach Tag 3 sank die Enzymaktivität bis Tag 14 und 16 auf 53 ± 2 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein.

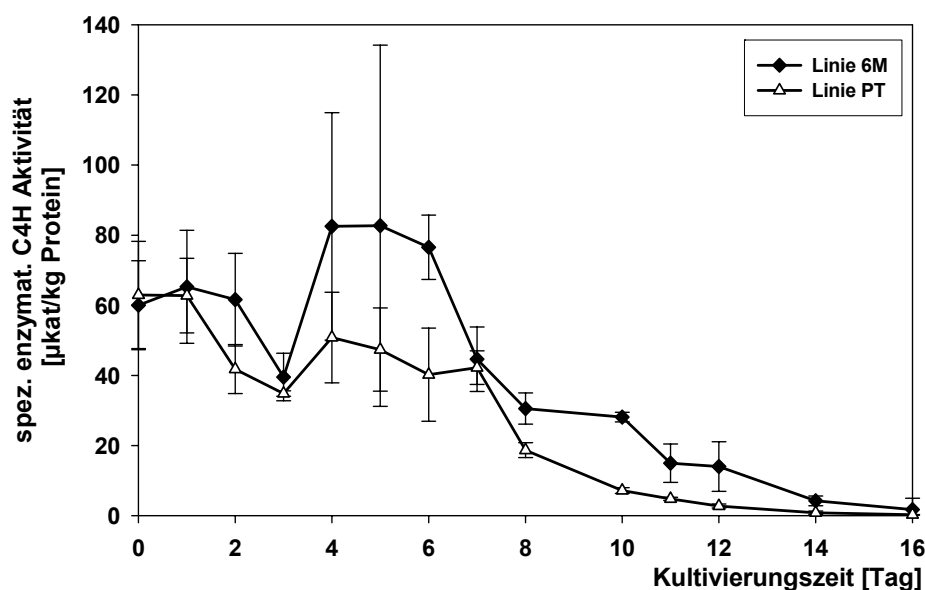


Abb. 4.7.: Spezifische enzymatische C4H Aktivität der Linien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Dreifachproben]

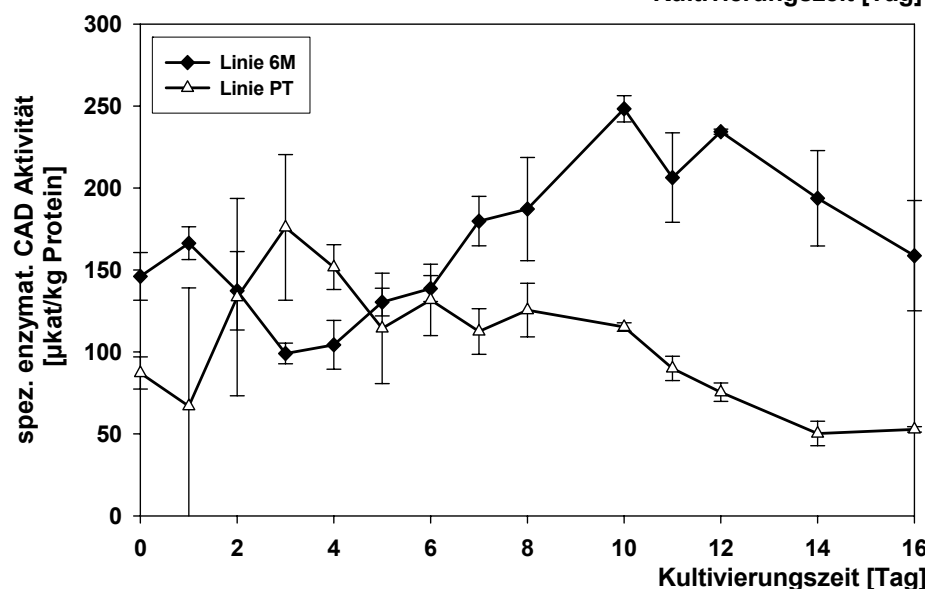


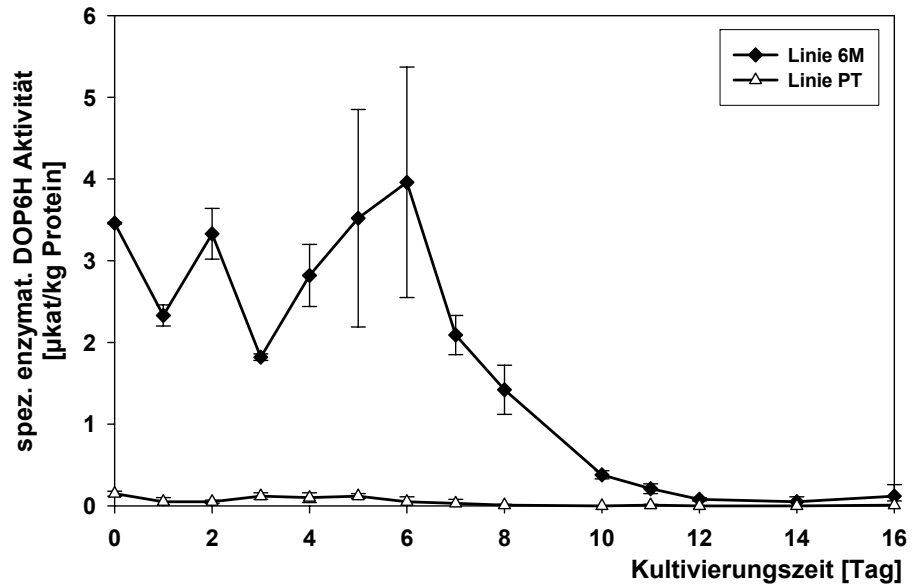
Abb. 4.8.: Spezifische enzymatische CAD Aktivität der Linien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Doppelproben]

4.2.3.2. Enzyme der „späten“- Schritte der Lignanbiosynthese

Bei der Synthese des 6MPTOX aus DOP müssen zwei Hydroxylierungen und eine Methylierung erfolgen. Die Einführung der ersten Hydroxylgruppe an Position 6 wird von einem CYP Enzym katalysiert, der DOP6H, die bisher nur in *L. flavum* und *L. nodiflorum* enzymatisch nachgewiesen wurde (Molog et al., 2001; Kuhlmann et al., 2002). Diese freie OH-Gruppe wird im Anschluss von der β P6OMT methyliert (gefunden in *L. nodiflorum*; Kranz und Petersen, 2003). Diese beiden Reaktionen von DOP zu β -Peltatin und von β -Peltatin zu β -Peltatin-A-Methylether (PAM) konnten nun erstmals für *L. album* über den Kulturverlauf von 16 Tagen beschrieben werden (Abb. 4.9. und 4.10.).

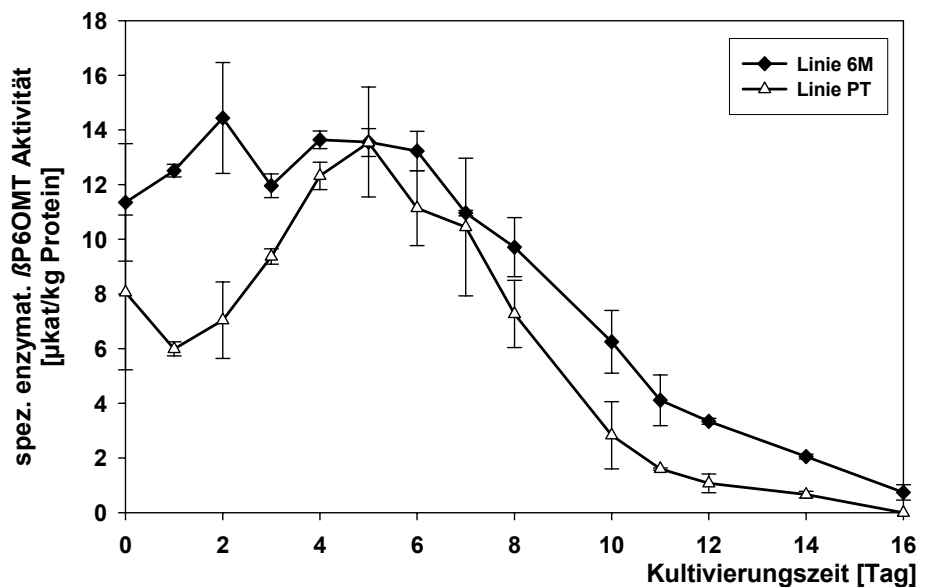
Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten der **DOP6H** waren mit maximal 4 - 5 μ kat/kg Protein für Linie 6M sehr gering (Abb. 4.9.). Zellen der Linie 6M zeigten zwischen Tag 0 und 3 alternierende Aktivitäten im Bereich 2 - 4 μ kat/kg Protein. An den Tagen 5 bzw. 6 waren die maximalen Aktivitäten mit 4 +/- 1 μ kat/kg Protein erreicht. In Folge fiel die Aktivität bis Tag 12 ab und konnte nicht mehr detektiert werden. In Linie PT lagen die enzymatischen Aktivitäten hingegen zwischen 0,2 +/- 0,0 an Tag 0 und 0,1 +/- 0,0 μ kat/kg Protein an den Tagen 3 und 5.

Abb. 4.9.: Spezifische enzymatische DOP6H Aktivität der Linien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Dreifachproben]



Die enzymatische Aktivität der β P6OMT konnte in Zellen beider Linien nachgewiesen werden (Abb. 4.10.). In Linie 6M stieg die spezifische enzymatische β P6OMT Aktivität zunächst von 11 +/- 2 auf etwa 14 +/- 2 μ kat/kg Protein, sank an Tag 3 geringfügig ab und erreichte an den Tagen 4 - 6 ein Maximum mit 13,6 - 13,2 +/- 2 μ kat/kg Protein. Die Aktivität der β P6OMT aus Zellen der Linie PT stieg ab Tag 3 von 9 +/- 0 auf etwa 14 +/- 1 μ kat/kg Protein. Nach Tag 6 nahm die Aktivität des Enzyms langsam und parallel zu dem aus Linie 6M ab.

Abb. 4.10.: Spezifische enzymatische β P6OMT Aktivität der Linien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Dreifachproben].



4.2.4. Lignangehalte

Wie bereits erwähnt wurden die beiden Zellsuspensionskulturen aufgrund ihrer unterschiedlichen Akkumulation von Aryltetralinen ausgewählt. Während Linie 6M fast ausschließlich 6MPTOX synthetisiert, wird in Linie PT neben geringen Mengen an 6MPTOX überwiegend PTOX gebildet (Abb. 4.11.). Neben den beiden „Hauptlignanen“ konnten auch die Vorstufen DOP, β -Peltatin und PAM nach HPLC-Analyse der Lignanextrakte detektiert werden (Abb. 4.12.). Die postulierte Vorstufe (DOP) der „Hauptlignane“ PTOX und 6MPTOX konnte in Zellen beider Linien gefunden werden.

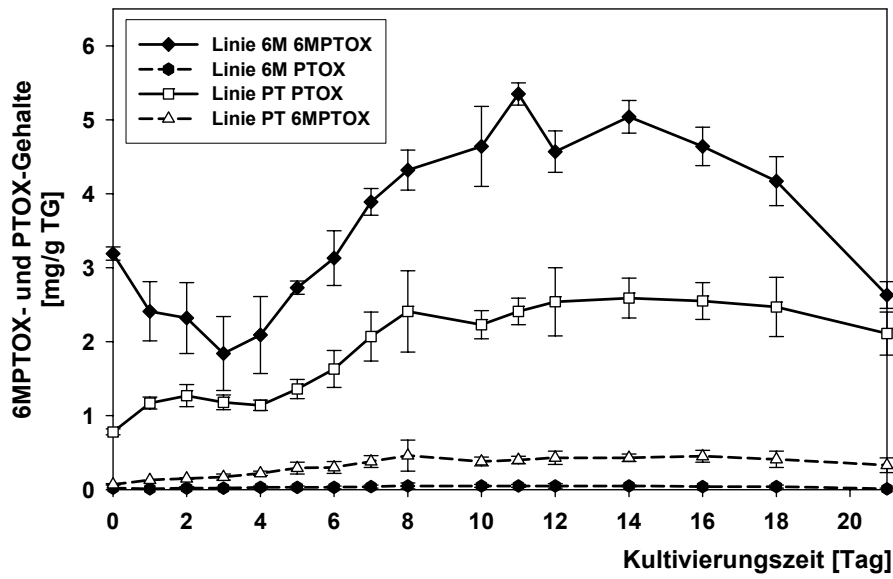


Abb. 4.11.: 6MPTOX- und PTOX-Gehalte der Zelllinien 6M und PT über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen]

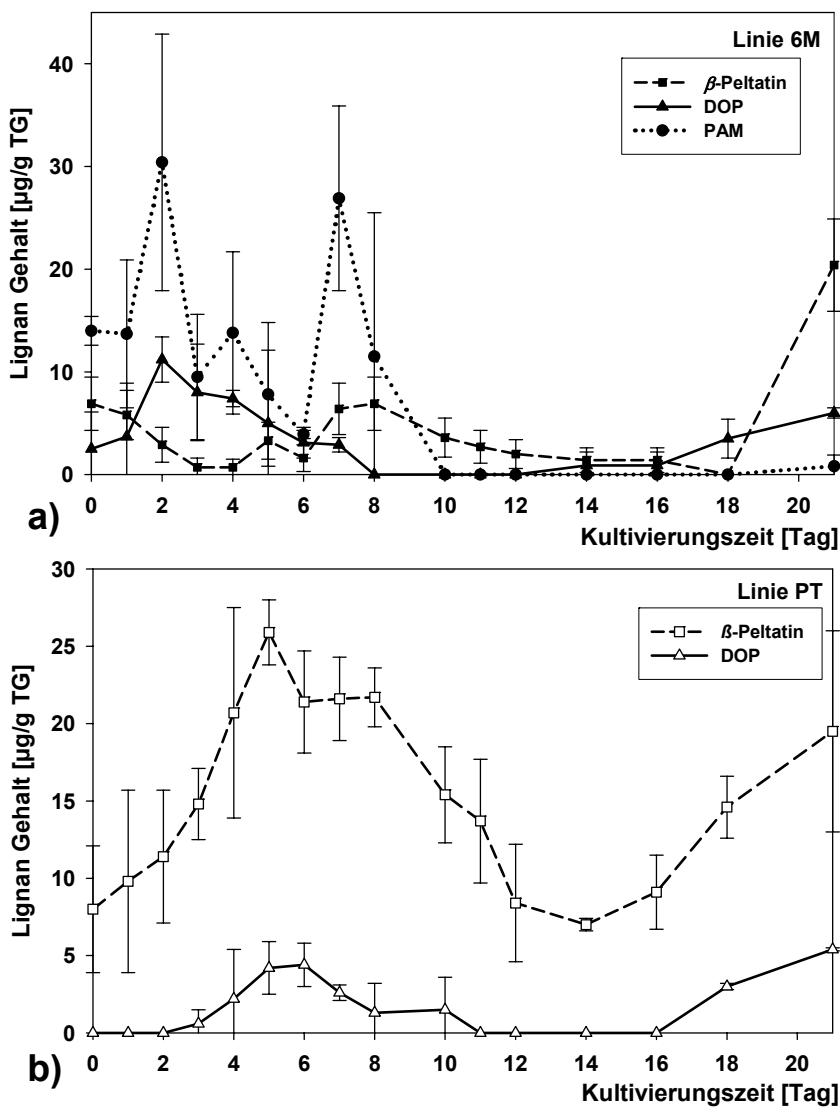


Abb. 4.12.: DOP, β -Peltatin und PAM-Gehalte der Zelllinien 6M (a) und PT (b) im Verlauf von 21 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen]

Die Lignanextraktion aus getrockneten Zellen erfolgte in diesem Fall unter wässrigen Bedingungen und unter Zugabe von β -Glucosidase (3.3.5.). Dies ermöglichte die Detektion des Gesamtgehaltes an Lignanaglyka der Zellen und nicht nur eines Teiles, der möglicherweise in glucosilierter Form vorliegt (4.5.1.).

Der 6MPTOX-Gehalt in Linie 6M sank zunächst im Verlauf der Tage 0 bis 3 von 3,2 +/- 0,1 auf 1,8 +/- 0,5 mg/g TG ab, stieg danach bis zu einem Maximum von 5,4 +/- 0,2 mg/g TG (Tag 11) an und sank erneut auf 2,6 +/- 0,2 mg/g TG (Tag 21). Der PTOX-Gehalt in Linie 6M war mit 0,05 +/- 0,04 mg/g TG an den Tagen 8 - 14 vergleichsweise gering. Linie PT akkumulierte hingegen zunehmend höhere Gehalte an PTOX mit einem Maximum von etwa 2,5 - 2,6 +/- 0,5 mg/g TG an den Tagen 12 - 16 und bis zu 0,5 +/- 0,2 mg/g TG 6MPTOX an den Tagen 8 und 16.

In Linie 6M stiegen die Gehalte an DOP innerhalb von 2 Tagen auf ein Maximum von etwa 11,2 +/- 2,2 μ g/g TG und sanken bis Tag 8 unter die Nachweisgrenze (Abb. 4.12. a). In Linie PT traten hingegen erstmals an Tag 3 geringe Mengen an DOP auf, die an Tag 4 - 6 ein Maximum von 4,4 +/- 1,7 μ g/g TG erreichten. Ab Tag 11 war in Linie PT zunächst kein DOP mehr detektierbar. In beiden Linien traten DOP und β -Peltatin nach Tag 16 erneut verstärkt auf. Dieser Anstieg lässt sich durch die Freisetzung der verschiedenen Inhaltsstoffe nach dem Absterben der Zellen erklären, was bereits unter 4.2.1. für den Anstieg der Mediumsparameter angeführt wurde.

Die Gehalte an β -Peltatin waren in Zellen der Linie 6M schwankend. Sie sanken zunächst bis Tag 4 von 6,9 +/- 2,6 auf etwa 0,7 +/- 0,8 μ g/g TG, stiegen danach erneut auf 6,9 +/- 2,6 mg/g TG an den Tagen 7 und 8 an und sanken bis Tag 18 unter die Nachweisgrenze (< 1 μ g). Die β -Peltatin-Gehalte der Linie PT stiegen hingegen kontinuierlich von 8,0 +/- 4,1 μ g/g TG an Tag 0 auf ca. 25,9 +/- 2,1 μ g/g TG an Tag 5 an. Nach einer kurzen Plateauphase zwischen Tag 6 und 8 mit 22,0 +/- 3,1 μ g/g TG fielen die Gehalte auf 7,0 +/- 0,4 μ g/g TG bis Tag 14 ab, um bis Tag 21 erneut auf etwa 19,5 +/- 6,5 μ g/g TG anzusteigen.

Während in Zellen der Linie PT kein PAM gefunden werden konnte, waren die Gehalte in Linie 6M stark schwankend. An den Tagen 2 und 7 wurden maximale PAM-Gehalte mit 30,4 und 26,9 +/- 12,5 μ g/g TG in den Zellen gefunden.

4.3. Biochemische Charakterisierung der DOP6H

Die Umsetzung von DOP zu β -Peltatin konnte in-vitro mit Mikrosomensuspensionen aus *L. flavum* und *L. nodiflorum* gezeigt werden. Erstmals ist dies nun auch in mikrosomaler Rohfraktion von *L. album* Zellsuspensionskulturen gelungen (4.2.3.2). Das entstandene β -Peltatin wurde mittels **LC/MS** im Vergleich zu einer Standard- β -Peltatin Lösung auf seine Identität überprüft. Obwohl die Menge an gebildetem β -Peltatin relativ gering war, konnte die Identität aufgrund des Fragmentierungsmusters eindeutig bestätigt werden (siehe Anhang 10.4.). Sämtliche Enzymteste wurden mittels HPLC analysiert und die Retentionszeiten und Spektren des erhaltenen Produktes mit denen einer Standard- β -Peltatin Lösung verglichen. Desweiteren wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt, um die Richtigkeit der enzymatischen Reaktion zu belegen. 0-Kontrollen, wie die Inkubation der Enzymteste mit gekochtem Protein, ohne NADPH, ohne das Substrat DOP, oder direktes Abstoppen des Testes ohne Inkubation bestätigten, dass der Umsatz von DOP zu β -Peltatin eine echte enzymatische Reaktion ist. Wie die Charakterisierung der beiden Zelllinien 6M und PT über den Kulturverlauf ergab, kann dieses Enzym fast ausschließlich in der Zelllinie 6M detektiert werden. Aus diesem Grund wurden nur die Eigenschaften der DOP6H aus Zellen der Linie 6M näher untersucht und das pH- und Temperaturoptimum sowie die Protein- und Zeitabhängigkeit betrachtet (3.4.1.). Die dabei erhaltenen Informationen dienten zugleich als Vorarbeiten für die folgenden Enzymkinetiken und Hemmexperimente (4.3.2. und 4.3.3.).

4.3.1. Bestimmung allgemeiner Parameter

Das **pH-Optimum** wurde im Bereich 6 - 9 untersucht. Die Enzymaufarbeitungen erfolgten in 0,1 M Tris/HCl Puffer mit verschiedenen pH-Werten. Dies diente im Wesentlichen dazu, den optimalen Aufarbeitungspuffer für die enzymatische Reaktion zu finden. Die tatsächlichen pH-Werte der Enzymteste bei 30°C betragen 6,4; 6,6; 7,0; 7,0; 7,8; 8,3 und 8,9 (anstelle der Puffer pH-Werte: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 und 9,0). Innerhalb des verwendeten Pufferbereiches war kein eindeutiges Maximum erkennbar, sondern lediglich ein relativ breiter Bereich zwischen pH 7,5 und 8,5, bei dem die Aktivität maximal war (Abb. 4.13. a)). Alle weiteren Enzymaufarbeitungen und -teste erfolgten daher bei pH 7,5.

Die Suche nach der optimalen **Proteinkonzentration** diente der Ermittlung der maximalen Produktausbeute innerhalb des linearen Bereiches. Vorversuch 1 (Experiment 1) zeigte, dass bis zu einer Proteinmenge von 500 μ g (unter Berücksichtigung der Standardabweichungen) der lineare Aktivitätsbereich noch nicht verlassen wurde (Abb. 4.13. b)). Bei der Wiederholung (Experiment 2) war dies jedoch zwischen 300 und 400 μ g der Fall. Um eine möglichst hohe Ausbeute an β -Peltatin bzw. Aktivität der DOP6H zu erzielen, wurden die folgenden Experimente mit 338 μ g Protein/Enzymtest durchgeführt.

Das **Temperaturoptimum** wurde durch die Inkubation der einzelnen Testansätze bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C bestimmt (Abb. 4.13. c)). Die maximalen spezifischen enzymatischen Aktivitäten lagen im Bereich zwischen 28 und 34°C (Experiment 1) bzw. 30°C (Experiment 2). Alle weiteren Enzymteste wurden deshalb bei 30°C inkubiert.

Bei der Untersuchung der **Zeitabhängigkeit** wurden die Enzymteste zu verschiedenen Zeiten abgestoppt und die Bildung des Produktes analysiert (Abb. 4.13. d)). Die Menge des gebildeten β -Peltatin erreichte nach 60 min noch nicht das Maximum. Der Vergleich beider Experimente zeigte, dass die Aktivitäten der DOP6H von einer Aufarbeitung zur nächsten stark schwanken können. Bei Experiment 1 brach der lineare Aktivitätsbereich bei 20 min ab und stieg anschließend erneut linear weiter an. Bei Experiment 2 erfolgte dieser Einbruch nach 40 min. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der K_M - und v_{max} -Werte eine Inkubationszeit von 20 min gewählt.

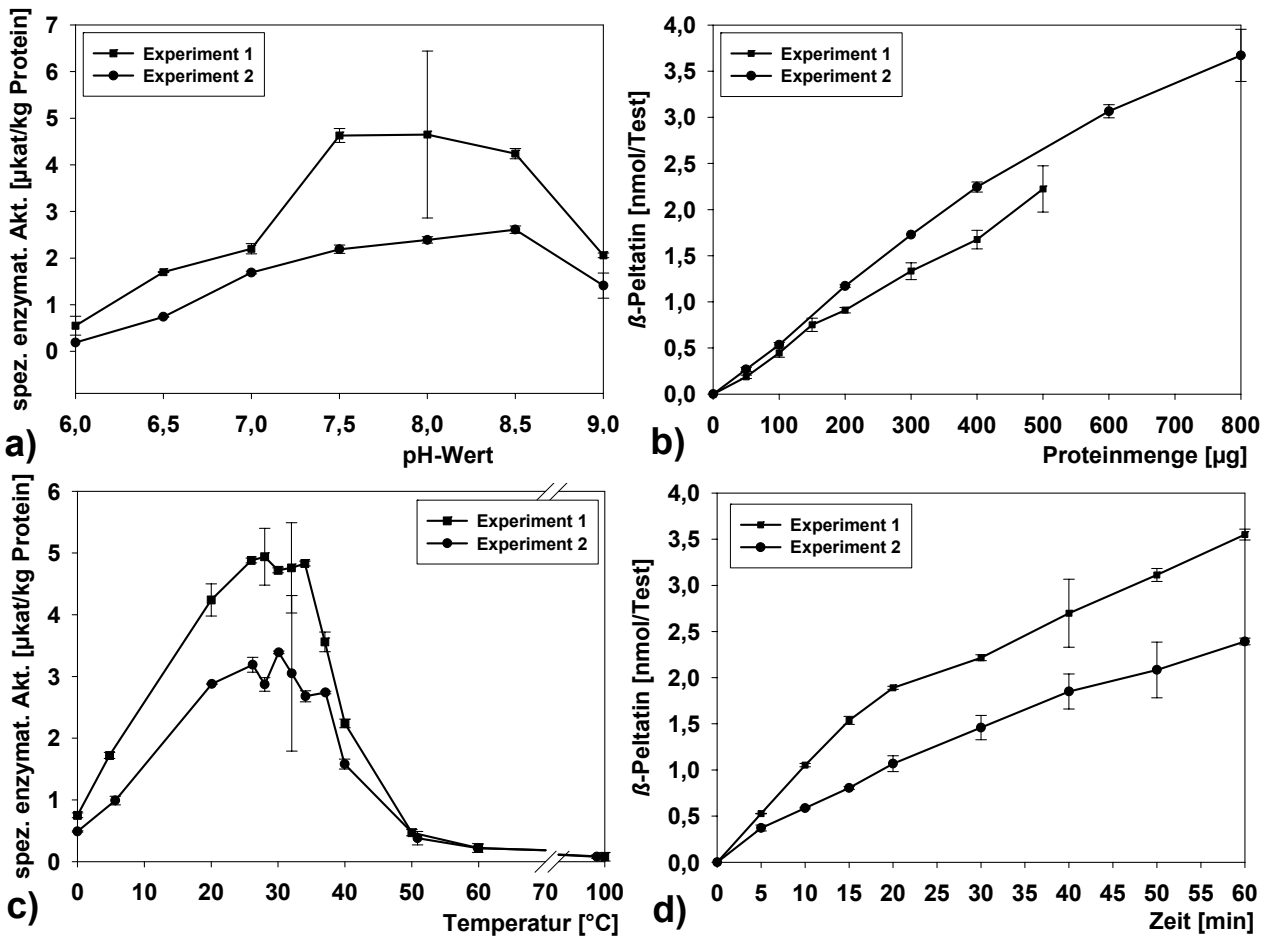


Abb. 4.13.: Charakteristika der DOP6H

Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen DOP6H-Aktivität a) vom pH-Wert des Puffers und c) von der Inkubationstemperatur; Bildung von β -Peltatin [nmol/Test] in Abhängigkeit von der b) eingesetzten Proteinmenge und d) Inkubationszeit [Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Messreihe mit Doppelproben]

4.3.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für DOP und NADPH

Kinetische Daten geben wichtige Informationen über die Wechselwirkung zwischen einem Enzym und dem jeweiligen Substrat, sie können mit dem Michaelis-Menten-Modell erklärt werden. Allerdings gilt dieses Modell nur für Reaktionen 1. Ordnung, bei denen sich ein Enzym mit einem Substratmolekül zu einem Enzym-Substrat-Komplex zusammenfindet. Bei der DOP6H Reaktion handelt es sich jedoch um eine Reaktion 3. Ordnung, da die Reaktion nur dann ablaufen kann, wenn sich Enzym, DOP, NADPH und Sauerstoff zu einem Komplex zusammengefunden haben. Für die Ermittlung der apparenten K_M - und v_{max} -Werte der DOP6H aus mikrosomaler Proteinrohfraktion wurden deshalb die Versuchsbedingungen so gewählt, dass immer eines der benötigten Substrate (DOP oder NADPH) in Sättigung vorlag, bzw. für Sauerstoff wurde angenommen, dass er immer in ausreichender Form in den Testansätzen gelöst zur Verfügung stand (3.4.2.). Alle Testansätze wurden für 20 min bei 30°C inkubiert und zur besseren Sauerstoffversorgung zwischendurch vorsichtig geschüttelt. Auf diese Weise wurde eine Reaktion Pseudo 1. Ordnung geschaffen, auf die sich die Michaelis-Menten-Gleichung anwenden lässt. Insgesamt wurde die Bestimmung der apparenten K_M - und v_{max} -Werte fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt, denn wie in Folge zu erkennen ist (Abb. 4.14. und 4.15.), treten auch bei diesen Enzymtesten je nach Enzymaufarbeitung die bereits erwähnten Aktivitätsschwankungen auf.

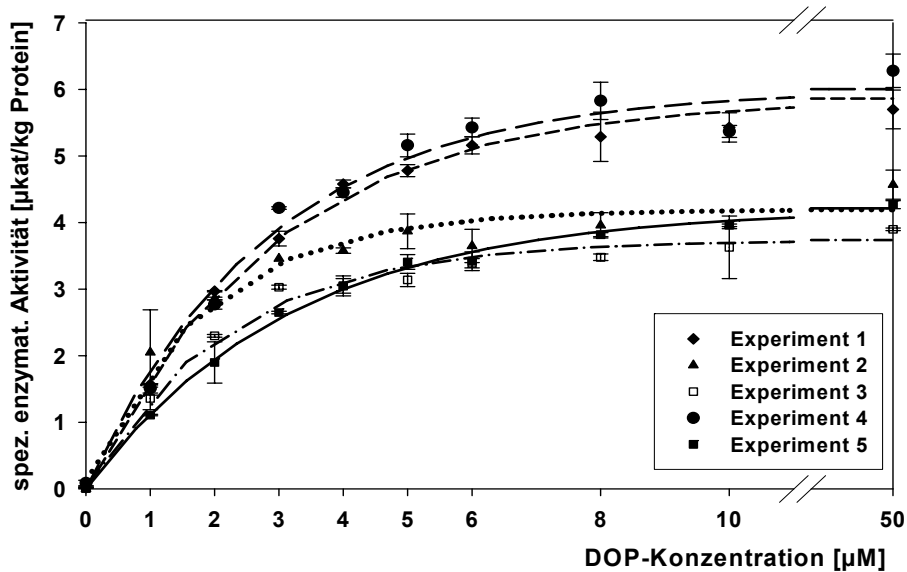


Abb. 4.14.: Substrat- (DOP) Abhängigkeit der DOP6H Reaktion - Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten wurden bei steigenden DOP-Konzentrationen ermittelt. Zur besseren Übersicht sind nur die Ergebnisse bis 10 μM bzw. mit Unterbrechung bis 50 μM dargestellt. Die Kurven nähern sich asymptotisch dem Maximalwert [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben].

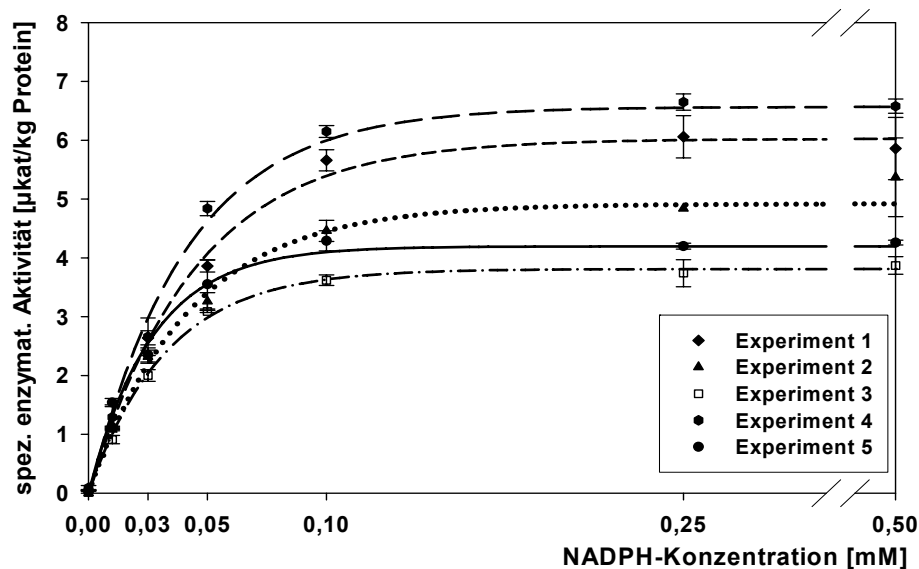


Abb. 4.15.: Co-Substrat- (NADPH) Abhängigkeit der DOP6H Reaktion - Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten wurden bei steigenden NADPH-Konzentrationen ermittelt. Zur besseren Übersicht sind nur die Ergebnisse bis 0,25 mM bzw. mit Unterbrechung bis 0,5 mM dargestellt. Die Kurven nähern sich asymptotisch dem Maximalwert [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben].

Mit steigender DOP bzw. NADPH Konzentration steigen die spezifischen enzymatischen Aktivitäten exponentiell an und nähern sich asymptotisch ihren Maximalwerten (Abb. 4.14. und 4.15.). Diese sind graphisch schlecht zu bestimmen, da bei zu hohen Substrat- oder Cosubstrat-Gaben eine Abnahme der Aktivität eintreten kann. Eine Substrathemmung, die durch sterische Behinderung an der Substratbindetasche auftreten kann, konnte bei der Ermittlung der DOP6H Kinetik bis zu einer Konzentration von 200 μM DOP bzw. 500 μM NADPH nicht beobachtet werden.

Die apparente Michaelis-Menten-Konstante K_M und die v_{max} -Werte für DOP und NADPH wurden graphisch mit dem Programm SigmaPlot 2001 (10.2.3.) und rechnerisch nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard ermittelt, die die erhaltenen Messwerte z.T. unterschiedlich stark gewichten. Die Werte der einzelnen Testreihen wurden gemittelt (Tabelle 4.1.).

Die ermittelten v_{max} -Werte der Testreihen, sowohl bei den Experimenten der Substrat- als auch der Co-substrat-Abhängigkeit waren innerhalb der Testreihen stark unterschiedlich (Abb. 4.14. und 4.15.). So lagen z.B. die Werte der DOP-Abhängigkeit zwischen 4 und 7 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein (Auswertung der einzelnen Messreihen aus Abb. 4.14. mittels SigmaPlot). Der Vergleich der Mittelwerte der Substrat- mit denen der Co-substrat-Abhängigkeits-Testreihen zeigte jedoch, dass die v_{max} -Werte untereinander kongruent sind und im Bereich von 5,1 - 6,0 \pm 1,7 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein liegen (Tab. 4.1.). Die apparenten K_M -Werte für DOP

liegen im Bereich von 1,0 - 2,8 +/- 1,2 μM , während sie für NADPH etwa im Bereich von 20 - 40 +/- 13,6 μM zu finden sind.

Tab.: 4.1.: Michaelis-Menten-Konstanten der DOP6H

„apparenter K_M -Wert für“ bezeichnet die erhaltenen Werte bei der Bestimmung der Substrat- bzw. Cosubstrat-Abhängigkeit - Die v_{\max} - und K_M -Werte wurden mit vier verschiedenen Methoden ausgewertet, die Ergebnisse aller Testreihen gemittelt und die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt.

Kalkulationsart nach	apparenter K_M -Wert für DOP [μM]	v_{\max}^1 [$\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein]	apparenter K_M -Wert für NADPH [μM]	v_{\max}^2 [$\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein]
SigmaPlot (10.2.3.)	1,6 +/- 0,4	5,2 +/- 1,3	25,8 +/- 6,2	5,4 +/- 1,3
Lineweaver-Burk	2,8 +/- 1,2	5,9 +/- 1,7	40,9 +/- 13,6	6,0 +/- 1,6
Hanes-Woolf	1,0 +/- 0,6	4,9 +/- 1,0	18,4 +/- 7,6	5,1 +/- 1,0
Eadie-Scatchard	2,3 +/- 0,9	5,5 +/- 1,4	37,0 +/- 10,9	5,9 +/- 1,5

v_{\max}^1 - Wert ermittelt bei variabler DOP-Konzentration

v_{\max}^2 - Wert ermittelt bei variabler NADPH-Konzentration

4.3.3. Bestimmung der Inhibition der DOP6H

CYP Enzyme sind durch verschiedene spezifische Hemmstoffe inhibierbar. Jeder CYP Inhibitor scheint dabei für eine spezielle CYP Familie effizient und spezifisch zu sein, wobei hohe Konzentrationen eine Familien-übergreifende Wirkung haben können (Rademacher et al., 1987; Zhang et al., 2002).

In einem Vorversuch wurden verschiedene Hemmstoffe zu den Standardenzymtesten zugegeben, darunter die Dioxygenase Hemmstoffe Pyridindicarboxylsäure 2,4 (PCA2,4), Pyridindicarboxylsäure 2,5 (PCA2,5) und Trinexapac-Ethyl (Trinex) und die CYP Hemmstoffe Tetcyclacis (NDA), Clotrimazol (CLOT) und Aminobenzotriazol (ABT). Dabei konnte in den Testansätzen mit 10^{-5} M CLOT oder NDA eine Senkung der spezifischen enzymatischen Aktivität um 50 % im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hemmstoffzugabe beobachtet werden, während die Zugabe von 10^{-4} M CLOT oder NDA zu einer vollständiger DOP6H Hemmung führte. Alle anderen Hemmstoffe, mit Ausnahme von ABT, zeigten keinen Einfluss auf die Umsetzung von DOP zu β -Peltatin (Daten nicht gezeigt). ABT verursachte bei der maximal eingesetzten Konzentration von 0,5 mM lediglich ein Absinken der spezifischen enzymatischen Aktivität von 20 %.

Bei der stufenweisen Erhöhung der CLOT oder NDA Konzentration konnte bereits bei Gabe von 1 μM eine Hemmung der DOP6H Reaktion beobachtet werden (Abb. 4.16. a) und b)). Dabei nahm die spezifische enzymatische Aktivität exponentiell ab und näherte sich asymptotisch dem Wert 0. Eine 50 %ige Hemmung der DOP6H Reaktion wurde durch Zugabe von etwa 10 μM NDA oder 10 - 20 μM CLOT erreicht. Die Abnahme der DOP6H Aktivität mit steigender Cytochrom c (Cyt c) Konzentration verlief hingegen sigmoidal (Abb. 4.16. c)). Erst ab einer Konzentration zwischen 0,5 - 0,75 μM Cyt c nahm die spezifische enzymatische Aktivität ab, sank dann fast linear auf etwa 50 % der Aktivität ohne Hemmstoffzugabe und ließ sich danach nicht weiter durch höhere Hemmstoffgabe vermindern.

Der **spezifische Einfluss der Inhibitoren NDA und CLOT** auf die DOP6H Aktivität wurde mit Hemmkinetiken eingehender untersucht (3.4.3.). Dabei wurden zu den Standardenzymtesten die Hemmstoffe und das Substrat DOP in variablen Konzentrationen zugegeben. Diese Experimente wurden zweimal mit jeweils Doppelproben durchgeführt. Auf Grund der bereits erwähnten DOP6H Aktivitätsschwankungen sind die erhaltenen v_{\max} -Werte der Vergleichsmessreihen stark unterschiedlich. Die Tendenzen der Hemmung bzw. der Kurvenverläufe waren jedoch weitestgehend identisch. Im Folgenden wird daher jeweils nur ein Beispiel (bestehend aus Doppelproben) einer Messreihe vorgestellt (Abb. 4.17. und 4.19.).

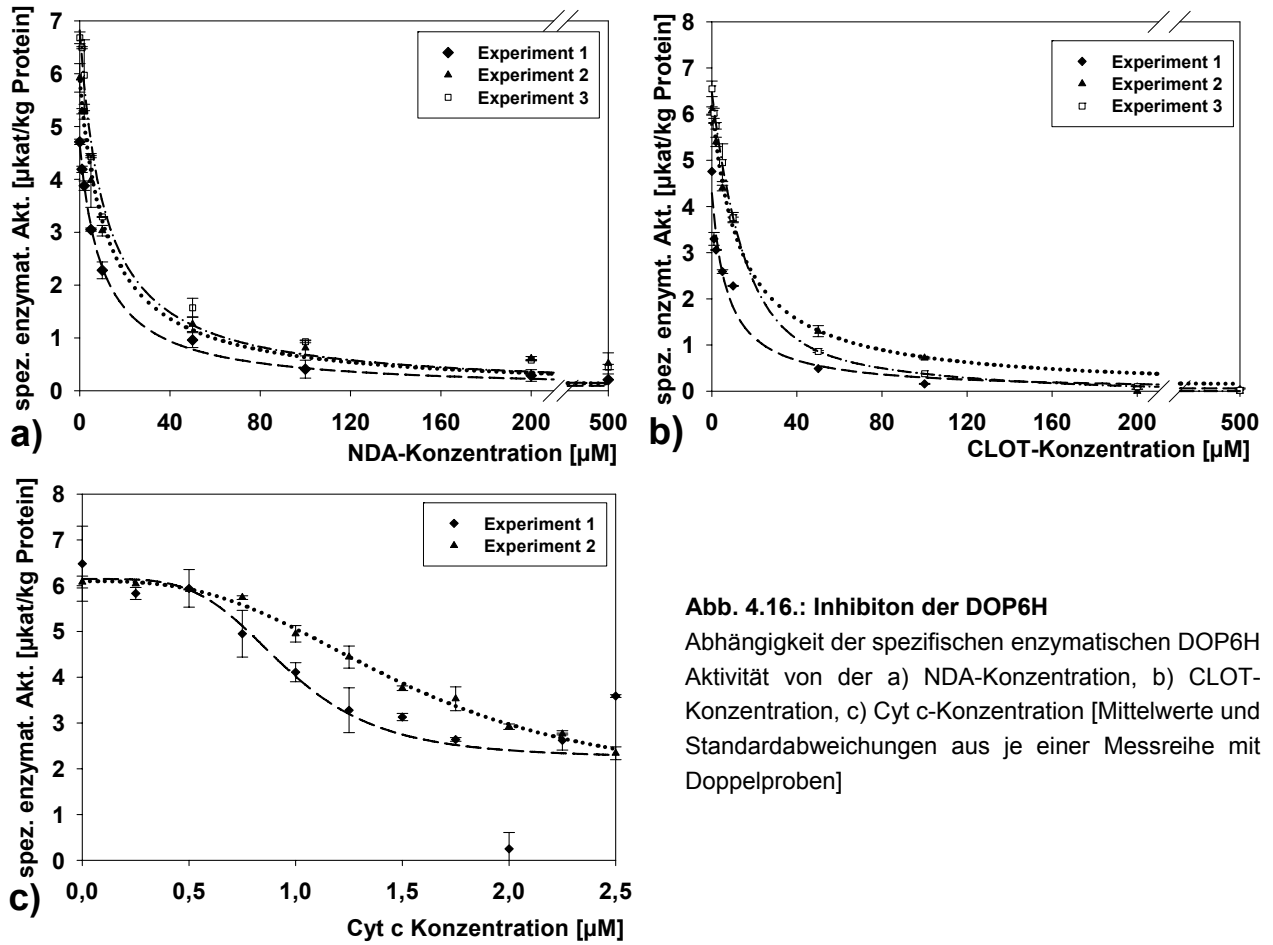


Abb. 4.16.: Inhibitor der DOP6H

Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen DOP6H Aktivität von der a) NDA-Konzentration, b) CLOT-Konzentration, c) Cyt c-Konzentration [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

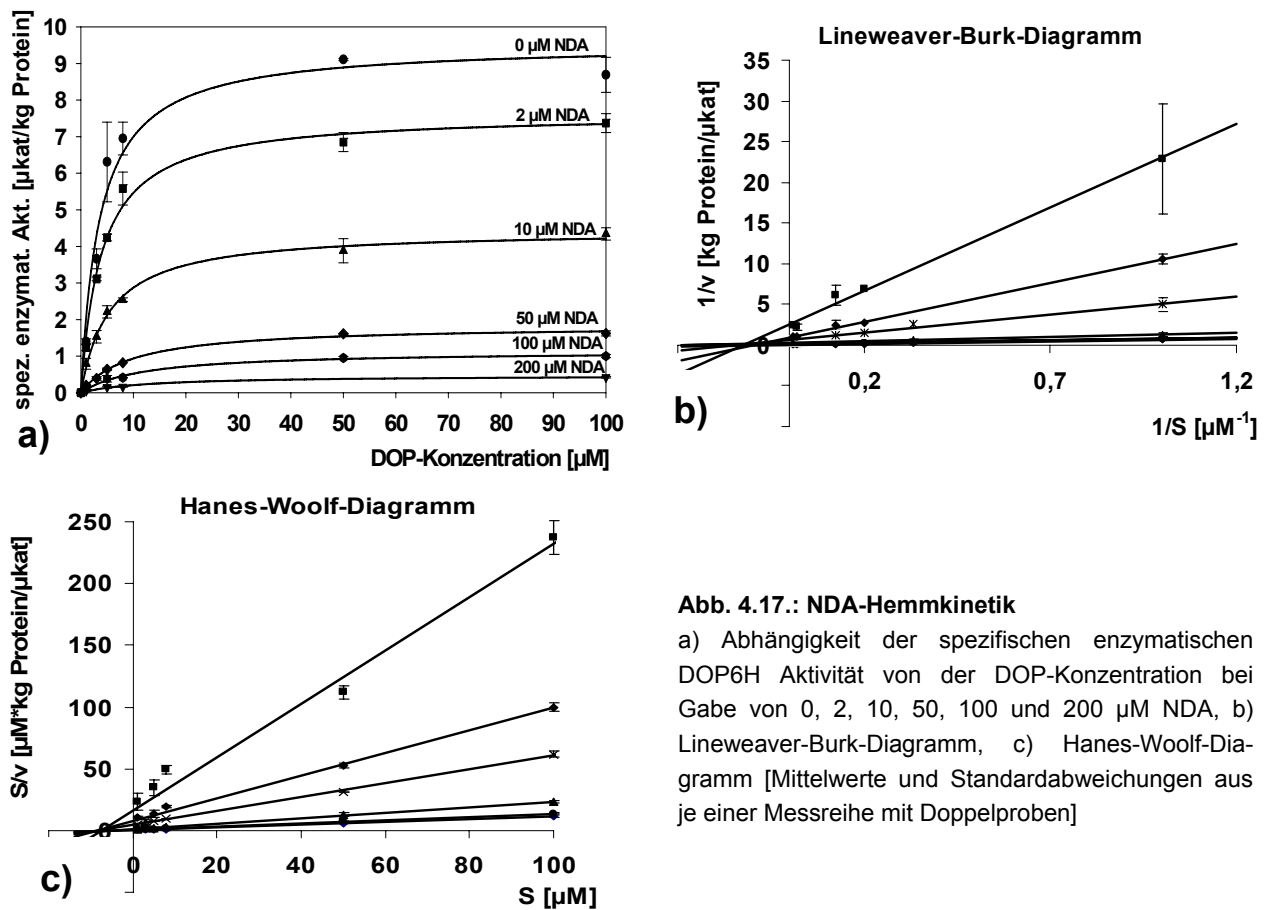


Abb. 4.17.: NDA-Hemmkinetik

a) Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen DOP6H Aktivität von der DOP-Konzentration bei Gabe von 0, 2, 10, 50, 100 und 200 μM NDA, b) Lineweaver-Burk-Diagramm, c) Hanes-Woolf-Diagramm [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

Mit steigender **NDA**-Konzentration wurden die ermittelten v_{\max} -Werte kleiner. Die graphische Auswertung mit dem Programm SigmaPlot2001 (10.2.3.) ergab, dass die K_M -Werte geringfügig sanken (Abb. 4.17. a)), wohingegen bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard die K_M -Werte geringfügig anstiegen (Werte 10.5.). Die v_{\max} -Werte sanken im Mittel von etwa 13 auf 0,5 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein. Bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf treffen sich die Geraden der doppelt reziproken Auftragung der Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration, bzw. der reziproken Auftragung der Substratkonzentration zur Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration, annähernd in einem Punkt (Abb. 4.17. b) und c)). Die Ordinatenschnittpunkte bei der Lineweaver-Burk Auswertung lagen dabei zwischen $-0,1$ und $-0,24 \mu\text{M}^{-1}$, während sich die Geradenschnittpunkte in einem Bereich von $-0,1$ bis $-0,5 \mu\text{M}^{-1}$ befinden (Abb. 4.17. b)). Trotz dieser geringen Ungenauigkeit der Geradenschnittpunkte und des geringfügigen Anstiegs der K_M -Werte, deutet die Hemmkinetik auf eine nicht-kompetitive oder gemischte („mixed-type“) Hemmung hin (nach Dixon und Webb, 1964).

Unter dieser Annahme, dass es sich bei der Hemmung der DOP6H mit NDA um eine nicht-kompetitive oder gemischte Inhibition handelt, kann die Inhibitionskonstante (K_i) nach Dixon und Webb (1964) graphisch ermittelt werden. Dabei ergibt sich der K_i -Wert aus den Geradenschnittpunkten bei $-K_i$ nach Auftragung der reziproken Geschwindigkeit, ermittelt bei verschiedenen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gegen die Inhibitorkonzentration (Abb. 4.18.). Bei dieser Auftragung war eine geringe positivkooperative Tendenz erkennbar, die dazu führte, dass die Schnittpunkte der „unbereinigten“ Ausgleichsgeraden (Abb. 4.18.a)) in einem Bereich von $-11,9$ bis $+5,7 \mu\text{M}$ zu finden waren. Gemittelt ergab sich ein K_i -Wert von $1,5 \pm 6 \mu\text{M}$. Unter Nichtbeachtung der Gerade der $1 \mu\text{M}$ DOP-Konzentration und der Erstellung der Ausgleichsgeraden zwischen den Messwerten 0 bis $50 \mu\text{M}$ NDA, ergab sich ein Diagramm von „bereinigten“ Ausgleichsgeraden (Abb. 4.18. b)). Ausschlusskriterien für diese „bereinigten“ Ausgleichsgeraden waren, dass kleine Fehler in v bei kleinen S -Werten eine große Abweichung in $1/v$ ergeben und daher geringer gewichtet (bzw. vernachlässigt) werden sollten (Bode et al., 2005). In diesem Fall schneiden sich alle Geraden in einem Bereich von $-3,4$ bis $+2,4 \mu\text{M}$, was einen K_i -Mittelwert von $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ergibt.

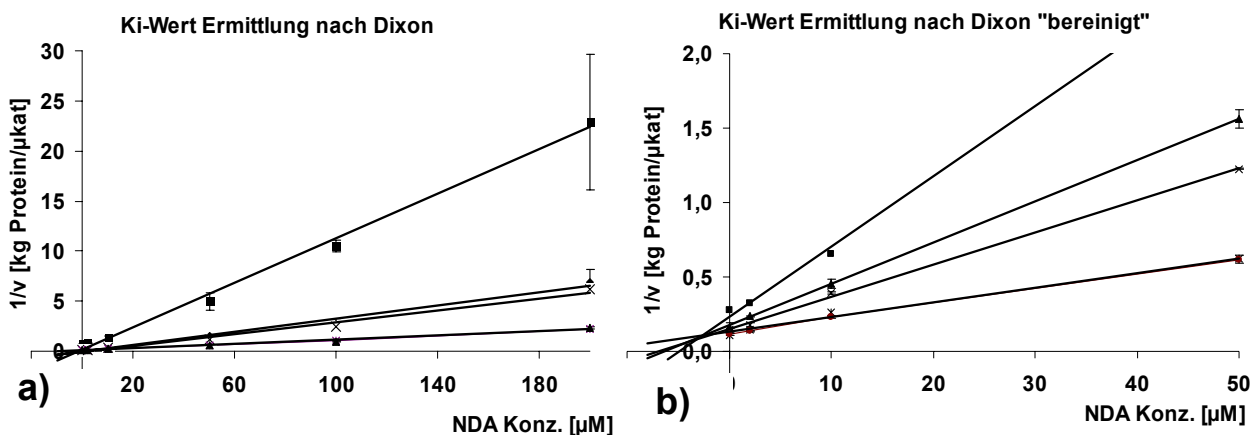


Abb. 4.18.: K_i -Wert Ermittlung nach Dixon

Aufgetragen sind die spezifischen enzymatischen DOP6H Aktivitäten bei einzelnen DOP-Konzentrationen gegen die NDA-Konzentration. a) Ermittlung der K_i -Werte aus den „Rohdaten“, b) Ermittlung der K_i -Werte unter Ausschluss einiger Daten (Gerade der $1 \mu\text{M}$ DOP-Konzentration und die Ausgleichsgeraden wurden zwischen die Messpunkte von 0 bis $50 \mu\text{M}$ NDA gelegt anstelle zwischen 0 bis $200 \mu\text{M}$)

Bei Betrachtung der Abb. 4.18 b) (K_i -Wert Ermittlung nach Dixon „bereinigt“) fällt auf, dass der Schnittpunkt der Geraden nicht auf der x -Achse erfolgt, was nach Dixon und Webb (1964) auf eine Hemmung des gemischten Typs hindeutet. Es ist noch anzumerken, dass strenggenommen zwei Konstanten für diesen Inhibitionstyp relevant sind. K_i definiert die Bindung des Enzyms mit dem Inhibitor,

während K_i die Bindung des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes beschreibt. Da für den Vergleich mit Literaturdaten ausschließlich die K_i -Werte relevant sind, wurde der K_i -Wert nicht berechnet.

Der Einfluss von CLOT auf die DOP6H Reaktion unterscheidet sich von der des NDAs hinsichtlich der v_{max} - und K_M -Werte. Mit steigender CLOT-Konzentration wurden die ermittelten v_{max} -Werte stark vermindert. Bei CLOT-Konzentrationen zwischen 0 und 10 μM sanken die v_{max} -Werte von etwa 3,2 auf maximal 1,7 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein, während sie bei 50 μM CLOT zwischen 0,3 und 0,7 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein lagen. Ab einer Konzentration von 100 μM war fast keine DOP6H Aktivität mehr messbar (Abb. 4.19. a)).

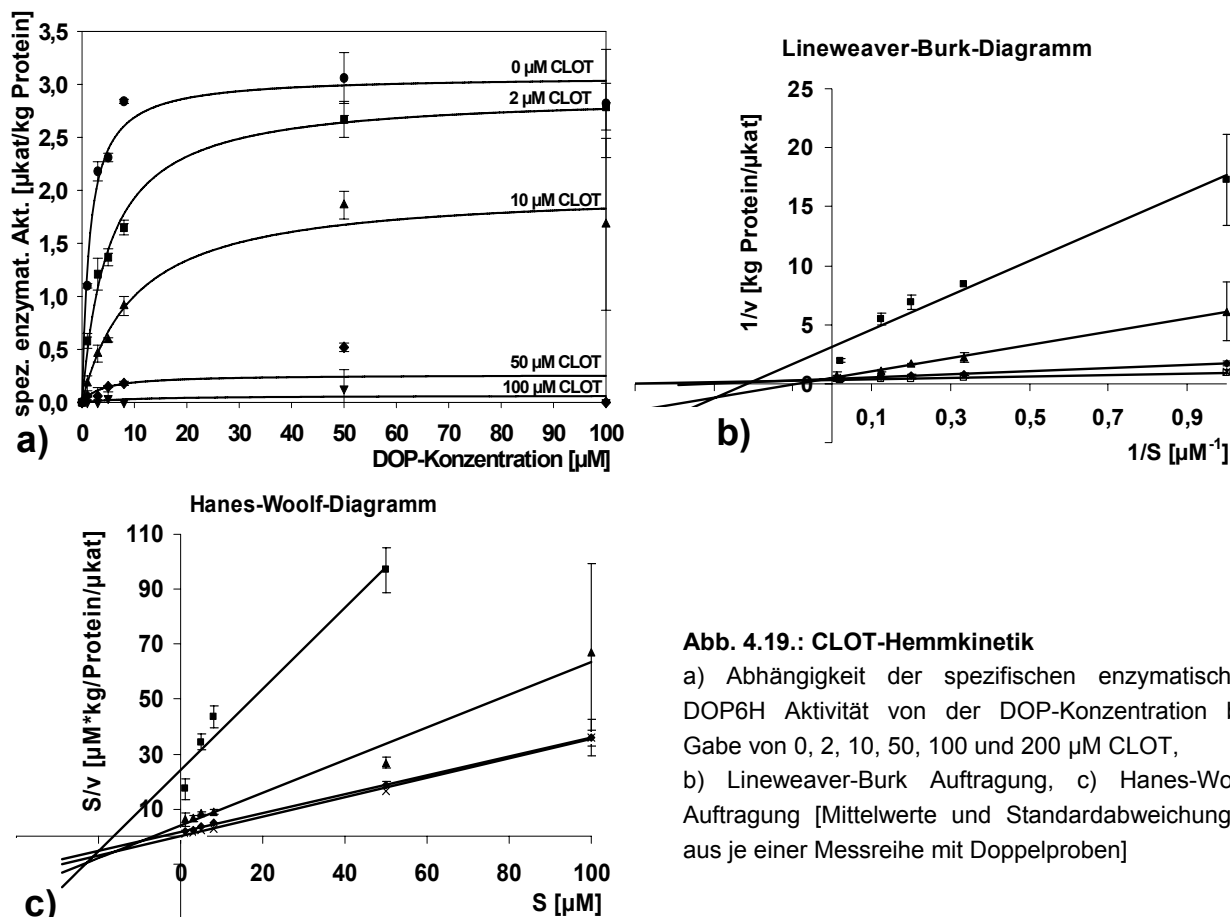


Abb. 4.19.: CLOT-Hemmkinetik

a) Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen DOP6H Aktivität von der DOP-Konzentration bei Gabe von 0, 2, 10, 50, 100 und 200 μM CLOT, b) Lineweaver-Burk Auftragung, c) Hanes-Woolf Auftragung [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

Im Gegensatz dazu stiegen die K_M -Werte nach Auswertung mit dem Programm SigmaPlot2001 (10.2.3.), Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard im Mittel von 1,4 auf 10,4 μM (Werte 10.5.). Bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf treffen sich die Geraden der doppelt reziproken Auftragung der Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration, bzw. der reziproken Auftragung der Substratkonzentration zur Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration, in keinem gemeinsamen Punkt (Abb. 4.19. b) und c)). Dadurch ist keine eindeutige Aussage über den vorliegenden Hemmtyp möglich.

Unter der Annahme, dass es sich möglicherweise bei der Hemmung der DOP6H mit CLOT um eine gemischte Inhibition handeln könnte, wurde mittels Auftragung der reziproken Geschwindigkeit bei verschiedenen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gegen die Inhibitorkonzentration versucht, K_i -Werte aus den Geradenschnittpunkten bei $-K_i$ zu erhalten. Der Bereich der Geradenschnittpunkte liegt dabei zwischen $-6,3$ und $-0,5$ μM (Abb. 4.20. a)). Unter Nichtbeachtung des reziproken Wertes der Geschwin-

digkeit bei der 1 μM DOP- und 50 μM CLOT-Konzentration ergibt sich ein Diagramm von „bereinigten“ Ausgleichsgeraden (Abb. 4.20. b)). In diesem Fall würden sich alle Geraden in einem Bereich von -5,8 bis -0,1 μM schneiden, was einem K_i -Mittelwert von 1,7 \pm 1,7 μM entsprechen würde.

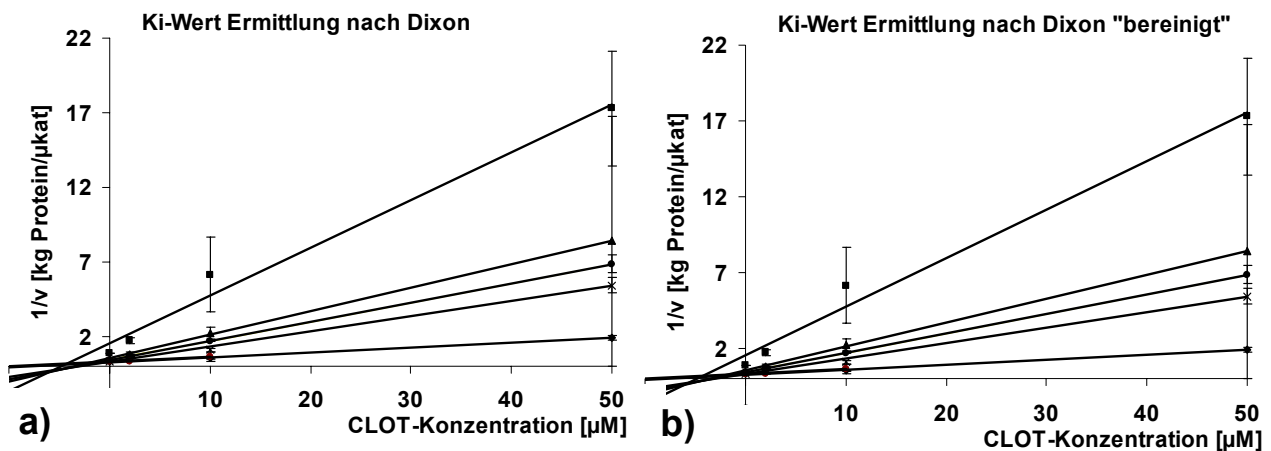


Abb. 4.20.: K_i -Wert Ermittlung nach Dixon

Aufgetragen sind die ermittelten spezifischen enzymatischen DOP6H Aktivitäten bei einzelnen DOP-Konzentrationen gegen die CLOT-Konzentration. a) Ermittlung der K_i -Werte aus den „Rohdaten“, b) Ermittlung der K_i -Werte unter Ausschluss einiger Daten (Gerade der 1, 50 und 100 μM DOP-Konzentration)

4.4. Biochemische Charakterisierung der β -Peltatin 6-O-Methyltransferase

Die Methylierung der freien OH-Gruppe am β -Peltatin erfolgt durch die β -Peltatin 6-O-Methyltransferase (β P6OMT), die ebenfalls in *L. nodiflorum* gefunden und charakterisiert wurde (Kranz und Petersen, 2003). Erstmals ist dies nun auch in der Rohproteinfraktion von *L. album* Zellsuspensionskulturen gelungen (4.2.3.2). Das entstandene PAM wurde mittels **LC/MS** im Vergleich zu einer Standard-PAM Lösung auf seine Identität überprüft, wobei diese aufgrund des Fragmentierungsmusters eindeutig bestimmt werden konnte (10.6.). Sämtliche Enzymteste wurden mittels HPLC analysiert und die Retentionszeiten und Spektren der erhaltenen Produkte mit denen einer Standard-PAM Lösung verglichen. Desweiteren wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt, um die Richtigkeit der enzymatischen Reaktion zu belegen. 0-Kontrollen, wie die Inkubation der Enzymteste - mit gekochtem Protein, ohne S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), ohne das Substrat β -Peltatin, oder direktes Abstoppen der Teste ohne Inkubation bestätigten, dass der Umsatz von β -Peltatin zu PAM eine „echte“ enzymatische Umsetzung ist.

Die Aktivität der β P6OMT konnte, wie unter 4.2.3.2. gezeigt in Zelllinien PT und 6M gefunden werden. Aus diesem Grund wurden pH- und Temperaturoptimum sowie die Protein- und Zeitabhängigkeit in beiden Zelllinien betrachtet (3.5.1.). Die dabei erhaltenen Informationen dienen zugleich als Vorarbeiten für die folgenden Enzymkinetiken und Hemmexperimente (4.4.2. und 4.4.3.). Es ist anzumerken, dass die Aktivitätsschwankungen der β P6OMT bei den einzelnen Enzymaufarbeitungen relativ gering waren. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Parallel-Experimente gemittelt und die Standardabweichung der Einzelmesswerte bestimmt.

4.4.1. Bestimmung allgemeiner Parameter

Das **pH-Optimum** wurde im Bereich 5,4 - 8,8 untersucht. Die Enzymaufarbeitungen erfolgten in 0,1 M Tris/HCl Puffer mit verschiedenen pH-Werten. Dies diente im Wesentlichen dazu den optimalen Aufarbeitungspuffer für die enzymatische Reaktion zu finden. Die tatsächlichen pH-Werte der Enzymteste bei 30°C betragen 6,3; 6,3; 6,4; 6,9; 7,4; 7,8; 8,4 und 8,7 (anstelle der Puffer pH-Werte: 5,4; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5;

8,0; 8,5 und 8,8). Innerhalb des verwendeten Pufferbereiches waren für die β P6OMT aus beiden Zelllinien keine eindeutigen Maxima erkennbar, sondern lediglich Bereiche maximaler Aktivität (Abb. 4.21. a)). Der pH-Optimumsbereich der β P6OMT aus Proteinrohextrakt der Linie 6M lag in etwa zwischen pH 7,5 und 8,5 und für Linie PT um pH 7. Alle weiteren Enzymaufarbeitungen und -teste wurden für beide Zelllinien bei pH 7,5 durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse mit den Charakterisierungsdaten (ebenfalls bei pH 7,5 ermittelt) zu vergleichen. Die Verluste der spezifischen enzymatischen Aktivität der β P6OMT aus Linie PT bei den Enzymaufarbeitungen und -testen bei pH 7,5 waren im Vergleich zu den Enzymtesten bei pH 7 um etwa 20 % geringer.

Bei der Ermittlung der optimalen **Proteinkonzentration**, bei der eine maximale Produktausbeute innerhalb des linearen Bereiches erreicht wurde, zeigte sich für Linie PT, dass bereits bei mehr als 100 μ g Protein pro Enzymtestansatz weniger PAM gebildet wurde (Abb. 4.21. b)), wohingegen für Linie 6M die Zunahme der PAM-Menge bis 150 μ g Protein fast linear erfolgte. Ab 150 μ g Protein pro Enzymtestansatz nahm auch in Linie 6M die PAM-Menge nicht weiter zu. Um eine möglichst hohe und vergleichbare Produktausbeute bzw. β P6OMT-Aktivität zu erhalten, wurden die folgenden Experimente mit 100 μ g Protein durchgeführt.

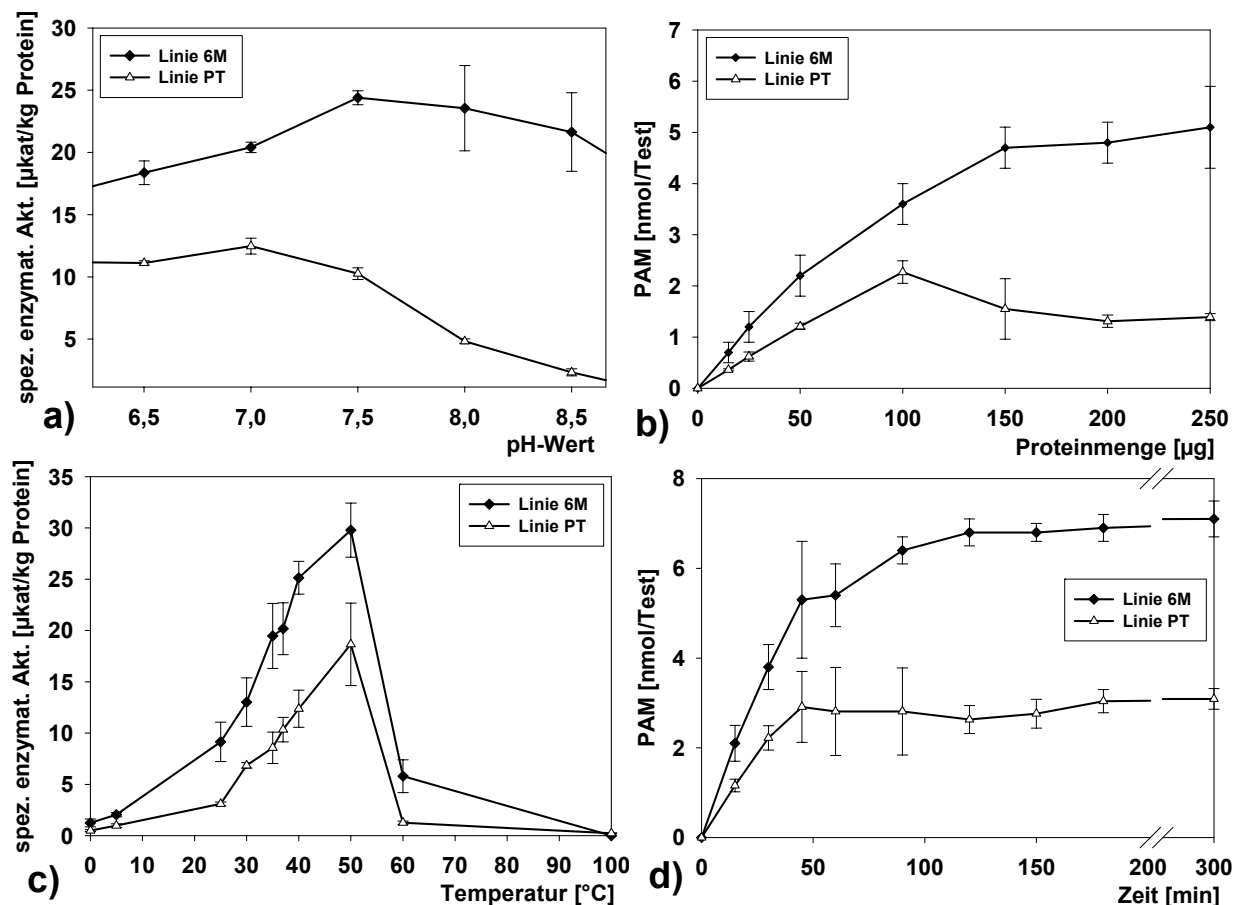


Abb. 4.21.: Charakteristika der β P6OMT

Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen β P6OMT Aktivität a) vom pH-Wert des Puffers und c) von der Inkubationstemperatur; Bildung von PAM [nmol/Test] in Abhängigkeit von der b) eingesetzten Proteinmenge und d) Inkubationszeit [Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit Doppelproben]

Das **Temperatur-Optimum** wurde durch die Inkubation der einzelnen Testansätze bei Temperaturen zwischen 0 - 100°C bestimmt (Abb. 4.21. c)). Die maximalen spezifischen enzymatischen Aktivitäten der β P6OMT aus beiden Zelllinien wurden bei 50°C gefunden. Die Inkubation von in-vitro Enzymtesten bei Temperaturen um 50°C birgt die Gefahr von sehr hohen Verdunstungsverlusten. Zur Vermeidung von zu großen Wasserverlusten wurden die Enzymteste bei 37°C inkubiert.

Bei der Untersuchung der **Zeitabhängigkeit** wurden die Enzymteste zu verschiedenen Zeiten abgestoppt und die Bildung des Produktes analysiert. Wie in Abb. 4.21. d) zu erkennen ist, erfolgte die Produktzunahme des gebildeten PAMs bis etwa 45 min linear. Danach war für Linie PT die Plateauphase erreicht, in der keine weitere Produktzunahme erfolgt. Die β P6OMT aus Linie 6M kann im Vergleich dazu noch weiteres PAM bilden. Um im linearen Produktbildungsbereich zu liegen, wurden die folgenden kinetischen und Inhibitions- Experimente für 20 min inkubiert.

4.4.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für β -Peltatin und SAM

Bei der β P6OMT Reaktion handelt es sich um eine Reaktion 2. Ordnung, da für die Umsetzung von β -Peltatin in PAM SAM als Cosubstrat benötigt wird. Für die Ermittlung der apparenten K_M - und v_{max} -Werte aus der Proteinhofraktion wurden deshalb die Versuchsbedingungen so gewählt, dass immer eines der benötigten Substrate in Sättigung vorlag (3.5.2.). Alle Testansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und zur besseren Durchmischung vorsichtig geschüttelt. Auf diese Weise wurde eine Reaktion Pseudo 1. Ordnung geschaffen, auf die sich die Michaelis-Menten-Gleichung anwenden lässt. Insgesamt wurde die Bestimmung der apparenten K_M - und v_{max} -Werte dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, die Ergebnisse gemittelt und die Standardabweichungen der einzelnen Messwerte bestimmt.

Mit steigender β -Peltatin bzw. SAM Konzentration stiegen die spezifischen enzymatischen Aktivitäten exponentiell an und näherten sich asymptotisch ihren Maximalwerten (Abb. 4.22.). Die maximale spezifische β P6OMT Aktivität wurde für Linie 6M ab etwa 40 μ M β -Peltatin und 100 - 150 μ M SAM erreicht. Für Linie PT war dies zwischen 25 - 50 μ M β -Peltatin und 50 - 80 μ M SAM der Fall. Bis zu einer Konzentration von 200 μ M β -Peltatin und SAM konnte keine Substrathemmung beobachtet werden (Abb. 4.22.). Die apparente Michaelis-Menten-Konstante K_M und die v_{max} -Werte für β -Peltatin und SAM wurden graphisch mit dem Programm SigmaPlot 2001 (10.2.3.) und rechnerisch nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard ermittelt (Tab. 4.2. und 4.3.).

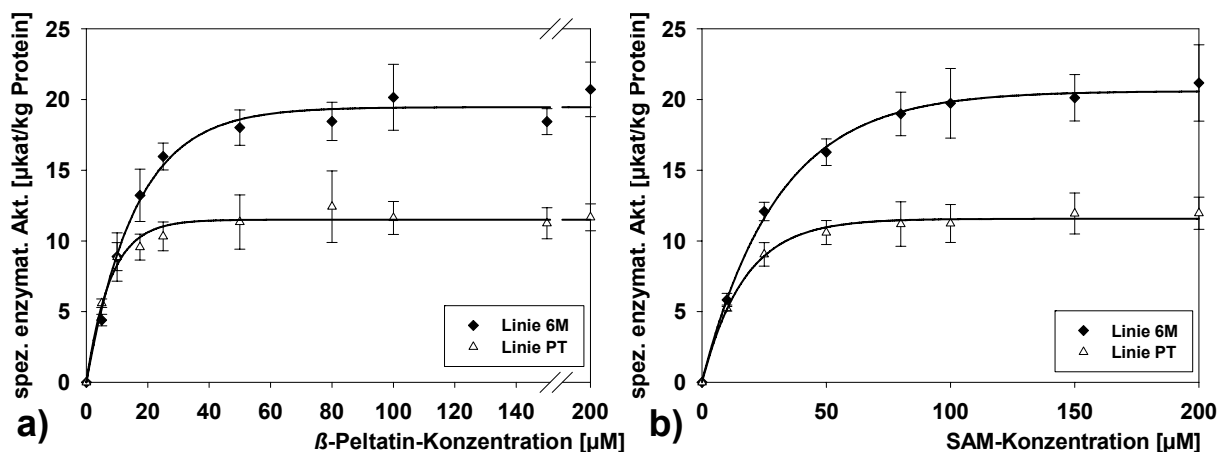


Abb. 4.22.: Substrat- und Cosubstrat-Abhängigkeit der β P6OMT Reaktion

Die spezifischen enzymatischen β P6OMT Aktivitäten in μ kat/kg Protein wurden bei steigenden a) β -Peltatin- und b) SAM-Konzentrationen ermittelt. Zur besseren Übersicht sind in Abb. a) die Ergebnisse zwischen 150 und 200 μ M mit einer Unterbrechung dargestellt [Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen mit Doppelproben].

Die apparenten K_M -Werte für β -Peltatin und SAM der Linie 6M lagen im Vergleich zu denen der Linie PT etwa doppelt so hoch. Für Linie 6M wurden apparente K_M -Werte für β -Peltatin zwischen 12 - 20 μ M ermittelt, hingegen für Linie PT 5 - 11 μ M. Die apparenten K_M -Werte für SAM lagen für Linie 6 M im Bereich 25 - 37 μ M und für Linie PT zwischen 12 - 15 μ M (Tab. 4.2. und 4.3.).

Tab.: 4.2.: Michaelis-Menten-Konstanten der β P6OMT der Linie 6M

„apparenter K_M -Wert für“ bezeichnet die erhaltenen Werte bei der Bestimmung der Substrat- bzw. Cosubstrat-Abhängigkeit; K_M und v_{max} wurden mit vier verschiedenen Methoden ausgewertet, die Ergebnisse aller Testreihen gemittelt und die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt.

Kalkulationsart nach	apparenter K_M -Wert für β -Peltatin [μ M]	v_{max}^1 [μ kat/kg Protein]	apparenter K_M -Wert für SAM [μ M]	v_{max}^2 [μ kat/kg Protein]
SigmaPlot (10.2.3.)	11,8 +/- 3,2	22,3 +/- 2,2	24,5 +/- 6,0	23,9 +/- 4,6
Lineweaver-Burk	19,7 +/- 8,2	24,9 +/- 3,6	36,8 +/- 13,9	37,4 +/- 6,0
Hanes-Woolf	13,2 +/- 4,8	21,8 +/- 2,4	25,6 +/- 7,9	24,1 +/- 3,9
Eadie-Scatchard	19,8 +/- 7,3	23,2 +/- 1,9	32,6 +/- 9,9	26,0 +/- 4,6

v_{max}^1 - Wert ermittelt bei variabler β -Peltatin-Konzentration

v_{max}^2 - Wert ermittelt bei variabler SAM-Konzentration

Tab.: 4.3.: Michaelis-Menten-Konstanten der β P6OMT der Linie PT

„apparenter K_M -Wert für“ bezeichnet die erhaltenen Werte bei der Bestimmung der Substrat- bzw. Cosubstrat-Abhängigkeit; K_M und v_{max} wurden mit vier verschiedenen Methoden ausgewertet, die Ergebnisse aller Testreihen gemittelt und die Standardabweichungen der Mittelwerte bestimmt.

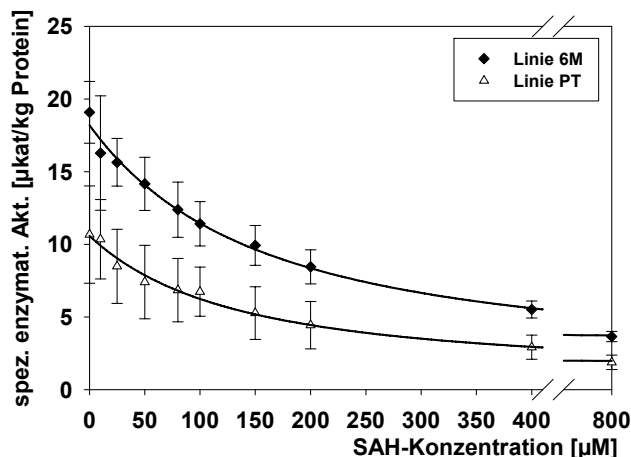
Kalkulationsart nach	apparenter K_M -Wert für β -Peltatin [μ M]	v_{max}^1 [μ kat/kg Protein]	apparenter K_M -Wert für SAM [μ M]	v_{max}^2 [μ kat/kg Protein]
SigmaPlot (10.2.3.)	4,9 +/- 0,6	12,4 +/- 0,9	12,3 +/- 2,2	13,0 +/- 1,8
Lineweaver-Burk	5,8 +/- 0,5	12,5 +/- 1,3	15,1 +/- 3,7	13,4 +/- 2,1
Hanes-Woolf	3,6 +/- 1,8	11,9 +/- 1,1	11,8 +/- 2,0	12,7 +/- 1,6
Eadie-Scatchard	11,0 +/- 0,4	13,4 +/- 1,1	14,7 +/- 3,3	13,3 +/- 2,0

v_{max}^1 - Wert ermittelt bei variabler β -Peltatin-Konzentration

v_{max}^2 - Wert ermittelt bei variabler SAM-Konzentration

4.4.3. Bestimmung der Inhibition der β P6OMT

O-Methyltransferasen sind durch das entstehende Coprodukt S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) reversibel hemmbar. Der Einfluss von SAH wurde durch Gabe verschiedener Konzentrationen im Standardenzymtest ermittelt (3.5.3.). Die spezifische enzymatische Aktivität der β P6OMT nahm exponentiell ab und näherte sich asymptotisch dem Wert 0 (Abb. 4.23.). Eine 50 %ige Hemmung der β P6OMT Reaktion wurde durch Zugabe von etwa 200 μ M SAH erreicht.

**Abb. 4.23.: Inhibitor der β P6OMT**

Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen Aktivität von der SAH-Konzentration. [Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen mit Doppelproben]

4.5. Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen

Bei den „späten“-Schritten der Lignanbiosynthese sind die enzymatischen Vorgänge bei der Synthese des PTOX aus DOP und 6MPTOX aus PAM bisher nicht bekannt. Auf der Suche nach diesen „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen an Position 7 des Lignangerüsts wurden verschiedene methodische Ansätze aus den Bereichen der Phytochemie und Enzymatik angewandt.

4.5.1. Biotransformation in Zellkulturen von *L. album* und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen

Unter dem Begriff der Biotransformation versteht man im Allgemeinen die Aufnahme und Umwandlung von Stoffen durch Lebewesen oder Zellen mittels enzymatischer Prozesse. Die Zugabe von DOP zu Zellkulturen von *Podophyllum hexandrum* resultierte in der Bildung von PTOX, die Zugabe von DOP zu Zellkulturen von *L. flavum* in der Bildung von 6MPTOX, bzw. in der Bildung ihrer Glucoside (van Uden et al., 1995). A. Henges (1999) fand heraus, dass die Gabe von DOP zu einer Zelllinie von *L. album*, die überwiegend nur PTOX produzierte, ebenfalls in der Produktion von PTOX resultierte. Die folgenden Biotransformationsexperimente dienten der Klärung, ob diese Ergebnisse auch auf die verwendeten *L. album* Zellsuspensionskulturen 6M und PT zutreffen. In kombinierten Fütterungs- und Hemmstoffexperimenten wurde versucht die „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese selektiv zu hemmen, um so Hinweise auf involvierte Enzyme zu erhalten.

4.5.1.1. Vorversuch zur Lösungsmittelverträglichkeit

In einem Vorversuch wurden die Zellen der Linien 6M und PT zunächst auf ihre Sensitivität gegenüber Lösungsmitteln getestet (3.6.1.1.). Dabei wurden die Zellen nach Subkultivierung an Tag 3 mit verschiedenen Methanol- und DMSO-Konzentrationen versetzt und an Tag 7 die Auswirkungen auf die Leitfähigkeit, die Zuckergehalte und die pH-Werte der jeweiligen Medien, sowie die Trockengewichte und Lignangehalte der Zellen ermittelt (Abb. 4.24.).

Die Zugabe von 2 - 4 % Methanol und DMSO erhöhten die **Brechungsindices der Medien** in beiden Zelllinien (Abb. 4.24 a) und b)). Dies war bei Methanol behandelten Zellen der Linie 6M weniger stark der Fall, als für die DMSO behandelten Zellen der gleichen Zelllinie. Der starke Anstieg des Brechungsindex als Maß für einen erhöhten Zuckergehalt des Mediums korrelierte mit dem verminderten Zellwachstum (ausgedrückt in FG- und TG) der Methanol behandelten Zellen der Linie 6M, aber nicht mit dem der DMSO enthaltenden Parallelproben (Abb. 4.24. c)). Die erhaltenen Brechungsindices der DMSO behandelten Proben traten vermutlich aufgrund des hohen „Eigenbrechungsindex“ von DMSO auf, was durch refraktometrische Messung einer DMSO-Lösung bestätigt werden konnte.

Die **Leitfähigkeit der Medien** der Linie 6M änderte sich kaum mit zunehmender Methanoldmenge (Leitfähigkeitswerte zwischen 2,6 bis 2,8 +/- 0,1 mS/cm), während sie mit steigender DMSO Konzentration von 2,8 +/- 0,1 mS/cm in der Kontrolle ohne Zugabe (0-Kontrolle) geringfügig auf 2,1 +/- 0 mS/cm absank (Abb. 4.24. a)). Geringe Lösungsmittelkonzentrationen (0,5 % Methanol, 0,5 - 1 % DMSO) führten bei Linie PT zum Absinken der Leitfähigkeit des Mediums von 2,2 +/- 0 auf etwa 1,7 +/- 0,2 mS/cm. Hohe Konzentrationen zeigten hingegen keinen Einfluss (Abb. 4.24. b)).

Die **pH-Werte des Mediums** der Linie 6M stiegen mit zunehmender DMSO Menge von 5,9 auf 6,5 +/- 0,2 Einheiten an. Methanol zeigte hingegen kaum einen Einfluss auf den pH-Wert. Bei Linie PT führten jedoch geringe Lösungsmittelmengen (0,5 - 1 % Methanol und DMSO) im Durchschnitt zur Erhöhung der pH-Werte um 1,1 Einheiten. Hohe Lösungsmittelgabe beeinflusste den pH-Wert weniger stark.

Die **Wachstumsparameter**, FG und TG, waren bei Linie 6M durch Lösungsmittelzugabe nur geringfügig beeinträchtigt (Abb. 4.24. c)). 4 % Methanol verringerten das Wachstum um etwa 20 % im Vergleich zur 0-Kontrolle. 2 - 4 % DMSO verursachten eine 10 %ige Abnahme der FGs, aber nicht der TGs. Linie PT

reagierte hingegen etwas sensibler auf die Lösungsmittelzugabe. 1 - 4 % Methanol senkten die Menge an FG um etwa 20 % und die des TG um etwa 10 %. Mit 2 - 4 % DMSO sanken die Menge an FG bzw. TG um etwa 27 % bzw. 22 % (Abb. 4.24. d)).

Die **Lignangehalte der Zellen** veränderten sich nach Lösungsmittelzugabe unterschiedlich stark. Der PTOX-Gehalt der Linie 6M blieb in etwa gleichbleibend gering (0,02 +/- 0,00 mg/g TG). Der β -Peltatin-Gehalt sank mit steigender Lösungsmittelmenge. Dies galt auch für den PAM-Gehalt allerdings nur bei DMSO-Zugabe. Methanol-Zugabe führte zum Ansteigen des PAM-Gehaltes. Die 6MPTOX-Gehalte der Zellen der Linie 6M sanken mit steigender Lösungsmittelmenge von 4,11 +/- 0,02 auf 2,23 +/- 0,12 mg/g TG mit 4 % Methanol bzw. 1,86 +/- 0,00 mg/g TG mit 4 % DMSO.

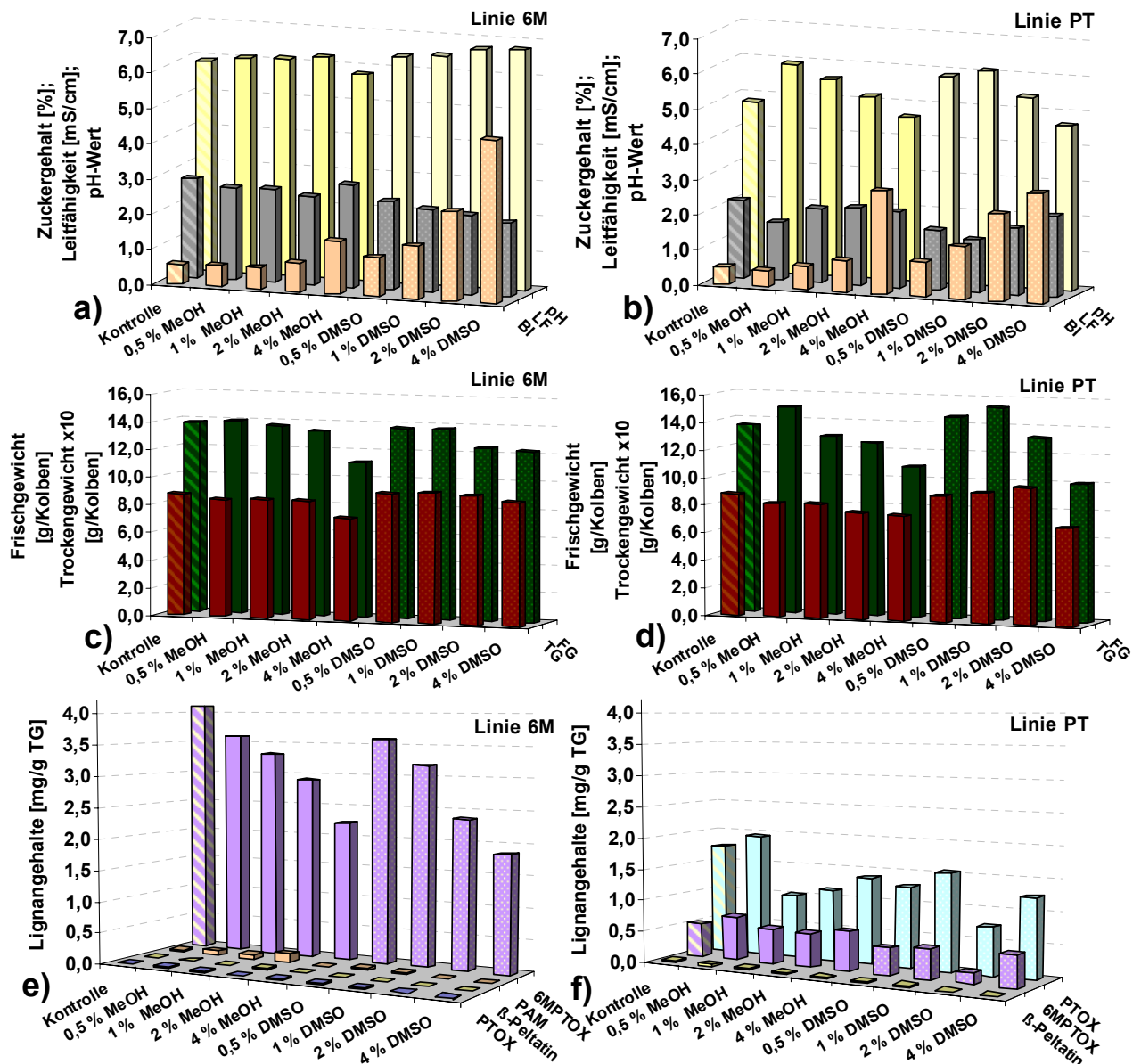


Abb. 4.24.: Lösungsmittelverträglichkeit der Zellen der Linien 6M und PT

die Zuckergehalte (BI), die Leitfähigkeitswerte (LF) und die pH-Werte (pH) der Linien 6M (a)) und PT (b)); die FG und TG der Linien 6M (c)) und PT (d)); die Lignangehalte der Zellen der Linien 6M (e)) und PT (f)); die Zellen wurden wie folgt behandelt (im Diagramm von links nach rechts): ohne Lösungsmittelzugabe (Kontrolle), Zugabe von 0,5, 1, 2 und 4 % Endkonzentration Methanol und 0,5, 1, 2 und 4 % Endkonzentration DMSO [Mittelwerte aus einer Messreihe mit Doppelproben, Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, sind aber dem Text zu entnehmen; die TGs wurden zur besseren Darstellung mit Faktor 10 multipliziert].

In Linie PT führten geringe Lösungsmittelkonzentrationen (0,5 %) zu einer geringen Erhöhung der Lignangehalte im Vergleich zur 0-Kontrolle. Die PTOX-Gehalte stiegen geringfügig von 1,76 +/- 0,13 auf 1,95 +/- 0,1 mg/g TG, die β -Peltatin-Gehalte um 0,01 +/- 0,00 mg/g TG und die 6MPTOX-Gehalte von 0,53 +/- 0,07 auf 0,70 +/- 0,10 mg/g TG. Bei einer Konzentration von 1 % Methanol und 2 % DMSO waren die PTOX-Gehalte mit 1,01 +/- 0,22 und 0,76 +/- 0,06 mg/g TG am geringsten. Die β -Peltatin-Gehalte sanken mit steigender Lösungsmittelzugabe, während die 6MPTOX-Gehalte lediglich bei der Gabe von 2 % DMSO geringer wurden.

4.5.1.2. Biotransformation von DOP und PTOX

Die Zellen der Linie PT zeigten im Vorversuch, dass sie wesentlich sensitiver gegenüber Lösungsmittelzugabe waren als Zellen der Linie 6M. Dies äußerte sich in geringerem Wachstum und verminderter Lignanakkumulation. Aus diesem Grund wurden die folgenden Fütterungs- und Hemmstoffexperimente mit maximal 2 % Methanol (oder 1,5 % DMSO) durchgeführt (3.6.1.2.). Da außerdem nur eine begrenzte Menge der Hemmstoffe NDA und ABT (4.5.1.3.) zur Verfügung stand, wurden die Experimente in 25 ml Medium mit 2,5 g Zellen durchgeführt (1/2 der normalen Zellkultivierung). Pro Kolben wurden etwa 2,5 mg DOP bzw. PTOX (gelöst in 250 μ l Methanol) zugegeben. Die Zugabe von PTOX bzw. DOP erfolgte an Tag 5, um der Kultur die Möglichkeit zu geben, in die lineare Wachstumsphase zu gelangen und maximale Enzymaktivitäten ausnutzen zu können (4.2.). Neben Kontrollexperimenten ohne Substanz-Zugabe (0-Kontrolle) wurden Kontrollen mit entsprechenden Lösungsmittelmengen (MeOH-Kontrolle) durchgeführt. Das Zugabeschemata des Biotransformationsexperimentes von DOP und PTOX zu Zellen der beiden Linien ist aus Abb. 4.25. ersichtlich.

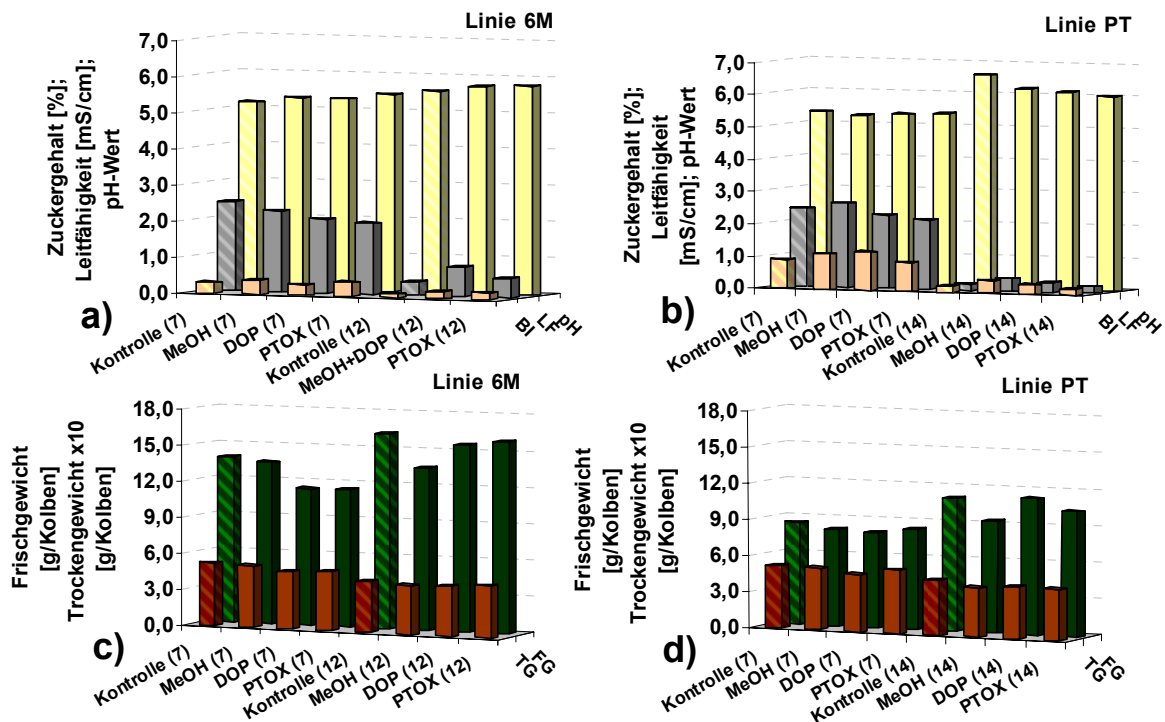


Abb. 4.25.: Lösungsmittel-, DOP- und PTOX-Verträglichkeit der Zellen der Linien 6M und PT

Die Zuckergehalte (Bl), die Leitfähigkeits- (LF) und pH-Werte (pH) der Linie 6M (a) wurden an den Tagen 7 und 12 und die der Linie PT (b) an den Tagen 7 und 14 ermittelt, sowie die FGs (c) und TGs (d) beider Linien. In Linie 6M wurden versehentlich die Medien der Methanol und DOP behandelten Zellen vereinigt (Abb. a) MeOH+DOP [Mittelwerte aus einer Messreihe mit Doppelproben, Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, sind aber dem Text zu entnehmen; die TGs wurden zur besseren Darstellung mit Faktor 10 multipliziert].

Die Ernte der Zellen erfolgte für Linie 6M an den Tagen 7 und 12 und für Linie PT an den Tagen 7 und 14. Die Lignanextraktion wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt: Lignanextraktionsmethode A (3.3.5.) und Lignanextraktionsmethode B (3.6.1.2.). Bei der modifizierten Methode B erfolgte die Extraktion in 100 % Methanol p.A., wodurch verhindert wird, dass zelleigene Glucosidasen aktiv werden. Dies ermöglicht die Extraktion von 6MPTOX- und PTOX-Glucosiden.

Bei Gabe von Methanol, DOP und PTOX zu Zellen der Linien 6M und PT im Vergleich zu den 0-Kontrollen zeigten sich kaum Unterschiede in den Zuckergehalten und pH-Werten (Abb. 4.25. a) und b)). Lediglich die Leitfähigkeitswerte waren nach Gabe von DOP und PTOX an Tag 7 geringfügig gesenkt. Die Mengen an FG der Linie 6M waren nach Zugabe von DOP bzw. PTOX an Tag 7 vermindert, was jedoch an Tag 12 nicht mehr erkennbar war (Abb. 4.25. c)). Die FG-Mengen der Linie PT waren im Vergleich zu denen der Linie 6M um etwa 5,2 g/Kolben geringer. Die Kultur zeigte aber an Tag 7 kein vermindertes Wachstum (Abb. 4.25. d)). Das vermeintlich verminderte FG beider Linien an Tag 12 bzw. 14 nach Methanol-Gabe lag in der Schwankungsbreite des Mittelwertes von durchschnittlich 0,5 g/Kolben. Die FG-Zunahme der Zellen von Tag 7 bis 12/14 betrug etwa 2 g/Kolben. Im Gegensatz dazu wiesen die TGs beider Linien konstante Werte von etwa 0,5 g/Kolben an Tag 7 auf, während sie an Tag 12/14 bei etwa 0,4 g/Kolben lagen.

Die Zugabe von PTOX zu Zellen der **Linie 6M** führte zu erhöhten PTOX und PTOX-Glucosidgehalten (Abb. 4.26. a)). Während an Tag 7 0,83 +/- 0,02 mg/g TG PTOX und 0,77 +/- 0,14 mg/g TG PTOX-Glucosid gefunden wurden, lagen an Tag 12 nur noch 0,31 +/- 0,08 mg/g TG in Form von PTOX vor, hingegen 1,47 +/- 0,00 mg/g TG PTOX-Glucosid (Abb. 4.26. a)). Im Gegensatz zur 0-Kontrolle zeigten die Ansätze mit Methanol, DOP und PTOX nach 7 Tagen erhöhte 6MPTOX-Gehalte von durchschnittlich 0,85 +/- 0,21 mg/g TG. Die 6MPTOX-Glucosid-Gehalte nach DOP-Gabe waren in Anbetracht der hohen Standardabweichung des Mittelwertes von 1,17 +/- 0,40 mg/g TG nicht als vermindert anzusehen, insbesondere da die 6MPTOX-Glucosid-Gehalte an Tag 12 vergleichbar mit der 0-Kontrolle und den Ansätzen mit Methanol- und PTOX-Zugabe waren. Die Zugabe von DOP zu Zellen der Linie 6M führte bis Tag 12 nicht zur Erhöhung der 6MPTOX-Gehalte, sondern zur 2,4-fachen Steigerung der PTOX-, 12-fachen Steigerung der β -Peltatin- und 850-fachen Steigerung der PAM-Gehalte im Vergleich zur MeOH-Kontrolle (Abb. 4.26. a) und c)).

Die in Abb. 4.26. b) und d) dargestellten Ergebnisse der wässrigen Extraktion A (mit β -Glucosidase Zugabe) der Linie 6M zeigen die fast vollständige Freisetzung der PTOX- und 6MPTOX-Aglyka (b)), sowie geringfügig erhöhte β -Peltatin-Gehalte nach DOP Zugabe an Tag 7 und 12 mit 0,02 +/- 0,00 mg/g TG im Vergleich zur MeOH-Kontrolle (0,00 +/- 0,00 mg/g TG; 4.26.d)).

Die Zellen der **Linie PT** enthielten 0,53 +/- 0,16 mg/g TG PTOX-Glucosid und 0,07 +/- 0,01 mg/g TG 6MPTOX-Glucosid in unbehandelten Zellen (Abb. 4.26. e)). Durch Zugabe von DOP und PTOX konnte die PTOX-Glucosid Menge an Tag 7 auf 2,04 +/- 0,04 bzw. 2,13 +/- 0,15 mg/g TG erhöht werden, aber nicht die 6MPTOX bzw. 6MPTOX-Glucosid Menge. Die Zellen enthielten an Tag 14 in den 0- und MeOH-Kontrollen durchschnittlich 1,37 +/- 0,17 mg/g TG PTOX-Glucosid. Die Zugabe von DOP oder PTOX führte zur Erhöhung des PTOX-Glucosid-Gehaltes auf durchschnittlich 2,59 +/- 0,04 mg/g TG. Neben den Lignan PTOX, 6MPTOX und deren Glucosiden konnte an Tag 14 in den Proben mit zugegebenem DOP noch nicht umgesetztes DOP (0,003 +/- 0,005 mg/g TG) gefunden werden (Abb. 4.26. g)). Bei der wässrigen Extraktion (A) wurden etwas geringere PTOX-Gehalte gefunden als nach methanolischer Extraktion (B) (Abb. 4.26. e) und f)). Dennoch schien eine vollständige Umsetzung der Glucoside in ihre Aglyka erfolgt zu sein. Nach methanolischer Lignanextraktion (B) wurden geringe Gehalte an β -Peltatin gefunden, während sie nach wässriger Extraktion (A) z.T. um ein Vielfaches erhöht waren. So stiegen die β -Peltatin-Gehalte an Tag 7 bzw. 14 in den 0-Kontrollen um das 24- bzw. 47-fache an.

Die glucosylierten Endprodukte PTOX und 6MPTOX wurden zusätzlich mittels LC/MS analysiert und ihr Fragmentierungsmuster mit Literaturdaten verglichen, was das Vorliegen der 6MPTOX- und PTOX-Glucoside bestätigte (10.9.; Schmidt et al., 2006; Vasilev et al., 2007).

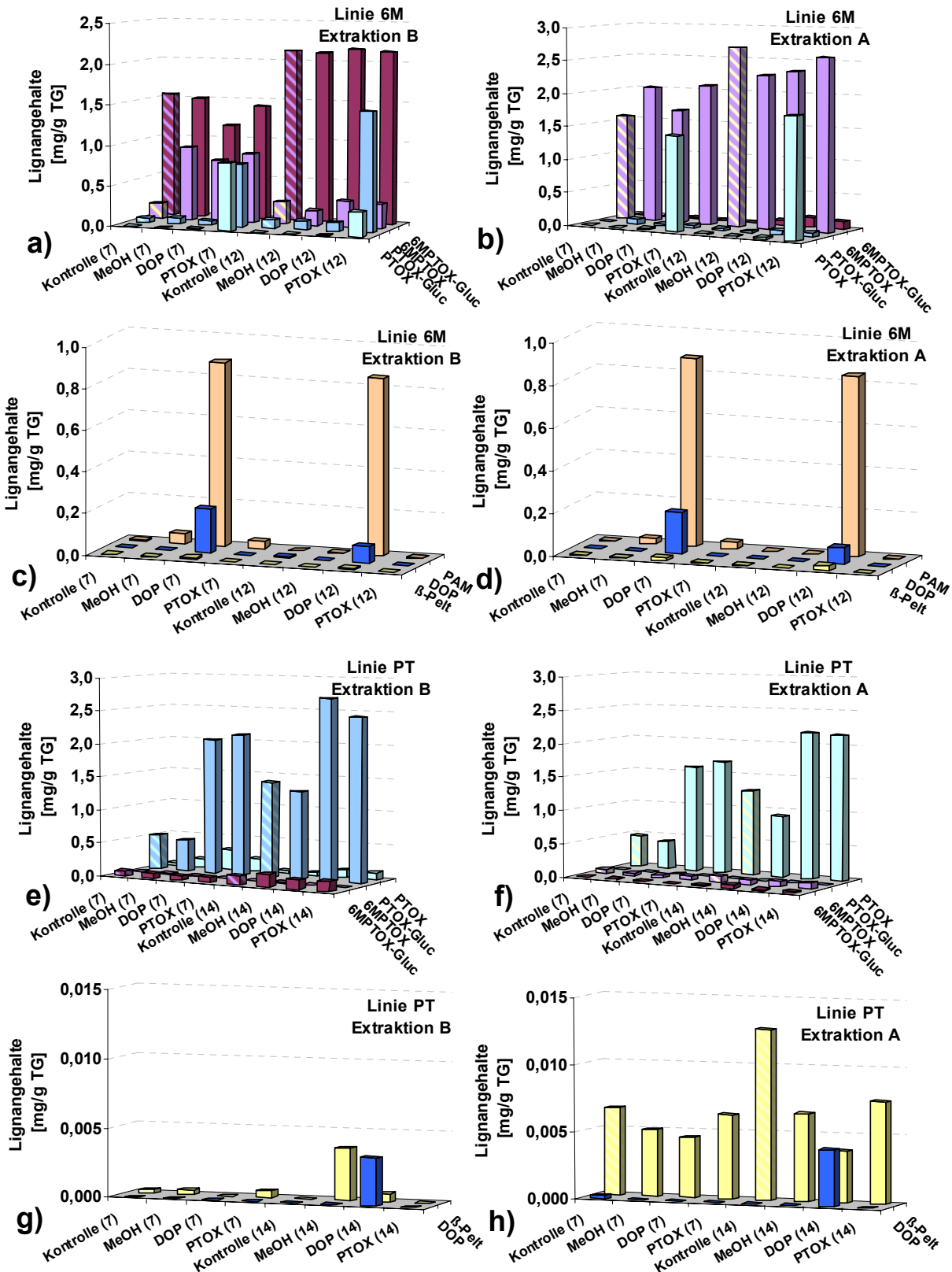


Abb. 4.26.: Auswirkung der Lösungsmittel-, DOP- und PTOX-Zugabe auf die Lignanakkumulation der Zellen der Linien 6M und PT - Lignangehalte erhalten nach Extraktionsmethode B (ohne Wasser- und β -Glucosidase-Zugabe): PTOX, PTOX-Glucosid, 6MPTOX und 6MPTOX-Glucosid Linie 6M a), Linie PT e); β -Peltatin, DOP und PAM Linie 6M c), Linie PT g); Lignangehalte erhalten nach Extraktionsmethode A (mit Wasser- und β -Glucosidase-Zugabe): PTOX, PTOX-Glucosid, 6MPTOX und 6MPTOX-Glucosid Linie 6M b), Linie PT f); β -Peltatin, DOP und PAM Linie 6M d), Linie PT h) [Mittelwerte aus einer Messreihe mit Doppelproben, Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, sind aber dem Text zu entnehmen]

4.5.1.3. Biotransformation von DOP und Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen

Wie bereits im vorhergehenden Versuch gezeigt wurde, können Zellen der Linie 6M DOP in PAM überführen und Zellen der Linie PT DOP in PTOX. Diese Umwandlungen wurden nun zusammen mit der Gabe von verschiedenen Hemmstoffen untersucht. Die Hemmstoffe wurden bereits unter 4.3.3. bei der in-vitro Inhibition der DOP6H eingesetzt, wobei sich die Cytochrom P450 Hemmstoffe NDA, CLOT und ABT als wirkungsvoll für die Hemmung der DOP6H herausstellten. Zusätzlich wurden die bereits vorgestellten Dioxygenase Hemmstoffe PCA2,4, PCA2,5 und Trinex in parallel verlaufenden Experimenten verabreicht, mit dem Ziel einen Hinweis auf den an der 7-Hydroxylierung beteiligten Enzymtyp zu erhalten.

Die Zellen wurden wie unter 4.5.1.2. beschrieben in 25 ml Medium kultiviert und mit maximal 2 % Lösungsmittel behandelt. Eine Verringerung der Lösungsmittelmenge war nicht möglich, da einzelne Hemmstoffe (wie NDA und PCA2,5) und DOP eine begrenzte Löslichkeit in Methanol oder DMSO aufweisen. An Tag 4 wurden NDA, PCA2,4 und PCA2,5 zu 20 mM in DMSO gelöst und 125 µl dieser Lösung zu den Zellkulturen zugegeben. ABT, CLOT und Trinex wurde zu 10 mM in Methanol gelöst und 250 µl dieser Lösung verabreicht. An Tag 5 wurden pro Kolben 2,25 mg DOP (gelöst in 250 µl Methanol) gefüttert. Neben Kontrollexperimenten ohne Substanz-Zugabe (0-Kontrolle) wurden Kontrollen mit 500 µl Methanol (MeOH-Kontrolle) und 250 µl Methanol zusammen mit 125 µl DMSO (MeOH+DMSO-Kontrolle) angesetzt. Die Lignanextraktion wurde nach Methode A (3.3.5.) durchgeführt und somit nur die Gehalte der Aglyka betrachtet. Die Zugabeschemata zu Zellen der beiden Linien sind aus Abb. 4.28. und Abschnitt 3.6.1.3. (Tab. 3.12.) ersichtlich.

Die **PTOX**-Bildung in **Linie 6M** wurde durch die Zugabe von Lösungsmitteln nicht beeinträchtigt, während die DOP-Fütterung die PTOX-Synthese von 0,02 +/- 0,00 (0-Kontrolle) auf 0,07 +/- 0,01 mg/g TG erhöhte (Abb. 4.27. a) und b)). Auf die PTOX-Synthese konnte kein Einfluss durch die Zugaben von CLOT, PCA2,4 und Trinex beobachtet werden. Bei Zugabe von NDA oder PCA2,5 sank die PTOX Akkumulation geringfügig (auf 0,01 +/- 0,00 mg/g TG) und die Zugabe von PCA2,4 + DOP und PCA2,5 + DOP führte zu einer geringen Erhöhung um 0,01 mg/g TG im Vergleich zur DOP-Kontrolle. Eine sehr starke Erhöhung der PTOX Akkumulation wurde durch Zugabe von NDA + DOP, CLOT + DOP, ABT + DOP und ABT (1,07 +/- 0,07, 0,26 +/- 0,04, 0,39 +/- 0,04 bzw. 0,13 +/- 0,01 mg/g TG) erreicht.

β-Peltatin konnte in der 0-Kontrolle und den Ansätzen mit NDA, CLOT, ABT und PCA2,5 nicht gefunden werden. Die Fütterung von DOP führte zur Bildung von 0,11 +/- 0,02 mg/g TG **β-Peltatin**, während die zusätzliche Gabe von NDA + DOP, CLOT + DOP und ABT + DOP lediglich 0,01 - 0,03 +/- 0,02 mg/g TG erkennen ließ. Die höchsten **β-Peltatin**-Gehalte konnten durch Zugabe von PCA2,4 + DOP, PCA2,5 + DOP und Trinex + DOP mit 0,16 +/- 0,02 mg/g TG gefunden werden.

Die **PAM**-Gehalte der 0-Kontrolle, der DMSO-Kontrolle und der Ansätze mit NDA, CLOT und ABT waren in Linie 6M mit 0,002 mg/g TG sehr gering. Die MeOH-Kontrollen enthielten geringe Mengen an PAM mit einer sehr hohen Standardabweichung (0,12 +/- 0,16 mg/g TG). Nach Zugabe von DOP war der PAM-Gehalt auf 1,40 +/- 0,00 mg/g TG erhöht. Geringe PAM-Gehalte wurden nach Zugabe von NDA + DOP (0,02 +/- 0,00 mg/g TG), CLOT + DOP (0,18 +/- 0,09 mg/g TG), ABT + DOP (0,37 +/- 0,15 mg/g TG), PCA2,4 (0,04 +/- 0,06 mg/g TG) und Trinex (0,164 +/- 0,01 mg/g TG) beobachtet. Stark erhöhte PAM-Gehalte wurden nach Zugabe von PCA2,4 + DOP (2,19 +/- 0,04 mg/g TG), PCA2,5 + DOP (1,53 +/- 0,09 mg/g TG) und Trinex + DOP (1,62 +/- 0,05 mg/g TG) erzielt.

Die **6MPTOX**-Gehalte der Linie 6M wurden hingegen kaum beeinflusst. In den 0-Kontrollen lag der 6MPTOX-Gehalt bei 2,85 +/- 0,12 mg/g TG und in den Ansätzen mit Methanol und DMSO bei etwa 1,9 +/- 0,2 mg/g TG. Nach DOP-Zugabe erhöhte sich die 6MPTOX-Bildung im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen geringfügig auf 2,39 +/- 0,03 mg/g TG. Nach PCA2,4- und PCA2,5-Gabe erhöhte sich der 6MPTOX-Gehalt im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen um 0,7 bzw. 0,6 +/- 0,3 mg/g TG, während nach Gabe von NDA + DOP, PCA2,5 + DOP und Trinex + DOP der Gehalt um 0,3 +/- 0,2 mg/g TG im Vergleich zur DOP-Kontrolle vermindert war.

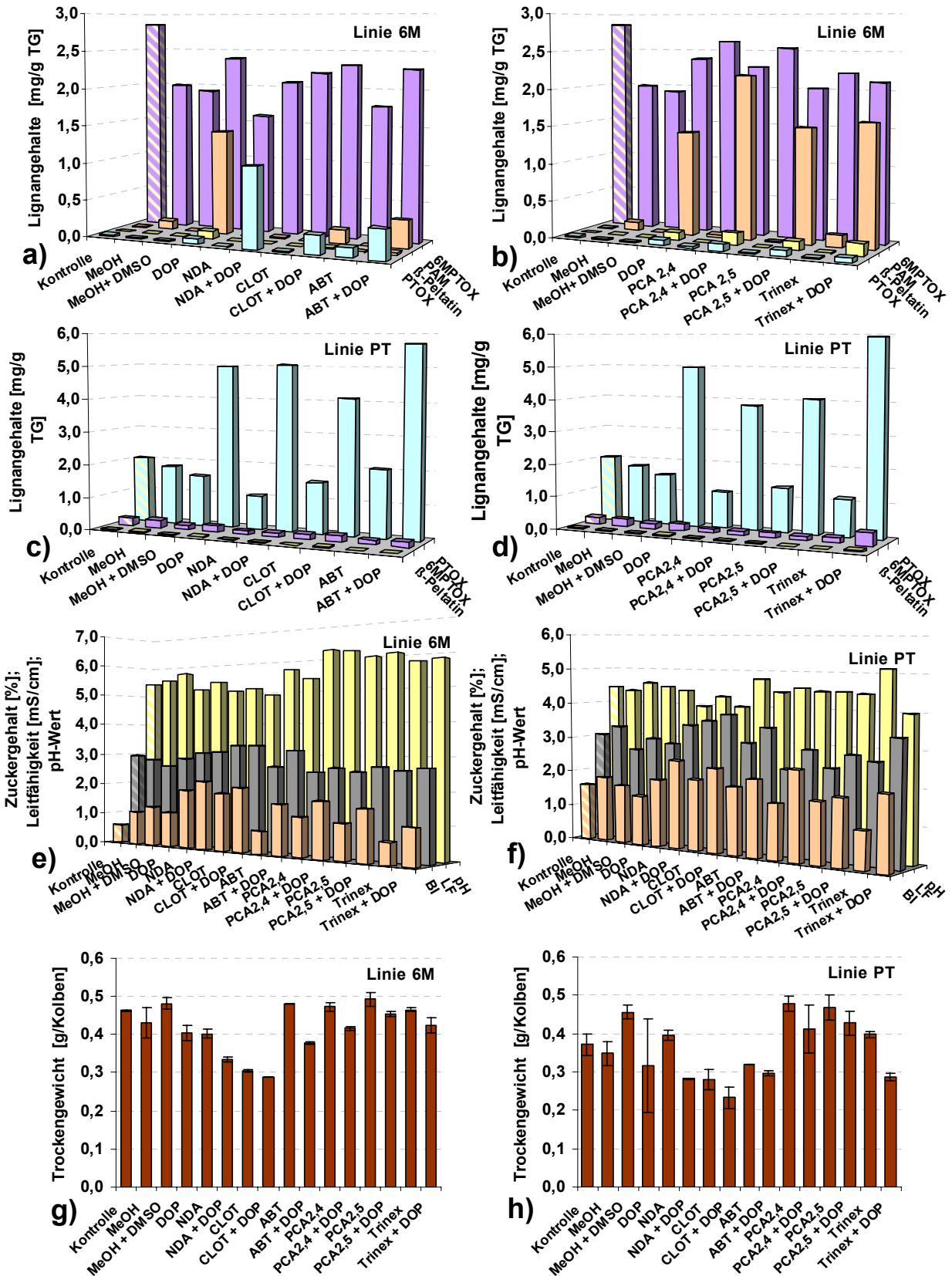


Abb. 4.27.: Lösungsmittel-, DOP- und Hemmstoffverträglichkeit der Zellen der Linien 6M und PT und die Wirkung der Hemmstoffe in der Konzentration 10^{-4} M auf die Lignanakkumulation - Wirkung der CYP-Hemmstoffe auf die Lignangehalte der Zellen der Linien 6M a) und PT c); Wirkung der Dioxygenase-Hemmstoffe auf die Lignangehalte der Zellen der Linien 6M b) und PT d); die Zuckergehalte (BI), die Leitfähigkeitswerte (LF) und pH-Werte (pH) der Linien 6M e) und PT f); die Trockengewichte der Linien 6M g) und PT h) [Mittelwerte aus einer Messreihe mit Doppelproben, Standardabweichungen nur für TG gezeigt]

Die **PTOX**-Gehalte der **Linie PT** sanken von 2,03 +/- 0,48 mg/g TG in der 0-Kontrolle und in den Lösungsmittelkontrollen auf 1,80 +/- 0,38 bzw. 1,55 +/- 0,23 mg/g TG (Abb. 4.27. c) und d)). Bei Gabe der Hemmstoffe NDA, PCA2,4 und Trinex sanken die PTOX-Gehalte im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen auf jeweils 1,04 +/- 0,03, 1,12 +/- 0,03 und 1,14 +/- 0,07 mg/g TG. Ob die Hemmstoffzugabe von PCA2,5 ebenfalls ein Absinken verursachte kann nicht beantwortet werden, da die Standardabweichungen von 0,46 mg/g TG zu hoch waren. Die DOP-Zugabe führte zur Erhöhung der PTOX-Akkumulation auf bis zu 5,00 +/- 0,10 mg/g TG, welche durch die zusätzliche Gabe der Hemmstoffe ABT + DOP und Trinex + DOP noch verstärkt wurde auf bis zu 5,7 +/- 0,56 bzw. 5,9 +/- 0,08 mg/g TG. Eine Verminderung der PTOX-Bildung konnte nach Gabe von CLOT + DOP (4,09 +/- 0,59 mg/g TG), PCA2,4 + DOP (3,82 +/- 0,08 mg/g TG) und PCA2,5 + DOP (4,06 +/- 0,17 mg/g TG) beobachtet werden. Die **β -Peltatin**-Gehalte der Zelllinie PT waren mit 0,02 +/- 0,00 mg/g TG in der 0-Kontrolle, in der MeOH-Kontrollen und in den Ansätzen mit zugegebenem DOP sehr gering. Die Zugaben von NDA, NDA + DOP, CLOT, ABT, ABT + DOP, PCA2,4, PCA2,4 + DOP, PCA2,5, PCA2,5 + DOP und Trinex verursachten ein Absinken auf 0,01 +/- 0,00 mg/g TG β -Peltatin, während die Gabe von Trinex + DOP eine Erhöhung auf 0,05 +/- 0,01 mg/g TG ergab.

Die **6MPTOX**-Gehalte der Linie PT lagen in der 0- und MeOH-Kontrolle, sowie in den Ansätzen mit zugegebenem DOP bei etwa 0,22 +/- 0,07 mg/g TG, während die Zugabe von DMSO ein Absinken auf 0,15 +/- 0,01 mg/g TG verursachte. Im Vergleich zu dieser DMSO-Kontrolle führten die Zugaben von NDA (0,11 +/- 0,01 mg/g TG), PCA2,4 (0,13 +/- 0,01 mg/g TG) und PCA2,5 (0,13 +/- 0,00 mg/g TG) zu noch geringeren 6MPTOX-Gehalten. Im Vergleich zu den Ansätzen mit DOP sank der Gehalt an 6MPTOX nach Gabe von NDA + DOP (0,13 +/- 0,03 mg/g TG), PCA2,4 + DOP (0,12 +/- 0,04 mg/g TG) und PCA2,5 + DOP (0,13 +/- 0,00 mg/g TG) ebenfalls, während die Zugabe von Trinex + DOP den Gehalt auf 0,39 +/- 0,02 mg/g TG erhöhte.

Es ist noch anzumerken, dass in den Ansätzen mit CLOT + DOP noch größere Mengen an nicht transformiertem DOP von 0,15 +/- 0,09 mg/g TG (Linie 6M) bzw. 2,42 +/- 0,74 mg/g TG (Linie PT) gefunden werden konnten.

Die **Mediums- und Wachstumsparameter** wiesen darauf hin, dass einige Substanzen wachstumshemmende Wirkung auf die Zellen beider Linien hatten (Abb. 4.27. e-h)). Die TGs der Linie 6M sanken nach Zugabe von DOP, NDA, ABT + DOP und PCA2,4 + DOP geringfügig und wesentlich stärker nach Zugabe von NDA + DOP, CLOT, CLOT + DOP. Die Zellen der Linie PT zeigten eine verminderte TG-Akkumulation nach Behandlung mit DOP, NDA + DOP, CLOT, CLOT + DOP, ABT, ABT + DOP und Trinex + DOP. Diese Wachstumsverminderung spiegelte sich in den erhöhten Zuckergehalten und Leitfähigkeitswerten der Medien wider. Die pH-Werte der Medien der Linie 6M wurden durch die Zugabe der Dioxygenase Hemmstoffe etwas erhöht, während dies für Linie PT nur für Trinex der Fall war. NDA + DOP und CLOT + DOP verminderten sie hingegen.

4.5.1.4. Behandlung der Zellen mit hohen Hemmstoffkonzentrationen

Zusätzlich wurde die Wirkung von höheren NDA und Trinex Konzentrationen auf die Zellen der Linien 6M und PT getestet. Dabei wurden 5×10^{-4} M NDA und 1×10^{-3} M Trinex an Tag 4 verabreicht und die Mediumsparameter, die Lignangehalte und TGs der Zellen betrachtet (3.6.1.4.). Die Gabe von Trinex zu Zellen der Linie 6M verursachte eine Hemmung der PTOX-, β -Peltatin- und PAM-Akkumulation, während die Gabe von NDA ausschließlich die Akkumulation von β -Peltatin und PAM verminderte (Abb. 4.28. a)). Bei Zellen der Linie PT wurde die Bildung von 6MPTOX und β -Peltatin durch Gabe beider Hemmstoffe gesenkt (Abb. 4.28. b)). Die PTOX Akkumulation schien hingegen in beiden Zelllinien nur durch NDA vermindert zu werden. Allerdings zeigten die Werte der Mediumsparameter und der TGs bei den Zellen, die mit den Hemmstoffen behandelt wurden, starke Unterschiede im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen (Abb. 4.28. c) und d)). Neben erhöhten Zuckergehalten und Leitfähigkeitswerten wurden verminderte TGs und FGs, ebenso wie Verschiebungen der pH-Werte (nicht gezeigt) ermittelt.

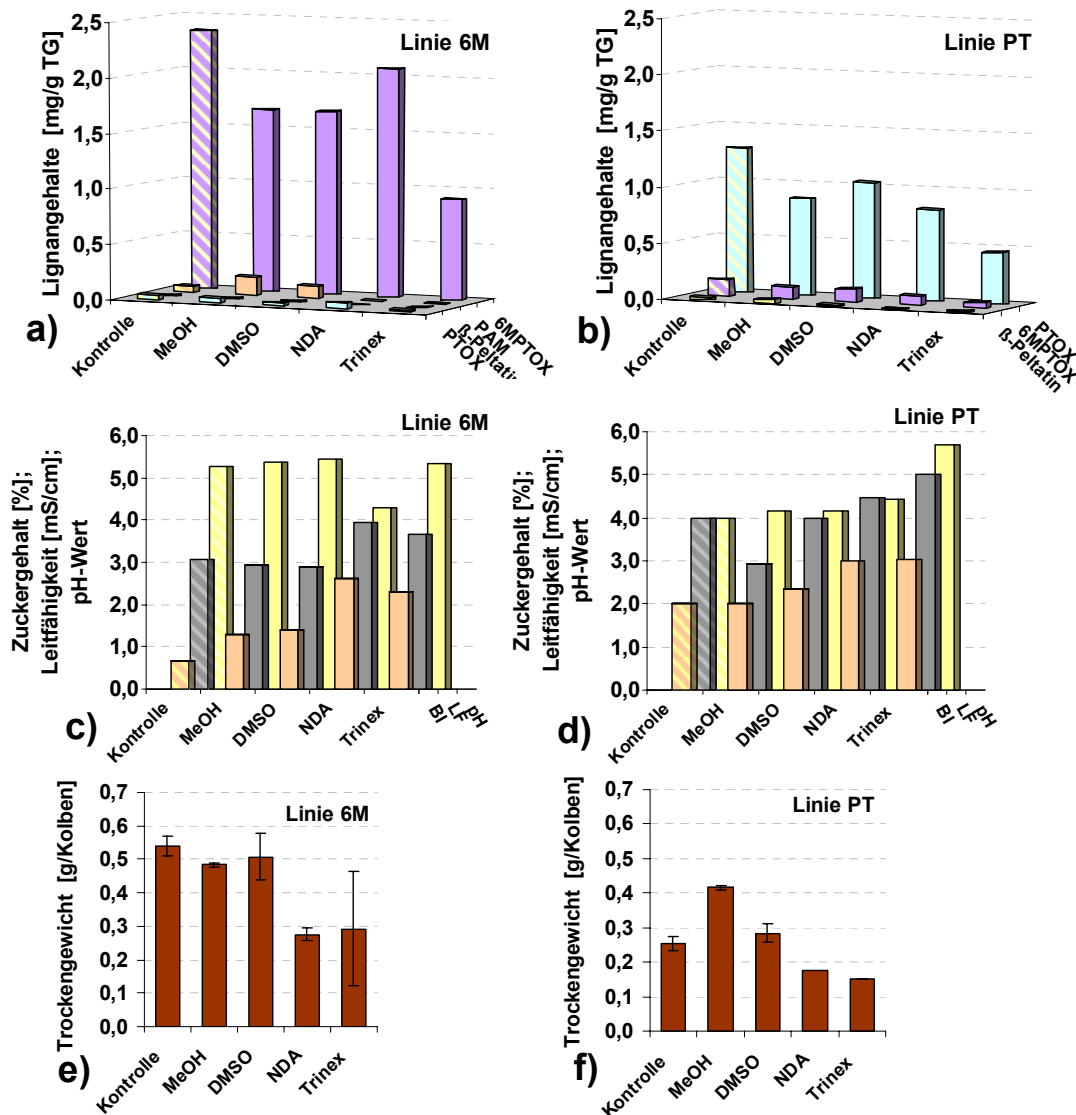


Abb. 4.28.: Lösungsmittel-, DOP- und Hemmstoffverträglichkeit der Zellen der Linien 6M und PT und die Wirkung der Hemmstoffe in hoher Konzentration auf die Lignanakkumulation - Neben der 0-Kontrolle wurden 250 µl Methanol (MeOH), 125 µl DMSO, 5 x 10⁻⁴ M NDA und 1 x 10⁻³ M Trinex zugegeben. Wirkung der Hemmstoffe auf die Lignangehalte der Zellen der Linien 6M a) und PT b); die Zuckergehalte (BI), die Leitfähigkeitswerte (LF) und pH-Werte (pH) der Linien 6M c) und PT d); die Trockengewichte der Linien 6M e) und PT f) [Mittelwerte aus einer Messreihe mit Doppelproben, Standardabweichungen nur für die TG gezeigt]

Es ist noch anzumerken, dass die Zellen z.T. auch ihre Farbe änderten. Zellen, die mit NDA behandelt wurden, verfärbten sich leicht pink und Zellen mit Trinex wurden weißlich. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Hemmstoffe den Zellen sehr stark schaden. Aus diesem Grund wurden Vitalitätstests nach Towill und Mazur (1974) durchgeführt (3.6.1.5.). Dabei wird 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) nur durch lebende Zellen zu Formazan reduziert, welches dann photometrisch bei 485 nm gemessen werden kann. Zwischen Tag 4 und Tag 7 wurden täglich Kontrollen mit DMSO oder Methanol, sowie Zellen, die mit NDA (gelöst in DMSO) oder Trinex (gelöst in Methanol) behandelt wurden, geerntet. Nach Durchführung des TTC-Testes wurden die Extinktionswerte photometrisch ermittelt und in Prozent der Gesamtviitalität der Zellen, bezogen auf die jeweiligen Methanol/DMSO-Kontrollen der jeweils gleichen Tage angegeben (Abb. 4.29. a) und b)). Es wurden jeweils Dreifachproben pro Tag und zugegebener Lösung angesetzt. Dennoch waren die erhaltenen Standardabweichungen extrem hoch. Dies liegt darin begründet, dass die Zellen in Aggregaten wachsen und somit den Lösungsmitteln bzw. Hemmstoffen

unterschiedlich stark ausgesetzt waren. Wie bereits erwähnt, färbten sich die NDA behandelten Zellen leicht pink. Je nach dem, welcher Zellverband für den Vitalitätstest verwendet wurde, waren die Zellen stärker oder schwächer eingefärbt als andere und erschienen somit weniger oder stärker vital.

Beide Hemmstoffe fügten den Zellen beider Linien einen beträchtlichen Schaden zu. Die Vitalität der Zellen der Linie 6M sank mit NDA an Tag 6 unter 20 %. An Tag 7 lagen die ermittelten Vitalitäten von Zellen der Linie 6M nach NDA-Gabe um 40 % und nach Trinex-Gabe um etwa 30 %. Die Vitalitätswerte der Zellen der Linie PT lagen an Tag 7 nach Behandlung mit NDA unter 20 % und mit Trinex unter 5 %.

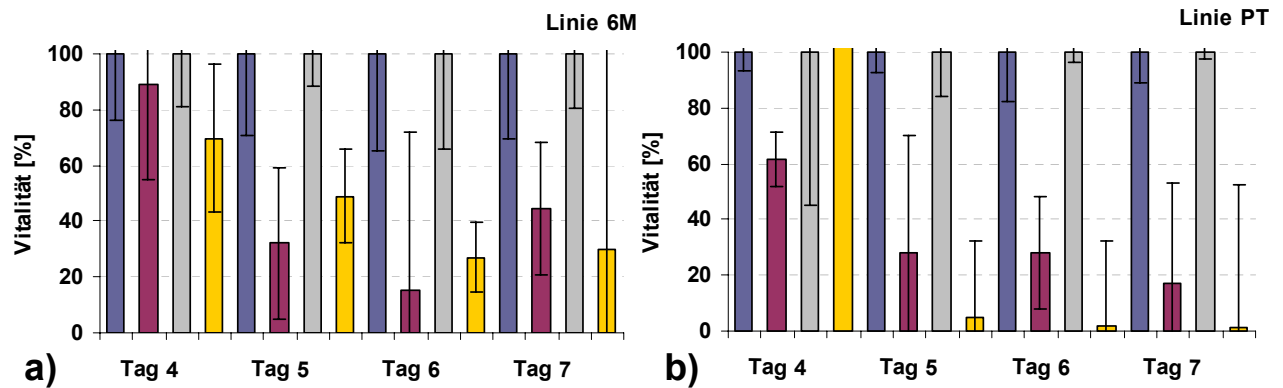
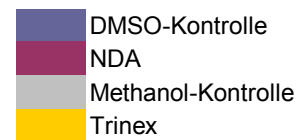


Abb. 4.29.: Vitalität der Zellen der Linien 6M und PT nach Gabe von 5×10^{-4} M NDA und 1×10^{-3} M Trinex

An den Tagen 4 - 7 wurden jeweils Proben geerntet und die Vitalität mittels TTC-Test ermittelt; Linie 6M a), Linie PT b) [Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Messreihe von Dreifachproben].



4.5.2. Enzymatische Suche

4.5.2.1. DOP7H - Eine Cytochrom P450 Monoxygenase?

A. Henges (1999) fand in einer PTOX produzierenden Zelllinie (X4) eine geringe CYP-Aktivität, die DOP in PTOX überführte und in Fütterungsexperimenten durch NDA gehemmt werden konnte. Allerdings ließ sich diese Reaktion schwer reproduzieren und die Aktivität war mit 0,1 - 0,2 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein gering. Aufgrund dieser Tatsache wurde zunächst versucht diese Aktivität in Linie PT nachzuweisen. Hierfür wurden 4 - 7 Tage alte Zellen verwendet. Diese wurden mittels Mörsern aufgeschlossen und die Enzymteste nach dem Standardenzymtest der DOP6H (3.4.1.) durchgeführt. Bei längeren Inkubationszeiten von 2 - 12 h wurde regenerierendes System (3.6.2.3.) zugefügt.

Die Enzymaufarbeitung erfolgte grundsätzlich wie für die DOP6H beschrieben (3.6.2.1.). Abweichend davon wurden die Mikrosomen teilweise mittels Ultrazentrifugation anstelle der MgCl_2 -Fällung pelletiert. Neben 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (DTT, DIECA), 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 (DTT, DIECA), 0,1 M KPi pH 8,0 (DTT, DIECA) und 0,1 M KPi pH 7,3 (DIECA, EDTA, Mannit) wurde 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 (MgCl_2 , KCl, EDTA, Saccharose, DTT, Na-Ascorbat) als Aufarbeitungspuffer verwendet. In einigen Fällen entsprach der Resuspendierungspuffer für die Mikrosomen nicht dem Aufarbeitungspuffer [Mikrosomenpuffer - 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 (MgCl_2 , KCl, EDTA, Saccharose, DTT, Na-Ascorbat)]. Die Mikrosomenfraktion wurde zum Vergleich mittels PD10 Säulen entsalzt, um evtl. störendes MgCl_2 und vorhandenes PTOX zu entfernen (3.6.2.1.).

Nach Mikrosomenpräparation in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (DTT, DIECA), Inkubation der Teste für 7 h mit regenerierendem System und Proteinmengen von 675 bzw. 1240 μg pro Testansatz konnten erhöhte PTOX-Gehalte von 1,8 bzw. 5,0 \pm 0,0 nmol/Testansatz (bzw. 0,11 - 0,12 \pm 0,01 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein) detektiert werden. Dabei wurde die Mikrosomenfraktion zuvor nicht entsalzt. Die Berechnung der PTOX-Gehalte (bzw. der spezifischen enzymatischen Aktivität) erfolgte durch Abzug der parallel durchgeführten 0-Kontrollen (Stopp vor Start). Wie bereits erwähnt erfolgte die Mikrosomenpräparation zusätzlich mittels Ultrazentrifugation, um auszuschließen, dass MgCl_2 -Ionen die mögliche DOP7H Aktivität hemmen. Bei den zugehörigen Enzymtesten konnten PTOX-Gehalte von 9,2 \pm 0,4 nmol/Testansatz gefunden werden im Vergleich zu 2,2 \pm 0,1 nmol/Testansatz in den Kontrollen mit gekochtem Protein.

Im Vergleich dazu lieferte auch die Zugabe von 10 mM α -Ketoglutar säure oder 5 mM H_2O_2 zu dieser Proteinaufarbeitung und Inkubation der Teste für 3 h hohe PTOX-Gehalte von 8,8 \pm 0,1 bzw. 8,5 \pm 0,0 nmol/Testansatz. In den 0-Kontrollen mit gekochtem Protein fanden sich 1,6 \pm 0,6 (mit α -Ketoglutar säure) bzw. 1,9 \pm 0,3 nmol PTOX/Testansatz (mit H_2O_2).

Bei weiteren Testreihen erfolgte die Enzymaufarbeitung wie oben beschrieben, aber die Mikrosomenpellets wurden in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 (MgCl_2 , KCl, EDTA, Saccharose, DTT, Na-Ascorbat) resuspendiert und die Inkubationszeiten auf 60 min verkürzt. Die PTOX-Gehalte der jeweiligen Doppelproben waren z.T. sehr stark schwankend und weitere 0-Kontrollen, wie das Weglassen des Substrates (DOP) oder des Cosubstrates (NADPH) ergaben die gleichen PTOX-Gehalte wie mit Substrat- und Cosubstrat-Zugabe. Es ist anzumerken, dass dies für die jeweils parallel durchgeführten DOP6H Teste nicht beobachtet wurde.

Die hohen Mengen an PTOX in den Kontrollansätzen ohne DOP- und/oder NADPH-Zugabe und nach Zugabe von α -Ketoglutar säure oder H_2O_2 wiesen darauf hin, dass die Inkubation bei 30°C alleine ausreichte, um erhöhte PTOX-Gehalte in den Testansätze zu verursachen. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen gesucht, um die mögliche Aktivität dieses Enzyms zu erhöhen. van Fürden et al. (2005) gelang es durch Zugabe von Methyljasmonat zu Zellen der Linie X4SF die Produktion von PTOX um das 10-fache zu erhöhen, was vermuten ließ, dass möglicherweise die involvierten Enzyme ebenfalls in erhöhtem Maß vorhanden sein könnten. Analog zur Elicitierung von Zellkulturen mit Methyljasmonat fanden Berim et al. (2005) heraus, dass Zellkulturen von *L. nodiflorum* nach Gabe des modifizierten Pilzelicitors Coronalon einen 10-fach höheren Gehalt an 6MPTOX enthielten und die enzymatischen

Aktivitäten der DOP6H und β P6OMT um das 22- bzw. 15-fache erhöht waren. Die Idee bestand nun darin durch Zugabe dieser Elicitoren die Aktivität der DOP7H zu steigern.

In Enzymtesten mit Proteinen aus 5 Tage alten Zellen der Linie X4SF, die 5 h mit 100 μ M Methyljasmonat behandelt wurden, konnte eine geringe, aber nicht signifikante Erhöhung der PTOX-Gehalte (um 0,8 +/- 0,5 nmol/Testansatz) im Vergleich zu Enzymtesten, die ohne Substratzugabe inkubiert wurden, gefunden werden. Bei Enzymtesten deren Ausgangszellen für 42 h mit Methyljasmonat behandelt wurden, konnte keine Erhöhung der PTOX-Gehalte detektiert werden. In Enzymtesten mit Proteinen aus 7 Tage alten Zellen der Linie PT, die 4 Tage mit 25 μ M Coronalon behandelt wurden, konnten generell erhöhte PTOX Gehalte, im Vergleich zu Enzymtesten deren Ausgangszellen nicht elicitiert waren, gefunden werden (Abb. 4.30). Die mikrosomalen Fraktionen konnten dabei nicht mittels PD10-Säulen entsalzt werden, da die Proteinlösung sehr zähflüssig war. Die Inkubation erfolgte für 3 h. Innerhalb der Testreihen (Ausgangszellen elicitiert oder nicht-elicitiert) konnten geringfügig erhöhte PTOX-Gehalte in Testansätzen mit regenerierendem System, im Vergleich zu Testansätzen ohne regenerierendes System, ohne NADPH oder ohne das Substrat DOP, gefunden werden (Abb. 4.30.). Wie auch hier zu erkennen ist (Ausgangszellen elicitiert), waren die PTOX-Gehalte der Kontrollen Stopp vor Start und mit gekochtem Protein deutlich geringer als die der übrigen Testansätze. Als zusätzliche Kontrollen (auf Aktivität dieser Mikrosomen-Präparation) wurden die Aktivitäten der C4H und DOP6H ermittelt. Diese konnten mit 1,82 +/- 0,00 (C4H) bzw. 0,04 +/- 0,00 μ kat/kg Protein (DOP6H) in Testansätzen mit elicitierten und 2,30 +/- 0,01 (C4H) bzw. 0,02 +/- 0,14 μ kat/kg Protein (DOP6H) in Testansätzen mit nicht-elicitierten Ausgangszellen eindeutig detektiert werden.

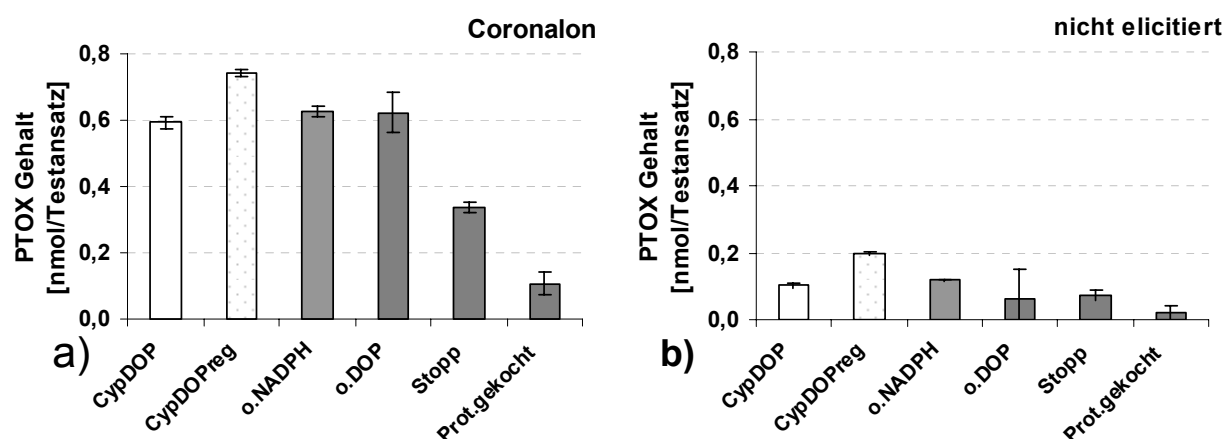


Abb. 4.30.: PTOX-Gehalte pro CYP-Enzymtestansatz

a) Enzymteste mit Mikrosomen gewonnen aus Zellen, die mit Coronalon elicitiert wurden. b) Enzymteste mit Mikrosomen gewonnen aus nicht-elicitierten Zellen. Legende: CypDOP - Standardenzymtest (für DOP6H), CypDOPreg - Standardenzymtest (für DOP6H) mit regenerierendem System, o.NADPH - ohne NADPH, o.DOP - ohne DOP, Stopp - Stopp vor Start (direkte Zugabe von 50 μ l 6 N HCl, ohne Inkubation), Prot.gekocht - Enzymtest mit gekochten Mikrosomen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der DOP6H und C4H auch in der Rohproteinfraktion detektiert werden kann. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen mittels Mörser oder Schlagmesserhomogenisator aufgeschlossen wurden (Aufarbeitung siehe 3.6.2.1. und 4.5.3.1. Tab. 4.5.). Allerdings konnte in dieser Rohproteinfraktion kein Hinweis auf ein CYP-Enzym gefunden werden, welches an der DOP7H Reaktion beteiligt ist. Dialyse oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (0 - 80 %) des Rohproteins sollte zeigen, ob möglicherweise eine inhibierende Substanz die DOP-Umsetzung zu PTOX verhindert. Doch weder nach Dialyse noch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung zeigten sich signifikante enzymatische CYP-Aktivitäten.

Obwohl in den vorgestellten CYP-Enzymtesten die Bildung von PTOX erfolgte, schien dies nicht auf eine enzymatische Aktivität hinzudeuten. Auch im folgenden Kapitel werden diese Schwierigkeiten deutlich.

4.5.2.2. DOP7H - Eine Dioxygenase?

Wie in den Biotransformationsexperimenten gezeigt wurde, konnte die PTOX-Synthese in Zelllinie PT nach Zugabe von DOP in Kombination mit den Hemmstoffen CLOT, PCA2,4 oder PCA2,5 geringfügig gehemmt werden. Desweiteren führte in Linie 6M die Hemmung der DOP6H durch Zugabe von NDA, CLOT und ABT zur Bildung von PTOX. Dieser Befund, zusammen mit der Angabe, dass CYP-Enzyme selten an gesättigten C-C - Bindungen Hydroxylierungen vornehmen (Prof. Dr. J. Schröder, persönliche Mitteilung), sprach für die Tatsache, dass ein anderer Enzymtyp die Hydroxylgruppe an Position 7 des DOP-Moleküls einführen könnte.

In Anlehnung an Hausinger (2004) beschränkte sich die „Enzymatische Suche“ nach einer involvierten Dioxygenasereaktion ausschließlich auf α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen. Die Enzymaufarbeitungen wurden mit 4 - 7 Tage alten Zellen, vorwiegend der Linie PT, durchgeführt. Dabei wurde neben der Rohproteinfraktion auch die lösliche Proteinfraktion für die Enzymteste verwendet (3.6.2.1.) Die im einzelnen verwendeten Puffer und deren Zusätze sind aus Tab. 3.13. ersichtlich, die Zusammensetzung der Enzymteste aus Tab. 3.14. (3.6.2.3.). Eisensulfat wurde in Form von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (Mohr'sches Salz) verabreicht. Nach Angabe von Dr. G. Schröder (persönliche Mitteilung) ist dieses Eisensalz oxidationsstabiler als Andere.

Nach Präparation der löslichen Proteinfraktion in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (DTT, DIECA), Inkubation der Enzymteste für 8,3 h und Proteinmengen von 400 bzw. 800 μg pro Testansatz konnten erhöhte PTOX-Gehalte von 3,0 \pm 1,1 bzw. 7,2 \pm 1,6 nmol/Testansatz (bzw. 0,3 \pm 0,1 $\mu\text{kat/kg}$ Protein) detektiert werden. Die Enzymtestansätze mit 400 μg Protein enthielten dabei 10 mM α -Ketoglutar säure, 7,5 μM Ascorbat und 100 μM Eisensulfat. Die Enzymtestansätze mit 800 μg Protein enthielten jeweils die doppelte Konzentration an Cosubstraten. Die Berechnung der PTOX-Gehalte pro Testansatz erfolgte auch in diesem Fall durch Abzug der parallel durchgeführten 0-Kontrollen (Stopp vor Start).

Bei der Wiederholung dieser Testreihe konnten 10,5 \pm 0,9 bzw. 19,9 \pm 0,7 nmol PTOX/Testansatz in Dioxygenase-Enzymtesten mit 400 bzw. 800 μg Protein gefunden werden. In Kontrollexperimenten mit gekochtem Protein konnten 2,9 \pm 0,2 bzw. 4,8 \pm 0,3 nmol PTOX/Testansatz und in nicht inkubierten Testansätzen (Stopp vor Start) 6,4 \pm 0,1 bzw. 14,2 \pm 0,2 nmol PTOX/Testansatz gefunden werden. Berechnet man die entstandene PTOX-Menge abzüglich der Kontrollansätze mit gekochtem Protein, so würden diese 4,1 \pm 0,9 (für 400 μg Protein) und 5,7 \pm 0,7 nmol/Testansatz (für 800 μg Protein) betragen. Die spezifische enzymatische Aktivität lägen in diesem Fall bei 0,8 bzw. 0,9 \pm 0,1 $\mu\text{kat/kg}$ Protein. Dieses Ergebnis lieferte einen weiteren Hinweis, dass es Unterschiede in den PTOX-Gehalten zwischen den 0-Kontrollen Stopp vor Start und den Enzymtesten mit gekochtem Protein gab.

Während der Suche nach dem optimalen Puffer und Puffer-pH-Wert für die mögliche Dioxygenase Aktivität, wurde dies noch deutlicher (Abb. 4.31.). Jeweils 6 Tage alte Zellen der Linie PT wurden in verschiedenen Puffern aufgearbeitet. Ein Teil der Zellen wurde mit 0,1 M Tris/HCl (DTT) Puffer pH 6, 7,5 bzw. 8,8; ein Anderer in 0,1 M KPi (DTT) Puffer pH 6, 7 bzw. 8; ein Teil in 0,1 M MOPS (DTT) Puffer pH 6, 7 bzw. 8 und ein Weiterer in 0,1 M HEPES (DTT) Puffer pH 6,5, 7,5 bzw. 8,5 aufgearbeitet. Von der jeweiligen Proteinrohfraktion wurde jeweils 600 μg für die Enzymteste verwendet. Die vollständigen Dioxygenasetestansätze enthielten 40 mM α -Ketoglutar säure, 10 mM Ascorbat und 200 μM Eisensulfat. Als Kontrolle wurden die Ansätze Stopp vor Start, mit gekochtem Protein und ohne die Zugabe der Cofaktoren (α -Ketoglutar säure, Ascorbat und Eisensulfat) durchgeführt.

Unter Verwendung des Tris/HCl Puffers bei pH 6 lagen die PTOX-Gehalte der Stopp vor Start Kontrolle und mit gekochtem Protein mit 5,5 \pm 0,6 bzw. 7,2 \pm 1,0 nmol/Testansatz unter Berücksichtigung der Standardabweichungen dicht zusammen (Abb. 4.31. a)). Die geringfügig erhöhten PTOX-Gehalte des Testansatzes ohne Cosubstrat-Zugabe ließen sich damit erklären, dass bei der Verwendung einer Rohproteinfraktion zellinterne Cofaktoren zu einem Umsatz beitragen können.

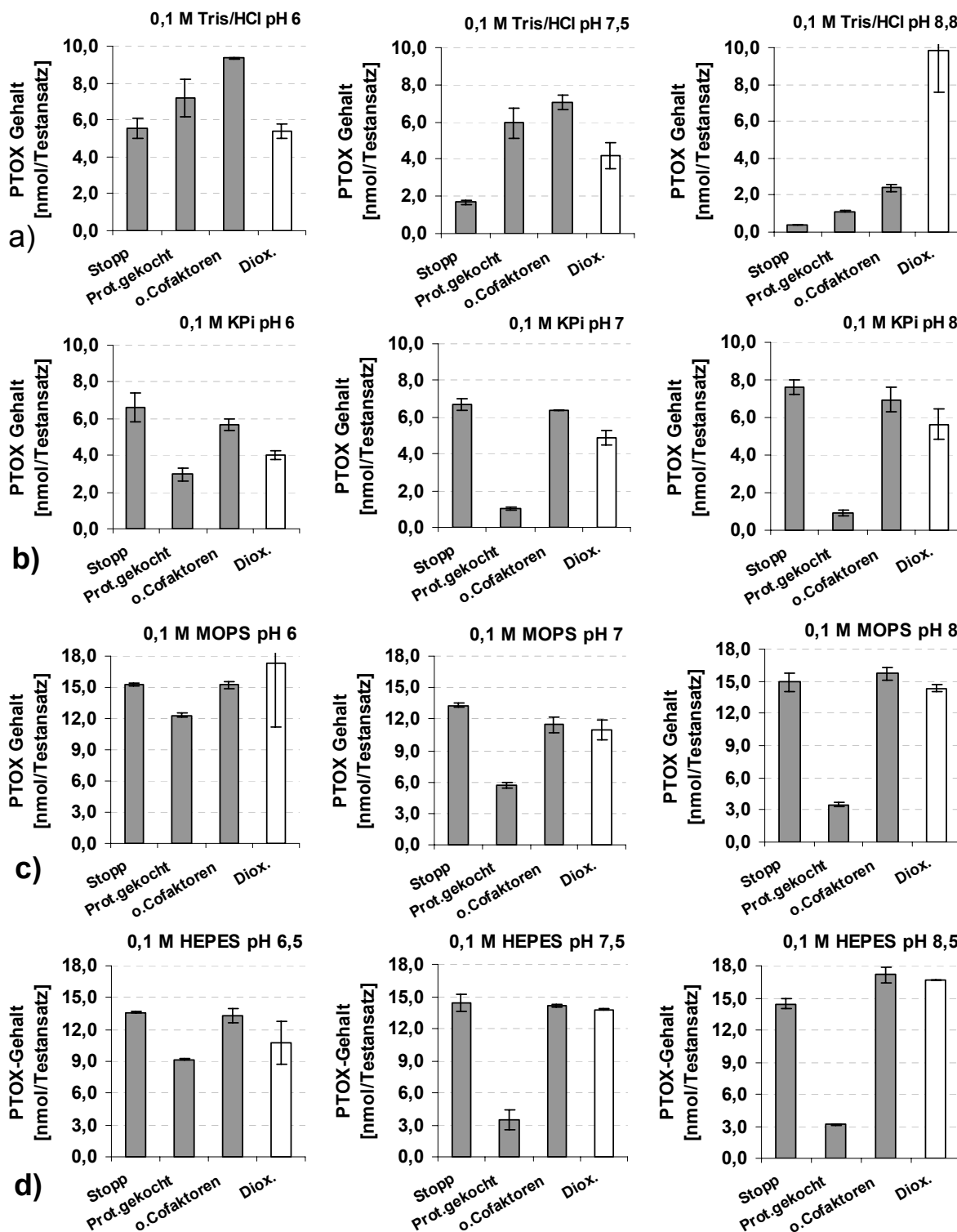


Abb. 4.31.: PTOX-Gehalte pro Dioxygenase-Enzymtestansatz

PTOX-Gehalte der jeweiligen Enzymteste durchgeführt in a) 0,1 M Tris/HCl pH 6, 7,5 und 8,8; b) 0,1 M KPi pH 6, 7 und 8; c) 0,1 M MOPS pH 6, 7 und 8; d) 0,1 M Tris/HCl pH 6, 7,5 und 8,8; Legende: Stopp - Stopp vor Start (direkte Zugabe von 50 μ l 6 N HCl, ohne Inkubation); Prot.gekocht - Enzymtest mit gekochtem Protein; o.Cofaktoren - ohne die Cofaktoren α -Ketoglutar säure, Ascorbat, Eisensulfat; Diox. - vollständiger Dioxygenasetest [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

In den Testansätzen mit Tris/HCl Puffer pH 7,5 waren hingegen die PTOX-Gehalte in der Stopp vor Start Kontrolle im Vergleich zu den anderen Kontrollen wesentlich niedriger (4.31. a)). Diese Tendenz wurde bei der Betrachtung der Enzymteste, die in Tris/HCl Puffer pH 8,8 durchgeführt wurden noch deutlicher. Im Gegensatz zu den Enzymtesten bei pH 6 und 7,5 waren bei pH 8,8 die PTOX-Gehalte mit 9,9 +/- 2,3 nmol/Testansatz im Vergleich zu allen Kontrollansätzen sehr hoch. Die Verhältnisse der PTOX-Gehalte unter Verwendung des KPi und MOPS Puffers bei pH 6, 7 oder 8, sowie des HEPES Puffers bei pH 6,5, 7,5 und 8,5 waren hingegen vergleichbar (Abb. 4.31. b), c) und d)). In diesem Fall zeigten die Kontrollen mit gekochtem Protein mit zunehmendem pH-Wert Abweichungen von den übrigen Kontrollen.

Da der vollständige Dioxygenaseenzymtest in Tris/HCl Puffer bei pH 8,8 der Einzige war, der eine positive Tendenz auf eine mögliche DOP7H Aktivität zeigte, wurde er wiederholt und mit zusätzlichen Kontrollen vervollständigt (Tab. 4.4.). Neben den Kontrollansätzen Stopp vor Start, mit gekochtem Protein und ohne Cofaktor-Zugabe wurden Kontrollen ohne α -Ketoglutarate, ohne Ascorbat, ohne Eisensulfat und ohne das Substrat DOP durchgeführt. Während in den Kontrollen Stopp vor Start, Protein gekocht, ohne Cofaktor-Zugabe und ohne α -Ketoglutarate nur geringe Mengen an PTOX vorlagen, befanden sich in den Testansätzen ohne Ascorbat, ohne Eisensulfat, ohne das Substrat DOP und in den vollständigen Dioxygenasetestansätzen zwischen 11,2 - 12,1 +/- 0,6 nmol/Testansatz (Abb. 4.32.). Der Vergleich der Spektren und Retentionszeiten mit einer PTOX-Standardlösung, sowie die Analyse des Produktes mittels LC-MS (10.7.) bestätigte das Vorliegen von PTOX.

Tab.: 4.4.: Übersicht über die durchgeführten Dioxygenaseenzymtestansätze und Kontrollen;
 Legende siehe Abb. 4.32.

Testansatz	Konz.	Stopp	Prot. gekocht	o.Co-faktoren	o.Keto	o.Asc.	o.Fe	o.DOP	Diox.
Puffer	0,1 M Tris/HCl pH 8,8	x	x	x	x	x	x	x	x
Protein	400 μ g	x	gekocht	x	x	x	x	x	x
α -Ketoglutarat	1 M (10 mM)	x	x	-	-	x	x	x	x
Ascorbat	1 M (7,5 mM)	x	x	-	x	-	x	x	x
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	10 mM (100 μ M)	x	x	-	x	x	-	x	x
DOP	2,5 mM (50 μ M)	x	x	x	x	x	x	-	x
HCl	+ 0,6 N	x	-	-	-	-	-	-	-

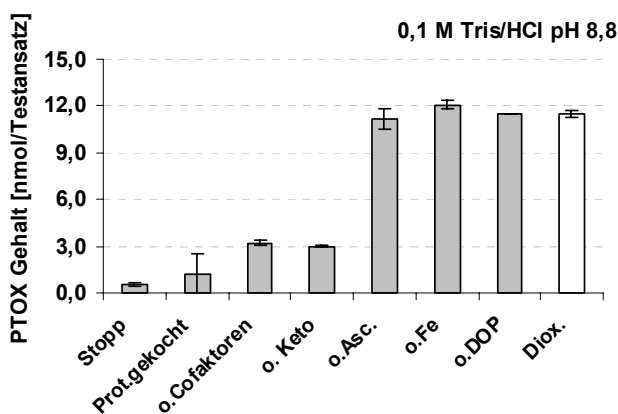


Abb. 4.32.: PTOX-Gehalte pro Dioxygenase-Enzymtestansatz; Enzymtest durchgeführt in 0,1 M Tris/HCl pH 8,8. Legende: Stopp - Stopp vor Start (direkte Zugabe von 50 μ l 6 N HCl, ohne Inkubation); Prot.gekocht - Enzymtest mit gekochtem Protein; o.Cofaktoren - ohne die Cofaktoren α -Ketoglutarate, Ascorbat, Eisensulfat; o.Keto - ohne α -Ketoglutarate; o.Asc. - ohne Ascorbat, o.Fe - ohne Eisensulfat, o.DOP - ohne DOP (Substrat); Diox. - vollständiger Dioxygenasetest [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

Nachträglich wurde der pH-Wert in der Proteinrohfraktion nach Zellaufschluss in 0,1 M Tris/HCl Puffer bei pH 8,8 vor und nach Zugabe von α -Ketoglutarate bestimmt. Dabei lag der pH-Wert im Enzymtestansatz vor der Zugabe etwa bei 8,2 und nach der Zugabe zwischen pH 4 - 5, was eine extreme pH-Wert Verschiebung in den Testansätzen bedeutete. Das Lösen von α -Ketoglutarate im jeweiligen Aufarbeitungspuffer änderte nichts an den vorgestellten Ergebnissen. Die Zugabe von α -Ketoglutarat (Na-Salz) veränderte hingegen den pH-Wert der Testansätze weniger stark (pH-Wert Verschiebung auf

8,5 - 8,7). Die Kombination bzw. Variation von α -Ketoglutarat, α -Ketoglutarat, Ascorbinsäure und Ascorbat ergab in einer weiteren Testreihe, dass die Zugabe von α -Ketoglutarat zusammen mit DOP als Substrat die höchsten PTOX-Gehalte von $5,8 \pm 0,0$ nmol/ Testansatz lieferte. Die zweithöchsten Werte wurden mit α -Ketoglutarat in Kombination mit Ascorbat (ohne DOP-Zugabe) mit $5,3 \pm 0,0$ nmol/Testansatz erreicht, gefolgt von $5,0 \pm 0,2$ nmol/Testansatz in Enzymtesten die ausschließlich α -Ketoglutarat enthielten. In allen weiteren Testansätzen wurden deutlich geringere PTOX-Gehalte gefunden bzw. die Einzelwerte schwankten z.T. sehr stark um den Mittelwert. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Enzymteste weiterhin mit α -Ketoglutarat (in jeweiligem Aufarbeitungspuffer gelöst) durchgeführt.

Wie unter 4.5.2.1. beschrieben, wurde auch in diesem Fall versucht durch Zugabe der Elicitoren Coronalon und Methyljasmonat die enzymatische Aktivität der DOP7H zu erhöhen. Dabei waren die PTOX-Gehalte in den Testansätzen mit löslichen Proteinen, isoliert aus nicht-elicitierten Zellen, höher als aus elicitierten Zellen (Abb. 4.33.). Neben Ascorbat schien vor allem wie zuvor gezeigt α -Ketoglutarat für die Bildung von PTOX notwendig zu sein. Die Dioxygenasetestansätze ohne DOP zeigten im Fall der Coronalon und Methyljasmonat Elicitierungen geringere PTOX-Gehalte als die vollständigen Dioxygenasetestansätze, wobei aber z.T. starke Schwankungen um ihren Mittelwert zu verzeichnen waren (Abb. 4.33. a) und c)). In den nicht-elicitierten Parallelproben war dies nicht der Fall (Abb. 4.33. b)). Die PTOX-Gehalte der Enzymteste Stopp vor Start waren in allen Testansätzen dieser Testreihe sehr gering. Es ist zudem anzumerken, dass sich die Reproduzierbarkeit dieser Testreihe als schwierig erwies.

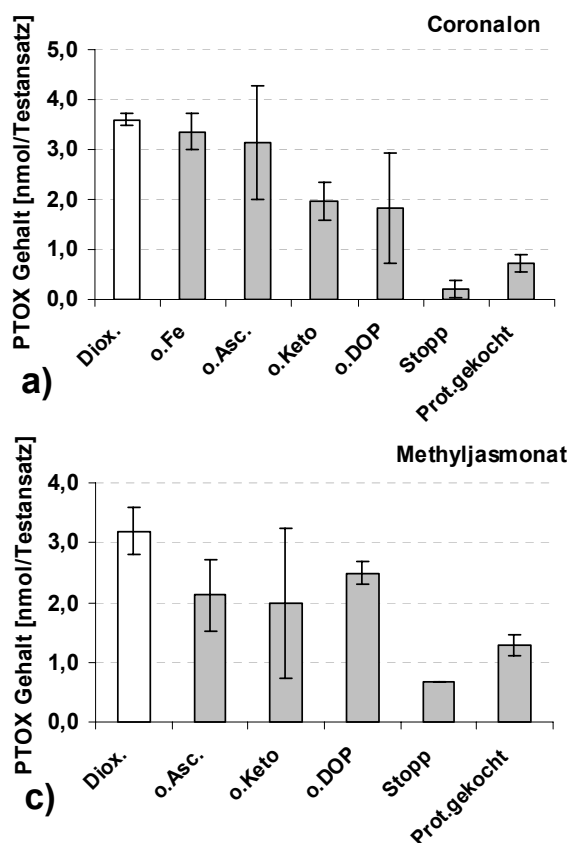


Abb. 4.33.: PTOX-Gehalte pro Dioxygenaseenzymtestansatz; Enzymteste durchgeführt mit löslichen Proteinen, Zellen zuvor elicitiert mit a) Coronalon, c) Methyljasmonat oder b) nicht-elicitiert; Legende: Diox. - vollständiger Dioxygenasetest, o.Fe - ohne Eisensulfat, o.DOP - ohne DOP (Substrat); o.Asc. - ohne Ascorbat, o. α -Keto - ohne α -Ketoglutarat; Stopp - Stopp vor Start (direkte Zugabe von $50 \mu\text{l}$ 6 N HCl, ohne Inkubation); Prot.gekocht - Enzymtest mit gekochtem Protein [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

In einigen Fällen wurde zusätzlich als Reduktionsäquivalent NADPH oder in Anlehnung an Bouwmeester et al. (1998) FAD und FMN zugegeben. Da einige enzymatische Reaktionen sensitiv auf Methanol (Lösungsmittel für die Substrate) reagieren, wurde teilweise das Substrat vor dem Ansetzen der Enzymteste in die Reaktionsgefäße überführt, anschließend zur Trockne eingedunstet und dann erst die Enzymtestkomponenten zugegeben. Im Zuge weiterer Untersuchungen mit der Rohproteinfraktion wurde

versucht, mögliche Störfaktoren auszuschließen. Zur Entfernung störender Salze, unbekannter Substanzen und hoher Lignangehalte wurden die Proteinfractionen z.T. mittels Pd10 Säulen entsalzt, einige Fractionen wurden für 4 - 12 h dialysiert oder einer fraktionierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung unterzogen. Keine dieser Maßnahmen führte zu einer Verbesserung bisweilen sogar eher zu einem Verlust der vermeintlichen DOP7H Aktivität.

4.5.2.3. DOP7H - Eine Peroxidase?

L. album Zellsuspensionskulturen weisen hohe Peroxidaseaktivitäten auf, die bereits im Kulturmedium detektiert werden können (Dr. J. Windhövel, persönliche Mitteilung). Dies ließ sich durch einen photometrischen Enzymtest nach Baier und Dietz (1999; 3.6.2.3.) bestätigen. Sowohl in den Mediumsproben, als auch in den Proteinlösungen war die Bildung des Guajacol-Tetramers innerhalb von 1 - 2 min abgeschlossen. Die Suche nach einer spezifischen enzymatischen DOP7H Aktivität erfolgte in Roh- oder löslichen Proteinfractionen parallel zu den Dioxygenaseenzymtesten. Im Gegensatz zu diesen konnten jedoch für Peroxidasen keine erhöhten PTOX-Gehalte in Vergleich zu verschiedenen Kontrollen gefunden werden.

4.5.2.4. PAM7H - Cytochrom P450 Monooxygenase oder Dioxygenase?

Bei der PAM7H handelt es sich um das zweite Enzym der „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese, dessen Existenz bisher unbekannt ist. Dieses Enzym ist für die Einführung einer Hydroxylgruppe an Position 7 von PAM verantwortlich. Dabei handelt es sich um die gleiche Hydroxylierungsposition, wie auch bei der DOP7H Reaktion. Aufgrund dessen sind zwei Möglichkeiten denkbar - entweder es existieren zwei verschiedene Enzyme mit sehr hohen Substratspezifitäten oder es gibt nur ein Enzym, welches beide Substrate (DOP und PAM) hydroxylieren kann.

Die Suche nach der PAM7H erfolgte parallel zu der Suche nach der DOP7H d.h., alle Enzymaufarbeitungen und -teste wurden wie unter 4.5.2.1. und 4.5.2.2. beschrieben durchgeführt. Dabei konnte bis auf eine Ausnahme kein Hinweis auf eine PAM7H Aktivität gefunden werden. Die Ausnahme bezog sich auf die mikrosomale Aufarbeitung von Zellen der Linie PT nach Coronalon-Elicitierung und anschließenden CYP-Enzymtesten. Dabei konnten geringfügig erhöhte 6MPTOX-Gehalte nach 3 stündiger Inkubation von $0,09 \pm 0,0$ nmol/Testansatz im Vergleich zu Kontrollen ohne NADPH mit $0,02 \pm 0,0$ nmol/Testansatz oder ohne PAM mit $0,03 \pm 0,0$ nmol/Testansatz detektiert werden. Aber wie bereits für die DOP7H Enzymteste beschrieben, waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar.

4.5.2.5. Versuche zur Auffindung weiterer Hydroxylierungen

Der in Abb. 1.5. dargestellte Lignanbiosyntheseweg von PTOX und 6MPTOX ist bisher nur hypothetisch. Es konnte nicht sicher nachgewiesen werden, ob DOP tatsächlich eine Vorstufe von PTOX ist, da das zugehörige Enzym bisher noch nicht biochemisch charakterisiert werden konnte (4.5.2.1., 4.5.2.2.). Im Gegensatz dazu konnte zweifelsfrei gezeigt werden (biochemisch und mittels Fütterungsexperimenten), dass DOP die Vorstufe von β -Peltatin ist.

Die Hydroxylgruppe an Position 7 des PTOX-Moleküls könnte theoretisch bereits sehr viel „früher“ im Biosyntheseweg eingeführt werden, z.B. auf Stufe von Matairesinol, Yatein, 4'-Demethyl-DOP, 4'-Demethylatein oder eines Thujaplicatins. Für die Suche nach solchen Hydroxylierungsreaktionen standen die Substrate Matairesinol, Yatein und 4'-Demethyl-DOP zur Verfügung. In der mikrosomalen Fraktion (CYP-Enzymteste) als auch mit löslicher oder Rohproteinfraktion (Dioxygenaseenzymteste) von

Zellen der Linien 6M und PT konnte jedoch keine Umsetzung dieser Substrate in ihre hydroxylierten Produkte beobachtet werden.

Im Zusammenhang mit der Suche weiterer Hydroxylierungsreaktionen stellte sich auch die Frage, ob die DOP6H neben DOP noch weitere Substrate wie PTOX, β -Peltatin oder α -Peltatin als Substrate in ihre hydroxylierten Produkte überführen kann. Dafür wurden mikrosomale Proteine der Linie 6M verwendet und in CYP-Enzymtesten die genannten Substrate angeboten. Als einziges Substrat wurde dabei DOP akzeptiert und in β -Peltatin umgesetzt, während alle übrigen Substrate nicht in ihre hydroxylierten Produkte überführt wurden.

4.5.2.6. Glucosidase- bzw. Glucosyltransferase-Aktivität

Bei der vermeintlichen Dioxygenaseaktivität scheint PTOX durch alleinige Zugabe von α -Ketoglutarat zu entstehen. Um eine Erklärung für diese de-novo Entstehung zu erhalten, wurde eine Glucosidase-reaktion in Betracht gezogen. In der Zelle vorliegendes PTOX-Glucosid könnte dabei von zelleigenen Glucosidasen in PTOX und aktivierte Glucose überführt werden.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Proteinfractionen bei dem pH-Wert der Aufarbeitung (0,1 M Tris/HCl pH 7,5 oder 8,0) und nach Titrieren auf pH 5,0 für 3h bei 30°C mit β -Glucosidase inkubiert. Dabei konnten aber keine erhöhten PTOX-Gehalte gefunden werden.

Wie die Fütterungsexperimente zeigten, lagen nach Lignanaufarbeitung ohne β -Glucosidase Zugabe PTOX und 6MPTOX fast ausschließlich in ihren glucosylierten Formen vor, was auf eine zellinterne Glucosyltransferase schließen ließ. Enzymteste mit UDP-Glucose, PTOX und Rohproteinfraktion aus Zellen der Linie PT ergaben zunächst kein eindeutiges Ergebnis (3.6.2.6.). Nach fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung konnte jedoch eine Glucosyltransferaseaktivität in Fraktion 5 (Pellet der 50 - 60 %igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung) mit 1,8 +/- 0,2 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein gefunden werden. Die Berechnung der enzymatischen Aktivitäten erfolgte durch Abzug der Kontrollen bei der keine UDP-Glucose zugegeben wurde. Das entstandene PTOX-Glucosid wurde mittels LC/MS analysiert und das Fragmentierungsmuster mit Literaturdaten verglichen, was die Identität des PTOX-Glucosids bestätigte (10.8.; Schmidt et al., 2006; Vasilev et al., 2007).

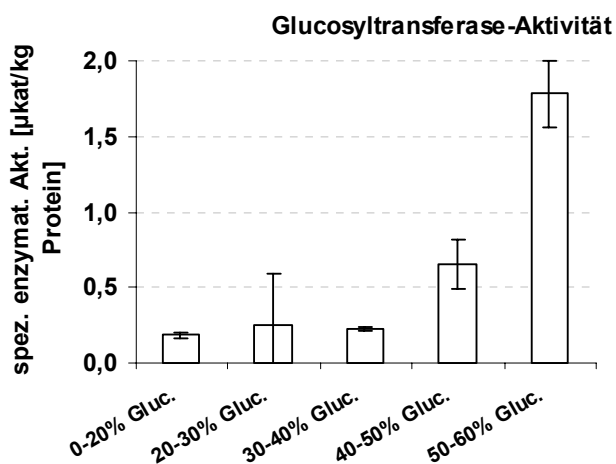


Abb. 4.34.: spezifische enzymatische PTOX:UDP-Glucosyltransferase-Aktivität

Die Enzymteste wurden mit einzelnen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällten Proteinfractionen durchgeführt. Legende: Gluc. - vollständiger Glucosyltransferasetest [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Doppelproben]

4.5.3. Proteinanalytik

4.5.3.1. Vergleichende Proteomanalyse der Zelllinien 6M und PT

Die Zellen der Linie 6M und PT unterscheiden sich in der Zellaggregatgröße und der Farbe (Abb. 2.1.). Zellen der Linie 6M wachsen in plättchenartigen Aggregaten und sind gelblich, während Zellen der Linie PT blassgelb aussehen und in feinen Zellklümpchen wachsen. Beide Linien unterscheiden sich in der Lignanakkumulation und der enzymatischen DOP6H Aktivität. Es ist daher denkbar, dass die Unterschiede der enzymatischen DOP6H Aktivität auf einer höheren Anzahl der DOP6H Proteinmoleküle in Linie 6M beruhen könnte. Da außerdem Zellen der Linie PT überwiegend PTOX akkumulieren, ist es möglich, dass in diesen Zellen anstelle der DOP6H, die DOP7H Proteinmoleküle in größerer Anzahl vorhanden sind. Sollten diese Annahmen zutreffen, so könnte eine vergleichende Proteomanalyse Hinweise auf die genannten Proteine geben.

Nach Zellaufschluss von Zellen beider Linien wurden die Proteine durch fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung separiert (3.6.3.1.). Die fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung wurde in sieben Schritten von 0 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 - 70 und 70 - 80 % durchgeführt und die enzymatischen Aktivitäten der jeweiligen Proteinfraction nach Entsalzen ermittelt (Tabelle 4.5.). Dabei wurden die enzymatischen Aktivitäten der C4H, DOP6H und β P6OMT betrachtet und schließlich die Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.6.3.2.).

Tab.: 4.5.: Spezifische enzymatische Aktivitäten der C4H, DOP6H und β P6OMT der einzelnen Proteinfractionen nach Ammoniumsulfat-Fällung; Die Hauptaktivitäten der Enzyme in den jeweiligen Fraktionen wurden farbig markiert [Mittelwerte und Standardabweichungen einer Messreihe mit Doppelproben].

	Linie 6M spezifische enzymatische Aktivität [$\mu\text{kat}/\text{kg Protein}$]	Linie PT spezifische enzymatische Aktivität [$\mu\text{kat}/\text{kg Protein}$]
Proteinfraction	C4H	C4H
Rohproteinfraction	14,9 +/- 4,1	2,7 +/- 0,8
0-20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	17,8 +/- 0,6	17,4 +/- 0,7
20-30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,6 +/- 0,7	3,9 +/- 0,6
30-40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,9 +/- 0,1	2,2 +/- 0,1
40-50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0	0,0
50-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0	0,0
60-70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0	0,0
70-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0	0,0
Proteinfraction	DOP6H	DOP6H
Rohproteinfraction	0,01 +/- 0,00	0,01 +/- 0,01
0-20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,20 +/- 0,01	0,12 +/- 0,01
20-30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,56 +/- 0,02	0,04 +/- 0,02
30-40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,52 +/- 0,02	0,02 +/- 0,00
40-50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,01 +/- 0,00	0,01 +/- 0,00
50-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,01 +/- 0,00	0,02 +/- 0,01
60-70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,00	0,00
70-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,00	0,02 +/- 0,02
Proteinfraction	βP6OMT	βP6OMT
Rohproteinfraction	3,3 +/- 0,3	4,5 +/- 0,7
0-20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,6 +/- 0,1	2,1 +/- 0,1
20-30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,9 +/- 0,0	1,4 +/- 0,1
30-40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,9 +/- 0,1	1,5 +/- 0,0
40-50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,2 +/- 0,1	7,6 +/- 0,4
50-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,3 +/- 0,2	8,4 +/- 0,2
60-70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,8 +/- 0,0	4,6 +/- 0,4
70-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 +/- 0,1	0,3 +/- 0,0

Die enzymatischen Aktivitäten der C4H, DOP6H und β P6OMT wurden bestimmt wie unter 3.3.4.1. und 3.4.1. beschrieben. Auf die Durchführung von 0-Kontrollen (Stopp vor Start) wurde in diesem Fall verzichtet, da in vorhergehenden Experimenten gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), dass die Akkumulation der gesuchten Produkte (p -Cumarsäure, β -Peltatin und PAM) in 5 Tage alten Zellen < 1 % betrug.

Die Hauptaktivitäten der CYP-Enzyme C4H und DOP6H wurden für beide Zelllinien in der 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Proteinfraction gefunden. Die ermittelten enzymatischen C4H Aktivitäten lagen in beiden Linien zwischen 17 und 18 \pm 1 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein. Die Aktivität der DOP6H lag in Linie 6M mit 1,2 \pm 0,0 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein zehnfach höher als in Linie PT. Die höchsten β P6OMT Aktivitäten konnten in den 50 und 60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Proteinfractionen mit 9 bzw. 8 \pm 0 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein gefunden werden.

Die nachfolgende vergleichende SDS-Gelelektrophorese der jeweiligen Proteinextrakte beider Zelllinien zeigte, dass die Zellen auf Proteinebene ebenfalls einige Unterschiede aufwiesen (Abb. 4.35.). Da die enzymatische DOP6H Aktivität vor allem in der 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Proteinfraction gefunden wurde, war diese Fraction von besonderem Interesse. Die einzelnen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Proteinfractionen der Linien 6M und PT wurden nebeneinander aufgetragen und direkt miteinander verglichen.

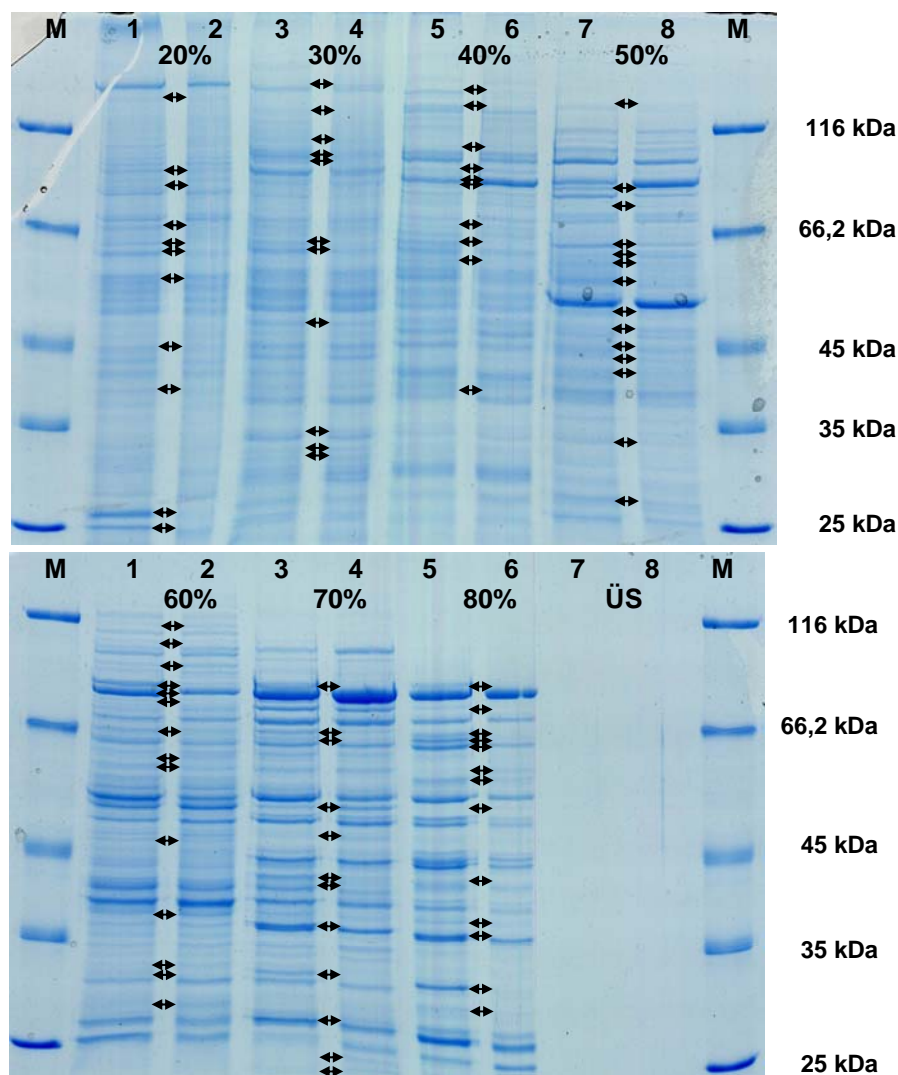


Abb.: 4.35.: Coomassie gefärbte SDS-Gele (10 %) der verschieden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Fractionen der Linien 6M und PT; Schwarze Pfeile markieren Unterschiede in der Proteinbandenstärke der gegenübergestellten Proteinlösungen. M - Größenmarker; oberes Gel: Spur 1, 3, 5 und 7 - 20, 30, 40 und 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Linie 6M, Spur 2, 4, 6, 8 - 20, 30, 40, 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Linie PT; unteres Gel: Spur 1, 3, 5 und 7 - 60, 70, 80% und Überstand der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung Linie 6M, Spur 2, 4, 6 und 8 - 60, 70, 80% und Überstand der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung Linie PT; Es wurden 25 μg Protein/Spur aufgetragen.

Insgesamt waren 85 Proteinbanden als unterschiedlich starke Banden mit bloßem Auge sichtbar. Die Größe von CYP-Enzymen liegt im Bereich von 45 - 62 kDa, während die Größe von pflanzlichen Dioxygenasen etwa 38 - 43 kDa beträgt (Abb. 1.13.). Für CYP-Enzyme konnten in der 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

gefällten Proteinfraction drei bis fünf verschiedene Proteinbanden erkannt werden, die in Linie 6M stärker zum Vorschein kamen, als in Linie PT. Da sich somit lediglich die 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällte Proteinfraction in Bezug auf CYP-Enzyme als interessant erwies, wurden die mikrosomalen Proteine im Folgenden genauer untersucht.

4.5.3.2. Vergleichende Mikrosomenanalyse der Zelllinien 6M und PT

Mikrosomale Proteine wurden wie unter 3.3.3.2. beschrieben aufgearbeitet und mittel SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.6.3.2.). Insgesamt 18 Banden konnten als differentielle Banden identifiziert werden (in Abb. 4.36. beschriftet mit 1 - 15 und A - C), welche fast ausschließlich (bis auf die Banden 4, 6 und 13) nur in Linie PT erkennbar waren.

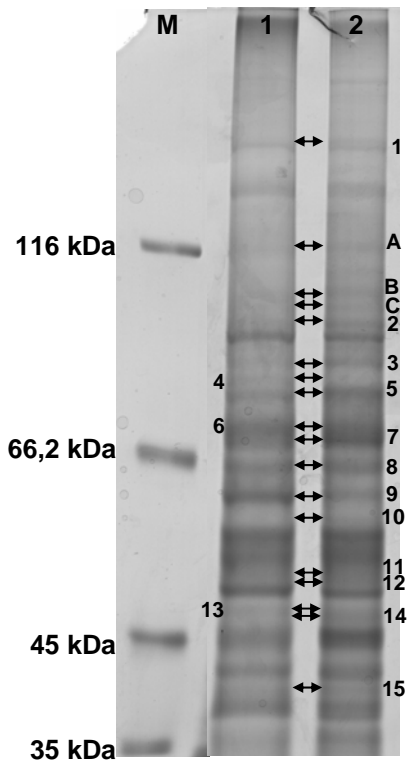


Abb.: 4.36.: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (10 %) mit mikrosomalen Proteinfractionen der Linien 6M und PT

Die Proteinbanden der mikrosomalen Proteinfractionen wurden verglichen und Unterschiede mit 1 - 15 und A - C kenntlich gemacht. Banden 4, 6 und 13 sind nur in Linie 6M erkennbar, während sie in Linie PT fehlen. M - Größenmarker; Spur 1 - Mikrosomen Linie 6M (176 μg), Spur 2 - Mikrosomen Linie PT (120 μg);

Alle unterschiedlich aussehenden Banden wurden zweifach aus parallel aufgetragenen Mikrosomenlösungen der Linien 6M und PT herausgeschnitten. Ein Teil davon wurde zunächst gelelektrophoretisch in einem 8 %igen SDS-Gel auf Reinheit analysiert (Abb. 4.37.).

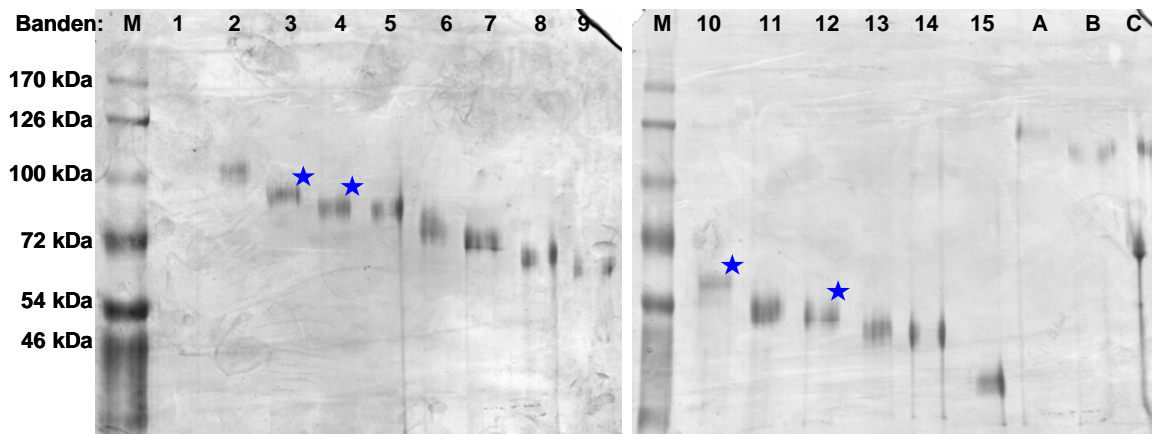


Abb.: 4.37.: Silbernitrat gefärbtes SDS-Gel (8 %) mit spezifischen Proteinbanden herausgetrennt aus dem oben abgebildeten SDS-Gel; M - Größenmarker; Banden 1 - 15 und A - C entsprechen der Beschriftung der Abb. 4.36.; Die mit Stern markierten Banden wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt.

Das in Abb. 4.37. gezeigte SDS-Gel wurde mittels Silbernitrat gefärbt. Dabei zeigte sich, dass die zuvor ausgeschnittenen Banden größtenteils frei von Verunreinigungen mit anderen Proteinen waren. Die Banden 6, 7, 11, 14 und 15 zeigten jedoch einen etwas breiteren Bandenbereich, was vermuten ließ, dass eventuell mehr als ein Protein enthalten sein könnte. Aus diesem Grund wurden nur die Banden 10 und 13, als mögliche Vertreter der CYP-Klasse, zusammen mit den Banden 3 und 4 als Kontrollen für eine genauere Untersuchung ausgewählt. Die Größen der in den Banden 3, 4, 10 und 13 enthaltenen Proteine betragen 89, 85, 59 und 49 kDa. Diese Proteine wurden in den jeweiligen Gelstücken tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels Nanoelektrospray Tandem-Massenspektrometrie untersucht. Die Ergebnisse der Peptidanalysen und der anschließenden Blast-Suche sind in den folgenden Tabellen (Tab. 4.6. - 4.9.) dargestellt. Die Blast-Suche erfolgte in der GenBank -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - mit der Suchoption blastp („short nearly exact matches“) und der Datenbank der Viridalesplanta.

Tab.: 4.6.: Ergebnisse der Peptidanalyse der Bande 3 (+TOF MS Produkte; ca. 89 kDa) und der Blastp-Suche; Für jede Einzelpeptidsequenz wurde eine Blastp-Suche durchgeführt und die Sequenzidentität (SI) und Sequenzähnlichkeit (SÄ) zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Pflanzen angegeben.

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
+ TOF MS Produkt (652.4) / VLQEGAFGDVLR				
<i>Citrus unshiu</i>	sucrose synthase	BAA89049	81%	90%
<i>Citrus unshiu</i>	sucrose synthase	BAA88905	81%	90%
<i>Eucalyptus grandis</i>	sucrose synthase	ABB53602	72%	90%
<i>Pisum sativum</i>	sucrose synthase	AAC28107	72%	90%
<i>Glycine max</i>	sucrose synthase (nodule-enhanced)	P13708	72%	90%
<i>Vigna radiata var. radiata</i>	sucrose synthase (Sucrose-UDP glucosyltransferase)	Q01390	72%	90%
<i>Medicago sativa</i>	sucrose synthase (Sucrose-UDP glucosyltransferase)	O65026	72%	90%
+ TOF MS Produkt (603.9) / LSGDGVFLNR				
<i>Coffea arabica</i>	sucrose synthase	CAJ32596	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase-like protein	BAE99649	100%	100%
<i>Coffea canephora</i>	sucrose synthase	CAI56307	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase-like protein	NP_566865	100%	100%
<i>Eucalyptus grandis</i>	sucrose synthase	ABB53602	71%	78%
<i>Viscum album subsp. album</i>	sucrose synthase	ABF50715	71%	78%
<i>Beta vulgaris</i>	sucrose synthase	AAR19769	71%	78%
+ TOF MS Produkt (657.9) / VYGTQYSDLLR				
<i>Carica papaya</i>	sucrose synthase	AAL16016	81%	100%
<i>Gossypium hirsutum</i>	sucrose synthase	AAD09568	81%	100%
<i>Citrus unshiu</i>	sucrose synthase	BAA89049	81%	100%
<i>Citrus unshiu</i>	sucrose synthase	BAA88905	81%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase-like protein	BAE99649	72%	90%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative sucrose synthase	AAK59464	72%	90%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase-like protein	NP_566865	72%	90%
+ TOF MS Produkt (605.9) / FEVWPYQK				
<i>Eucalyptus grandis</i>	sucrose synthase	ABB53602	100%	100%
<i>Fragaria x ananassa</i>	sucrose synthase	BAF33368	100%	100%
<i>Coffea arabica</i>	sucrose synthase	CAJ32596	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase-like protein	BAE99649	100%	100%
<i>Viscum album subsp. album</i>	sucrose synthase 2	ABF50716	100%	100%
<i>Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae</i>	sucrose synthase isoform 2	AAV89387	100%	100%
<i>Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae</i>	sucrose synthase isoform 1	AAV89384	100%	100%
+ TOF MS Produkt (489.3) / FQDLGLER				
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	sucrose synthase	AAC14180	87%	100%
<i>Phaseolus vulgaris</i>	sucrose synthase	AAN76498	87%	100%
<i>Diospyros kaki</i>	lycopene epsilon-cyclase	BAE94036	87%	100%
<i>Adonis palaestina</i>	lycopene epsilon-cyclase	AAK07431	87%	100%
<i>Eucalyptus grandis</i>	sucrose synthase	ABB53602	75%	100%
<i>Coffea arabica</i>	sucrose synthase	CAJ32596	75%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sucrose synthase like protein	BAE99649	75%	100%
+ TOF MS Produkt (515.8) / DELVSLLSR				
<i>Craterostigma plantagineum</i>	sucrose synthase	BAE99649	88%	100%
<i>Actinidia deliciosa</i>	sucrose synthase	AAQ18911	88%	100%
<i>Citrus unshiu</i>	sucrose synthase	BAA88981	88%	100%
<i>Craterostigma plantagineum</i>	sucrose synthase	CAB38022	88%	100%
<i>Pisum sativum</i>	sucrose synthase 2	O24301	77%	100%
<i>Thlaspi caerulescens</i>	sucrose synthase	ABI81471	77%	100%
<i>Coffea arabica</i>	sucrose synthase	CAJ32597	77%	100%

Tab.: 4.7.: Ergebnisse der Peptidanalyse der Bande 4 (+TOF MS Produkte; ca. 85 kDa) und der Blastp-Suche;
Für jede Einzelpeptidsequenz wurde eine Blastp-Suche durchgeführt und die Sequenzidentität (SI) und Sequenz-ähnlichkeit (SÄ) zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Pflanzen angegeben.

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
+ TOF MS Produkt (669.4) / SLLDSGVGFTK				
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	ankyrin repeat protein chloroplast precursor-like	BAD37889	55%	55%
<i>Anthrithinum majus</i>	RNA polymerase IV largest subunit	AAV89361	72%	81%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	HSP 90-like proetin	NP_001052020	72%	90%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	heat shock protein 90	BAD04054	72%	90%
<i>Zea mays</i>	heat shock protein HSP82	Q08277	72%	90%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	NP_564315	52%	52%
<i>Mesostigma viride</i>	HSP 90	ABJ80947	70%	90%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass	ABG66113	70%	80%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	retrotransposon protein, putative, unclassified	ABF97883	70%	80%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	unknown protein	CAE04852	70%	80%
+ TOF MS Produkt (646.4) / QNLSNSSDALSR				
<i>Scenedesmus obliquus</i>	ChlB subunit of protochlorophyllide reductase	YP_635962	87%	100%
<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	dihydroliipoamide dehydrogenase precursor	BAB44156	75%	83%
<i>Oryza sativa</i> (indica)	H0721B11.2	CAJ86046	87%	100%
<i>Cucumis melo</i>	receptor lectin protein kinase-like	AAU04770	87%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DNA binding, transcription factor	NP_564293	87%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	T22C5.19	AAF24948	87%	100%
<i>Zea mays</i>	pullulanase-type starch debranching enzym	AAD11599	87%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYB-related transcription factor-like protein	NP_200570	75%	75%
<i>Ipomoea trifida</i>	hypothetical protein	BAF36336	63%	81%
<i>Oryza sativa</i>	H0311C03.11	CAH67557	87%	87%
+ TOF MS Produkt (750.5) / VDSDDLPLNLSR				
<i>Beta vulgaris</i>	heat shock protein 83	CAK22426	91%	100%
<i>Hevea brasiliensis</i>	heat shock protein	AAQ08597	91%	100%
<i>Lycopersicon esculentum</i>	heat shock protein 90	AAD30456	91%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	OSJNBb0085F13.17	CAE02770	91%	100%
<i>Ipomoea nil</i>	heat shock protein 83	P51819	91%	100%
<i>Zea mays</i>	heat shock protein 82	Q08277	91%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	heat shock protein 82	P27323	91%	100%
<i>Zea mays</i>	heat shock protein HSP82	A48426	91%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	heat shock protein HSP81-1	1908431A	91%	100%
<i>Nicotiana tabacum</i>	heat shock protein 82	P36182	91%	100%

Tab.: 4.8.: Ergebnisse der Peptidanalyse der Bande 10 (+TOF MS Produkte; ca. 59 kDa) und der Blastp-Suche; Für jede Einzelpeptidsequenz wurde eine Blastp-Suche durchgeführt und die Sequenzidentität (SI) und Sequenzähnlichkeit (SÄ) zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Pflanzen angegeben.

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
+ TOF MS Produkt (865.6) / ELYVFNPK				
<i>Pinus taeda</i>	calreticulin	AAG01147	100%	100%
<i>Nicotiana tabacum</i>	tabacco calreticulin	CAA59694	88%	100%
<i>Prunus armeniaca</i>	calcium-binding protein calreticulin	AAD32207	88%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	hypothetical protein	AAC49695	88%	88%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	AAN60341	88%	88%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative calcium-binding protein, calreticulin	AAM63796	88%	88%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative calcium-binding protein, calreticulin	AAK74014	88%	88%
+ TOF MS Produkt (491.3) / FAEETWAK				
<i>Triticum aestivum</i>	calreticulin-like protein	AAW02798	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative calreticulin precursor	NP_001051799	100%	100%
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	calreticulin	AAA32949	100%	100%
<i>Oryza sativa</i>	calcium-binding protein	BAA88900	100%	100%
<i>Zea mays</i>	calreticulin	CAA54975	87%	87%
<i>Pennisetum ciliare</i>	calreticulin-like protein	AAK15502	87%	87%
<i>Phormium cookianum</i>	putative calreticulin	AAX21201	87%	87%
+ TOF MS Produkt (450.3) / FFEEK				
<i>Phaseolus glabellus</i>	maturase	ABE99997	100%	100%
<i>Ostreococcus tauri</i>	unnamed protein product	CAL54622	100%	100%
<i>Stigeoclonium helveticum</i>	cell division protein	YP_764381	100%	100%
<i>Medicago truncatula</i>	cytochrome cd1-nitrite reductase-like, C-terminal haem d1	ABE88907	100%	100%
<i>Medicago truncatula</i>	Esterase, Lipase, Thioesterase	ABE88701	100%	100%
<i>Medicago truncatula</i>	Actin-binding FH2, Quinonprotein alcohol dehydrogenase-like	ABE85432	100%	100%
<i>Medicago truncatula</i>	Phosphoesterase, DHHA1	ABE78182	100%	100%
+ TOF MS Produkt (455.8) / PEDGWEK				
<i>Oryza sativa</i>	unknown protein	NP_001048253	100%	100%
<i>Zea mays</i>	nitrate reductase [NAD(P)H]	P39871	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	AAN60258	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	calreticulin, calcium ion binding	NP_001031199	100%	100%
<i>Beta vulgaris</i> susp. <i>vulgaris</i>	calreticulin precursor	O81919	100%	100%
<i>Physcomitrella patens</i>	class III homeodomain-leucine zipper	ABD90523	83%	100%
<i>Physcomitrella patens</i>	class III homeodomain-leucine zipper HB10	ABD75299	83%	100%
+ TOF MS Produkt (833.6) / YFALSAEYSFLLNK				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	AAD24854	60%	73%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative zinc finger protein	AAO72627	69%	76%
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	hypothetical protein	NP_848105	72%	72%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	unknown protein	BAD10789	77%	88%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative peroxidase	BAB39281	70%	90%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os08g0198100	NP_001061197	66%	83%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os04g0525700	NP_001053359	100%	100%
+ TOF MS Produkt (522.4) / SSPATLTAGHR				
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	hypothetical protein	AAM01093	80%	90%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative chloroplast protease	BAD37263	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	BAD81320	72%	72%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	AAM13155	77%	75%
<i>Oryza sativa</i>	hypothetical protein	AAU90180	87%	87%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative cytochrome P450	AAT38061	63%	72%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	unknown protein	BAD38111	87%	87%
+ TOF MS Produkt (618.5) / TELVLSSPK				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TPA: KIP	DAA00366	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative sulfate transporter	AAN59769	100%	100%
<i>Manihot esculenta</i>	NBS-LRR resistance protein RGH2	AAO37646	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	AAV74222	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative protein	BAD43272	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative flavonoid glycosyl-transferase	XP_483068	80%	80%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	expansin-like protein A1	AAM52409	87%	87%

Tab.: 4.9.: Ergebnisse der Peptidanalyse der Bande 13 (+TOF MS Produkte; ca. 49 kDa) und Blastp-Suche;
Für jede Einzelpeptidsequenz wurde eine Blastp-Suche durchgeführt und die Sequenzidentität (SI) und Sequenz-ähnlichkeit (SÄ) zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Pflanzen angegeben.

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
+ TOF MS Produkt (868,1) / NYTDWNLPPR				
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os05g0507300	NP_001055991	80%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	calreticulin like protein	BAF01991	80%	100%
<i>Medicago truncatula</i>	concanavalin A-like lectin/glucanase	ABE78019	80%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative calreticulin protein	AAT07600	80%	100%
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	calreticulin 3	AAQ19995	80%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative calreticulin protein	AAL07169	80%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRT3, calreticulin 3, calcium ion	NP_973793	80%	100%
<i>Ricinus communis</i>	calreticulin	P93508	88%	100%
<i>Glycine max</i>	calreticulin-1	BAF36056	77%	100%
<i>Nicotiana tabacum</i>	tabacco calreticulin	CAA59694	77%	100%
+ TOF MS Produkt (586,9) / EVVQDLSNR				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SRF3	BAF00067	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative acetyl-CoA carboxylase	AAP53321	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATP binding/kinase/protein serine/threonine kinase	NP_192248	100%	100%
<i>Brassica napus</i>	acetyl-CoA carboxylase	CAC19876	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative LRR receptor-like protein	AAD14467	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	acetyl-CoA carboxylase, putative, 5' partial (ACC1)	AAG51250	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	putative acetyl-CoA carboxylase	AAM18728	100%	100%
<i>Oryza sativa</i>	unknown protein	BAD54140	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	acetyl-CoA carboxylase	AAG40563	100%	100%
<i>Brassica napus</i>	acetyl-CoA carboxylase	CAC16140	100%	100%
+ TOF MS Produkt (461,3) / LDLFEEER				
<i>Schiedea adamantis</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81125	100%	100%
<i>Schiedea globosa</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81127	100%	100%
<i>Schiedea haleakalensis</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81128	100%	100%
<i>Schiedea hookerii</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81130	100%	100%
<i>Schiedea jacobii</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81131	100%	100%
<i>Schiedea kaalea</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	ABK81132	100%	100%
+ TOF MS Produkt (571,5) / LVSLNQLR				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative heat shock protein	AAF04452	88%	88%
<i>Lycopersicon esculentum</i>	kinesin related protein	AAO15358	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATP binding / microtubule motor	NP_188650	100%	100%
<i>Anthirrhinum hispanicum</i>	S locus F-box (SLF)-S5A protein	CAD56853	75%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unnamed protein product	BAB01875	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os10g0492300	NP_0010664931	75%	87%
<i>Medicago truncatula</i>	protein kinase	ABE78378	85%	85%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	hypothetical protein AT2G02955	AAU44443	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	NP_175111	85%	85%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	hypothetical protein	AAU44442	100%	100%
+ TOF MS Produkt (485,4) / LNPFGDA				
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os04g0545200	NP_001053466	85%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative protein	CAA22564	85%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	polygalacturonase	NP_194963	85%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	leucine zipper protein	BAB10258	85%	85%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	NP_182004	83%	100%
<i>Ostreococcus tauri</i>	unnamed protein product	CAL51955	83%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	hypothetical protein	BAD81399	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TFIIB-related protein	CAC82714	100%	100%
<i>Ostreococcus tauri</i>	cryptochrome-like protein 2	AAU14281	83%	100%
<i>Picea glauca</i>	homeobox transcription factor KN4	ABB95348	100%	100%
+ TOF MS Produkt (435,9) / EAVAV				
<i>Lolium perenne</i>	CRT-binding factor	BAF36839	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	ABK28150	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (indica)	H0303G06.6	CAJ86417	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (indica)	OSIGBa0152L12.5	CAH66996	100%	100%
<i>Ostreococcus tauri</i>	unnamed protein product	CAL56517	100%	100%
<i>Malus x domestica</i>	DELLA protein	AAV56754	100%	100%
<i>Oryza sativa</i> (japonica)	Os12g0603700	NP_001067214	100%	100%
<i>Glycine max</i>	MYB transcription factor MYB61	ABH02829	100%	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative second messenger-dependent protein kinase	BAF01078	100%	100%
<i>Platanus x acerifolia</i>	hypothetical protein	CAL25354	100%	100%

Von dem Protein der Bande 3 konnten sechs Peptidsequenzen erhalten werden (VLQEGAFGDVLR, LSGDGVF LNR, VYGTQYSDLLR, FEVWPYQK, FQDLGLER, DELVSLLSR), die alle nach Blastp-Suche Sequenzähnlichkeit zu einer Sucrose Synthase aufwiesen. Der Sequenzvergleich der Sucrose Synthase aus *Gossypium hirsutum* und *Citrus unshiu* mit den *L. album* Linie PT Peptidsequenzstücken zeigt die Abfolge bzw. Anordnung der Teilpeptide in der Gesamtsequenz (Abb. 4.38.).

Peptid	1	-----d lvs-----vlqegafgdvlr-----	
SuSyGos	1	maeraltrvhsrlrerldstltahrnmlaalsiegkkgkigllhhqiilefaepeenerkladgaffeilkasqexivlpp	82
SuSyCit	1	maeraltrvhsrlrerldetlsahrnmlaalsiegkkgkigllqhqliaefesiseenrkhltgafgevlratqeaivlpp	82
Peptid	2	-----lsgdgvflnr--	
Goss	83	wvalavrprpgvweyirvnhalvveeltvaeylrfkeelvdgssnanfvleldfepfnasfprptlksksignvveflnrhl	164
SuSyCit	83	wvalavrprpgvweyirvnhalvveellvaeylhfkeelvdgssngnfvlleldfepfnasfprptlksksignvveflnrhl	164
Peptid	5	-----fqdlgler-----	
SuSyGos	165	saklfhdkesmhpllefevshhgkmmndriqnlslqhvkkaeeylvalpaetpyaefehkfqeiglergwgdtar	246
SuSyCit	165	saklfhdkesmhplleflrvhchkgkmmndriqnlslqhvlrkaeeylvtvapetpfselalrfqeiglergwgdtar	246
Peptid		-----	
SuSyGos	247	vlemiqlldlleapdpctlekflgripmvfnviltphgyfaqdnvlygypdtggqvviyldqvralenemlnrikqggldi	328
SuSyCit	248	alemiqlldlleapdpctletflgripmvfnviltphgyfaqddvlygypdtggqvviyldqvraledemllrikqggldi	328
Peptid		-----	
SuSyGos	329	tpriiitrlpdaavgttcgqrlekkygveedilipfrtekgivrrwisrfevwpyletytedvaveiskelqgkpdlii	410
SuSyCit	330	tpqiliitrlpdaavgttcgqrlekkygveedilipfrtekgivrrwisrfevwpyletytedvaveiakelqgkpdlii	410
Peptid		-----	
SuSyGos	411	gnysggnivasllahklgvtqctiahalectkypdsdiywkkl-----	454
SuSyCit	411	gnysdgnivasllahklgvtqctiahalectkypdsdiywkklndkyhscqftadliamhntdfiitstfqiagskdtvg	492
Peptid		-----	
SuSyGos	493	qyeshtaftlpglyrvvhgidvfdpkfnivspgadmisyfpyteekrllksfhpeieellysdvenkehlcvlkdrnkpiif	574
SuSyCit	493	qyeshtaftlpglyrvvhgidvfdpkfnivspgadmisyfpyteekrllksfhpeieellysdvenkehlcvlkdrnkpiif	574
Peptid		-----	
SuSyGos	575	tmarldrvcnltglvewygnaknlrelvnlvvvggdrkkeskdlleaemkmyslidqyknngqfrwissqmnrvrngely	656
SuSyCit	575	tmarldrvcnltglvewygnaknlrelvnlvvvggdrkkeskdlleaemkmyslidqyknngqfrwissqmnrvrngely	656
Peptid		-----	
SuSyGos	657	rylcdtkgafvqpalveafglvtveamtcglptfatckgppaeiivngksygidpyhgeqaaeilvdfekckadpsywdk	738
SuSyCit	657	rylcdtkgafvqpalveafglvtveamtcglptfatckgppaeiivngksygidpyhgeqaaeilvdfekckadpsywdk	738
Peptid		-----	
SuSyGos	739	islgglkrieekytwkiysqrlltltgvvgfkwkhsnldrlesrylemfyal kyrklaesvplave-----	805
SuSyCit	739	islgglkrieekytwkiysqrlltltgvvgfkwkhsnldrlesrylemfyal kyrklaesvplave-----	805

Abb.: 4.38.: Sequenzalignment der Sucrose Synthase (SuSy) aus *Gossypium hirsutum* (Gos; accession no. AAD095 68) und *Citrus unshiu* (Cit; accession no. BAA890 49) mit den Peptidsequenzstücken aus *L. album* Linie PT Bande 3; Die Lage der Peptide ist farbig markiert.

Die Peptidsequenzen des Proteins der Bande 4 (SLLDSGVGFTK, QNLSNSSDALSR, VDSDDLPLNLSR) wiesen nach Blastp-Suche auf ein Hitzeschock-Protein (HSP90, 82 oder 83) hin. Der Sequenzvergleich der HSP82 aus *Arabidopsis thaliana* und eines HSP-Proteins aus *Hevea brasiliensis* mit den erhaltenen Peptiden macht dies deutlich (Abb. 4.39.).

Peptid	2	-----qnlnssdsalr-----	
HSArath	1	madvqadaetfafqaeinqslsiintfysnkeiflreilssdsadkirkfesltdkskldagpelfirlvdpkanktlls	82
HSHevbr	1	----madaetfafqaeinqslsiintfysnkeiflreilssdsadkirkfesltdkskldaqpelfirlvdpkanktlls	77
Peptid	1	-----slldsvgvftk-----	
HSArath	83	iidsigimtkadlvnmlgtiarsgtkefmealqagadvsmigqfvgvfyysaylvaekvvvttkhnddeqyiwesqaggsftv	164
HSHevbr	78	iidsigimtkadlvnmlgtiarsgtkefmealqagadvsmigqfvgvfyysaylvaekvvttkhnddeqyiwesqaggsftv	159
Peptid		-----	
HSArath	165	trdvdgeplgrgtkislflkddqleyleerlkdvlkvhsefisyypilwtektekeisddededepkkenegeveevdee	246
HSHevbr	160	trdvngdqplgrgtkitlflkedqleyleerlkdvlkvhsefisyypilwtektekeisdded-depkkeegdvveevdee	240
Peptid		-----	
HSArath	247	kekdgkkkkkikevshewelinkgkpiwlrkpeeitkeesaafyksltnwedhlavkhfsveggqlefkailfvkrapfdl	328
HSHevbr	241	ketk-skkkkikevshewelinkgkpiwlrkpeeitkeesaafyksltnwedhlavkhfsveggqlefkailfvkrapfdl	321
Peptid		-----	
HSArath	329	fdtrkklmnklyvrrvfimdnceelipeylsfvkgvvdaddiplnlsbetlqqnkilkvirknlvkkciemfneiaenked	410
HSHevbr	322	fdtrkkmnsniklyvrrvfimdnceelipeylsfvkgvvdaddiplnlsbetlqqnkilkvirknlvkkciemfneiaenked	403
Peptid		-----	
HSArath	411	ytkfyeafsknlklghedsqnrakiadllryhstksqdemtsfkdyvtrmkegqkdifyitgeskkavenspflerlkkrq	492
HSHevbr	404	ynkfyeafsknlklghedsqnrakladllryhstksqdemtslkdyvtrmkegqkdiyyitgeskkavenspflerlkkrq	485
Peptid		-----	
HSArath	493	yevlymndaideyavqgkkyedgkklvsatkeglkledeteekkkreekkksfenlcktikeilgdkvkvvsvdrivdsp	574
HSHevbr	486	yevlfmndaideyavqgkkyedgkklvsatkeglkldeteekkkreekkksfenlcktikidilgdkvkvvsvdrivdsp	567
Peptid		-----	
HSArath	575	cclvtgeygtwanmerimkaqalrdssmgymskkktmeinpndngimeelrkraeadkndksvkdvlmllyetalltsgfsl	657
HSHevbr	568	cclvtgeygtwanmerimkaqalrdssmgymskkktmeinpndviveelrkraeadkndksvkdvlmllyetalltsgfsl	649
Peptid		-----	
HSArath	658	depntfaarihmlklglslidedenveedgdpelpeledaaeeskmeevd 705	
HSHevbr	650	dpntfsarihmlklglsliddetaggddadmpaleedgaeeskmeevd 698	

Abb.: 4.39.: Sequenzalignment des HSP82-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (HS Arath, accession no. AAA328 22) und des HSP-Proteins aus *Hevea brasiliensis* (HS Hevbr; accession no. AAQ085 97) mit den Peptidsequenzstücken aus *L. album* Linie PT Bande 4; Die Lage der Peptide ist farbig markiert.

Die Blastp-Suche der einzelnen Peptidsequenzen der Proteinbanden 10 und 13 lieferte hingegen keinen Hinweis auf ein einheitliches spezifisches Protein. Für Bande 10 Peptid 5 (YFALSAE YSFLLNK) und 6 (SSPATLTAGHR) konnte einmalig der Hinweis auf eine putative Peroxidase aus *Oryza sativa*, ein putatives CYP ebenfalls aus *Oryza sativa* und eine Dioxygenase aus *Pisum sativum* gefunden werden (Tab. 4.8., farbig markiert).

4.5.3.3. 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von mikrosomalen Proteinen

Zusätzlich zur vergleichenden Mikrosomenanalyse mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die mikrosomalen Proteine der Linien 6M und PT mittels Blue-Native/SDS-Gelelektrophorese analysiert. Proteine und Protein-Komplexe wurden zunächst mit nichtionischen Detergenzien (Triton X100 und Digitonin; 3.6.3.4.) solubilisiert, durch Zugabe des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau negativ geladen und in einem nicht denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt (Abb. 4.40. a)). In Kombination mit der folgenden SDS-Gelelektrophorese wurden die zuvor getrennten Proteine weiter separiert (Abb. 4.40. b)).

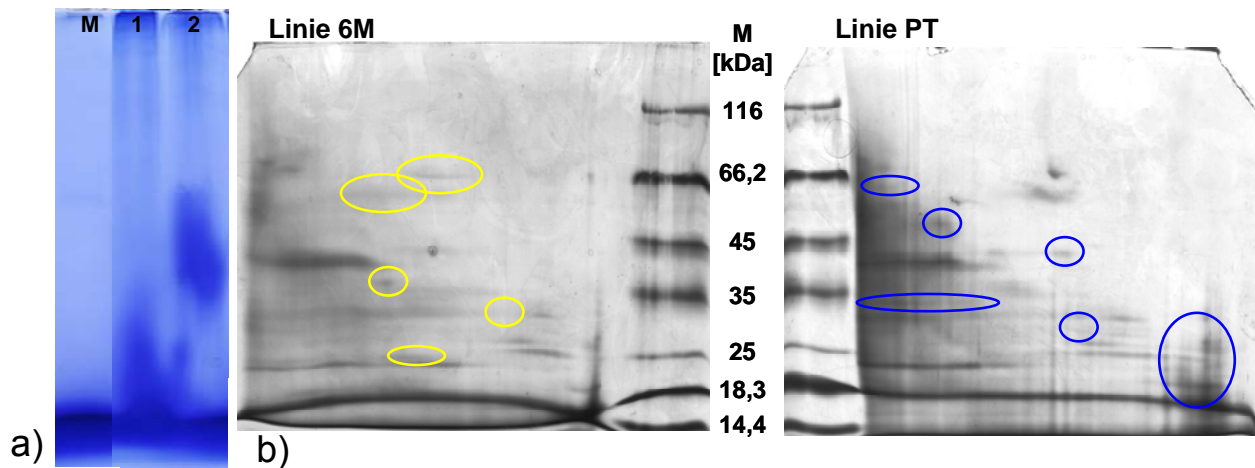


Abb. 4.40.: a) Blue-Native-Gel (15,8 %) mit mikrosomalen Proteinfractionen der Linien 6M und PT und b) Silbernitrat gefärbte SDS-Gele (10 %); Blue-Native-Gel: M - Größenmarker (BSA, 66,2 kDa), Spur 1 - Mikrosomen Linie 6M (86 µg), Spur 2 - Mikrosomen Linie PT (86 µg); Die Spuren 1 und 2 des Blue-Native-Gels wurden aus dem Gesamt-Gel herausgetrennt und in der 2. Dimension analysiert, die Unterschiede wurden markiert.

Der Vergleich der mikrosomalen Proteinfractionen beider Zelllinien lässt einige Unterschiede erkennen, die in Abb. 4.40. markiert wurden. Allerdings sind nur einige wenige Spots als solche identifizierbar. Der größte Teil der Proteine ist als eine Art „Schmier“ über die gesamte Gelbreite verteilt erkennbar.

4.5.4. Molekularbiologie

Die Unterschiede der Genexpression beider Zelllinien sollten auch molekularbiologisch genutzt werden. Mit Hilfe der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) nach Diatchenko et al. (1996) sollten die Genexpressionsprofile der beiden Zelllinien vergleichend untersucht werden.

Diese Methode ermöglicht die Amplifikation von differentiell exprimierten cDNA Fragmenten bei gleichzeitiger Unterdrückung von nicht Differentiellen. Bei der vergleichenden Charakterisierung der *L. album* Zelllinien 6M und PT konnte gezeigt werden (4.2.3.), dass enzymatische Unterschiede in der DOP6H Aktivität bestehen. Die Idee bei der Verwendung dieser Methode bestand darin, mögliche cDNA-Sequenzen zu finden, die für Proteine kodieren, die am Sekundärstoffwechsel bzw. der Lignanbiosynthese von *L. album* beteiligt sind.

4.5.4.1. Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)

Außer der DOP6H ist die C4H das einzige CYP-Enzym, welches ebenfalls in Zellkulturen von *L. album* biochemisch detektiert werden konnte (4.2.3.2.). Da bereits einige C4Hs aus anderen Pflanzen sowohl biochemisch, als auch auf Sequenzebene bekannt sind, diente ein Alignment ihrer Sequenzen als Template für das Design von degenerierten Primern. Anhand dieser (zusammen mit passenden nested Primern) gelang es mittels einer Touchdown-PCR Methode (3.7.5.) eine cDNA Sequenz zu amplifizieren. Der Sequenzvergleich über die NCBI-BLAST Datenbank (3.7.12.) ergab eine hohe Übereinstimmung mit anderen C4H Sequenzen (Tab. 4.10.).

Tab. 4.10.: Ergebnisse des C4H Sequenzvergleichs mit der NCBI-Blast Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
<i>Populus kitakamiensis</i>	cinnamic acid 4-hydroxylase	BAA11578	89%	94%
<i>Citrus sinensis</i>	cinnamate 4-hydroxylase	AAF66066	86%	92%
<i>Gossypium arboreum</i>	cinnamate-4-hydroxylase	AAG10196	86%	92%
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	cinnamic acid 4-hydroxylase	BAB71716	85%	91%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	cinnamate-4-hydroxylase	AAB58356	85%	92%
<i>Glycine max</i>	cinnamic acid 4-hydroxylase	CAA63172	84%	92%
<i>Pisum sativum</i>	trans-cinnamic acid hydroxylase	AAG09205	84%	93%
<i>Catharanthus roseus</i>	cinnamate 4-hydroxylase	CAA83552	85%	91%
<i>Capsicum annuum</i>	cinnamic acid 4-hydroxylase	AAC35857	84%	90%
<i>Ammi majus</i>	cinnamate 4-hydroxylase	AAO62904	82%	90%

Die gewonnene Sequenz wurde von A. Korczak (2006) verwendet, um eine *L. album* cDNA Bank der Linie 6M nach der Vollängensequenz zu durchsuchen. Dieses Experiment verlief erfolgreich, so dass nun die erste vollständige C4H cDNA Sequenz aus *L. album* vorliegt (Vollängensequenz siehe Diplomarbeit von A. Korczak, 2006). Die Klonierung der C4H sollte, im Falle eines „positiven Hydroxylase-Fundes“ bei der SSH Methode als Kontrolle bei einer Überexpression in Hefe dienen.

4.5.4.2. Aktin

Für die Macroarray Experimente wurde eine Kontrolle zur Normierung benötigt. Dabei wurde Aktin gewählt, welches in allen Zellen exprimiert wird. Als Template für das Design von degenerierten Primern wurde eine Aktin Sequenz aus *L. usitatissimum* verwendet. Anhand dieser Primer (zusammen mit passenden nested Primern) gelang es mittels einer „einfachen“-PCR Methode (3.7.5.) eine cDNA Sequenz aus *L. album* der Linie 6M zu amplifizieren (10.10.). Der Sequenzvergleich über die NCBI-Blast Datenbank (3.7.12.) ergab Übereinstimmung mit anderen Aktin Sequenzen (Tab. 4.11.).

Tab. 4.11.: Ergebnisse des Aktin Sequenzvergleichs mit der NCBI-Blast Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit

Name der Pflanze	Enzym	NCBI accession no.	SI	SÄ
<i>Malva pusilla</i>	Aktin	AAD41039	100%	100%
<i>Gossypium hirsutum</i>	Aktin	AAP73457	100%	100%
<i>Linum usitatissimum</i>	Aktin	AAW34192	99%	100%
<i>Helianthus annuus</i>	Aktin	AAF82805	99%	100%
<i>Cucumis sativus</i>	Aktin	AAZ74666	99%	100%
<i>Ricinus communis</i>	Aktin	AAR15174	99%	99%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aktin	NP_196543	99%	99%
<i>Pyrus communis</i>	Aktin	BAD90938	98%	100%
<i>Isatis tinctoria</i>	Aktin	AAW63030	98%	99%
<i>Glycine max</i>	Aktin	AAB40078	98%	99%

4.5.4.3. Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)

Die SSH Methode wurde mittels Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit mit vorangehendem BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (3.7.10). Der Hersteller schlägt verschiedene Kontrollen vor, um die Richtigkeit einzelner Schritte zu überprüfen. So diente die Analyse auf Adapterligation der Überprüfung, ob die Adapter 1 und 2 an die Enden der cDNA Fragmente ligiert wurden. Die Ligation wurde mit einer „einfachen“-PCR analysiert, die sich aus verschiedenen Primerkombinationen zusammensetzte (3.7.5., Tab. 3.20.; Tab. 4.12.). Für die Kontroll-cDNA (Skelettmuskel cDNA, Humane Placenta RNA) wurde die Primerkombination des G3PDH 3' (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) und PCR 1 Primers verwendet. Die Primerkombination aus G3PDH 3' und PCR 1 Primer ergab ein cDNA Stück der Größe 750 bp und die Kombination aus G3PDH 3' und 5' ein cDNA Stück der Größe von etwa 400 bp, was dem erwarteten Resultat (laut Hersteller) entspricht.

Die Adapterligationskontrolle für die Linien 6M und PT wurde mit einer PCR auf das Genstück der Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (PLR; accession no. CAH60857) durchgeführt. Dieses Gen wurde aufgrund von Vorexperimenten von A. Sandermann (2003) ausgewählt. Mittels Northern Analysen und Hybridisierung mit einer PLR-UTR Sonde konnte er zeigen, dass das PLR-Gen differentiell in den *L. album* Suspensionskulturen 6M und PT exprimiert wird. Dabei zeigte sich, dass in Linie PT die PLR in stärkerem Maße exprimiert wird als in Linie 6M. Die Adapterligationskontrolle für die Linien 6M und PT lieferte für die durchgeführte PLR-PCR bei Verwendung der Primerkombinationen 5' und 3' LAPLRI ein cDNA Stück von etwa 1000 bp (Abb. 4.41. Spuren 3, 5, 7 und 9) und bei Verwendung der Primerkombination 3' LAPLRI und PCR 1 Primer ein cDNA Stück von 400 bp (Abb. 4.41. Spuren 2, 4, 6 und 8). Es wurde aber erwartet, dass das cDNA Stück der PCR mit der Primerkombination 3' LAPLRI und PCR 1 > 1000 bp ist.

Rücksprache mit der Firma BD Biosciences ergab, dass die nicht erwartete DNA-Bandengröße von etwa 400 bp kein Indikator für den Fehlschlag der Adaptorligation sei. Zur Sicherheit wurde ein weiteres Kontrollexperiment nach Rebrikov (2003) durchgeführt. Dabei wurde anstelle einer Primerkombination nur der PCR 1 Primer zu den PCR Reaktionen zugegeben. Das Ergebnis zeigte einen „Schmier“ vieler verschiedener cDNAs. Nach dieser zusätzlichen Bestätigung, wurde mit der ersten und zweiten Hybridisierung, sowie der PCR Amplifikation fortgefahren.

Zusätzlich zu der Adapterligationskontrolle wurde von BD Biosciences eine Kontrolle zur Subtraktions-effizienz vorgeschlagen. Für die Kontroll-cDNA (Skelettmuskel cDNA, Humane Placenta RNA) wurde erneut das erwartete Resultat (laut Hersteller) gefunden. Während die semiquantitative PLR-PCR mit den LAPLRI Primern 3' und 5' in den subtrahierten cDNA Banken der Linien 6M und PT keine Banden ergab, konnte in der unsubtrahierten Tester Kontrolle 2c (Abb. 3.3., Linie PT) eine PLR cDNA Bande mit zunehmender Stärke gefunden werden.

Dies deutete darauf hin, dass die SSH Methode erfolgreich durchgeführt wurde. Das PLR-Genstück konnte nur in der unsubtrahierten cDNA Bank der Linie PT nachgewiesen werden, während nach Subtraktion mit der cDNA Bank der Linie 6M keine Amplifikation mehr möglich war.

Tab. 4.12.: Primerkombination der PCR Analyse auf Adapterligation; Ergebnisse sind in Abb. 4.41. dargestellt.

cDNA Template (Ansatz)	Primer 1	Primer 2	Abb. 4.41. Bande
1-1	3' LAPLRI	PCR 1	2
1-1	3' LAPLRI	5' LAPLR	3
1-2	3' LAPLRI	PCR 1	4
1-2	3' LAPLRI	5' LAPLR	5
2-1	3' LAPLRI	PCR 1	6
2-1	3' LAPLRI	5' LAPLR	7
2-2	3' LAPLRI	PCR 1	8
2-2	3' LAPLRI	5' LAPLR	9

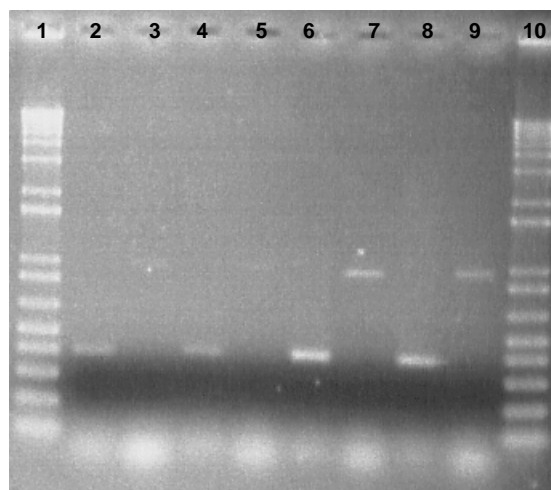


Abb. 4.41.: PCR Analyse auf Adapterligation; Spuren 1 und 10 enthalten 1 kb⁺-Marker (Invitrogen); Auftrag der Spuren 2 - 9 siehe Tab. 4.12.

Die erhaltenen subtrahierten cDNA-Banken wurden schließlich in den pGEMT[®]-T Vektor (Promega) ligiert und in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (3.7.6.). Von diesen transformierten Bakterien wurden insgesamt 671 Klone mit differentiellen SSH cDNA Fragmenten der Linie 6M und 563 Klone mit differentiellen SSH cDNA Fragmenten der Linie PT gepickt und amplifiziert.

4.5.4.4. Macroarray Experimente

Der Prozentsatz an Klonen in der subtrahierten cDNA Bank, welche tatsächlich für differentiell exprimierte mRNAs kodieren, variiert zwischen 5 - 95 % (Diatchenko et al., 1996; 1998; Gurskaya et al., 1996). Aus diesem Grund erfolgte die Verifizierung der differentiellen Gene der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung mittels Macroarray-Analyse nach Rebrikov (2003; 3.7.11.).

In einem Vorversuch wurden zunächst je 95 Klone mit SSH cDNA Fragmenten der Linien 6M und PT amplifiziert und mittels DOT-Blotting auf Nylon-Membran aufgebracht. Diese cDNA Fragmente wurden im Anschluss mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Dabei wurde je ein DOT-Blot mit SSH cDNA Fragmenten der Linien 6M bzw. PT mit unsubtrahierten $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP sscDNA Fragmenten der Linien 6M bzw. PT hybridisiert. Das Ergebnis dieser Autoradiographie ist in Abb. 4.42. dargestellt.

Insgesamt wurden von 95 cDNA Fragmenten der Linie 6M acht überexprimierte und fünf subtrahierte cDNAs gefunden, wohingegen von Linie PT 23 überexprimierte und zwei subtrahierte Fragmente gefunden wurden. Dies würde einem Prozentsatz von 13,6 (Linie 6M) bzw. 26,3 (Linie PT) an möglichen differentiell exprimierten cDNA Fragmenten entsprechen.

Die überexprimierten und subtrahierten cDNAs wurden sequenziert und ein Sequenzvergleich über die NCBI-Blast Datenbank durchgeführt (3.7.12.). Die Ergebnisse sind in Tab. 4.13. dargestellt. Dabei kamen einige Sequenzen mehrfach vor (gelb markiert), darunter aus den Linien 6M und PT eine putative Catalase.

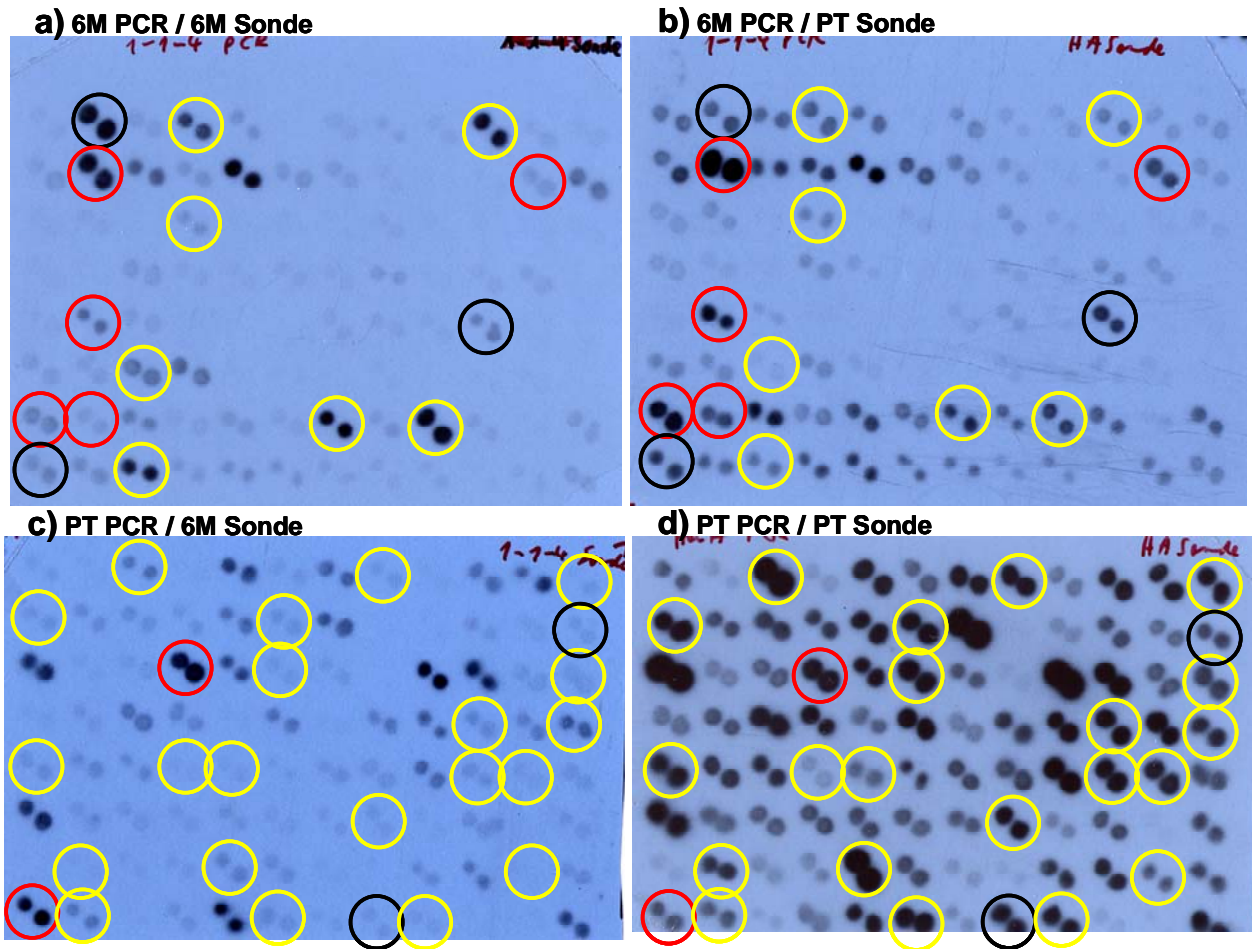


Abb. 4.42.: Exemplarisches Beispiel eines DOT-Blots der SSH cDNA Fragmente der Linien 6M und PT nach Hybridisierung mit den 6M bzw. PT Sonden; Dargestellt sind die Hybridisierungsergebnisse der SSH cDNA Fragmente der Linie 6M, hybridisiert mit der sscDNA Sonde der Linie 6M (a)). Diese wurden verglichen mit den Hybridisierungsergebnissen der SSH cDNA Fragmente der Linie 6M, hybridisiert mit der sscDNA Sonde der Linie PT (b)) und umgekehrt (c) und d)). Legende der Farbkreise: gelb - überexprimierte cDNAs, rot - subtrahierte cDNAs und schwarz - erhaltenes Ergebnis nicht glaubhaft*; Zur Normalisierung wurde an den Positionen 96 jeweils Aktin cDNA aufgetragen.

* Schwarz umrandete cDNA Fragmente kennzeichnen überexprimierte oder subtrahierte cDNA-Fragmente, die vermutlich aufgrund von Verunreinigungen zustande kamen. Die cDNA Fragmente wurden vor dem Aufbringen auf die Membran mittels PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese analysiert (3.7.5. Tab. 3.18. SSH). Dabei wurden für diese markierten Fragmente entweder keine oder mehrere Banden gefunden. Aus diesem Grund kann keine eindeutige Auswertung erfolgen.

Um diese Sequenz bei den Folgeexperimenten ausschließen zu können, wurden die weiteren DOT-Blots nach Hybridisierung mit der jeweiligen spezifischen 6M bzw. PT Sonde ein zweites Mal hybridisiert. DOT-Blot Membranen mit SSH cDNA Fragmenten der Linie 6M wurden dabei mit der Sonde pKF03KPA0G07088 und SSH cDNA Fragmente der Linie PT mit der Sonde pKF04KPB0H09110 behandelt (Tab. 4.13. rot markiert). Das Ergebnis dieser zweifachen Hybridisierung waren 93 SSH cDNA Sequenzen der Linie 6M und 136 der Linie PT, die sich als vermeintlich differentiell herausstellten (Tabelle 4.14.). Die Ergebnisse der Sequenzanalysen mit folgender NCBI-Blastx Datenbanksuche sind aus den Tab. 4.15. - Tab. 4.18. zu entnehmen.

Tab. 4.13.: Ergebnisse der überexprimierten und subtrahierten cDNAs nach Blastx-Suche

Die Bezeichnung pKF03 steht für SSH cDNA Sequenzen der Linie 6M, pKF04 für SSH cDNA Sequenzen der Linie PT. E-value - Signifikanz des Suchergebnisses in der Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit; * bei mehrfach vorkommenden Sequenzen beziehen sich die gezeigten Blastx-Ergebnisse auf die jeweils erstgenannte Sequenz.

Klon-bezeichnung	cDNA Fragment-größe [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis				
				Enzym	NCBI accession no.	E-value	SI	SÄ
pKF03KPA0A02003*	769	überexprimiert	<i>Zea mays</i>	Catalase	A55092	4e-09	100%	100%
pKF03KPA0A10012	681		<i>Oryza sativa</i>	OSJNBb0048E02.12	CAD40936	7e-08	25%	48%
pKF03KPA0F03072	681		<i>Zea mays</i>	Bet v I allergen	AAV28626	3e-06	25%	52%
pKF03KPA0G07088	817		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pathogenesis-related protein	NP_173813	1e-04	32%	50%
pKF03KPA0G09090	817			Bet v I family				
pKF03KPA0H03097	649		<i>Arabidopsis thaliana</i>	pollen allergen-like protein	AAM65899	2e-04	30%	50%
pKF03KPA0A04005	834	überexprimiert		unknown		> 0		
pKF03KPA0B02017	852	subtrahiert		unknown		> 0		
pKF03KPA0B11032	320	subtrahiert	<i>Populus trichocarpa</i>	malic enzyme	CAA39690	8e-22	80%	91%
			<i>Vitis vinifera</i>	NADP-dependent malic enzyme	P51615	8e-22	83%	94%
pKF03KPA0E02059	817	subtrahiert	<i>Gossypium hirsutum</i>	non-symbiotic hemoglobin protein	AAx86687	6e-67	87%	93%
			<i>Medicago sativa</i>	non-symbiotic hemoglobin protein	AAG29748	9e-66	86%	91%
			<i>Lotus japonicus</i>	non-symbiotic hemoglobin protein	BAE46739	2e-65	84%	93%
pKF03KPA0G01082	748	subtrahiert	<i>Citrus x paradisi</i>	Inositol-3-phosphate synthase	CAA83565	1e-10	48%	68%
			<i>Nicotiana paniculata</i>	Inositol-3-phosphate synthase	Q9SSV4	5e-10	48%	68%
			<i>Nicotiana tabacum</i>	Inositol-3-phosphate synthase	Q9LW96	6e-10	46%	67%
pKF03KPA0G02083	437	subtrahiert	<i>Cicer arietinum</i>	putative reverse transcriptase	CAD59768	4e-12	100%	100%
			<i>Campylobacter jejuni</i>	catalase	CAA59444	3e-09	96%	96%
			<i>Zea mays</i>	catalase	A55092	4e-08	100%	100%
pKF03KPA0H01095	817	subtrahiert	<i>Nicotiana attenuata</i>	xyloglucan endo-transglycosylase	AAR37363	4e-06	47%	69%
			<i>Capsicum annuum</i>	xyloglucan endotransglucosylase	ABD96609	4e-05	45%	67%
			<i>Solanum tuberosum</i>	putative xyloglucan endotransglycosylase precursor	CAJ77496	4e-05	45%	67%
pKF04KPB0A08014*	754	überexprimiert	<i>Zea mays</i>	catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2	A55092	2e-07	100%	100%
pKF04KPB0A12025	758		<i>Spinacia oleracea</i>	TFIIB-related protein	CAC82715	> 0	29%	39%
pKF04KPB0B01026	721							
pKF04KPB0B06035	818							
pKF04KPB0D10063	818							
pKF04KPB0E01066	818							
pKF04KPB0E10075	819							
pKF04KPB0E11076	817							
pKF04KPB0G02091	817							
pKF04KPB0H06107	817							
pKF04KPB0H09110	821							
pKF04KPB0A03003*	652		überexprimiert	<i>Capsicum chinense</i>	arachidonic acid-induced DEA1	CAI51313	1e-24	80%
pKF04KPB0F08085	665		<i>Lycopersicon esculentum</i>	arachidonic acid-induced DEA1	AAS80139	3e-24	56%	62%
pKF04KPB0G05094	809		<i>Nicotiana tabacum</i>	P-rich protein NTEIG-C29	BAB16431	6e-24	55%	62%
pKF04KPB0B12041	677	überexprimiert	<i>Oryza sativa</i>	unnamed protein product	NP_913385	2e-17	61%	76%
			<i>Microplitis demolitor bracovirus</i>	hypothetical protein 3	YP_239367	5e-09	78%	78%
pKF04KPB0C04045*	817	subtrahiert		unknown		> 0		
pKF04KPB0H01102	295							
pKF04KPB0C12053*	456	überexprimiert		unknown		> 0		
pKF04KPB0D11064	819							
pKF04KPB0E05070	602							
pKF04KPB0E04069	666	überexprimiert	<i>Zea mays</i>	triosephosphate isomerase 1	AAB81110	5e-79	85%	94%
			<i>Petunia x hybrida</i>	triosephosphate isomerase	CAA58230	9e-79	85%	94%
			<i>Solanum chacoense</i>	triose phosphate isomerase cytosolic isoform	AAR11379	2e-78	85%	95%
pKF04KPB0H02103	608	überexprimiert	<i>Solanum tuberosum</i>	ubiquitin carrier-like protein	ABB02644	1e-70	98%	99%
			<i>Gossypium raimondii</i>	ubiquitin conjugating enzyme E2	AAL99225	1e-70	98%	99%
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	ubiquitin conjugating enzyme	NP_567791	1e-70	98%	99%

Tab. 4.14.: Übersicht über die möglichen differentiellen cDNAs des zweiten Macroarray-Experimentes der Linien 6M und PT; Die DOT-Blots wurden nach Hybridisierung mit der jeweiligen spezifischen 6M bzw. PT Sonde ein zweites Mal mit den Sonden pKF03KPA0G07088 (Linie 6M) bzw. pKF04KPB0H09110 (Linie PT) hybridisiert.

Linie 6M	Anzahl	%
Gesamtanzahl gepickter Klone	576	100
überexprimierte cDNAs	147	25,5
subtrahierte cDNAs	18	3,1
Gesamtanzahl unterschiedlicher cDNAs	165	28,6
subtrahierte cDNAs nach II.Hyb.	74	12,8
überexprimierte cDNAs nach II.Hyb.	21	3,6
Gesamtanzahl differentieller cDNAs	93	16,1

Linie PT	Anzahl	%
Gesamtanzahl gepickter Klone	468	100
überexprimierte cDNAs	148	31,6
subtrahierte cDNAs	10	2,1
Gesamtanzahl unterschiedlicher cDNAs	158	33,8
subtrahierte cDNAs nach II.Hyb.	117	25,0
überexprimierte cDNAs nach II.Hyb.	10	2,1
Gesamtanzahl differentieller cDNAs	127	27,1

Tab. 4.15.: Ergebnisse der überexprimierten cDNA Fragmente der Linie 6M nach Blastx-Suche

E-value - Signifikanz des Suchergebnisses in der Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit; farbig markierte Bereiche kennzeichnen mögliche interessante Klone; * bei mehrfach vorkommenden Sequenzen beziehen sich die gezeigten Blastx-Ergebnisse auf die jeweils erstgenannte Sequenz.

Klonbezeichnung	cDNA Fragmentgröße [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis					
				Enzym	NCBI accession no.	E-value	SI	SÄ	
pKF03P01D10, P01E04, P01G03, P01G06, P02C03, P02D07, P02E08, P02F09, P02G01, P02G10, P03C03, P03D06, P03E03, P03E06, P03F11, P03G02, P03G03, P03G09, P03H04, P03H08, P04A06, P04A07, P04B05, P04C01, P04C02, P04D07, P04E08, P04F11, P04H10, P05B04, P05C09, P05D06, P05E11, P05G03, P05G11, P06A02, P06A04, P06C04, P06E08, P06G10, P06H09, P04D03, P04D06, P05G12, P01H10k3,4,7, P05H02k7	817, 817, 774, 818, 818, 816, 817, 685, 309, 816, 238, 237, 784, 774, 788, 775, 234, 781, 391, 837, 597, 775, 332, 886, 698, 733, 706,320, 775, 767, 775, 780, 704, 817, 818, 724, 234, 668, 816, 189, 494, 671, 269, 809, 816, 224	überexprimiert		unknown			> 0		
pKF03P01G10*, P01H08, P02H06, P02H07, P03A07, P04H07, P05A08, P5A11, P06A09, P06H12, P1H10k1	544, 770, 709, 767, 660, 600, 781, 653, 620, 818, 544	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Zea mays</i> <i>Zea mays</i>	Pathogenesis-related protein, Bet v I family Bet v I allergen pathogenesis-related protein 2	XP_472791 AAV28626 ABF81693	5e-07 1e-05 3e-05	26% 25% 24%	53% 52% 52%	
pKF03P03C11*, P05D08, P06C02, P06C03, P06D01	759, 712, 752, 753, 714	überexprimiert	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> <i>Antirrhinum majus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	YABBY transcription factor, DM51 YABBY-like transcription factor GRAMINIFOLIA AFO (ABNORMAL FLORAL ORGANS); transcription factor	AAO22990 AAS10177 NP_566037	5e-30 1e-28 1e-27	73% 71% 69%	77% 75% 79%	
pKF03P01F05*, P05G10	412, 414	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	putative coatomer protein complex, subunit beta 2 putative coatomer protein complex, subunit beta 2 protein transporter	BAD68397 AAG52258 NP_175645	8e-28 8e-27 8e-27	55% 56% 56%	76% 75% 74%	
pKF03P02C01*, P05E05	713, 415	überexprimiert	<i>Ananas comosus</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	PVR3-like protein (Alpha Amylase Inhibitor, Lipid Transfer and Seed Storage proteins) Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor unknown	AAM28295 ABE79318 AAM62457	9e-21 2e-17 6e-15	58% 58% 52%	69% 70% 63%	
pKF03P02F03*, P03A02	625, 812	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Mo-molybdopterin cofactor sulfurase molybdenum cofactor sulfurase protein -like molybdenum cofactor sulfurase	NP_174376 BAD46080 NP_199285	5e-70 1e-69 4e-23	65% 64% 38%	80% 80% 56%	
pKF03P01D06	547	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lilium longiflorum</i>	putative NEC1 unknown "orf"-MTN3/saliva family protein	XP_465111 NP_567366 BAA04837	5e-10 1e-7 7e-7	31% 34% 31%	47% 45% 46%	
pKF03P02B02	423	überexprimiert	<i>Fragaria x ananassa</i> <i>Malus x domestica</i> <i>Corylus avellana</i>	non-specific lipid transfer protein precursor lipid transfer protein precursor (Allergen Mal d 3) lipid transfer protein precursor	AAV83346 AAV64878 AAK28533	1e-12 6e-12 1e-11	73% 76% 76%	80% 85% 83%	
pKF03P04A10	813	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Solanum tuberosum</i>	putative protein EMB 1967 (forkhead-associated domain-containing protein) 40S ribosomal protein S10-like protein	CAB81800 NP_566998 ABB72819	1e-36 1e-36 3e-22	44% 44% 94%	62% 62% 98%	
pKF03P04D08k1	718	überexprimiert	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> <i>Zea mays</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-2 translational initiation factor eIF-4A Eukaryotic initiation factor 4A-8	P41379 AAB67607 P41381	1e-04 4e-04 4e-04	41% 40% 41%	55% 53% 52%	
pKF03P04E07	816	überexprimiert	<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> <i>Glycine max</i> <i>Sesamum indicum</i>	myo-inositol 1-phosphate synthase myo-inositol 1-phosphate synthase myo-inositol 1-phosphate synthase	ABF51620 AAK49896 AAG01148	1e-43 4e-43 6e-43	88% 88% 87%	96% 95% 95%	
pKF03P05F06	816	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	unknown protein expressed protein hypothetical protein	NP_563841 ABA98963 NP_919170	2e-33 4e-27 2e-23	66% 54% 61%	79% 74% 75%	
pKF03P05H02k3	793	überexprimiert	<i>Gossypium hirsutum</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Lotus japonicus</i>	non-symbiotic hemoglobin protein non-symbiotic hemoglobin nonsymbiotic hemoglobin	AAX86687 Q9FVL0 BAE46739	4e-68 6e-67 3e-66	88% 87% 84%	93% 91% 93%	
pKF03P06H08	570	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	unknown protein expressed protein hypothetical protein	NP_563841 ABA98963 NP_919170	2e40 5e-33 1e-29	66% 54% 55%	79% 72% 71%	

Tab. 4.16.: Ergebnisse der subtrahierten cDNA Fragmente der Linie 6M nach Blastx-Suche

E-value - Signifikanz des Suchergebnisses in der Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit; farbig markierte Bereiche kennzeichnen mögliche interessante Klone; * bei mehrfach vorkommenden Sequenzen beziehen sich die gezeigten Blastx-Ergebnisse auf die jeweils erstgenannte Sequenz.

Klonbezeichnung	cDNA Fragmentgröße [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis				
				Enzym	NCBI accession no.	E-value	SI	SÄ
pKF03P01C02, P01E05, P01E09, P01F07, P02A06, P03H03, P03H10, P06G08	777, 817, 653, 813, 811, 234, 269, 366	subtrahiert		unknown		> 0		
pKF03P01C07	476	subtrahiert	<i>Helianthus annuus</i> <i>Beta vulgaris (vulgaris)</i> <i>Daucus carota</i>	orfB ATPase subunit 8 orfB-F1	CAA57787 NP_064090 BAB16712	7e-32 1e-30 2e-30	84% 82% 80%	85% 86% 82%
pKF03P01F02	573	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	Predicted Na ⁺ -dependent transporter putative anion:sodium symporter Predicted Na ⁺ -dependent transporter	NP_850089 AAU03362 BAD68006	3e-89 7e-85 3e-84	94% 88% 87%	98% 96% 97%
pKF03P01G12k7	267	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lycopersicon chilense</i> <i>Capsicum annuum</i>	4-coumarate-CoA ligase-like protein putative 4-coumarate-CoA ligase putative acyl-CoA synthetase	AAM65672 AAW23965 AAL29212	3e-31 8e-31 2e-29	80% 82% 80%	94% 92% 92%
pKF03P02H12	583	subtrahiert	<i>Capsicum chinense</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>	arachidonic acid-induced DEA1 P-rich protein NtEIG-C29 arachidonic acid-induced DEA1	CAI51313 BAB16431 AAS80139	8e-28 8e-28 2e-27	59% 61% 62%	70% 70% 72%
pKF03P03B04	817	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein Nucleic acid-binding, OB-fold putative replication protein;	NP_568511 ABE80587 AAG52278	5e-10 4e-8 7e-8	34% 41% 30%	50% 62% 50%
pKF03P04H02	419	subtrahiert	<i>Capsicum annuum</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	hyom protein (Metal-binding; Ribonucleoprotein) ribosomal protein S27-like protein ribosomal protein S27	AAR83850 ABA40465 CAB71041	1e-43 4e-43 6e-43	95% 95% 93%	100% 100% 100%
pKF03P04H11	818	subtrahiert	<i>Curcubita maxima</i>	preproMP73 (Membrane protein, Protein-Storage Vacuoles)	BAB78478	9e-6	22%	41%
pKF03P05G01	712	subtrahiert	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> <i>Antirrhinum majus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	YABBY transcription factor CDM51 YABBY-like transcription factor GRAMINIFOLIA AFO (ABNORMAL FLORAL ORGANS); transcription factor	AAO22990 AAS10177 NP_566037	4e-30 9e-29 7e-28	74% 72% 69%	78% 76% 80%
pKF03P05H08	846	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	peptidase peptidase family-like protein	NP_176909 XP_477572	5e-118 2e-99	71% 59%	86% 75%
pKF03P06G05	759	subtrahiert	<i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica rapa</i>	Transcriptional factor B3 DNA binding / transcription factor reduced vernalization response 1	ABE81225 NP_180045 AAQ55453	8e-6 1e-5 4e-5	35% 32% 23%	47% 53% 47%

Tab. 4.17.: Ergebnisse der subtrahierten cDNA Fragmente der Linie PT nach Blastx-Suche

E-value - Signifikanz des Suchergebnisses in der Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit; farbig markierte Bereiche kennzeichnen mögliche interessante Klone; * bei mehrfach vorkommenden Sequenzen beziehen sich die gezeigten Blastx-Ergebnisse auf die jeweils erstgenannte Sequenz.

Klonbezeichnung	cDNA Fragmentgröße [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis				
				Enzym	NCBI accession no.	E-value	SI	SÄ
pKF04P04H07*, P03A01	573, 818	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica rapa</i> <i>Vitis berlandieri x Vitis rupestris</i>	PIP1C; water channel aquaporin putative aquaporin PIP1-3	NP_171668 AAB61378 AAF71819	1e-73 5e-73 1e-72	92% 91% 91%	96% 97% 95%
pKF04P01F07	460	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	protein binding / ubiquitin- protein ligase/ zinc ion binding Zinc finger, RING-type zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein-like	NP_566281 ABE87296 BAD45918	4e-47 4e-47 2e-45	64% 61% 42%	82% 80% 66%
pKF04P01G05	592	subtrahiert	<i>Vitis pseudoreticulata</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Gossypioideis kirkii</i>	pollen-specific protein pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein putative SAH7 protein (Pollen proteins Ole e I family)	ABC86745 NP_567338 AAM78189	6e-21 1e-20 7e-19	54% 50% 56%	68% 70% 73%
pKF04P02H01	772	subtrahiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Medicago truncatula</i>	EMB2279 (pentatricopeptide repeat-containing protein) pentatricopeptide repeat- containing protein-like Pentatricopeptide repeat	NP_174349 BAD73522 ABE85862	4e-59 1e-39 1e-17	53% 40% 27%	71% 63% 50%
pKF04P04A12	1429	subtrahiert		unknown		> 0		
pKF04P04G06	701	subtrahiert	<i>Platanus x acerifolia</i> <i>Lilium longiflorum</i> <i>Elaeis guineensis</i>	translation elongation factor 1 alpha elongation factor 1-alpha 1 elongation factor 1-alpha 1	CAL07988 AAD27590 AAT45847	7e-89 2e-88 6e-88	97% 96% 95%	99% 99% 100%
pKF04P04B09	817	subtrahiert	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> <i>Prunus avium</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	60S ribosomal protein L24 60S ribosomal protein L24 putative 60S ribosomal protein L24	P50888 Q9FUL4 BAD82702	1e-5 1e-5 3e-5	88% 88% 84%	88% 88% 88%

Tab. 4.18.: Ergebnisse der überexprimierten cDNA Fragmente der Linie PT nach Blastx-Suche

E-value - Signifikanz des Suchergebnisses in der Datenbank; SI - Sequenzidentität; SÄ - Sequenzähnlichkeit; farbig markierte Bereiche kennzeichnen mögliche interessante Klone; * bei mehrfach vorkommenden Sequenzen beziehen sich die gezeigten Blastx-Ergebnisse auf die jeweils erstgenannte Sequenz.

Klonbezeichnung	cDNA Fragmentgröße [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis				
				Enzym		E-value	SI	SÄ
pKF04P01A03*, P01B05, P01B08, P01B09, P01D11, P01E01, P01E08, P01G08, P01G09, P02A01, P02A03, P02A11, P02D02, P02D05, P02E01, P02E05, P02F12, P02H05, P03A03, P03C06, P03D04, P03D07, P03E02, P03E04, P03E05, P03F02, P02F03, P03F11, P03G09, P03H02, P03H07, P04B06, P04C03, P04C04, P04C05, P04D11, P04E07, P04E10, P04F02, P04G01, P04G02, P05A09, P05A10, P05B01, P05C06, P05D02	634, 661, 664, 666, 663, 664, 664, 666, 664, 655, 663, 664, 665, 1110, 663, 663, 665, 672, 655, 664, 664, 665, 665, 663, 665, 664, 662, 664, 665, 554, 667, 666, 664, 394, 555, 664, 664, 667, 471, 664, 665, 819, 817, 822, 818, 744,	überexprimiert	<i>Capsicum chinense</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	arachidonic acid-induced DEA1 arachidonic acid-induced DEA1 P-rich protein NtEIG-C29	CAI51313 AAS80139 BAB16431	4e-26 9e-26 2e-25	57% 58% 57%	65% 63% 63%
pKF04P01A11, P01H06, P02A05, P02B01, P02C01, P02C03, P02C05, P02C06, P02C07, P02D07, P02E11, P02E12, P02F09, P02G02, P02G04, P02G07, P02G10, P02G12, P02H02, P02H04, P03A06, P03A07, P03A10, P03B02, P03C02, P03C04, P03G10, P04A02, P04D02, P04E09, P04H02, P04H04, P04H12	816, 815, 223, 961, 800, 722, 818, 865, 534, 1388, 894, 821, 816, 1158, 1033, 1076, 816, 817, 346, 815, 807, 778, 412, 528, 558, 816, 272, 817, 815, 757, 759, 817, 810	überexprimiert		unknown		> 0		
pKF04P02H12*, P04D05, P04D06	374, 390, 385	überexprimiert	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	monodehydroascorbate reductase monodehydroascorbate reductase putative monodehydroascorbate reductase	CAC82727 Q43497 BAD46251	1e-29 1e-29 1e-27	86% 93% 90%	93% 95% 92%
pKF04P04B01*, P04C01	608, 608	überexprimiert	<i>Ricinus communis</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	lipase triacylglycerol/steryl ester lipase-like protein unnamed protein product	AA17358 AAR29056 BAD43470	4e-64 1e-50 4e-50	65% 71% 73%	78% 85% 82%
pKF04P01E06	815	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Cryptomeria japonica</i>	RNA binding / ribonuclease III hypothetical protein similarity to ribonuclease III	NP_173854 XP_470451 BAE92294	4e-39 2e-24 5e-18	55% 44% 39%	73% 61% 62%
pKF04P02C10	817	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	hypothetical protein HMG-I and HMG-Y, DNA-binding; Putative plant transposon protein; putative far-red impaired response protein	BAD29327 ABE87448 XP_470754	8e-1 1e-10 2e-10	22% 20% 26%	43% 44% 45%
pKF04P02D10	818	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown protein	NP_189519	9e-4	23%	39%
pKF04P02D11	808	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	unknown protein F10A5.28 (Integral membrane protein DUF6) putative MnN21	NP_565111 AAF87121 XP_483787	8e-5 8e-5 8e-4	54% 54% 52%	66% 66% 61%
pKF04P02E07	762	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Tetrahymena thermophila SB210</i>	unknown protein putative nucleolar essential protein Suppressor Mra1 family protein	AAM65530 XP_465024 EAR92747	4e-17 2e-13 4e-10	67% 58% 53%	79% 72% 68%
pKF04P02F04	817	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa (japonica)</i>	putative RING3 protein unnamed protein product putative bromodomain-containing protein	XP_478318 BAA97526 XP_479904	1e-8 1e-7 1e-5	37% 33% 32%	58% 54% 49%
pKF04P02F08	426	überexprimiert	<i>Eucalyptus globulus (globulus)</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	pectin acetyltransferase pectin acetyltransferase putative pectinacetyltransferase	ABG34280 ABD33181 AAM20385	1e-54 2e-52 1e-50	70% 65% 62%	84% 84% 81%
pKF04P02G06	687	überexprimiert	<i>Oryza sativa (japonica)</i> <i>Thlaspi arvense</i> <i>Arabidopsis halleri subsp. halleri</i>	putative zinc transporter heavy metal transporter MTP1 zinc transporter CDF1-3	AAU10745 AAR83906 CAD89013	1e-25 2e-25 4e-25	44% 45% 45%	65% 70% 69%
pKF04P02H07	701	überexprimiert	<i>Medicago truncatula</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	DNA-binding SAP; Zinc finger, MIZ-type putative protein	ABE89544 BAD94301	9e-15 1e-13	64% 58%	79% 72%
pKF04P03B10	759	überexprimiert	<i>Macaca mulatta</i> <i>Gallus gallus</i>	PREDICTED: similar to nucleosomal binding protein 1 ring finger protein 20	XP_001103630 NP_001026605	5e-4 8e-4	48% 37%	60% 62%
pKF04P03E09	382	überexprimiert	<i>Nicotiana glauca</i> <i>Prunus persica</i> <i>Vicia faba</i>	plasma membrane H ⁺ -ATPase plasma membrane H ⁺ -ATPase plasma membrane H ⁺ -ATPase precursor	CAA47275 CAB69823 AAB35314	2e-50 3e-50 3e-50	80% 80% 84%	90% 88% 93%

Fortsetzung der Tab. 4.18.:

Klonbezeichnung	cDNA Fragmentgröße [bp]	SSH-Resultat	Name der Pflanze	Blastx-Ergebnis				
				Enzym		E-value	SI	SÄ
pKF04P04D12	815	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i>	catalytic/ metal ion binding metalloenzyme superfamily protein, expressed putative phosphopyruvate decarboxylase	NP_850651	1e-122	85%	92%
			<i>Oryza sativa (japonica)</i>		ABA98832	7e-117	81%	90%
			<i>Iris tectorum</i>		AAZ04780	3e-110	83%	93%
pKF04P04F01	771	überexprimiert	<i>Populus nigra</i>	extensin like protein	BAA11855	8e-6	31%	45%
pKF04P04G07	613	überexprimiert	<i>Arabidopsis thaliana</i>	lipid binding	NP_567392	4e-5	37%	46%
			<i>Oryza sativa (japonica)</i>	hypothetical protein	AAT69217	2e-45	53%	69%
			<i>Medicago truncatula</i>	expressed protein	ABF94647	1e-30	42%	60%
pKF04P03D08	816	überexprimiert	<i>Prunus armeniaca</i>	hairpin induced 1 protein	ABE93217	3e-13	28%	52%
			<i>Oryza sativa (japonica)</i>	ubiquitin-conjugating enzyme	AAB63513	3e-62	94%	95%
			<i>Populus x canadensis</i>	putative ubiquitin-conjugating enzyme	AAN74837	1e-61	92%	96%
pKF04P04A09	753	überexprimiert	<i>Nicotiana glauca</i>	nectarin IV	AAX81588	4e-64	70%	85%
			<i>Solanum tuberosum</i>	putative xyloglucanase inhibitor	AAP84703	2e-62	69%	83%
			<i>Lycopersicon esculentum</i>	xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	AAN87262	2e-61	68%	82%
pKF04P05D04k3	171	überexprimiert	<i>Euphorbia tirucalli</i>	beta-amyrin synthase	BAE43642	8e-10	66%	82%
			<i>Medicago truncatula</i>	Prenyltransferase/squalene oxidase	ABE91090	2e-9	67%	80%
			<i>Glycyrrhiza glabra</i>	beta-amyrin synthase	BAA89815	3e-9	67%	77%

Von insgesamt 671 untersuchten cDNAs der Linie 6M schienen 107 (16 %) differentiell exprimiert zu sein. Sieben dieser cDNA Sequenzen zeigten Sequenzähnlichkeit zu einer putativen ‚Catalase‘ (putative Bet v I allergen; Abb. 4.43.). Von den verbleibenden 100 Differentiellen ergaben 58 nach Blastx-Suche keine Zuordnung zu bekannten Sequenzen. Für den Primärstoffwechsel, Vesikeltransport, O₂-Speicherprozesse, die Translation und die Transkription kodieren 2 - 10 putative cDNA-Sequenzen, für den Aufbau der primären Zellwände und den Proteinabbau jeweils eine (Abb. 4.43.). Eine cDNA zeigte Sequenzähnlichkeit zu einem Hydroxymethyl-CoA-Ligase ‚like‘ Protein aus *Arabidopsis thaliana* (4CL; E.C. 6.2.1.12), einem Enzym des Phenylpropanstoffwechsels (Sequenz im Anhang 10.11.).

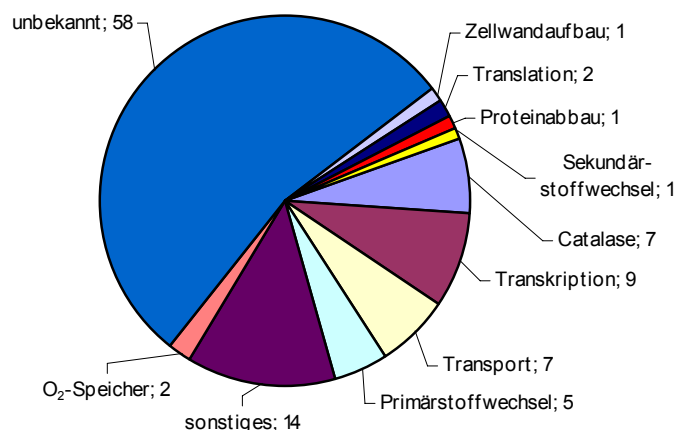


Abb. 4.43.: Zusammenfassung der sequenzierten cDNAs der Linie 6M kategorisiert nach ihren besten Homologien

Die subtrahierte cDNA-Bank der Linie PT lieferte von insgesamt 563 der untersuchten cDNAs Sequenzen 131 (23 %) vermeintlich Differentielle. Elf dieser Sequenzen zeigten Sequenzähnlichkeit zu einer putativen ‚Catalase‘ (bzw. ‚TFIIB related protein‘). Für 42 cDNA Sequenzen konnte keine Zuordnung zu bekannten Sequenzen gefunden werden (Abb. 4.44.). Für Transportprozesse, die Proteinmarkierung, RNA- oder DNA-Bindung, sowie Primärstoffwechselprozesse kodierten 2 - 5 cDNA Sequenzen. Für den Aufbau der primären Zellwände und die Translation konnte jeweils eine kodierende Sequenz gefunden

werden. Bei der cDNA des putativen Sekundärstoffwechselproteins handelt es sich um ein Protein, welches Sequenzähnlichkeit zu einer β -Amyrin Synthase (prenyltransferase/squalen oxidase) aus *Euphorbia tirucalli* und *Medicago truncatula* zeigt (Sequenz im Anhang 10.12.). Unter „sonstiges“ sind 49 cDNA Sequenzen eingeordnet, die Sequenzähnlichkeit zu einem Arachidonsäure induzierten Protein (DEAI; P-rich protein, NtEIG-C29) aus *Capsicum chinense* zeigten. Die restlichen drei Sequenzen zeigten Sequenzähnlichkeiten zu einem Pollen-spezifischen Protein (pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein) aus *Vitis pseudoreticulata* und *Arabidopsis thaliana*, einem F10A5.28 (integral membrane protein DUF6) aus *Arabidopsis thaliana* und einem ‚NEC IV‘ Protein (putativer Xyloglucanase Inhibitor) aus *Nicotiana langsdorffii* x *Nicotiana sanderae* (*Solanum tuberosum*).

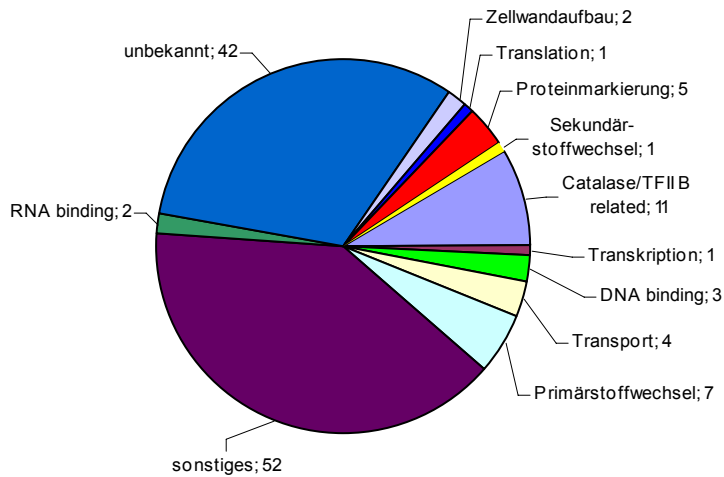


Abb. 4.44.: Zusammenfassung der sequenzierten cDNAs der Linie PT kategorisiert nach ihren besten Homologien

5. Diskussion

5.1. Gewinnung der Vorstufe Deoxypodophyllotoxin

Naturstoffintermediate sind in Pflanzen oft nur in geringen Mengen vorhanden. Das macht eine Extraktion aufwendig und erfordert z.T. große Mengen an Pflanzenmaterial. Dennoch sind diese Stoffe notwendig, um grundlegende Untersuchungen der Biosynthese von Naturstoffen vorzunehmen. Für phyto- und biochemische Untersuchungen der „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese mussten große Mengen an DOP zur Verfügung gestellt werden.

Zwei Verfahren zur Gewinnung von DOP wurden getestet. van Uden et al. (1997) reinigten das extrahierte DOP aus *Anthriscus sylvestris* Wurzelstücken dreifach säulenchromatographisch auf und konnten DOP schließlich aus Methanol auskristallisieren. Die Effizienz lag dabei bei etwa 51 %. In dieser Arbeit sollte die Methode nach van Uden et al. (1997) so verkürzt werden, dass DOP möglichst schnell und einfach aus den Wurzelstücken extrahiert und angereinigt werden konnte. Die einfache säulenchromatographische Reinigung reichte jedoch nicht aus, um DOP mit einem Reinheitsgrad von mindestens 80 - 90 % zu erhalten (4.1., Abb. 4.1.).

Parallel zur Gewinnung von DOP aus Pflanzenmaterial wurde eine modifizierte Methode nach Jackson und Dewick (1984) zur Synthese von DOP aus PTOX verwendet. Diese Methode erwies sich als schneller, einfacher und effizienter. Eine einmalige Säulenchromatographie reichte aus, um DOP von Synthesenebenprodukten, dem Katalysator und dem restlichen PTOX abzutrennen. Die Effektivität wurde von Jackson und Dewick (1984) mit 64 % angegeben, wobei sie eine dünnschichtchromatographische anstelle einer säulenchromatographischen Reinigung verwendeten. Die Ausbeuten nach der modifizierten Methode lagen je nach Synthesansatz zwischen 36 - 54 % mit einem Reinheitsgrad > 80 %. Aufgrund der Effizienz der Synthesemethode wurden die Extrakte aus *Anthriscus sylvestris* nicht weiter aufgereinigt und verworfen.

5.2. Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen

Für die Untersuchung der „späten“-Schritte der Aryltetralin-Lignanbiosynthese wurden zwei verschiedene *L. album* Zellsuspensionskulturen verwendet. Die Zelllinie 6M akkumuliert überwiegend 6MPTOX (Neumetzler, 2003), während Linie PT überwiegend PTOX bildet (Garden, 2004). Eine vergleichende Charakterisierung sollte zunächst klären, wie das unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster zustande kommt.

Bei der Charakterisierung der Zellkulturen 6M und PT wurden die FGs und TGs, verschiedene Mediumparameter, sowie die Lignangehalte der Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen bestimmt. Parallel dazu wurden die enzymatischen Aktivitäten der PAL, C4H, CAD, DOP6H und β P6OMT über einen Zeitraum von 16 Tagen ermittelt. Die erhaltenen Kurven der Mediums- und Wachstumsparameter (Abb. 4.4. und 4.5.) zeigen typische Verläufe für pflanzliche Zellsuspensionskulturen, wie sie bereits in früheren Charakterisierungen bei verschiedenen *L. album* Kulturen beobachtet werden konnten (Empt et al., 2000; Garden, 2004; Henges, 1999; Neumetzler, 2003; Seidel et al., 2002; Smolny et al., 1998; van Fürden, 2004; Windhövel, 2002).

5.2.1. Wachstums- und Mediumsparameter

Nach dem Überführen der Zellen in neues Medium musste sich deren Stoffwechsel auf die neuen Bedingungen einstellen. Aus diesem Grund fand zunächst keine Wachstumszunahme statt (4.2.2., Abb. 4.5.). Für Linie 6M dauerte diese lag-Phase bis Tag 1, während sie bei Linie PT bis Tag 2 anhielt. Dieser Unterschied könnte mit der Aggregatgröße der Zellen, d.h. mit der damit verbundenen besseren Versor-

gung einzelner Zellen zusammenhängen. Zellen der Linie 6M bilden plättchenartige Aggregate, während Zellen der Linie PT in feinen Zellklümpchen vorliegen. Zellen, die zu Klümpchen aggregieren, scheinen somit einer etwas schlechteren Versorgung zu unterliegen. Dies zeigte sich auch im verminderten Verbrauch der Kohlenstoffquelle Saccharose. Die Änderungen der Zuckergehalte verhalten sich spiegelbildlich zur Kurve der Trockengewichte, d.h. in dem Maße wie die Trockengewichte ansteigen, nehmen die Zuckergehalte im Medium ab (4.2.1., 4.2.2., Abb. 4.4. und 4.5.). Neben einer verminderten Einzelversorgung der Zellen besteht außerdem noch die Möglichkeit, dass Zellen der Linie PT generell eine reduzierte Nährstoffaufnahme oder -verwertung haben. Die Unterschiede in der Nährstoffaufnahme zwischen den Zelllinien spiegeln sich auch darin wider, dass Zellen der Linie PT Ionen in einer anderen Reihenfolge im Vergleich zu Linie 6M aufnehmen (siehe pH-Werte).

Nach der exponentiellen Wachstumsphase zwischen den Tagen 2 - 7 (Linie 6M) bzw. 3 - 7 (Linie PT) in der sich die Zellen vermehrt teilten, wurden die maximalen FGs in Linie 6M an Tag 7 - 14 und in Linie PT an Tag 10 erreicht. In Linie 6M erreichten die FGs 14,9 - 13,8 +/- 1,4 g/Kolben, während sie in Linie PT bis 18,2 g/Kolben anstiegen. Die Unterschiede in den Maxima können zum einen, durch den späteren Beginn der log-Phase und zum anderen, in einer verstärkten Vakuolisierung infolge von Wassereinlagerung in Zellen der Linie PT, begründet sein. Die verstärkte Vakuolisierung ist auch der Grund dafür, dass die maximalen TGs 2 - 3 Tage vor der maximalen FG-Akkumulation erreicht wurden. Maximale TGs wurden für die Linien 6M und PT zwischen den Tagen 4 - 5 bzw. 6 - 7 erreicht. Ab Tag 6 bzw. 7 war die Kohlenstoffquelle (Saccharose) weitestgehend aufgebraucht (BI von 0,3 %; Abb. 4.4.), was bedeutete, dass kein weiteres Wachstum mehr möglich war. Im Zuge dessen reicherten sich vermutlich zusätzlich toxische Stoffwechselprodukte an und die Absterbephase setzte ein. Ab Tag 12 konnte diese Phase nicht nur an den TGs, sondern auch am Anstieg der Brechungsindices und den Leitfähigkeiten beobachtet werden. Dieser Anstieg beruht auf der Freisetzung von verschiedenen Zellinhaltsstoffen, hervorgerufen durch die Lyse der Zellen.

Die Leitfähigkeit des Mediums ist ein Maß für die Ionenkonzentration. Ihr Verlauf korreliert spiegelbildlich mit dem der FGs. Die Zellen nehmen bis Tag 10 kontinuierlich Ionen auf und geben im Zuge der Zellyse wieder Ionen ins Medium ab. Der pH-Wert des Mediums der Linie 6M stieg von pH 4,9 kontinuierlich (Ausnahme zwischen Tag 3 und 4) bis Tag 21 auf pH 6,5 an, während er in Linie PT zunächst um eine pH-Einheit abfiel, um dann stetig bis auf pH 6,5 am letzten Erntetag zu steigen. Dies könnte mit einer unterschiedlichen Ionenaufnahmefähigkeit der Zellen zusammenhängen. Nach Schönell (1996) und Empt et al. (2000) liegt das Absinken des pH-Wertes vor allem an der Aufnahme von Phosphat- und Ammoniumionen, wobei Phosphationen maßgeblich an der Pufferwirkung des Mediums beteiligt sein sollen. Der Anstieg des pH-Wertes scheint hingegen durch die Aufnahme von Nitrationen verursacht zu werden, da deren Aufnahme unmittelbar mit der von Protonen gekoppelt ist (aktiver Transport unter ATP-Verbrauch; Heldt, 1999). Die Zellen der Linie PT scheinen somit im Gegensatz zu Zellen der Linie 6M verstärkt Phosphationen aus dem Medium zu resorbieren, was zugleich auf einen erhöhten Bedarf bzw. eine verminderte Speicherkapazität für Phosphat hindeutet.

Phosphat kann in der Zelle in Form von Phytinsäure (Phytat, Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexaphosphat) gespeichert werden. Dabei werden Phosphate am Zuckeralkohol Inositol gebunden. Inositol wird, wie aus Tab. 2.1. zu entnehmen ist, in Form des myo-Inosits dem Medium zugegeben. Das Phytat kann in seiner Eigenschaft als Anion gleichzeitig als Speicher bzw. Komplexbildner weiterer Ionen, wie K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} oder beispielsweise Fe^{2+} dienen (Harland und Oberleas, 2001).

Im Zusammenhang mit den SSH-Experimenten konnten ebenfalls Hinweise auf eine eventuell unterschiedliche aktive Nitrationsaufnahme oder eine Phosphat-Speicherkapazität gefunden werden. In der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT wurde eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu einer ‚plasma membrane H^+ -ATPase‘ gefunden, die eine erhöhte Expression zeigte (Tab. 4.18.), während in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu einer Inositol-3-Phosphat Synthase auftrat, die schwächer exprimiert war (Tab. 4.13.). Zusätzlich wurde in Linie 6M eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu einer myo-Inositol-1-Phosphat Synthase gefunden (überexprimiert, Tab. 4.15.; siehe hierzu 5.7.). Wobei

die Bezeichnungen ‚1- Phosphat Synthase‘ und ‚3-Phosphat Synthase‘ den gleichen Enzymtyp (die gleiche Enzymreaktion) kennzeichnen und die Benennung lediglich von unterschiedlicher D- bzw. L-Nomenklatur des Inositol-Phosphates ausgeht (Podeschwa, 2003; NCBI-Proteindatenbank). Bei der myo-Inositol-1/3-Phosphat Synthase handelt es sich um eine Isomerase, die Glucose-6-Phosphat in myo-Inositol-1/3-Phosphat überführen kann. Myo-Inositol-1/3 ist zum einen die Ausgangssubstanz für die Bildung des Phytats und zum anderen des myo-Inositol-1,4,5-triphosphates, einem wichtigen Bestandteil der bei der Rezeptor-vermittelten Hydrolyse aus Phosphatidylinositol-bisphosphat freigesetzt wird und für die Öffnung von intrazellulären Ca^{2+} -Kanälen sorgen kann.

Im Gegensatz zum niedrigen pH-Wert des Mediums sank die **Leitfähigkeit** der Linie PT an Tag 1 weniger stark ab. Das bestätigt die Annahme, dass in dieser Zelllinie zuerst Phosphationen aufgenommen und benötigt werden und erst dann größere Mengen an Ammonium und Nitrat aus dem Medium verstoffwechselt werden.

5.2.2. Enzymatische Aktivitäten über den Kulturverlauf

Bei der **PAL** handelt es sich um das „Eingangsenzym“ des Phenylpropanstoffwechsels. In *Medicago truncatula* konnten in verschiedenen Geweben nach unterschiedlichen Stressstimuli insgesamt neun PAL bzw. PAL-ähnliche Gene nachgewiesen werden (Dixon und Reddy, 2003). In Tabak wurden zwei Familien von PAL-Genen mit jeweils zwei Vertretern gefunden (Dixon und Reddy, 2003). Das PAL2 Gen aus Tabak ist ein lösliches Protein, während das PAL1 Gen sowohl in der Fraktion mikrosomaler als auch löslicher Proteine vorliegt (Rasmussen und Dixon, 1999). Man vermutet, dass das PAL1-Protein direkt mit der C4H assoziiert sein könnte. In einer cDNA Bibliothek von *L. album* Zellsuspensionskulturen konnten bisher nur zwei PAL-Isoformen gefunden werden (Schwelm, 2001). Es ist aber anzunehmen, dass auch in *L. album* weitere PAL-Isoformen vorliegen können.

Da die PAL-Aktivität in der Proteinrohfraktion gemessen wurde, ist keine Aussage darüber möglich, welche Aktivität von welcher PAL-Isoform tatsächlich detektiert wurde. Es wäre aber möglich, dass das „kleine“ Maximum an Tag 1 der Zelllinie 6M mit $94 \pm 11 \mu\text{kat/kg}$ Protein von einer durch Stress induzierten Isoform hervorgerufen wurde. Gleiches gilt auch für das erste Maximum der PAL Aktivität in Linie PT an Tag 1 mit $209 \pm 34 \mu\text{kat/kg}$ Protein (4.2.3.1. Abb. 4.6.). Allerdings ist die Bezeichnung „erstes Maximum“ kritisch zu betrachten, da die Standardabweichungen des Wertes mit $\pm 34 \mu\text{kat/kg}$ Protein sehr hoch sind und dadurch keine eindeutige Aussage über ein tatsächliches Maximum möglich ist. Mann nimmt an, dass die Aktivitätssteigerung der PAL an Tag 1 durch den sog. „Verdünnungseffekt“, einer Stressantwort der Zellen auf das Überimpfen in frisches Nährmedium, hervorgerufen wird (Hahlbrock, 1976; van Fürden et al., 2005). Das Maximum der PAL Aktivität lag für Zelllinie 6M an den Tagen 5 - 6 ($210 \pm 20 \mu\text{kat/kg}$ Protein). Zelllinie PT besaß mit $212 \pm 27 \mu\text{kat/kg}$ Protein an Tag 5 ein Maximum. Sowohl die Verläufe als auch die Höhe der ermittelten enzymatischen Aktivitäten sind vergleichbar mit denen anderer *L. album* Zellkulturen, wobei in anderen Zelllinien oftmals das Hauptmaximum mit der Stressantwort am ersten Kultivierungstag zusammenfiel (Henges, 1999; Neumetzler, 2003; van Fürden, 2004; Windhövel, 2002).

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, katalysiert die **C4H** den zweiten Schritt des Phenylpropanstoffwechsels. Einige Isoformen dieses Enzyms scheinen teilweise mit einigen Isoformen des Einstiegsenzym PAL assoziiert zu sein. In *Medicago truncatula* und *Glycine max* wurden je zwei Isoformen gefunden (Dixon und Reddy, 2003). In *L. album* konnte erstmals mittels einer einfachen PCR ein Genstück isoliert werden (4.5.4.1.). Bei der Durchsuchung einer cDNA Bank der Zelllinie 6M wurde bisher eine cDNA gefunden, die für dieses Enzym kodiert (Korczak, 2006).

Erstmals wurde die enzymatische Aktivität der C4H über den Kulturverlauf von 16 Tagen in diesen Zellkulturen verfolgt. Das Maximum der C4H Aktivität der Linie 6M lag an den Tagen 4 - 6 (4.2.3.1. Abb.

4.7.). Die hohen Standardabweichungen kamen zum einen dadurch zustande, dass das Maximum der C4H Aktivität der ersten Charakterisierung an Tag 4 - 5 und der zweiten Charakterisierung an Tag 6 lag (Abb. 5.1.). Zum anderen waren die Standardabweichungen der maximalen Enzymaktivitäten der Charakterisierung 2 mit 35,9 bzw. 25,5 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein sehr hoch. Ein Mess- oder Pipettierfehler kann nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu wurde die maximale C4H Aktivität der Linie PT an den Tagen 1 und 2 detektiert. Die Präparation der mikrosomalen Fraktion aus Linie PT war in allen Fällen schwieriger als für Linie 6M. Das Wachstum der Zellen in feineren Aggregaten erforderte ein etwas längeres und intensiveres Mörsern, was möglicherweise zu einer höheren Reibungswärme beim Zellaufschluss führte. Das Rücklösen und Verdünnen der mikrosomalen Proteine erfolgte parallel zu denen aus Linie 6M. Allerdings war die Mikrosomenlösung aus Linie PT meist zähflüssig, was ein Entsalzen mittels PD10-Säulen sehr schwierig machte und dies, obwohl die Proteinkonzentration stets geringer als die der Linie 6M war.

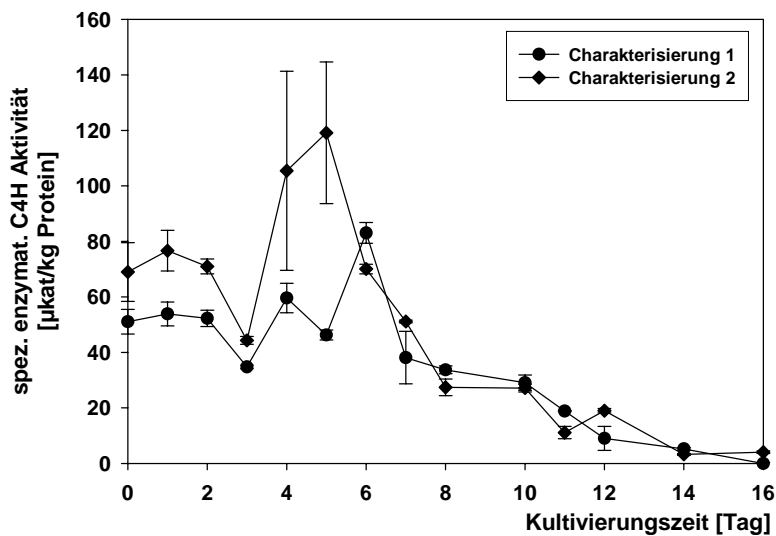


Abb. 5.1.: Spezifische enzymatische C4H Aktivitäten der Linie 6M der Charakterisierung 1 im Vergleich zu Charakterisierung 2 über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Dreifachproben].

Die **CAD** gehört zu einer großen Klasse von Zink-enthaltenden Alkohol-Dehydrogenasen, die meist als Dimer vorliegen. Je nach Pflanzenart wurden mehrere Isoformen beschrieben. So fand man beispielsweise in *Arabidopsis thaliana* 12 mögliche Konsensussequenzen (Dixon und Reddy, 2003; Petersen et al., 1999). Aus *L. album* ist bisher die Vollängensequenz einer CAD bekannt (Schwelm, 2001).

Die enzymatische CAD-Aktivität der untersuchten Zelllinien 6M und PT zeigte sehr unterschiedliche Verläufe. Das Maximum in Linie PT war an den Tagen 3 - 4 zu finden, während es für Linie 6M an Tag 9 lag (4.2.3.1. Abb. 4.8.). Bei Linie 6M trat zudem an Tag 1 ein „kleines“ Aktivitätsmaximum auf. Das Auftreten von zwei Maxima, sowie das Vorkommen eines späten Hauptmaximums, an einem Tag, an dem bereits die Absterbephase der Zellkultur begann, kann darauf hindeuten, dass entweder mehrere CADs (mindestens zwei), oder andere Alkohol-Dehydrogenasen bei der Messung der Aktivität erfasst wurden. Dies könnte der Fall sein, wenn Alkohol-Dehydrogenasen vorhanden wären, die Coniferylalkohol mehr oder weniger substratunspezifisch im Zuge abbauender Reaktionen zur Energiegewinnung umsetzen würden.

Die Aktivitäten der **DOP6H** und **β P6OMT**, die an den „späten“-Schritten der Lignanbiosynthese beteiligt sind, konnten erstmals in *L. album* Zellsuspensionskulturen über den Kulturverlauf verfolgt werden. Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten dieser beiden Enzyme waren im Vergleich zu denen aus dem „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel“ mit maximal 3 - 5 (DOP6H) und 14 - 16 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein (**β P6OMT**) gering (4.2.3.2. Abb. 4.9. und 4.10.). Es ist anzumerken, dass ein Vergleich zwischen den in-

in vitro Aktivitäten der PAL und CAD (photometrische Enzymteste) mit den in-vitro Aktivitäten der C4H, DOP6H und β P6OMT (Enzymteste mit anschließender HPLC-Analyse) kritisch betrachtet werden muss. Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten wurden in Rohproteinfraktionen und wie bereits erwähnt unter in-vitro Bedingungen ermittelt. Sie spiegeln somit nicht die Verhältnisse in-vivo wider.

Die hohen Standardabweichungen der DOP6H Aktivität der Linie 6M an den Tagen 5 und 6 wurden verursacht durch die Verschiebung der maximalen Aktivitäten (Abb. 5.2.). Bei der ersten Charakterisierung lag die Hauptaktivität mit $5,0 \pm 0,8 \mu\text{kat/kg Protein}$ an Tag 6, während sie bei der Zweiten mit $4,5 \pm 0,2 \mu\text{kat/kg Protein}$ an Tag 5 zu finden war. Die Verschiebung der enzymatischen Hauptaktivitäten um 1 - 2 Tage scheint für pflanzliche Zellkulturen nichts Ungewöhnliches zu sein. A. Henges (1999) konnte dies beispielsweise ebenfalls für die C4H in der *L. album* Zelllinie X4 beobachten.

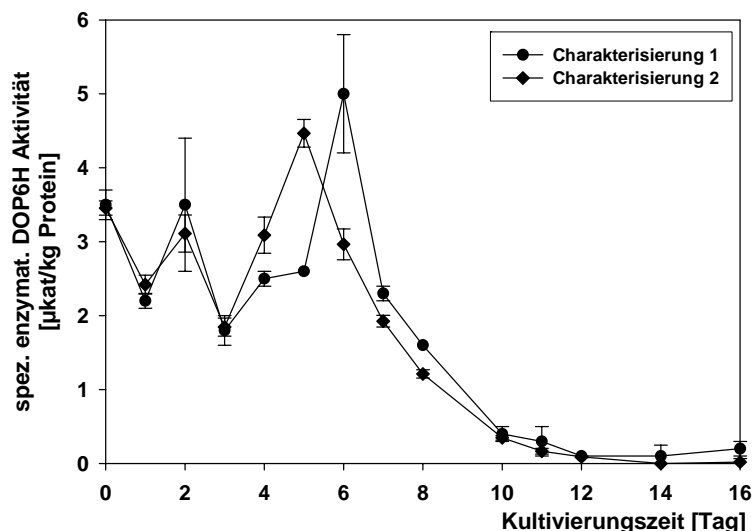


Abb. 5.2.: Spezifische enzymatische DOP6H Aktivitäten der Linie 6M der Charakterisierung 1 im Vergleich zu Charakterisierung 2 über einen Kulturverlauf von 16 Tagen [Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messreihe mit Dreifachproben].

Die Maxima der β P6OMT Aktivitäten lagen für Linie 6M mit $15 - 13 \pm 2 \mu\text{kat/kg Protein}$ an Tag 2 und 4 - 6, während diese für Linie PT mit $14 \pm 1 \mu\text{kat/kg Protein}$ an Tag 5 zu finden waren (Abb. 4.10.). Im Vergleich dazu wurden in *L. nodiflorum* Zellsuspensionskulturen lediglich maximal $9 \mu\text{kat/kg Protein}$ an Tag 7 detektiert (Kranz und Petersen, 2003).

5.2.3. Lignangehalte

Der 6MPTOX-Gehalt der Linie 6M sank an den Anfangstagen geringfügig ab, um auf ein Maximum von $5,4 \pm 0,2 \text{ mg/g TG}$ an Tag 11 zu steigen (4.2.4. Abb. 4.11.). Bis Tag 21 sank der 6MPTOX-Gehalt in Linie 6M auf $2,6 \pm 0,2 \text{ mg/g TG}$. L. Neumetzler fand 2003 in dieser Kultur etwa 10 mg/g TG 6MPTOX an Tag 14, was zeigt, dass sich das Lignanakkumulierungsmuster im Verlauf von etwa zwei Jahren verändert hat. Die höchsten 6MPTOX-Gehalte wurden bisher in ‚hairy root‘ Kulturen von *L. album* mit etwa 35 mg/g TG gefunden (Dr. E. Fuss, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu den geringeren 6MPTOX-Gehalten an den Tagen 0 - 4 in Linie 6M, waren die PAM-, β -Peltatin- und DOP-Gehalte in diesem Zeitraum erhöht (Abb. 4.12. a)). Die hohen Anfangsgehalte von PAM-, β -Peltatin- und DOP könnten dadurch zustande kommen, dass an Tag 2 bereits DOP von den Enzymen des „Allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels“ und der „frühen“-Schritte der Lignanbiosynthese gebildet wurde, welches durch die geringfügig vorhandene DOP6H in β -Peltatin überführt wurde. β -Peltatin konnte im Anschluss direkt in PAM überführt werden, wohingegen PAM aufgrund fehlender PAM7H Aktivität akkumulierte.

An den Tagen 7 - 9 bzw. 7 und evtl. 8 (hohe Standardabweichung) stiegen die β -Peltatin- bzw. PAM-Gehalte in Linie 6M erneut an, wohingegen die DOP-Gehalte gegen Null gingen (Abb. 4.12. a)). Dies ließe sich durch die erhöhten Aktivitäten der DOP6H und β P6OMT an den Tagen 5 - 6 bzw. 4 - 6

erklären. PAM wurde allerdings im Anschluss nur sehr langsam in 6MPTOX überführt und akkumulierte dadurch zunächst. Die hohen Standardabweichungen der PAM-Gehalte kamen dadurch zustande, dass in den einzelnen Charakterisierungen die gemessenen Maxima stark unterschiedlich waren. So wurden beispielsweise an Tag 7 bei Charakterisierung 1 ein Gehalt von 33,3 µg/g TG PAM ermittelt, während bei Charakterisierung 2 der PAM-Gehalt bei 20,6 µg/g TG lag.

Die hohen Gehalte an PAM-, β -Peltatin- und DOP an den Tagen 0 bzw. 2 erklären aber nicht die sinkenden 6MPTOX-Gehalte zwischen den Tagen 0 - 4, es sei denn eine 6MPTOX-Bildung wäre durch das Fehlen oder eine totale Blockade des PAM7H-Enzyms nicht möglich. In diesem Fall würde der Gesamtgehalt an 6MPTOX aufgrund der Wachstumszunahme vermindert. Eine weitere Möglichkeit wäre eine abbauende Reaktion, die 6MPTOX direkt in PAM überführen kann. A. Henges (1999) fand heraus, dass die Lignane 6MPTOX und PTOX überwiegend in der Vakuole zu finden sind. Es scheint für Pflanzen im Allgemeinen ein weit verbreitetes Prinzip zu sein, ihre Giftstoffe als solche oder in ihrer glycosylierten Form in der Vakuole zu speichern (Strasburger, 1991). So werden beispielsweise primäre Herzglykoside in einem energieabhängigen Prozess in die Zentralvakuole aufgenommen und dort gespeichert (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/pharmbiol/index.html>; AG Prof. Dr. W. Kreis). Für den stereospezifischen Transport der Isochinolin-Alkaloid Vorstufen (S)-Reticulin und (S)-Scoulerin in die Vakuolen von *Fumaria capreolata* wurde ein ATP-abhängiges Protonentransportsystem nachgewiesen (Deus-Neumann und Zenk, 1986). Einige Sekundärstoffe wie z.B. Medicarpin können durch Bildung von Glutathion-S-Konjugaten mittels spezifischen ABC-Transportern in die Vakuole transportiert werden, wobei der Transfer von endogenen Substraten (z.B. Medicarpin, Zimtsäure oder Cyanidin-3-Glucosid) auf Glutathion durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert wird (Li et al., 1997; Marrs, 1996; Rea et al., 1998). Desweiteren können Pflanzen ihre Naturstoffe durch Protonierung oder Komplexbildung mit Pflanzensäuren oder phenolischen Verbindungen in der Vakuole akkumulieren. So werden beispielsweise die Schöllkrautalkaloide Sanguinarin und Chelerythrin an Chelidonsäure gebunden (Matile, 1976; Hauser und Wink, 1990).

Die Bildung von PAM aus 6MPTOX, bei einer eventuell abbauenden 6MPTOX-Reaktion, könnte energetisch schwierig sein und würde vermutlich zunächst nach Entfernung der Hydroxylgruppe an Position 7 in der Bildung einer C-C Doppelbindung resultieren. Möglich wäre eine membrangebundene oder membran-assoziierte Synthetase- oder Transferasereaktion, die das wasserlösliche 6MPTOX-Glucosid beim Durchgang oder Transport durch den Tonoplasten in PAM überführt, oder wie eben für Medicarpin beschrieben, ein ABC-Transporter, der den Transfer übernimmt. Diese Modellvorstellung ließe sich theoretisch auch für die Hinreaktion von PAM in 6MPTOX postulieren, aber wie die Biotransformationsexperimente zeigten, ist 6MPTOX eindeutig ein Intermediat bei der Bildung des Glucosids.

Das Absinken der 6MPTOX-Gehalte ab Tag 11 könnte ebenso zustande kommen, da die aktivierte Glucose für die Energiegewinnung und somit zur Verzögerung der Absterbephase benötigt werden könnte. Es ist aber eher denkbar, dass das Absinken des 6MPTOX-Gehaltes am Ende der Kultivierungsphase, durch die Abgabe von 6MPTOX oder 6MPTOX-Glucosid an das Medium, mit der Zellyse in Zusammenhang steht.

In Linie PT waren die DOP- und β -Peltatin-Gehalte an den Tagen 4 - 7 bzw. 4 - 8 erhöht. DOP schien bereits ab Tag 0 direkt in β -Peltatin umgesetzt zu werden und dies, obwohl die DOP6H Aktivität dieser Zelllinie äußerst gering war. Akkumuliertes DOP schien in Folge aber nicht weiter in β -Peltatin, sondern zu PTOX umgesetzt zu werden. Dieses Resultat wirft folgende Fragen auf: Wie konnten die relativ hohen β -Peltatin-Gehalte trotz fast fehlender DOP6H Aktivität gebildet werden und weshalb akkumuliert β -Peltatin und nicht PAM, obwohl die spezifische β P6OMT Aktivität sehr hoch ist?

Die hohen β -Peltatin-Gehalte lassen sich damit erklären, dass entweder die geringe DOP6H Aktivität ausreichte, um DOP hocheffektiv in β -Peltatin umzusetzen, oder eine unspezifische Monooxygenase führte die Hydroxylgruppe an Position 6 ein, um eine Detoxifikation des lipophilen und toxischen DOPs herbeizuführen. Das entstandene β -Peltatin konnte in Folge glycosyliert und gespeichert werden. Die

Ergebnisse der Biotransformation mit DOP und anschließender Lignanextraktion der Zellen ohne β -Glucosidase und Wasserzugabe bestätigen das Vorliegen des β -Peltatin-Glucosides (4.5.1.2./5.5.1.). Ab Tag 5 scheint DOP verstärkt in PTOX überführt zu werden. PAM konnte bisher in keiner Lignanextraktion der Zelllinie PT gefunden werden und dies, obwohl eine β P6OMT Aktivität mit sehr geringen K_M -Werten für β -Peltatin gefunden wurde (4.4.2./5.4.1.), was auf eine hohe Substratspezifität schließen lässt. Vermutlich wurde PAM direkt und sehr effektiv durch die PAM7H in das Folgeprodukt 6MPTOX (oder 6MPTOX-Glucosid) überführt.

Die höchsten PTOX-Gehalte der Linie PT wurden zwischen den Tagen 8 - 18 mit 2,4 - 2,5 +/- 0,6 mg/g TG erreicht. Die höchsten 6MPTOX-Gehalte lagen an Tag 8 mit 0,5 +/- 0,2 mg/g TG. Die intrazellulären PTOX- und 6MPTOX-Gehalte sanken auch nach Tag 18 nicht wesentlich ab. Es ist somit anzunehmen, dass entweder kein Abbau des PTOX stattfand, die Zellen der Linie PT einer geringeren Zellyse unterworfen sind und PTOX (6MPTOX) dadurch nicht freigesetzt wurde oder, dass trotz stattfindender Zellyse PTOX (6MPTOX) an den abfiltrierbaren Zellbestandteilen haften blieb. Auch in der Zelllinie PT scheinen Veränderungen in der Lignanakkumulation stattgefunden zu haben. H. Garden fand ein Jahr zuvor noch etwa 3,5 mg/g TG PTOX in dieser Kultur (Garden, 2004).

Die höchsten enzymatischen PAL, C4H, DOP6H und β P6OMT Aktivitäten, sowie maximale Frisch- und Trockengewichte wurden in Linie 6M überwiegend an den Tagen 4 bzw. 5 - 6 gemessen (4.2.2., 4.2.3.; Abb. 4.5., 4.6., 4.7., 4.9., 4.10.). Erst mit Ende der Wachstums- und Vermehrungsphase an Tag 4 (Beginn der stationären Phase) und Einsetzen der Expression der oben genannten Proteine stiegen die 6MPTOX-Gehalte kontinuierlich bis Tag 11 an.

In Linie PT waren die PAL und β P6OMT Hauptaktivitäten an den Tagen 4 bzw. 5 - 6 zu finden, wohingegen die der CAD und C4H an den Tagen 0 - 3 lagen (Abb. 4.7. und 4.8.). Diese Unterschiede in den Aktivitäten spiegeln das Lignanakkumulierungsmuster dieser Zelllinie nicht wider, denn PTOX (und 6MPTOX) schien über die gesamte Kultivierungszeit kontinuierlich gebildet zu werden (Abb. 4.11.). Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase akkumulierte PTOX (6MPTOX). Dies lässt die Vermutung zu, dass die detektierte PAL Aktivität möglicherweise nicht unmittelbar an der Bildung dieser Lignane beteiligt war. Das gleiche gilt für die β P6OMT Aktivität der Zelllinie PT. Vermutlich sind einige OMTs in der Lage Substrate mehr oder weniger unspezifisch zu methylieren, folglich könnten deren Aktivitäten ebenfalls erfasst worden sein (bi- bzw. multifunktionelle Enzyme; Gauthier et al., 1998; Frick und Kutchan, 1999; Schröder et al., 2002).

In beiden Zelllinien konnten analoge Verläufe der enzymatischen PAL, C4H und β P6OMT Aktivitäten, sowie ähnliche Wachstumskurven in vergleichbarer Größenordnung detektiert werden. CAD Aktivitäten wurden ebenfalls in Zellen beider Linien gefunden, wohingegen die DOP6H fast ausschließlich in Linie 6M detektierbar war. Dies lässt den Schluss zu, dass die DOP6H der Schlüssel für die differentielle Lignanakkumulation ist. Wenn die DOP6H vorhanden ist, wird 6MPTOX synthetisiert, fehlt sie, wird PTOX gebildet. Diese Annahme konnte durch die Biotransformationsexperimente in Kombination mit der Gabe von Hemmstoffen bestätigt werden (4.5.1.3.; 5.5.1.).

5.3. Biochemische Charakterisierung der DOP6H

Erstmals konnte die DOP6H aus einer *L. album* Zellsuspensionskultur (Linie 6M) charakterisiert werden. Kontrollexperimente und LC/MS-Analysen bestätigten die Richtigkeit der entstandenen Produkte. Nach Bestimmung der allgemeinen Parameter wurden die Standardenzymteste bei 30°C für 20 min mit 338 µg Protein durchgeführt. Der optimale pH-Wert in Tris/HCl Puffer lag bei pH 7,5 - 8,5. Die apparenten Michaelis-Menten Konstanten lagen für DOP und NADPH in den Bereichen 1 - 3 +/- 1 µM und 20 - 40 +/- 14 µM. Diese Ergebnisse waren mit den Charakteristika der DOP6H aus Zellsuspensionskulturen von *L. flavum* und *L. nodiflorum* vergleichbar (Molog et al., 2001; Kuhlmann, 2004). Für *L. flavum* wurden pH- und Temperaturoptima von 7,6 und 26°C ermittelt, für *L. nodiflorum* 7,2 - 7,4 und 33 - 38°C. Die apparenten K_M -Werte lagen in diesen Zellkulturen bei 20 bzw. 8,9 µM für DOP und 36 bzw. 55 µM für NADPH in *L. flavum* bzw. *L. nodiflorum*. Derart geringe K_M -Werte, die für eine hohe Enzym-Substratspezifität sprechen, sind für CYP-Enzyme nicht ungewöhnlich. Für die Tabersonin 16-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* wurden beispielsweise apparente K_M -Werte für Tabersonin von 11 µM und für NADPH von 14 µM gefunden (St-Pierre und DeLuca, 1995). Dass die Bandbreite an apparenten K_M -Werten dennoch sehr groß sein kann, verdeutlicht der K_M -Wert der 7-Deoxyloganin 7-Hydroxylase aus *Lonicera japonica* von 170 µM für 7-Deoxyloganin und 18 µM für NADPH (Katano et al., 2001).

Ein Vorversuch zeigte, dass die DOP6H nicht durch die Dioxygenasehemmstoffe PCA2,4, PCA2,5 und Trinex gehemmt werden kann. Die Wirkung dieser Hemmstoffe beruht auf ihrer Eigenschaft als α -Keto-glutarat Substratanaloga. Im Gegensatz dazu konnte die DOP6H Reaktion durch die CYP-Hemmstoffe vermindert werden (4.3.3.; Abb. 4.16.). Die genauen Wirkmechanismen der einzelnen Inhibitoren sind nur z.T. bekannt. In Abb. 5.3. sind die Strukturformeln der Inhibitoren abgebildet.

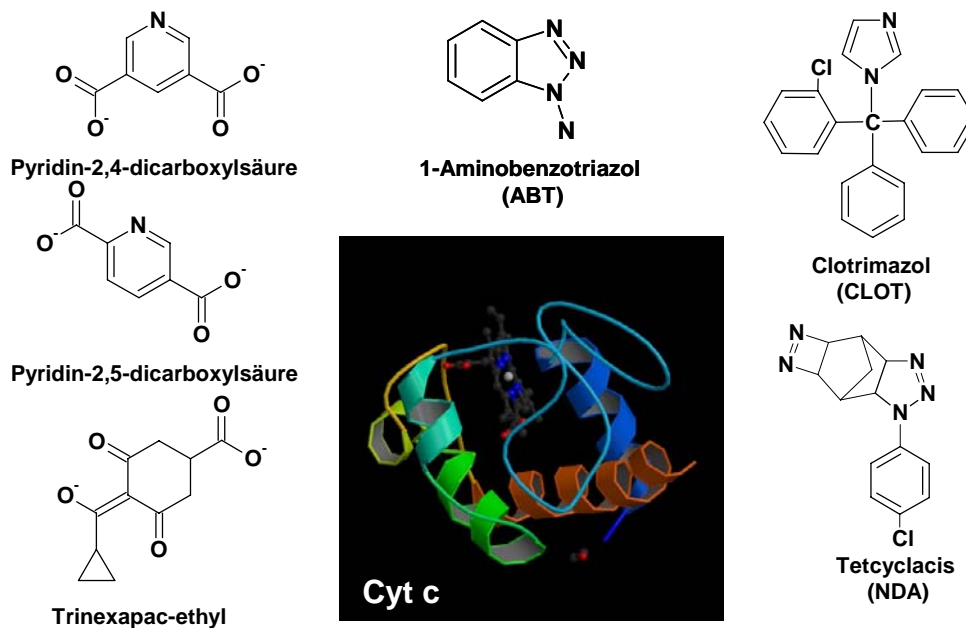


Abb. 5.3.: Strukturformeln der Inhibitoren

Dioxygenasehemmstoffe: Trinex, PCA2,4 und PCA2,5; CYP-Hemmstoffe: ABT, CLOT, NDA und Cyt c (Cyt c - Proteingerüst mit prosthetischer Häm c Gruppe und zentralem Eisen-Ion; Abb. aus <http://www.dynameomics.org/status.shtml>)

Bei ABT handelt es sich wahrscheinlich um ein selektives (möglicherweise sehr spezifisches) „Selbstmord-Substrat“. Bei der Interaktion von ABT mit dem CYP-Enzym kommt es vermutlich zur katalytischen Aktivierung von ABT unter Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH und in Folge dessen, zu einem N,N-verknüpften ABT-Porphyrin Produkt. Dadurch geht das komplexierte Eisen-Ion verloren und das CYP-Enzym wird inaktiv (Ortiz de Montellano und Mathews, 1981; Reichhart et al., 1982). Die Hemmwirkung von ABT auf die DOP6H-Reaktion war nicht sehr groß. 5×10^{-3} M ABT war nötig, um eine 20 %ige

Hemmung zu erhalten, wohingegen beispielsweise die C4H aus *Helianthus tuberosus* durch eine Konzentration von nur 5×10^{-5} - 10^{-4} M um 50 % gehemmt werden konnte (Reichhart et al., 1982). Die Hemmung der DOP6H durch NDA und CLOT war hingegen deutlicher. $1,1 \times 10^{-5}$ M CLOT oder NDA reichten aus, um eine 50 %ige Hemmung hervorzurufen. Diese Ergebnisse sind mit Inhibitionsversuchen anderer CYP-Enzyme vergleichbar. So sind 10^{-6} - 10^{-5} M NDA notwendig, um eine 50 %ige Hemmung der C4H aus *Vicia spec.* und der 5-O-(4-Cumaroyl)-D-Chinasäure 3-Hydroxylase aus *Petroselinum crispum* zu verursachen (Rademacher et al., 1987). Die Tabersonin 16-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* kann mit 10^{-4} M NDA oder 5×10^{-5} M CLOT zu 50 % gehemmt werden, während für eine 50 %ige Hemmung der (+)-Abscisinsäure 8'-Hydroxylase aus *Zea mays* nur 10^{-6} M NDA notwendig sind (Krochko et al., 1998; St-Pierre und DeLuca, 1995).

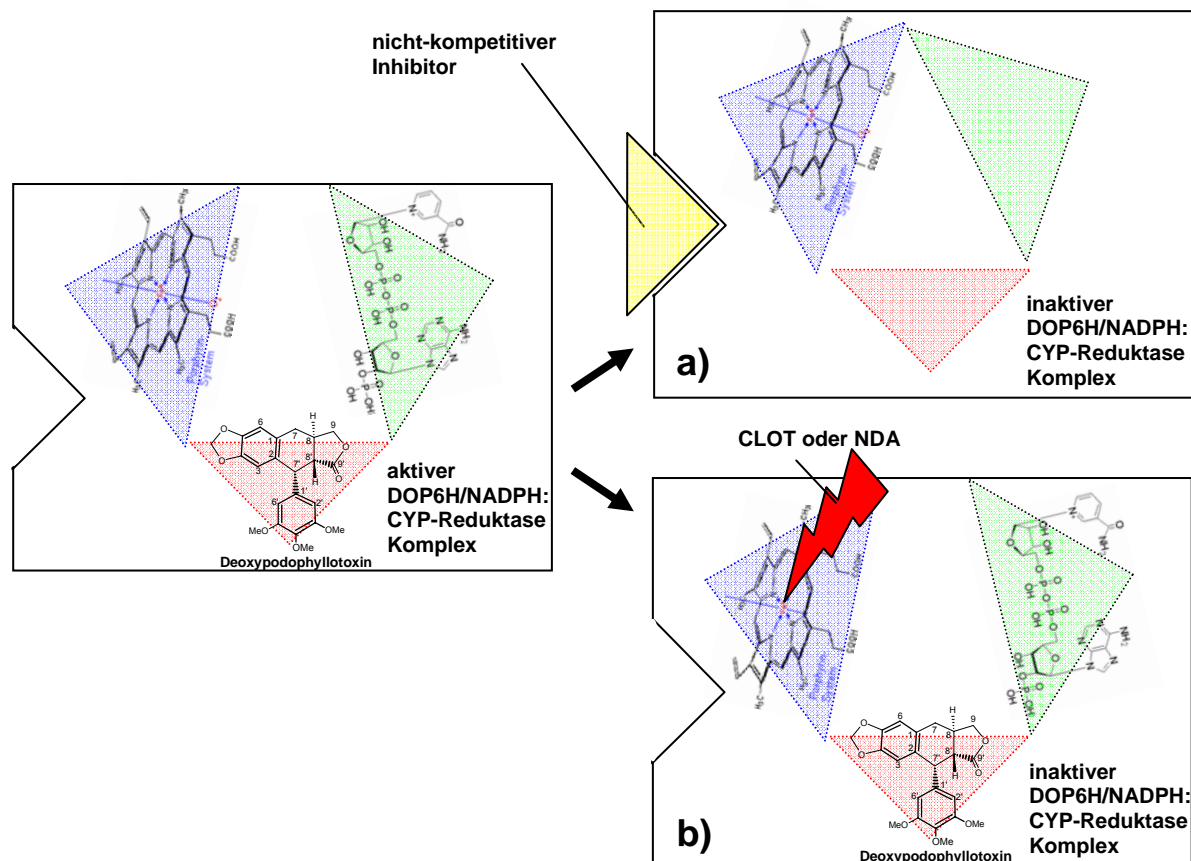


Abb. 5.4.: Modellvorschlag des Hemmechanismus von NDA und CLOT auf die DOP6H

a) Modell eines nicht-kompetitiven Inhibitors: Die Hemmung kommt durch Bindung an einer bestimmten Stelle außerhalb des aktiven Zentrums des Enzymkomplexes zustande und verhindert vermutlich durch eine Konformationsänderung die enzymatische Reaktion. b) Modell der Wirkungsweise von CLOT und NDA: Nach der Beschreibung der Wirkmechanismen dieser Hemmstoffe scheinen sie mit dem Eisen-Protoporphyrin IX zu interagieren [DOP6H - gelb: Inhibitormolekül, blau: Bindestelle für O_2 am Eisen-Protoporphyrin IX, rot: DOP-Bindestelle; NADPH:CYP-Reduktase - grün: NADPH-Bindestelle].

Die Wirkung von Imidazolen (CLOT) und Triazolen (NDA) ist vermutlich auf die Interaktion zwischen dem freien sp^2 -hybridisierten N-Elektronenpaar ihres heterozyklischen Ringes und dem Eisen-Ion im aktiven Zentrum des CYP-Enzyms zurück zu führen (Rademacher et al., 1987; Zhang et al., 2002). Allerdings fanden Trivedi et al. (2005), dass CLOT die Häm-Peroxidase aus *Plasmodium falciparum* irreversibel hemmen kann. Dabei wird CLOT unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert und radikalisch an das Protoporphyrin gebunden, so dass keine Enzymkatalyse mehr möglich ist. Die Radikalisierung von CLOT kann verhindert werden, wenn genügend putatives Substrat vorhanden ist. Trotz dieses Wirkmechanismus konnte bei den durchgeführten DOP6H-Hemmkinetiken keine kompetitive, sondern eine gemischte oder nicht-kompetitive Hemmung gefunden werden. Dies würde bedeuten, dass die Bindung des

Substrates DOP in seine Substratbindetasche ungehindert erfolgen kann und NDA oder CLOT dennoch Platz im aktiven Zentrum finden, um die Reaktion zu unterbinden oder zu stören (Abb. 5.4.). Die Wirkung von CLOT als „Selbstmord“-Substrat kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da die Zugabe von 100 oder 200 μM CLOT aufgrund der kaum messbaren Aktivitäten eine Bestimmung der K_M - und v_{max} -Werte z.T. nicht mehr ermöglichte.

Oxidiertes Cyt c greift nicht direkt in die Hemmung von CYP-Enzymen ein, sondern konkurriert um die, von NADPH auf die NADPH:Cytochrom P450 Reduktase übertragenen Elektronen. Durch diesen NADPH- bzw. Elektronenverlust, kann die CYP-Reaktion nur vermindert erfolgen. Die Hemmung der DOP6H um 50 % war durch Zugabe von $1,6 \times 10^{-6}$ M Cyt c möglich. Diese Werte sind mit der Tabersonin 16-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus*, die durch 10^{-6} M zu 50 % gehemmt wurde, vergleichbar (St-Pierre und DeLuca, 1995). Bei der DOP6H aus *L. flavum* reichten $2,5 \times 10^{-6}$ M Cyt c aus, um eine 90 %ige Hemmung zu erzielen (Molog et al., 2001). Eine vollständige Hemmung durch höhere Cyt c Gabe konnte bei der DOP6H aus *L. album* Linie 6M jedoch nicht beobachtet werden, was darauf hindeuten könnte, dass möglicherweise noch andere Elektronen-liefernde Prozesse eine Rolle spielen.

5.4. Biochemische Charakterisierung der βP6OMT

Erstmals konnte die βP6OMT Aktivität aus *L. album* Zellsuspensionskulturen der Linien 6M und PT charakterisiert werden (4.4.). Kontrollexperimente und LC/MS-Analysen bestätigten die Identität der entstandenen Produkte. Nach Bestimmung der allgemeinen Parameter wurden die Standardenzymteste bei 37°C für 20 min mit 100 μg Protein durchgeführt. Der optimale pH-Wert in Tris/HCl Puffer lag für die βP6OMT der Linie 6M zwischen pH 7,5 - 8,5 und der Linie PT bei pH 7,0. Dieses unterschiedliche pH-Optimum könnte ein Hinweis darauf sein, dass die detektierten OMT-Aktivitäten möglicherweise in-vivo in verschiedenen Kompartimenten zu finden sind. Es könnte aber auch bedeuten, dass sich die cytoplasmatischen pH-Werte der untersuchten Zelllinien geringfügig unterscheiden. Zugleich stellt sich die Frage, ob es sich um die Aktivität einer spezifischen βP6OMT -Reaktion handelt, oder ob mehr oder weniger „unspezifische“ OMTs diese Reaktion katalysieren (bi- bzw. multifunktionelle Enzyme; Gauthier et al., 1998; Frick und Kutchan, 1999; Schröder et al., 2002). Die gefundenen apparenten Michaelis-Menten Konstanten für β -Peltatin waren sehr gering (4.4.), was ein Hinweis auf eine hohe Substratspezifität ist.

Ein weiterer Unterschied zwischen den βP6OMT Aktivitäten der untersuchten Zelllinien konnte bei den proteinanalytischen Versuchen festgestellt werden (4.5.3.1. Tab. 4.5.). Nach fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung wurden die einzelnen Proteinfractionen auf ihre βP6OMT Aktivität getestet. Für beide Linien wurden die Hauptaktivitäten in den Fraktionen 40 - 50 und 50 - 60 % gefunden. Für Linie 6M wurde zusätzlich in Fraktion 30 - 40 % eine hohe Aktivität von 3,9 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein gefunden, während dies bei Linie PT in Fraktion 60 - 70 % mit 4,6 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ Protein der Fall war. Durch die Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird die Löslichkeit von Proteinen herabgesetzt. Diese Löslichkeit unterscheidet sich von Protein zu Protein. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass bei der fraktionierten Fällung verschiedene OMTs getrennt wurden, die eine βP6OMT Aktivität aufweisen.

Die Charakteristika der βP6OMT aus den *L. album* Zellsuspensionskulturen sind trotz der gefundenen Unterschiede vergleichbar mit denen der βP6OMT aus *L. nodiflorum*, deren pH- und Temperaturoptimum bei pH 7,5 bzw. 40°C lagen. Die apparente Michaelis-Menten Konstante für β -Peltatin lag mit 42 μM etwas über den Werten der βP6OMT aus *L. album*. Die apparente Michaelis-Menten Konstante für SAM lag hingegen mit 11 μM in einem vergleichbaren Bereich (Kranz und Petersen, 2003).

Hohe Konzentrationen des Co-Produktes SAH hemmen die βP6OMT Reaktion. Die Zugabe von 158 +/- 38 μM (Linie 6M) bzw. 117 +/- 69 μM (Linie PT) bewirkte eine 50 %ige Hemmung. Die βP6OMT aus *L. nodiflorum* konnte durch vergleichbare Konzentrationen von 100 - 120 μM SAH gehemmt werden (Kranz, 2004).

5.5. Suche nach den „unbekannten“ Hydroxylierungsreaktionen

5.5.1. Phytochemische Suche

Die Enzyme PAM7H und DOP7H der „späten“-Schritte der Biosynthese der Aryltetralin-Lignane sind noch unbekannt. Sie sind für die Hydroxylierung an Position 7 des DOP zu PTOX bzw. des β -Peltatin-A-Methylethers zu 6MPTOX verantwortlich. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Suche nach diesen beiden Reaktionen. In kombinierten Fütterungs- und Hemmstoffexperimenten wurde versucht die „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese selektiv zu hemmen, um so einen Hinweis auf die involvierten Enzyme zu erhalten.

Die Vorversuche zur Lösungsmittelverträglichkeit zeigten, dass die Zellen empfindlich auf die Zugabe der Lösungsmittel reagierten. Zusätzlich verursachten die zugegebenen Hemmstoffe z.T. ein vermindertes Zellwachstum und eine verminderte Zellvitalität. Dies konnte durch die Vitalitätsteste nach Towill und Mazur (1974) bei Gabe von hohen NDA und Trinex Konzentrationen (5×10^{-4} M NDA und 1×10^{-3} M Trinex) gezeigt werden. Solche Auswirkungen konnten bereits in vorhergehenden Arbeiten mit „Hairy root“ Kulturen von *Catharanthus roseus* beobachtet werden (Morgan und Shanks, 1999). Rademacher et al. (1987) und Zhang et al. (2002) erklärten dies mit dem Eingriff der Inhibitoren in die Hormon-Biosynthese, so hemmt Trinex α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen der Gibberellin-Synthese (Rademacher, 2000). Diese Eigenschaft wird inzwischen in der Landwirtschaft genutzt, da die verminderte Konzentration an Gibberellinen zu einem kürzeren Wachstum von Getreidehalmen führt. Dadurch werden die Getreidehalme verstärkt und können weniger leicht umknicken (Handelsbezeichnungen: Metro, Moddus, Primo Maxx).

Die Zugabe von PTOX zu Zellen der Linien 6M und PT führte zur Bildung des PTOX-Glucosid und nicht zur Synthese von 6MPTOX. Hinzu kommt, dass bei der Suche nach weiteren Hydroxylierungsreaktionen mit mikrosomalen Fraktionen der Linie 6M keine Umsetzung des PTOX durch CYP-Enzyme beobachtet werden konnte (4.5.2.5.). Dies bedeutet, dass an Position 6 von PTOX keine Hydroxylgruppe eingeführt werden kann. Diese Informationen zusammen mit den biochemischen Eigenschaften (niedrige K_M -Werte) der DOP6H und β P6OMT bestätigen die Reihenfolge der Reaktionen der 6MPTOX-Biosynthese von DOP zu β -Peltatin und schließlich zu PAM in den Linien 6M und PT (Abb. 5.5.).

Die Zugabe von DOP zu Zellen der Linie 6M resultierte bis Tag 12 in einem 12-fachen Anstieg des β -Peltatin-Gehaltes, einem 850-fachen Anstieg des PAM-Gehaltes und einem 2,4-fachen Anstieg des PTOX-Gehaltes im Vergleich zu den MeOH-Kontrollen. Der 6MPTOX-Gehalt änderte sich hingegen nicht. PAM wurde bis Tag 12 nicht weiter in 6MPTOX überführt. Die Gabe von DOP zu Zellen der Linie PT resultierte in einem 3,6-fachen Anstieg des PTOX- (PTOX-Glucosid-) Gehaltes und einem 1,2-fachen Anstieg des 6MPTOX-Gehaltes. Der Vergleich der Lignangehalte nach Aufarbeitung mit und ohne β -Glucosidase zeigte, dass die 6MPTOX- und PTOX-Glucoside nach Behandlung mit β -Glucosidase fast vollständig in ihre Aglyka umgesetzt wurden. Desweiteren stiegen auch die β -Peltatin-Gehalte nach Extraktion mit β -Glucosidase (Extraktionsmethode A) im Vergleich zu der methanolischen Extraktion (Extraktionsmethode B) an, was bedeutet, dass β -Peltatin ebenfalls in einer glucosylierten Form in den Zellen vorliegen kann (4.5.1.2. Abb. 4.26. c), d), g) und h)). Es stellt sich nun die Frage, ob β -Peltatin generell als Glucosid in den Zellen vorkommt (z.B. zu Transportzwecken), oder ob es der Zelle lediglich als eine Art „Notlösung“ dient, um das vermutlich toxische Intermediat aus dem Cytoplasma in die Vakuole zu schleusen. Diese Art der „Notlösung“ scheint für Linie PT die Methode der Wahl zu sein, da β -Peltatin generell in diesen Zellen zu akkumulieren scheint und nicht unmittelbar in PAM überführt wird (siehe hierzu auch die Charakterisierungsdaten 5.2.3. und 4.2.4, Abb. 4.12. b)). Für Linie 6M lässt sich dies nicht eindeutig bestätigen, da nur dann β -Peltatin angereichert wurde (Abb. 4.26. c) und d)), wenn eine Zugabe von DOP erfolgte. β -Peltatin scheint in Linie 6M somit unmittelbar in PAM überführt zu

werden, was zugleich bedeutet, dass sich DOP6H und β P6OMT in unmittelbarer Nachbarschaft an der ER-Membran befinden müssen.

Die Akkumulation von PAM in Linie 6M könnte dadurch zustande kommen, dass nur wenig PAM7H Aktivität vorhanden ist. Dies wiederum könnte auf eine geringe Anzahl an PAM7H-Molekülen, oder auf eine sehr langsame enzymatische Reaktion zurückzuführen sein. Es wäre auch denkbar, dass das zugegebene Lösungsmittel eine Schädigung oder Hemmung des Enzyms verursachte. Bei der Charakterisierung der Zelllinie 6M wurden an den Tagen 2, 7 - 8 erhöhte PAM-Gehalte gefunden (4.2.4., Abb. 4.12. a)). Dies scheint die Annahme der geringen PAM7H Aktivität zu bestätigen. Das Vorliegen einer geringen Molekülanzahl könnte einem komplexen Expressionsmusters der PAM7H zugrunde liegen, wodurch eine ausreichend große Enzymanzahl nur zu bestimmten Zeiten vorliegen würde. Dem widerspricht, dass ein ständiger Auf- und Abbau von solch speziellen Enzymen für die Zellen einen großen Energieaufwand bedeuten würde. Es sei denn, es handelt sich bei der PAM7H um eine „unspezifische“ enzymatische Reaktion, bei der unspezifische Hydroxylasen PAM in 6MPTOX überführen. Je nach Kultivierungszeit wären dann zwei bis mehrere verschiedene Hydroxylasen an einer solchen Umsetzung beteiligt. Ein „Rückstau“ an Intermediaten kann auch darauf beruhen, dass die involvierten Enzyme in verschiedenen Kompartimenten zu finden sind. So könnte beispielsweise die PAM7H in der Vakuole lokalisiert sein und PAM würde durch die Verzögerung des energieaufwendigen Transportes akkumulieren.

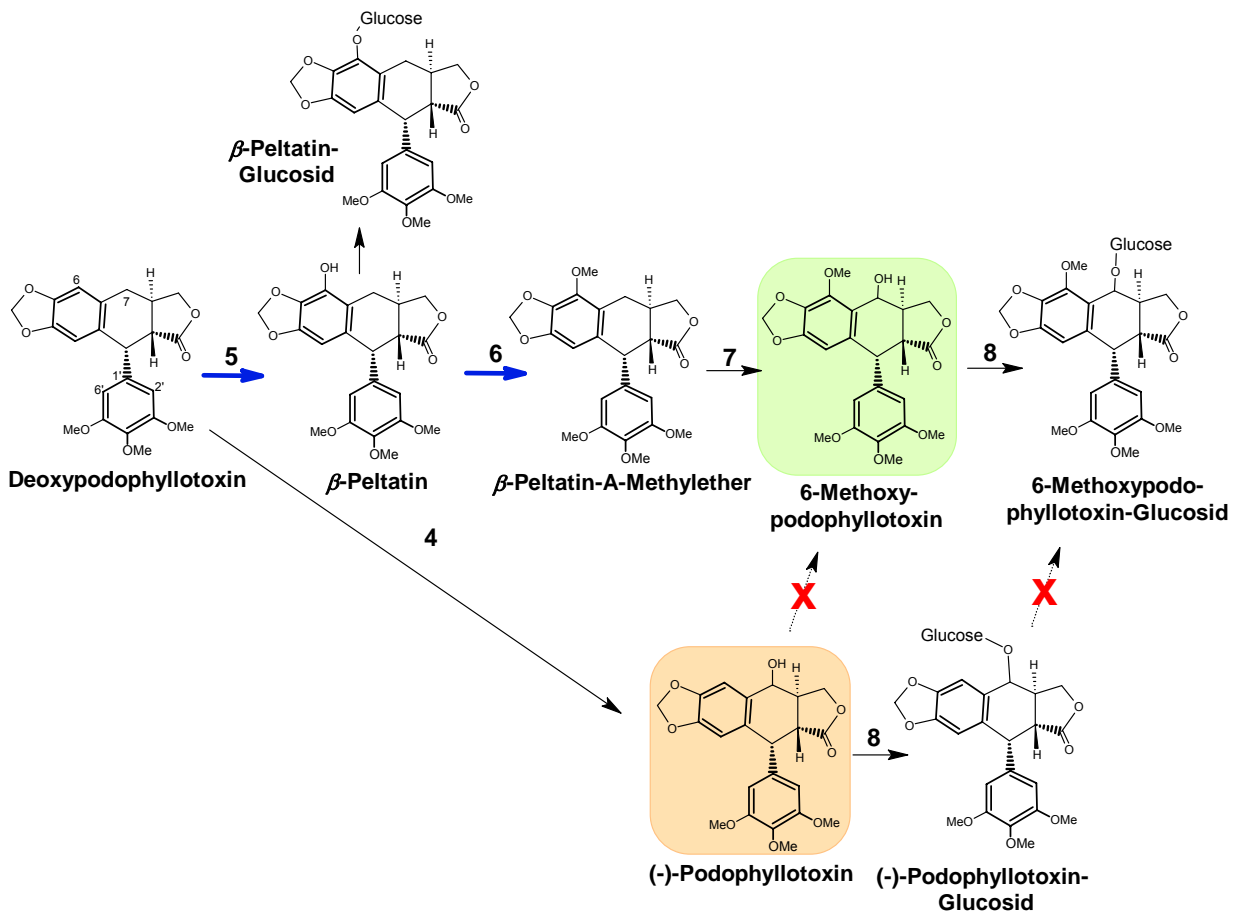


Abb. 5.5.: Biosyntheseweg von PTOX und 6MPTOX in Linie 6M

Blau gedruckte Pfeile kennzeichnen Reaktionsschritte die in *L. album* (5,6) detektiert wurden. 4: postulierte Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase (DOP7H); 5: Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H); 6: β -Peltatin 6-O-Methyltransferase (β P6OMT); 7: postulierte β -Peltatin-A-Methylether 7-Hydroxylase (PAM7H); 8: Glucosyltransferase (unbekannt); x: Umsetzung nicht möglich

Die durchgeführten Fütterungsexperimente bestätigten außerdem, dass DOP tatsächlich der Verzweigungspunkt der „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese ist. Dies wurde zunächst bezweifelt, da DOP ein sehr lipophiles Molekül und ohne Glucosylrest vermutlich nicht frei in der Zelle beweglich ist. Davin und Lewis (2003) verabreichten $[7\text{-}^3\text{H}]\text{-7-Hydroxymatairesinol}$ zu Wurzelgewebekulturen von *L. flavum* und fanden dieses transformiert in 6MPTOX. Daraus schlossen die Autoren, dass eine Hydroxylierung des Lignangerüsts an Position 7 bereits sehr früh im Stoffwechselweg erfolgen könnte, was auch die Wasserlöslichkeit des Moleküls begünstigen würde. Dagegen spricht die Tatsache, dass die Zugabe von 7-Hydroxymatairesinol zu *L. album* Zellsuspensionskulturen der Linie X4SF nicht in der Bildung von 6MPTOX oder PTOX resultierte, sondern in der Bildung von Matairesinol (Humburg, 2005). Hinzu kommt, dass der K_M -Wert der DOP6H für β -Peltatin (mit 1 - 3 μM) sehr gering ist, was dafür spricht, dass ein sehr spezifisches Enzym diese Hydroxylierung katalysiert.

In einem kombinierten Fütterungs- und Hemmstoffexperiment wurde versucht die „späten“-Schritte der Lignanbiosynthese selektiv zu hemmen. Die Gabe von 10^{-4} M NDA, CLOT oder ABT bei gleichzeitiger DOP-Gabe reichte aus, um die Bildung von β -Peltatin in Zellen der Linie 6M um 91, 82 bzw. 73 % zu unterbinden. Im Gegensatz dazu stiegen die PTOX-Gehalte nach Gabe von NDA, CLOT und ABT im Vergleich zu den Kontrollexperimenten um das 14,4-, 3,5- bzw. 5,3-fache an. Die DOP6H konnte somit, wie bei der biochemischen Charakterisierung bereits beschrieben, durch die CYP-Inhibitoren gehemmt werden, während die Bildung des PTOX erhöht wurde. Die Dioxygenase Inhibitoren PCA2,5 und Trinex zeigten keinen Einfluss auf die DOP6H Reaktion. Die Zugabe von PCA2,4 schien die Akkumulation von β -Peltatin und PAM zu fördern. Die PTOX-Synthese der Linie 6M wurde durch PCA2,5 und NDA geringfügig vermindert. Diese Befunde sprechen dafür, dass es sich bei der DOP7H der Zelllinie 6M nicht um ein CYP-Enzym handelt, sondern um eine andere Art von Hydroxylase, möglicherweise sogar eine α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase. Die geringe Hemmung der PTOX-Synthese durch NDA könnte aufgrund des Wirkmechanismus dieses Inhibitors zustande kommen, indem eine Interaktion zwischen dem freien sp^2 -hybridisierten N-Elektronenpaar des heterozyklischen NDA Ringes und dem Eisen-Ion im aktiven Zentrum eines Dioxygenase-Enzyms erfolgt. Vermutlich ist die Hemmung der PTOX-Synthese jedoch hauptsächlich auf eine verminderte Zellvitalität zurückzuführen, wie sie im zweiten Abschnitt dieses Kapitels diskutiert wurde. Die „allgemeine Störung“ der Zellfunktionen durch NDA-Gabe bewirkte möglicherweise, dass zugegebenes DOP schlechter verstoffwechselt wurde. Es wäre auch denkbar, dass Transportprozesse, wie beispielsweise der Transport der Lignankomponenten in andere Kompartimente (Vakuole) gehemmt wurden.

Es ist anzumerken, dass in keinem Testansatz der Biotransformation mit DOP eine Umsetzung von akkumuliertem PAM zu 6MPTOX beobachtet werden konnte, da die 6MPTOX-Gehalte nicht signifikant erhöht waren. Somit ist auch eine Enzymtypisierung der PAM7H nicht möglich. Die Gründe für das Fehlen der PAM7H bzw. der Akkumulation von PAM wurden bereits zuvor diskutiert.

Die Wirkung der Inhibitoren in einer Konzentration von 10^{-4} M auf die PTOX-Synthese in der Zelllinie PT war hingegen nicht eindeutig. ABT und Trinex schienen nach Zugabe von DOP die PTOX-Bildung geringfügig zu fördern, während CLOT, PCA2,4 und PCA2,5 diese verminderten. Trinex schien ebenfalls die Bildung von β -Peltatin und 6MPTOX zu begünstigen, während alle anderen Hemmstoffe die β -Peltatin-Bildung verminderten. Die 6MPTOX-Gehalte wurden durch PCA2,4, PCA2,5 und NDA (mit oder ohne DOP-Gabe) vermindert. Die Ergebnisse zeigten, dass die DOP6H durch CYP- und Dioxygenaseinhibitoren gehemmt werden konnte. In diesem Fall wäre keine Aussage über den Enzymtyp dieser Reaktion in Zelllinie PT möglich. Gleichzeitig wurde die DOP7H Reaktion nicht eindeutig durch eine bestimmte Hemmstoffklasse inhibiert, wodurch ebenfalls keine Aussage über den Enzymtyp möglich ist. Die Gehalte an β -Peltatin und 6MPTOX waren allerdings sehr gering in dieser Zelllinie, so dass man sie

möglicherweise vernachlässigen könnte. In einem solchen Fall wäre eine Hemmung der DOP7H durch PCA2,5, PCA2,4 und CLOT nach DOP-Zugabe als solche zu deuten. PCA2,5 und PCA2,4 würden dann auf die Hemmung einer α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase hinweisen, wohingegen CLOT eigentlich ein CYP-Inhibitor ist. Der Wirkmechanismus von CLOT wurde bereits beschrieben (5.3.). Nach Iwata et al. (1973) verursacht CLOT in *Candida albicans* Zellen ein Anschwellen der Mitochondrien Membranen und schadet den Zellen sehr stark. Dies könnte auch bei den *L. album* Suspensionskulturzellen der Fall sein, denn die TG der Linie PT nach CLOT- und DOP-Gabe waren sehr gering (Abb. 4.27.h)). Aus diesem Grund könnte die Wirkung von CLOT in Bezug auf die spezifische Hemmung der DOP7H fraglich sein.

Aufgrund dieser Experimente ist es jedoch nicht möglich den bei der DOP7H Reaktion involvierten Enzymtyp eindeutig zu bestimmen. Es ist aber möglich die Klasse der CYP-Enzyme auszuschließen.

Es wurde bereits unter 5.2.3. postuliert, dass die DOP6H der Schlüssel für die Bildung der unterschiedlichen Lignanakkumulierungsmuster sein könnte. D.h., wenn die DOP6H fehlt (sowie in Linie PT) könnte möglicherweise die PAM7H das toxische DOP in PTOX überführen. Mit anderen Worten, die Hydroxylierung von DOP und PAM an Position 7 könnte durch das gleiche Enzym katalysiert werden. Für Linie 6M wäre ein solches Szenario ebenfalls denkbar, indem die Substratpräferenz eindeutig auf PAM läge und DOP nur in geringem Maß als Substrat akzeptiert würde. Sollte diese Hypothese stimmen, so wäre die PAM7H/DOP7H kein CYP-Enzym, sondern eine andere Art von Hydroxylase. Unter Berücksichtigung der enzymatischen Versuche zur Auffindung der DOP7H und PAM7H (4.5.2.1.-3.) ist eine solche Hypothese jedoch kritisch zu betrachten (siehe folgendes Kapitel).

5.5.2. Enzymatische Suche

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf dem enzymatischen Nachweis der DOP7H und PAM7H. A. Henges (1999) widmete sich bereits vor einigen Jahren diesem Thema. In einem kombinierten Fütterungs- und Hemmstoffexperiment verabreichte sie DOP und NDA und konnte eine Hemmung der PTOX-Bildung beobachten. In zellfreien Extrakten der PTOX-produzierenden *L. album* Zelllinie X4 konnte sie eine geringe CYP-Aktivität nachweisen, die DOP in PTOX überführte. Die Messwerte der DOP7H Enzymaktivitäten variierten sehr stark und waren schwer reproduzierbar. Sie deuteten aber auf die Beteiligung eines CYP-Enzym hin.

Ihre Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass CYP-Enzyme Hydroxylierungen überwiegend nur an aromatischen Ringsystemen einführen können. Bisher wurden nur wenige Ausnahmen gefunden, die eine solche Reaktion an einfachen C-C-Bindungen katalysieren können. Zu diesen Ausnahmen gehören beispielsweise die CYP-abhängige Hydroxylierungen von Steroiden, die 12 β -Hydroxylierung von Digitoxin, die Reaktionen der Pterocarpan 6-Hydroxylase und der (+)-Limonen 6-Hydroxylase (Bouwmeester et al., 1998; Durst, 1991; Petersen, 1986). Für ein CYP-Enzym würde allerdings die Tatsache sprechen, dass der Substratzugang möglicherweise, so wie für das CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus* postuliert, nahe der ER-Membran erfolgt und dadurch das lipophile DOP direkt von der ER-Membran (ohne Wasserkontakt) zum Enzym gelangen könnte (Werck-Reichhart et al., 2002; Abb. 1.9.).

Die Fütterungs- und Hemmstoffexperimente mit *L. album* Zellsuspensionskulturen der Linie 6M und PT sprechen jedoch eindeutig gegen die Beteiligung eines CYP-Enzyms bei der Umwandlung von DOP zu PTOX (4.5.1.3., 5.5.1.). Die Beobachtungen von A. Henges (1999) dienen jedoch zunächst als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführte enzymatische Suche. Zunächst sollten die verschiedenen CYP-Enzymteste mit mikrosomalen Fraktionen der Linie PT wiederholt werden. Dabei konnten unabhängig von der Enzymaufarbeitung in den Testansätzen mit DOP und NADPH erhöhte PTOX-

Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen Stopp vor Start oder mit gekochtem Protein gefunden werden. Es schien zunächst, als würde es sich um eine enzymatische Umsetzung handeln. Aber die Durchführung weiterer Kontrollansätze, wie das Weglassen des Substrates DOP oder des Cosubstrates NADPH führten ebenfalls zur Bildung von PTOX im Vergleich zu den Kontrollen Stopp vor Start oder mit gekochtem Protein. Die erhöhten PTOX-Gehalte ohne Substrat- bzw. Cosubstrat-Zugabe könnten damit erklärt werden, dass die Substanzen in der mikrosomalen Rohproteinfraktion vorlagen und damit in den Enzymtest eingebracht wurden. DOP konnte tatsächlich in geringen Mengen (0,6 nmol/Testansatz) in den Kontrollen Stopp vor Start und mit gekochtem Protein gefunden werden. Das Auffinden von NADPH in reduzierter Form und in ausreichender Menge, um solch hohe PTOX-Ausbeuten zu erhalten, ist eher unwahrscheinlich. Vor allem im Hinblick darauf, dass in den DOP6H- und C4H-Enzymtesten die Zugabe von NADPH essentiell war. Desweiteren hatte die Zugabe von H₂O₂ oder α -Ketoglutar Säure anstelle des Cosubstrates NADPH ebenfalls erhöhte PTOX-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen mit gekochtem Protein zur Folge. Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass PTOX allein durch die Inkubation der Enzymteste bei 30°C gebildet wurde.

Es stellte sich somit die Frage, wie die hohen PTOX-Gehalte entstehen konnten, bzw. aus welchem internen Substrat die Umsetzung erfolgte und welches Cosubstrat (oder Cofaktor) für diese Reaktion benötigt wird. Eine direkte Umsetzung von DOP in PTOX-Glucosid durch eine Transferase oder Synthetase Reaktion, so wie für den 6MPTOX-Abbau diskutiert, wäre denkbar (5.2.3.), aber die Biotransformationsexperimente zeigten, dass DOP von den Zellen der Linie PT zunächst in PTOX überführt und dann glucosyliert wurde (4.5.1.2., Abb. 4.26. e)). Die Frage nach der Vorstufe von PTOX wurde bereits im Zusammenhang mit den Fütterungsexperimenten diskutiert. Von Davin und Lewis (2003) wurde die Hydroxylierung an Position 7 des Matairesinols als indirekte PTOX Vorstufe vorgeschlagen. Die Fütterungsexperimente von A. Humburg (2005) zeigten aber, dass die Zugabe von 7-Hydroxymatairesinol zu *L. album* Zellsuspensionskulturen der Linie X4SF nicht in der Bildung von 6MPTOX oder PTOX resultierten, sondern in der Bildung von Matairesinol. Weitere mögliche Vorstufen für eine Hydroxylierung an Position 7 wären 4'-DemethylDOP, DehydroDOP, Yatein oder eines der Thujaplicatine (Abb. 5.6.). Dagegen sprechen aber, wie bereits erwähnt, die Ergebnisse der Fütterungsexperimente. Die vermeintliche de-novo Entstehung von PTOX muss somit andere Gründe haben. Im Zusammenhang mit der Diskussion der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase Enzymteste wird auf eine mögliche Ursache näher eingegangen.

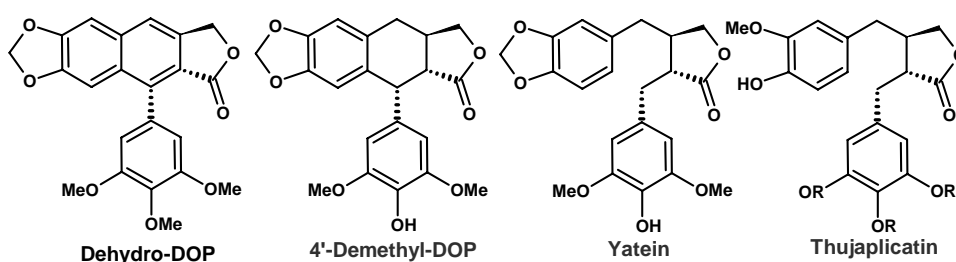


Abb. 5.6.: Mögliche PTOX-Vorstufen

DehydroDOP, 4'-Demethyl-DOP, Yatein und Thujaplicatin (Thujaplicatin, 5-O-Methylthujaplicatin oder 4,5-O,O-Thujaplicatin)

Die Enzymteste für α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen wurden im wesentlichen in Anlehnung an die Reaktion der Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus*, der Isoleucin Hydroxylase aus *Trigonella foenum-graecum* und der Flavonol Synthase aus Petersilie und *Citrus unshiu* durchgeführt (Britsch et al., 1981; DeCarolis et al., 1990; DeCarolis und DeLuca, 1994; Haefel  et al., 1997; Moriguchi et al., 2002). Bei den Enzymtesten mit löslicher Proteinfraktion konnten höhere PTOX-Gehalte gefunden werden, als in den CYP-Enzymtesten. Allerdings waren für den Erhalt von hohen PTOX-Gehalten kein

Eisensulfat, kein Ascorbat und kein DOP als Substrat notwendig. Für die enzymatische Aktivität der Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* war die Zugabe von Eisensulfat und Ascorbat ebenfalls nicht zwingend erforderlich, während für die volle Aktivität der Isoleucin Hydroxylase aus *Trigonella foenum-graecum* Eisensulfat, Ascorbat und α -Ketoglutarat notwendig waren. Erneut stellt sich die Frage nach der vermeintlichen de-novo Entstehung von PTOX. Möglicherweise ist die Erklärung bei den Enzymtesten in Puffern mit verschiedenen pH-Werten bzw. unterschiedlichen Puffern zu finden (4.5.2.2., Abb. 4.31.). Bei dieser Enzymtestserie waren die PTOX-Gehalte in den Kontrollen mit gekochtem Protein unabhängig vom verwendeten Puffer umso geringer, je höher der pH-Wert war. Es scheint als würde PTOX in den Kontrollansätzen mit gekochtem Protein im denaturierten Protein festgehalten und könnte bei der Extraktion mit Ethylacetat nicht freigesetzt werden. Somit wäre dieser Kontrollansatz unter Verwendung von hohen Puffer pH-Werten nicht aussagekräftig. Die PTOX-Gehalte in den Stopp vor Start Kontrollen waren unter Verwendung der Puffer KPi, MOPS und HEPES mit 7,0 nmol/Testansatz (KPi) bzw. 14,5 (MOPS) und 14,2 nmol/Testansatz (HEPES) sehr hoch, was bedeutet, dass die PTOX-Gehalte in der Proteinaufarbeitung bereits sehr hoch waren. Die Zugabe von α -Ketoglutarat, Ascorbat und Eisensulfat zu den vollständigen Dioxygenasetestansätzen in den so eben genannten Puffern führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der PTOX-Gehalte.

Bei der Verwendung von Tris/HCl Puffer sanken die PTOX-Gehalte mit steigendem pH-Wert in den Kontrollen Stopp vor Start und ohne Cosubstrat-Zugabe. Dies könnte auf eine pH-Wert-abhängige Degradierung des PTOX zurückzuführen sein. S. Kuhlmann (2004) fand heraus, dass 4'-Demethyl-DOP unter basischen Bedingungen nicht stabil ist. Bei der Verwendung eines KPi-Puffers pH 9,1 konnte er nach HPLC-Analyse ein primäres Abbauprodukt beobachten. Die Menge an 4'-Demethyl-DOP wurde um etwa 35 % verringert. Nach Inkubation bei pH 10,9 war 4'-Demethyl-DOP nur noch in Spuren zu finden und auch das primäre Abbauprodukt war kaum noch zu detektieren. Er schloss daraus, dass das primäre Abbauprodukt möglicherweise durch die Öffnung bzw. Spaltung des Lactonringes zustande kommen könnte. Dies könnte bedeuten, dass bereits während der Enzymaufarbeitung PTOX nicht mehr als solches vorliegt. Die Zugabe von α -Ketoglutarat verursachte in den Enzymtesten eine pH-Wert Verschiebung um 3 - 4 Einheiten. Dies könnte eine Lactonring-Rückbildung ermöglichen und somit die hohen PTOX-Gehalte in den Dioxygenasetestansätzen in Tris/HCl Puffer pH 8,8 erklären (Abb. 4.31. a) ganz rechts). Für diese Hypothese spricht, dass Entsalzen oder Dialyse der Proteinrohfraktion im Verlust der möglichen DOP7H Aktivität resultierte. Beim Entsalzen oder Dialysieren könnte zum einen ein essentieller Cofaktor oder ein Cosubstrat entfernt worden sein, ohne den die Reaktion nicht mehr ablaufen konnte, oder zum anderen die Vorstufe DOP und das bereits vorhandene Endprodukt PTOX. Allerdings wäre es auch denkbar, dass es durch Verdünnung der Proteinlösung beim Entsalzen zum Verlust der enzymatischen DOP7H Aktivität gekommen ist. Die Zugabe von verschiedenen Schutzreagenzien, wie z.B. BSA, Glutathion oder Leupeptin hätten in diesem Fall möglicherweise eine Denaturierung verhindert (Bouwmeester et al., 1998). Diese Möglichkeit wurde aber zunächst nicht weiter verfolgt, da es die Halbwertszeiten der enzymatischen Aktivität der DOP7H eventuell nur bedingt verlängert hätte. Die Halbwertszeiten der Dihydroxypterocarpan 6 α -Hydroxylase aus der Sojabohne liegen beispielsweise bei 9 - 18 min (Hagmann et al., 1984). Solch kurze Halbwertszeiten hätten einen eindeutigen enzymatischen Nachweis zusätzlich sehr erschwert.

Gegen diese Hypothese spricht, dass der pH-Wert der Proteinrohfraktion im Bereich von pH 8,0 - 8,2 lag, was bedeuten würde, dass noch ein großer Anteil des PTOX als solches in den Kontrollansätzen hätte auffindbar sein müssen. Zudem wurden alle Testansätze vor der Extraktion durch Zugabe von 0,6 M HCl abgestoppt, was eine starke pH-Wert Senkung auf pH 1 - 2 zur Folge hatte und eigentlich auch zur Rückbildung des Lactonringes hätte beitragen können. Es sei denn, dass eine solche Reaktion nur in Abhängigkeit des richtigen pH-Wertes (4 - 5) und der richtigen Temperatur (um 30°C) erfolgen kann. Abgesehen davon wird der Lactonring in *Forsythia intermedia* enzymatisch mittels der Secoisolariciresinol Dehydrogenase (SDH) unter Verbrauch von NAD geschlossen (Abb. 1.5.; Davin und Lewis, 2003). Bei der Verwendung von heterolog exprimierter SDH aus *Forsythia intermedia* konnten Xia et al. (2001) die Bildung des Lactol-Intermediates beobachten. Das pH-Optimum einer heterolog exprimierten

SDH aus *Podophyllum peltatum* lag dabei bei pH 8,8. Diese Informationen sprechen somit eher gegen die spontane Öffnung bzw. Rückbildung des Lactonringes.

Durch die exogene Zugabe von Elicitoren ist es bereits mehrfach gelungen die Sekundärstoffwechselproduktion von pflanzlichen Zellen zu erhöhen. So führte beispielsweise die Zugabe von Methyljasmonat zu Zellkulturen von *Catharanthus roseus* zu einer erhöhten Produktion von Aspidosperma-Typ Alkaloiden, der Produktion des Benzophenanthridinalkaloids in Kulturen von *Eschscholtzia californica*, sowie der erhöhten Nicotin-Bildung in *Nicotiana tabacum* (Aerts et al., 1994; Goossens et al., 2003; Schumacher et al., 1987). Methyljasmonat bzw. Jasmonsäure sind endogene Signaltransduktoren, die bei Verwundung oder Pathogenbefall aus Linolsäure der Plasmamembran freigesetzt werden. Sie scheinen z.T. direkt auf regulierende Sequenzregionen einwirken zu können. So wurden zum Beispiel Methyljasmonat-empfindliche Sequenzen in der ‚upstream‘ Promotorregion der Gene der Chalcon Synthase aus *Glycine max* und des Proteinaseinhibitors II aus verschiedenen Pflanzenblättern gefunden (Aerts et al., 1994; Farmer and Ryan, 1990; Mason et al., 1993). Wie bereits erwähnt, führte die Zugabe von Methyljasmonat auch zu einer Erhöhung der PTOX-Gehalte in Linie X4SF und PT (van Fürden et al., 2005). Die Gabe von Methyljasmonat zu Zellen der Linie 6M bewirkte hingegen keine Erhöhung der 6MPTOX-Bildung (van Fürden, persönliche Mitteilung).

Eine Erhöhung der PTOX-Gehalte in Linie PT nach Zugabe von Methyljasmonat konnte in diesem Fall nicht bestätigt werden, was vermutlich am frühen Erntezeitpunkt der Zellen an Tag 7 lag. Die Zugabe führte auch nicht zu einer Erhöhung der DOP7H Aktivität in den verschiedenen Enzymtestansätzen. Im Gegensatz dazu lieferte die Zugabe des Elicitors Coronalon erhöhte PTOX-Gehalte, die vor allem in der mikrosomalen Proteinfraction gefunden wurden (4.5.2.1. Abb. 4.30.). Die Durchführung von CYP-Enzymtesten lieferte dabei geringfügig erhöhte PTOX-Gehalte unter zusätzlicher Verwendung des regenerierenden Systems. Die Frage, ob es sich um eine enzymatische Umsetzung handelte, ließ sich nicht eindeutig klären, zumal der Vorrat des Coronalons sehr begrenzt war. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein chemisch modifiziertes, bakterielles Phytotoxin. Die Originalsubstanz Coronatin aus *Pseudomonas syringae* wurde strukturell so verändert, dass sie eine größere Strukturähnlichkeit zu biologisch aktiven Oxylipinen aufweist (Schüler et al., 2004; Abb. 5.7.). Der Wirkmechanismus scheint ähnlich zu dem des Methyljasmonat zu sein. Coronalon ist aber 10- bis 100-fach wirksamer als Methyljasmonat (Schüler et al., 2004). Berim et al. (2005) fanden die enzymatischen Aktivitäten der DOP6H und β P6OMT in Zellkulturen von *L. nodiflorum* um das 22- bzw. 15-fache erhöht. Die bisher durchgeführten Elicitierungsversuche mit Coronalon in Zellkulturen von *L. album* Linie PT wiesen bisher nicht auf eine Erhöhung der Aktivitäten dieser Enzyme hin (Ergebnisse der DOP6H-Aktivität - 4.5.2.1.; Ergebnisse der β P6OMT-Aktivität nicht gezeigt).

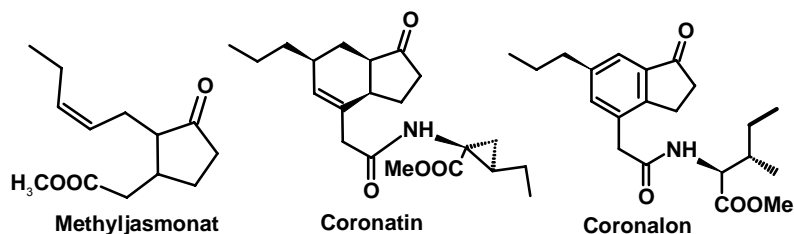


Abb. 5.7.: Methyljasmonat, Coronatin, Coronalon

Weder Methyljasmonat noch Coronalon waren in der Lage, den 6MPTOX-bildenden Stoffwechselweg in *L. album* signifikant zu erhöhen. Diese Information ist in sofern wichtig, als dass für die molekularbiologischen Experimente (SSH) mehrere Vergleichsmöglichkeiten zur Auswahl standen: Zum einen der Vergleich der Zelllinien 6M und PT (so wie durchgeführt, 4.5.4.3.) und zum anderen der Vergleich der Zellen der Linie PT elicitiert mit Coronalon mit nicht-elicitierten Zellen. Unter Verwendung der Zelllinie PT

(elicitiert/nicht-elicitiert) hätte man theoretisch nur den Hinweis auf ein putatives DOP7H Enzym erhalten können. Da aber bisher kein Hinweis auf den involvierten Enzymtyp existiert, wäre eine Identifikation sehr schwierig. Unter Verwendung bzw. Vergleich der beiden verschiedenen Zelllinien war die Möglichkeit gegeben Hinweise auf die Enzyme der DOP6H und DOP7H zu finden. Da der Enzymtyp der DOP6H bekannt ist, dürfte die Identifizierung dieses Enzyms weniger schwierig sein. Aus diesem Grund wurde bei der Durchführung der SSH-Experimente der Vergleich der beiden Zelllinien 6M und PT gewählt (5.7.).

Für die PAM7H konnte weder eine mögliche CYP- noch eine Dioxygenaseaktivität detektiert werden. Der Nachweis auf eine geringe CYP-Aktivität gelang lediglich einmalig nach Elicitierung der Zellen der Linie PT mit Coronalon. Aus diesem Grund ist keine Aussage über den involvierten Enzymtyp der PAM7H Reaktion möglich. Desweiteren konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der PAM7H bzw. DOP7H um das gleiche Enzym handelt.

Bei der Suche nach ‚weiteren Hydroxylierungen‘ konnte keine weitere CYP-Reaktion mit mikrosomaler Fraktion aus Zellen der Linie 6M mit den Substraten PTOX, Matairesinol, Yatein, 4'-Demethyl-DOP, β -Peltatin oder α -Peltatin gefunden werden (4.5.2.5.). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis, dass die Einführung der Hydroxylgruppe nur an DOP erfolgen kann. Desweiteren zeigt es, dass die DOP6H ausschließlich DOP als Substrat akzeptiert und somit ein sehr enges Substratspektrum hat.

Glucosyltransferasen stellen neben OMTs und CYPs eine weitere Großgruppe von wichtigen Pflanzenenzymen dar. Allein in *Arabidopsis thaliana* konnten bisher 110 Glucosyltransferasegene gefunden werden, wobei ein Großteil dieser Enzyme vermutlich an der Regulation von Pflanzenhormonen, Signalmolekülen oder der Detoxifikation von Xenobiotika beteiligt sind. Ein kleiner Teil ist vermutlich an der Biosynthese und Lagerung von Sekundärstoffwechselprodukten beteiligt (Kaminaga et al., 2004). Einige Glucosyltransferasen scheinen ein sehr breites Substratspektrum zu haben wie z.B. die 5-O-Glucosyltransferase aus *Solanum soganandum*, während andere wie die UDP-Glucose:Coniferylalkohol Glucosyltransferase aus ‚Paul’s scarlet rose‘ fast ausschließlich Coniferyl- und Sinapylalkohol zu akzeptieren scheint (Ibrahim und Grisebach, 1976; Lorenc-Kukula et al., 2004).

Die Zugabe von β -Glucosidase zu Proteinfractionen der Linie PT ergab keinen Hinweis, ob die PTOX-Bildung durch die Freisetzung von PTOX aus seinem Glucosid entstand, aber erstmals konnte in *L. album* Zelllinie PT eine „UDP-Glucose:PTOX Glucosyltransferase“ detektiert werden. Die enzymatische Aktivität konnte allerdings nur nach vorheriger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung im Überstand der 50 %igen Fraktion gefunden werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich um ein lösliches Protein handelt, welches aber nur in geringer Konzentration in den Zellen vorliegt. Ähnliches fand auch J. Windhövel (1989) bei der enzymatischen Suche nach der Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase (CCR), die erst nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung im Pellet der 30 - 45 %igen Fraktion gefunden werden konnte. Eine genauere Untersuchung der ‚UDP-Glucose:PTOX Glucosyltransferase‘ und weitere Tests auf die genaue Substratspezifität konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

5.6. Proteinanalytik

Die vergleichende Proteomanalyse diente auch dazu, im Hinblick auf die Suppressiv-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) Unterschiede zwischen den Zelllinien sichtbar zu machen. Erwartungsgemäß konnten beim Vergleich der einzelnen Ammoniumsulfat-Fractionen einige deutliche Unterschiede gefunden werden. Insgesamt waren 85 Proteinbanden als unterschiedlich starke Banden mit bloßem Auge sichtbar (Abb. 4.35.). Eine Analyse aller Banden im Rahmen eines Proteomprojektes war aus Kostengründen nicht möglich. Daher wurde die Suche auf eine mögliche differentiell exprimierte DOP6H in der mikrosomalen Proteinfraction beschränkt. Von 18 unterschiedlichen Proteinbanden wurden vier mittels Nano-elektrospray Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die Ergebnisse wiesen auf eine putative ‚Sucrose Synthase‘ und ein HSP-Protein aus Zellen der Linie PT hin. Die Sucrose Synthase (Synonyme: Sucrose-UDP Glucosyltransferase, Sucrose-Uridin Diphosphat Glucosyltransferase, UDP-Glucose-Fructose Glucosyltransferase, Uridin Diphosphoglucose-Fructose Glucosyltransferase; EC 2.4.1.13) katalysiert die Synthese und Spaltung (Rückreaktion) von UDP-Glucose und Fructose in Saccharose unter Freisetzung von UDP. Sie spielt vor allem bei der Biosynthese von Cellulose und Callose eine Rolle. Bisher konnten in Pflanzen und Prokaryoten etwa 30 verschiedene Gene isoliert werden. Es wurden Membran-assoziierte, lösliche und Aktin-gebundene Vertreter dieses Enzyms gefunden (Amor et al. 1995; Römer, 2003; Winter et al., 1998).

Von der putativen Sucrose Synthase aus *L. album* wurden fünf kurze Peptidsequenzen aufgeklärt. Ein Sequenzalignment mit den Sucrose Synthasen aus *Gossypium hirsutum* und *Citrus unshiu* ergab keine 100 %ige Übereinstimmung zu den *L. album* Peptiden (Abb. 4.38.). Es wäre daher denkbar, dass dieses putative Enzym nicht ausschließlich auf die Übertragung von UDP-Glucose auf Fructose spezialisiert ist, sondern möglicherweise die Übertragung von UDP-Glucose auf PTOX (oder 6MPTOX) katalysieren kann. Erste Hinweise auf eine solche UDP-Glucosyltransferase konnten bei der enzymatischen Suche gefunden werden (4.5.2.6.; 5.5.2.). Allerdings ergab ein Alignment der Peptidsequenzen mit verschiedenen Glucosyltransferasen und den Sucrose Synthasen aus *Citrus unshiu* und *Gossypium hirsutum*, dass eine höhere Sequenzähnlichkeit zu den Sucrose Synthasen besteht und nicht zu den Glucosyltransferasen (Abb. 5.8.). Daher muss davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ein Enzym des Primärstoffwechsels gefunden wurde und nicht eine Lignan-spezifische Glucosyltransferase.

Eine bessere Auftrennung der mikrosomalen Proteinfraction beider Zelllinien sollte mittels der 2D-Gelelektrophorese erreicht werden. 2D-Gelelektrophoresen werden normalerweise in Form einer isoelektrischen Fokussierung mit anschließender SDS-Page durchgeführt. Für membrangebundene zumeist basische Proteine ist die isoelektrische Fokussierung jedoch nur eingeschränkt möglich. Die Blue-Native Gelelektrophorese kann daher als Alternative dienen um Membranproteine oder größere Membrankomplexe zu analysieren. Diese Methode wurde vor allem für die Charakterisierung von Photosystemen verwendet (Kügler et al., 1997; Heinemeyer et al., 2004). Der Vergleich der mikrosomalen Proteine beider Zelllinien ließ einige Unterschiede erkennen, aber es konnten nur wenige Spots als solche identifiziert werden. Da es zudem nicht gelang, die aufgetragene Proteinmenge soweit zu erhöhen, dass die Unterschiede mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden konnten, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

Peptid 6/1	-----DELVLLSR-----	-----VLQEG
PG	-----MGQLHFFFPVMAHGHIPTLDMAKLFAS-----RGVKATIIITPLNEFVFSKAIQRNKHGLGIEIERLRIKFFPAVENGLPEEC	78
F7OG	-----MGQLHIVLVPMIAHGHIPTLDMAKLFSS-----RGVKTIIATP-----AFAEPIRKARESGHDIGLTTKFPKGSLLPDNI	74
COG	-----MVSETTKSSPLHFVLPFMAQGHMIPMVDIARLLAQ-----RGVITIVTTPHNAARFKNVNLNRAIESGLPINLVQVKFPLYEAGLQEQG	85
SSG	-----MAERALTRVHSLRERLDTLTAH-----RNEILALLSRIE-----GKGKGIILHQQIILEFEAIPENENRKLADG	65
SSC	-----MAERALTRVHSLRERLDTLSAH-----RNEILALLSRIE-----GKGKGIILQHQLIAEFESISEENRKHLEAG	65
HAOG	-----MGSESKLVHVFVLSFPQGQHVNPILLRGLKRLAS-----KGLLVTFPTPEISIG-KQMRKASNITDQPTPVGDGMIRFEFFEDGDWENE	81
F3OG	MAPADAESSPPHVAVVAFPPSSHAAVLLSARALAAAAAPS GATLSFLST ASSLAQLRKASSASAGHGLPGLNRFFVEVPDGA AAEETV	90
Peptid 1/2	AFGDVLR -----	-----LSGD
PG	ERLDQIP SDDEKLPNFFKAVAMMQEPLEQLIEEC--RPDCLISDMFLPWTTDTAAKFNIPRIVFHGTSFFALCVENSVRNLN--PFKNVSSD	165
F7OG	RSLDQVT -DDLLPHFFRALELLQEPVEEIMEDL--KPDCLVSDMFLPWTTDSAAKFGIPRLLFHGTSLFARCFAEQMSIQK-PYKNVSSD	161
COG	ENIDSLD TMERMIFFKAVNFLEEPVQKLIEMNRPSPCLISDFCLPYTSKIAKFNIPKILFHGMGCFCLLCMHVLRKNREILDNLKSD	175
SSG	AFFEILK ASQEXIVLPPWVALAVRPRGVWEYIRVNVHALVVEELVVAEYLRFKKEELVDGSSNANFVLELDFEPFNASFPRPTLSK SI GN	155
SSC	AFGEVLR ATQEAIVLPPWVALAVRPRGVWEYIRVNVHALVVEELVVAEYLRFKKEELVDGSSNANFVLELDFEPFNASFPRPTLSK SI GN	155
HAOG	PKRQDL LDLYLPQLELVGKIIPEMIKKNAEQDR--PVSCLINNPFIPWSDVADDGLPSAMLVWQSCACLSTYHYHYHGLVFPSE AE EP	169
F3OG	PVPRQML FMEAAEAGGVKAWLEAARASAGGAR---VTCVVGDVFWVPAADAASAGAPWVFWVTAASCALLAHIRTDALREDVGD QAAN	177
Peptid 2/5	GVEFLNR -----	-----FQDLGLER
PG	SETFVVP DLPHIEIKLTR-TQVSPFERS-GEETAMTRMIKTVRESDSKSYGVVNSFYELETDYVEHY-TKVLGRR AWAI GPLSMCNRDIE	252
F7OG	SEPFVLR GLPHEVSVFR-TQIPDYELQEGDDAFSKMAKQMRDADKKSYGDVINSFELESEYADYN-KNVFGK AWHI GPLKLFNNRAE	249
COG	KELFTVP DFPDRVEFTR-TQVPVETYPAGD--WKDIFDGMVEANETSYGIVNSFQELEPAYAKDY-KEVRS GAWTI GPVSLCNKVG	261
SSG	GVEFLNR HL SAKLF HDKESMHPLEFPPEVHSHKGNMMLNDRIQNLNSLQHVLRKAEYLVALPAETPYAEFEHK FQEI GLERGWGD TAE	245
SSC	GVEFLNR HL SAKLF HDKESMHPLEFLRVHCHKGNMMLNDRIQNLNSLQHVLRKAEYLVAPETPFSE LALR FQEI GLER GWGD TAE	245
HAOG	EEDVQL PCMP---LLKYDEIASFLYPTTYPPLRRAILGQYKNLDPKPCILMDTFQLELEPEVIEYMSKICP---IKPV G PLYKPKVPN	252
F3OG	RVDGLLI SHPLGLASVYRDLDPGVVSGDFNVYINLLVHRMGQCLPRSAVAALNTFPLDPPDVTAALAEILPN-CV FP GPYHLLLAEDD	266
Peptid	-----	-----
PG	DKAE-RGKSSIDKHECLKWLDKPKSSVVYVCFGSVANFTASQHLHELAMGIEASGQEFIWVVV---TELDNEDWLP-EGFEERTKEKGL	337
F7OG	QKSSQ RKESA IDDHECLAWLNSKPPNSVVMCFGSMATFPAQLHETAVGLESSGQDFIWVVV---NGGENEDWLP-QGFEERIKGKGL	335
COG	DKAE-RGNKSDIDQDECLKWLDKPKKHSVLYVCLGSI CNLPLSQLKELGLGLEESQRPFIWVIRGWEYKELVEWFSSES GF EDRIQDRGL	350
SSG	RVLEMIQ LLD LEAPDPCTLEK-FLGRIPMVFNVILTPHGYFAQDNVLYGPDYDGGQVVIYLLD-----QVRALENEMLNRIQ Q GL	326
SSC	RALEMIQ LLD LEAPDPCTLET-FLGRIPMVFNVILTPHGYFAQDDVLYGPDYDGGQVVIYLLD-----QVRALEDEMLLR I Q Q GL	326
HAOG	AAVR---GDFMKADDCIEWLDSKPPSSVVYISFGSVVYLKQEVDEIAYGLLNSGVQFLWVMKPPHKDAGLELLVLE PE GFLEKAGDKG	338
F3OG	ADTA---APADPHGCLAWLGRQPARGVAYVSFGVACRPDELRELAAGLEDSEGAPFLWLSL-----EDSWPHLPPGLDR AA GTGS	345
Peptid 3/4	-----VYGTQYSDLLR-----	-----FEVWPYQK
PG	-IIR WAPQ VLLLDHESVGFVTHCGWNSTLEGVSGVPMVTPVFAEQFFNEKLVTEVLK TGAGV GSIQ---WKR S --ASEGV KREAI A	421
F7OG	-MIR WAPQ VMLDHPSTGAFVTHCGWNSTLEGI CAGL PMVTPVFAEQFFNEKLVTEVLK TGVS VGNK---WQ R ---VGEV GSEAV K	418
COG	-L KG WSPQMLILSHSPVGGF L THCGWNSTLEGI TAGL PL TW LFADQFCNEKLVTEVLK AGVRS GV EQ PMKW EE KIGV LD KEG V K	439
SSG	-N IT ---P RI LIITRLLPDAVGTTC Q RLEK VYGT Y SDI LRIPFRTEKGI VRR WIS R FEV W PY LE TY TED V A HE I SK EL Q G PD LI IG N	412
SSC	-D IT ---P QI LIITRLLPDAVGTTC Q RLEK VYGT K YSDI LRV PF TEKGI VRR WIS R FEV W PY LE TY TED V A HE I SK EL Q G PD LI IG N	412
HAOG	-V VQ WSP Q EV L AHP S VAC F VTHCGWNS M EALSSGMPV V FP Q WGD Q VTDAKYLV D V F K V VR M CR GEA -----EN KLI TR DE VE	418
F3OG	GLV V W APQ VAVLR HP SVGFVTHAGWASVLEGLSSG V PMAC R PF GDQ RMNARS V AHV W GF AAE -----EGAM T S AG VA	421
Peptid	-----	-----
PG	KAIK RM VS- E AD G FR NR AK AY K EM ARK AE EGGSS Y TGL T LL ED IS T Y S ST G H-----	476
F7OG	E A VER VM V G - D GA E MR S R AL Y K EM AR KA VE EGGSS Y NN L AL IE LS A Y V PM K Q GL N-----	476
COG	K A VE E LM G ES D AK ER RR R AK EL GD S A H KA VE EGGSS S NS I FL L Q D IM E LA E PN N -----	495
SSG	Y S GG N IV A S LL A H KL G VT Q CT I A H A L E K TK Y PD S DI Y W K LE-----	454
SSC	Y S D G NI V A S LL A H K L G VT Q CT I A H A L E K TK Y PD S DI Y W K LN D D K Y H F S Q F T A D L I A M N H T D F I I T S T F Q E I A G S K D V G Q	493*
HAOG	K C L I E A T T G- E KA E L K EN T M K W K AA E EA V AE G SS S DR N L Q EV D VE V RR M S M EL V CK S K I -----	479
F3OG	T A VE L LR G - E GA R MR AR AK EL Q AL V A E A F G PG G E C R K N F ER F VE I V C RA-----	471

Abb. 5.9.: Sequenzalignment (ClustalW) der Peptidsequenzstücke aus *L. album* Linie PT Bande 3 mit zwei Sucrose Synthasen und fünf Glucosyltransferasen;

Die Lage der Peptide ist farbig markiert. Legende: PG - Phenylpropanoid:Glucosyltransferase 1 aus *Nicotiana tabacum* (accession no. AAK28303), F7OG - UDP-Glucose:Flavonoid 7-O-Glucosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* (accession no. BAA83484), COG - Cytokinin-O-Glucosyltransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* (accession no. Q9ZQ94), SSG - Sucrose Synthase aus *Gossypium hirsutum* (accession no. AAD09568), SSC - Sucrose Synthase aus *Citrus unshiu* (accession no. BAA89049), HAOG - Resveratrol/Hydroxyzimtsäure O-glucosyltransferase aus *Vitis labrusca* (accession no. ABH03018), F3OG - UDP-Glucose flavonoid-3-O-glucosyltransferase aus *Zea mays* (accession no. ABF72121); [Anmerkung: bei den Sequenzen der Sucrose Synthase aus *Citrus unshiu* und *Gossypium hirsutum* handelt es sich um die gleichen, die in Abb. 4.38. gezeigt sind. Aus Platzgründen wurden die Sequenzen umbenannt; * die Sequenz SSC wurde nur bis Aminosäure 493 dargestellt, die Originalsequenz geht bis 805]

5.7. Molekularbiologie

Die Unterschiede der Genexpression der beiden Zelllinien 6M und PT sollten auch molekularbiologisch genutzt werden. Mehrere Methoden standen für einen cDNA-Vergleich zur Verfügung - die cDNA-AFLP, das ‚differential Display‘ oder die Suppressive-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) (Breyne und Zabeau, 2001; Diatchenko et al., 1996; Lottspeich und Engels, 2006).

Bei der cDNA-AFLP handelt es sich um eine sehr aufwendige Methode, um differentiell exprimierte Gene zu untersuchen. So wurden von Breyne und Zabeau (2001) Tabakzellen untersucht, die sich in verschiedenen Stadien des Zellzyklus befanden. Sie verwendeten dazu 360 verschiedene Primerpaare und erhielten etwa 18.000 unterschiedliche AFLP ‚tags‘. Neben dem großen Aufwand ist die Auswahl der richtigen Primerpaare entscheidend. Dies gilt auch für das ‚differential Display‘.

Bei der Suche nach CYP-Enzymen fällt die Auswahl geeigneter Primer extrem schwer, da die Sequenzidentität innerhalb der pflanzlichen CYPs äußerst gering (< 20 %) ist und sich die Identität lediglich auf sehr kurze Bereiche beschränkt (1.5.1.1.). Neben dem hydrophoben N-Terminus, der sog. „Hinge“-Region [Konsensussequenz (P/I)PGPx(G/P)xP] beschränken sich diese Bereiche auf die I-Helix [Konsensussequenz (A/G)Gx(E/D)T(T/S)], die „ERR“-Triade, bestehend aus der Konsensussequenz „KETLR“ und „PERF“ und die Häm-Binderegion [Konsensussequenz PFxxGxRxCxG] (Durst und Nelson, 1995; Hasemann et al., 1995; Schuler, 1996; Werck-Reichhart et al., 2002).

Ikezawa et al. (2003) verwendeten beispielsweise in einer einfachen PCR degenerierte Primer für die Helix K (umfasst die Konsensussequenz „KETLR“) und die Häm-Binderegion, sowie nested Primer dieser beiden Regionen (Abb. 1.8.). Damit gelang ihnen letztendlich das Auffinden zweier CYP-Enzyme aus *Coptis japonica*. Mittels solch einer einfachen PCR-Methode und den soeben erwähnten Primerpaaren wurde versucht cDNA Fragmente aus *L. album* Linie 6M zu amplifizieren (Daten nicht gezeigt). Es gelang ein cDNA Fragment zu klonieren und mittels 3'- und 5'-RACE Experimenten dieses zu verlängern. Der nach Sequenzanalyse durchgeführte Blastx-Datenbankvergleich deutete auf eine ‚Reverse Transkriptase‘ hin und nicht auf ein CYP-Enzym. Dieses Experiment zeigte, dass die Auswahl der richtigen Primer essentiell für das Auffinden von CYP-Sequenzen ist.

Eine andere Auswahl an Primern verwendeten Fischer et al. (2001) in Kombination mit einer nested RT-PCR Methode. Es gelang ihnen mit vier verschiedenen nicht-degenerierten Primern gegen die „EEF(R)PER“-Region in Kombination mit einem Oligo dT-Primer cDNA Fragmente zu amplifizieren, deren Signale in einer nested PCR verstärkt werden konnten. In dieser folgenden nested PCR wurden acht verschiedene Primer gegen das PFG-Motif (Häm-Binderegion) zusammen mit Poly A-Primern verwendet. Insgesamt konnten mit dieser Methode 34 putative CYP-ESTs aus *Lolium rigidum* und 10 aus *Ocimum basilicum* isoliert werden. S. Specker (2004) gelang es mit diesen Primern unter Verwendung der ‚differential Display‘ Methode fünf verschiedene CYP-ESTs aus *Ammi majus* zu isolieren.

Diese Versuche ließen darauf schließen, dass die ‚differential Display‘ Methode mit den oben genannten Primerpaaren möglicherweise im Hinblick auf das Auffinden der DOP6H erfolgreich sein könnte. Aber in diesem Fall wäre eine Erfassung weiterer Sequenzen wie z.B. für eine putative DOP7H oder PAM7H nicht möglich gewesen. Wie der Sequenzvergleich in Abb. 1.11. zeigt, weisen α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen an einigen Stellen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und das Design von Primern wäre möglich. Da bisher aber keine Informationen über die Enzyme PAM7H und DOP7H vorliegen, besteht keine Möglichkeit mittels der cDNA-AFLP oder ‚differential Display‘ diese Enzyme zu finden. Aus diesem Grund wurde die SSH-Methode für den Vergleich der Genexpressionsprofile der beiden Zelllinien verwendet. Desweiteren sprach für die SSH-Methode nach Diatchenko et al. (1996), dass vor allem Gene isoliert und angereichert werden sollen, die in geringer Abundanz vorliegen.

Die SSH wurde für die Verwendung an tierischen Systemen entwickelt, was man auch an den Kontrollen des Kits (Skelettmuskel-cDNA und Humane Plazenta RNA) erkennen kann. Vor allem wird sie für die differentielle Untersuchung von Tumorgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe eingesetzt. Inzwischen wurde die Methode aber auch erfolgreich bei pflanzlichen Systemen eingesetzt. So wurden z.B. differentiiell exprimierte Gene aus Kartoffel-, Tomaten- und Reispflanzen isoliert, wobei in diesen Fällen gesunde Pflanzen mit pathogen-befallenen verglichen wurden (Beyer et al, 2001; Birch et al., 1999; Liu et al., 2001; Werner et al., 2001; Xiong et al., 2001).

Die Effizienz der SSH-Methode scheint sehr unterschiedlich zu sein. Wie bereits unter 4.5.4.4. erwähnt, kann sie zwischen 95 und 5 % liegen (Diatchenko et al., 1996; 1998). Wobei unter Effizienz der Anteil an Klonen zu verstehen ist, der tatsächlich differentiiell exprimierte cDNAs repräsentiert. Der Anteil an sog. ‚falsch-positiven‘ Klonen kann daher mitunter sehr hoch sein. Birch et al. (1999) fanden bei SSH-Experimenten mit Kartoffelpflanzen 10 % an tatsächlich differentiiell exprimierten cDNAs. Wawrzyńska et al. (2005) fanden bei einem Vergleich von Tabakpflanzen mit bzw. ohne Schwefelzugabe lediglich 5 % differentiiell exprimierter Sequenzen. Xiong et al. (2001) konnten 4,4 % der Reisklone als differentiiell bestätigen, während Beyer et al. (2001) lediglich 1,4 % fanden. Über die Effizienz dieses SSH-Experimentes dieser Arbeit lässt sich noch keine genaue Aussage machen, da die subtrahierten cDNA-Banken lediglich mittels Macroarray-Experimenten verifiziert wurden, um „falsch-positive“ cDNAs auszuschließen. Eine weitere Überprüfung der cDNA Sequenzen mittels semiquantitativer PCR oder Northern Blot Analysen konnte aus Zeitgründen noch nicht durchgeführt werden.

Die subtrahierte cDNA-Bank der Linie 6M lieferte von insgesamt 671 untersuchten cDNA Sequenzen 107 (16 %) vermeintlich differentiiell exprimierte, während bei Linie PT von 563 untersuchten cDNA Sequenzen 131 (20 %) möglicherweise differentiiell exprimiert sind. Nach Abzug der unbekannt Sequenzen und mehrfach vorkommender cDNAs verbleiben 33 cDNAs für Linie 6M (5 %) und 37 für Linie PT (7 %).

Die Durchführung der SSH erwies sich zunächst als schwierig, wie die Ergebnisse der Adapterligation zeigten (4.5.4.3.), zumal keine direkten Vergleichsmöglichkeiten mit anderen pflanzlichen Systemen möglich waren. Die einzige Erklärung für das Auffinden der 400 bp großen cDNA-Bande, anstelle einer cDNA-Bande > 1000 bp, wäre eine unspezifische Bindung des PCR 1 Primers. Da es aber keinen Hinweis auf eine fehlgeschlagene Adapterligation gab und auch das zweite Kontrollexperiment nach Rebrikov (2003) erwartungsgemäße Ergebnisse lieferte, wurde mit der Hybridisierung der cDNAs fortgefahren.

Bei den ersten Macroarray-Experimenten trat sowohl in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M als auch in der Linie PT jeweils eine Sequenz auf, die eine geringe Sequenzähnlichkeit zu einer Catalase aufwies. Catalasen (H_2O_2 :Oxidoreduktasen) sind vor allem an der Stressabwehr beteiligt, in dem sie toxisches H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff überführen (Bethards et al., 1987; Wawrzyńska et al., 2005). Die Sequenzen beider Linien stimmten allerdings nur bedingt am 5'- und 3'-Ende überein. Bei der Blastx-Suche, die den Hinweis auf eine Catalase lieferte, stimmten bei der Sequenz der Linie 6M lediglich die Aminosäuren 468 - 490 der Catalase überein. Bei der Sequenz der Linie PT waren dies die Aminosäuren 468 - 493. Außer dieser geringen Sequenzähnlichkeit konnte kein weiterer Hinweis auf ein Protein mit bekannter Funktion gefunden werden [Megablast-Suche ergab: *Zea mays* mRNA for autophagy protein 9 (atg9 gene; accession no. AM085516)]. Durch Hybridisierung der nachfolgenden Macroarray-Experimente mit Sonden der jeweiligen putativen Catalase der Linie 6M bzw. PT konnten diese Fragmente markiert und dadurch die Anzahl der zu sequenzierenden cDNAs beträchtlich gesenkt werden.

Die Anzahl der „**unbekannten**“ cDNA Fragmente war mit 58 (9 %; Linie 6M) bzw. 42 (7 %; Linie PT) sehr hoch. Unter diesen „unbekannten“ Fragmenten wurden alle Sequenzen zusammengefasst, die bei

der Blastx-Suche keine Sequenzähnlichkeit zu einem Protein oder einem Protein mit bekannter Funktion ergaben. Neun (Linie 6M) bzw. zwei (Linie PT) dieser cDNAs schienen dabei subtrahiert zu sein.

Interessanterweise fanden Xiong et al. (2001) ähnliche Ergebnisse. Bei einem Vergleich von unbehandelten Reiskeimlingen mit solchen, die mit Cycloheximid und Jasmonsäure bzw. Cycloheximid und Benzothiadiazol behandelt wurden, fanden sie nach SSH, anschließenden Macroarray-Experimenten und Northern Blot Analysen von insgesamt 34 differentiellen cDNAs 19 Unbekannte. Diese „unbekannten“ Sequenzen wiesen entweder Sequenzähnlichkeit zu *Arabidopsis*-Proteinen mit unbekannter Funktion auf oder zeigten keine Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen.

Aus der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M wurden Hinweise auf drei verschiedene **Primärstoffwechsellenzyme** gefunden. Die Inositol-3-Phosphat Synthase bzw. Inositol-1-Phosphat Synthase wurde bereits im Zusammenhang mit den Leitfähigkeiten und den pH-Werten des Mediums angesprochen (5.2.1.). Wobei die cDNA Sequenz der putativen Inositol-3-Phosphat Synthase ein schlechtes Sequenzierungsergebnis ergab. Es ist somit fraglich, ob diese Sequenz tatsächlich subtrahiert ist. Im Gegensatz dazu scheint die Inositol-1-Phosphat Synthase in Linie 6M überexprimiert zu sein. Zwei cDNAs zeigten Sequenzähnlichkeit zu einer Mo-Molybdopterin Cofaktor Sulfurase (ABA3) aus *Arabidopsis thaliana*. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches die Aktivität der Molybdän-Enzyme wie der Aldehyd Oxidase und Xanthin Dehydrogenase reguliert. Die Regulation erfolgt durch Überführen des Molybdän-Cofaktors aus der Desulfo- in die Sulfo-Form (Heidenreich et al., 2005). Eine subtrahierte cDNA zeigte Sequenzähnlichkeit zu einem NADPH-abhängigen Malat Enzym aus *Populus trichocarpa* und *Vitis vinifera*. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Malat in Pyruvat unter Freisetzung von CO₂ und Bildung von NADPH. Das NADPH-abhängige Malat Enzym wurde auch bei Kartoffelpflanzen nach Elicitor-Induktion gefunden. Aus diesem Grund vermuten Wawrzyńska et al. (2005), dass es sich dabei um ein durch Stress induziertes Gen handelt.

Aus der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT wurden hingegen Hinweise auf vier verschiedene überexprimierte Primärstoffwechsellenzyme gefunden. Neben einer Triosephosphat-Isomerase aus *Zea mays* und einer Phosphopyruvat Decarboxylase aus *Iris tectorum*, wurden zweimal Sequenzähnlichkeiten zu einer Lipase aus *Ricinus communis* und dreimal zu einer Monodehydroascorbat Reduktase aus *Mesembryanthemum crystallinum* gefunden werden. Bei der Triosephosphat-Isomerase und Phosphopyruvat Decarboxylase handelt es sich um Enzyme des Glucosestoffwechsels. Die Zellen der Linie PT scheinen neben einer veränderten Ionenaufnahmefähigkeit auch einigen Unterschiede im Kohlenhydratstoffwechsel aufzuweisen, was eventuell ein verlangsamtes Zellwachstum bzw. den verlangsamten Eintritt in die log-Phase erklären könnte (5.2.1.). Bei der Monodehydroascorbat Reduktase handelt es sich um ein Enzym, welches Monodehydroascorbat zu Ascorbat reduziert. Ascorbat ist wichtig für die Stresstoleranz und das Auffangen von freien Radikalen, die vor allem bei der Photosynthese freigesetzt werden. Desweiteren dient Ascorbat als Substrat für die Ascorbat Peroxidase und die Violaxanthin De-Epoxidase in Chloroplasten, auf die in diesem Fall nicht weiter eingegangen wird, da die Zellen im Dunkeln kultiviert wurden und somit die Expression von Enzymen für die Photosynthese eine untergeordnete Rolle spielen sollten (De Pinto und De Gara, 2004; Shimaoka et al., 2003). Es ist noch anzumerken, dass eine Veränderung des Ascorbatstoffwechsels ebenfalls eine Wachstumshemmung verursachen kann.

Zweifach wurde in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M die Sequenzinformation für ein ‚non-symbiotic hemoglobin‘ gefunden. Dabei handelt es sich vermutlich um ein **sauerstoffspeicherndes** Enzym, welches auch an Oxidationsreaktionen beteiligt sein könnte (Hill, 1998). Die cDNA Sequenz wurde einmal als überexprimiert und einmal als subtrahiert identifiziert, was einer weiteren Überprüfung bedarf. Interessanterweise konnte diese Sequenz in Linie 6M gefunden werden. Durch die Möglichkeit Sauerstoff zu binden, könnten die Zellen in der Lage sein eine bessere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Dies wiederum könnte dazu geführt haben, dass Zellen der Linie 6M kürzer in der lag-Phase verweilten und ihre maximale Frisch- und Trockengewichte im Vergleich zu Linie PT früher erreichten.

Elf cDNA Fragmente der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M zeigten Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen, die für die **Transkription und Translation** benötigt werden. Darunter befanden sich lediglich zwei Sequenzen (‘40S ribosomale protein’, ‘eukaryotic initiation factor’), die überexprimiert zu sein scheinen, während die übrigen Sequenzen bis auf eine Ausnahme subtrahiert sein könnten. Bei der Ausnahme handelt es sich um eine Sequenzähnlichkeit zu dem Transkriptionsfaktor YABBY aus *Chrysanthemum x moriflorum*, der fünfmal als überexprimiert und einmal als subtrahiert auftrat, was ebenfalls einer weiteren Überprüfung bedarf. Neben dem Transkriptionsfaktor YABBY wurde noch eine weitere cDNA mit Sequenzähnlichkeit zu einem Transkriptionsfaktor B3 aus *Medicago truncatula* gefunden. Diese Sequenzen wurden (zusammen mit weiteren) in den Tabellen 4.15. und 4.16. farbig markiert, da sie für potentiell interessant im Sinne der Lignan-Biosynthese sein könnten. Der Transkriptionsfaktor YABBY wird eigentlich für die Festlegung der abaxialen Zellform (vor allem in ganzen Pflanzen) verantwortlich gemacht, während die Bezeichnung B3 lediglich besagt, dass es sich um eine besondere DNA-Bindedomäne handelt, die verschiedenen pflanzlichen Transkriptionsfaktoren gemeinsam ist (Siegfried et al., 1999; Yamasaki et al., 2004). Dazu zählen z.B. Transkriptionsfaktoren, die Auxin- oder Abscisinsäure-reguliert sind.

Die Analyse der Sequenzen der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT ergab lediglich zwei Hinweise auf subtrahierte Gene, deren Proteine bei der Translation oder Transkription involviert sind (‘60 S ribosomal protein L24’ und ‘transcription elongation factor 1 alpha’). Desweiteren wurden zwei cDNAs in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT gefunden, die für Proteine zu kodieren scheinen, die an der **RNA-Bindung** beteiligt sind, wie das ‘pentacotriptide repeat containing protein’ und eine ‘ribonuclease III’. Für die **Bindung an DNA** scheinen hingegen drei überexprimierte cDNA Fragmente der Linie PT zu kodieren. Darunter Proteine der ‘high mobility group’ (HMG), die bevorzugt an AT-reichen Regionen der kleinen Rinne von doppelsträngiger DNA binden und deren Funktion in der Prozessierung von 3’-Enden von mRNA-Transkripten und der Transkriptionsregulation gesehen wird (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/ISearch?query=IPR000637>). Sowie eines ‘suppressor Mra1 family proteins’, welches essentiell für das Zellwachstum, die Zellpaarung und für die Biogenese von 40S Ribosomen bzw. für die Prozessierung von prä rRNA zu sein scheint. Dieses ‘suppressor’ Protein wird vor allem dann in hoher Kopienzahl gefunden, wenn Ras 1 (Proto-Onkogen; kleines G-Protein der Signaltransduktion und verantwortlich für die Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen) mutiert ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=43511>). Eine weitere Sequenz aus der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT zeigte Sequenzähnlichkeit zu einem Protein aus *Medicago truncatula* mit einem ‘SAP’-DNA-Bindemotiv. Dieses Protein scheint an der Chromosomenorganisation beteiligt zu sein (Aravind und Koonin, 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zellen der Linie PT im Vergleich zu Zellen der Linie 6M neben Unterschieden im Primärstoffwechsel, vor allem Unterschiede in der Wachstumsregulation aufweisen.

Zu diesen Unterschieden kommen noch morphogenetische Aspekte hinzu. In die Gruppe der „**Proteinmarkierung**“ wurden Sequenzen aus der subtrahierten cDNA-Bank der Linie PT eingeordnet, die Sequenzähnlichkeiten zu einem ‘ring finger protein 20’ aus *Gallus gallus*, einem ‘ubiquitin carrier-like protein’ aus *Solanum tuberosum*, einem ‘ubiquitin-conjugating enzym’ aus *Prunus armenica* und einem putativen ‘ring 3 protein’ aus *Oryza sativa* aufwiesen. Eine subtrahierte cDNA zeigte Sequenzähnlichkeit zu einer ‘ubiquitin-protein ligase’ (‘zinc ion binding’) aus *Arabidopsis thaliana*. Während die Funktion des putativen ‘ring 3’ Proteins noch ungeklärt ist, handelt es bei dem ‘ring finger protein 20’ (Synonyme: RNF 20, Ubiquitin-protein ligase) um ein Enzym, welches an der Monoubiquitinierung von Histonproteinen (Histon 2 in *Homo sapiens*) beteiligt ist und dadurch eine verstärkte Methylierung verschiedener Lysinreste initiiert. Im Zuge dessen scheinen die HOX-Gene (homöotische Gene, welche mehrere andere, funktionell zusammenhängende Gene im Verlauf der Morphogenese steuern) exprimiert zu werden (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/gs/101031.html>; <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/Genetik/hox-gen-geschichte/hox-gen-geschichte.htm>; Zhu et al., 2005). Die oben genannten Sequenzen (‘ring finger protein 20’, ‘ubiquitin carrier-like protein’, ‘ubiquitin-conjugating enzym’, ‘ring 3 protein’ ubiquitin-protein ligase’) sind möglicherweise ebenfalls an diesen Reaktionen beteiligt, wobei in Betracht

gezogen werden muss, dass Ubiquitinierung von Proteinen vor allem ein wichtiges Erkennungsmerkmal für proteinabbauende Enzyme ist (Stryer, 1996). Die von differentiell exprimierten Genen kodierten Proteine könnten somit auch lediglich für die Initiierung des Proteinabbaus verantwortlich sein. Allerdings wurde die Ausgangs RNA für die Herstellung der cDNA-Banken aus Zellen gewonnen, die 4 - 6 Tage alt waren und zu diesem Zeitpunkt dürfte noch kein übermäßiger Proteinabbau erfolgen. Demnach könnte in einigen dieser Gene die Information für die Ausbildung der unterschiedlichen Zellform begründet sein, bzw. es den Zellen der Linie 6M ermöglichen in größeren plättchenartigen Aggregaten zu wachsen als Zellen der Linie PT (Abb. 2.1.).

Einige differentiell exprimierte Gene kodieren für **Zellwandauf-** oder abbauende Proteine, wie die ‚xyloclucan endo-transglycosylase‘ (subtrahiert in Linie 6M), die ‚pectin acetylesterase‘ (subtrahiert in Linie PT) und ein ‚extensin-like/lipid binding‘ Protein (überexprimiert in Linie PT). Pectin Esterasen sind an der Esterspaltung des Hauptzellwandbestandteiles Pectin beteiligt. Sie werden von einer Multigen-Familie kodiert, deren Mitglieder spezifische Expressionsmuster aufweisen und dienen vor allem der Festigung der Zellen und haben wasserregulierende Funktion (Wawrzyńska et al., 2005). Extensine sind ebenfalls Zellwandproteine, die bis zu 20 % des Zellwand-TG ausmachen können und ebenfalls an der Festigung beteiligt sind.

In der cDNA-Bank der Linie 6M wurden desweiteren zwei subtrahierte Gene gefunden, die für eine ATPase und einen Na-**Transporter** kodieren, wohingegen für Linie PT zweimal das Gen für einen ‚PIP 1 water channels‘ subtrahiert auftrat. Die Unterschiede in der Stoffaufnahme der beiden Zelllinien wurden bereits im Zusammenhang mit der Leitfähigkeit der Medien angesprochen (5.2.1.). Im Zuge dessen könnte das verminderte bzw. erhöhte Vorkommen eines Wasserkanals mit einer verstärkten Vakuolisierung infolge von Wassereinlagerung korrelieren. Zellen der Linie PT scheinen desweiteren eine erhöhte Anzahl an mRNAs zu enthalten, die für eine ATPase und einen ‚heavy metal‘ Transporter kodieren. Im Gegensatz dazu wurden in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M eine erhöhte Anzahl an mRNAs gefunden, die für ein ‚coatomer‘ und ein ‚lipid transfer‘ Protein kodieren. Bei den ‚coatomer‘ Proteinen (COP I) handelt es sich um Vesikelhüllproteine, die am Vesikeltransport zwischen Golgi-Zisternen bzw. Dictyosom und ER beteiligt sind (Kleinig und Mayer, 1999).

In den Tabellen 4.14. bis 4.18. wurden einige weitere potentiell interessante cDNA Sequenzen farblich markiert und unter „**Sonstiges**“ zusammengefasst. Darunter eine Sequenz einer cDNA (überexprimiert), die in der subtrahierten cDNA-Bank der Linie 6M elfmal gefunden wurde und Ähnlichkeiten zu einem ‚pathogenesis-related protein (Bet v I allergen)‘ aus *Oryza sativa* zeigt. Die Funktion dieses Proteins in Pflanzen ist noch unbekannt. Breiteneder et al. (1989) fanden eine 55 %ige Sequenzähnlichkeit zu einem ‚disease resistance response gene‘ aus *Pisum sativum* und vermuteten daher einen Zusammenhang mit der Pathogenresistenz. Interessanterweise zeigte auch eine heterolog exprimierte Norcolaurin Synthase aus *Thalictrum flavum ssp. glaucum* Zellsuspensionskulturen 28 - 38 % Sequenz- und Strukturähnlichkeit mit dem Bet v I allergen. Die Strukturähnlichkeit beruht auf einer Anordnung von sieben β -Faltblättern um eine lange α -Helix (Samanani et al., 2004). Die Norcolaurin Synthase katalysiert die Kopplung von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norcolaurin einer Vorstufe der Benzylisochinolin Alkaloide (Berberin, Morphin, Sanguinarin). Ein Zusammenhang der in *L. album* gefundenen cDNA Sequenz mit einer Sekundärstoffwechselreaktion kann aus diesem Grund nicht ganz ausgeschlossen werden und sollte im Hinblick auf die Lignanbiosynthese noch genauer untersucht werden (siehe Ausblick). Im Vergleich dazu wurde in Linie PT eine subtrahiert cDNA gefunden mit Sequenzähnlichkeit zu einem ‚pollen specific protein (Ole e I allergen)‘, dessen Funktion jedoch ebenfalls noch ungeklärt ist.

In den subtrahierten cDNA-Banken der Linien 6M und PT wurden desweiteren je eine überexprimierte Sequenz eines sog. ‚**NEC**‘ Proteins gefunden. In Linie 6M handelte es sich um die Sequenzähnlichkeit zu einem putativen ‚NEC I‘ aus *Oryza sativa*, welches zu der ‚MtN3/saliva‘-Proteinfamilie zu gehören scheint und dessen molekulare Funktion noch unbekannt ist. Man weiß aber, dass diese Gruppe zu den Transmembran-Proteinen zählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=43016>).

Die cDNA aus Linie PT zeigt Sequenzähnlichkeit zu einem ‚NEC IV‘ aus *Nicotiana langsdorffii* x *Nicotiana sanderae*. In diesen Tabakpflanzen wurden insgesamt fünf ‚NEC‘-Proteine gefunden. ‚NEC I‘ kodiert für eine Superoxid Dismutase, ‚NEC III‘ für eine bifunktionale Carboanhydrase, ‚NEC V‘ für eine Glucose Oxidase (und eine mögliche Dehydroascorbat Reduktase) und ‚NEC IV‘ für eine Xyloglucan-spezifische Endoglucanase. Diese Proteine sind vermutlich am Schutz des Gynoeceums und des sich entwickelnden Embryos vor mikrobiellen Angriffen involviert (Naqvi et al., 2005). Wie bereits vorgestellt handelt es sich bei der in *L. album* gefundenen cDNA Sequenz möglicherweise um eine Xyloglucan-spezifische Endoglucanase. Somit scheint es, als würden die Zellen, obwohl sie unter sterilen Bedingungen gehalten werden, neben der Produktion an toxischen Lignan noch weitere Pathogenabwehrmechanismen unterhalten.

Einmalig wurde in Linie 6M eine subtrahierte cDNA gefunden, deren Sequenz Ähnlichkeit zu einem Arachidonsäure-induzierten ‚DEAI‘ Protein aus *Capsicum chinense* zeigte. Diese Sequenzinformation konnte für Linie PT insgesamt 49-mal (überexprimiert) gefunden werden. Die Funktion in *Capsicum chinense* scheint noch unbekannt zu sein, aber in Tomate fanden Weyman et al. (2006) ein ‚DEAI‘ Gen, welches im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod zu stehen scheint. Nach Behandlung von Geweben mit Arachidonsäure oder Infektion mit *Phytophthora infestans* konnten erhöhte Transkriptlevel gefunden werden. In der Promotorregion dieses Gens wurden Bereiche gefunden, die möglicherweise für eine Stress- und Signalantwort benötigt werden, sowie Elemente, die bei der circadianen Rhythmik eine Rolle spielen. Nach dem Überführen von Blättern in einen Kurztagesrhythmus, wurde ‚DEAI‘ konstitutiv exprimiert. Das kodierende Protein für dieses Gen scheint eine konservierte Domäne aus acht Cysteinen zu enthalten, die auch in anderen Proteinen, wie Protease- und dem α -Amylase-Inhibitoren, Speicherproteinen in Samen und Proteinen des Lipidtransfers gefunden wurden (Weyman et al., 2006).

Da die *L. album* Zellsuspensionskulturen bei permanenter Dunkelheit kultiviert werden, kann ein Zusammenhang mit der circadianen Rhythmik vermutlich ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod ebenfalls, da sich die Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Gewinnung (Tag 4 -6) noch nicht in der Absterbephase befanden. Ein Bezug zu den genannten Proteinen (Protease-, α -Amylase-Inhibitoren, Speicher-, Lipidtransferproteine) wären eher denkbar. Dennoch ist verwunderlich, dass diese cDNA so häufig auftrat. Möglicherweise handelt es sich um ein ‚Haushaltsgen‘, welches vorwiegend in Linie 6M Verwendung findet. Eine weitere Untersuchung könnte hierzu Klarheit bringen (siehe Ausblick).

Letztlich wurden noch je zwei weitere Sequenzen aus den cDNA-Banken beider Linien erhalten, die Ähnlichkeiten zu **Membranproteinen** mit noch ungeklärter Funktion zeigen (‚prepro M3‘ aus *Curcubita maxima*; ‚integral membrane protein DUF6‘ aus *Arabidopsis thaliana*). ‚Prepro M3‘ wird allerdings im Zusammenhang mit dem Transport von Proteinen zu Proteinspeichervakuolen diskutiert (accession no. BAB78478). Das noch funktional unbekannte ‚integral membrane protein DUF6‘ sollte im Hinblick auf die Lignanbiosynthese ebenfalls noch genauer untersucht werden (siehe Ausblick).

Der Vergleich der beiden Zelllinien zeigte, dass in nahezu allen Stoffwechselwegen unterschiedliche Genexpression stattfindet. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass lediglich zwei cDNAs für Sekundärstoffwechsellzyme gefunden wurden. Bei den Sequenzen die für Sekundärstoffwechsellzyme kodieren, handelt es sich um cDNAs, die Sequenzähnlichkeiten zu einem Hydroxyzimtsäure CoA-Ligase ähnlichem Protein aus *Arabidopsis thaliana* (subtrahiert in Linie 6M) und einer β -Amyrin Synthase aus *Euphorbia tirucalli* (überexprimiert in Linie PT) zeigten. Während das Hydroxyzimtsäure CoA-Ligase ähnliche Protein möglicherweise im Phenylpropanstoffwechsel involviert ist, was einer weiteren Überprüfung bedarf (siehe Ausblick), ist die β -Amyrin Synthase an der Triterpensynthese beteiligt (Abb. 5.10.). Die β -Amyrin Synthase katalysiert dabei in einem Schritt die Zyklisierung des 2,3-Oxidosqualens durch Bildung von fünf C_6 -Ringen und insgesamt acht asymmetrischen Zentren (Shibuya et al., 1999). β -Amyrin bildet die Vorstufe der Oleanolsäure, die wiederum in Glycyrrhizin - ein Triterpensaponin - überführt werden kann. Die Funktionen dieser Substanzen in pflanzlichen Zellen sind bisher noch unbekannt. Glycyrrhizin wird pharmakologisch als Expektoranz eingesetzt.

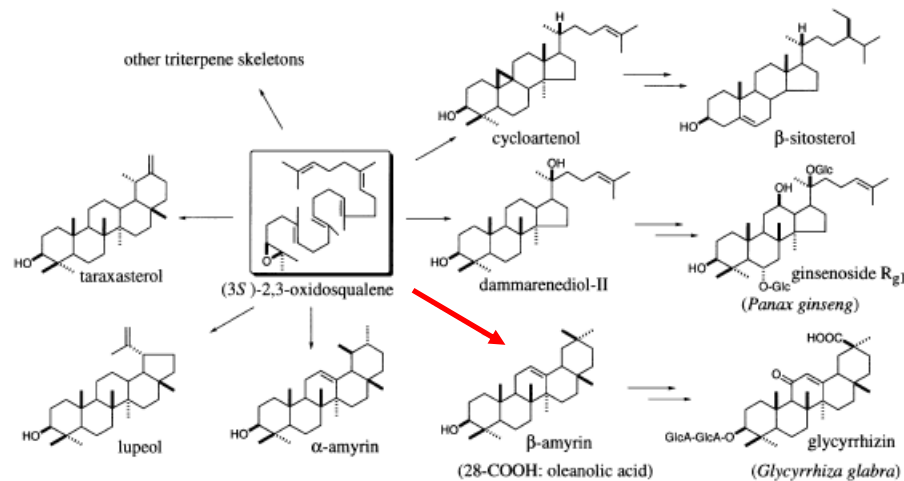


Abb. 5.10.: Zyklisierung von Oxidosqualen in höheren Pflanzen;

Neben der Zyklisierung zu β -Amyrin sind noch einige weitere Beispiele von Triterpenen gezeigt (Shibuya et al., 1999).

Es wurden keine cDNAs für CYP-Enzyme gefunden. Für das Fehlen der CYPs in den Banken differentiell exprimierter cDNAs könnte es mehrere Gründe geben. Ein Hauptgrund könnte sein, dass bisher lediglich ein Teil der Gesamt cDNA-Bank durchsucht wurde und cDNAs, die nur in geringen Mengen vorkommen, möglicherweise noch nicht erfasst wurden. Insbesondere liegen mRNAs die für CYP-Enzyme kodieren, vermutlich in nur sehr geringer Anzahl vor, da zumeist nur wenige Moleküle eines CYP-Enzyms in der Zelle notwendig sind, um das entsprechende Substrat hocheffektiv umzusetzen. Dies widerspricht aber den Aussagen von Diatchenko et al. (1996), wonach, wie bereits zu Beginn angesprochen, vor allem cDNAs mit geringer Abundanz angereichert werden sollen. Abgesehen von unterschiedlich langen Halbwertszeiten von mRNA-Molekülen, könnte aber auch die Ernte der Zellen für die Gewinnung der mRNAs (Tag 4 - 6) zu früh oder zu spät erfolgt sein. Dadurch wären die für die Lignanbiosynthese relevanten mRNAs nicht in die SSH eingebracht worden. Allerdings zeigten die Genexpressionsanalysen von A. Sandermann (2003), dass die mRNAs der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL), Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase (CCR), Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) und Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (PLR) in Zellen der Linien 6M und PT überwiegend an den Tagen 5 - 8 exprimiert wurden. Ein weiterer Hauptgrund für das ‚Nicht-Auffinden‘ von Sequenzen, die für Sekundärstoffwechsel und CYP-Enzyme kodieren, könnte sein, dass die Unterschiede der Genexpression geringer als das Fünffache waren. Ji et al. (2002) fanden unter Verwendung einer menschlichen Fibroblasten cDNA als ‚Driver‘ und einer HaeIII restriktionshydrolysierten ϕ x174 Phagen cDNA als ‚Tester‘ heraus, dass eine effektive Anreicherung an differentiell exprimierten cDNAs nur dann erfolgen kann, wenn die Unterschiede zwischen den gesuchten cDNAs mindestens fünffach sind. Das unterschiedliche Vorkommen der DOP6H in beiden Zelllinien konnte bisher nur auf enzymatischer Ebene festgestellt werden, was aber nicht bedeuten muss, dass dies auch auf mRNA-Ebene der Fall ist. Die Anzahl an mRNAs, die für die DOP6H (oder DOP7H, PAM7H) kodieren, könnte in Zellen beider Linien mehr oder weniger gleich sein, und die sichtbaren Unterschiede in der Lignanakkumulation könnten lediglich durch Unterschiede in der Translation oder der Enzymaktivität zustande kommen. Dies würde zugleich bedeuten, dass selbst größere Unterschiede in den enzymatischen Aktivitäten (25-fach im Fall der DOP6H) nicht ausreichend sind, um die involvierten Gene mittels SSH zu erfassen.

Nichtsdestotrotz wurden mittels der SSH cDNA Fragmente zahlreicher interessanter Gene kloniert. Acht der cDNA-Sequenzen, bei denen die Funktionen der kodierenden Proteine z.T. noch unbekannt sind, wurden als interessant im Hinblick auf die Lignan-Biosynthese erachtet. Dazu zählen die cDNA-Fragmente, die für die Transkriptionsfaktoren YABBY und B3, die Membranproteine ‚prepro M3‘ und ‚integral membrane protein DUF6‘, das Sekundärstoffwechsellzym ‚hydroxycinnamic acid CoA-ligase like protein‘, sowie das ‚pathogenesis-related‘ Protein (Bet v I allergen), das ‚NECIV‘ und DEAI kodieren. Desweiteren konnte mit der cDNA der β -Amyrin Synthase ein weiteres Fragment eines Sekundärstoffwechsellzym gefunden werden, dessen Protein eine sehr interessante und hochkomplizierte Reaktion katalysiert. Sowohl diese als auch die übrigen cDNAs werden für weitere Untersuchungen genutzt werden.

6. Ausblick

Bei der Proteomanalyse und der SSH handelt es sich um interessante, aber auch weitgreifende methodische Ansätze um die Genome oder Teile von Genomen zu untersuchen. Mit dieser Arbeit wurden die ersten grundlegenden Ergebnisse erhalten, um zukünftige Proteom- oder Genom-Untersuchungen mit *L. album* Zellsuspensionskulturen zu konzipieren. In Anlehnung an diese Vorarbeiten ist ein cDNA-AFLP-Ansatz mit *L. album* Zellkulturen angedacht. Entweder werden dabei die Zelllinien 6M und PT vergleichend untersucht oder es wird die Zelllinie PT verwendet, die zuvor elicitiert bzw. nicht-elicitiert wurde. Vorarbeiten zur Elicitierung mit Methyljasmonat wurden bereits von van Fürden et al. (2004) und A. Humburg (2005) durchgeführt. Derzeit wird von H. Fuhrmann die Elicitierung der Zellen der Linie PT mit Coronalon untersucht. Dabei scheint die Bildung von PTOX im Vergleich zu unbehandelten Zellen um das 5-fache gesteigert zu sein. Dies lässt vermuten, dass die DOP7H ebenfalls in erhöhtem Maße exprimiert wird und sie dadurch möglicherweise molekularbiologisch erfasst werden könnte. Allerdings wird sich, wie bereits erwähnt, die Suche nach geeigneten Primern als schwierig erweisen, da bisher noch kein Hinweis auf die Zugehörigkeit zu einer Klasse hydroxylierender Enzyme gefunden wurde.

Abgesehen davon sind die Arbeiten des SSH-Experimentes noch nicht abgeschlossen. Acht cDNA Sequenzen wurden als potentiell interessant im Hinblick auf die Lignan-Biosynthese erachtet, sowie die Sequenz der β -Amyrin Synthase. Mittels Northern Blot oder semiquantitativer PCR muss noch geklärt werden, ob die entsprechenden Sequenzen tatsächlich differentiell exprimiert sind.

Da für die meisten Sequenzen die Funktionen der entsprechenden Proteine noch nicht bekannt sind, soll mittels RNAi-Experimenten versucht werden ihre Expression zu unterdrücken. Die Auswirkungen dieser Unterdrückung sollten sich in einem veränderten Lignanakkumulierungsmuster (bzw. Triterpengehalt) zeigen, sofern die verwendete cDNA in die Lignan- (bzw. Triterpen-) Biosynthese involviert ist. Die für RNAi verwendeten Sproßkulturen sind bereits vorhanden. Allerdings akkumulierten die daraus bisher angelegten ‚hairy root‘ Kulturen überwiegend 6MPTOX und nur Spuren von PTOX (Federolf et al., 2007; J. Windhövel, persönliche Mitteilung; Dr. E. Fuss, Publikation in Vorbereitung). D.h., dass diese Kulturen eher der Linie 6M ähnlich sind. Dennoch sollten diese zunächst ausreichen, um die ersten RNAi-Experimente durchführen zu können.

7. Zusammenfassung

Pflanzen und Zellkulturen von *Linum album* sind in der Lage, cytotoxische Aryltetralin-Lignane zu produzieren, von denen das Podophyllotoxin (PTOX) in chemisch derivatisierter Form als Krebstherapeutikum Anwendung findet. Lignane sind Abkömmlinge des Phenylpropanstoffwechsels. Das Grundgerüst der Aryltetraline besteht aus Coniferylalkohol-Dimeren, die über ihre 8 - 8' Atome stereospezifisch miteinander verknüpft sind. Die einzelnen Syntheseschritte bis zu Deoxypodophyllotoxin (DOP) sind noch weitestgehend unbekannt. Von DOP ausgehend wurden zwei Wege postuliert: zum einen kann DOP durch Hydroxylierung an Position 7 in Podophyllotoxin (PTOX) überführt werden und zum anderen kann durch Hydroxylierung an Position 6 β -Peltatin gebildet werden. β -Peltatin wird in Folge durch eine O-Methyltransferase in β -Peltatin-A-Methylether (PAM) umgewandelt, welches schließlich in 6-Methoxypodophyllotoxin (6MPTOX) überführt wird. Während die Enzyme, die die Umsetzungen von DOP zu β -Peltatin (Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase, DOP6H) und von β -Peltatin zu PAM (β -Peltatin 6-O-Methyltransferase, β P6OMT) bereits charakterisiert sind, fehlten zu den Umsetzungen von DOP zu PTOX (Deoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase, DOP7H) und von PAM zu 6MPTOX (β -Peltatin-A-Methylether 7-Hydroxylase, PAM7H) noch jegliche Informationen.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Suche nach den DOP7H und PAM7H Reaktionen. Für die Untersuchungen wurden zwei Zellsuspensionskulturen mit den Methoden der Phytochemie, Enzymatik, Proteinanalytik und Molekularbiologie verglichen. Bei Linie 6M handelt es sich um eine 6MPTOX akkumulierende Kultur, während Linie PT vorwiegend PTOX anreichert. Das unterschiedliche Lignanakkumulierungsmuster kommt vermutlich durch das differentielle Vorkommen der DOP6H zustande. Neben der DOP6H konnte in diesen Zellkulturen auch die β P6OMT erstmals nachgewiesen werden. Beide Enzyme wurden aus diesem Grund eingehend hinsichtlich ihrer pH- und Temperaturoptima und ihrer Michaelis-Menten Kinetiken untersucht. Die DOP6H kann als Cytochrom P450 (CYP)-Enzym in-vitro durch entsprechende CYP-Hemmstoffe inhibiert werden. Hemmkinetiken mit einigen dieser Hemmstoffe deuten auf eine gemischte- bzw. nicht-kompetitive Hemmung hin. Während die DOP6H Reaktion auch in-vivo durch CYP-Hemmstoffe inhibiert werden kann, zeigen Dioxygenase-Hemmstoffe keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu zeigte keiner dieser Inhibitoren eine Beeinflussung der DOP7H Reaktion. Aus diesem Grund kann lediglich die Gruppe der CYP-Enzyme für die DOP7H Reaktion ausgeschlossen werden. Die Hemmexperimente lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf die PAM7H Reaktion. Die Zugabe von DOP zu Zellen der Linie 6M führte zu einer verstärkten Bildung von β -Peltatin und PAM, während in Linie PT das zugegebene DOP in PTOX überführt wurde. Dies zeigte, dass DOP tatsächlich der Verzweigungspunkt zu PTOX bzw. 6MPTOX zu sein scheint. Bisher wurde vermutet, dass auch eine Umwandlung von PTOX in 6MPTOX möglich sein könnte. Die Gabe von PTOX zu Zellen beider Linien resultierte aber in der Bildung des PTOX-Glucosids und nicht in der Bildung von 6MPTOX.

Umfangreiche enzymatische Tests auf CYP-, Dioxygenase- und Peroxidase-Enzyme lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf den involvierten Enzymtyp einer DOP7H oder PAM7H Reaktion. Allerdings konnte eine bisher unbekannte 'PTOX:UDP-Glucosyltransferase' Reaktion gefunden werden. Die Proteomanalyse der beiden Zelllinien ergab insgesamt 85 Proteinbanden, die als unterschiedlich starke Banden mit bloßem Auge sichtbar waren. Aus Kostengründen konnten jedoch nur vier davon massenspektrometrisch untersucht werden. Die Ergebnisse wiesen auf eine putative Sucrose Synthase und ein HSP-Protein aus Zellen der Linie PT hin. Hinweise auf CYP- oder Dioxygenase-Enzyme konnten nicht gefunden werden. Effektiver schien der molekularbiologische Vergleich der Zellen mittels der Suppressiven-Subtraktions-Hybridisierung. Die Verifizierung der differentiell exprimierten Gene konnte bisher nur mittels Macroarray-Analysen erfolgen. Von insgesamt 671 untersuchten cDNAs der Linie 6M schienen 16 % bzw. von 563 untersuchten cDNAs Sequenzen der Linie PT 23 % differentiell exprimiert zu sein. Darunter befanden sich 42 %, die nach Blastx-Suche keine Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen zeigten. Für den Primärstoffwechsel, den Aufbau der primären Zellwände, Transportprozesse, Proteinmarkierung, O₂-Speicherprozesse, RNA- oder DNA-Bindung, die Translation und die Transkription kodierten jeweils 1 - 10 putative cDNA-Sequenzen, während für Sekundärstoffwechsellenzyme zwei kodierende cDNA-Sequenzen gefunden wurden. Dabei handelt es sich um ein zu Hydroxymethylsäure CoA-Ligase ähnliches Protein - einem Enzym des Phenylpropanstoffwechsel und eine β -Amyrin Synthase (Prenyltransferase, Squalen Oxidase) - einem Enzym der Oxidosqualen Synthase. Neben der Sequenz der β -Amyrin Synthase wurden acht cDNA-Sequenzen, bei denen die Funktion der kodierenden Proteine z.T. noch unbekannt ist, als interessant im Hinblick auf die Lignan-Biosynthese erachtet und sollen für weitere Untersuchungen genutzt werden.

7. Conclusion

Cell suspension cultures and plants of *Linum album* can accumulate cytotoxic aryltetralin-lignans like podophyllotoxin (PTOX), which can be used as its semisynthetic derivative in anticancer-therapy. Lignans are a class of secondary metabolites derived from two phenylpropanoid units that are linked by a C-C bond between 8 and 8' of the side chain carbon atoms. The single steps to give deoxypodophyllotoxin (DOP) are rather unknown. But DOP might be the branching point to either PTOX or 6MPTOX. DOP can be hydroxylated at position 7 to give PTOX or the hydroxylation can occur at position 6 to give β -peltatin. β -peltatin is converted by an O-methyltransferase to β -peltatin-A-methylether (PAM), whereas PAM is transformed into 6-methoxypodophyllotoxin (6MPTOX). The enzymes that convert DOP to β -peltatin (deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, DOP6H) and β -peltatin to PAM (β -Peltatin 6-O-methyltransferase, β P6OMT) are known. The enzymes converting DOP to PTOX (deoxypodophyllotoxin 7-hydroxylase, DOP7H) and PAM to 6MPTOX (β -peltatin-A-methylether 7-hydroxylase, PAM7H) has to be characterized.

The aim of this work was to search for the DOP7H and PAM7H reactions. Therefore, two cell suspension cultures of *L. album* were compared by using methods of phytochemistry, enzymatics, protein analytics and molecular biology. Cell line 6M is a 6MPTOX producer, whereas line PT accumulates mainly PTOX. The differential lignan accumulation pattern may be due to differential occurrence of DOP6H. Beside DOP6H, β P6OMT was detected for the first time in those cell lines. Therefore, both enzymes were characterized with respect to pH and temperature optima and their Michaelis-Menten kinetics. The cytochrome P450 (CYP) enzyme DOP6H can be inhibited in-vitro by CYP-inhibitors. Kinetics with some of those inhibitors indicate a mixed-type or non-competitive inhibition. The DOP6H reaction can also be inhibited in-vivo by CYP-, but not by dioxygenase-inhibitors. In contrast, none of those inhibitors showed any influence on DOP7H. For that reason the group of CYP-enzymes involved in the DOP7H reaction can be entirely excluded. Similar inhibition experiments gave no clue on the enzyme type involved in PAM7H reaction. The feeding of DOP to cells of line 6M resulted in an accumulation of β -peltatin and PAM, whereas in line PT PTOX was formed, showing, that DOP really seems to be the branching point either to PTOX or 6MPTOX. Until now it was speculated that PTOX could be transformed into 6MPTOX, but feeding of PTOX to cells of both lines resulted in formation of PTOX-glucoside and not in 6MPTOX-glucoside formation.

Extensive enzymatic tests for CYPs, dioxygenases and peroxidases did not throw light on the enzymes involved in DOP7H and PAM7H reactions. Nevertheless, a novel 'PTOX:UDP-glucosyltransferase' reaction could be detected. Comparison of the proteom of both cell lines resulted in 85 protein bands that seemed to be different. Four of the proteins could be analysed by mass spectrometric analysis. The results gave hints for a putative sucrose synthase and a HSP-protein from cell line PT, but no information was found for CYP- or dioxygenase enzymes. Comparison of the cells by suppressive-subtractive-hybridization seemed to be more effective. Verification of the differential expressed genes was done via macroarray-analyses up to now. Altogether 671 cDNAs from line 6M and 563 from line PT were screened and 16 % respectively 23 % seems to be differentially expressed. 42 % of the sequences gave no assignment to any known sequence in a blastx-search. One to ten putative sequences encoding for primary metabolism, construction of primary cell wall, processes of transport, protein signalling, O₂-reservoir, RNA- or DNA-binding, translation and transcription could be found, whereas two sequences were found encoding for enzymes involved in secondary metabolism. These sequences were hydroxycinnamic acid CoA-ligase like protein from the phenylpropanoid pathway and β -amyrin synthase (prenyltransferase/squalen oxidase) from the biosynthesis of oxidosqualen. Beside the β -amyrin synthase eight sequences encoding for proteins with partly unknown functions seems to be interesting with regard to lignan biosynthesis and will be used for further research.

8. Literaturverzeichnis

01. Aerts R.J., Gisi D., DeCarolis E., DeLuca V., Baumann T.W., 1994, Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings, *Plant J.*, 5, 635-643
02. Alfermann A.W., Petersen M., 1993, Plant cell cultures, In: *Biotechnology*, Rehm H.-J., Reed G., Bühler A., Stadler P. (eds), Second Edition, *Biological Fundamentals*, Sahm H. (ed.), Vol. 1, 577-614, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
03. Amor Y., Haigler C.H., Johnson S., Wainscott M., Delmer D.P., 1995, A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 26, 9353-9357.
04. Apers S., Paper D., Buergermeister J., Baronikova S., Van Dyck S., Lemiere G., Vlietinck A., Pieters L., 2002, Antiangiogenic activity of synthetic dihydrobenzofuran lignans, *Nat. Prod.* 65, 718-720
05. Aravind L., Koonin E.V., 2000, SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization, *TiBS* 25, 112-144
06. Baier M., Dietz K.-J., 1999, Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 119, 1407-1414
07. Bauer I., DeBeyer A., Tshisuaka B., Fetzner S., Lingens F., 1994, A novel type of oxygenolytic ring cleavage: 2,4-Oxygenation and decarbonylation of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline and 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline, *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 299-304
08. Bayliss M.W., 1973, Origin of chromosome number variation in cultured plant cells, *Nature* 246, 529-530
09. Berim A., Spring O., Conrad J., Maitrejean M., Boland W., Petersen M., 2005, Enhancement of lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum* by coronalol, indanoyl-isoleucine and methyl jasmonate, *Planta* 222, 769-776
10. Berlin J., Wray V., Mollenschott C., Sasse F., 1986, Formation of β -peltatin-A-methylether and coniferin by root cultures of *Linum flavum*, *J. Nat. Prod.* 49, 435-439
11. Bertani, G. (1951): Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* Bd. 62, Nr. 3, S.293-300
12. Bethards L.A., Sadsen R.W., Sandalios J.G., 1987, Isolation and characterization of a cDNA clone for the *Cat2* gene in maize and its homology with other catalases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 6830-6834
13. Beyer K., Binder A., Boller T., Collinge M., 2001, Identification of potato genes that are induced during colonization by *Phytophthora infestans*, *Mol. Plant Pathol.* 2, 125-134
14. Birch P.R.J., Avrova A.O., Duncan J.M., Lyon G.D., Toth R.L., 1999, Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 356-361
15. Blodig W., Smith A.T., Doyle W.A., Piontek K., 2001, Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism, *J. Mol. Biol.* 305, 851-861
16. Bode J., Hans A., Garbe J., 2005, „Enzymkinetik und Mechanismus“, *Texte und Praktikumsvorschriften 2005*, <http://rzv054.rz.tu-bs.de/Biotech/lehre/scripts/bb3-2005.pdf>
17. Bouwmeester H., Gershenzon J., Konnings M.C.J.M. Croteau R., 1998, Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway, *Plant Physiol.* 117,901-912
18. Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M., 1990, Crystallization and preliminary x-ray analysis of soybean lipoxygenase-1, a non-heme iron-containing dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 265,12771-12773
19. Bradford M.M., 1976, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochem.* 72, 248-254
20. Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A., Valenta R., Kraft D., Rumpold H., Schreiner O., Breitenbach M., 1989, The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1 is highly homologous to a pea disease resistance response gene, *EMBO J.*, 8, 1935-1938
21. Breyne P., Zabeau M., 2001, Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 136-142
22. Britsch L., Heller W., Grisebach H., 1981, Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley, *Z. Naturforsch.*, 36c, 742-750
23. Britsch L., Ruhnau-Brich B., Forkmann G., 1992, Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida*, *J. Biol. Chem.* 267 (8), 5380-5387
24. Broomhead A.J., Dewick P.M., 1990, Aryltetralin lignans from *Linum flavum* and *Linum capitatum*, *Phytochem.* 29, 3839-3844

25. Broomhead A.J., Rahman M.M.A., Dewick P.M., Jackson D.E., Lucas J.A., 1991, Matairesinol as precursor of *Podophyllum* lignans, *Phytochem.* 30, 1489-1492
26. Canel C., Moraes R.M., Dayan F.E., Ferreira D., 2000, Molecules of interest: Podophyllotoxin, *Phytochem.* 54, 115-120
27. Carlsson G.H., Nicholls P., Svistunen D., Berglund G.I. Hajdu J., 2005, Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate, and carbon monoxide, *Biochem.* 44, 635-642
28. Chatterjee R., 1952, Indian Podophyllum. *Economic Botany* 6, 342
29. Chattopadhyay S., Mehra R.S., Srivastava A.K., Bhojwani S.S., Bisaria V.S., 2003, Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 541-546
30. Cupp-Vickery J.R., Poulos T.L., 1995, Structure of P450_{eryF} involved in erythromycin biosynthesis, *Nat. Struct. Bio.* 2, 144-153
31. Damayanthi Y., Lown J.W., 1998, Podophyllotoxins: Current status and recent developments, *Curr. Med. Chem.* 5, 205-252
32. Davin L.B., Lewis N.G., 2003, An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism, *Phytochem. Rev.* 2, 257-288
33. Davin L.B., Wang H.-B., Crowell A.L., Bedgar D.L., Martin D.M., Sarkanen S., Lewis N.G., 1997, Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center, *Science* 275, 362-266
34. Davis P.H., 1970, *Linum*. In: Davis P.H. (ed), *Flora of Turkey and East Aegan Islands*, Vol. 2, Edinburgh University Press, Edinburgh
35. De Pinto M., De Gara L., 2004, Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation, *J. Experimental Bot.* 55, 2559-2569
36. DeCarolis E., Chan F., Balsevich J., DeLuca V., 1990, Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second-to-last step in vindoline biosynthesis, *Plant Physiol.*, Vol. 94, 1323-1329
37. DeCarolis E., DeLuca V., 1994, A novel 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis: characterization, purification and kinetic properties, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Vol. 38, 281-287
38. DeLuca V., Cutler A.J., 1987, Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, *J. Plant Physiol.* 85, 1099-1102
39. Deus-Neumann B., Zenk M.H., 1986, Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism, *Planta* 167, 44-53
40. Deus-Neumann B., Zenk M.H., 1984, Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, *Planta Med.* 50, 427-431
41. Diatchenko L., Chenchik A., and Siebert P., 1998, Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A+) or total RNA. In *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*, Eds. Siebert, P. & Larrick, J. (BioTechniques Books, MA), 213-239
42. Diatchenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E., Siebert P.D., 1996, Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc. Natl. Sci. USA*, Vol. 93, 6025-6030
43. Dietz K.-J., 2003, Plant Peroxiredoxins, *Annu. Rev. Biol.* 54, 93-107
44. Dinkova-Kostova A.T., Gang D.R., Davin L.B., Bedgar D.L., Chu A., Lewis N.G., 1996, (+)-Pinoresinol/(+)-lari-ciresinol reductase from *Forsythia intermedia*, *J. Biol. Chem.* 271, 29473-29482
45. Dixon M., Webb E.C., 1964, *Enzymes*, Longman Group Ltd.
46. Dixon R.A., Reddy M.S.S., 2003, Biosynthesis of monolignols. Genomic and reverse genetic approaches. *Phytochem. Rev.* 3, 289-306.
47. Donaldson R.P., Luster D.G., 1991, Multiple forms of plant cytochromes P450, *Plant Physiol.*, 96, 669-674
48. Durst F., 1991, Physiology and biochemistry of plant cytochrome P450 enzymes, In: *Frontiers in Biotransformation*, (Ruckpaul K., ed.), Vol. 4, Akademie Berlin
49. Durst F., Nelson D.R., 1995, Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases, *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 189-268
50. Eckardt N., 2002, Probing the mysteries of lignin biosynthesis: the crystal structure of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase provides new insights, *Plant Cell* 14, 1185-1189
51. Egmond M.R., Fasella P.M., Veldink G.A., Vliegthart J.F., Boldingh J., 1977, On the mechanism of action of soybean lipoxygenase-1. A stopped-flow kinetic study of the formation and conversion of yellow and purple enzyme species, *Eur. J. Biochem.* 76, 469-479

52. Eibl R., 2002, Fermentative Herstellung bioaktiver Wirkstoffe, Aktuelle Mitteilungen aus den Hochschulen des Kernteams des Swiss BiotechNet, beider Basel, www.swissbiotechnet.ch, BioWorld 6-2002
53. Elkins J.M., Ryle M.J., Clifton I.J., Dunning Hotopp J.C., Lloyd J.S., Burzlaff N.I., Baldwin J.E., Hausinger R.P., Roach P.L., 2002, X-ray structure of *Escherichia coli* Taurine/ α -ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochem.* 41, 5185-5192
54. Emt U., Alfermann A.W., Pras N., Petersen M., 2000, The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans, *J. Appl. Bot.* 74, 145-150
55. Engler A., 1931, Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2. Auflage, Band 19a, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
56. Erdtman H., 1933, Dehydrierung in der Coniferylreihe, (I). Dehydrodieugenol und Dehydrodiisoeugenol, *Biochem. Z.* 258, 172-180
57. Farmer E.E., Ryan C.A., 1990, Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 7713-7716
58. Federolf K., 2001, Reaktionen zweier Enzyme des Indol-Alkaloid-Stoffwechsels aus *Catharanthus roseus* und die Suche nach neuen P450 - Reaktionen, Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
59. Federolf K., Alfermann A.W., Fuss E., 2006, Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key-enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin, *Phytochem.*, doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.31
60. Fischer T.C., Klattig J.T., Gierl A., 2001, A general cloning strategy for divergent plant cytochrome P450 genes and its application in *Lolium rigidum* and *Ocimum basilicum*, *Theor. Appl. Genet.* 103, 1014-1021
61. Frey M., Huber K., Park W.J., Sicker D., Lindberg P., Meeley R.B., Simmons C.R., Yalpani N., Gierl A., 2003, A 2-oxoglutarate dependent dioxygenase is integrated in the DIMBOA-biosynthesis, *Phytochem.* 62, 371-376
62. Frick S., Kutchan T.M., 1999, Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis, *Plant Journal* 17, 329-339
63. Fujita Y., Tabata M., Nishi A., Yamada Y., 1982, New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture method, In: *Plant Tissue Culture 1982*, (Fujiwara A., Ed.) 399-400, Tokyo: Maruzen Co
64. Fuss E., 2003, Lignans in plant cell and organ cultures: an overview, *Phytochem. Rev.* 2, 307-320
65. Gang D.R., Costa M.A., Fujita M., Dinkova-Kostova A.T., Wang H.B., Burlat V., Martin W., Sarkanen S., Davin LB., Lewis N.G., 1999, Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis, *Chem. Biol.* 6, 143-151
66. Garden H., 2004, Biotechnological production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
67. Gasteiger J., Schunk A., 2003, CCC Univ. Erlangen, GMT BMBF-Leitprojekt *Vernetztes Studium - Chemie*, www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chem
68. Gauthier A., Gulick P.J., Ibrahim R.K., 1998, Characterization of two cDNA clones which encode O-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropamoid compounds, *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 234-249
69. Giri A.D.V., Narasu M.L., 2000, Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: a potential natural product for clinically useful anticancer drugs, *Cytotechnol.* 34, 17-26
70. Goodin D.B., McRee D.E., 1993, The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme, *Biochem.* 32, 3313-3324
71. Goossens A., Häkkinen S.T., Laakso I., Seppänen-Laakso T., Biondi S., De Sutter V., Lammertyn F., Nuutila A.M., Söderlund H., Zabeau M., Inzé D., Oksman-Caldentey K.-M., 2003, A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells, *PNAS* 100, 8595-8600
72. Grand G., 1984, Ferulic acid 5-hydroxylase: A new cytochrome P450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis, *FEBS* 1328, Vol. 169, 7-11
73. Groves J.T., Han Y.-Z., 1995, Models and mechanism of cytochrome P450 action. In: *Cytochrome P450 - Structure, Mechanism and Biochemistry* (Hrsg.: P.R. Ortiz de Montellano), 2. Ausgabe, Plenum Press, New York, 3-48
74. Gurskaya N.G., Diatchenko L., Chenchik A., Siebert P.D., Khaspekov G.L., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Ermolaeva O.D., Lukyanov S.A. Sverdlov E.D.N.G., 1996, Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate, *Anal. Biochem.* 240, 90-97.
75. Haefelè C., Bonfils C., Sauvaire Y., 1997, Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis, *Phytochem.*, Vol. 44, 563-566
76. Hagmann M.L., Heller W., Grisebach H., 1984, Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Stereospecific 3,9-dihydroxypterocarpan 6 α -hydroxylase from elicitor induced soybean cell cultures, *Eur. J. Biochem.* 142, 127-131

77. Hahlbrock K., 1976, Regulation of phenylalanine ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Apparent rates of enzyme synthesis and degradation, Eur. J. Biochem. 63, 137-145
78. Hallahan D.L., Lau S.-M.C., Harder P.A., Smiley D.W.M., Dawson G.W., Pickett J.A., Christoffersen R.E., O'Keefe D.P., 1994, Cytochrome P450-catalysed monoterpene oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related enzymes with different activities, Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1201,94-100
79. Hanahan D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol. 166, 557-580
80. Harland B.F., Oberleas D. 2001, Effects of dietary fiber and phytate on the homeostasis and bioavailability of minerals, In: CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition, Third Edition, Gene A. Spiller (Ed.), CRC Press, 161-170
81. Hartmann T., Ober D., 2003, Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. Carolo-Wilhelmina: Forschungsmagazin der Technischen Universität Braunschweig 38: 26-32
82. Hasemann C.A., Kurumbail R.G., Boddupalli S.S., Peterson J.A., Deisenhofer J., 1995, Structure and function of cytochrome P450: a comparative analysis of three crystal structures, Structure 3, 41-62
83. Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J., 1994, Crystal structure and refinement of cytochrome P450_{terp} at 2.3 Å resolution, J. Mol. Biol. 236, 1169-1185
84. Hauser M.-T., Wink M., 1990, Uptake of alkaloids by latex vesicles and isolated mesophyll vacuoles of *Chelidonium majus* (Papaveraceae), Z. Naturforsch. 45c, 949-957
85. Hausinger R.P., 2004, Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 39, 21-68
86. He X.-Z., Dixon R.A., 1996, Affinity chromatography, substrate/product specificity and amino acid sequence analysis of an isoflavone O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.), Arch. Biochem. Biophys. 336, 121-129
87. Hedden P., 1999, Recent advances in gibberellin biosynthesis, J. Exper. Bot. 50, 553-563
88. Hegg E.L., Whiting A.K., Saari R.E., McCracken J., Hausinger R.P., Que L. Jr., 1999, Herbicide degrading alpha-keto acid-dependent enzyme TfdA: metal coordination environment and mechanistic insights, Biochem. 38, 16714-16726
89. Heidenreich T., Wollers S., Mendel R.R., Bittner F., 2005, Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of Molybdenum Cofactor Sulfuration, J. Biolog. Chem. 280, 4213-4218
90. Heinemeyer J., Eubel H., Wehmhöner D., Jänsch L., Braun H.-P., 2004, Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants, Phytochem. 65, 1683-1692
91. Heldt H.-W., 1999, Pflanzenbiochemie, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akad. Verlag
92. Hemmati S., 2003, Initiation, maintenance and evaluation of lignan compounds in in-vitro cultures of *Linum album*, Faculty of Pharmacy, Shiraz, University of Medical Sciences
93. Henges A., 1999, Biosynthese und Kompartimentierung von Lignan in Zellkulturen von *Linum album*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
94. Hill R.D., 1998, What are hemoglobins doing in plants? Can. J. Bot. 76, 707-712
95. Hulst A.C., Meyer M.T., Breteler H., Tramper J., 1989, Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiopene production and cell growth, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 18-25
96. Humburg A., 2005, Accumulation of lignans in *Linum* cell cultures: elicitation and feeding of precursors, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
97. Humphreys J.M., Chapple C., 2002, Rewriting the lignin roadmap, Curr. Opin. Plant Biol. 5, 224-229
98. Ibrahim R.K., Bruneau A., Bantignies B., 1998, Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification, Plant Mol. Biol. 36, 1-10
99. Ibrahim R.K., Grisebach H., 1976, Purification and properties of UDP-Glucose:coniferyl alcohol glucosyltransferase from suspension cultures of Paul's scarlet rose, Archives Biochem. Biophys. 176, 700-708
100. Ikezawa N., Tanaka M., Nagayoshi M., Shinkyo R., Sakaki T., Inouye K., Sato F., 2003, Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylendioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells, J. Biolog. Chem. 278, 38557-38565
101. Imbert T.F., 1998, Discovery of podophyllotoxin, Biochemie 80, 207-222
102. Ishimura Y., Nozaki M., Hayaishi O., 1970, The oxygenated form of L-tryptophan 2,3-dioxygenase as reaction intermediate, J. Biol. Chem. 245, 3593-3602

103. Itoh H., Tanaka-Ueguchi M., Kawaide H., Chen X., Kamiya Y. Matsuoka M. 1999, The gene encoding tobacco gibberellin 3beta-hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development, *Plant J.* 20, 15-24
104. Iwata K., Kanda Y., Yamaguchi H., Osumi M., 1973, Electron microscopic studies on the mechanism of action of clotrimazole on *Candida albicans*, *Sabouraudia* 11, 205-209
105. Iwata K., Yamaguchi H., Hiratani T., 1973, Mode of action of clotrimazole, *Sabouraudia* 11, 158-166
106. Jackson D.E., Dewick P.M., 1984, Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*, *Phytochem.* 23, 1147-1152 (a)
107. Jackson D.E., Dewick P.M., 1984, Biosynthesis of Podophyllum lignans - I. Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*, *Phytochem.* 23, 1029-1035 (b)
108. Ji W., Wright M.B., Cai L., Flament A., Lindpaintner K., 2002, Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes, *BMC Genomics* 3, 12
109. Joshi C.P., Chiang V.L., 1998, Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases, *Plant Mol. Biol.* 37, 663-674
110. Kadkade PG., 1982, Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*, *Plant Sci. Lett.* 25, 107-115
111. Kaminaga Y., Sahin F.P., Mizukami H., 2004, Molecular cloning and characterization of a glucosyltransferase catalyzing glucosylation of curcumin in cultured *Catharanthus roseus* cells, *FEBS* 567, 197-202
112. Kanegae T., Kajiya H., Amano Y., Hashimoto T., Yamada Y., 1994, Species-dependent expression of the hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene in the pericycle, *Plant Physiol.* 105, 483-490
113. Katano N., Yamamoto H., Iio R., Inoue K., 2001, 7-Deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures, *Phytochem.*, 58, 53-58
114. Katayama T., Davin L.B., Lewis N.G., 1992, An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol, *Phytochem.* 31, 3875-3881
115. Kim J.H., Kim B.G., Park Y., Ko J.H., Lim C.E., Lim J., Lim Y., Ahn J.-H., 2006, Characterization of flavonoid 7-O-Glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1471-1477
116. Kiso Y., Tohkin M., Hikino H., Ikeya Y., Taguchi H., 1985, Mechanism of antihepatotoxic activity of wuweizisu C and gomisin A, *Planta Medica* 51, 331-334
117. Kleinig H. und Mayer U., 1999, *Zellbiologie*, G. Fischer Verlag,
118. Konuklugil B., 1996, Aryltetralin lignans from the genus *Linum*, *Fitoterapia* 67, 379-381
119. Korczak A., 2006, Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Linum album*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
120. Kranz K., 2004, Die Biosynthese cytotoxischer Lignane aus *Linum nodiflorum* L. (linaceae): β -Peltatin 6-O-Methyltransferase, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
121. Kranz K., Petersen M., 2003, β -peltatin 6-O-methyltransferase from cell suspension cultures of *Linum nodiflorum* L., *Phytochem.* 64, 453-458
122. Krochko J.E., Abrams G.D., Loewen M.K., Abrams S.R., Cutler A.J., 1998, (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase, *Plant Physiol.*, Vol. 118, 849-860
123. Kügler M., Jänsch L., Kruft V., Schmitz U.K., Braun H.-P., 1997, Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), *Photosynthesis Res.*, 53, 35-44
124. Kuhlmann S., 2004, Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom P450-Enzymen in der Biosynthese von Aryltetralin-Lignan in Zellkulturen von *Linum spec.*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
125. Kuhlmann S., Kranz K., Lücking B., Alfermann A.W., Petersen M., 2002, Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*, *Phytochem. Rev.* 1, 37-43
126. Kulling S.E., Watzl B., 2003, Phytoöstrogene, *Ernährungs-Umschau* 50, (Heft 6) 234-239
127. Kunishima N., Fukuyama K., Wakabayashi S., Sumida M., Takaya M., Shibano Y., Amachi T., Matsubara H., 1993, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of peroxidase from a fungus *Arthromyces ramosus*, *Proteins* 15, 216-220
128. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-684
129. Lee K.-H., Xiao Z., 2003, Lignans in treatment of cancer and other diseases, *Phytochem. Rev.* 2, 341-362
130. Lewis N.G., Davin L.B., 1999, Lignans: Biosynthesis and function, In: DHR Barton, Nakanishi K., Meth-Coon O., (eds.), *Comprehensive natural products chemistry*, Vol. 1, Sankawa U. (ed.), Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives, 639-712, Elsevier Science

131. Lewis N.G., Davin L.B., Sarkanen S., 1998, Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. In: Lewis N.G. and Sarkanen S., (eds.), Lignin and lignan biosynthesis, Vol. 697, 1-27, ACS Symposium Series, Washington, DC
132. Li H., Poulos T.L., 1994, Structural variation in heme enzymes: a comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures, *Structure* 2, 461-464
133. Li, Z.-S., Alfenito, M., Rea, P.A., Walbot, V., Dixon, R.A., 1997, Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump, *Phytochem.* 45, 689-693
134. Liu J., Lui J.D., Yuang Z.Q., Qian X.Y., Qian M., Yang J.S., 2001, Isolation and identification of genes expressed differentially in rice inflorescence meristem with suppression subtractive hybridization, *Chin. Sci. Bull.* 46, 98-101
135. Lloyd J.U., 1910, The eclectic alkaloids, resins, resinoids, oleo-resins and concentrated principles, Bulletin of the Lloyd Library of Botany, Pharmacy and Materia Medica, Pharmacy series No. 2, Cincinnati, Ohio, USA
136. Lorenc-Kukula K., Korobczak A., Aksamit-Stachurska A., Kostyn K., Lukaszewicz M., Szopa J., 2004, Glucosyltransferase: the gene arrangement and enzyme function, *Cell. & Mol. Biol. Letters* 9, 935-946
137. Lottspeich F., Engels J.W., 2. Auflage, 2006, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH München
138. MacRae W.D., Towers G.H.N., 1984, Biological activities of lignans, *Phytochem.* 23, 1207-1220
139. Madyastha K.M., Meehan T.D., Coscia C.J., 1976, Characterization of a cytochrome P450 dependent monoterpene hydroxylase from higher plant *Vinca rosea*, *Biochem.* 15, 1097-1102
140. Marrs K.A., 1996, The function and regulation of glutathione S-transferases in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 127-158
141. Martens S., Forkmann G., Matern U., Lukacin R., 2001, Cloning of parsley flavone synthase I, *Phytochem.* 58, 43-46
142. Mason H.S., DeWald D.B., Mullet J.E., 1993, Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* Promotor, *Plant Cell* 5, 241-251
143. Mason H.S., Onopryenko I., Buhler D., 1957, Hydroxylation: the activation of oxygen by peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 24, 225-226
144. Matile, P., 1976, Localization of alkaloids and mechanism of their accumulation in vacuoles of *Chelidonium majus* laticifers, In: Luckner M., Mothes K.; Nover L., (Hrsg.) Secondary metabolism and coevolution. Nova Acta Leopoldina, Suppl. 7, 139-156
145. Maxwell C.A., Edwards R., Dixon R.A., 1992, Identification, purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 156-166
146. Messner B., Boll M., Berndt J., 1991, L-phenylalanine ammonia-lyase in suspension culture cells of spruce (*Picea abies*). Induction by UV-light and fungal elicitor, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27, 267-274.
147. Middel O., Woerdenbag H.J., Van Uden W., Van Oeveren A., Jansen J.F.G.A., Feringa B.L., Konings A.W.T., Pras N., Kellogg R.M., 1995, Synthesis and cytotoxicity of novel lignans, *J. Med. Chem.* 38, 2112-2118
148. Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J.T., Walter R., Axelrod B. 1996, Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochem.* 35, 10687-10701
149. Molog G.A., Emt U., Kuhlmann S., Van Uden W., Pras N., Alfermann A.W., Petersen M., 2001, Deoxy-podophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans, *Planta* 214, 288-294
150. Morgan J.A., Shanks J.V., 1999, Inhibitor studies of tabersonine metabolism in *C. roseus* hairy roots, *Phytochem.*, 51, 61-68
151. Moriguchi T., Kita M., Ogawa K., Tomono Y., Endo T., Omura M., 2002, Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development, *Physiologia Plantarum*, 114, 251-258
152. Moss G.P., 2000, Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* 72, 1493-1523
153. Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum* 15, 473-479
154. Naqvi S.M.S., Harper A., Carter C., Ren G., Guirgis A., York W.S., Thornburg R.W., 2005, Nectarin IV, a potent endoglucanase inhibitor secreted into the nectar of ornamental tobacco plants. Isolation, cloning, and characterization, *Plant Physiol.* 139, 1389-1400
155. Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzales F., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Loper J.C., Sato R., Waterman M.R., Waxman D.J., Nebert D.W., 1993, The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA Cell Biol.* 12, 1-51

156. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W., 1996, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature, *Pharmacogenetics* 6, 1-42
157. Neumetzler L., 2003, Biochemische Charakterisierung und Versuche zur Änderung der Expressionsstärke einer Zimtalkohol Dehydrogenase aus *Linum album*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
158. Noel J.P., Dixon R.A., Pichersky E., Zubieta C., Ferrer J.-L., 2003, Structural, functional and evolutionary basis for methylation of plant small molecules, *Recent Advances Phytochem.* 37, 37-58
159. Nultsch W., 2001, Sekundäre Pflanzenstoffe, In: Allgemeine Botanik, 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
160. Ockendon D.J., Walters S.M. 1968, *Linum*. In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moorre D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (eds), *Flora Europaea*, Vol. 2, 206-211, Cambridge University Press, Cambridge
161. Omura T., Sato R., 1964, The carbon monoxide pigment of liver microsomes. I Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378
162. Ortiz de Montellano P.R., Mathews J.M., 1981, Autocatalytic alkylation of the cytochrome P450 prosthetic haem group by 1-aminobenzotriazole, *Biochem. J.* 195, 761-764
163. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C., 2005, Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Rep.* 24, 255-265
164. Petersen M., 1986, Digitoxin 12 β -Hydroxylase, ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym aus Zellkulturen von *Digitalis lanata* EHRH., Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
165. Petersen M., Alfermann A.W., 2001, The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 135-142
166. Petersen M., Strack D., Matern U., 1999, Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, In: *Biochemistry of plant secondary metabolism*, 4. Wink M. (Hrsg.) Sheffielde Acad. Press, 151-221
167. Phillips R.L., Kaeppler S.M., Olhoff P., 1994, Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5222-5226
168. Plücken H., Müller B., Grohmann D., Westhoff P., Eichacker L.A., 2002, The HCF 136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 532, 85-90
169. Podeschwa M.A.L., 2003, Synthese von Naturstoffen auf Inosittbasis ausgehend von *para*-Benzochinon, Dissertation, Bergische Universität Wuppertal
170. Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J., 1987, High-resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}, *J. Mol. Biol.* 195, 687-700
171. Prescott A.G., Stamford N.P.J., Wheeler G., Firmin J.L., 2002, In vitro properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*, *Phytochem.* 60, 589-593
172. Rademacher W., 2000, Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 51, 501-531
173. Rademacher W., Fritsch H., Graebe J.E., Sauter H., Jung J., 1987, Tetracyclis and triazole-type plant growth retardants: their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes, *Pestic Science*, Vol. 21, 241-252
174. Rasmussen S., Dixon R.A., 1999, Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway, *Plant Cell* 11, 1537-1551
175. Ravichandran K.G., Boddupalli S.S., Hasermann C.A., Peterson J.A., Deisenhofer J., 1993, Crystal structure of hemoprotein domain of P450_{BM-3} a prototype for microsomal P450s, *Science* 261, 731-736
176. Rea, P.A., Li, Z.-S., Lu, Y.-P., Drozdowicz, Y.M., 1998, From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 727-760
177. Rebrikov D.V., 2003, Identification of differential genes by suppression subtractive hybridization, In: *PCR Primer. A laboratory manual*, C.W. Dieffenbach, G.S. Dveksler (eds), Second Edition, 297, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
178. Reichhart D., Simon A., Durst F., 1982, Autocatalytic inactivation of plant cytochrome P450 enzymes: selective inactivation of cinnamic acid 4-hydroxylase from *Helianthus tuberosus* by 1-aminobenzotriazole, *Archives Biochem. and Biophys.* 216, 522-529
179. Rios J.L., Giner R.M., Prieto J.M., 2002, New findings on the bioactivity of lignans, *Studies in Nat. Prod.* 26, (Part G) 183-292
180. Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N., Aro E.M, 2005, Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: Multiple assembly steps of photosystem II, *Biochem. J.* 388, 159-168

181. Römer U., 2003, Charakterisierung und Anwendung der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel zur Synthese von Saccharose-Analoga, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
182. Rosche E., Westhoff P., 1995, Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae), *Plant Mol. Biol.* 29, 663-678
183. Rouhier N., Jacquot J.-P., 2005, The plant multigenic family of thiol peroxidases, *Free Radical Biology & Med.* 38, 1413-1421
184. Rupasinghe S., Baudry J., Schuler M.A., 2003, Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling, *Protein Engineering* 16, 721-731
185. Sakakibara N., Suzuki S., Umezawa T., Shimada M., 2003, Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*, *Org. Biomol. Chem.* 1, 2474-2485
186. Samanani N., Liscombe D.K., Facchini P.J., 2004, Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, *Plant J.* 40, 302-313
187. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
188. Sandermann A., 2003, Expression von Phenylalanin Ammonium-Lyase und Pinoresinol-Lariciresinol Reduktase in *Linum album* Suspensionskulturen mit unterschiedlicher Lignanakkumulation, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
189. Sarkanen S., Davin L.B., Lewis N.G., 1999, Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis, *Chem. Biol.* 6, 143-151
190. Schägger H., 1994, Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-30.
191. Schmidt T.J., Hemmati S., Fuss E., Alfermann A.W., 2006, A combined HPLC-UV and HPLC-MS method for the identification of lignans and its application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. and *L. bienne* Mill., *Phytochem. Anal.* 17, 299-311
192. Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ilmann P., Werck-Reichhart D., 2001, CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway, *The J. Biol. Chem.*, Vol. 276, 36566-36574
193. Schomburg D., 2005, Lignan-Nomenklatur: Nomenklatur der Lignane und Neolignane, *Angew. Chem.* 117, 2339-2351
194. Schönell B., 1996, Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
195. Schröder G., Unterbusch E., Kaltenbach M., Schmidt J., Strack D., De Luca V., Schröder J., 1999, Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase, *FEBS Letters* 458, 97-102
196. Schröder G., Wehinger E., Schröder J., 2002, Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases, *Phytochem.* 59, 1-8.
197. Schüler G., Mithöfer A., Baldwin I.T., Berger S., Ebel J., Santos J.G., Herrmann G., Hölscher D., Kramell R., Kutchan T.M., 2004, Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology, *FEBS Lett* 563, 17-22
198. Schuler M.A., 1996, Plant cytochrome P450 monooxygenases, *Crit. Rev. Plant Sci.*, Vol. 15, 235-284
199. Schuler M.L., 1981, Production of secondary metabolites from plant tissue cultures, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 369, 65-69
200. Schuller D.J., Ban N., Huystee R.B., McPherson A., Poulos T.L., 1996, The crystal structure of peanut peroxidase, *Structure* 4, 311-321
201. Schumacher H.-M., Grundlach H., Fiedler F., Zenk M.H., 1987, Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures, *Plant Cell Rep.* 6, 410 - 413
202. Schwelm A., 2001, Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an Zellkulturen von *L. album* mit unterschiedlicher Akkumulation von Lignanenen, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
203. Seidel V., Windhövel J., Eaton G., Alfermann A.W., Arroz R.R.J., Medarde M., Petersen M., Woolley J., 2002, Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures, *Planta* 215, 1031-1039
204. Seitz H.U., Seitz U., Alfermann A.W., 1985, *Pflanzliche Gewebekultur - ein Praktikum*, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
205. Sharifnia F., Assadi M., 2001, *Flora of Iran*, No. 34: Linaceae, Assadi M., Maassoumi A.A., Khatamsaz M. (eds.) [Islamic Republic of Iran, Ministry of Jihad-e-Sazandegi, Research Institute of Forests and Rangelands]

206. Shimaoka T., Miyake C., Yokota A., 2003, Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts, *Eur. J. Biochem.* 270, 921-928
207. Shibuya M., Zhang H., Endo A., Shishikura K., Kushiro T., Ebizuka Y., 1999, Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualen cyclases, *Eur. J. Biochem.* 266, 203-307
208. Siegfried K.R., Eshed Y., Baum S.F., Otsuga D., Drews G.N., Bowman J.L., 1999, Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*, *Development* 126, 4117-4128
209. Smolny T., 1993, Bildung von Lignan bei Zellkulturen von *Linum album*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
210. Smolny T., Wichers H., Kalenberg S., Shamsavari A., Petersen M., Alfermann A.W., 1998, Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*, *Phytochemistry* 48, 975-979
211. Sparrow L.G. Ho P.P., Sundaram T.K., Zach D., Nyns E.J., Snell E.E., 1969, The bacterial oxidation of vitamin B6. VII. Purification, properties and mechanism of action of an oxygenase which cleaves the 3-hydroxypyridine ring, *J. Biol. Chem.* 244, 2590-2600
212. Specker S., 2004, Klonierung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen aus *Ammi majus* L. und funktionelle Expression der Zimtsäure 4-Hydroxylase, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
213. Stähelin F., von Wartburg A., 1991, The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide, *Cancer Research* 51, 5-15
214. Stöckigt J., Klischies M., 1977, Biosynthesis of lignans. 1. Biosynthesis of arctiin and phillyrin, *Holzforschung* 31, 41-44
215. St-Pierre B., DeLuca V., 1995, A cytochrome P450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*, *Plant Physiol.*, 109, 131-139
216. St-Pierre B., Vasquez-Flota F.A., DeLuca V., 1999, Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate, *Plant Cell* 11, 887-900
217. Strasburger, 33. Auflage, 1991, Lehrbuch der Botanik, Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Besinsky A., Spektrum Verlag, GmbH Heidelberg/Berlin
218. Strasburger, 35. Auflage, 2002, Lehrbuch der Botanik, Sitte P., Weiler E.W., Kadereit J.W., Besinsky A., Körner C., Spektrum Verlag, GmbH Heidelberg/Berlin
219. Stryer L., 4. Auflage, 1996, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
220. Sunderland N., 1977, Nuclear cytology, In: *Plant Tissue and Cell Culture* (Street H.E., Ed.), 177-205, Oxford: Blackwell Scientific Publ.
221. Svensson B., Pettersson H., 2003, Rheumacon (CPH82) showed similar X-ray progression and clinical effects as methotrexate in a two year comparative study on patients with early rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheumatol.* 32, 83-88
222. Towill L.E., Mazur P., 1974, Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures, *Can J. Bot.* 53, 1097-1102.
223. Trivedi V., Chand P., Srivastava K., Puri S.K., Maulik P.R., Bandyopadhyay U., 2005, Clotrimazole inhibits hemo-peroxidase of *P. falciparum* and induces oxidative stress: proposed antimalarial mechanism of clotrimazole, *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M501563200
224. Umezawa T., 2003, Diversity in lignan biosynthesis, *Phytochem. Rev.* 2, 371-390
225. Umezawa T., Davin L.B., Lewis N.G., 1991, Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts, *J. Biol. Chem.* 266, 10210-10217
226. Umezawa T., Davin L.B., Yamamoto E., Kingston D.G.I., Lewis N.G., 1990, Lignan biosynthesis in *Forsythia* species, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1405-1408
227. Ushiyama K., 1991, Large scale cultivation of ginseng, In: *Plant Cell Culture in Japan* (Komamine A., Misawa M., DiCosmo F., Eds.) 92-98, Tokyo: CMC Co
228. van Fürden B., 2004, Einfluß von Methyljasmonat auf die Lignanakkumulation und Genexpression in Kulturen von *Linum album*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
229. van Fürden, B., Humburg, A., Fuss, E., 2005, Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.* 24, 312-317.
230. van Uden W., Bos A., Boeke G.M., Woerdenbag J., Pras N., 1997, The large-scale isolation of deoxypodophyllotoxin from rhizomes of *Anthriscus sylvestris* followed by its bioconversion into 5-methoxypodophyllotoxin beta-D-glucoside by cell-cultures of *Linum flavum*, *J. Nat. Prod.* 60, 401-403
231. van Uden W., Bouma A.S., Waker J.F.B., Middel O., Wichers H.J., DeWaard P., Woerdenbag H.J., Kellogg R.M., Pras N., 1995, The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bioconversion of cyclodextrin-complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell cultures, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 42, 73-79

232. van Uden W., Pras N., Visser J.F., Malingré T.M., 1989, Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures from *Podophyllum hexandrum* Royle, Plant Cell Rep. 8, 165-168
233. Vasilev N., Ebel R., Edrada R.A., Fuss E., Alfermann A.W., Ionkova I., Petrova A., Schmidt T.J., 2007, Lignan variability in *Linum* species of section *Syllinum* occurring in Bulgaria, Biochem. Systemat. Ecol., in press
234. Vazquez-Flota F., De Carolis E., Alarco A.M., De Luca V., 1997, Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, Plant Mol. Biol. 34, 935-948
235. von Heimendahl C.B., Schäfer K.M., Eklund P., Sjöholm R., Schmidt T.J., Fuss E., 2005, Pinosesinolariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*, Phytochem. 66, 1254-1263
236. Wawrzyńska A., Lewandowska M., Hawkesford M.J., Sirko A., 2005, Using a suppression subtractive library-based approach to identify tobacco genes regulated in response to short-term sulphur deficit, J. Exp. Bot. 416, 1575-1590
237. Weiss S.G., Tin-Wa M., Perdue R.E., Farnsworth N.R., 1975, Potential anticancer agents II: antitumor and cytotoxic lignans from *Linum album* (Linaceae), J. Pharmaceutical Sci. 64, 95-98
238. Weissenböck, G.: Verteilung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)-Aktivität und Akkumulation flavonoider Verbindungen in Keimlingen von *Impatiens balsamin*, L. Z., Pflanzenphysiol. 66, 243-250 (1972)
239. Welinder K.G., Justesen A.F., Kjærsgård I.V.H., Jensen R.B., Rasmussen S.K., Jespersen H.M., Duroux L., 2002, Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*, Eur. J. Biochem. 269, 6063-6081
240. Werck-Reichhart D., Bark S., Paquette S., 2002, Cytochrome P450. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists
241. Werck-Reichhart D., Feyereisen R., 2000, Cytochrome P450: a success story, Genome Biology 1, 3003.1-3003.9
242. Werner M., Uehlein N., Proksch P., Kaldenhoff R., 2001, Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*, Planta 213, 550-555
243. Westcott N.D., Muir A.D., 2003, Flax seed lignan in disease prevention and health promotion, Phytochem. Rev. 2, 401-417
244. Westendorf A., 2005, Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-Herbiziden durch Bakterien - Eine Charakterisierung der Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes, Dissertation, Universität Leipzig
245. Westhoff P., Offermann-Steinhard K., Höfer M., Eskins K., Oswald A., Streubel M., 1991, Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath of cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C₄ plants, Planta 184, 377-388
246. Weyman P.D., Pan Z., Feng Q., Gilchrist D.G., Bostock R.M., 2006, A circadian rhythm-regulated tomato gene is induced by arachidonic acid and *Phytophthora infestans* infection, Plant Physiol. 140, 235-248
247. Williams P.A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E.F., McRee D.E., 2000, Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity, Mol. Cell. 5, 121-131
248. Williams P.A., Cosme J., Ward A., Angove H.C., Matak Vinkovic D., Jhoti H., 2003, Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin, Nature 424, 464-468
249. Wilmouth R.C., Turnbull J.J., Welford R.W., Clifton I.J., Prescott A.G., Schofield C.J., 2002, Structure and Mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*, Structure (Camb) 10, 93-103
250. Windhövel J., 1989, Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*: Untersuchungen zur Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
251. Windhövel J., 2002, Biochemie und molekularbiologische Untersuchungen zur Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase aus Zellsuspensionskulturen von *Linum album*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
252. Winter H., Huber J.L., Huber S.C., 1998, Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein, FEBS Letters 430, 205-208
253. World Conservation Monitoring Centre, 2001, Appendix II der „Convention for international trades in endangered species“, <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>
254. Wyrambik D., Grisebach H., 1975, Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures, European J. Biochem. 59, 9-15
255. Xia Z.Q., Costa M.A., Pelissier H.C., Davin L.B., Lewis N.G., 2001, Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning, and functional expression. Implications for human health protection, J. Biol. Chem. 276, 12614-12623
256. Xiong L., Lee M.-W., Qi M., Yang Y., 2001, Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening, MPMI 14, 685-692

257. Yamamoto H., Yatou A., Inoue K., 2001, 8-Dimethylallylnaringenin 2'-hydroxylase, the crucial cytochrome P450 monooxygenase for lavandulylated flavanone formation in *Sophora flavescens* cultured cells, *Phytochem.*, 58, 671-676
258. Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M., Masaru Tateno M., Yamasaki T. Yabuki T., Aoki M., Seki M., Matsuda T., Tomo Y., Hayami N., Terada T., Shirouzu M., Osanai T., Tanaka A., Seki M., Shinozaki K., Yokoyama S., 2004, Solution Structure of the B3 DNA binding domain of the *Arabidopsis* cold-responsive transcription factor RAV1, *Plant Cell* 16, 3448-3459
259. Zhang W., Ramamoorthy Y., Kilicarslan T., Nolte H., Tyndale R.F., Sellers E.M., 2002, Inhibition of cytochrome P450 by antifungal imidazole derivatives, *Pharmacol. Exper. Therapeutics* 30, 314-318
260. Zhou C., Yang Y., Jong A.Y., 1990, Mini-prep in ten minutes, *Biotechniques* 8, 172-173
261. Zhu B., Zheng Y., Pham A.-D., Mandal S.S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D., 2005, Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation, *Molec. Cell* 20, 601-611
262. Zimmermann S., Hahlbrock K., 1975, Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase (E.C.4.3.1.5), *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 54-62
263. Zubieta C., He X.-Z., Dixon R.A., Noel J.P., 2001, Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases, *Nature Struct. Biol.* 8, 271-279
264. Zubieta C., Kota P., Ferrer J.-L., Dixon R.A., Noel J.P., 2002, Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase, *Plant Cell* 14, 1265-1277

9. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits öffentlich vorgestellt.

Poster:

Federolf K., Sandermann A., Fuss, E., 2003, Lignan accumulation and gene expression in different *Linum album* cell suspension cultures, Congress - Phytochemistry and biology of lignans, Bornheim-Walberberg

Vorträge:

Federolf K., Sandermann A., Fuss E., 2004, Differential gene expression in cell suspension cultures of *Linum album* with different lignan accumulation, Symposium - Future Trends in Phytochemistry, A young scientist symposium, Gargnano (Brescia), Italien

Federolf K., 2004, Different enzyme activities in cell suspension cultures of *Linum album* with different lignan accumulation, Seminar des Graduiertenkollegs Molekulare Physiologie, Maria Aue

Federolf K., 2005, Späte Schritte in der Biosynthese von Aryltetralin Lignanen in Zellsuspensionskulturen von *Linum album* - DOP6H - Ein Schlüsselenzym der Biosynthese von 6-Methoxypodophyllotoxin?, Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 4. Vortragstagung, Haus Elsenburg, Kaub am Rhein

Federolf K., 2005, Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*, Kurth-Mothes-Doktoranden-Workshop, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle

Federolf K., 2006, Späte Schritte in der Biosynthese von Aryltetralin Lignanen in Zellsuspensionskulturen von *Linum album* - DOP6H - Ein Schlüsselenzym der Biosynthese von 6-Methoxypodophyllotoxin?, Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 5. Vortragstagung, Haus Elsenburg, Kaub am Rhein,

Publikationen:

Federolf K., Alfermann A.W., Fuss E., Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key-enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin, Phytochem., doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.31

10. Anhang

10.1. HPLC-Standards

Die HPLC-Standards wurden bei 230 nm analysiert, mit Ausnahme der *p*-Cumar- und Zimtsäure, die bei 309 nm detektiert wurden.

Tab. 10.1.: HPLC-Standards

Substanz	Molekulargewicht	Konzentration [mM]	Konzentration [mg/ml]	Peakfläche	HPLC-Methode	Retentionszeiten [min]
Hydroxymatairesinol	374,0	0,042	0,016	2.772.408	20040324.met	10,5
Matairesinol	358,0	0,042	0,015	3.438.094	20040324.met	18,8
DOP	398,0	0,042	0,017	4.342.786	Podo1b.met	14,9
β -Peltatin	414,4	0,042	0,017	6.069.563	Podo1b.met	10,1
PTOX	414,4	0,042	0,017	4.226.745	Podo1b.met	9,5
PAM	428,4	0,042	0,018	5.094.625	Podo1b.met	16,6
Yatein	400,0	0,042	0,017	2.538.512	20040324.met	37,0
6MPTOX	444,4	0,102	0,044	10.961.429	Podo1b.met	12,0
<i>p</i> -Cumarsäure	164,2	0,083	0,014	8.729.076	C4H.met	6,1
Zimtsäure	148,2	0,083	0,012	6.494.206	C4H.met	12,3

10.2. Berechnung und Auswertung der Enzymaktivitäten

10.2.1. Berechnung der Enzymaktivitäten nach HPLC-Auswertung

$$\text{Berechnung der Produktmenge [mM]} = \frac{\text{Peakfläche des Produktes [mAU]} \times \text{Konzentration Standard [mM]}}{\text{Peakfläche Standard [mAU]}}$$

$$\text{Produktmenge/Testansatz [nmol]} = \text{Produktmenge [mM]} \times 1,5 \times 10^{-4} [\text{l}] \times 1000$$

$$\text{spezifische enzymatische Aktivität [kat/kgProtein]} = \frac{\text{Produktmenge/Testansatz [nmol]}}{\text{eingesetzte Proteinmenge [mg]} \times \text{Inkubationsdauer [sec]}}$$

10.2.2. Berechnung der Enzymaktivitäten nach photometrischen Testen

$$\text{Enzymaktivität [pkat]} = \frac{\Delta E}{[t]} \times \frac{V_{\text{Test}} \times 10^6}{d \times \varepsilon}$$

$$\text{spezifische Enzymaktivität [\mu kat/kgProtein]} = \frac{\text{Enzymaktivität [pkat]}}{C_{\text{Protein}} \times V_{\text{Protein}}}$$

- $\Delta E/t$ - Absorptionsänderung pro Sekunde
- V_{Test} - Volumen des Testansatzes [ml]
- d - Schichtdicke der Küvette [cm]
- ε - Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
- C_{Protein} - Proteinkonzentration [mg/ml]
- V_{Protein} - Volumen der Proteinlösung im Test [ml]

10.2.3. Graphische Auswertung nach SigmaPlot2001

Die Auswertung erfolgte mit SigmaPlot2001 Version 7.0 (SPSS Chicago, IL, USA). Die Berechnungen und Grafiken wurden erstellt mittels ‚nonlinearer Regression‘ unter Zuhilfenahme des ‚Regression Wizard‘. Die einzelnen Parameter der Auswertungen sind im Folgenden aufgelistet. Die K_M - und v_{max} -Werte wurden von dem Programm automatisch anhand der Gleichungen errechnet.

Abb. 4.14.:	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- exponential rise to maximum - single, 3 parameters - $y = a(1-e^{-bx})$
Abb. 4.15.	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- exponential rise to maximum - simple exponent, 3 parameters - $y = y_0+a(1-b^x)$
Abb. 4.17. a)	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- hyperbola - single rectangular, 2 parameters - $y = \frac{ax}{b+x}$
Abb. 4.19. a)	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- hyperbola - single rectangular, 2 parameters - $y = \frac{ax}{b+x}$
Abb. 4.22. a)	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- exponential rise to maximum - single, 3 parameters - $y = a(1-e^{-bx})$
Abb. 4.22. b)	‚equation category‘ ‚equation name‘- ‚equation‘	- exponential rise to maximum - single, 3 parameters - $y = a(1-e^{-bx})$

10.3. DOP-Synthese

^1H - und ein ^{13}C - NMR-Spektrum von DOP: Die Daten wurden mit Literaturangaben aus Ikeda et al. (1998) verglichen und stimmten mit diesen sehr gut überein (siehe Tabelle 10.2.).

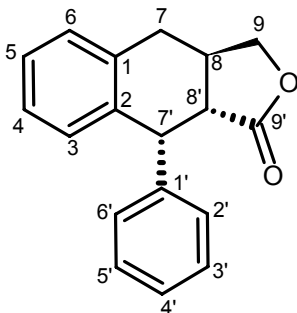


Abb. 10.1.: Nomenklatur der Aryltetralin-Lignane (nach IUPAC)

Die Nummerierung entspricht der Peak-Zuordnung der Spektren (Abb. 10.2. und 10.3.).

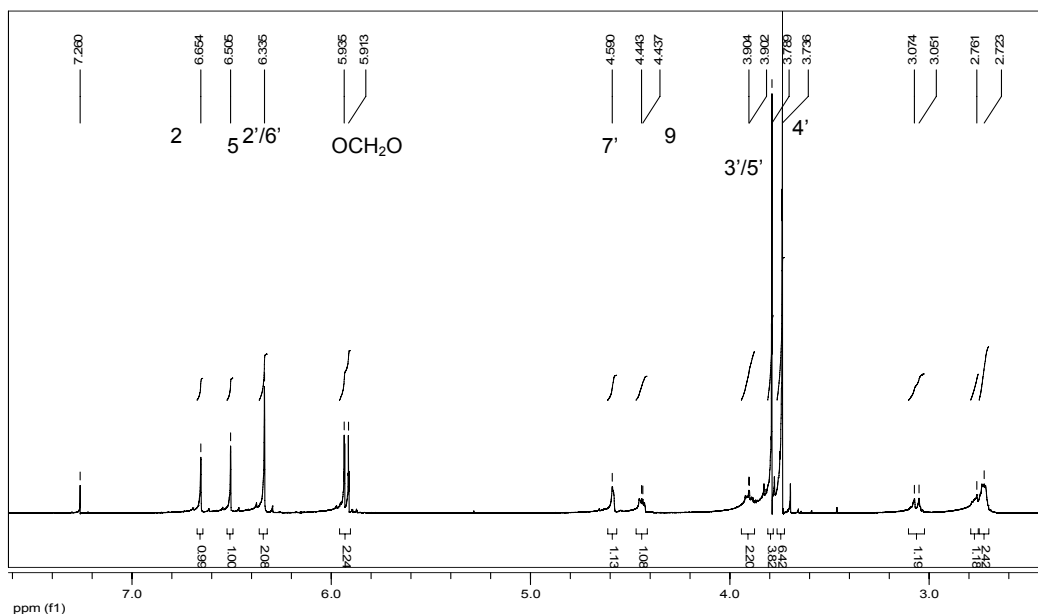


Abb. 10.2.: ^1H -NMR Spektrum aufgenommen bei 500 MHz (CDCl_3)

Die Lage der Resonanzsignale (δ in ppm) ist erkennbar. Die Signalfäche unter den Peaks ist ein Maß für die Anzahl an Protonen. \int kennzeichnet die Intensität der Signale. Die Nummern wurden nachträglich eingefügt und kennzeichnen die Peakzuordnung bzw. die in Abb. 10.1. nummerierten C-Atome.

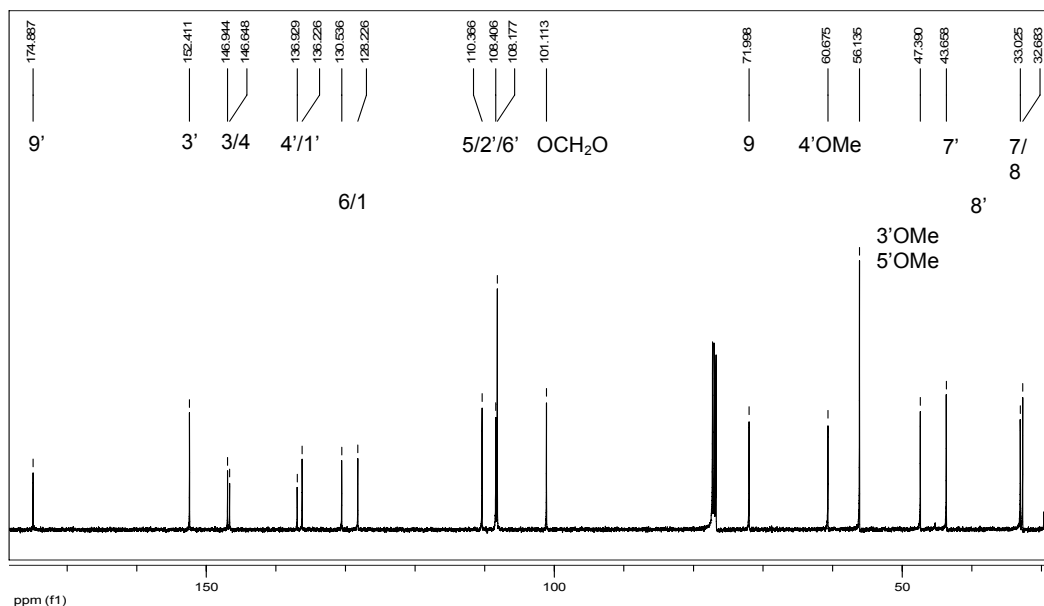


Abb. 10.3.: ^{13}C -NMR Spektrum aufgenommen bei 125 MHz (CDCl_3)

Die Lage der Resonanzsignale (δ in ppm) ist erkennbar. Die Signalfäche unter den Peaks ist ein Maß für die Anzahl an Protonen. Die Nummern wurden nachträglich eingefügt und kennzeichnen die Peakzuordnung bzw. die in Abb. 10.1. nummerierten C-Atome.

Tabelle 10.2.: Vergleich der Literaturdaten mit den gemessenen NMR-Daten

Legende: s - Singulett, m - Multipllett, d - Duplett

Nummerierung der C-Atome in den Aryltetralin-Lignane	gemessenes ¹ H-NMR Spektrum	gemessenes ¹³ C-NMR Spektrum	¹ H-NMR Spektrum nach Ikeda et al. (1998)	¹³ C-NMR Spektrum nach Ikeda et al. (1998)
1		128,2		128,3
2	6,654		6,66 s	108,5
3		147,0		147,1
4		146,7		146,8
5	6,505	110,4	6,52 s	110,5
6		130,5		130,7
7		33,0	ca. 2,73	33,1
8		32,8	2,72 m	32,8
9		72,0	3,91 m	72,0
	4,44		4,44 m	
1'		136,2		136,2
2'	6,335	108,4	6,35 s	108,5
3'		152,4		152,5
4'		136,9		137,3
5'				152,5
6'	6,335	108,2	6,35 s	108,5
7'	4,590	43,7	4,60 d	43,8
8'		47,4	2,72 m	47,5
9'		174,9		174,8
-OCH ₂ O-	5,935	101,1	5,92 d	101,2
	5,913		5,94 d	
C ₃ -OCH ₃	3,736	56,1	3,75 s	56,3
C ₄ -OCH ₃	3,789	60,7	3,80 s	60,8
C ₅ -OCH ₃	3,736	56,1	3,75 s	56,3

10.4. LC/MS-Analyse der DOP6H Produkte

Das bei der DOP6H Reaktion entstandene Produkt β -Peltatin wurde mittels LC/MS im Vergleich zu einer Standard- β -Peltatin Lösung (1,036 mg/ml) auf seine Identität überprüft. Diese Analyse wurde im Labor von Prof. Dr. Schmidt durchgeführt.

LC/MS-Analyse des DOP-Standards:

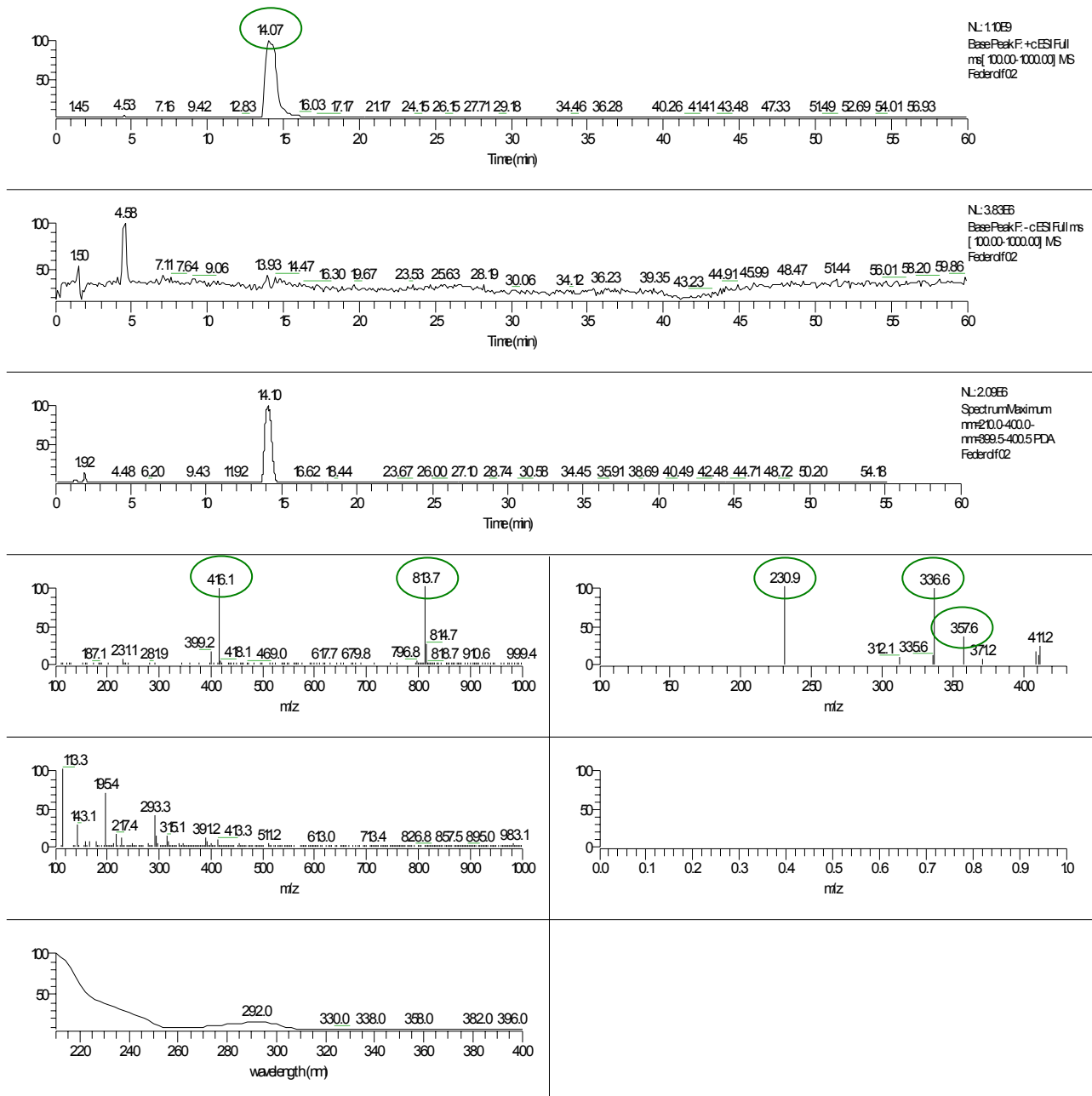


Abb. 10.4.: LC/MS-Analyse des DOP-Standards

Retentionszeit von 14,07 min; Hauptfragmente: +ms - 416,1 m/z (Dimer - 813,7 m/z); +ms/ms - 230,9, 336,6 und 357,6 m/z; Absorptionsmaximum: 292 nm

LC/MS-Analyse des β -Peltatin-Standards:

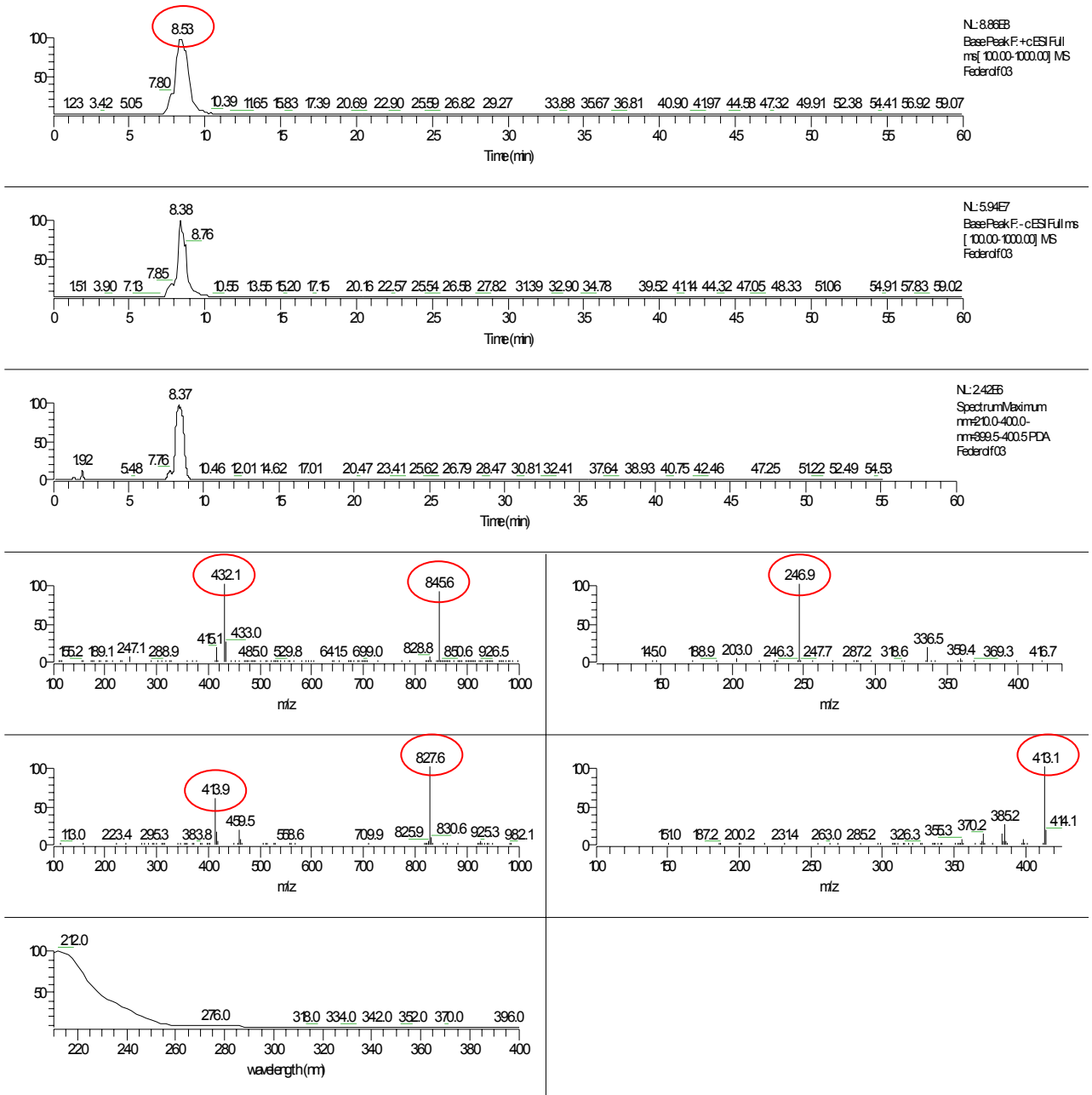


Abb. 10.5.: LC/MS-Analyse des β -Peltatin-Standards

Retentionszeit von 8,38 min; Hauptfragmente: +ms - 432,1 m/z (Dimer - 845,6 m/z); +ms/ms - 246,9 m/z; -ms -413,9 m/z (Dimer - 827,6 m/z); -ms/ms - 413,1; Absorptionsmaximum: 276 nm

LC/MS-Analyse des DOP6H-Assays für 60 min inkubiert:

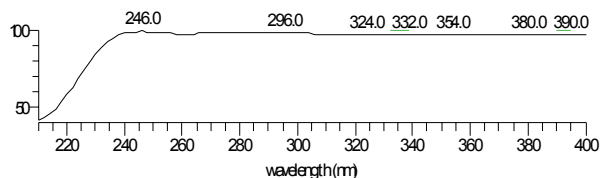
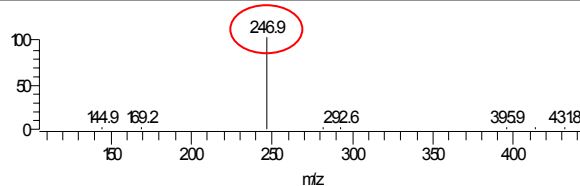
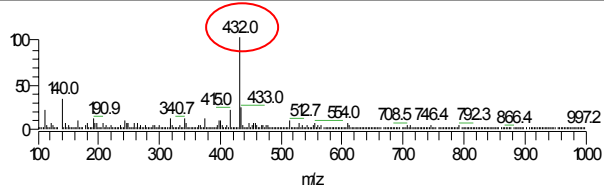
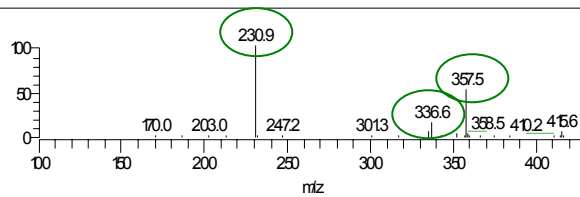
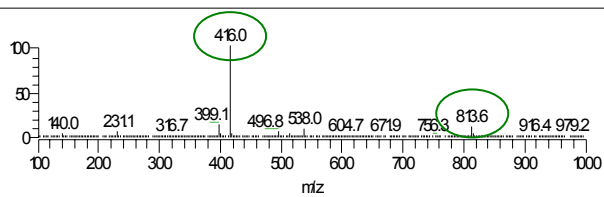
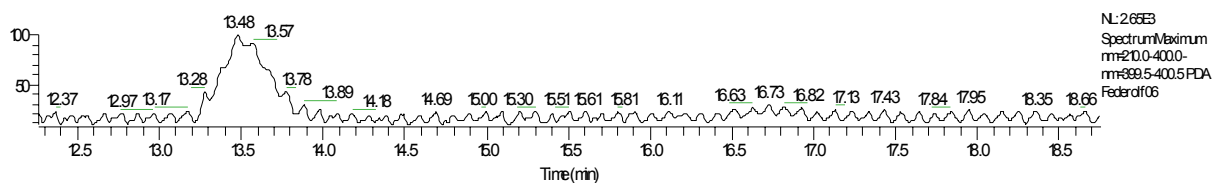
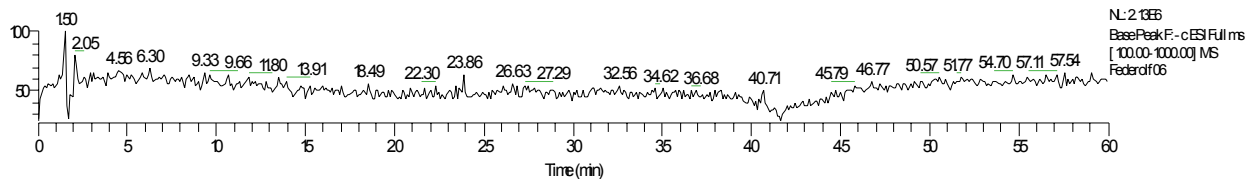
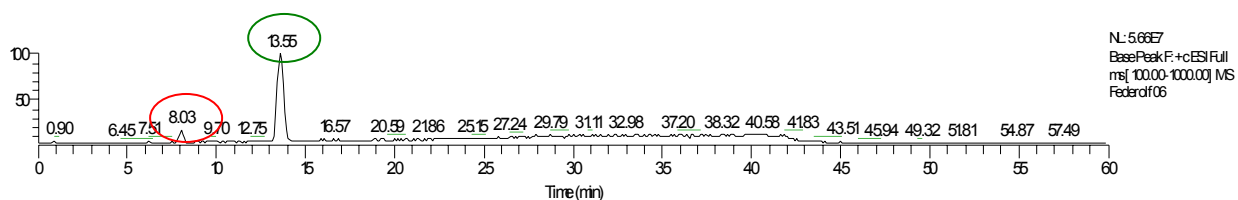


Abb. 10.6.: LC/MS-Analyse des DOP6H-Assays für 60 min inkubiert

Retentionszeit DOP - 13,55 min, β -Peltatin - 8,03 min;

Hauptfragmente DOP: +ms - 416,1 m/z (Dimer - 813,7 m/z); +ms/ms - 230,9, 336,6 und 357,6 m/z;

Hauptfragmente β -Peltatin: +ms - 432,0 m/z; +ms/ms - 246,9 m/z

LC/MS-Analyse des DOP6H-Assays nicht inkubiert (Stopp vor Start):

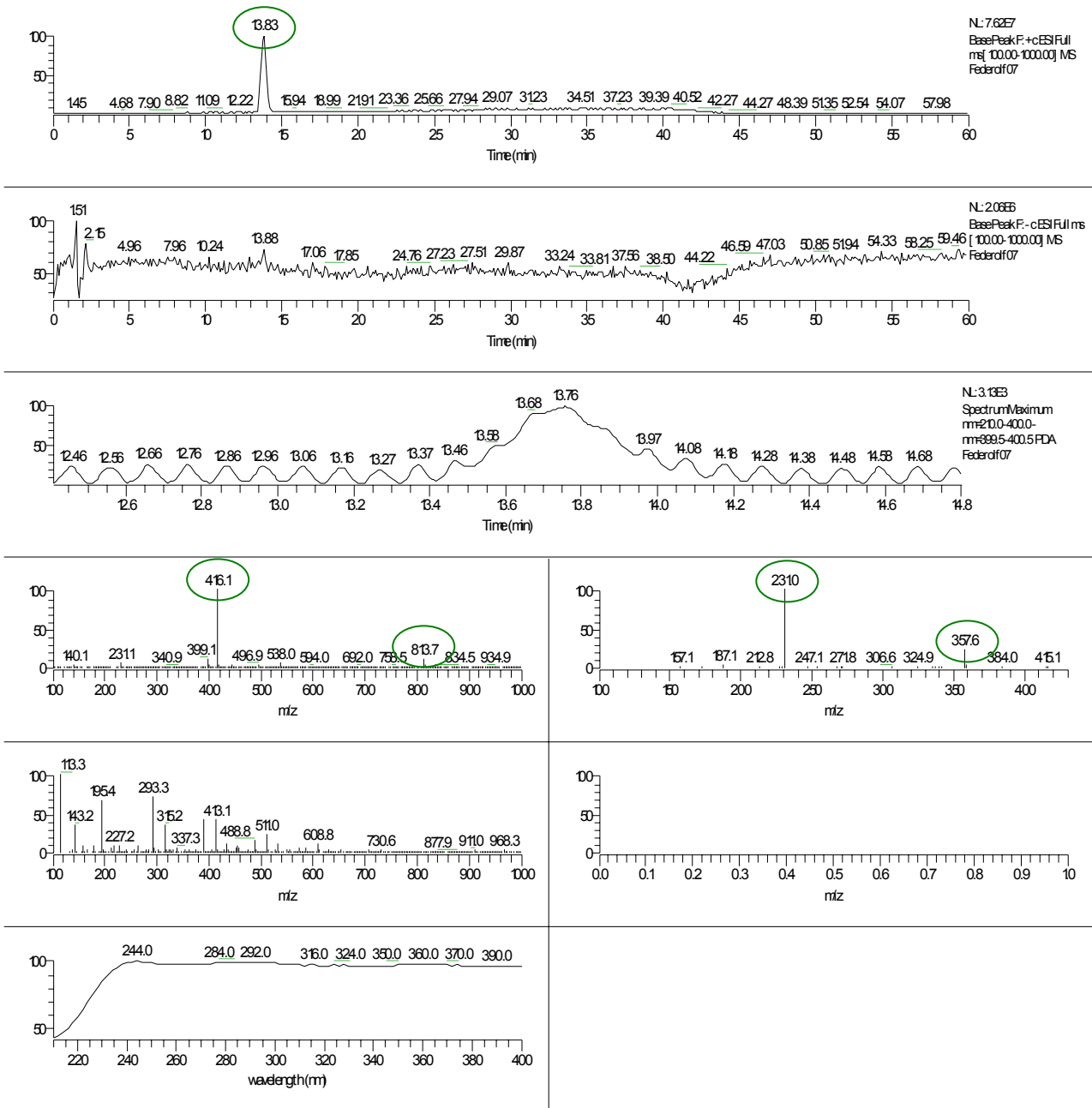


Abb. 10.7.: LC/MS-Analyse des DOP6H-Assays nicht inkubiert (Stopp vor Start)

Retentionszeit DOP - 13,83 min,

Hauptfragmente DOP: +ms - 416,1 m/z (Dimer - 813,7 m/z); +ms/ms - 231,0 und 357,6 m/z

10.5. Bestimmung der Inhibition der DOP6H

Kalkulationsart nach	NDA-Konzentration [μM]	v_{max} bzw. v_{max}' Werte [$\mu\text{kat/kg Protein}$]	K_M bzw. K_M' Werte [μM]
SigmaPlot	0 μM	9,5	3,6
	2 μM	7,6	4,0
	10 μM	4,4	5,5
	50 μM	1,8	9,7
	100 μM	1,0	3,0
	200 μM	0,6	0,2
Lineweaver-Burk	0 μM	12,9	8,0
	2 μM	9,1	6,3
	10 μM	4,0	4,2
	50 μM	1,5	6,5
	100 μM	1,1	10,3
	200 μM	0,4	8,0
Hanes-Woolf	0 μM	9,1	3,3
	2 μM	7,7	4,4
	10 μM	4,5	5,9
	50 μM	4,5	8,9
	100 μM	1,1	8,2
	200 μM	0,5	7,5
Eadie-Scatchard	0 μM	11,1	6,0
	2 μM	8,2	5,1
	10 μM	4,3	4,9
	50 μM	1,8	9,1
	100 μM	1,1	11,1
	200 μM	0,5	11,6

Tab. 10.3.: Berechnung der K_M - bzw. K_M' - und v_{max} - bzw. v_{max}' -Werte mit steigender NDA-Konzentration

graphische Auswertung mit dem Programm SigmaPlot 2001, rechnerische Auswertung nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard

Kalkulationsart nach	NDA-Konzentration [μM]	v_{max} bzw. v_{max}' Werte [$\mu\text{kat/kg Protein}$]	K_M bzw. K_M' Werte [μM]
SigmaPlot	0 μM	9,5	3,6
	2 μM	7,6	4,0
	10 μM	4,4	5,5
	50 μM	1,8	9,7
	100 μM	1,0	3,0
	200 μM	0,6	0,2
Lineweaver-Burk	0 μM	12,9	8,0
	2 μM	9,1	6,3
	10 μM	4,0	4,2
	50 μM	1,5	6,5
	100 μM	1,1	10,3
	200 μM	0,4	8,0
Hanes-Woolf	0 μM	9,1	3,3
	2 μM	7,7	4,4
	10 μM	4,5	5,9
	50 μM	4,5	8,9
	100 μM	1,1	8,2
	200 μM	0,5	7,5

Tab. 10.4.: Berechnung der K_M - bzw. K_M' - und v_{max} - bzw. v_{max}' -Werte mit steigender CLOT-Konzentration

graphische Auswertung mit dem Programm SigmaPlot 2001, rechnerische Auswertung nach Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf und Eadie-Scatchard (Tabelle wird auf Seite XV fortgesetzt)

Fortsetzung der Tab. 10.4.:

Kalkulationsart nach	NDA-Konzentration [µM]	v _{max} bzw. v _{max} ' Werte [µkat/kg Protein]	K _M bzw. K _M ' Werte [µM]
Eadie-Scatchard	0 µM	11,1	6,0
	2 µM	8,2	5,1
	10 µM	4,3	4,9
	50 µM	1,8	9,1
	100 µM	1,1	11,1
	200 µM	0,5	11,6

10.6. LC/MS-Analyse der βP6OMT Produkte

LC/MS-Analyse des β-Peltatin-Standards (siehe oben)

LC/MS-Analyse des β-Peltatin-A-Methylether (PAM) Standards:

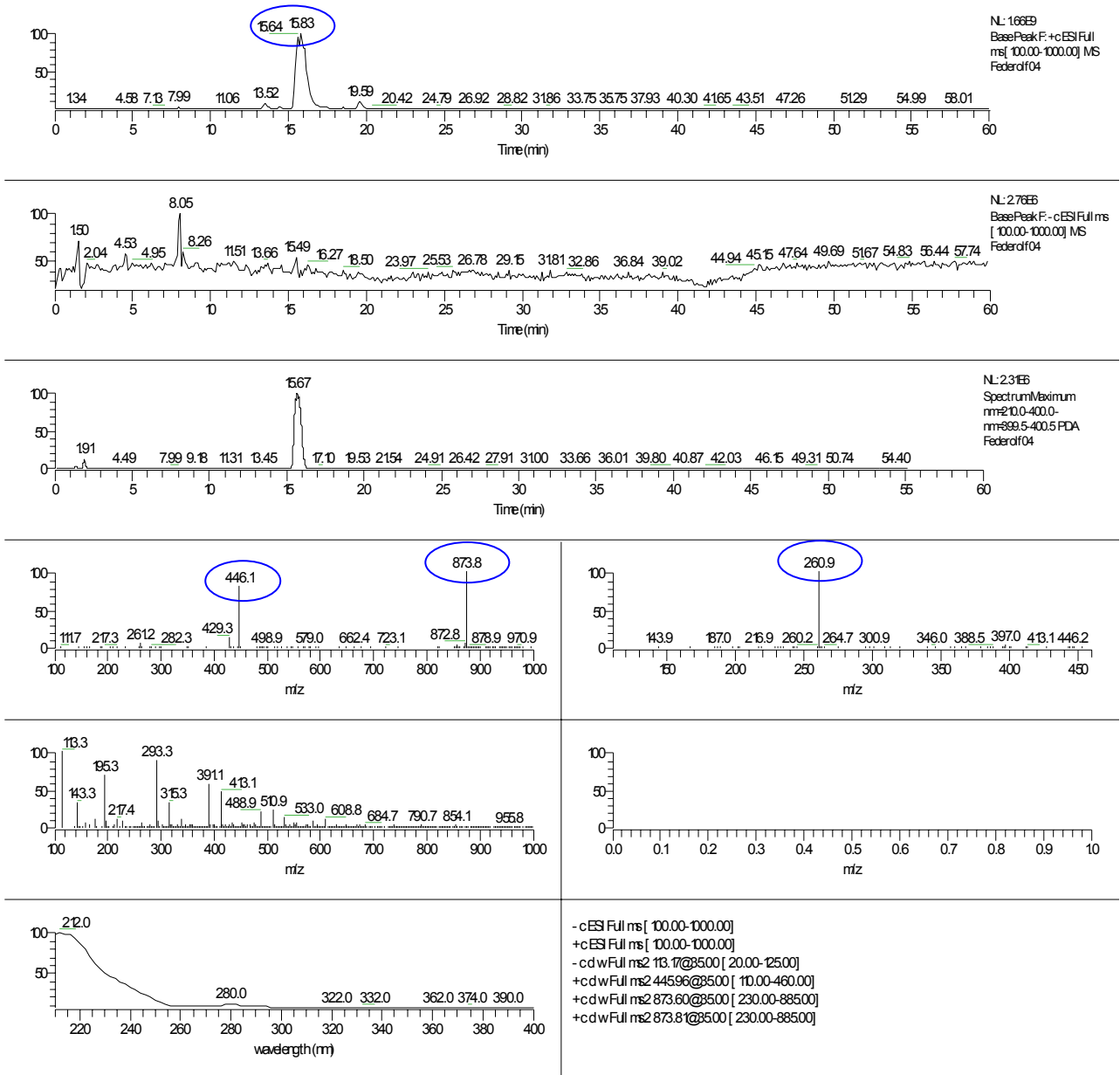


Abb. 10.8.: LC/MS-Analyse des β-Peltatin-A-Methylether (PAM) Standards

Retentionszeit von 15,83 min; Hauptfragmente: +ms - 446,1 m/z (Dimer - 873,8 m/z); +ms/ms - 260,9 m/z; Absorptionsmaximum: 280 nm

LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays für 60 min inkubiert (β -Peltatin):

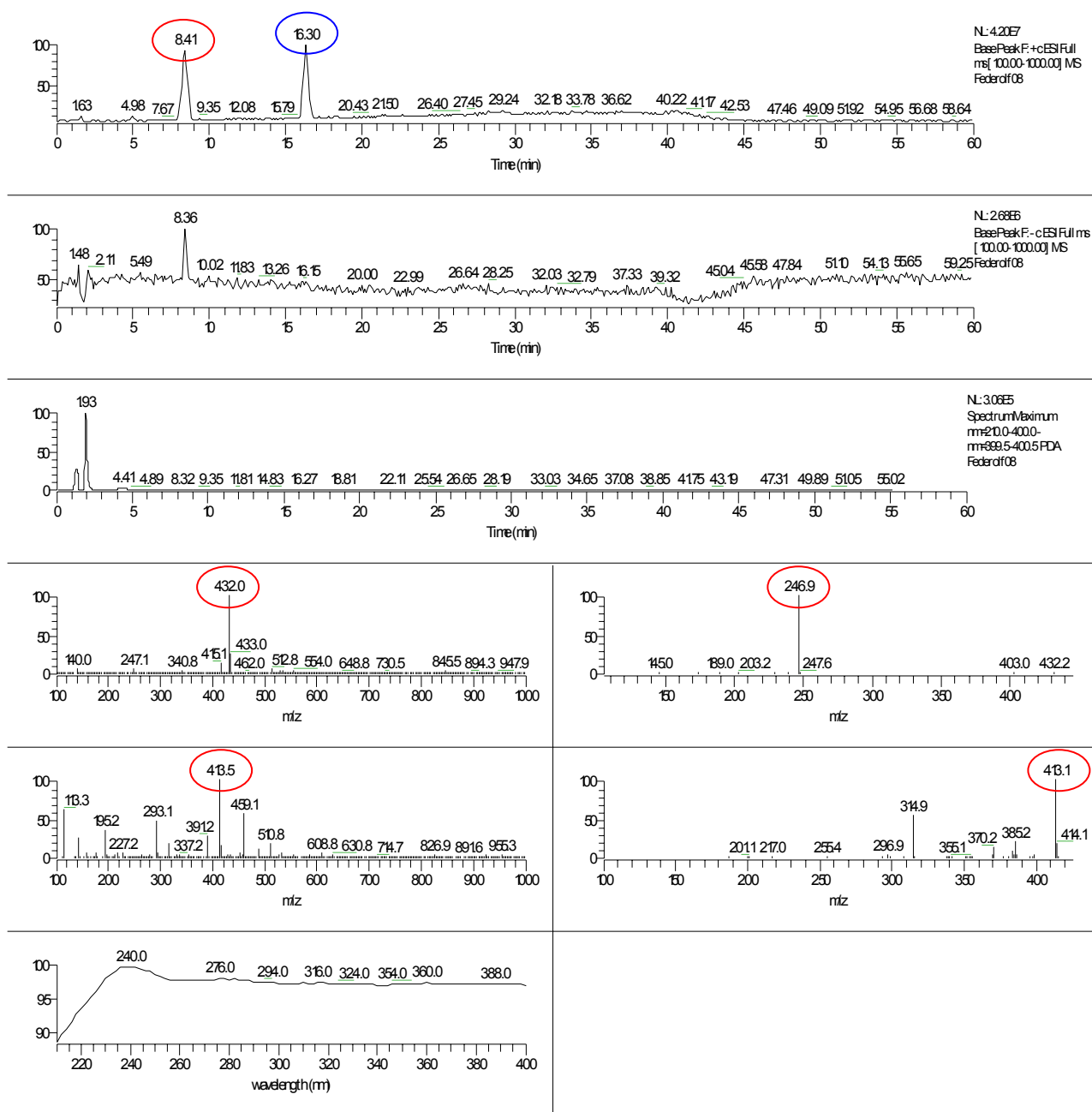


Abb. 10.9.: LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays für 60 min inkubiert (β -Peltatin)

Retentionszeit: β -Peltatin - 8,41 min, PAM - 16,30 min; Hauptfragmente β -Peltatin: +ms - 432,0 m/z; +ms/ms - 246,9 m/z; -ms - 413,5 m/z; -ms/ms - 413,1 m/z

LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays für 60 min inkubiert (PAM):

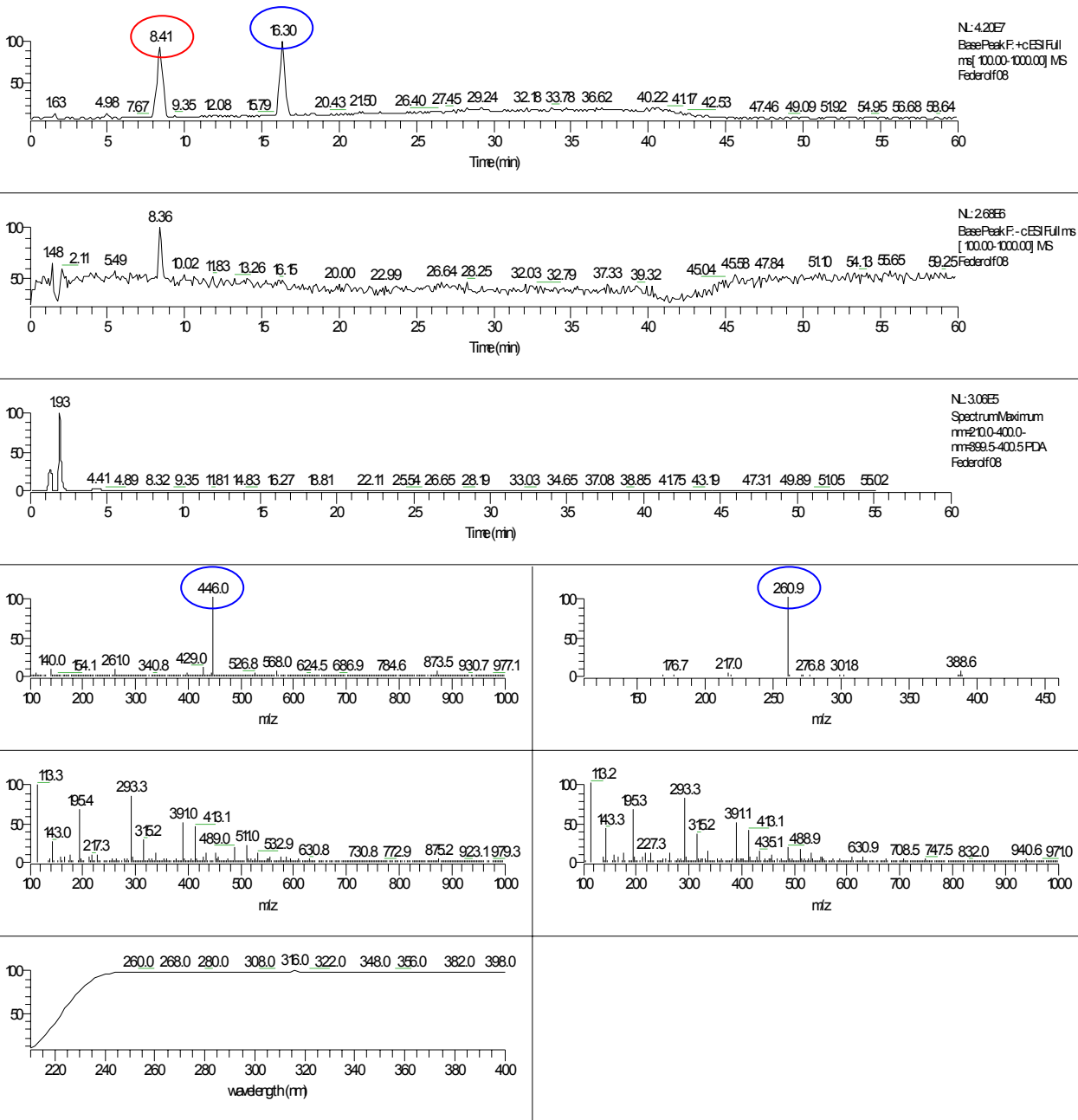


Abb. 10.10.: LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays für 60 min inkubiert (PAM)

Retentionszeit: β -Peltatin - 8,41 min, PAM - 16,30 min; Hauptfragmente PAM: +ms - 446,0 m/z; +ms/ms - 260,9 m/z

LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays nicht inkubiert:

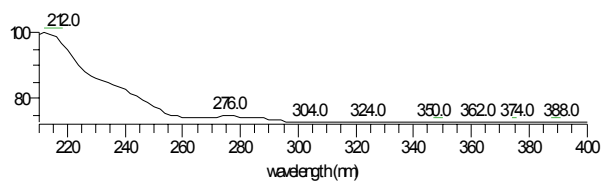
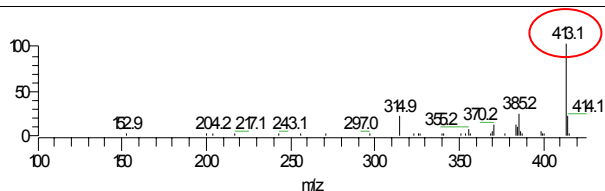
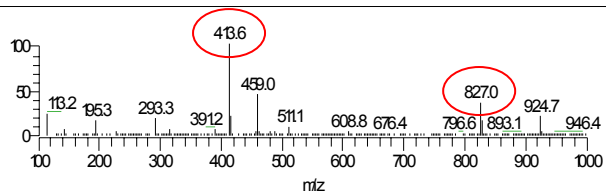
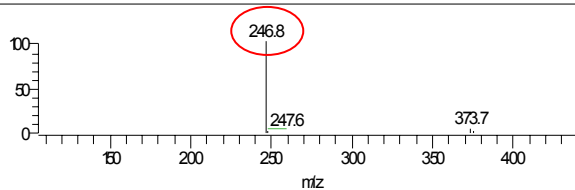
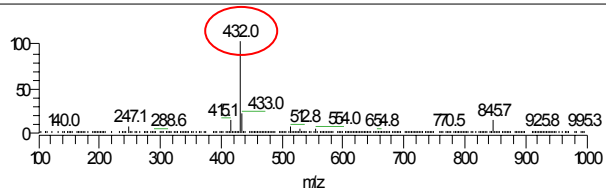
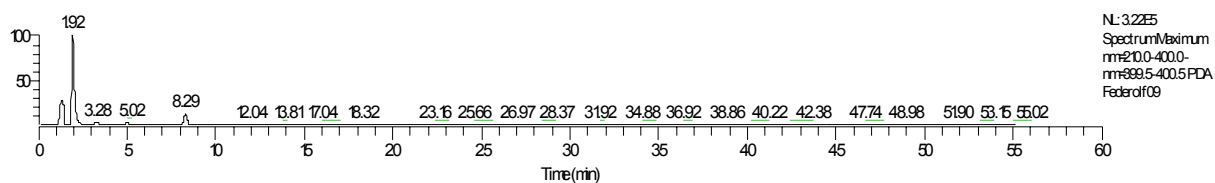
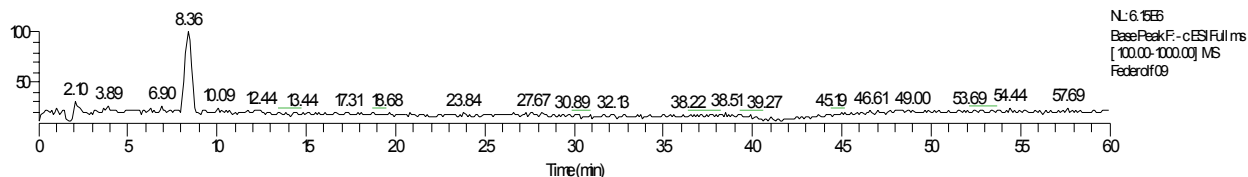
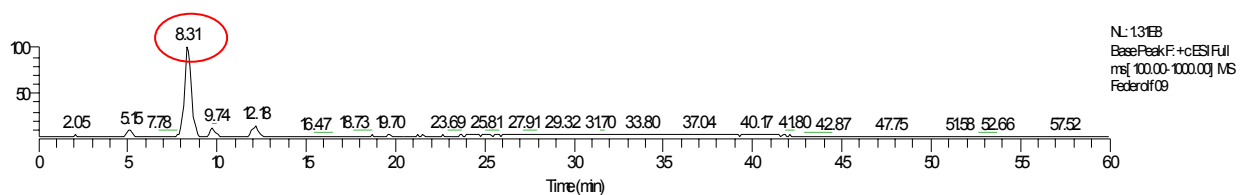


Abb. 10.11.: LC/MS-Analyse des β P6OMT-Assays nicht inkubiert

Retentionszeit: β -Peltatin - 8,31 min; Hauptfragmente β -Peltatin: +ms - 432,0 m/z; +ms/ms - 246,9 m/z; -ms - 413,6 m/z (Dimer - 827,0 m/z); -ms/ms - 413,1 m/z

10.7. LC/MS-Analyse der DOP7H Produkte

LC/MS-Analyse des PTOX-Standards:

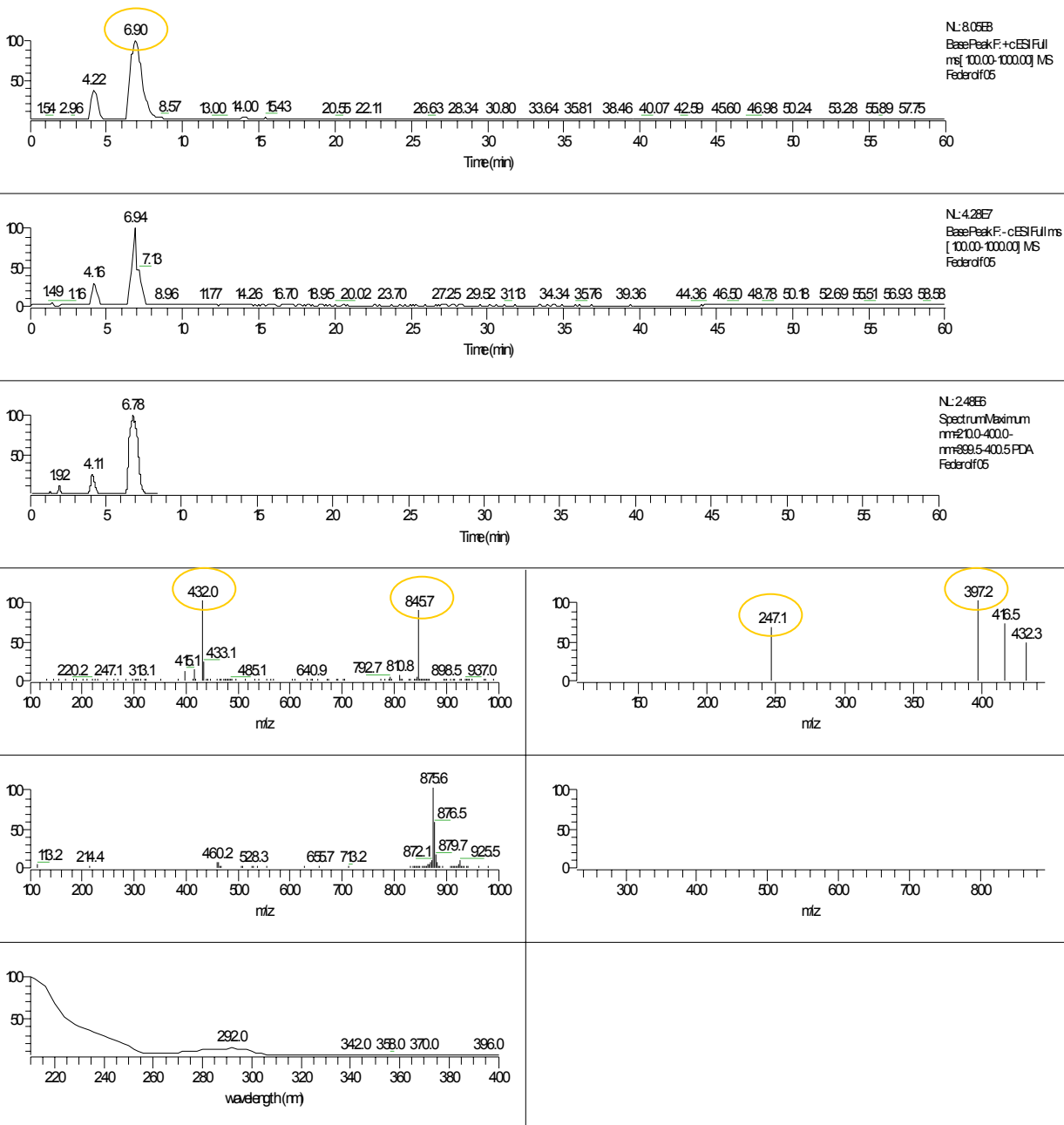


Abb. 10.12.: LC/MS-Analyse des PTOX-Standards

Retentionszeit von 6,9 min; Hauptfragmente: +ms - 432,0 m/z (Dimer - 845,7 m/z); +ms/ms - 247,1, 397,2 m/z;
Absorptionsmaximum: 292 nm

LC/MS-Analyse des DOP7H-Dioxygenaseassays mit Substrat (DOP-Zugabe):

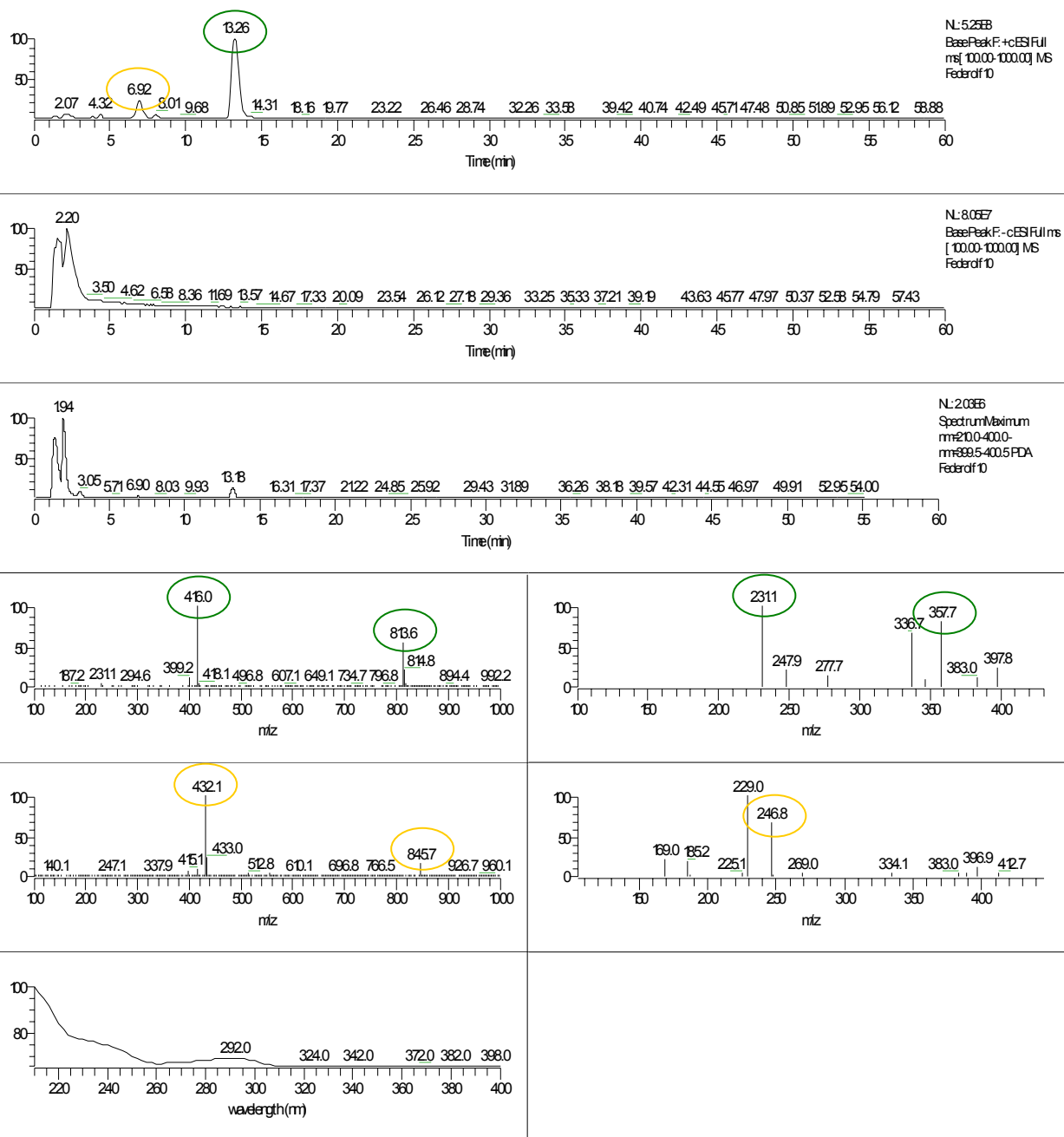


Abb. 10.13.: LC/MS-Analyse des DOP7H-Dioxygenaseassays mit Substrat (DOP-Zugabe)

Retentionszeit PTOX - 6,92 min, DOP - 13,26 min;

Hauptfragmente PTOX: +ms - 432,1 m/z (Dimer - 845,7 m/z); +ms/ms - **246,8 m/z; 396,9 m/z;**

Hauptfragmente DOP: +ms - 416,0 m/z (Dimer - 813,6 m/z); +ms/ms - 231,1, 336,6 und 357,6 m/z;

Absorptionsmaximum: 292 nm

LC/MS-Analyse des DOP7H-Dioxygenaseassays ohne Substrat (DOP-Zugabe):

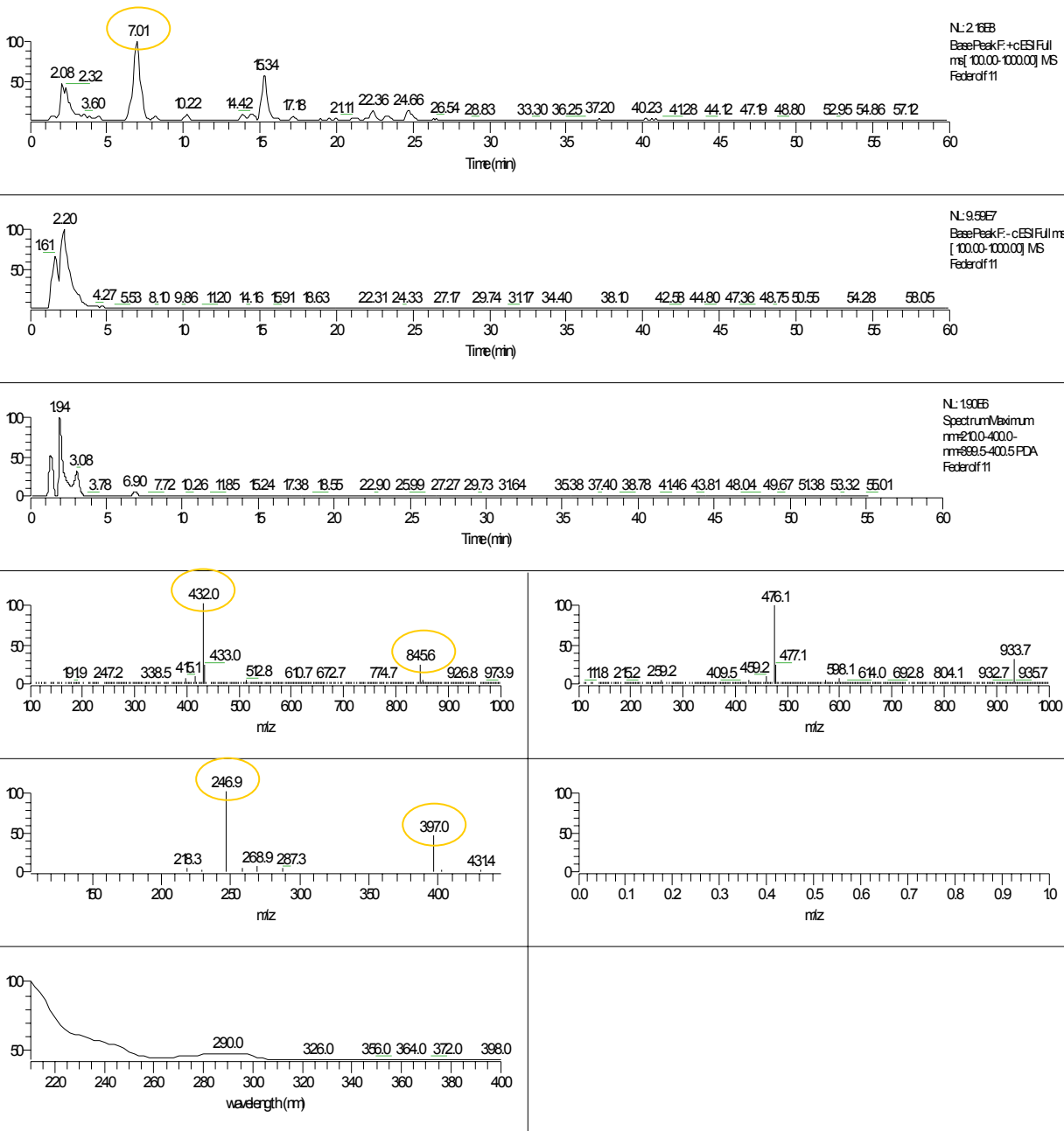


Abb. 10.14.: LC/MS-Analyse des DOP7H-Dioxygenaseassays ohne Substrat (DOP-Zugabe)

Retentionszeit PTOX - 6,92 min, DOP - 13,26 min;

Hauptfragmente PTOX: +ms - 432,0 m/z (Dimer - 845,7 m/z); +ms/ms - **246,9 m/z; 397,0 m/z;**

Absorptionsmaximum: 290 nm

10.8. LC/MS-Analyse der UDP-Glucosyltransferase Produkte

LC/MS-Analyse des UDP-Glucosyltransferaseassays mit Cosubstrat-Zugabe (UDP-Glucose):

C:\Calibur...AK_Alfemann\Federdf_02

01/30/2007 10:39:49 AM

K1 UDP

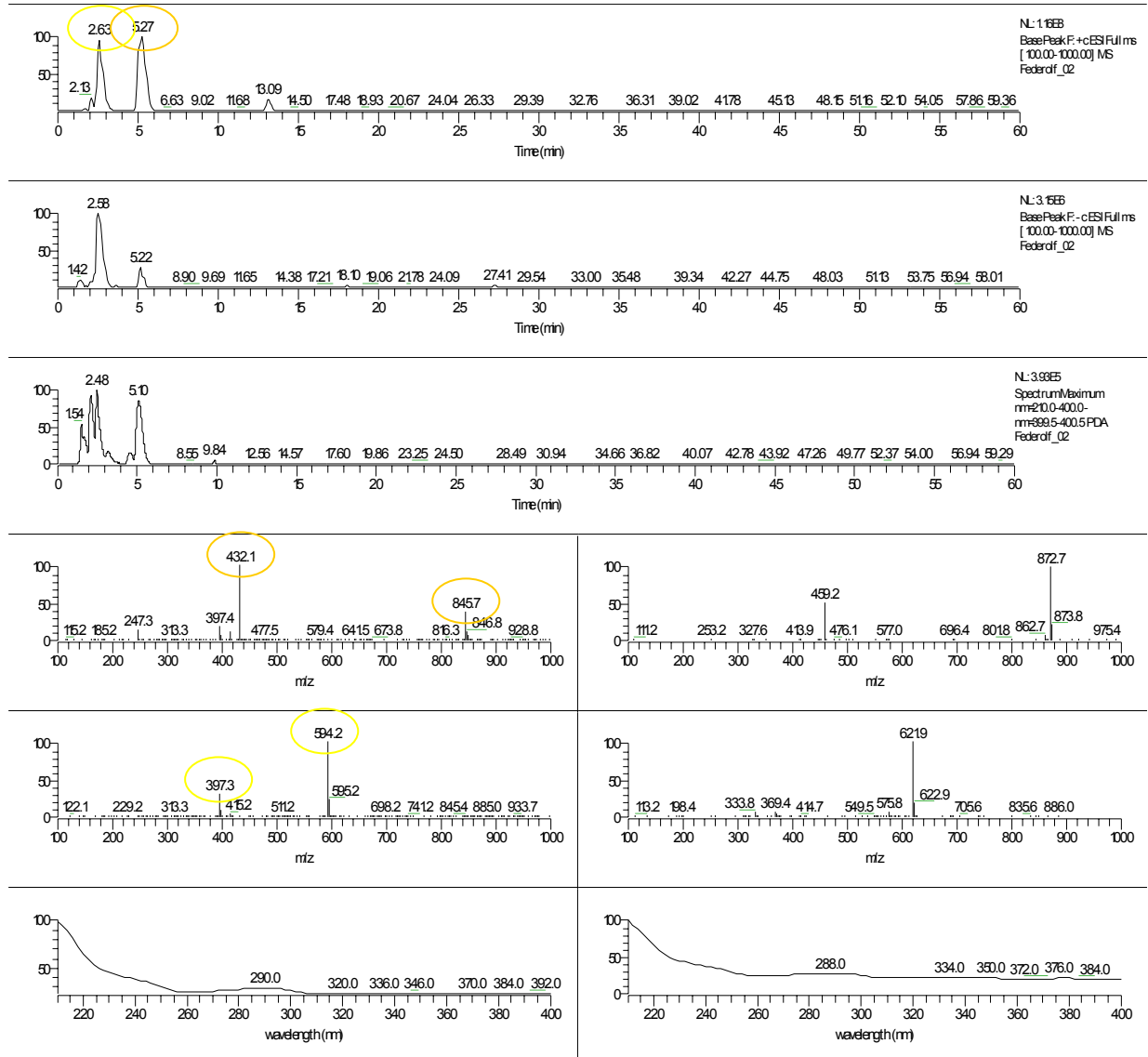


Abb. 10.15.: LC/MS-Analyse des UDP-Glucosyltransferaseassays mit Cosubstrat-Zugabe (UDP-Glucose)

Retentionszeit PTOX - 5,27 min, PTOX-Glucosid - 2,63 min; Hauptfragmente PTOX: +ms - 432,1 m/z (Dimer - 845,7 m/z); Hauptfragmente PTOX-Glucosid: +ms - 397,3 m/z, 594,2 m/z; Absorptionsmaximum: 290 nm; Die Hauptfragmente des PTOX-Glucosids stimmen im Wesentlichen mit Literaturdaten überein (Schmidt et al., 2006; Vasilev et al., 2007).

LC/MS-Analyse des **UDP-Glucosyltransferaseassays** ohne Cosubstrat-Zugabe (UDP-Glucose):

CVCalbur...AK_AlfemannFederdf_03

01/30/2007 11:56:57 FM

K2.UF1.Cme

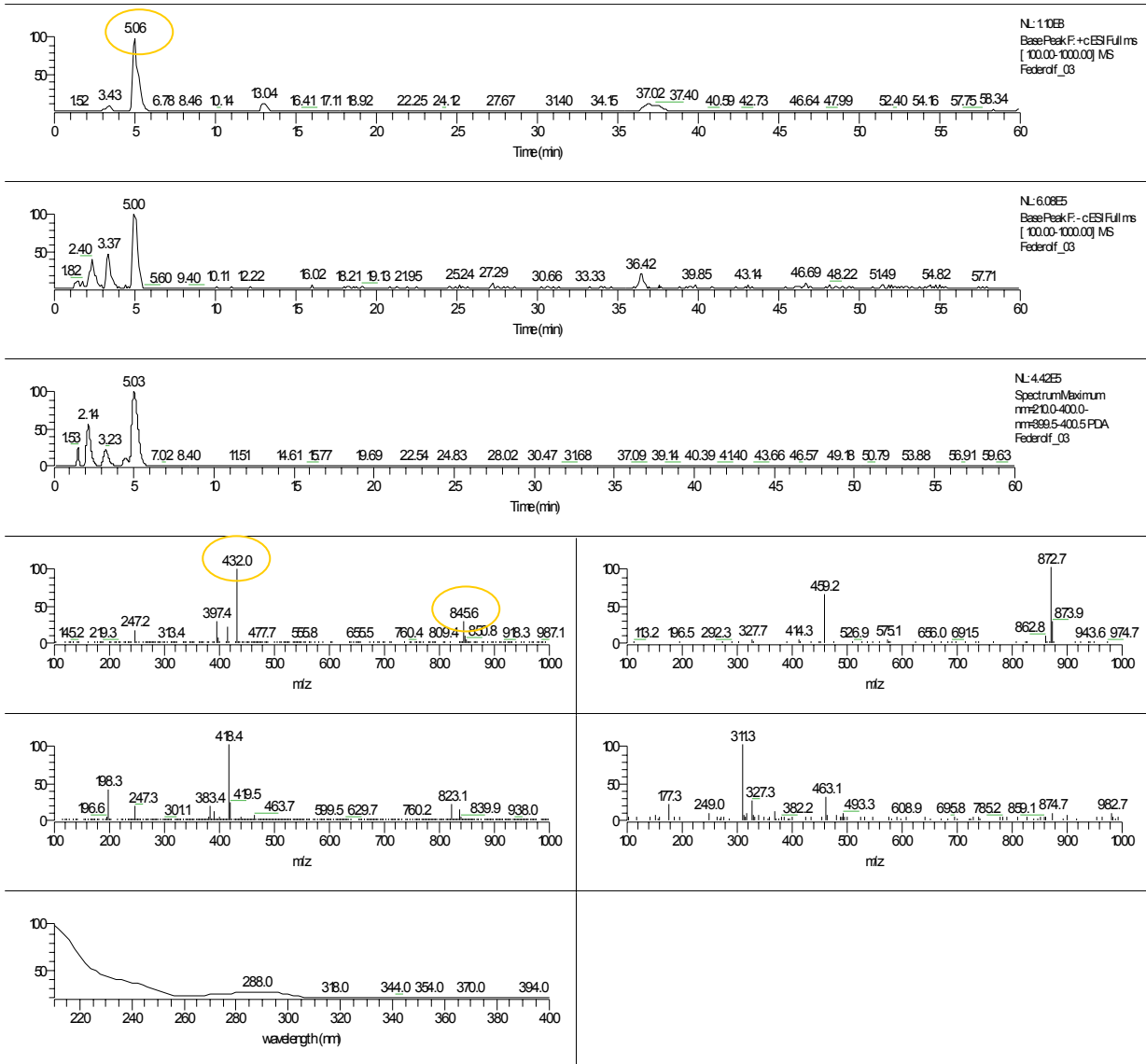


Abb. 10.16.: LC/MS-Analyse des UDP-Glucosyltransferaseassays ohne Cosubstrat-Zugabe (UDP-Glucose)
 Retentionszeit PTOX - 5,27 min, Hauptfragmente PTOX: +ms - 432,1 m/z (Dimer - 845,7 m/z); Absorptionsmaximum:
 268 nm

10.9. LC/MS-Analyse der 6MPTOX- und PTOX-Glucoside

LC/MS-Analyse des Lignanextraktes der Linie 6M:

C:\Calibur...VAK_Alfemam\Federof_04

01/31/2007 01:14:00 AM

K3GU

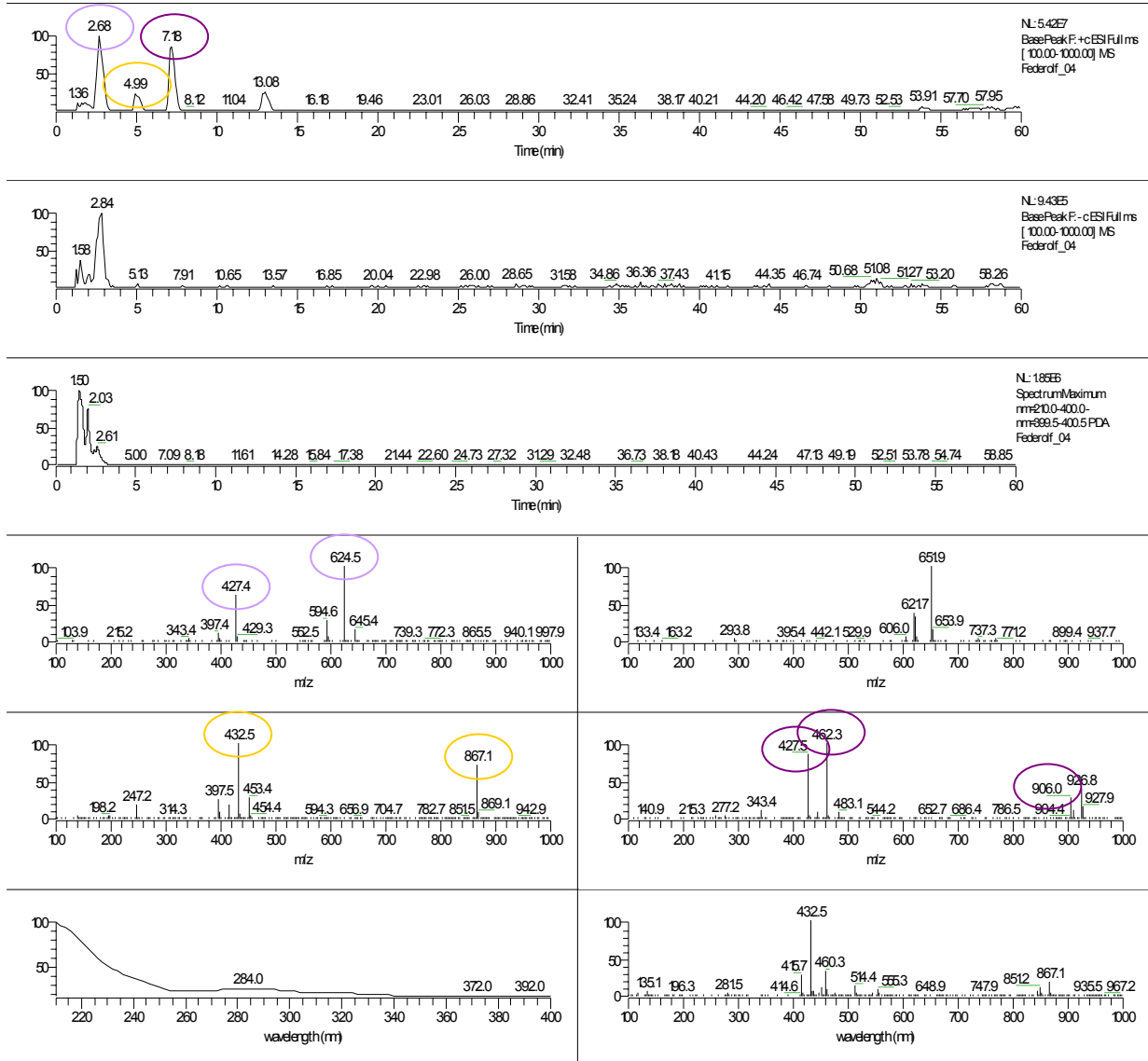


Abb. 10.17.: LC/MS-Analyse des Lignanextraktes der Linie 6M (Lignanextraktionsmethode B)

Retentionszeiten: 6MPTOX - 7,18 min, PTOX - 4,99 min, 6MPTOX-Glucosid - 2,68 min;

Hauptfragmente: 6MPTOX: +ms - 427,5 m/z, 462,3 m/z, 906,0 m/z; 6MPTOX-Glucosid: +ms - 427,7 m/z, 624,4 m/z; PTOX: 432,5 m/z, 867,1 m/z;

Die Hauptfragmente des 6MPTOX und 6MPTOX-Glucosids stimmen im Wesentlichen mit Literaturdaten überein (Schmidt et al., 2006; Vasilev et al., 2007).

LC/MS-Analyse des Lignanextraktes der Linie PT:

C:\Calibur\...AK_Alferrami\Federdf_05

01/31/2007 02:31:04 AM

K4 PT

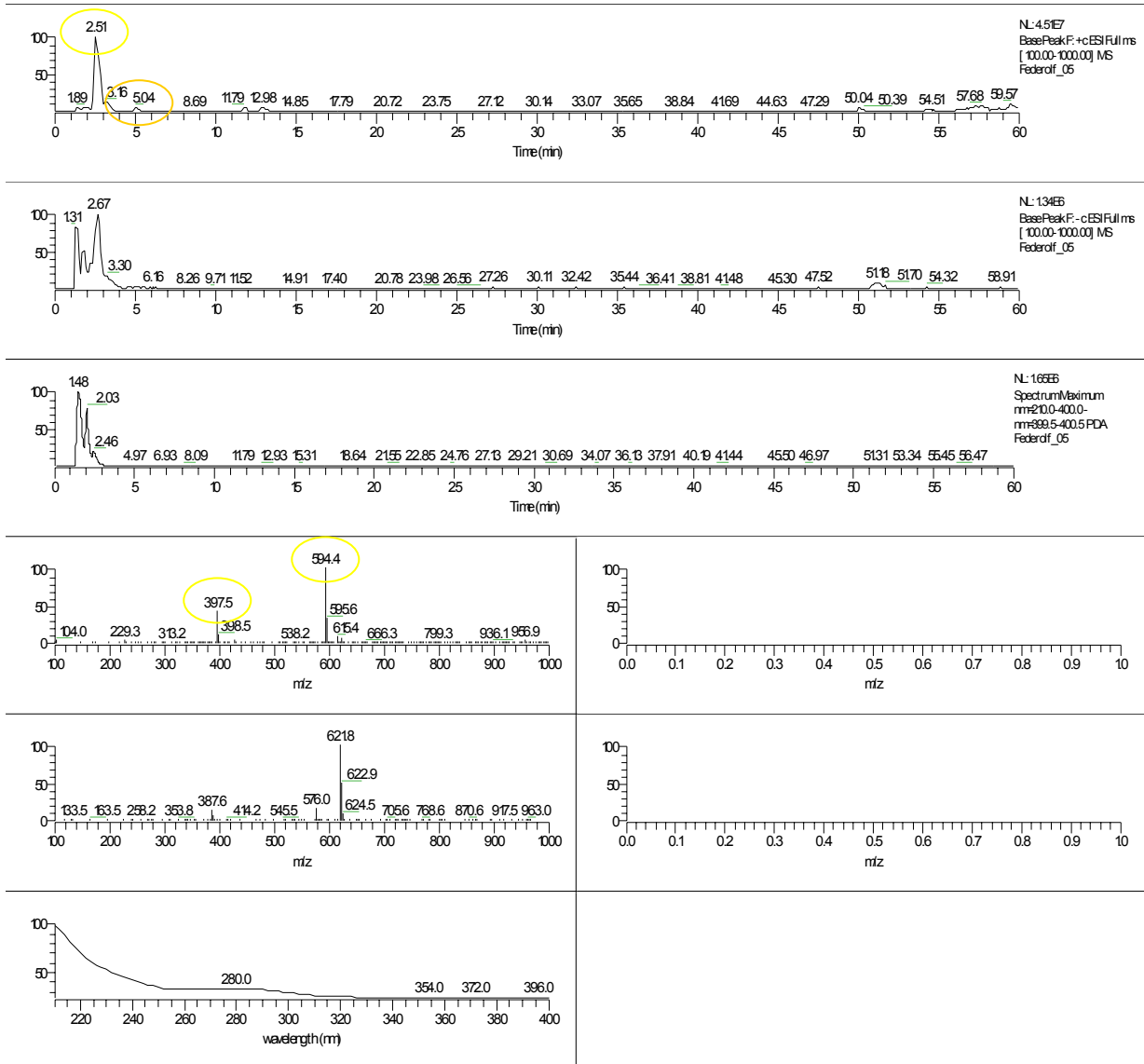


Abb. 10.18.: LC/MS-Analyse des Lignanextraktes der Linie PT (Lignanextraktionsmethode B)

Retentionszeiten: PTOX - 5,04 min, PTOX-Glucosid - 2,51 min;

Hauptfragmente: PTOX-Glucosid: +ms - 397,5 m/z, 495,4 m/z,

Die Hauptfragmente des PTOX-Glucosids stimmen im Wesentlichen mit Literaturdaten überein (Schmidt et al., 2006; Vasilev et al., 2007).

10.10. cDNA Teilsequenz von Aktin aus *L. album* Linie 6M

>pKF5K3* (838 bp)

```
5' GATGAGCTCCGGCGCATGGCCGGGGATATGGAAAGATATGGCATCACACATTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCAC
CTGAGGAGCACCCAGTGCTTTTACTGAGGCCCTCTTAACCCAAAGGCCAACAGAGAGAAGATGACTCAAATCATG
TTCGAGACGTTCAATGTCCCCGCCATGTATGTTGCCATCCAGGCCGTCTTTCCCTCTACGCCAGTGGTTCGTACTAC
CGGTATTGTGTTGGATTCCGGGTGATGGTGTGAGTCACACTGTGCCAATCTACGAGGGTTATGCTCTGCCACACGCCA
TTCTCCGTTTTGGATCTCGCAGGTTCGTGACTTGACCGACTCACTGATGAAGATCCTCACAGAGAGGGGTTACATGTTT
ACCACCACTGCCGAGCGGGAAATTGTCCGTGACATGAAGGAGAAGCTCGCGTACGTCCGCTCGACTACGAGCAAGA
GCTCGAGACGGCCAAGAGCAGCTCGTCCGGTTCGAGAAGAACTACGAGCTTCCCGATGGCCAGGTTCATCACCATTGGAG
CAGAGAGATTCCGCTGCCCTGAAGTCTCTTCCAGCCATCCCTCATCGGAATGGAAAGCTGCCGGGATCCACGAGACT
ACTTACAACCTCCATCATGAAGTGCATGTCGACATCAGGAAGGATCTCTACGGTAAACATCGTGCTCAGCGGTGGCTC
CACCATGTTCCCAGGCATTGCTGACCGTATGAGCAAAGAGATCACCGCACTTGCTCCAGCAGCATGAAGATCAAGG
TTGTTGCGCCCCCGGAGAGGAAATACAGTGTCTGGGATTGGAGGGTCCATCCTCGCCTCTCTCAGCACGT-3'
```

* pKF5 - Plasmid Katja Federolf Nr. 5, Klon Nr. 3; Teilsequenz ohne Reste der pGEMT[®]-Vektorsequenz

10.11. cDNA Teilsequenz einer putativen 4-CL aus *L. album* Linie 6M

>pKF03P01G12-07** (268)

```
5' TTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGTACAAGAACAATCCTGAAGCTACAAGAGCGGGTTTCTGTTTGGGTGGTTCCAC
ACCGGAGATCTTGGTTATTTTATTCCGATGGCTATTTGAATCTCGTCGGCAGGATTAAGGAGCTTGTCAACCGTGG
AGGGGAGAAGATATCTCCAATTGAAGTGGACTCAGTTCTTCTATCTCATCCAGACATCGCTCAAGCGGTCTGCTTCG
CTGTCCCTGATGAGAAGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA-3'
```

** pKF03 - Plasmid Katja Federolf Nr. 3, Klon Nr. P01G12; Teilsequenz ohne Reste der pGEMT[®]-Vektorsequenz

10.12. cDNA Teilsequenz einer putativen β -Amyrin Synthase aus *L. album* Linie PT

>pKF04P05D04*** (171)

```
5' TAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACGCGATCCAAGCGTTGGTGTFTTTTCAAGAAGCTATACCCCTCGGCACAGAGAGA
CAGAGATTGAGTGTFTTTATTAAGGTGCCGGCGAGATACCTGGAAAGCATTCAAACGTCCGAGGGCGGGTGGTACCT
GCCCCGGCGGCCGCTCGAA-3'
```

*** pKF04 - Plasmid Katja Federolf Nr. 5, Klon Nr. P05D04; Teilsequenz ohne Reste der pGEMT[®]-Vektorsequenz

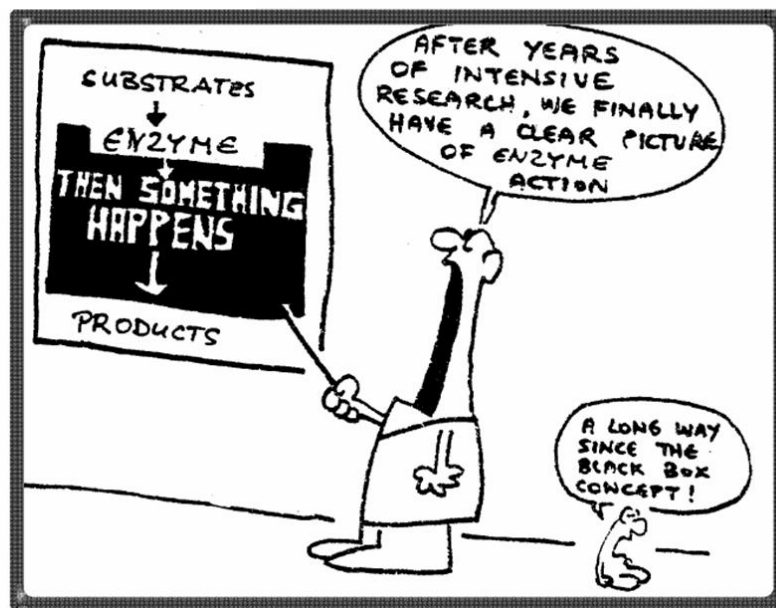


Abb. entnommen aus „Enzymkinetik und Mechanismus“
Texte und Praktikumsvorschriften 2005, J. Bode, A. Hans, J. Garbe;
Quelle - Internet;

Danksagung

Vielen herzlichen Dank an alle, die mir für das Gelingen dieser Arbeit behilflich waren:

Herrn Prof. Dr. A.W. Afermann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine Geduld, seinen hilfreichen Anregungen, seiner Hilfsbereitschaft bei der Lösung jedes noch so kleinen Problems und nicht zuletzt für die finanzielle Absicherung für die Dauer dieser Arbeit. Er verstand es stets durch ein „schwäbisches Späßle“ oder eine kleine Anekdote frustige Stunden zu erheitern.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Fuß. Trotz ihrer vielen Arbeit hatte sie stets ein offenes Ohr und viele gute Ratschläge. Danke, dass man jederzeit vorbeikommen konnte und auch „dumme Fragen“ beantwortet wurden. Auch wenn ich häufig grimmig dreinblickte, so war mir konstruktive Kritik stets willkommen.

Frau Prof. Dr. M. Petersen (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie) für die Einführung in die Geheimnisse der Cytochrom P450 Präparation und sonstigen nützlichen Tipps. Im Zuge der „Marburger-Danksagung“ geht mein Dank auch an Dr. S. Kuhlmann und Dr. K. Kranz für ihre Tipps und e-mail Kommunikation.

Frau Dr. K. Henze (Institut für Botanik III, HHU Düsseldorf) für die Nanoelektrospray Tandem-Massenspektrometrie und die Tipps bei der 2-D-Gelelektrophorese. Prof. Dr. Schmidt (ehemals HHU Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische Biologie; jetzt Westfälische Wilhelms-Universität Münster) für die NMR-Spektroskopie und LC/MS-Analysen, sowie deren Interpretation. Dr. R. Ebel und Dr. R. Edrada-Ebel für die LC/MS-Analysen. Prof. Dr. G. Wulff (HHU, Düsseldorf, Institut für Organische und Makromolekulare Chemie) an dessen Institut es mir möglich war die DOP-Synthesen vorzunehmen und für Überlassung des dafür nötigen Materials. Hierzu vor allem Dr. K. Knorr der mir beim Aufbau der Syntheseapparatur mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. W. Rademacher und Dr. K. Grossmann (BASF, Limburgerhof, Germany) für die Tetcyclacis (NDA) Spende. Frau Dr. G. Schröder und Prof. Dr. J. Schröder (ehemals Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Biochemie II) für ihre nützlichen Tipps bei den Dioxygenaseassays und der $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (Ammonium Eisen(II)-sulfat-6-hydrat; Mohr'sches Salz) Spende. Dr. M. Medarde (Salamanca, Spanien) für die Yatein Spende. Dr. A. Koulmann (Universität Groningen, Niederlande) für die Spende der getrockneten *Anthriscus sylvestris* Wurzelstücke. Prof. Dr. W. Boland (MPI für chemische Ökologie, Jena) für die Coronalon Spende. Der AG-Strothmann dafür, dass ich ein bisschen Dialyseschlauch und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase schnorren durfte.

Nicht zuletzt danke ich dem DFG-Graduiertenkolleg Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung unter Leitung von Prof. Dr. M.K. Grieshaber (Institut für Zoophysiology, HHU Düsseldorf) für die Aufnahme und finanzielle Unterstützung, sowie die Durchführung einiger schöner Exkursionen. Dank hierfür auch dem Sprecher des Graduiertenkollegs Andre Müller.

So, bevor ich jetzt dem „nackten Hamster“ für seine Arbeit danke, danke ich herzlichst meinem Mann („,,,,,,,,,,,,,;,,,,;.....:.....“ husch, husch auf Eure Plätze) und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Neben meiner Familie muss ich auch noch meinen besten Freunden Kirsten und Melli für ihr Dasein danken.

Nun zum „nackten Hamster“: Neben allen Kollegen sind mir besonders Jörg, Susanne, Cosima und Dagmar ans Herz gewachsen. Sie waren immer für einen Spaß und ein Schwätzchen zu haben, halfen stets mit Rat und vor allem Tat. Vielen Dank Susanne, dass ich immer bei Euch schnorren durfte (Schüttlerracks, Schüttlerkapazitäten, Gelapparaturen, 96er well Platten, DOT-Blot Apparaturen usw. usw.). Hierzu bedanke ich mich ebenfalls herzlich bei Karin Ernst (ebenfalls wie Susanne AG Westhoff) für die Einführung in die Macroarray Methodik.

An alle übrigen Kollegen - Danke für die Zeit und verzeiht, wenn ich immer wieder mal was zu Meckern hatte.

Erklärung

Ich versichere, dass mein Dissertation

Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen in *Linum album* –
Biochemie und Molekularbiologie der „späten“-Schritte

selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht oder zu sonstigen Prüfungszwecken verwendet.

Düsseldorf, 05.04.2007

.....
Katja Federolf

Katja Federolf
Schopstreck 20
42327 Wuppertal
katjafederolf@gmx.de

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 23.06.1975
Geburtsort: Kehl, Baden-Württemberg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung/Studium/Fortbildung:

1986 - 1992 Tulla-Realschule, Kehl; Abschluss: Mittlere Reife;
1992 - 1995 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Offenburg;
Abschluss: Abitur
1995 - 2001 Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
Grund- und Hauptstudium Biologie
(Schwerpunkte - Biochemie, Zellbiologie und Genetik)
1/2001 - 12/2001 Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Schröder, Institut für Biologie II,
Biochemie der Pflanzen,
Abschluss: Diplom
1/2002 - 6/2002 Bayer AG, Wuppertal, Forschungszentrum Aprath
Industriepraktikum
8/2002 Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Arbeitsgruppe Prof. Dr. A.W. Alfermann, Institut für Biologie
IV, Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen