

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur  
Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase  
aus Zellsuspensionskulturen von *Linum album*

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von  
Jörg Windhövel  
aus Solingen

Düsseldorf, 2002

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

Referent: Prof. Dr. A. W. Alfermann

Korreferent: Prof. Dr. P. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| I          | EINLEITUNG .....   | 1  |
| I.1        | Pflanzliche Sekundärmetabolite .....   | 1  |
| I.2        | Lignane – Abkömmlinge des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels .....                              | 1  |
| I.3        | Podophyllotoxin.....   | 2  |
| I.4        | Pflanzliche Zellkulturen.....  | 3  |
| I.5        | <i>Linum album</i> (der weiße Lein) - Zellsuspensionskulturen als Quelle für Podophyllotoxin ..... | 4  |
| I.6        | Der Phenylpropanstoffwechsel .....   | 6  |
| I.7        | Die Biosynthese von Podophyllotoxin und verwandten Lignanen.....                                   | 8  |
| I.8        | Die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase.....  | 10 |
| I.9        | Zielsetzung der Arbeit .....   | 12 |
| II         | MATERIAL UND METHODEN .....  | 13 |
| II.1       | Biochemische Methoden.....   | 13 |
| II.1.1     | Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen .....   | 13 |
| II.1.2     | CoA-Ester-Synthese.....  | 13 |
| II.1.3     | Herstellung des Enzymextrakts aus <i>L. album</i> Suspensionskulturen.....                         | 16 |
| II.1.4     | Reinigung des Enzymextraktes mittels Anionenaustausch-Chromatographie .....                        | 16 |
| II.1.5     | Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR).....               | 17 |
| II.1.6     | Biochemische Charakterisierung der CCR .....   | 18 |
| II.1.6.1   | Abhängigkeit der CCR von der Inkubationsdauer.....   | 18 |
| II.1.6.2   | Proteinabhängigkeit der CCR .....  | 18 |
| II.1.6.3   | Abhängigkeit der CCR vom pH-Wert .....   | 18 |
| II.1.6.4   | Bestimmung des Temperaturoptimums der CCR.....   | 18 |
| II.1.6.5   | Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante .....  | 19 |
| II.1.7     | HPLC-Analyse der CCR-Tests .....   | 19 |
| II.1.8     | Bestimmung der Proteinkonzentration .....  | 20 |
| II.1.9     | Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von <i>L. album</i> im Kulturverlauf .....           | 20 |
| II.1.9.1   | Wachstumsparameter.....  | 20 |
| II.1.9.2   | Mediumsparameter .....   | 20 |
| II.1.9.3   | Enzympräparation .....   | 20 |
| II.1.9.4   | Enzymtests .....   | 21 |
| II.1.9.4.1 | Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) .....  | 21 |
| II.1.9.4.2 | Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (4CL) .....  | 21 |
| II.1.9.4.3 | Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) (Rückreaktion).....  | 21 |
| II.1.9.4.4 | Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase.....  | 22 |
| II.1.9.5   | Lignan-Extraktion und Analyse der Lignanextrakte mittels HPLC .....                                | 22 |
| II.2       | Molekularbiologische Methoden .....  | 23 |
| II.2.1     | Standardmethoden .....   | 23 |
| II.2.2     | Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen .....               | 23 |
| II.2.2.1   | Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA aus <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen .....        | 23 |
| II.2.2.1.1 | Isolierung der Gesamt-RNA .....  | 23 |
| II.2.2.1.2 | Gewinnung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA.....   | 23 |
| II.2.2.2   | Herstellung und Amplifikation der Phagen-cDNA-Bibliothek von <i>L. album</i> .....                 | 24 |
| II.2.2.3   | Sichtung der cDNA-Bibliothek .....   | 24 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| II.2.2.3.1  | Herstellung einer mit Digoxigenin markierten Sonde .....  | 24 |
| II.2.2.3.2  | Transfer von Phagen-DNA auf Nylonmembranen .....  | 25 |
| II.2.2.3.3  | Hybridisierung und Detektion filtergebundener Phagen-DNA.....   | 25 |
| II.2.2.4    | <i>In vivo</i> Exzision .....   | 26 |
| II.2.3      | Polymerasekettenreaktion (PCR).....   | 26 |
| II.2.3.1    | RT-PCR .....  | 26 |
| II.2.3.1.1  | RT-PCR zur Sondenherstellung für die Sichtung der cDNA-Biblio-<br>thek .....                                      | 26 |
| II.2.3.1.2  | Klonierung der homologen <i>L. album</i> -Sonde in pGEM-T .....   | 26 |
| II.2.3.2    | PCR für die Klonierung von DNA-Fragmenten .....   | 27 |
| II.2.3.3    | Reaktionsbedingungen für die PCR.....   | 27 |
| II.2.3.4    | PCR-Programme .....   | 28 |
| II.2.3.4.1  | Programm zur Herstellung der homologen <i>L. album</i> -Sonde (346 bp) .....<br>zur Sichtung der cDNA-Bank: ..... | 28 |
| II.2.3.4.2  | Programm zur Amplifikation des offenen Leserasters der <i>L. album</i> -<br>CCR:.....                             | 28 |
| II.2.3.4.3  | Programm zur Herstellung der 3'-untranslatierten Region der CCR-<br>cDNA von <i>L. album</i> : .....              | 28 |
| II.2.3.5    | Reinigung der PCR-Ansätze .....   | 29 |
| II.2.4      | Agarose-Gelelektrophorese.....  | 29 |
| II.2.5      | Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....  | 29 |
| II.2.6      | Plasmidpräparationen.....   | 29 |
| II.2.6.1    | Präparation zur Erhaltung sauberer Plasmid-DNA .....  | 29 |
| II.2.6.2    | „TENS“-Plasmidpräparation .....   | 30 |
| II.2.7      | Sequenzierung.....  | 30 |
| II.2.7.1    | Konzentrieren von DNA für die Sequenzierung.....  | 30 |
| II.2.7.2    | Computergestützte Sequenzanalyse.....   | 31 |
| II.2.8      | Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen .....   | 31 |
| II.2.8.1    | Isolierung genomischer DNA aus <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen .....                                     | 31 |
| II.2.8.2    | Fällung von DNA aus Restriktionshydrolysen .....  | 31 |
| II.2.8.3    | Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern-Transfer) .....   | 32 |
| II.2.8.4    | Isolierung der RNA aus <i>L. album</i> Zellsuspensionen für den Northern-<br>Transfer .....                       | 32 |
| II.2.8.5    | Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Transfer).....  | 32 |
| II.2.8.6    | DNA/DNA- und RNA/DNA-Hybridisierung.....  | 33 |
| II.2.8.6.1  | Sondenmarkierung mit $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP.....   | 33 |
| II.2.8.6.2  | Prähybridisierung .....   | 33 |
| II.2.8.6.3  | Hybridisierung und Autoradiographie .....   | 33 |
| II.2.8.6.4  | Entfernung der Sonde von der Membran .....  | 34 |
| II.2.9      | Herstellung kompetenter Bakterien (DH5 $\alpha$ und BL21(DE3)pLysS) .....   | 34 |
| II.2.10     | Heterologe Expression .....   | 34 |
| II.2.10.1   | Herstellung eines Enzymrohextrakts aus transformierten <i>E. coli</i> -Zellen .....                               | 35 |
| II.2.10.2   | Optimierungsexperimente zur heterologen Expression .....  | 35 |
| II.2.10.2.1 | Optimierung der Induktionsdauer .....   | 35 |
| II.2.10.2.2 | Experimente zur Stabilisierung der heterolog exprimierten CCR .....   | 35 |
| II.2.11     | Kulturbedingungen für Bakterien .....   | 35 |
| II.2.11.1   | Antibiotika .....   | 36 |
| II.2.11.2   | Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen.....  | 36 |
| II.2.12     | Stammhaltung von Bakterien.....   | 36 |
| II.3        | Material .....  | 36 |
| II.3.1      | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....  | 36 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| II.3.2    | Geräte.....  | 39 |
| II.3.3    | Enzyme .....   | 40 |
| II.3.4    | Bakterienstämme .....  | 40 |
| II.3.5    | Kulturmedien .....   | 41 |
| II.3.6    | Phagen.....  | 41 |
| II.3.7    | Plasmide.....  | 41 |
| II.3.8    | Oligonukleotide .....  | 41 |
| III       | ERGEBNISSE.....  | 42 |
| III.1     | Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von <i>Linum album</i> .....   | 42 |
| III.1.1   | Wachstumsparameter – Frisch- und Trockengewicht .....  | 42 |
| III.1.2   | Mediumsparameter .....   | 43 |
| III.1.3   | Enzymaktivitäten im Kulturverlauf.....   | 44 |
| III.1.3.1 | Proteinkonzentrationen der Enzymextrakte im Kulturverlauf.....   | 45 |
| III.1.3.2 | Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) .....  | 45 |
| III.1.3.3 | Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (4CL).....   | 46 |
| III.1.3.4 | Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) .....  | 47 |
| III.1.3.5 | Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR).....  | 48 |
| III.1.4   | Podophyllotoxin-Gehalt.....  | 49 |
| III.2     | Herstellung und Sichtung einer cDNA-Bibliothek aus Zellsuspensionskulturen<br>von <i>L. album</i> X4 .....                           | 50 |
| III.2.1   | Herstellung einer homologen <i>L. album</i> -Sonde .....   | 50 |
| III.2.2   | Identifizierung einer für eine <i>L. album</i> -CCR codierenden cDNA.....  | 51 |
| III.3     | Sequenzvergleich der putativen <i>L. album</i> -CCR mit verschiedenen CCRs<br>unterschiedlichster pflanzlicher Herkunft.....         | 53 |
| III.4     | Southern-Analyse.....  | 55 |
| III.5     | Untersuchung zum Transkriptionslevel der CCR in <i>L. album</i> .....  | 56 |
| III.6     | Gewinnung der Enzymextrakte für die Untersuchung der CCR aus <i>L. album</i> -<br>Suspensionskulturen .....                          | 57 |
| III.7     | Heterologe Expression der CCR aus <i>L. album</i> im <i>E. coli</i> -Stamm .....   | 59 |
|           | BL21(DE3)pLysS .....   | 59 |
| III.7.1   | Optimierung der Induktionsdauer.....   | 59 |
| III.7.2   | Stabilisierung des Enzymrohextrakts.....   | 60 |
| III.8     | Vergleichende Charakterisierung der aus <i>L. album</i> -Suspensionskulturen<br>extrahierten und der heterolog exprimierten CCR..... | 62 |
| III.8.1   | Zeitabhängigkeit .....   | 62 |
| III.8.2   | Proteinabhängigkeit .....  | 63 |
| III.8.3   | Temperaturabhängigkeit .....   | 64 |
| III.8.4   | pH-Abhängigkeit .....  | 65 |
| III.8.5   | Aktivitätsexperimente mit Caffeoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA .....  | 67 |
| III.8.6   | K <sub>M</sub> -Wert-Bestimmung für Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und NADPH .....   | 67 |
| IV        | DISKUSSION .....   | 72 |
| IV.1      | Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von <i>L. album</i> X4.....  | 72 |
| IV.1.1    | Das Wachstumsverhalten von <i>L. album</i> -Suspensionskulturen der Zelllinie<br>X4 – Wachstums- und Mediumsparameter .....          | 72 |
| IV.1.2    | Stoffwechseluntersuchungen – Enzymaktivitäten und PTOX-Synthese.....   | 73 |
| IV.2      | Molekularbiologische Untersuchungen zur CCR aus <i>L. album</i> X4.....  | 75 |
| IV.2.1    | Herstellung und Sichtung einer <i>L. album</i> -cDNA-Bank.....   | 75 |
| IV.2.2    | Heterologe Expression der putativen <i>L. album</i> -CCR .....   | 76 |

---

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| IV.2.3 | Die Suche nach CCR-Isoformen mittels Southern-Analyse .....   | 77  |
| IV.2.4 | Transkriptionsstudien mittels Northern-Analyse .....  | 78  |
| IV.3   | Biochemische Untersuchungen zur CCR aus <i>L. album</i> X4 .....  | 79  |
| IV.3.1 | Reinigung des gefällten <i>L. album</i> -Proteinextrakts durch Chromatographie<br>mit DEAE-Sephacel ..... | 79  |
| IV.3.2 | Vergleich von pflanzlichem und bakteriellem Proteinextrakt .....  | 79  |
| IV.4   | Abschließende Bemerkungen .....   | 85  |
| V      | ZUSAMMENFASSUNG .....   | 87  |
| VI     | LITERATURVERZEICHNIS .....  | 89  |
| VII    | ANHANG .....  | 95  |
| VII.1  | Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....  | 95  |
| VII.2  | Abkürzungen und Maßeinheiten außerhalb des SI-Systems .....   | 97  |
| VII.3  | Nukleinsäuren .....   | 99  |
| VII.4  | Aminosäuren .....   | 100 |
| VII.5  | Vektorkarten .....  | 100 |
| VII.6  | DNA-Größenstandard .....  | 103 |
| VII.7  | Publikationen / Konferenzberichte .....   | 103 |

Danksagung

# I EINLEITUNG

## I.1 Pflanzliche Sekundärmetabolite

Der Begriff pflanzliche Sekundärmetabolite (Sekundärstoffe, Naturstoffe) umfaßt eine große Anzahl an Substanzen, die scheinbar keine direkte Funktion im Stoffwechsel besitzen. Häufig ist das Vorkommen eines bestimmten Sekundärstoffes auf eine oder wenige Pflanzenspezies beschränkt, in denen sie eine spezifische Aufgabe erfüllen. Im Gegensatz dazu gibt es vergleichsweise wenige Primärstoffe, wie z.B. Chlorophyll, Aminosäuren, Nucleotide, einfache Kohlenhydrate und Membranlipide, die in allen Pflanzen gleichermaßen vorkommen und dort immer dieselben Funktionen erfüllen (HELDT, 1999; TAIZ und ZEIGER, 1999).

Mittlerweile sind über 80.000 Sekundärstoffe bekannt, und jährlich kommen etwa 1000 neue Substanzen zu dieser Stoffgruppe dazu (RICHTER, 1998).

Für die Pflanzen sind die Sekundärmetabolite aber keineswegs sekundär, d.h. sie sind nicht von untergeordneter Bedeutung. Früher wurden zahlreiche Verbindungen für End- oder „Abfall“produkte des Stoffwechsels gehalten, doch weiß man heute, daß sie wichtige Aufgaben als „Speicherstoffe mit erneuter Mobilisierung, als Lichtwandler, Phytohormon, Abwehrstoff, Signalsubstanz oder Grundbaustein essentieller komplexer Moleküle“ erfüllen (RICHTER, 1998). Hinsichtlich ihres chemischen Aufbaus lassen sich die Sekundärmetabolite in drei bedeutende Stoffklassen einordnen: die Terpenoide, Phenole und Alkaloide (HESS, 1991).

Für den Menschen stellen pflanzliche Sekundärstoffe eine wichtige Quelle für Arzneistoffe (z.B. herzwirksame Glykoside, anticancerogene Lignane), Pestizide (z.B. Rotenoide, Nicotine, Pyrethrine), Geschmacks- und Duftstoffe (z.B. Vanille, Anis, Campher, Citronenöl, Eucalyptusöl, Zimt usw.) dar (KIERAN et al., 1997; HESS, 1991). Somit sind sie sowohl wissenschaftlich als auch industriell von großem Interesse.

## I.2 Lignane – Abkömmlinge des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels

Die Sekundärstoffgruppe der Lignane zählt zu den Phenylpropanoiden. Lignane entstehen aus zwei Hydroxymethylalkohol-Einheiten, zumeist handelt es sich um Coniferylalkohol, die über die C8-Atome ihrer Seitenketten miteinander verbunden sind. Dieses Grundgerüst kann durch Ringschluß-, Ringspaltungs- sowie Substitutionsreaktionen zu einer Vielzahl verschiedener Lignanderivate (substituierte Dibenzylbutane, Dibenzylbutyrolactone, Furane, Furanofurane, Aryltetrahydronaphthalene) verändert werden, die sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden können (SCHMITT und PETERSEN, 2002; DAVIN und LEWIS, 1991). Hydroxymethylalkohol-Dimere, die nicht über die 8,8'-Atome verbunden sind, sondern ein abweichendes Verknüpfungsmuster aufweisen, werden Neolignane genannt.

Lignane sind im Pflanzenreich weit verbreitet (DEWICK, 1989) und kommen auch in höheren Pilzen vor (RÖMPP, 1997). Sie konnten sowohl bei Gymnospermen als auch bei Angiospermen, bei letzteren jedoch fast ausschließlich bei den Dikotylen (DEWICK, 1989), nachgewiesen werden. Innerhalb der Pflanze konnten Lignane aus Rhizomen, Wurzeln, Blättern, Blüten, Früchten und sogar aus Samen isoliert werden (MACRAE und TOWERS, 1984).

Selbst bei Säugetieren wurden Abkömmlinge dieser Stoffklasse in Form von Enterodiol und Enterolacton entdeckt. Sie werden durch mikrobielle Aktivität im Verdauungstrakt aus Matai-

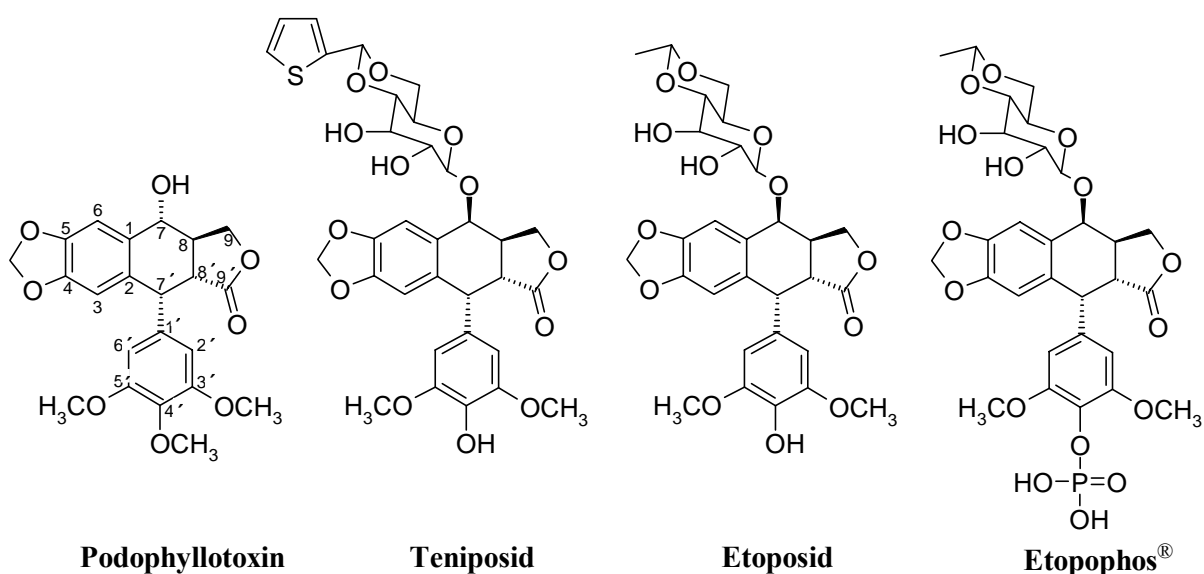
resinol und Secoisolariciresinol (Abb. 6) und deren Glucosiden, die in pflanzlicher Nahrung (z.B. Leinsamen) enthalten sind, gebildet (LEWIS und DAVIN, 1994; MEAGHER, et al. 1999). Diesen „Säugetier-Lignan“ schreibt man eine Schutzfunktion gegen hormonabhängige Krebserkrankungen zu (PETERSEN und ALFERMANN, 2001).

Aufgrund ihrer antibakteriellen, fungiziden, antiviralen und antioxidativen Eigenschaften dienen Lignane den Pflanzen vermutlich als Abwehrstoffe (SCHMITT und PETERSEN, 2002), für den Menschen sind sie aufgrund ihrer medizinischen Wirkung interessant.

### I.3 Podophyllotoxin

Podophyllotoxin (PTOX) ist strukturell ein Aryltetralinlacton-Lignan (DAMAYANTHI und LOWN, 1998), das genauso wie seine Derivate (Abb. 1) cytotoxische und antivirale Eigenschaften aufweist. Der Wirkungsmechanismus entspricht dem des Colchicins. Die Ausbildung des Spindelapparates bei der Zellteilung wird unterbunden, indem das PTOX an die  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimere bindet und so die Polymerisation der Mikrotubuli verhindert, während die Depolymerisation weiterhin abläuft (PETERSEN und ALFERMANN, 2001). Die Zellen verharren in der Metaphase und sterben nach einigen Stunden ab (STÄHELIN und VON WARTBURG, 1991). Aufgrund der hohen Toxizität des PTOX ist sein medizinischer Anwendungsbereich eingeschränkt. Es wird äußerlich zur Behandlung von Genitalwarzen (Condyloma acuminata), verursacht durch den Human-Papilloma-Virus, eingesetzt.

Besondere Bedeutung hat PTOX als Ausgangssubstanz für die Herstellung semisynthetischer Derivate wie Teniposid, Etoposid und Etopophos<sup>®</sup> (Abb. 1), die in der Krebstherapie zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Testikularkarzinoms und anderer Tumorerkrankungen eingesetzt werden (DAMAYANTHI und LOWN, 1998; HANDE, 1998).



**Abb.1:** Podophyllotoxin und seine semisynthetischen Derivate Teniposid, Etoposid und Etopophos<sup>®</sup>



Diese drei Derivate zeichnen sich gegenüber PTOX durch eine bessere Verträglichkeit aus. Im Gegensatz zu PTOX induzieren sie eine Arretierung der Zellen in der späten S- oder der frühen G<sub>2</sub>-Phase vor dem Eintritt in die Meiose durch Hemmung der Topoisomerase II. Hierdurch kommt es zu DNA-Strangbrüchen, was zum Absterben der Zellen führt (CANEL et al., 2000).

Einige synthetische PTOX-Analoga inhibieren auch die Reverse Transkriptase. Dies könnte zu einem selektiv gegen RNA-Viren (z.B. HIV) wirkenden Therapeutikum führen (CANEL et al., 2000).

PTOX wird aus den Rhizomen wild wachsender *Podophyllum*-Arten (Podophyllaceae) gewonnen. Diese Pflanzen sind aufgrund der hohen PTOX-Nachfrage und des resultierenden Raubbaus in ihren Beständen bedroht. Ihr Podophyllotoxingehalt liegt bei 0,25 bis 4,9 % des Trockengewichts in *P. peltatum* und 1,0 bis 4,9 % in *P. hexandrum* (PETERSEN und ALFERMANN, 2001). Die Rhizome benötigen für eine ausreichende PTOX-Akkumulation eine Wachstumsphase von 5 bis 7 Jahren (SMOLLNY et al., 1998). Die chemische Synthese von PTOX ist zwar möglich, aber nicht ökonomisch.

Um sicherzustellen, daß der PTOX-Bedarf auch in Zukunft gedeckt werden kann, wird nach alternativen Quellen gesucht. Neben Bemühungen, *Podophyllum*-Arten nachzuzüchten und zu kultivieren (NADEEM et al., 2000), wurden auch Suspensionskulturen von *Podophyllum hexandrum* angelegt, die jedoch schlecht wachsen und eine geringe PTOX-Synthese aufweisen (CHATTOPADHYAY et al., 2001). Des Weiteren wurden pflanzliche Zell- und Organkulturen anderer Pflanzenfamilien für eine biotechnologische Produktion von PTOX und verwandten Lignanen hergestellt (PETERSEN und ALFERMANN, 2001). Außer in Podophyllaceae wurden auch in Berberidaceae, Cupressaceae, Polygalaceae und Linaceae PTOX und verwandte Derivate gefunden (PETERSEN und ALFERMANN, 2001; WICHERS et al., 1990).

#### **I.4 Pflanzliche Zellkulturen**

Höhere Pflanzen stellen eine Quelle zahlreicher biochemischer Verbindungen dar, die für den Menschen als Pharmazeutika, Pestizide, Geschmacks- und Duftstoffe von Nutzen sind. Einige dieser Substanzen können auch als Alternative zur traditionellen Kultivierung und zur chemischen Synthese mit Hilfe von pflanzlichen Zellkulturen produziert werden (KIERAN et al., 1997). Diese haben den Vorteil, daß sie von biotischen und abiotischen Außenfaktoren, wie z.B. Fraßfeinden, Jahreszeit und Klima, aber auch von der politischen Situation der Anbauländer, weitgehend unabhängig sind (HESS, 1991). Durch Einhaltung steriler Bedingungen ist das Zellmaterial frei von störenden Mikroorganismen und somit auch von Pflanzenkrankheiten. Besonders wichtig ist, daß die Synthese sekundärer Pflanzenstoffe auf eine Kulturperiode von wenigen Wochen reduziert werden kann, während differenzierte Pflanzen mehrere Monate bis Jahre zum Wachsen benötigen können (ZENK, 1991). Interessanterweise konnten aus Zellsuspensionskulturen auch Substanzen isoliert werden, die die Pflanze normalerweise nicht synthetisiert (HESS, 1991). Durch das Anlegen von Wurzel- und Sproßkulturen ist es teilweise möglich, auch Sekundärstoffe herzustellen, die in der Pflanze nur in bestimmten Organen oder Geweben zu finden sind.

Einige vielversprechende Beispiele für eine mögliche Nutzung von Zellsuspensionskulturen sind die Produktion von Rosmarinsäure in *Coleus blumei* (ULBRICH et al., 1985), Shikonin in *Lithospermum erythrorhizon* (TABATA et al., 1974; TABATA und FUJITA, 1985) und  $\beta$ -Methyldigitoxin durch Biotransformation in *Digitalis lanata* (SEITZ et al., 1985).

Die Synthese bzw. Akkumulation mancher Inhaltsstoffe, z.B. Rosmarinsäure in *Coleus blumei* (ULBRICH et al., 1985), kann in den Zellkulturen die der intakten Pflanze bei weitem übersteigen. Normalerweise aber ist die Produktivität relativ gering. Demgegenüber sind die Kosten für die Nutzung pflanzlicher Zellkulturen im industriellen Maßstab hoch. Daher kann die Verwendung von Zellkulturen nur gerechtfertigt werden, wenn es einen ökonomischen Vorteil gegenüber anderen Herstellungsverfahren gibt, oder wenn keine Alternative vorhanden ist (KIERAN et al., 1997). Die Produktion von Taxol<sup>®</sup> (Paclitaxel) ist ein solches Beispiel, bei dem der kommerzielle Wert des Sekundärstoffes so hoch ist, daß sich die Synthese mit Zellkulturen lohnen könnte. Podophyllotoxin gehört auch zu den wertvollen Substanzen mit hoher Nachfrage, bei denen sich die Nutzung geeigneter Zellkulturen zur Herstellung rechnen könnte.

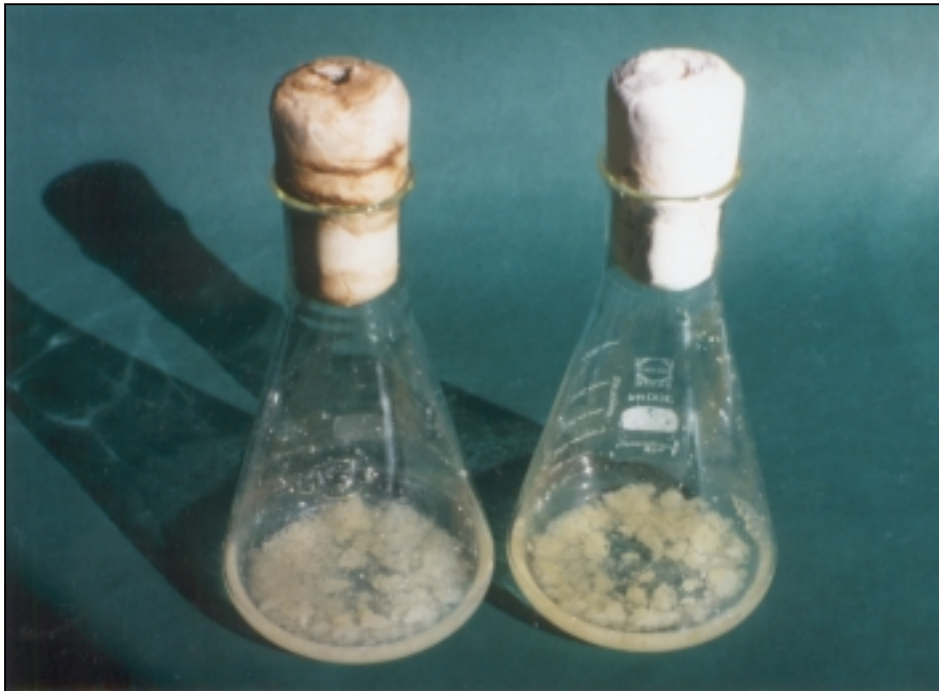
### **I.5 *Linum album* (der weiße Lein) - Zellsuspensionskulturen als Quelle für Podophyllotoxin**

Bei *Linum album* Kotschy, dem weißen Lein, (Abb. 2) handelt es sich um eine mehrjährige, krautige Pflanze, die vorwiegend im Iran vorkommt. Ihre schmalen, sitzenden Blätter sind alternierend angeordnet.



**Abb. 2:** *Linum album* Kotschy (A. Mohagheghzadeh)

Systematisch wird *Linum album* Kotschy innerhalb der Familie der *Linaceae* in die Sektion *Syllinum* eingeordnet (WINKLER, 1931).



**Abb. 3:** Zellsuspensionskulturen von *Linum album*



**Abb. 4:** vom Medium befreite Zellaggregate von *Linum album*

Bereits 1975 berichteten WEISS et al. über das Vorkommen cytotoxischer Lignane wie Podophyllotoxin (PTOX),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peltatin ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -PEL) sowie 3'-Demethylpodophyllotoxin in *Linum album*-Pflanzen. Zellsuspensionskulturen (Abb. 3 und 4) akkumulieren hauptsächlich PTOX und 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX), in geringeren Mengen aber auch Desoxypodophyllotoxin (DOP), 5'-Demethoxy-6-Methoxypodophyllotoxin, Lariciresinol (LARI), Pinoresinol (PINO), Matairesinol (MAT),  $\alpha$ - und  $\beta$ -PEL sowie die glukosidierte Form der Lignanvorstufe Coniferylalkohol (CONALC), das Coniferin (SMOLLNY et al., 1998). Die maximale Lignanausbeute aus unterschiedlichen *L. album*-Zelllinien, die im Dunkeln oder bei Licht kultiviert wurden, beträgt 0,2 bis 0,5 % des Trockengewichtes, wobei der Hauptanteil aus PTOX besteht (SMOLLNY et al., 1998). Die Kulturen zeichnen sich durch ein schnelles Wachstum aus. Bisher ist es möglich, 28 mg PTOX in einem Liter der Suspensionskultur in nur 11 Tagen zu produzieren (EMPT et al., 2000). Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zur langen Wachstumsdauer der *Podophyllum*-Rhizome (I.3).

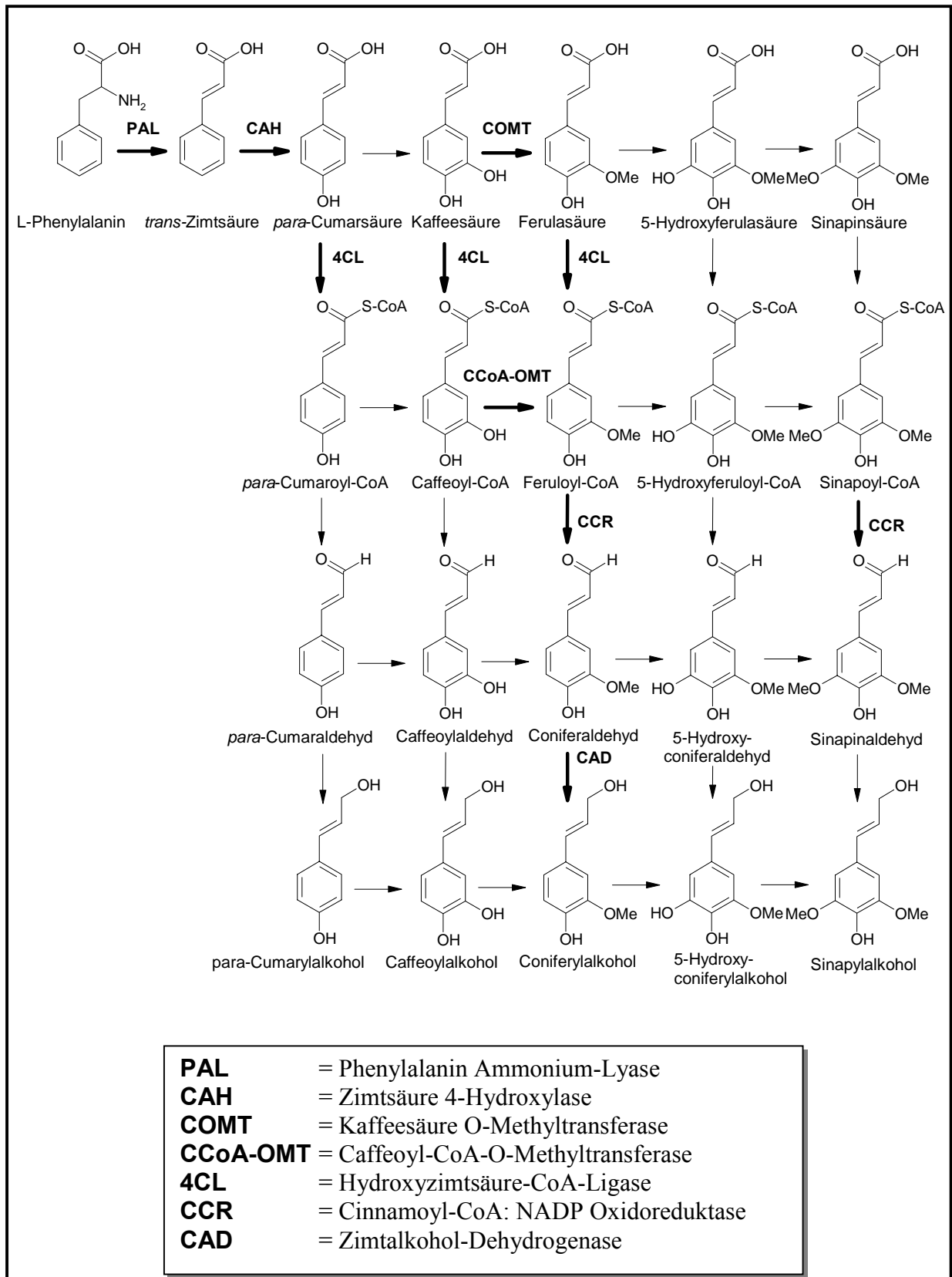
Kompartimentierungsuntersuchungen ergaben, daß das PTOX in *L. album*-Suspensionskulturen in den Zellvakuolen gespeichert wird (HENGES, 1999).

Die Zellsuspensionskulturen von *L. album* stellen aber nicht nur eine mögliche alternative PTOX-Quelle zu *Podophyllum*-Pflanzen dar, sie eignen sich auch hervorragend für die grundlegende Erforschung der Lignanbiosynthese. Eine ganze Reihe der an der PTOX-Synthese beteiligten Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels wurden bereits untersucht (EMPT et al., 2000). Gentechnische Veränderungen der Zellkulturen, die durch die Aufklärung der Lignanbiosynthese ermöglicht werden, sowie Mediumoptimierungen könnten eine weitere Steigerung der PTOX-Produktion bewirken.

## I.6 Der Phenylpropanstoffwechsel

Die Ausgangsverbindungen vieler Substanzen wie Lignane, Lignin, Flavonoide, Cumarine, Stilbene und Derivate der Benzoesäure entstammen dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel (Abb. 5). Alle Phenylpropanoide weisen mit einer Seitenkette aus drei Kohlenstoffatomen und einem aromatischen Ring eine charakteristische Struktur auf (WHETTEN und SEDEROFF, 1995).

L-Phenylalanin, ein Produkt aus dem Shikimisäureweg, ist die wichtigste Ausgangssubstanz für die Bildung der Phenylpropanoide und seiner Abkömmlinge. Die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5), ein lösliches Enzym, katalysiert die Desaminierung des L-Phenylalanins zu *trans*-Zimtsäure. Dies ist der Übergangsschritt vom primären zum sekundären Pflanzenstoffwechsel (GROSS, 1985). Es folgt eine schrittweise ablaufende Hydroxylierung der *trans*-Zimtsäure über *p*-Cumarsäure zu Kaffeesäure. Die beteiligten Enzyme sind die Zimtsäure-4 Hydroxylase (CAH, E.C. 1.14.14.11), eine membranständige, Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase, und die Cumarsäure 3-Hydroxylase, die bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Die Reaktion kann von einer Phenolase (E.C. 1.10.3.1) mit geringer Substratspezifität katalysiert werden, doch könnte sie auch von einer spezifischer arbeitenden Hydroxylase übernommen werden (HENGES, 1999). Die Carboxylgruppen der jeweiligen Zimtsäurederivate werden unter ATP-Verbrauch von der Hydroxyzimtsäure-CoA-



**Abb. 5:** Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel  
 Die in *Linum album*-Zellsuspensionskulturen bereits nachgewiesenen Enzymreaktionen sind durch fett gedruckte Pfeile und die Abkürzungen der jeweiligen Enzymnamen gekennzeichnet.

Ligase aktiviert, indem eine Thioesterbindung zwischen den Gruppen und Coenzym A hergestellt wird. Die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR, E.C. 1.2.1.44) katalysiert die NADPH abhängige Umwandlung der jeweiligen Cinnamoyl-CoA-Ester in ihre entsprechenden Zimtaldehyde (I.8.), die dann von der Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD, E.C. 1.1.1.195) ebenfalls unter NADPH-Verbrauch in die korrespondierenden Zimtalkohol-Derivate umgesetzt werden. Die von der CCR und der CAD vermittelten Reaktionen werden als Monolignol-Biosynthese vom allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel abgetrennt. Aus den Monolignolen (*p*-Cumaryl-, Sinapyl- und Coniferylalkohol) werden durch Polymerisierung die Lignine gebildet. Biosynthesestudien ergaben, daß aus Coniferylalkoholmolekülen durch Dimerisierung die Lignane entstehen. Ob dies auch für Sinapyl- und *p*-Cumarylalkohol gilt, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Hydroxylgruppen können von O-Methyltransferasen (OMT, E.C. 2.1.1.6) mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor methyliert werden. Dabei ist noch unklar, auf welcher Ebene (Säure, CoA-Ester, Aldehyd, Alkohol; Abb. 5) im Phenylpropanstoffwechsel die Methylierungen stattfinden (PARVATHI et al., 2001). Möglicherweise laufen diese Schritte in Abhängigkeit von der Pflanzenart unterschiedlich ab. In *L. album*-Zellsuspensionkulturen konnte bisher die Methylierung von Kaffeesäure zu Ferulasäure nachgewiesen werden (HEGENER, persönliche Mitteilung).

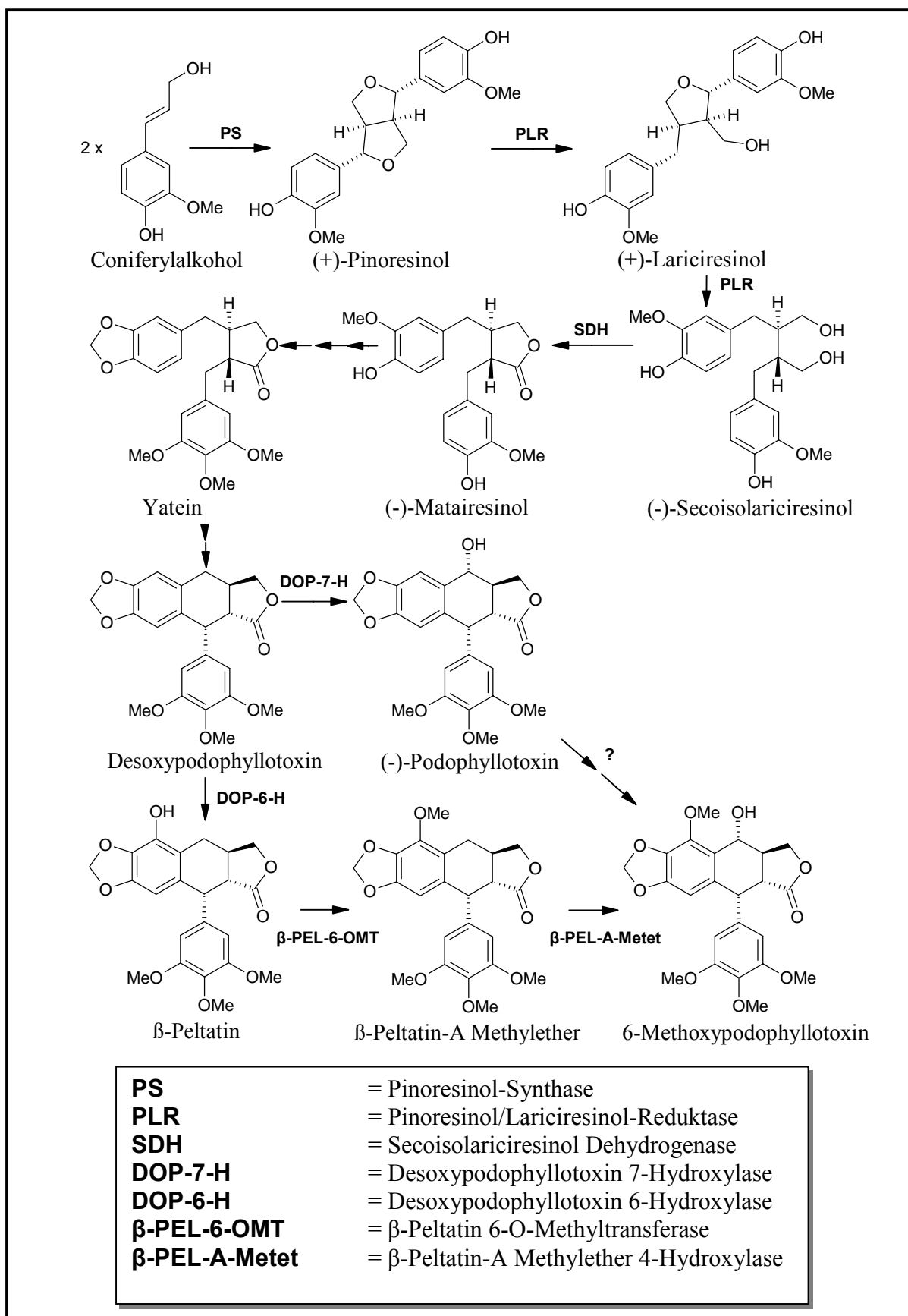
An Position 5 des aromatischen Ringes wird von einer 5-Hydroxylase eine Hydroxylgruppe eingebracht, die wiederum von einer OMT methyliert werden kann. Dieser Schritt konnte in *L. album*-Zellsuspensionkulturen aber noch nicht experimentell bestätigt werden. Es gibt Hinweise, daß die Hydroxylierung *in vivo* am Coniferaldehyd und nicht wie bisher vermutet an der Ferulasäure stattfindet (LI et al., 2000).

## I.7 Die Biosynthese von Podophyllotoxin und verwandten Lignanen

Der Biosyntheseweg des PTOX ist noch nicht vollständig geklärt. Mit Hilfe von Fütterungsversuchen, bei denen Stoffwechselintermediate zu den Zellkulturen unterschiedlicher Pflanzenspezies gegeben wurden, und durch enzymatische Experimente konnte ein hypothetischer Stoffwechselweg erstellt werden (Abb. 6).

Zwei *E*-Coniferylalkoholmoleküle, die aus dem Monolignolzweig des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels stammen, werden über die Pinoresinol-Synthase, einem Enzymsystem aus einer Oxidase und einem dirigierenden, nicht katalytisch aktiven Protein (DAVIN et al., 1997), zu (+)-PINO, dem ersten Lignan dieses Biosyntheseweges, gekoppelt. In einigen Pflanzenspezies konnte dirigierendes Protein nachgewiesen werden, in *L. album* allerdings wurde es noch nicht gefunden (FUSS, persönliche Mitteilung).

Alle folgenden Reaktionen laufen ebenfalls streng stereospezifisch ab. Nur das (+)-Enantiomer des PINOs wird in *Forsythia intermedia* von der Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase über (+)-LARI zu (-)-Secoisolariciresinol ((-)-SECO) umgewandelt (KATAYAMA et al., 1992). Das in der Biosynthese folgende (-)-MAT gilt als Verzweigungspunkt für die 3',4',5'-Trimethoxy- und die 4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxy-Serien (in Abb. 6 nicht aufgeführt) der PTOX-ähnlichen Lignane (BROOMHEAD et al., 1991). Dieser Dehydrogenierungsschritt wird von der Secoisolariciresinol-Dehydrogenase in Gegenwart



**Abb. 6:** Hypothetischer Biosyntheseweg von Podophyllotoxin und verwandten Lignan  
 Die 4'-hydroxy-3',5'-dimethoxy-Serie der PTOX-ähnlichen Lignane ist nicht ab-  
 gebildet.

von NADP katalysiert (UMEZAWA et al., 1991). (-)-MAT wird wahrscheinlich durch Methoxylierung und Methylierung in Yatein (YAT) überführt, aus dem möglicherweise durch oxidative Zyklisierung DOP entsteht (DEWICK, 1989; AYRES und LOIKE, 1990; SCHÜTTE, 1993). DOP wird als Ausgangssubstanz für die Synthese von PTOX,  $\beta$ -PEL und MPTOX angesehen (PETERSEN et al., 1999). 7-Hydroxylierung des DOPs führt zu PTOX, die 6-Hydroxylierung zu  $\beta$ -PEL (PETERSEN et al., 1999; MOLOG et al., 2001).

Möglicherweise wird bei *L. album*-Zellsuspensionskulturen aber auch ein alternativer Biosyntheseweg eingeschlagen. So lassen Fütterungsversuche vermuten, daß die Lignansynthese evtl. mit einer Dimerisierung von zwei unterschiedlichen Molekülen, einem 4-Hydroxy-3-methoxy substituierten Phenylpropanoid und einer 3,4-Methylenedioxy substituierten Einheit, beginnt, da diese in PTOX eingebaut werden können (SEIDEL et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

## I.8 Die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase

Die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR; EC 1.2.1.44) katalysiert den ersten Schritt der Monolignol-Biosynthese, einem Zweig des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (I.6) (GROSS, 1985). Sie wandelt durch Reduktion Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester in ihre jeweiligen Zimtaldehyde um, wobei als Reduktionsäquivalent vorzugsweise NADPH verwendet wird (GROSS und KREITEN, 1975). Mit NADH fällt die CCR-Aktivität wesentlich geringer aus (WENG-ENMAYER et al., 1976). Unter geeigneten Bedingungen konnte auch die Oxidationsreaktion der CCR vom Zimtaldehyd zum entsprechenden Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester nachgewiesen werden (LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981; WINDHÖVEL, 1998).

Allen bisherigen Untersuchungen zufolge handelt es sich bei der CCR um ein Monomer mit einem, je nach pflanzlicher Herkunft, zwischen 36 und 38 kDa liegenden Molekulargewicht (PETERSEN et al., 1999).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche CCR-Sequenzen veröffentlicht, die hohe Ähnlichkeiten aufweisen, unabhängig davon, ob sie von Monokotylen oder Dikotylen stammen (z.B. *Zea mays*, *Populus trichocarpa*, *Lolium perenne*, *Eucalyptus gunnii*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharum officinarum* usw.).

Die CCR wird in die Überfamilie der Säugetier-3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen/Pflanzen-Dihydroflavonol-Reduktasen eingeordnet (BAKER et al., 1990; BAKER und BLASCO, 1992), da sie große Sequenzähnlichkeiten mit den zu dieser Familie gehörenden Enzymen (Säugetier-3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, bakterielle UDP-Galaktose-4-Epimerase, Dihydroflavonol-4-Reduktase) aufweist. Vor allem die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR), das erste Enzym der Anthocyanin-Biosynthese (HELLER und FORKMANN, 1993), besitzt bemerkenswert große Homologien zu CCR-Gen-Sequenzen (LACOMBE et al., 1997). Ein Sequenzvergleich des CCR-Gens aus *Eucalyptus gunnii* mit DFR-Genen von Dikotylen zeigt, daß nicht nur Homologien im codierenden Bereich, sondern auch in den Intronpositionen vorhanden sind, was zu der Vermutung führt, daß es für die CCR und die DFR einen gemeinsamen Vorläufer gibt, aus dem sich beide Enzyme entwickelt haben (LACOMBE et al., 1997). Dennoch zeigt ein phylogenetischer Stammbaum eine klare



Trennung der CCRs und der DFRs (LACOMBE et al., 1997). Allen bisher bekannten CCRs ist die hoch konservierte Aminosäuresequenz „NWYCY“ gemein, die möglicherweise innerhalb des katalytischen Zentrums des Enzyms von Bedeutung ist (PICHON et al., 1998; LACOMBE et al., 1997).

Bislang wurde die CCR vorwiegend im Zusammenhang mit der Lignifizierung von Pflanzen untersucht, da es für die Papier produzierende Industrie von ökonomischem Interesse ist, Pflanzenmaterial mit reduziertem Ligningehalt herzustellen. Zu diesem Zweck wurden bereits „Antisense“-Experimente mit *Nicotiana tabacum* durchgeführt, bei denen die CCR-Aktivität in der Pflanze herunterreguliert wurde (PIQUEMAL et al., 1998; CHABANNES et al., 2001; CHABANNES et al., 2001 b). Dabei wurde das Ligninprofil des transgenen Tabaks sowohl quantitativ als auch qualitativ verändert, während andere „Antisense“-Experimente, bei denen die Zimtalkohol-Dehydrogenase in ihrer Aktivität gedrosselt wurde, lediglich zu qualitativen Effekten bei der Ligninzusammensetzung führten (PIQUEMAL et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, daß die CCR zumindest bei der Ligninsynthese eine regulierende Kontrollfunktion besitzt (PIQUEMAL et al., 1997).

Die CCR wird zwar bei *Eucalyptus gunnii* vorzugsweise in lignifizierenden, gefäßhaltigen Geweben exprimiert (LACOMBE et al., 2000), doch findet man sie auch in Blättern, die keinen hohen Lignifizierungsgrad besitzen (LACOMBE et al., 1997). Dort dient die CCR möglicherweise der Produktion von Monolignolen für die Bildung von Lignanen und Neolignanen (LACOMBE et al., 1997; LEWIS und DAVIN, 1994). In Mais konnten CCR-Isoenzyme identifiziert werden, die organspezifisch exprimiert werden. Während die eine CCR wahrscheinlich der konstitutiven Lignifizierung der Pflanze dient, wird dem anderen Isoenzym eine mögliche Rolle bei der Synthese anderer Produkte wie z.B. Lignanen zugesprochen (PICHON et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in *Arabidopsis thaliana* gefunden: Die *AtCCR1* soll für die Lignifizierung verantwortlich sein, hingegen das Isoenzym *AtCCR2* in der Biosynthese von Phenolen bei der Resistenzantwort der Pflanze gegen Pathogenbefall eine Rolle spielen (LAUVERGEAT et al., 2001).

Die von der CCR gelieferten Zimtaldehyde müssen nicht zwingend in weitere Stoffwechselwege eingehen. Es ist bekannt, daß Pathogene die Bildung von CCR-mRNA induzieren können (LACOMBE et al., 1997; LAUVERGEAT et al., 2001) und daß sowohl Coniferaldehyd als auch der im nachfolgenden Schritt gebildete Coniferylalkohol als Phytoalexine wirken können (LACOMBE et al., 1997; KEEN und LITTLEFIELD, 1979).

Biochemisch wurde die CCR bereits mit lignifizierendem Gewebe von *Forsythia* (GROSS und KREITEN, 1975), Wurzelgewebe von *Brassica napo-brassica* (RHODES und WOOL-TORTON, 1974), Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* (WENGENMAYER et al., 1976), Xylem- und Sklerenchymgewebe von *Populus X euramericana* (SARNI et al., 1984), Kambialsaft und Samen von *Picea abies* L. (LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981), Xylemgewebe von *Eucalyptus gunnii* (GOFFNER et al., 1994) und Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (LAUVERGEAT et al., 2001) untersucht.

Dabei wurden Charakteristika wie pH-Optima bei Einsatz verschiedener Puffer und  $K_M$ -Werte unter Verwendung unterschiedlicher Substrate bestimmt. Die Substrataffinitäten waren je nach CCR-Herkunft ein wenig unterschiedlich, doch wurde in allen Fällen Feruloyl-CoA bevorzugt, gefolgt von Sinapoyl-CoA und Cumaroyl-CoA (PETERSEN et al., 1999).

## I.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die während einer Diplomarbeit (WINDHÖVEL, 1998) begonnenen Untersuchungen zur CCR aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen mit der Ermittlung der  $K_M$ -Werte erweitert werden.

Dazu sollte ein aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen hergestellter Proteinextrakt soweit gereinigt werden, daß er zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der CCR für unterschiedliche Substrate eingesetzt werden konnte. Dabei mußte vor allem die Zimtalkohol-Dehydrogenase aus dem Extrakt zuverlässig beseitigt werden, da dieses Enzym das Produkt der CCR weiter in einen Zimtalkohol umwandelt, so daß die Auswertung biochemischer Experimente mittels HPLC erschwert wird. Das Testsystem zur Bestimmung der CCR-Aktivitäten wurde bereits im Rahmen der oben erwähnten Diplomarbeit etabliert (WINDHÖVEL, 1998). Um die CCR-Eigenschaften im aufgereinigten Enzymextrakt näher zu charakterisieren, sollten neben den  $K_M$ -Werten auch die pH- und Temperaturoptima unter Verwendung verschiedener Substrate bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war das Anlegen einer cDNA-Bibliothek aus *L. album*-Zellen, die nach CCR-cDNAs durchsucht werden sollte. Dies diente der Aufklärung, ob in *L. album*-Zellkulturen eine oder mehrere unterschiedliche CCRs vorhanden sind, die möglicherweise mit verschiedener Substratspezifität arbeiten. Um putative CCR-cDNAs eindeutig zu identifizieren, sollten diese heterolog exprimiert werden. Die Produkte der heterologen Expression sollten durch Charakterisierungsexperimente mit der CCR aus dem Pflanzenzellextrakt verglichen werden.

Mit einer Charakterisierung der Suspensionskultur von *L. album* über einen Zeitraum von drei Wochen sollte das optimale Alter der Pflanzenzellen für die Herstellung der cDNA-Bank ermittelt werden. Zu diesem Zweck sollten sowohl die CCR-Aktivitäten als auch die einiger anderer Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels im Kulturverlauf bestimmt werden. Zudem sollte die PTOX-Akkumulation in der Zellkultur über den Charakterisierungszeitraum verfolgt werden, um mögliche Zusammenhänge mit den gemessenen Enzymaktivitäten erkennen zu können.

Diese Experimente liefern die Grundlage für Pflanzen-Transformationsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurden. Durch sie kann geklärt werden, ob die CCR eine Regulationsfunktion bei der Lignan-Biosynthese besitzt und ob es möglich ist, durch Überexpression des Enzyms in den *L. album*-Zellkulturen eine Steigerung der PTOX-Synthese zu bewirken.

## II MATERIAL UND METHODEN

### II.1 Biochemische Methoden

#### II.1.1 Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen

Als Grundlage für alle Experimente dienten Zellsuspensionskulturen von *L. album* (Weißer Lein) (Abb. 3 und 4), die nach Standardverfahren (SEITZ et al., 1985) aus Samen über Sproß- und Kalluspassagen gewonnen worden waren (SMOLLNY, 1993). Das Samenmaterial sammelte Dr. Abbas Shahsavari (Research Institute of Forests and Rangelands, Teheran) in der Umgebung Teherans (Iran).

Die hergestellten Zelllinien waren genetisch nicht einheitlich und wurden daher hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Linie „X4“ verwendet, die sich im Vergleich zu den anderen Kulturen durch einen erhöhten Podophyllotoxingehalt auszeichnete. Sie wurde bei 25 °C im Dauerdunkel auf einem Rundschüttler mit 120 Upm und 5 cm Auslenkung kultiviert. Zur Erhaltung wurden im Abstand von sieben Tagen etwa 5 g Zellen in einen 250 oder 300 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml frischem MS-Medium (verändertes Grundmedium nach MURASHIGE und SKOOG, 1962) (Tab. 1) überführt.

#### II.1.2 CoA-Ester-Synthese

Im folgenden wird die chemische Herstellung von Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA beschrieben. Das in Experimenten eingesetzte Caffeyl-CoA bzw. p-Cumaroyl-CoA war aus früheren Synthesen (Alexandra Henges, Juliane Meinhard) vorhanden.

Die chemische Synthese des Feruloyl-Succinimid-Esters erfolgte nach der Methode von STÖCKIGT und ZENK (1975). 15 mmol Ferulasäure und 15 mmol N-Hydroxysuccinimid wurden in 400 ml Ethylacetat p.A. bei 60 bis 70 °C im Ultraschallbad gelöst. N,N'-Dicyclohexyl-Carbodiimid wurde bei 40 °C in einem Wasserbad geschmolzen. Nachdem die Ferulasäure-N-Hydroxysuccinimid-Lösung auf 30 °C abgekühlt war, wurde sie mit 17 mmol des flüssigen N,N'-Dicyclohexyl-Carbodiimids versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht in einem gut verschlossenen und lichtundurchlässigen Gefäß bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene Niederschlag aus Dicyclohexylharnstoff wurde abgefiltert, mit 5 ml Ethylacetat gewaschen und anschließend verworfen. Das Filtrat wurde viermal mit jeweils 50 ml NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert, wobei die wäßrigen Phasen verworfen wurden. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden mit einer Spatelspitze Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Die nochmals filtrierte Lösung wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei anfangs 250 bis 300 mbar, zum Schluß bei 80 bis 120 mbar und 40 °C eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde in einem kleinen Volumen Ethylacetat gelöst. Zur Entfernung unlöslicher Partikel wurde die entstandene Lösung 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert (Heraeus Christ, Biofuge A), bevor sie zum Eintrocknen auf eine Glaspetrischale gegeben wurde. Die Restfeuchtigkeit in der resultierenden Masse wurde in einem Exsikkator bei 60 bis 75 mbar beseitigt. Das trockene Produkt wurde zu einem feinen Pulver gemörsert und bei -20 °C aufbewahrt.

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

**Tab. 1:** Zusammensetzung des veränderten MS-Mediums für *L. album*-Zellsuspensionskulturen

Sinapoyl-Succinimid für die CoA-Ester-Herstellung war aus früheren Synthesen (Alexandra Henges, Juliane Meinhard) bereits vorhanden.

Die Herstellung von Cinnamoyl-CoA-Estern (Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA) wurde nach der von MEINHARD (1995) modifizierten Vorschrift von STÖCKIGT und ZENK (1975) durchgeführt.

Aus 25 mg NaHCO<sub>3</sub> und 6 ml hochreinem Wasser wurde eine NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hergestellt, in die für ca. 15 min Stickstoffgas eingeleitet wurde. Die Lösung wurde mit 23 mg Coenzym A (freie Säure) versetzt und nochmals 15 min mit Stickstoff durchgast. Etwa 56 mg des Cinnamoyl-Succinimid-Esters wurden in 1 ml Aceton p.A. gelöst und tropfenweise zu der mit N<sub>2</sub> durchgasten Lösung aus NaHCO<sub>3</sub> und Coenzym A gegeben. Der auftretende Niederschlag wurde in 5 ml Aceton p.A. aufgelöst. Die klare Lösung wurde in einem verschlossenen und lichtgeschützten Reaktionsgefäß für 24 bis 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Aceton

wurde nach der Inkubationszeit mit Hilfe eines über die Lösung geleiteten Stickstoffstroms beseitigt. Zur Entfernung von Schwebstoffen wurde die trübe, wässrige Lösung, die das Reaktionsprodukt beinhaltete, zentrifugiert.

Die Reinigung der Cinnamoyl-CoA-Ester erfolgte nach STRACK et al. (1987) mittels Säulenchromatographie. Als Säulenmaterial wurde MN-Polyamid SC 6 (Polycaprolactam, Korngröße 0,05-0,16 mm, Macherey-Nagel) verwendet. Bevor dieses zur chromatographischen Trennung eingesetzt werden konnte, mußte es in Wasser suspendiert und von Schwebeteilchen getrennt werden. Anschließend wurde das Material zur Reinigung für 10 min in 10 % Ammoniak gerührt. Der Ammoniak wurde über eine Filternutsche abgesaugt, und das Material so lange mit hochreinem Wasser gewaschen, bis ein neutraler pH-Wert im Durchfluß erreicht wurde. Das MN-Polyamid SC 6 wurde 10 min in 10 % Salzsäure gerührt und erneut über eine Filternutsche so lange mit hochreinem Wasser gewaschen, bis ein pH-Wert von 5 bis 6 im Durchfluß vorlag. Das Material wurde mit etwas Methanol p.A. nachgewaschen und bis zum Gebrauch in Methanol aufbewahrt. Schon verwendetes MN-Polyamid SC 6 konnte durch das oben genannte Reinigungsverfahren regeneriert werden.

Das vorbereitete Säulenmaterial wurde in eine Glassäule ( $\varnothing = 2$  cm) gegeben, so daß eine Füllhöhe von ca. 27 cm erreicht wurde. Die Säule wurde mit mindestens 2,5 l hochreinem Wasser äquilibriert. Nach dem Auftragen der Cinnamoyl-CoA-Ester-Lösung wurde der CoA-Ester stufenweise mit einem Methanol/Ammoniak-Gemisch mit steigender Ammoniakkonzentration eluiert:

1. 250 ml hochreines Wasser
2. 250 ml Methanol
3. 25  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 250 ml Methanol
4. 105  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
5. 175  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
6. 350  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
7. 1050  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 350 ml Methanol
8. 1500  $\mu$ l 25 % Ammoniak in 300 ml Methanol

Die aufgefangenen Fraktionen wurden anhand ihrer photometrischen Spektren untersucht. Die den CoA-Ester beinhaltenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 180 bis 220 mbar bis zur vollständigen Trockenheit eingengt. Der Rückstand wurde in 3 ml hochreinem Wasser rückgelöst. Von dieser Lösung wurde ein photometrisches Spektrum zur Konzentrationsbestimmung des CoA-Esters aufgenommen.

Zur Berechnung der Konzentration wurde der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Cinnamoyl-CoA-Esters bei der Wellenlänge des zweiten Absorptionsmaximums herangezogen (STÖCKIGT und ZENK, 1975). Da es keine Literaturwerte für den Extinktionskoeffizienten von Sinapoyl-CoA gibt, wurde zur Konzentrationsberechnung der Koeffizient von Caffeoyl-CoA verwendet. Die angegebenen Werte gelten für in 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,0 gelöste CoA-Ester, während sie hier in hochreinem Wasser aufgenommen wurden, das einen pH-Wert von ca. 5,7 besitzt.

| CoA-Derivate | $\lambda_{\max}$ I<br>[nm] | $\lambda_{\max}$ II<br>[nm] | $\lambda_{\min}$<br>[nm] | $\epsilon_{\max} \times 10^6$ bei<br>$\lambda_{\max}$ II [cm <sup>2</sup> /mol] |
|--------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|---|
| p-Cumaroyl   | 261                        | 333                         | 285                      | 21  |
| Caffeoyl     | 257                        | 346                         | 287                      | 18  |
| Feruloyl     | 257                        | 346                         | 287                      | 19  |
| Sinapoyl     | 252                        | 352                         | 289                      | -   |

**Tab. 2:** UV-Absorptionsdaten für Hydroxycinnamoyl-CoA-Derivate (in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen) (STÖCKIGT und ZENK, 1975)

### II.1.3 Herstellung des Enzymextrakts aus *L. album* Suspensionskulturen

Sieben Tage lang kultivierte Zellen wurden über einen Büchnertrichter mittels einer Wasserstrahlpumpe vom Nährmedium getrennt und mit 1/5 des Frischgewichtes Polyclar 10 versetzt. Pro Gramm Frischgewicht wurde dem Zell-Polyclar 10-Gemisch jeweils 1 ml kalter 0,1 M Borsäure-NaOH-Puffer pH 7,8, der 0,5 mM DTT enthielt, zugesetzt. Nach der Homogenisierung dieses Gemisches in einer auf Eis gekühlten Reibschale wurde der Zellbrei 20 min bei 10.000 Upm (Sorvall, Rotor SS 34) und 4 °C zentrifugiert.

Der resultierende Überstand wurde mit 1/10 des Frischgewichtes Dowex 1x2 pract (vor Gebrauch mit Borsäure-NaOH-Puffer + 1 mM DTT äquilibriert) versetzt und 15 min auf Eis gerührt. Die Suspension wurde über Glaswolle filtriert. Es folgte eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung in einem Fällungsbereich von 30 % bis 45 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sättigung. Dazu wurde bei jedem Fällungsschritt (0 % - 30 % und 30 % - 45 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sättigung) innerhalb von 30 min eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 7,8 langsam zu dem auf Eis gerührten Überstand getropft. Der Extrakt wurde 20 min mit 20.000 Upm (Sorvall, Rotor SS 34) bei 4 °C zentrifugiert. Der Auslauf der Zentrifuge erfolgte ohne Bremse.

Das erhaltene Sediment wurde im Extraktionspuffer resuspendiert und mittels Gelfiltration über eine Sephadex PD-10 Säule (Pharmacia) entsalzt, die mit Extraktionspuffer äquilibriert war.

### II.1.4 Reinigung des Enzymextraktes mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Durch den im folgenden beschriebenen Reinigungsschritt sollte die CCR von der CAD (Zimt-alkohol Dehydrogenase) getrennt werden, sofern diese noch nicht durch die Ammoniumsulfatfällung beseitigt werden konnte.

6 bis 7 ml des entsalzten Proteinextrakts (II.1.3.) wurden über eine Anionenaustausch-Chromatographie mit einer DEAE-Sephacel-Säule bei 4 °C (Säulenvolumen: 10,2 ml, Durchmesser: 1,6 cm, Höhe: 5,1 cm) gereinigt. Zur Elution des Proteins wurde ein Puffersystem aus Puffer A: 60 mM Tris/HCl mit 0,5 mM DTT und Puffer B: 250 mM Tris/HCl mit 0,5 mM DTT verwendet. Die Puffer wurden vor der Benutzung filtriert (Membranfilter, Porengröße 0,2 µm) und mit Hilfe einer Membran-Vakuumpumpe entgast. Das Protein wurde bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit 15 ml Puffer A auf die Säule geladen. Die Elution er-

folgte mit einer Flußrate von 1 ml/min (Tab. 3).

| Zeit [min] | Lösung A [%] | Lösung B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|-------------------|
| 0          | 100          | 0            | 1                 |
| 20         | 89           | 11           | 1                 |
| 90         | 36           | 64           | 1                 |

**Tab. 3:** Gradientenprogramm zur Elution der CCR (Lösung A: 60 mM Tris-HCl, pH 7,5; Lösung B: 250 mM Tris-HCl, pH 7,5)

Das Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 20 ml 2 M NaCl-Lösung und 30 ml Puffer A mit einem Fluß von 1 ml/min regeneriert. Die Fraktionen, die die höchsten spezifischen CCR- und keine CAD-Aktivitäten aufwiesen, wurden vereinigt und mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren (Centriprep YM-30, Amicon/Millipore) auf ein Volumen von etwa 0,5 ml eingengt. Die Überprüfung der Fraktionen auf CAD-Aktivität wurde, wie unter II.1.9.4.3 beschrieben, durchgeführt. Abweichend wurden 50 µl Enzymrohextrakt und 25 µl 4 mM NADP<sup>+</sup> eingesetzt. Für die Verwendung des Enzymextraktes im Experiment wurde er mit 140 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 auf die jeweils benötigte Proteinkonzentration eingestellt.

### II.1.5 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Cinnamoyl-CoA: NADP Oxi-doreduktase (CCR)

In 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten vereinigt (Tab. 4):

| Volumen im Test-ansatz | Komponente                          |               | Endkonzentration im Test               |              |
|------------------------|-------------------------------------|---------------|--|--------------|
| 25,0 µl                | 1 M KPi-Puffer pH 6,0               |               | 0,1 M                                  |              |
| 125,0 µl               | 250 mM Na <sub>2</sub> -EDTA pH 6,0 |               | 125 mM                                 |              |
| 27,5 µl                | hochreines H <sub>2</sub> O         |               |  |              |
| 30,0 µl                | 1 mM Feruloyl-CoA                   |               | 0,12 mM                                |              |
|                        | oder<br>3 mM Sinapoyl-CoA           |               | 0,36 mM                                |              |
| 5,0 µl                 | 12,5 mM NADPH (Startkomponente)     |               | 0,25 mM                                |              |
| 37,5 µl                | Pflanzenzellextrakt                 |               | <i>E. coli</i> -Rohextrakt (II.2.10.1) |              |
|                        | mit F.-CoA *                        | mit S.-CoA ** | mit F.-CoA *                           | mit S-CoA ** |
|                        | 0,02 µg/µl<br>0,04 µg/µl            | 0,08 µg/µl    | 0,04 µg/µl                             | 0,12 µg/µl   |

**Tab. 4:** Zusammensetzung des CCR-Testansatzes

\* = Feruloyl-CoA; \*\* = Sinapoyl-CoA

Die Testansätze (ohne NADPH) wurden 5 min bei 35 °C im Wasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des NADPHs gestartet und nach einer je nach Experiment variierenden Inkubationsdauer mit 25 µl 6 M Essigsäure abgestoppt. Die Anwesenheit von Pro-

dukt in den noch nicht gestarteten Enzymtests wurde durch das Anfertigen von Nullproben überprüft. Diese Testansätze wurden durch Zugabe von Essigsäure „abgestoppt“, bevor das NADPH zum „Reaktionsstart“ zugegeben worden war.

Caffeoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA wurden jeweils in den Konzentrationen 120  $\mu\text{M}$  und 360  $\mu\text{M}$  bei einer Inkubationsdauer von 5 min und einer Proteinkonzentration von 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Pflanzenextrakt und *E. coli*-Rohextrakt) eingesetzt.

Die gebildeten Produktmengen wurden über HPLC-Messungen bestimmt (II.1.7.).

### **II.1.6 Biochemische Charakterisierung der CCR**

Wenn nicht anders beschrieben, betragen die Inkubationszeiten beim Zellextrakt aus *L. album*-Suspensionskulturen mit Feruloyl-CoA als Substrat 3 min, mit Sinapoyl-CoA 5 min, bei dem durch heterologe Expression gewonnenen Enzymextrakt (II.2.10.1) mit Feruloyl-CoA 2 min und 5 min mit Sinapoyl-CoA.

Bei den Bestimmungen der  $K_M$ -Werte (II.1.6.5) wurden kürzere Inkubationszeiten gewählt als bei anderen Charakterisierungsexperimenten (II.1.6.2 – II.1.6.4) zur CCR, damit auch geringe Substratkonzentrationen im Überschuß vorlagen und die Enzymreaktionen nicht durch ein Fehlen des Substrats beendet wurden.

#### **II.1.6.1 Abhängigkeit der CCR von der Inkubationsdauer**

Nach dem Start der Enzymreaktionen durch die Zugabe von NADPH wurden die Testansätze nach unterschiedlich langen, genau definierten Inkubationszeiten abgestoppt. Bei Verwendung des *E. coli*-Rohextrakts und Sinapoyl-CoA wurden abweichend zu den Angaben in II.1.5, Tab. 4 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein im Test eingesetzt.

#### **II.1.6.2 Proteinabhängigkeit der CCR**

In den Testansätzen wurden verschiedene Proteinmengen eingesetzt, um herauszufinden, in welchem Bereich die Produktbildung und somit die CCR-Aktivität linear bei Erhöhung der Proteinkonzentration ansteigt.

Die Inkubationszeiten betragen mit Feruloyl-CoA als Substrat beim Pflanzenzellextrakt 12 min und beim durch heterologe Expression gewonnenen Rohextrakt 2 bzw. 3 min.

#### **II.1.6.3 Abhängigkeit der CCR vom pH-Wert**

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der CCR wurde in den Testansätzen Kaliumphosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt. Der pH-Wert des  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ s wurde dem jeweiligen pH des Puffers angepaßt.

Der tatsächliche pH-Wert im Enzymtest wurde während der Inkubation mit Hilfe einer pH-Elektrode in einer der angefertigten Doppelproben bestimmt.

#### **II.1.6.4 Bestimmung des Temperaturoptimums der CCR**

Bei der Ermittlung des Temperaturoptimums der CCR wurden die tatsächlichen Temperatu-



ren in Parallelproben zum Testansatz gemessen.

### II.1.6.5 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

Es wurden die Michaelis-Menten-Konstanten für Feruloyl-CoA, NADPH (mit 0,12 mM Feruloyl-CoA im Test) und Sinapoyl-CoA ermittelt.

Die jeweiligen  $K_M$ -Werte wurden graphisch nach den Methoden von Lineweaver-Burk und Hanes bestimmt. Michaelis-Menten-Kinetiken wurden computergestützt mit dem Programm „Grafit“ (Version 3.01, Erithacus Software Ltd.) ausgewertet.

Die Inkubationsdauer für die Testansätze mit Feruloyl-CoA als Substrat betrug 1 min und mit Sinapoyl-CoA 3 min. Die Tests mit Sinapoyl-CoA enthielten abweichend vom Standardansatz 1 mM NADPH (II.1.5). Bei der Bestimmung der  $K_M$ -Werte für NADPH diente Feruloyl-CoA als Startkomponente.

### II.1.7 HPLC-Analyse der CCR-Tests

Die Identifikation und Quantifizierung der jeweiligen Cinnamaldehyde erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm mit Hilfe einer HPLC vom Typ ThermoQuest Spectra System, die einen Photodioden-Array-Detektor enthielt. Zur Probenauftrennung wurde zumeist ein Säulensystem der Firma GROM (Vorsäule: GROM-SIL 120 ODS-5 ST, 5  $\mu$ m, 40 x 4,6 mm; Trennsäule: GROM-SIL 120 ODS-5 ST, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) mit einem Laufmittelsystem aus filtriertem hochreinem Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %) (Laufmittel A) und 50 %igem Acetonitril (Laufmittel B) verwendet (Tab. 5).

Einige Enzymtests, die Sinapoyl-CoA als Substrat enthielten, wurden aufgrund besserer Chromatographieergebnisse mit einem Säulensystem der Firma Thermo-Finnigan (Vorsäule: Hypersil HyPURITY™ Elite C18, 5  $\mu$ m, 50 x 4,6 mm; Trennsäule: Hypersil HyPURITY™ Elite C18, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) und einem Laufmittelgradienten aus hochreinem Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %) (Laufmittel A) und 100 %igem Acetonitril (Laufmittel B) analysiert (Tab. 6).

Als Standards wurden 0,02805 mM Coniferaldehyd und 0,0156 mM Sinapinaldehyd verwendet. Caffeoylaldehyd- und *p*-Cumaraldehyd-Standards konnten nicht beschafft werden.

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|------------------|------------------|-------------------|
| 0          | 70               | 30               | 1                 |
| 16         | 20               | 80               | 1                 |
| 22         | 1                | 99               | 1                 |
| 24         | 1                | 99               | 1                 |
| 26         | 70               | 30               | 1                 |
| 40         | 70               | 30               | 1                 |

**Tab. 5:** Gradientenprogramm bei Verwendung des GROM-SIL-Säulensystems

Laufmittel A = hochreines Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %)

Laufmittel B = 50 % Acetonitril

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|------------------|------------------|-------------------|
| 0          | 85               | 15               | 1                 |
| 16         | 60               | 40               | 1                 |
| 20         | 50               | 50               | 1                 |
| 26         | 40               | 60               | 1                 |
| 30         | 85               | 15               | 1                 |
| 35         | 85               | 15               | 1                 |

**Tab. 6:** Gradientenprogramm bei Verwendung des Hypersil-Säulensystems  
 Laufmittel A = hochreines Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %)  
 Laufmittel B = 100 % Acetonitril

### II.1.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Enzymextrakte wurde nach BRADFORD (1976) unter Verwendung einer BSA-Lösung (1 mg/ml) als Standard bestimmt.

### II.1.9 Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von *L. album* im Kulturverlauf

#### II.1.9.1 Wachstumsparameter

**Frischgewicht:** Die Zellen wurden über einen Büchnertrichter mit Saugflasche an einer Wasserstrahlpumpe vom Nährmedium getrennt, das bis zur Bestimmung der Mediumsparameter (II.1.9.2) aufbewahrt wurde. Zur Ermittlung des Frischgewichtes wurden die Zellen gewogen. Die Anzahl der Kolben, die an den einzelnen Kulturtagen abgeerntet wurden, war abhängig vom Wachstum der Zellen.

**Trockengewicht:** Nach der Frischgewichtsbestimmung wurde ein definierter Teil der Zellen bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren, gefriergetrocknet und zur Bestimmung des Trockengewichtes gewogen.

#### II.1.9.2 Mediumsparameter

Der Zuckergehalt des Nährmediums wurde anhand des Brechungsindex mit Hilfe eines Handrefraktometers verfolgt.

Der pH-Wert wurde im von den Zellen getrennten Nährmedium mit Hilfe einer pH-Elektrode bestimmt.

Die Leitfähigkeit des Kulturmediums, die ein Maß für die Ionenkonzentration darstellt, wurde mittels einer Leitfähigkeitselektrode gemessen.

#### II.1.9.3 Enzympräparation

Die Herstellung der Proteinextrakte für die unterschiedlichen Enzymtests erfolgte nach demselben Prinzip wie unter II.1.3 beschrieben. Es wurde an jedem Tag die gleiche Zellmenge eingewogen und verarbeitet, um die Ergebnisse der einzelnen Kultivierungstage direkt miteinander vergleichen zu können.

Für die Charakterisierung der CCR-Aktivitäten (II.1.9.4.4) im Kulturverlauf wurde der entsalzte Extrakt nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (hier: 30 % bis 50 %) eingesetzt (II.1.3). Die anderen untersuchten Enzyme (PAL, 4CL, CAD) (II.1.9.4) wurden im Rohextrakt untersucht, d.h. bei jeder Aufarbeitung wurden nach der Dowex-Behandlung und der Filtration durch Glaswolle 3 ml der Proteinlösung abgenommen und sofort für die Enzymtests verwendet. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Durchführung der Enzymtests bestimmt (II.1.8).

## II.1.9.4 Enzymtests

### II.1.9.4.1 Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

In Quarzhalmikroküvetten wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 650  $\mu\text{l}$  0,1 M KPi-Puffer pH 8,0
- 150  $\mu\text{l}$  Enzymrohextrakt
- 200  $\mu\text{l}$  0,1 M L-Phenylalanin in KPi-Puffer

Nach einer 10 minütigen Vorinkubation des Testansatzes bei 36 °C wurde die durch die Bildung der *t*-Zimtsäure ( $\epsilon = 10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) hervorgerufene Extinktionszunahme bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$  über einen Zeitraum von 30 min bei 36 °C photometrisch verfolgt.

Die Referenz enthielt anstelle des L-Phenylalanins das entsprechende Volumen KPi-Puffer.

### II.1.9.4.2 Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (4CL)

In Quarzhalmikroküvetten wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 780  $\mu\text{l}$  100 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0
- 50  $\mu\text{l}$  20 mM Ferulasäure in 50 % Methanol
- 20  $\mu\text{l}$  50 mM ATP
- 20  $\mu\text{l}$  125 mM  $\text{MgCl}_2$
- 10  $\mu\text{l}$  100 mM DTT
- 100  $\mu\text{l}$  Enzymrohextrakt

Der Test wurde nach einer Vorinkubation von 2 min durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  5 mM Coenzym A (freie Säure) gestartet. Es wurde die Bildung von Feruloyl-CoA ( $\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , STÖCKIGT und ZENK, 1975) bei  $\lambda = 346 \text{ nm}$  über eine Meßdauer von 20 min bei 30 °C gegen eine Referenz, die anstatt des Coenzym A 20  $\mu\text{l}$  hochreines Wasser enthielt, photometrisch verfolgt.

### II.1.9.4.3 Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) (Rückreaktion)

In Quarzhalmikroküvetten wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 900  $\mu\text{l}$  0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,8
- 50  $\mu\text{l}$  2 mM  $\text{NADP}^+$
- 25  $\mu\text{l}$  Enzymrohextrakt

Nach 5 min Vorinkubation bei 30 °C wurde der Test durch Zugabe von 25 µl 4 mM Coniferylalkohol (in 2 % Methanol) gestartet. Die photometrische Messung der Coniferaldehyd-Zunahme ( $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , WYRAMBIK, 1977) erfolgte über einen Zeitraum von 15 min bei  $\lambda = 400 \text{ nm}$  gegen eine Referenz, die anstelle des Coniferylalkohols 25 µl 2 % Methanol enthielt.

#### II.1.9.4 Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase

Der Enzymtest wurde wie in II.1.5 beschrieben mit Feruloyl-CoA als Substrat durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 15 min.

Da der durch die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereinigte Extrakt noch geringe Mengen der Zimtalkohol Dehydrogenase enthalten konnte, mußte bei der Berechnung der CCR-Aktivität auch die gebildete Coniferylalkoholmenge berücksichtigt werden. Diese wurde mittels HPLC bei einer Wellenlänge von 262 nm detektiert (II.1.7, Tab. 5).

#### II.1.9.5 Lignan-Extraktion und Analyse der Lignanextrakte mittels HPLC

Jeweils 0,2 g der zu feinem Pulver gemörserten, gefriergetrockneten Zellen (II.1.9.1) wurden mit 2 ml Methanol p.A. versetzt und zweimal für 30 s mit einer 30 sekündigen Pause auf Eis im Ultraschallwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 6 ml bidest. Wasser wurde der pH-Wert der Suspensionen mit o-Phosphorsäure auf etwa pH 5 eingestellt. Nach Zugabe von jeweils 1 mg  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln (in 100 µl H<sub>2</sub>O) (7,1 U/mg, SERVA) wurden die Ansätze 1 h bei 35 °C im Wasserbad inkubiert und mit 12 ml Methanol p.A. versetzt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation im Ultraschallwasserbad bei 70 °C, nach der die Zellfragmente 10 min bei 10.000 bis 12.000 Upm (Sorvall, Rotor SS 34) abzentrifugiert wurden. Die Volumina der Überstände wurden zur Berechnung der Podophyllotoxingehalte bestimmt. Aliquots der Überstände wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (5 min bei 13.000 Upm, Heraeus Christ, Biofuge A) und zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Die Detektion und Quantifizierung des Podophyllotoxins erfolgte bei einer Wellenlänge von 290 nm mit der unter II.1.7 beschriebenen HPLC (ThermoQuest) und dem Säulensystem der Firma GROM mit einem Laufmittelgradienten aus filtriertem hochreinem Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %) (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) (Tab. 7).

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|------------------|------------------|-------------------|
| 0          | 60               | 40               | 0,8               |
| 17         | 33               | 67               | 1,0               |
| 18         | 60               | 40               | 1,0               |
| 24         | 60               | 40               | 0,8               |

**Tab. 7:** Gradientensystem zur Detektion von Podophyllotoxin

Laufmittel A = hochreines Wasser mit 0,01 % (v/v) o-Phosphorsäure (85 %)

Laufmittel B = 100 % Acetonitril

## II.2 Molekularbiologische Methoden

### II.2.1 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden, wie z.B. Restriktionshydrolysen, DNA-Ligationen und Transformationen wurden nach SAMBROOK et al. (1989) durchgeführt.

Bei allen Restriktionshydrolysen wurden die für die jeweiligen Enzyme (II.3.3) geeigneten 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer der React-Serie der Firma Invitrogen eingesetzt.

Die beim Umgang mit DNA und RNA verwendeten Materialien wurden, sofern erforderlich und nicht anders beschrieben, durch Autoklavieren oder 3 stündiges Erhitzen bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert. Lösungen (z.B. Antibiotika), die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit Einwegfiltern (Porengröße: 0,2 µm) sterilfiltriert.

### II.2.2 Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen

#### II.2.2.1 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen

##### II.2.2.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA

*L. album*-Zellen vom 4. bis 7. Kulturtag wurden geerntet und bei -80 °C eingefroren. Die Zellproben wurden vereinigt. Etwa 86 g der Zellen wurden portionsweise unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben und mit 500 ml Extraktionspuffer (0,33 M Sorbit, 0,2 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 2 % (w/v) SDS, pH 9,0) und 250 ml Phenol (pH 8,0) (beide auf 50 °C vorgewärmt) unter kräftigem Rühren aufgetaut. Es wurden 250 ml Chloroform hinzugegeben; danach wurde für 20 min gerührt und zur Phasentrennung bei 7.000 Upm (Sorvall, GSA-Rotor) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde sorgfältig abpipettiert und einmal mit Phenol/Chloroform (250 ml + 250 ml) und einmal mit Chloroform (250 ml) extrahiert. Die Nukleinsäuren in der wäßrigen Phase wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (4 M, pH 6,0) und einem Volumen Isopropanol 1,5 h bei -20 °C gefällt und durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000 Upm (Sorvall, GSA-Rotor) und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Sediment nach dem Trocknen in Tris-Borat-EDTA-Puffer (80 mM Tris-Borat, 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0) rückgelöst. Die RNA wurde durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M LiCl über Nacht auf Eis präzipitiert. Durch 15 minütige Zentrifugation bei 10.000 Upm (Sorvall, HS4-Rotor) und 4 °C wurde die RNA sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift 5 min bei 10.000 Upm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die trockene, sedimentierte RNA vorsichtig in sterilem Wasser auf Eis gelöst.

##### II.2.2.1.2 Gewinnung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Um aus der Gesamt-RNA selektiv die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA zu erhalten, wurde das Oligotex<sup>TM</sup>-Kit der Firma QIAGEN verwendet. Dabei wurde nach dem vom Hersteller angegebenen „Oligotex Batch Protokoll“ verfahren. Es wurde zur Aufreinigung 1mg der Gesamt-RNA eingesetzt. Die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat (4 M, pH 6,0) und mit dem 2,5 fachen Volumen eiskaltem Ethanol p.A. über Nacht gefällt. Die RNA wurde durch Zentri-

fugation (10 min bei 13.000 Upm und 4 °C, Eppendorf 5804 R) sedimentiert, vom Überstand getrennt, getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser gelöst.

### II.2.2.2 Herstellung und Amplifikation der Phagen-cDNA-Bibliothek von *L. album*

Die cDNA-Bibliothek von *L. album* wurde mit Hilfe des ZAP Express™-cDNA-Synthese-Kits der Firma Stratagene gemäß der zugehörigen Anleitung hergestellt. Zur Erststrangsynthese wurden etwa 5 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden die cDNA-Fragmente vor der Ligation in den ZAP Express-Vektor zur Größensfraktionierung mittels Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose) aufgetrennt. Die cDNA wurde in drei Fraktionen eingeteilt:

1. cDNA-Fragmente mit einer Größe von > 2,8 kb
2. cDNA-Fragmente mit einer Größe von 0,8 – 2,8 kb
3. cDNA-Fragmente mit einer Größe von < 0,8 kb

Die cDNA wurde aus dem Agarosegel mit Hilfe des QIAex-Kits der Firma QIAGEN eluiert. Für die Verpackung der cDNA in die Phagen wurden die Komponenten und die Anleitung des Gigapack® III Gold-Kits der Firma Stratagene verwendet. Zur Lagerung (bei 4 °C) und zur weiteren Verwendung wurde die ZAP Express-Bücherei der zweiten Fraktion (s.o.) amplifiziert.

Die Kultivierung des Bakterienstammes XL1BlueMRF' und die Durchführung der Amplifikation der cDNA-Bank (der 2. Fraktion) erfolgte weitgehend nach der Anleitung der Firma Stratagene. Etwa 45 µl der Phagen wurden zu je 500 µl des *E. coli*-Stammes (OD<sub>600</sub> = 0,5; in 10 mM MgSO<sub>4</sub>) gegeben und in 5 ml LB-Top-Agarose (II.3.5) auf LB-Agarplatten (II.3.5) ausplattiert. Nach einer ca. 14 stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Platten mit 8 ml SM-Puffer (pro 1 l: 5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50 ml 1 M Tris-HCl, 5 ml 2 % (w/v) Gelatine; pH 7,5) überschichtet und über Nacht bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Die Phagensuspensionen wurden abgenommen und vereinigt. Die Platten wurden mit etwas SM-Puffer nachgespült, der ebenfalls zu der Phagensuspension gegeben wurde. Durch Zugabe von 5 % (v/v) Chloroform wurden die verbliebenen Bakterien abgetötet. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2.500 Upm (Sorvall, Rotor: SS34) und 4 °C wurde der Überstand mit Chloroform (0,3 % (v/v)) versetzt und die amplifizierte Phagen-cDNA-Bank bei 4 °C gelagert.

Der Phagentiter nach der Amplifikation betrug etwa 1,5 x 10<sup>4</sup> pfu/µl in 70 ml Phagensuspension.

### II.2.2.3 Sichtung der cDNA-Bibliothek

#### II.2.2.3.1 Herstellung einer mit Digoxigenin markierten Sonde

Die homologe *L. album*-DNA-Sonde (346 bp) zur Sichtung der cDNA-Bank wurde mittels PCR hergestellt (II.2.3.1.1). Der PCR-Ansatz wurde über eine Agarosegelelektrophorese (1,5 %iges Agarosegel) aufgetrennt (II.2.4). Die Sonden-DNA wurde mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (QIAGEN) aus dem ausgeschnittenen Agarosegelstück aufgereinigt.

Die Markierung der DNA erfolgte mit dem DIG-High Prime Kit der Firma Boehringer nach Angaben des Herstellers. Hierbei handelte es sich um eine sogenannte „Random primed“ Markierung der DNA mit Digoxigenin (Digoxigenin-11-dUTP). Es wurden 160 ng Sonden-DNA bei der Markierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

#### II.2.2.3.2 Transfer von Phagen-DNA auf Nylonmembranen

Der *E.coli*-Stamm XL1BlueMRF' wurde in LBM-Medium (1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 % (w/v) Maltose; pH 7,0) kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,8 hatte. Nach Zentrifugation für 15 min bei 3.500 Upm (Hettich-Zentrifuge) wurde das Bakteriensediment in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen, so daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde mit den Bakteriophagen ( $\lambda$ -ZAP) versetzt und für 15 min bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nachdem die infizierten Bakterien in auf 48 °C vorgewärmte NZY-Topagarose (0,5 % (w/v) NaCl, 0,2 % (w/v) MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Caseinhydrolysat, 0,7 % (w/v) Agarose; pH 7,5) gegeben worden waren, wurden sie auf NZY-Agarplatten (auf 48 °C vorgewärmt) (NZY + 1,5 % (w/v) Agar) plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden drei Sichtungsdurchgänge der Phagen vorgenommen. Bei der ersten Sichtung wurden 12 NZY-Agarplatten mit einer Größe von jeweils 530 cm<sup>2</sup> verwendet. In den beiden folgenden Selektionen wurden Petrischalen ( $\emptyset$  = 9 cm) benutzt. Vor dem Transfer (Anleitung „The Dig System User's Guide for Filter Hybridization“ von Boehringer Mannheim) der Phagen-DNA auf Nylonmembranen (Roche Mannheim) wurden die Agarplatten mindestens 1 h bei 4 °C aufbewahrt, um ein Festkleben der Topagarose an den Membranen zu vermeiden. Der Transfer der Phagen-DNA erfolgte, indem die Nylonmembranen für 2 min auf die NZY-Agarplatten mit den Phagen gelegt wurden und anschließend 5 min in Denaturierungslösung (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl), 15 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und abschließend 10 min in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat; pH 7,0) inkubiert wurden. Zur Fixierung der DNA wurden die Membranen in einem Wärmeschrank 1 h bei 80 °C gebacken.

#### II.2.2.3.3 Hybridisierung und Detektion filtergebundener Phagen-DNA

Die Hybridisierung und Detektion der membrangebundenen Phagen-DNA erfolgte weitgehend nach der Anleitung „The Dig System User's Guide for Filter Hybridization“ der Firma Boehringer Mannheim. Prähybridisierung und Hybridisierung wurden in Röhren in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. In den drei vorgenommenen Sichtungsdurchgängen der Phagen wurden die Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen von 60 °C über 63 °C auf 66 °C gesteigert. Es wurde eine 346 bp lange, homologe *L. album*-DNA-Sonde eingesetzt (II.2.2.3.1), die durch PCR hergestellt worden war. Nach jeder Sichtung wurden die positiven „Plaques“ aus den NZY-Agarplatten ausgestochen, in 100  $\mu$ l SM-Pufferlösung (pro 1 l: 5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50 ml 1 M Tris-HCl, 5 ml 2 % (w/v) Gelatine; pH 7,5) mit ca. 20  $\mu$ l Chloroform eluiert und erneut auf NZY-Agar plattiert.

Die positiven Phagenklone wurden über Chemilumineszenz mit CSPD<sup>®</sup> detektiert. Für die Antikörperreaktion wurde eine 1:10.000-Verdünnung des Anti-Digoxigenin-Antikörpers ver-

wendet. Auf die mit CSPD<sup>®</sup> behandelten Nylonmembranen wurden Röntgenfilme gelegt. Die Filmkassetten wurden vor dem Entwickeln der Röntgenfilme zur Verstärkung der Chemilumineszenz 15 min bei 37 °C inkubiert.

#### II.2.2.4 *In vivo* Exzision

Die *in vivo* Exzision wurde nach dem Protokoll der Firma Stratagene durchgeführt. Die *E. coli*-Stämme XL1-Blue MRF' und XLOLR wurden in NZY-Medium bei 37 °C angezogen. Die optische Dichte der beiden Kulturen wurde in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf OD<sub>600</sub> = 1,0 eingestellt. XL1-Blue MRF' wurde mit 125 – 250 µl Phageneluat (je nach Verdünnung) und 1 µl des Helferphagen ExAssist (ca. 10<sup>8</sup> pfu/µl) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 37 °C in NZY-Medium wurde der in filamentösen Phagenpartikeln verpackte pBK-CMV Phagemidvektor durch 20 minütiges Erhitzen der Bakterienkultur auf 68 °C freigesetzt. Der *E. coli*-Stamm XLOLR wurde mit 10 µl bzw. 100 µl des Phagenüberstandes infiziert und nach einer Inkubationsphase in NZY (45 min, 37 °C) auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin plattiert. Die Bakterien wurden bei 37 °C über Nacht kultiviert. 7 Bakterienkolonien wurden willkürlich ausgewählt, die durch Restriktionshydrolysen auf das Vorhandensein möglicher CCR-cDNA-Inserts überprüft wurden. Drei Klone wurden sequenziert (II.2.7).

### II.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt, die entweder als Sonden für das Sichten der cDNA-Bank und für die Hybridisierung bei der Southern-Analyse dienen oder die kloniert werden sollten.

#### II.2.3.1 RT-PCR

Da sich RNA aufgrund ihrer geringen Stabilität nicht als PCR-Matrize eignet, stellt man bei der RT-PCR mit Hilfe einer Reversen Transkriptase aus RNA cDNA her.

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Plant-Kit der Firma QIAGEN verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem AMV-Kit der Firma Boehringer nach Herstellerangaben.

##### II.2.3.1.1 RT-PCR zur Sondenherstellung für die Sichtung der cDNA-Bibliothek

Die Methode der RT-PCR wurde zur Herstellung der homologen *L. album*-Sonde für die Sichtung der cDNA-Bibliothek (II.2.2.3) eingesetzt. Dabei wurden degenerierte Primer (II.3.8) verwendet, deren Sequenzen sich von einer bereits bekannten *Zea mays*-cDNA ableiteten. Mit den Primern CCR2ZM 448F und CCR2ZM 1085R wurde eine erste RT-PCR mit *L. album*-cDNA als Matrize durchgeführt, deren Produkt (gereinigt mit QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit, QIAGEN) als Vorlage für eine zweite PCR mit den zwischen dem ersten Primerpaar liegenden Primern CCR2ZM 610F und CCR2ZM 955R diente („nested“ Primer) (Reaktionsbedingungen und PCR-Programm: II.2.3.3 u. II.2.3.4.1).

##### II.2.3.1.2 Klonierung der homologen *L. album*-Sonde in pGEM-T

Die Sonden-DNA (II.2.3.1.1) wurde zur Sequenzierung in den Vektor pGEM-T (Firma Pro-



mega) nach Angaben des Herstellers kloniert.

### II.2.3.2 PCR für die Klonierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der PCR war es möglich, geeignete Restriktionsschnittstellen an DNA-Fragmente anzuhängen, um die Fragmente in einen gewünschten Vektor ligieren zu können. Diese Konstrukte konnten nach der Transformation in einen Bakterienstamm kloniert werden.

Um ein PCR-Produkt mit Restriktionsschnittstellen zu erhalten, die nicht in der DNA-Matrize vorhanden waren, wurden am 5'-Ende der Primer Erkennungssequenzen der gewünschten Restriktionsendonukleasen und gemäß den Katalogangaben der Firma Biogen weitere für die Restriktionshydrolysen erforderliche Nukleotide angehängt.

### II.2.3.3 Reaktionsbedingungen für die PCR

In dünnwandige 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden folgende Komponenten gegeben:

|      |    |  |
|------|----|--|
| 1    | μl | Primer 1 (100 pmol/μl)                 |
| 1    | μl | Primer 2 (100 pmol/μl)                 |
| 2    | μl | Template                               |
| 5    | μl | 10 x Reaktionspuffer (Roche, Mannheim) |
| 2    | μl | 50 mM MgCl <sub>2</sub>                |
| 0,5  | μl | dNTP Mischung (je 25 mM)               |
| 1    | μl | Taq-Polymerase <sup>1</sup>            |
| 37,5 | μl | H <sub>2</sub> O                       |

Die Ansätze wurden zum Schutz gegen Verdunstung mit Paraffinöl überschichtet.

Bei Bedarf wurde der Reaktionsansatz verdoppelt.

Für die Amplifikation des offenen Leserasters der *L. album*-CCR zur Klonierung in den Expressionsvektor pTrc99A wurde das Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Mannheim benutzt. Das in diesem System enthaltene Taq-/Pwo-Polymerase-Gemisch zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate aus, da es eine Korrekturlesefunktion besitzt.

In dünnwandige 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden folgende Komponenten gegeben:

|                            |    |   |
|----------------------------|----|---|
| 50                         | ng | Plasmid Purifikat   |
| 10,0                       | μl | 10 x Expand HF buffer (inklusive 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Roche) |
| 0,5                        | μl | Primer 1 (100 pmol/μl)  |
| 0,5                        | μl | Primer 2 (100 pmol/μl)  |
| 0,8                        | μl | dNTP Mischung (je 25 mM)  |
| 0,75                       | μl | Taq-/Pwo-Polymerase-Gemisch (3,5 U/μl, Roche)                     |
| ad 100 μl H <sub>2</sub> O |    |   |

Die Ansätze wurden zum Schutz gegen Verdunstung mit Paraffinöl überschichtet.

---

<sup>1</sup> Die Taq-Polymerase wurde von Arne Schwelm im Rahmen eines Praktikums mit Hilfe eines Taq-Polymerase überexprimierenden *E. coli*-Stammes hergestellt.

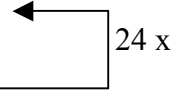
### II.2.3.4 PCR-Programme

Es wurde der Thermo-Cycler „UNO“ der Firma Biometra (Göttingen) eingesetzt. Die Sequenzen der im folgenden angegebenen Primer befinden sich in II.3.8.

#### II.2.3.4.1 Programm zur Herstellung der homologen *L. album*-Sonde (346 bp) zur Sichtung der cDNA-Bank:

verwendete Primerpaare: CCR2ZM 448F und CCR2ZM 1085R  
CCR2ZM 610F und CCR2ZM 955R

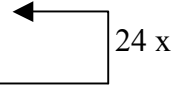
5 min Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
1 min 30 s Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
2 min Anlagerung der Primer bei 55 °C  
1 min Primerverlängerung bei 72 °C  
3 min Primerverlängerung bei 72 °C  
bis zur manuellen Beendigung des Programms 20 °C



#### II.2.3.4.2 Programm zur Amplifikation des offenen Leserasters der *L. album*-CCR:

verwendetes Primerpaar: CCRLA 118F, CCRLA 1143R b

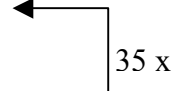
4 min Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
1 min 15 s Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
2 min Anlagerung der Primer bei 60 °C  
2 min 30 s Primerverlängerung bei 72 °C  
5 min Primerverlängerung bei 72 °C  
bis zur manuellen Beendigung des Programms 20 °C



#### II.2.3.4.3 Programm zur Herstellung der 3'-untranslatierten Region der CCR-cDNA von *L. album*:

verwendetes Primerpaar: JWCCR 1196F, JWCCR 1455R

4 min Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
1 min 15 s Denaturieren der Template-DNA bei 94 °C  
2 min Anlagerung der Primer bei 58 °C  
1 min Primerverlängerung bei 72 °C  
3 min Primerverlängerung bei 72 °C  
bis zur manuellen Beendigung des Programms 20 °C



Die korrekte Basenabfolge im PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung (II.2.7) bei Verwendung des PCR-Primerpaars (s.o.) bestätigt.

### **II.2.3.5 Reinigung der PCR-Ansätze**

PCR-Ansätze wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution erfolgte bei 50 µl-Ansätzen jeweils mit 30 µl, bei 100 µl-Ansätzen mit 60 µl EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

### **II.2.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,0 mit Essigsäure) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde auf etwa 50 °C abgekühlt und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren konnte das Gel sofort verwendet oder in Frischhaltefolie gewickelt für einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

Es wurden Gelkonzentrationen von 0,8 % (w/v) (DNA-Fragmente > 1 kb) bis 1,5 % (w/v) Agarose (DNA-Fragmente ≤ 1 kb) verwendet.

Die DNA-Ansätze wurden für die Elektrophorese mit 1/5 bis 1/10 des Probenvolumens DNA-Blaumarker (50 % (w/v) Saccharose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in TAE) versetzt. Als Größenstandard wurde die „1 Kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen) eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer bei 80 V bis 90 V für Gele zur Größenbestimmung oder zur Fragmentreinigung und bei 20 V bis 60 V für Gele zur Herstellung von Southern-Transfers durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Agarosegele in einem TAE-Ethidiumbromid-Färbepad (TAE, 0,3 mg/ml Ethidiumbromid) für etwa 20 min inkubiert und auf einem UV-Tisch fotografiert.

### **II.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen**

DNA-Mengen wurden entweder über Agarosegelelektrophorese ermittelt, bei denen die Bandenintensitäten der aufgetrennten DNA-Fragmente mit einem DNA-Massenstandard (Low DNA Mass<sup>TM</sup> Ladder, Invitrogen) verglichen wurden, oder die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch mit Hilfe des „Genequant“ der Firma Pharmacia bestimmt, wobei es durch die Berechnung der Quotienten aus den Absorptionen bei 280 nm und 260 nm möglich war, eine Aussage über die Reinheit der DNA-Präparationen zu treffen.

### **II.2.6 Plasmidpräparationen**

#### **II.2.6.1 Präparation zur Erhaltung sauberer Plasmid-DNA**

Die für Klonierungsexperimente und zur Sequenzanalyse (II.2.7) benötigte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN), Plasmid Midi Kit (QIAGEN), CONCERT<sup>TM</sup> Rapid Plasmid Miniprep System (Invitrogen), CONCERT<sup>TM</sup> Rapid Plasmid Midiprep System (Invitrogen) und E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II (peQlab Biotechnologie GmbH) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers isoliert.

Bei den verwendeten Präparationskits wurde die Plasmid-DNA immer mit dem kleinstmöglichen Volumen an EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; pH 8,0) eluiert.

### II.2.6.2 „TENS“-Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen, bei denen die Reinheit nicht bedeutend war (z.B. Identifikation von positiven Transformanten), wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit der TENS-Methode (ZHOU et al., 1990) angefertigt.

1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Teil verworfen. In den verbleibenden 50 - 100 µl Überstand wurden die sedimentierten Bakterienzellen resuspendiert und mit 300 µl TENS (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0; 0,1 M NaOH; 0,5 % SDS; wird immer frisch angesetzt) versetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,2 wurde der Reaktionsansatz 2 - 5 s gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl Ethanol p.A. durch Schütteln versetzt. Die gefällte DNA wurde durch 4 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und Raumtemperatur präzipitiert. Das Sediment wurde mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand vollständig entfernt, das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 50 bis 100 µl TE-RNase-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 7,4; 20 µg/ml RNase A) gelöst.

### II.2.7 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzanalysen wurden von der Firma MWG-BIOTECH AG (Ebersberg) durchgeführt.

Dazu wurde die jeweilige Plasmid-DNA mit Hilfe von Plasmid-Präparations-Kits aus Bakterien-Übernachtskulturen isoliert (II.2.6.1). Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration wurde diese auf die von der Firma MWG zur Sequenzierung benötigte Größe eingestellt (II.2.7.1). Neben selbst entworfenen Primern (II.3.8) wurden die Standardprimer T3, T7 und M13 rev (-48) eingesetzt.

Die Sequenzierung der Vollängen-CCR-cDNA wurde zur Bestätigung des Ergebnisses zweimal vorgenommen. Dabei wurden durch die Auswahl entsprechender Sequenzierungsprimer (CCRLA 470F, CCRLA 603R, CCRLA 966F, CCRLA 1143R) (II.3.8) überlappende Sequenzfragmente angefertigt, die zur Gesamtsequenz zusammengefügt werden konnten.

#### II.2.7.1 Konzentrieren von DNA für die Sequenzierung

Um DNA für die Sequenzierung zu konzentrieren, wurden 100 µl DNA mit 2 Volumina 2 M Ammoniumacetat und 900 µl Ethanol p.A. 5 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 4 °C und 13.000 Upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Sediment mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4 °C wurde der Überstand vollständig entfernt und das Präzipitat an der Luft getrocknet.

### II.2.7.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Zur Analyse von Oligonukleotid- und cDNA-Sequenzen wurde das Computerprogramm Winsconsin Package Version 10.0 der Genetics Computer Group (GCG, Madison, USA) verwendet. Vergleiche mit Sequenzen der Datenbanken wurden über eine EMBL BLAST Suche (<http://dove.embl-heidelberg.de/BLAST2>) vorgenommen. Die Auswertung von Sequenzvergleichen wurde mit den Programmen Clustal W Version 1.81 und BOXSHADE Version 3.21 durchgeführt.

## II.2.8 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

### II.2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen

Die Isolierung der genomischen DNA aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen erfolgte nach einer abgewandelten Methode von DOYLE (1990). Am dritten Kulturtag geerntete *L. album*-Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff versetzt und in einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Reibschale homogenisiert. Alle im folgenden beschriebenen Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

Etwa 6 g des Zellpulvers wurden nach Zugabe von 25 ml kaltem Extraktionspuffer (350 mM Sorbitol, 100 mM Tris, 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 7,5; direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 20 mM Natriumpyrosulfit) 60 s mit einem Schlagmesserhomogenisator bei 19.000 Upm aufgeschlossen. Der Zellbrei wurde 1 h bei 5.000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5804 R). Nachdem der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 2,25 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Glasstabes resuspendiert worden war, wurde die Suspension mit 3,15 ml Kernlysepuffer (200 mM Tris, 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB) versetzt und gemischt. Es wurden 1,05 ml 0,5 % Sarkosyl hinzugegeben und für 10 s gründlich durchgemischt. Nach 90 minütiger Inkubation bei 65 °C im Wasserbad wurden 7,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 24:1) zugesetzt. Die folgende Zentrifugation wurde für 15 min bei 5.000 Upm und Raumtemperatur durchgeführt. Die wäßrige Phase (6 ml), die die Nukleinsäuren enthielt, wurde in ein 12 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt. Die dabei als fädiges Knäuel ausfallende genomische DNA wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei 5.000 Upm und Raumtemperatur sedimentiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war, wurde nochmals für 1 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette vollständig entfernt. Das Sediment wurde kurz luftgetrocknet und in 600 µl TE-RNase (20 µg RNase A/ml TE-Puffer<sup>1</sup>) durch eine etwa 20 minütige Inkubation bei 68 °C rückgelöst.

### II.2.8.2 Fällung von DNA aus Restriktionshydrolysen

Um DNA aus Restriktionshydrolysen zu fällen, wurde ein Restriktionsansatz von 150 µl mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat pH 5,2 und 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 2 minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand vollständig entfernt, das Sediment kurz getrocknet, in 30 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 aufgenommen und für 10 bis 20 min bei 65 °C bis 68 °C gelöst.

<sup>1</sup> 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; pH 8,0

### II.2.8.3 Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern-Transfer)

Genomische DNA (II.2.8.1) wurde nach der Restriktionshydrolyse (II.2.1) (*Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Xba* I, *Bgl* II) gefällt (II.2.8.2) und in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch fraktioniert (II.2.4). Als Längenstandard wurde die „1 Kb Plus DNA Ladder“ der Firma Invitrogen eingesetzt. Nachdem das Gel in einem Ethidiumbromid-TAE-Bad gefärbt und auf einer UV-Durchlichtplatte fotografiert worden war, wurde es 15 min in 1 %iger Salzsäure inkubiert (Depurinisierung). Die Salzsäure wurde mit Wasser abgespült. Es folgte eine 20 minütige Denaturierung der DNA mit 0,4 N NaOH.

Die DNA-Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) erfolgte mittels Kapillartransfer mit 0,4 N NaOH über Nacht. Die Membran wurde anschließend zweimal 15 min mit 2 x SSPE (0,3 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 7,7 mit NaOH) + 0,1 % SDS gewaschen. Nach dem alkalischen Transfer der DNA konnte die Nylonmembran direkt für die DNA/DNA-Hybridisierung eingesetzt oder bei 4 °C gelagert werden.

### II.2.8.4 Isolierung der RNA aus *L. album* Zellsuspensionen für den Northern-Transfer

RNA wurde aus *L. album*-Zellsuspensionen vom 5. bis 9. Kulturtag mit Hilfe der peqGOLD RNA Pure<sup>TM</sup>-Lösung der Firma peQLab nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden jeweils 200 mg Zellen mit 2 ml der Extraktionslösung versetzt und mit einem Schlagmischerhomogenisator (Ultra Turrax, 11.000 Upm) zerkleinert.

### II.2.8.5 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Transfer)

Die Auftrennung der RNA mittels Gelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen mit einem 0,9 %igen Agarosegel (20 % 5 x MOPS-Puffer<sup>1</sup>, 63,3 % zweifach autoklaviertes Wasser, 16,7 % Formaldehyd) mit 1 x MOPS als Laufpuffer in einer Gelkammer, die zuvor über Nacht mit einer 0,1 %igen SDS-Lösung inkubiert und anschließend gründlich mit 2 x autoklaviertem Wasser gewaschen worden war, durchgeführt. Etwa 20 µg Gesamt-RNA des jeweiligen Kulturtages wurden mit 10 µl eines Auftragspuffers (50 % deionisiertes Formamid; 20 % Formaldehyd; 20 % 5 x MOPS-Puffer; 10 % 10 x Farbmix<sup>2</sup>; 0,1 mg/ml Ethidiumbromid) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde 1 µg des „RNA Ladder, High Range“ der Firma MBI Fermentas eingesetzt, der genauso vorbereitet wurde wie die Proben.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde das Gel 30 min in einer Lösung aus 0,05 M NaOH und 0,15 M NaCl denaturiert, durch 30 minütige Inkubation in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 mit 0,15 M NaCl neutralisiert und zur Vorbereitung auf den RNA-Transfer in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) inkubiert.

Die RNA-Übertragung auf eine Nylonmembran (Nytran Super Charge, Schleicher & Schuell) erfolgte mittels Kapillartransfer mit 20 x SSC über Nacht. Die Membran wurde 2 h bei 80 °C gebacken und 2 mal 10 min mit einer Lösung aus 2 x SSPE (0,3 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

<sup>1</sup> 20 µM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 7,0

<sup>2</sup> 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,25 % Xylen, 0,25 % Bromphenolblau; in 50 % 10 x TBE (10,8 % (w/v) Tris, 5,5 % (w/v) Borsäure, 0,93 % (w/v) Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,2), 50 % (v/v) Glycerin

2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; mit NaOH auf pH 7,7) und 0,1 % SDS behandelt.

## **II.2.8.6 DNA/DNA- und RNA/DNA-Hybridisierung**

### **II.2.8.6.1 Sondenmarkierung mit $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP**

Die Markierung der DNA-Sonde mit radioaktivem Phosphat erfolgte mit Hilfe des Nick-Translations Kits der Firma Invitrogen.

Reaktionsansatz:

- 2,5  $\mu$ l dNTP-Mix ohne dATP
- ca. 200 ng Sonden-DNA
- 2,5  $\mu$ l Pol I/DNase Mix
- 3  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP
- ad 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 15 °C im Wasserbad inkubiert und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) nach der Anleitung des Herstellers von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die Sonde wurde in 300  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 aufgenommen, 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### **II.2.8.6.2 Prähybridisierung**

Vor der DNA/DNA- bzw. der RNA/DNA-Hybridisierung wurde die Membran 2 h mit 25 ml Prähybridisierungslösung (5 x SSPE, 5 x Denhardt's Lösung, 0,5 % SDS, 100  $\mu$ g/ml denaturierte Fischsperma-DNA; ad 25 ml mit autoklaviertem, hochreinem H<sub>2</sub>O) bei der angestrebten Hybridisierungstemperatur in einer Röhre in einem Hybridisierungssofen inkubiert.

### **II.2.8.6.3 Hybridisierung und Autoradiographie**

Nachdem die Prähybridisierungslösung bis auf etwa 10 ml dekantiert worden war, wurde die zuvor denaturierte, radioaktiv markierte Sonden-DNA (II.2.8.6.1) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei der Southern-Membran über Nacht im Hybridisierungssofen bei 68 °C mit der gesamten CCR-cDNA bzw. bei 64 °C mit der 3'-untranslatierten Region der CCR-cDNA als Sonde.

Bei der RNA/DNA-Hybridisierung wurde als Sonde das offene Leseraster der CCR-cDNA bei einer Hybridisierungstemperatur von 64 °C eingesetzt.

In mehreren Waschschritten bei der Hybridisierungstemperatur wurde überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden-DNA von der Membran entfernt:

1. 2 x SSPE + 0,1 % SDS (10 bis 15 min)
2. 1 x SSPE + 0,1 % SDS (15 min)
3. 0,2 x SSPE + 0,1 % SDS (2 x 10 min bzw. so lange bis die Radioaktivität auf der Membran konstant blieb)
4. 2 x SSPE + 0,1 % SDS (kurzes Abspülen der Membran)

Die gebundene Sonden-DNA wurde mittels Autoradiographie detektiert. Der Röntgenfilm wurde bei den Southern-Hybridisierungen 3 Tage der Radioaktivität auf der Membran ausge-

setzt. Bei der Northern-Hybridisierung betrug die Expositionsdauer 10 Tage.

#### II.2.8.6.4 Entfernung der Sonde von der Membran

Die radioaktiv markierte Sonde wurde durch Waschen mit 0,5 % SDS für 30 min bei 80 °C von der Membran entfernt, so daß die Membran für weitere Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden konnte.

#### II.2.9 Herstellung kompetenter Bakterien (DH5 $\alpha$ und BL21(DE3)pLysS)

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Behandlung der Zellen mit Rubidiumchlorid nach einer von HANAHAN (1985) beschriebenen Methode durchgeführt.

5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden in 100 ml LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto<sup>®</sup>-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,0) überführt. Diese Bakterien wurden so lange bei 37 °C und 200 Upm auf einem Rundschtüller kultiviert bis die Suspension eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 aufwies. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 3.000 Upm und 4 °C (Sorvall, GSA-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Sediment getrocknet und in 30 ml TFB1 (30 mM KAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin; mit Eisessig auf pH 5,8) resuspendiert. Der Ansatz wurde nach 10 minütiger Inkubation auf Eis 10 min bei 3.000 Upm und 4 °C (Sorvall, GSA-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet nach dem Trocknen in 4 ml TFB2 (10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub> 15 % Glycerin; mit NaOH auf pH 7,0) aufgenommen.

Die Bakteriensuspension wurde in 200  $\mu$ l-Aliquots auf vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### II.2.10 Heterologe Expression

Zur heterologen Überexpression des CCR-Proteins im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS wurde das offene Leseraster der CCR-cDNA aus *L. album* in den Expressionsvektor pTrc99A eingefügt. Die Insertion der CCR-DNA-Sequenz für den ORF in den Vektor erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Nco* I und *Xba* I, die mit Hilfe einer PCR an das offene Leseraster angehängt worden waren (II.2.3.2 u. II.2.3.4.2). Nach der Restriktionshydrolyse des Vektors und der CCR-DNA wurden die beiden Reaktionsansätze mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) für die nachfolgende Ligation gereinigt. Das resultierende Konstrukt wurde in die Bakterien transformiert. Der korrekte Einbau des CCR-ORFs in den Expressionsvektor wurde durch Sequenzierung (II.2.7) mit den Primern CCRLA 603R, CCRLA 470F und CCRLA 966F (II.3.8) überprüft.

Der mit dem fertigen Konstrukt transformierte Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS wurde in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto<sup>®</sup>-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,0) mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin bei 37 °C und 200 Upm auf einem Rundschtüller kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 1,0 erreicht wurde. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Bakterien bei 28 °C und 200 Upm, nach der die Expression des CCR-Proteins durch Zugabe von 5 mM IPTG induziert



wurde. Nach 4 bis 5 h wurden die Bakterien 10 min bei 5.000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5804 R), das Sediment wurde in 1 ml/10 ml Bakterienkultur TE-Puffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5 mM DTT; pH 7,5) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

### **II.2.10.1 Herstellung eines Enzymrohextrakts aus transformierten *E. coli*-Zellen**

Die noch gefrorenen Bakteriensuspensionen wurden mit 1 mM PMSF und 5 µg/ml Leupeptin versetzt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit Hilfe einer Ultraschallnadel (Stufe 2) (Sonifier B12, Branson Sonic, USA) auf Eis aufgeschlossen. Bakteriensuspensionen mit einem Volumen von 1 ml wurden in 5 Intervallen zu jeweils 30 s beschallt (dazwischen 30 s Pause auf Eis), bei 5 ml Volumen wurde der Zellaufschluß in 8 Intervallen zu je 30 s durchgeführt. Zelltrümmer wurden durch 60 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand, der das heterolog exprimierte Protein enthielt, wurde mit 5 % (v/v) Ethylenglykol versetzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **II.2.10.2 Optimierungsexperimente zur heterologen Expression**

#### **II.2.10.2.1 Optimierung der Induktionsdauer**

Um eine geeignete Inkubationsdauer der BL21(DE3)pLysS-Zellen nach der Induktion mit IPTG zu finden, wurden die Bakterien sofort, nach 3 h, 6 h und 16 h nach IPTG-Zugabe geerntet. Zur Kontrolle wurden parallel Bakterien kultiviert, die nicht induziert wurden und Zellen, die den Expressionsvektor pTrc99A ohne Insertion enthielten.

Der Aufschluß der Bakterien durch Ultraschallbehandlung zur Herstellung der Enzymrohextrakte wurde abweichend von II.2.10.1 in 4 Intervallen zu je 15 s durchgeführt. Es wurde kein Ethylenglykol zugesetzt.

#### **II.2.10.2.2 Experimente zur Stabilisierung der heterolog exprimierten CCR**

Nach der Herstellung des Enzymrohextraktes wurde dieser aliquotiert und alternativ unbehandelt belassen, mit 5 % Ethylenglykol versetzt, über eine Sephadex PD10-Säule gereinigt oder zunächst über die PD10-Säule gereinigt und anschließend mit Ethylenglykol vermischt.

### **II.2.11 Kulturbedingungen für Bakterien**

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden auf Agarplatten (II.3.5) ausgestrichen und im Wärmeschrank bei 37 °C für etwa 14 h inkubiert. Einzelkolonien wurden von den Agarplatten in Reagenzgläser mit jeweils 3 bis 5 ml Kulturmedium überführt und ca. 14 h bei 37 °C und 200 Upm auf einem Rundschüttler (3 cm Auslenkung) kultiviert. Diese Bakteriensuspensionen wurden zur Herstellung von Glycerinstämmen, zur Plasmidpräparation im kleinen Maßstab oder als Vorkultur zum Animpfen größerer Kulturvolumina eingesetzt.

### II.2.11.1 Antibiotika

| Antibiotikum    | Konzentration der<br>1000 fachen Stammlösung<br>[mg/ml] | Lösungsmittel            |
|-----------------|---|--------------------------|
| Ampicillin      | 100   | Wasser (sterilfiltriert) |
| Chloramphenicol | 50  | Ethanol p.A.             |
| Kanamycin       | 50  | Wasser (sterilfiltriert) |
| Tetracyclin     | 30  | Wasser (sterilfiltriert) |

### II.2.11.2 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen eine Referenz aus dem jeweiligen bakterienfreien Medium bestimmt.

### II.2.12 Stammhaltung von Bakterien

Bakterienklone wurden kurzfristig auf Agarplatten (II.3.5) bei 4 °C gelagert.

Für eine langfristige Erhaltung wurden 550 µl Bakterien mit 450 µl einer sterilen Lösung aus LB-Medium (II.3.5) und 60 % (v/v) Glycerin versetzt und bei –80 °C eingefroren.

## II.3 Material

### II.3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

|  |  |
|--|--|
| Aceton p.A.                              | J.T. Baker B.V., Deventer , Holland  |
| Acetonitril, HPLC-Reagenz                | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland<br>Merck KgaA, Darmstadt           |
| Acrylamid (gebrauchsfertige Lösung)      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe  |
| Adenosintriphosphat (ATP)                | Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg   |
| $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP          | Amersham Buchler, Braunschweig   |
| Agar-Agar                                | Duchefa, Haarlem, Holland  |
| Agarose                                  | Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES, Paisley,<br>Schottland                           |
| Albumin, Bovine (BSA) 96-99 % Fraktion V | Sigma Chemical Co, St. Louis, USA  |
| Ammoniaklösung 25 % p.A.                 | Bernd Kraft GmbH, Duisburg   |
| Ammoniumacetat                           | Merck KgaA, Darmstadt  |
| Ammoniumnitrat                           | Merck KgaA, Darmstadt  |
| Ammoniumsulfat Rotipuran p.A.            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe  |
| Ampicillin (Binotal)                     | Grünenthal GmbH, Aachen  |
| Bacto <sup>®</sup> -Trypton              | DIFCO laboratories, Detroit, USA   |
| Borsäure p.A.                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe  |
| Bromphenolblau                           | Serva GmbH & Co, Heidelberg  |
| Caffeoyl-CoA                             | Eigensynthese, Alexandra Henges u. Juliane<br>Meinhard, Universität Düsseldorf |
| Caffeoyl-Succinimidester                 | Eigensynthese, Alexandra Henges u. Juliane<br>Meinhard, Universität Düsseldorf |
| Calciumchlorid-Dihydrat                  | Merck KgaA, Darmstadt  |
| Celluloseacetat Filter, 0,2 µm           | Sartorius AG, Göttingen  |

|   |   |
|---|---|
| Chloramphenicol   | AppliChem, Darmstadt                                    |
| Chloroform  | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland             |
| Coenzym A, Grade II, freie Säure                        | Boehringer, Mannheim GmbH                               |
| Coniferaldehyd (4-Hydroxy-3-methoxy Cinnamaldehyd) 98 % | Aldrich Chem. Co  |
| Coniferylalkohol  | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz                       |
| Coomassie-Brilliantblue G-250 für die Elektrophorese    | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)                     | Serva GmbH & Co, Heidelberg                             |
| p-Cumaroyl-CoA  | Eigensynthese, Alexandra Henges, Universität Düsseldorf |
| Denhardt's Lösung (100x)                                | Eppendorf, Netheler                                     |
| DEAE-Sephacel   | Pharmacia, Uppsala, Schweden                            |
| Diammoniumsulfat  | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| di-Kaliumhydrogenphosphat                               | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| 1,4-Dithiotreitol (DTT)                                 | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe                          |
| Dowex 1x2 pract.  | Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg              |
| Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat                            | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Essigsäure (99-100%)                                    | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland             |
| Ethanol p.A.  | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Ethidiumbromid  | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz                       |
| Ethylenglycol p.A.                                      | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Ferulasäure   | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe                          |
| Feruloyl-CoA  | Eigensynthese, Jörg Windhövel, Universität Düsseldorf   |
| Feruloyl-Succinimid-Ester                               | Eigensynthese, Jörg Windhövel, Universität Düsseldorf   |
| Filterpapier, 0,8 mm                                    | Schleicher & Schuell, Dassel                            |
| Fischsperma-DNA   | Roche, Mannheim   |
| Formaldehyd   | Riedel-de Haën, Seelze                                  |
| Formamid  | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz                       |
| $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln, 7,1 U/mg              | Serva, Heidelberg                                       |
| Glycin  | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe                          |
| Hefeextrakt   | Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland       |
| N-Hydroxysuccinimid zur Synthese                        | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München                |
| Isoamylalkohol  | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland             |
| Isopropanol   | Amersham Buchler, Braunschweig                          |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)       | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe                          |
| Kaliumacetat  | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland             |
| Kaliumdihydrogenphosphat                                | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland             |
| Kaliumdihydrogensulfat                                  | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Kaliumhydroxid  | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Kaliumjodid   | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Kaliumnitrat  | Riedel-de Haën, Seelze                                  |
| Kanamycin   | AppliChem, Darmstadt                                    |
| Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat                           | Ferak, Berlin   |
| Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat                           | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz                         |
| Leupeptin   | USB, Cleveland, USA                                     |
| Lithiumchlorid p.A.                                     | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat                             | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat                             | Merck KgaA, Darmstadt                                   |
| Maltose   | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe                          |
| Mangan(II)-sulfat-1-hydrat                              | Riedel-de Haën, Seelze                                  |

|   |   |
|---|---|
| Manganchlorid   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz             |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                    | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Methanol  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Miracloth   | Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA     |
| MN Polyamid SC6 (Polycaprolactam)<br>Korngröße 0,05-0,16 mm | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren         |
| 3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS)                     | Biomol, Hamburg                             |
| myo-Inosit  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| NADH  | Biomol Feinchemikalien, Hamburg             |
| NADP <sup>+</sup> -Dinatriumsalz                            | Biomol Feinchemikalien, Hamburg             |
| NADPH   | Biomol Feinchemikalien, Hamburg             |
| Naphtylessigsäure (NAA)                                     | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumacetat   | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumchlorid  | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland |
| Natriumcitrat   | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat                          | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumhydroxid (Plätzchen)                                 | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriummolybdat-Dihydrat                                    | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumpyrosulfit   | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Natriumsulfat p.A. 99 %                                     | Grüssing GmbH, Filsum                       |
| Nicotinsäure  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| N,N'-Dicyclohexyl-Carbodiimid 99 %                          | Janssen Chimica, Beerse, Belgien            |
| Nylonmembran, Hybond-N <sup>+</sup>                         | Amersham, Buchler, Braunschweig             |
| Nylonmembran, Nytran Super Charge                           | Schleicher & Schuell, Dassel                |
| NZ-Amine  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim        |
| L-Phenylalanin  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)                          | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe              |
| o-Phosphorsäure 85 % p.A.                                   | Janssen Chimica, Beerse, Belgien            |
| (-)-Podophyllotoxin   | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe              |
| Polyclar 10   | ISP Technologies INC., Wayne, New Jersey    |
| Pyridoxolhydrochlorid                                       | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Rubidiumchlorid p.A.  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Saccharose (Kölner Raffinade Zucker)                        | Pfeifer & Langen, Köln                      |
| Salzsäure (36-38%) p.A.                                     | Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland |
| Sarkosyl  | Serva GmbH & Co, Heidelberg                 |
| SDS (Natriumdodecylsulfat)                                  | Serva GmbH & Co, Heidelberg                 |
| Sephadex (Columns PD-10) G-25 M                             | Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Schweden  |
| Sorbitol  | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe              |
| Tetracyclin   | DUCHEFA, Haarlem, Holland                   |
| Thiaminchloridhydrochlorid                                  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Trichloressigsäure  | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Titriplex III (Na <sub>2</sub> -EDTA)                       | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Titriplex VI für die Molekularbiologie (EGTA)               | Merck KgaA, Darmstadt                       |
| Titron X-100  | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz             |
| Tris (TRIZMA BASE)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim        |
| Tween 20  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim        |
| X-GAL   | Bts, St. Leon-Roth                          |
| Zinksulfat-heptahydrat                                      | Janssen Chimica, Beerse, Belgien            |

### Hochreines Wasser

Bei allen biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten wurde hochreines Wasser verwendet, das mit Hilfe einer E-Pure-Reinstwasseranlage (II.3.2) über Filterkartuschen deioni-

siert wurde.

### II.3.2 Geräte

|   |  |
|---|--|
| Agarose-Gelelektrophorese                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gelkammer und Gelschlitten: Eigenanfertigung, Universität Düsseldorf</li> <li>• Netzteil: 2303 MultiDrive 1 Power Supply, Pharmacia</li> </ul>  |
| Autoklav                                      | Webeco Typ No. 5, Lüdenscheid  |
| Edelstahl-Vakuumfiltrationsgerät              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Edelstahl-Vakuumfiltrationsgerät 16201, Sartorius AG, Göttingen</li> </ul>  |
| Flüssigkeitschromatographie mit DEAE-Sephacel | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gradi Frac, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>• Mixer 0,6 ml, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>• Monitor 2138 Uvicord S, LKB, Bromma, Schweden</li> <li>• Peristaltic Pump P-1, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>• Recorder Rec 101, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>• Solenoid Valve PSV-50, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> </ul> |
| Gefriertrockner                               | Alpha 1-4, Christ, Osterode<br>Vakuumpumpe: Pfeiffer, Balzers Gruppe, Vaduz  |
| HPLC  | Thermoquest, Thermo Separation® Products, Egelsbach mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Laufmittel-Entgaser</li> <li>• Probengeber: Spectra SYSTEM AS1000</li> <li>• Detektor: Spectra SYSTEM UV6000LP</li> <li>• Pumpe: Spectra SYSTEM P2000</li> </ul>   |
| HPLC-Säulen                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypersil HyPURITY™ Elite C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) mit Vorsäule (50 x 4,6 mm, 5 µm), Thermoquest, Kleinostheim</li> <li>• GROM-SIL 120 ODS-5 ST(250 x 4 mm, 5 µm) mit Vorsäule (20 x 4 mm, 5 µm), GROM, Herrenberg-Kayh</li> </ul>   |
| Hybridisierungs-ofen                          | Appligene mini hybridisation oven, Heidelberg  |
| Leitfähigkeitselektrode                       | Batteriekonduktometer LF 91 mit Standardmeßzelle KLE 1/T, WTW Weilheim   |
| pH-Elektrode                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mettler Toledo, Udorf, Schweiz</li> <li>• InLab®, Mikro pH-Einstabmesskette 423</li> </ul>  |
| pH-Meter                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WTW pH 523, Knick, Weilheim</li> <li>• Digital-pH-Meter 646</li> </ul>  |
| Photometer                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• GeneQUANT II, Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>• Uvikon 930 Spektrometer, Kontron Instruments, Tegimenta, Schweiz</li> </ul>   |
| Refraktometer                                 | Handrefraktometer, Krüss, Hamburg  |
| Rotationsverdampfer                           | Rotavapor RE 111 mit Wasserbad 461, Büchi, Schweiz   |
| Schüttler für Suspensionskulturen             | G53, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA   |
| Schlagmesserhomogenisator                     | Ultra Turrax TP 18/10, Janke & Kunkel, Staufen   |
| Thermocycler                                  | UNO, Biometra, Göttingen   |
| Ultraschallbad                                | SONOREX SUPER RK 103 H, Bandelin electronics, Berlin   |
| Ultraschallstab                               | Sonifier B12, Branson Sonic, USA   |
| Vakuumpumpe                                   | Vacuubrand CVC 2, vacuubrand GmbH-co, Wertheim   |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Vortex                    | Vortex Genie 2™, Bender & Habein, Zürich, Schweiz   |
| Wasserbäder               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermomix, B. Braun, Melsungen</li> <li>• Schüttelwasserbad: Julabo SW 20, Seelbach</li> </ul>   |
| Wassersystem              | E-PURE: Reinstwasseranlage, Barnstead, Wilhelm Werner GmbH, Wete A Wassertechnische Anlagen, Leverkusen   |
| Zentrifugen               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode</li> <li>• Eppendorf Tischzentrifuge, Netheler</li> <li>• Hettich Universal, Tuttlingen</li> <li>• Sorvall Superspeed RC-5B, Rotor SS34 u. GSA-Rotor, Kendro Laborating Products GmbH</li> <li>• Eppendorf 5804 R</li> </ul> |
| Zentrifugalkonzentratoren | Centriprep YM-30, Amicon/Millipore  |

### II.3.3 Enzyme

|                     |  |
|---------------------|--|
| <i>Apa</i> I        | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Bam</i> HI       | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Bgl</i> II       | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Eco</i> RI       | 10 U/μl, Roche Mannheim  |
| <i>Eco</i> RV       | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Hind</i> III     | 10 U/μl, Roche Mannheim  |
| <i>Nco</i> I        | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Pst</i> I        | 10 U/μl, Roche Mannheim  |
| <i>Xba</i> I        | 10 U/μl, MBI Fermentas   |
| <i>Xho</i> II       | Boehringer   |
| Taq-Polymerase      | Herstellung Arne Schwelm, 2000                                       |
| Taq-/Pwo-Polymerase | 3,5 U/μl, Roche Mannheim   |
| T4 DNA Ligase       | 1 U/μl, Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES                                 |
| RNase A             | (Ribonuclease A from bovine pancreas)<br>Serva GmbH & Co, Heidelberg |

### II.3.4 Bakterienstämme

| Bakterienstämme | Herkunft                        | Eigenschaften/Genotyp   |
|-----------------|---------------------------------|---|
| BL21(DE3)pLysS  | Novagen (USA)<br>STUDIER (1991) | Expressionsstamm/ F ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cm <sup>R</sup> )  |
| DH5α            | Biolabs (Schwalbach)            | Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (Φ80dlac Δ(lacZ)M15) [F']  |
| XL1-Blue MRF'   | Stratagene (USA)                | Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]   |
| XL0LR           | Stratagene (USA)                | Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] Su <sup>-</sup> (nonsuppressing) λ <sup>r</sup> (lambda resistant) |

### II.3.5 Kulturmedien

LB-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto<sup>®</sup>-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,0

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar

LB-Top-Agarose: LB-Medium mit 0,7 % (w/v) Agar

LBM-Medium: LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % (w/v) Maltose

NZY-Medium: 5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ-Amine (Casein-Hydrolysat); pH 7,5

NZY-Agar: NZY-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar

NZY-Top-Agarose: NZY-Medium mit 0,7 % (w/v) Agar

### II.3.6 Phagen

ZAP Express<sup>™</sup>, zur Herstellung der cDNA-Bibliothek, Stratagene (USA)

ExAssist-Helferphage<sup>™</sup>, Verwendung bei der *in vivo* Exzision, Stratagene (USA)

### II.3.7 Plasmide

pBK-CMV Phagemid-Vektor Stratagene (USA)

*lac*-Promotor, *lacZ*-Gene, Neo<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, 4,5 kb

pGEM-T Promega (USA)

T7-Promotor, *lacZ*-Startcodon, *lac*-Operon, Amp<sup>R</sup>, 3 kb

pTrc99A Amersham Pharmacia (Amann, E. et al., 1988)

Expressionsvektor: *trc*-Promotor, *rrnB* Transkriptionsterminator, Amp<sup>R</sup>, *lac I<sup>q</sup>*, 4,2 kb

Die zugehörigen Vektorkarten sind in VII.5 gezeigt.

### II.3.8 Oligonukleotide

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen (Karlsruhe).

|               |  |
|---------------|--|
| CCR2ZM 610F   | 5'-[AYACICARAAAYTGGTAYTGY]-3'            |
| CCR2ZM 955R   | 5'-[TAYTCIGGRAAIAGYTTIGC]-3'             |
| CCR2ZM 448F   | 5'-[YGAYCCIGARVWRATGRTIGARCC]-3'         |
| CCR2ZM 1085R  | 5'-[IKTIACIGTBTCTAIAGVSAYTG]-3'          |
| CCRLA 470 F   | 5'-[GAAGCTAAAGTGAGGCGGGTTG]-3'           |
| CCRLA 603R    | 5'-[ACCGTCTTCCCGTAACAGTACC]-3'           |
| CCRLA 966F    | 5'-[AGAACCCAAGAGCAAAGGCG]-3'             |
| CCRLA 118F    | 5'-[CCGTTCCATGGTGGCTGACAGCTCATCCCTC]-3'  |
| CCRLA 1143R   | 5'-[GCCGCTCGAGTCAAGAAGACTGGATCTTGATG]-3' |
| CCRLA 1143R b | 5'-[GCTCTAGATCAAGAAGACTGGATCTTGATG]-3'   |
| JWCCR 1196F   | 5'-[AACAGGAAGGAAGGAAGGAGGCTG]-3'         |
| JWCCR 1455R   | 5'-[CTGATGAGGCACCCTTTGAAATGGC]-3'        |

I = Desoxyinosin, R = A+G, Y = C+T, K = T+G, S = C+G, W = A+T, B = T+C+G, V = A+C+G

### III ERGEBNISSE

#### III.1 Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von *Linum album*

Bei der Charakterisierung der Zellsuspensionskultur von *Linum album* X4 wurden Wachstumsparameter (Frisch- und Trockengewicht), Veränderungen im Nährmedium (pH-Wert, Brechungsindex, Leitfähigkeit) und die Aktivitäten einiger ausgewählter Enzyme im Kulturverlauf verfolgt (II.1.9). Mit Hilfe der gesammelten Daten ließen sich Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Kultur und die Biosyntheseaktivität ziehen. Da Zellkulturen aufgrund möglicher somaklonaler Variation Veränderungen unterworfen sein können, die sich auf das Wachstum und die Sekundärstoffproduktion auswirken können, müssen diese von Zeit zu Zeit überprüft werden. Die im folgenden dargestellten Ergebnisse geben exemplarisch eine solche Charakterisierung wieder. Diese diente vorrangig dem Ziel, den optimalen Kultivierungszeitpunkt zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden einige Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels im Kulturverlauf beobachtet, um herauszufinden, wann diese ihre maximalen Aktivitäten erreichen.

##### III.1.1 Wachstumsparameter – Frisch- und Trockengewicht

Die in Abb. 7 dargestellten Kurvenverläufe von Frisch- und Trockengewicht zeigen das typische Wachstumsprofil pflanzlicher Suspensionskulturen. Die Anlaufphase, in der sich die Zellen auf das neue Nährmedium einstellen müssen, betrug bei der untersuchten *L. album*-Kultur 1 bis 2 Tage. Bis zum 10. Charakterisierungstag stieg das Frischgewicht auf das 9,6-

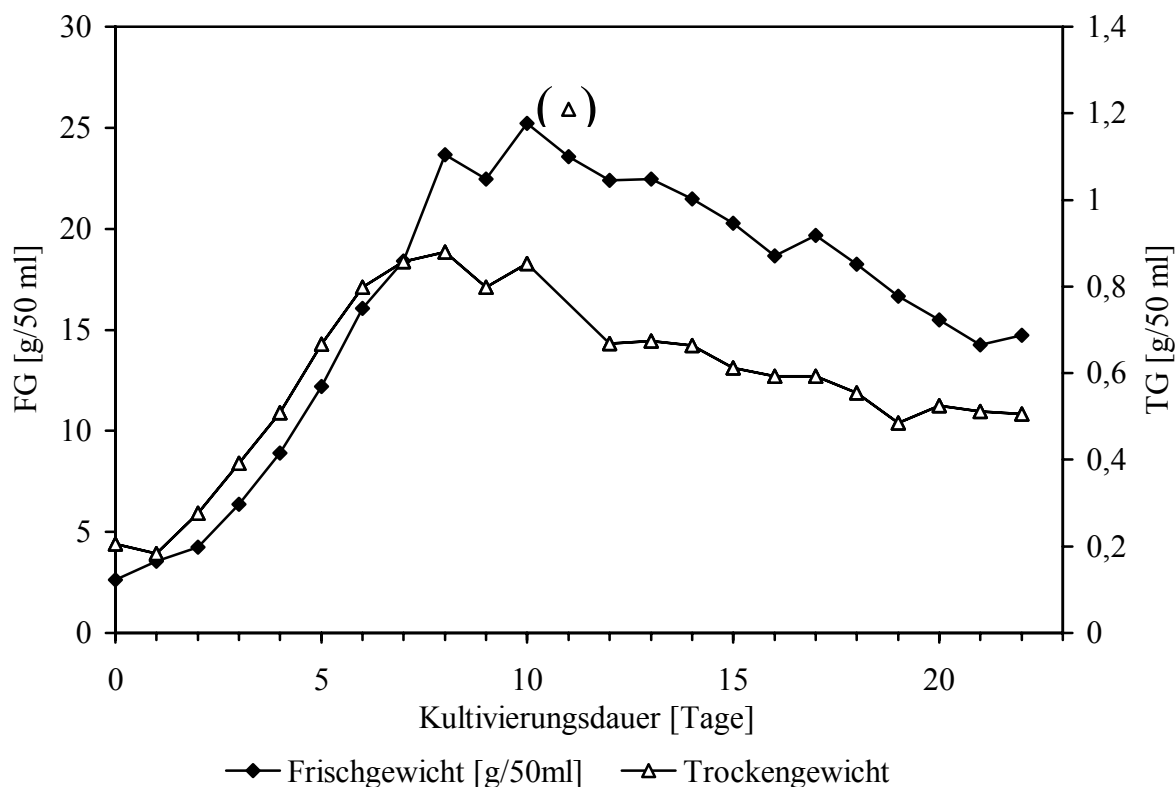


Abb. 7: Veränderung von Frisch- und Trockengewicht im Laufe der Kulturdauer



fache des Ausgangswertes beim Animpfen der Kultur an. Die mit dem starken Wachstum der Zellen verbundene Verarmung des Mediums an Nährsalzen und der Verbrauch der Saccharose als Kohlenstoffquelle (III.1.2) hatten zur Folge, daß die Pflanzenzellen ohne eine längere stationäre Phase in die Absterbephase gelangten. Am Ende der Kulturdauer betrug das Frischgewicht nur noch 58 % des Maximalwertes.

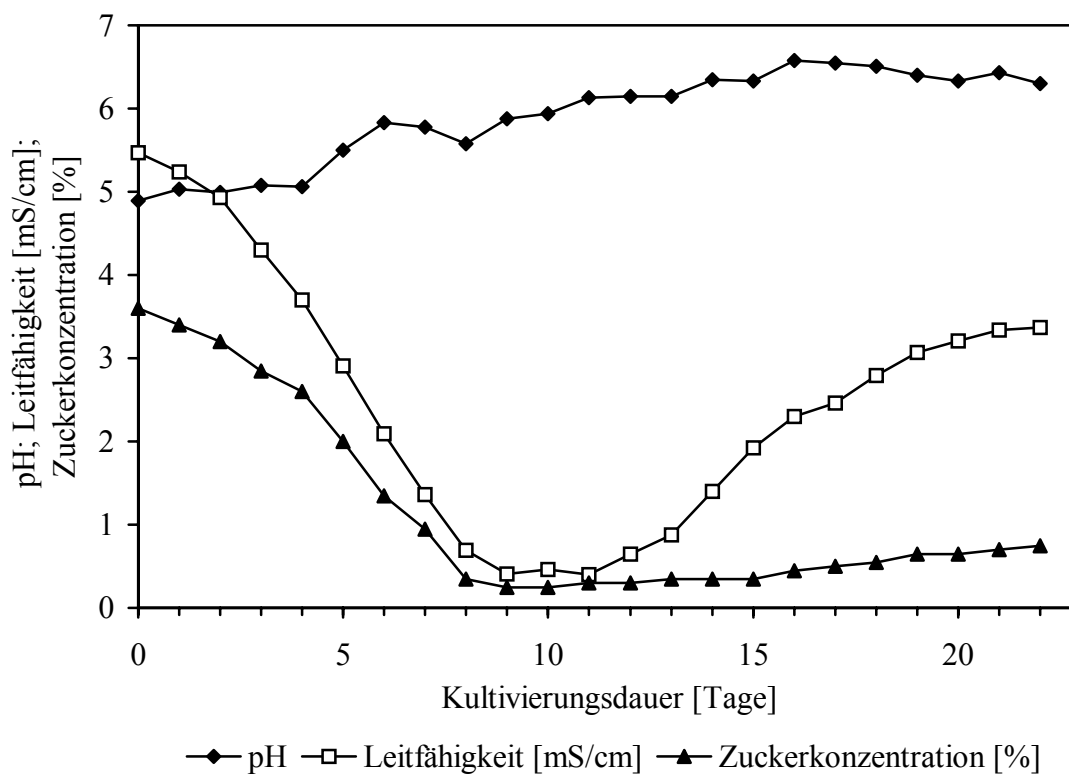
Die Trockengewichtskurve verläuft ähnlich wie die des Frischgewichts, nur daß das Maximum bereits 2 Tage früher erreicht wird. Das Verhältnis von Frisch- zum Trockengewicht gibt einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der Vakuolisierung und der damit verbundenen Wassereinlagerung in die Zellen. Die Verschiebung der Maxima bei Frisch- und Trockengewicht läßt sich daher durch die zunehmende Wassereinlagerung in die Vakuolen der Zellen erklären. Am 8. Kulturtag war der Maximalwert an Zelltrockenmasse erreicht. Danach fand nur noch eine Wassereinlagerung statt. Das Trockengewicht blieb bis zum Beginn der Absterbephase nach dem 10. Tag nahezu konstant. Der Trockengewichtswert für den 11. Charakterisierungstag ist als Meßfehler einzuordnen.

### III.1.2 Mediumsparameter

Der Zuckergehalt des Mediums wurde refraktometrisch über den Brechungsindex bestimmt (II.1.9.2). Dieser gibt den Zuckergehalt jedoch nur näherungsweise wieder, da es im Nährmedium auch andere lichtbrechende Komponenten gibt. Neben der Verdunstung beim Autoklavieren des Mediums war dies der Grund, warum zu Beginn der Kultivierung ein Zuckergehalt von 3,6 % ermittelt wurde (Abb. 8), obwohl er nur 3 % betragen sollte (Tab. 1). Die Hauptkohlenstoffquelle im MS-Medium ist die Saccharose, das zugesetzte Glycin spielt in dieser Beziehung eine untergeordnete Rolle. Der Brechungsindex nahm bis zum 8. Kulturtag ab, pendelte bis zum 15. Tag zwischen 0,25 und 0,35 % und stieg bis zum Ende der Charakterisierung auf 0,75 % an. Der Nullwert wurde aufgrund anderer lichtbrechender Substanzen in der Nährlösung nicht erreicht. Der Anstieg des Brechungsindex zum Ende der Kultivierung beruhte auf dem Freiwerden von lichtbrechenden Substanzen bei der Lyse absterbender Zellen. Die graphische Darstellung der Veränderung des Brechungsindex im Kulturverlauf entspricht typischerweise annähernd dem Spiegelbild der Trockengewichtskurve (Abb. 7) (Abszisse als Spiegelachse), da der im Medium verbrauchte Zucker von der Pflanzenkultur in zelleigene Biomasse umgewandelt wird.

Die Leitfähigkeit ist ein Maß für die Ionenkonzentration im Kulturmedium (II.1.9.2). Da das  $\text{NO}_3^-$ -Ion die Hauptmasse der Ionen im MS-Medium ausmacht, ist die Leitfähigkeit ein guter Anhaltspunkt für die momentane Nitratkonzentration. Die Veränderung der Leitfähigkeit während der Charakterisierung (Abb. 8) verhielt sich etwa spiegelbildlich zur Frischgewichtskurve (Abszisse als Spiegelachse) (Abb. 7). Die Aufnahme der Ionen durch die Pflanzenzellen konnte schon einige Stunden nach dem Überimpfen der Suspensionskultur beobachtet werden. So nahm die Leitfähigkeit, die im zellfreien Nährmedium bei 5,8 mS/cm lag, in wenigen Stunden auf 5,5 mS/cm ab. Bis zum zweiten Tag sank die Leitfähigkeit nur wenig auf 4,9 mS/cm. Danach fielen die Werte bis zum 9. Tag der Kulturperiode rapide auf 0,4 mS/cm ab und blieben in dieser Größenordnung bis zum 11. Charakterisierungstag. In der folgenden Zeit stieg die Ionenkonzentration im Medium wieder an und erreichte zum Ende der Charak-

terisierung einen Wert von 3,4 mS/cm. Diese Ergebnisse korrelierten gut mit der langsamen Zunahme des Frischgewichts in der zweitägigen Anlaufphase der Kultur, dem Erreichen eines Maximums zwischen dem 8. und 11. Tag der Charakterisierung und der folgenden Absterbephase, in der Ionen wieder ins Nährmedium abgegeben wurden.



**Abb. 8:** Abhängigkeit der Mediumsparameter pH-Wert, Leitfähigkeit und Zuckerkonzentration vom Alter der *L. album*-Suspensionskultur

Der pH-Wert des Kulturmediums veränderte sich im Zeitverlauf nur langsam (Abb. 8). Ausgehend von pH 4,9 am Überimpftag (Tag 0) stieg der pH-Wert um 1,7 Einheiten bis zum 16. Kulturtag (pH 6,6). Danach sank er bis zum Ende der Charakterisierung um 0,3 pH-Einheiten auf pH 6,3. Obwohl der pH-Wert beim Herstellen des Mediums auf 5,6 eingestellt worden war, betrug er nach dem Autoklavieren im zellfreien Medium nur noch 4,2. Durch das Überimpfen der Zellen wurde er um 0,7 pH-Einheiten auf pH 4,9 erhöht. Diese im Vergleich zur langsamen Veränderung im Kulturverlauf starke Alkalisierung des Mediums könnte auf einer durch das Überimpfen hervorgerufenen Streßantwort der Zellen beruhen. Es wird beim Animpfen der Kulturen zwar auch immer etwas von dem alten, basischeren Medium in das neue übertragen, doch ist es zweifelhaft, ob diese Mengen für eine solche pH-Veränderung ausreichen.

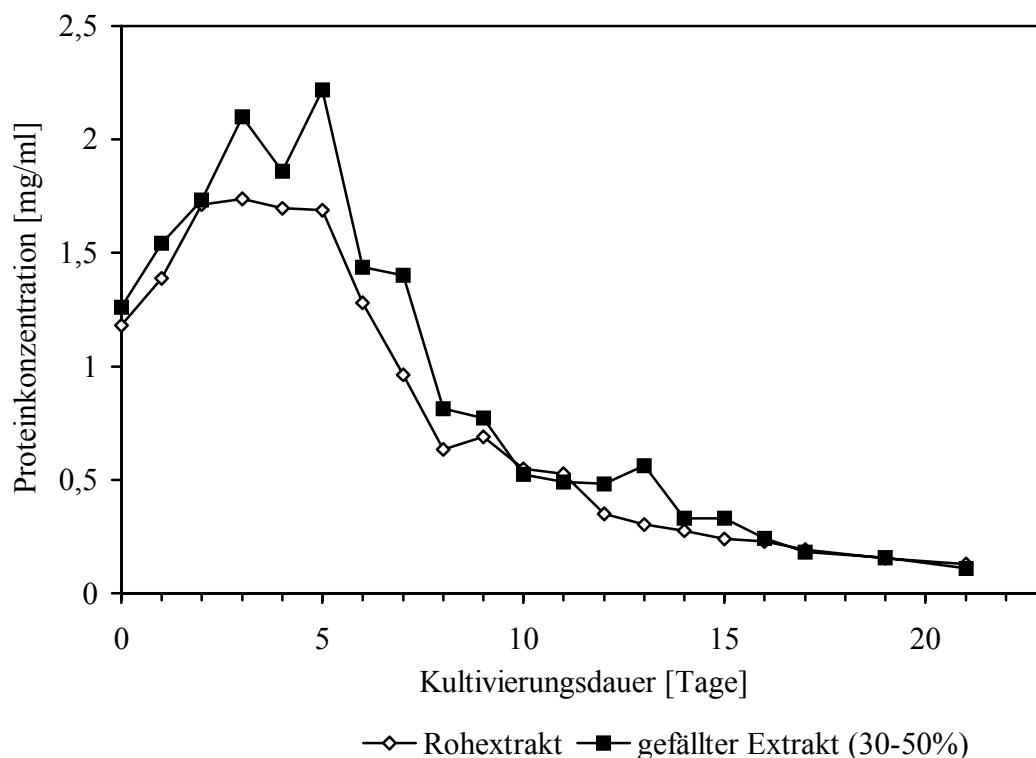
### III.1.3 Enzymaktivitäten im Kulturverlauf

Bei der graphischen Auswertung wurden sowohl die spezifischen als auch die auf das Frischgewicht der zur Extrakterstellung eingesetzten Zellen bezogenen Enzymaktivitäten aufgetra-

gen. Während die spezifischen Aktivitäten einen Anhaltspunkt geben, wann man in der Kulturperiode Enzymtests durchführen muß, um hohe Aktivitäten zu erzielen, geben die auf das Frischgewicht bezogenen Enzymaktivitäten einen besseren Überblick, wie die tatsächlichen Aktivitätsverhältnisse in den Zellen zu einer bestimmten Kultivierungszeit sind. Die spezifischen Enzymaktivitäten spiegeln den Anteil eines Enzyms am Gesamtprotein wider. Werden die Proteinkonzentrationen im Testansatz niedrig, so erhält man auch schon bei relativ schwachen enzymatischen Katalysereaktionen hohe spezifische Aktivitäten.

### III.1.3.1 Proteinkonzentrationen der Enzymextrakte im Kulturverlauf

Für die Ermittlung der spezifischen Enzymaktivitäten (II.1.9.4) wurden die Proteinkonzentrationen des Rohextrakts (für PAL, 4CL, CAD) und des gefällten Extrakts (für CCR) (II.1.9.3) an den einzelnen Kulturtagen bestimmt (II.1.8). Die Kurvenverläufe der beiden Proteinlösungen sind nahezu identisch (Abb. 9). Der Rohextrakt enthielt zu Beginn der Charakterisierung etwas weniger Protein. Bei ihm lag zwischen dem 2. und dem 5. Tag ein Plateau maximaler Konzentration, während beim gefällten Extrakt die größte Proteinmenge zwischen dem 3. und 5. Tag vorhanden war. Die Proteinsynthese fand vorwiegend in der Wachstumsphase der Zellkultur statt.

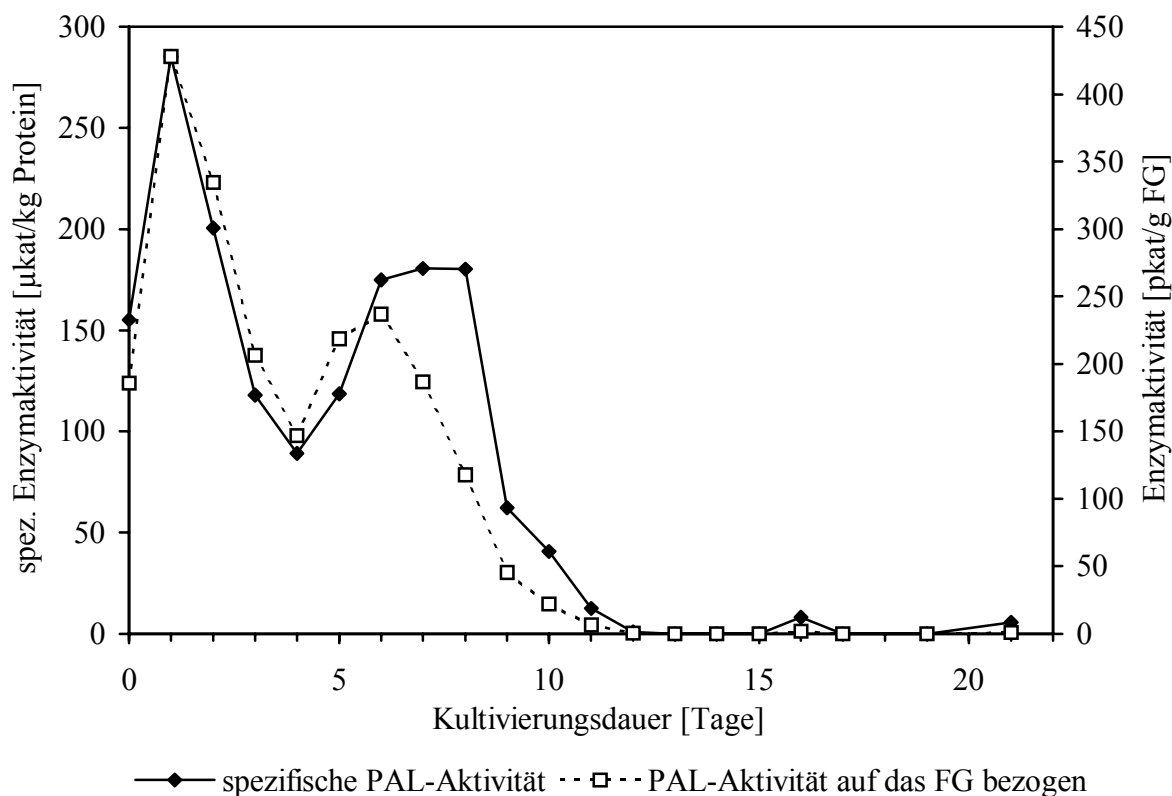


**Abb. 9:** Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Kulturdauer

### III.1.3.2 Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

Die Enzymaktivität der PAL stieg vom Überimpftag bis zum 1. Kulturtag rapide an und erreichte dort ein Maximum von 285  $\mu$ kat/kg Protein bzw. 428 pkat/g FG (Abb. 10). Bis zum 4. Tag fiel die Aktivität ab, wobei Werte erreicht wurden, die unter denen zu Charakterisie-

rungsbeginn lagen. In der folgenden Zeit war eine Aktivitätszunahme zu verzeichnen. Während aber die auf das Frischgewicht bezogenen Werte am 6. Tag ein zweites Maximum erreichten und sofort wieder abfielen, blieben die spezifischen PAL-Aktivitäten vom 6. bis zum 8. Kulturtag konstant hoch und sanken erst dann ab. Vom 12. Charakterisierungstag an waren keine oder nur geringe Aktivitäten meßbar.

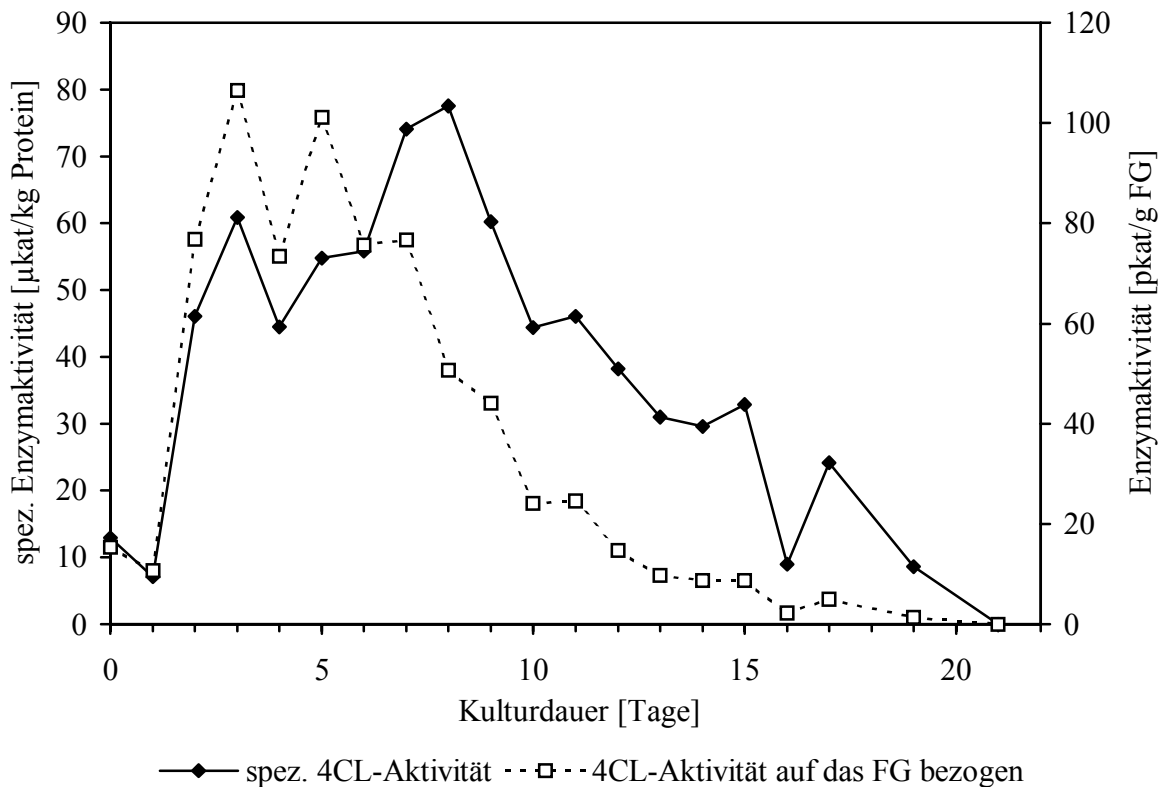


**Abb. 10:** Die Aktivität der Phenylalanin Ammonium-Lyase im Kulturverlauf

### III.1.3.3 Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (4CL)

Die Enzymaktivitäten der 4CL wurden mit Ferulasäure als Substrat gemessen (II.1.9.4.2). Am Überimpftag betragen sie nur  $13 \mu\text{kat}/\text{kg Protein}$  bzw.  $15 \text{pkat}/\text{g FG}$ . Am 1. Kulturtag fielen die Aktivitäten geringfügig und stiegen in den folgenden zwei Tagen steil an. Die spezifischen 4CL-Aktivitäten erreichten ein Nebenmaximum ( $61 \mu\text{kat}/\text{kg Protein}$ ) am 3. Kulturtag. Anschließend fiel die spezifische Enzymaktivität zum 4. Tag wieder ab. Es folgte eine Aktivitätszunahme, bei der am 8. Tag das Hauptmaximum von  $78 \mu\text{kat}/\text{kg Protein}$  erreicht wurde. Danach ging die spezifische 4CL-Aktivität zurück, so daß sie am 21. Tag der Charakterisierung nicht mehr meßbar war. Die relativ hohen spezifischen Aktivitäten in der mittleren Phase der Kulturperiode beruhen auf der Abnahme der Proteinkonzentrationen in diesem Zeitraum. Die auf das Frischgewicht bezogenen 4CL-Aktivitäten wiesen am 3. Kulturtag ihr Maximum von  $107 \text{pkat}/\text{g FG}$  auf. Nach einem Aktivitätsverlust am 4. Tag konnte am 5. Tag ein Nebenmaximum beobachtet werden, das mit  $101 \text{pkat}/\text{g FG}$  nicht wesentlich geringer ausfiel als das zuvor beschriebene Hauptmaximum. Bis zum Ende der Kultivierung fielen die 4CL-Aktivitäten ab. Die Aktivitätsschwankungen im Bereich des 3. bis 5. Kulturtages beruhen

möglicherweise nicht auf einer charakteristischen Eigenschaft der Kultur, sondern auf einem Artefakt, wie z.B. einem Meßfehler oder einer Unregelmäßigkeit bei der Herstellung des Proteinrohextrakts. Die Zellkulturen selbst zeigten an den jeweiligen Tagen keine offensichtlichen Abweichungen in den Wachstums- und Mediumsparametern (Abb. 7 und 8).



**Abb. 11:** Veränderung der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase-Aktivität im Kulturverlauf bei Verwendung von Ferulasäure als Substrat

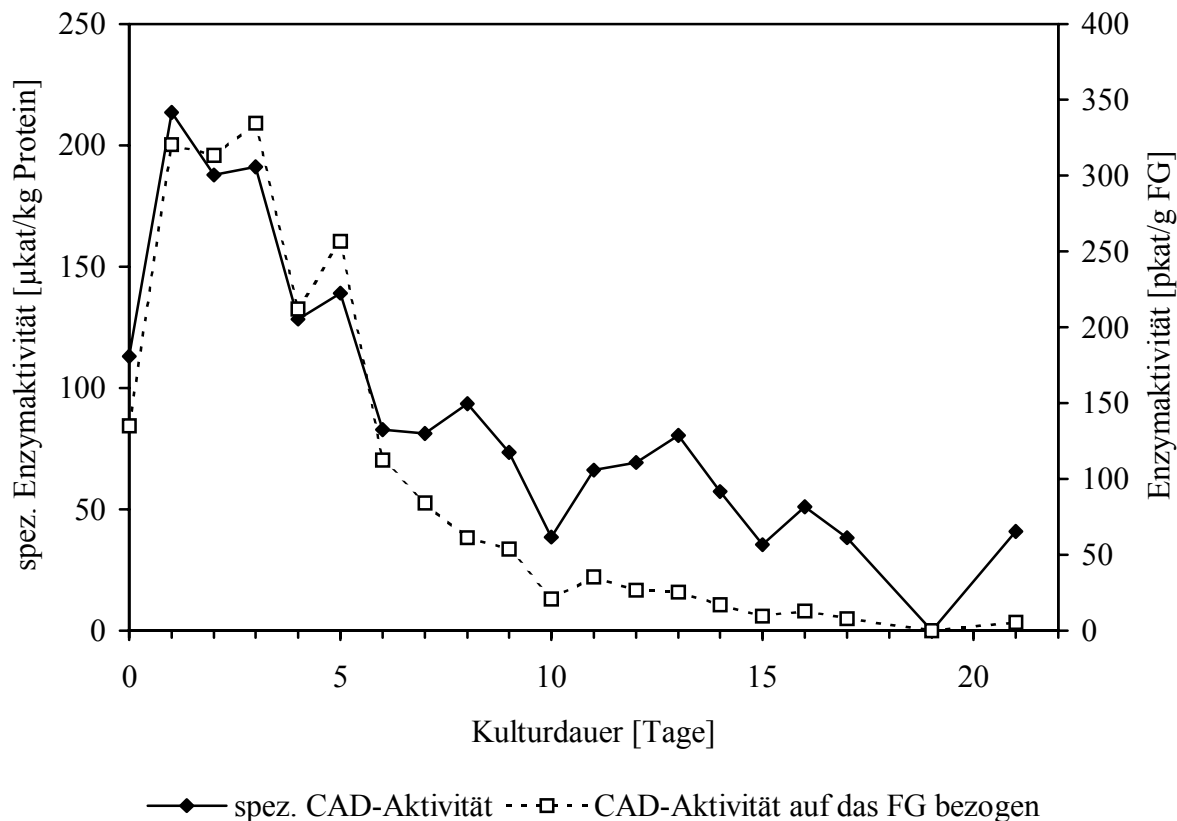
### III.1.3.4 Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD)

Die spezifischen und die auf das Frischgewicht bezogenen Enzymaktivitäten zeigten im Kulturverlauf vergleichbare Tendenzen (Abb. 12).

Ausgehend von 113  $\mu\text{kat}/\text{kg Protein}$  am Überimpftag wurde die maximale spezifische Aktivität bereits am ersten Kulturtag mit einem Wert von 213  $\mu\text{kat}/\text{kg Protein}$  erreicht. Im weiteren Verlauf nahm die spezifische CAD-Aktivität ab, wobei jedoch immer wieder geringe Anstiege zu verzeichnen waren. Diese dürfen bei der Auswertung spezifischer Enzymaktivitäten nicht überbewertet werden, da bereits kleine Aktivitätsschwankungen, die möglicherweise auf Meßungenauigkeiten beruhten, durch die geringe Proteinmenge in dieser Phase der Kultivierung die spezifische Aktivität stark erhöht erscheinen lassen.

Bei den auf das Frischgewicht bezogenen Enzymaktivitäten lag das Maximum von 334  $\text{pkat}/\text{g FG}$  am 3. Kulturtag. Die Aktivitäten der ersten beiden Tage waren aber mit 320 bzw. 313  $\text{pkat}/\text{g FG}$  nicht wesentlich niedriger. Am 5. Kulturtag konnte mit beiden Auswertungsmethoden ein Zwischenmaximum festgestellt werden, das eine Höhe von 139  $\mu\text{kat}/\text{kg Protein}$  bzw. 256  $\text{pkat}/\text{g FG}$  besaß. Diese Aktivitätserhöhung könnte zwar cha-

rakteristisch für die CAD im Kulturverlauf sein, doch ist es wahrscheinlicher, daß lediglich ein Artefakt vorlag.

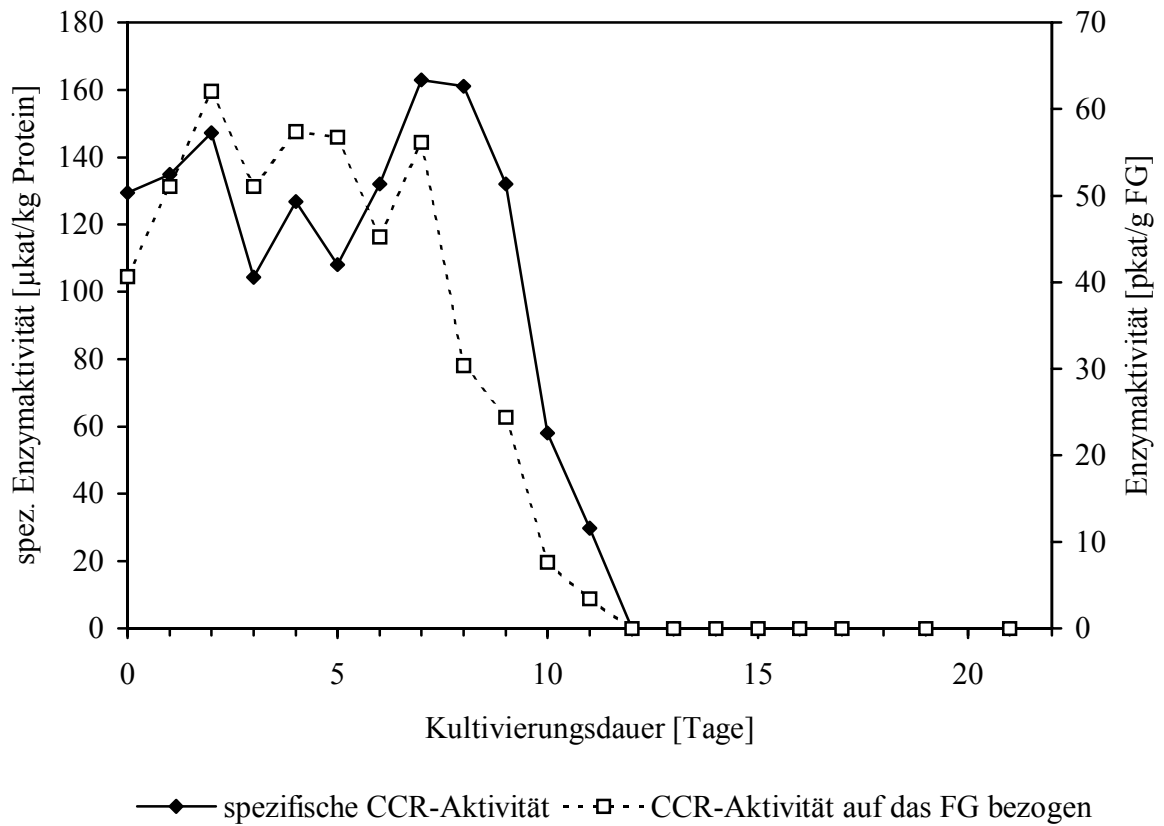


**Abb. 12:** Zimtalkohol-Dehydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit Coniferylalkohol als Substrat

### III.1.3.5 Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR)

Die auf das Frischgewicht bezogenen CCR-Aktivitäten stiegen nach dem Überimpfen von 41 auf 62 pkat/g FG am 2. Kulturtag an und blieben bis zum 7. Tag, von kleinen Schwankungen am 3. und 6. Tag abgesehen, auf einem Niveau von 56 pkat/g FG (Abb. 13). Nach einem steilen Abfallen der Aktivitätskurve konnte ab dem 12. Charakterisierungstag keine CCR-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

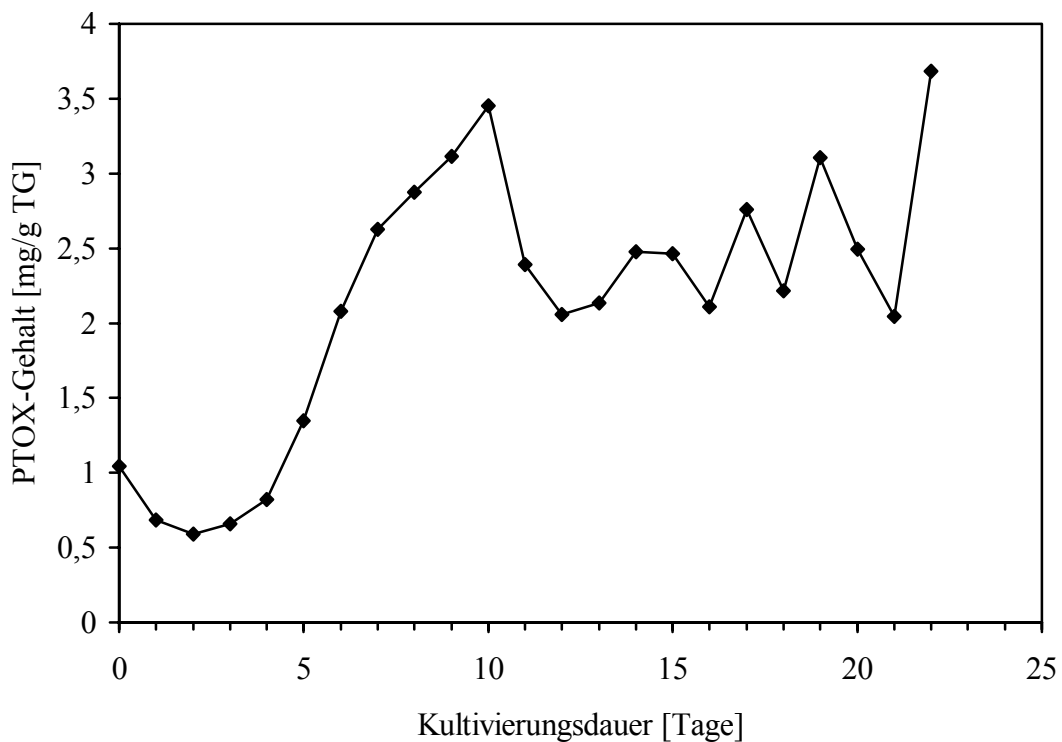
Die spezifischen Enzymaktivitäten erreichten ihr Maximum von etwa 162 µkat/kg Protein am 7. und 8. Tag der Kulturperiode (Abb. 13). Zu dieser Zeit in der Entwicklung der *L. album*-Kultur war der Anteil der CCR am Gesamtprotein am höchsten. Danach sanken die spezifischen Aktivitäten bis zum 12. Kulturtag auf den Nullwert ab. Die im Vergleich zu dem auf das Frischgewicht bezogenen Substratumsatz hohe spezifische CCR-Aktivität am 8. Charakterisierungstag beruhte auf dem Absinken der Proteinkonzentration in dieser Phase der Kulturperiode.



**Abb. 13:** Cinnamoyl-CoA:NADP Oxidoreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit Feruloyl-CoA als Substrat

### III.1.4 Podophyllotoxin-Gehalt

Der PTOX-Gehalt in den Zellen (II.1.9.5) nahm bis zum zweiten Kulturtag leicht ab, stieg



**Abb. 14:** PTOX-Gehalt pro Gramm Trockengewicht einer Suspensionskultur von *L. album* in Abhängigkeit vom Kulturalter

dann steil an und erreichte am 10. Tag einen Maximalwert von etwa 3,5 mg/g TG (Abb. 14). Die Meßwerte in der folgenden Zeit bis zum Ende der Charakterisierung variierten zwischen 2 und 3,7 mg/g TG, wobei die Schwankungsbreite mit dem Alter der Kultur zunahm.

Andere Lignane (I.5) außer PTOX wurden nicht detektiert. Ihre Konzentrationen lagen entweder unter der Nachweisgrenze oder das verwendete HPLC-System war für die Detektion nicht geeignet.

### III.2 Herstellung und Sichtung einer cDNA-Bibliothek aus Zellsuspensionskulturen von *L. album* X4

Die Charakterisierungsergebnisse zeigten, daß die CCR ihre höchsten Aktivitäten in den ersten neun Tagen der Kulturperiode hatte. Daher wurden Zellen vom 4. bis 7. Tag geerntet und für die Herstellung einer *L. album*-cDNA-Bibliothek eingesetzt (II.2.2). Literaturwerte für die Größe bisher untersuchter CCR-cDNAs lagen bei etwa 1200 bis 1500 bp (LACOMBE et al., 1997; PICHON et al., 1998). Aus diesem Grund wurde die cDNA in drei Größenbereiche fragmentiert, wobei nur die Fraktion von 0,8 bis 2,8 kb für die Suche nach der *L. album*-CCR Verwendung fand.

#### III.2.1 Herstellung einer homologen *L. album*-Sonde

Zur Sichtung der amplifizierten cDNA-Bibliothek wurde mittels RT-PCR mit „nested“ Primern eine homologe *L. album*-Sonde angefertigt (II.2.3.1.1) (Abb. 15). Die degenerierten Start-Oligonukleotide für die PCRs wurden anhand von Vergleichen bereits veröffentlichter CCR-Aminosäuresequenzen, insbesondere von *Zea mays*, ausgewählt. Um eine möglichst spezifische CCR-Sonde zu erhalten, wurde die für alle bislang im Pflanzenreich gefundenen CCRs typische, hochkonservierte Sequenz „NWYCY“ in einem der Primer berücksichtigt. Die Sequenz der aus der RT-PCR resultierenden 346 bp langen *L. album*-Sonde ist in Abb. 15 dargestellt.

```

1  ATACGCAGAA CTGGTATTGT TACGGGAAGA CGGTGGCGGA GCAGGCGGCG
51 TGGGAGATGG CGAAGGAAAA AGAGGTGGAC GTGGTGGTGG TGAACCCGGT
101 TCTGGTATTG GGCCATTGT TGCAATCAAC TATTAATGCA AGCATAATAC
151 ACATCCTCAA GTACCTGACA GGTTCCGCCA AAACCTATGC CAATTCGGTT
201 CAAGCCTATG TCCACGTCAA GGACGTTGCA CTATCCCACA TCCTTGCTTT
251 TGAGAACCCT TCTGCCGCCG GCCGTTACCT TTGCGCCGAA AGCGTGCTCC
301 ACCGTGGCGA GGTTGTTGAA ATCCTCACCA AGCTCTTCCC CGAGTA

```

**Abb. 15:** Homologe CCR-Sonde aus *Linum album* X4

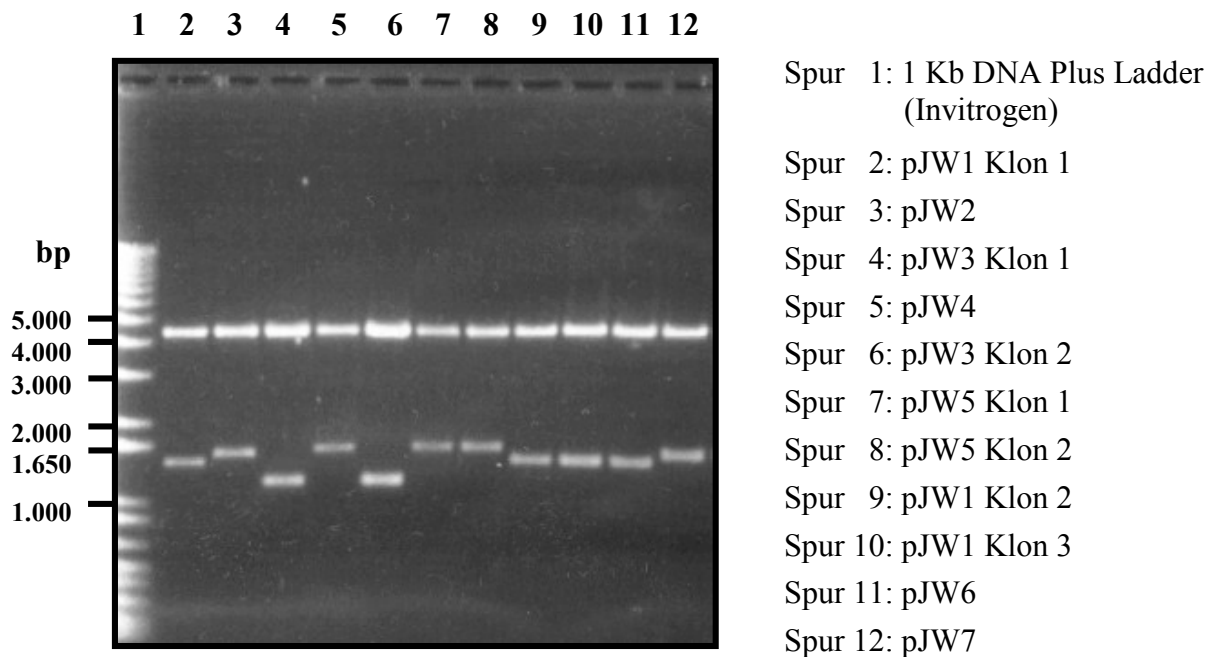
Die unterstrichenen Nukleotid-Sequenzen markieren die Primerpositionen (oben: CCR2ZM 610F; unten: CCR2ZM 955R).

Der kursiv markierte Nukleotidabschnitt codiert die bei allen CCRs konservierte Aminosäuresequenz „NWYCY“.



### III.2.2 Identifizierung einer für eine *L. album*-CCR codierenden cDNA

Zur Sichtung der cDNA-Bank wurden etwa 400.000 pfu ausplattiert. Bei Verwendung der homologen *L. album*-Sonde (Abb. 15) zur Plaque-Hybridisierung (II.2.2.3.3) erhielt man ca. 600 positive Klone, von denen 20 näher untersucht wurden. Nach drei Sichtungsdurchgängen wurden 7 Klone willkürlich ausgewählt, die nach der *in vivo* Exzision (II.2.2.4) durch Restriktionshydrolysen fragmentiert wurden. Die resultierenden DNA-Stücke wurden mittels Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 16). Dabei ergaben sich 3 unterschiedliche Gruppen, von denen jeweils ein Klon für die Sequenzierung ausgewählt wurde. Während zwei Sequenzen auf verkürzte bzw. durch Artefakte veränderte cDNAs schließen ließen, erwies sich die dritte als Vollängen-Klon, bestehend aus einer 5'- und 3'-untranslatierten Region mit Polyadenylierung am 3'-Ende und einem offenen Leseraster, beginnend mit einem „ATG“ an Position 118 und endend mit dem Stopcodon „TGA“ an Position 1143 (Abb. 17). Das Ergebnis der ersten Sequenzierung wurde durch eine zweite bestätigt. Von den 7 Klonen entsprachen den Ergebnissen der Gelelektrophorese (Abb. 16) und der Sequenzierung zufolge 4 dem Vollängenklon (pJW2, pJW4, pJW5, pJW7), 2 einer identischen aber verkürzten DNA-Sequenz (pJW1, pJW6), und einer war artifiziell verändert, so daß er kein längeres offenes Leseraster besaß (pJW3).



**Abb. 16:** Durch Restriktionshydrolysen mit den Endonukleasen *Xba* I und *Pst* I wurden die Insertionen putativer CCR-Klone aus dem Vektor pBK-CMV geschnitten und über eine Agarose-Gelelektrophorese (0,8 % Agarose) ihrer Größe nach aufgetrennt. Es waren 7 unterschiedliche Klone vorhanden, wobei von einigen identische Parallelklone auf dem Gel aufgetragen wurden. Die Klone konnten aufgrund der Insertionsgrößen in 3 Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe 1: pJW2, pJW4, pJW5, pJW7; Gruppe 2: pJW1, pJW6; Gruppe 3: pJW3

|      |   |      |
|------|---|------|
| 1    | GCCAAATCTTGTTTTCCCTCTTTGCTTTTATCTCATCCCTAGCGCTCTCCTTTCCCTC                    | 60   |
| 61   | CCATCTCCCAAAAGCAGAAGACGGGGCCAAAAGATTAAGTGAAGCCACACACACT <b>ATG</b>            | 120  |
|      |   | M -  |
| 121  | CCGGCTGACAGCTCATCCCTCCCCGGCCACGGCCAGACCGTCTGCGTCACCGGCGCCGGC                  | 180  |
|      | P A D S S S L P G H G Q T V C <b>V T G A G</b>                                | -    |
| 181  | GGCTTCATCGCCTCCTGGATCGTCAAACCTCCTCCTAGATAGAGGCTACTCCGTCAAAGGA                 | 240  |
|      | <b>G F I A S W I V K L L L D R G Y</b> S V K G                                | -    |
| 241  | ACTGTCAGGAATCCAGATGATCCGAAGAACGCTCACTTGAGAGCGCTGGAAGGAGCAGAC                  | 300  |
|      | T V R N P D D P K N A H L R A L E G A D                                       | -    |
| 301  | GAGCGGCTGACTCTGTGCAAAGCAGATCTTCTGGATTACCAGAGCCTCCGTGAAGCCATT                  | 360  |
|      | E R L T L C K A D L L D Y Q S L R E A I                                       | -    |
| 361  | AGCGGTTGCCAAGGCGTTTTCCCACTGCTTCCCCGTCACCGATGATCCAGAACAAATG                    | 420  |
|      | S G C Q G V F H T A S P V T D D P E Q M                                       | -    |
| 421  | GTGGAGCCGGCGGTGGAGGGGACTAAGAATGTAATTAACGCAGCAGCGGAAGCTAAAGTG                  | 480  |
|      | V E P A V E G T K N V I N A A A E A K V                                       | -    |
| 481  | AGGCGGTTGTATTACATCATCTATTGGCGCGTCTACATGGATCCTAACCGGAGCCCC                     | 540  |
|      | R R V V F T S S I G A V Y M D P N R S P                                       | -    |
| 541  | GACACGGTGGTTGACGAATCCTGTTGGAGCGACCTGGAGTCTGCAAGAACACTAAGAAC                   | 600  |
|      | D T V V D E S C W S D L E F C K N T K <b>N</b>                                | -    |
| 601  | TGGTACTGTTACGGGAAGACGGTGGCGGAGCAGCGCGCTGGGAGATGGCGAAGGAAAA                    | 660  |
|      | <b><u>W Y C Y</u></b> G K T V A E Q A A W E M A K E K                         | -    |
| 661  | GAGGTGGACGTGGTGGTGGTGAACCCGGTTCTGGTATTGGGCCATTGTTGCAATCAACT                   | 720  |
|      | E V D V V V V N P V L V L G P L L Q S T                                       | -    |
| 721  | ATTAATGCAAGCATAATACACATCCTCAAGTACCTGACAGGTTCCGGCCAAAACCTTATGCC                | 780  |
|      | I N A S I I H I L K Y L T G S A K T Y A                                       | -    |
| 781  | AATTCGGTTCAAGCCTATATCCACGTCAAGGACGTTGCACTATCCACATCCTTGTCTTT                   | 840  |
|      | N S V Q A Y I H V K D V A L S H I L V F                                       | -    |
| 841  | GAGAACCCTTCTGCCGCCGGCCGTTACCTTTGCGCCGAAAGCGTGCTCCACCGTGGCGAG                  | 900  |
|      | E N P S A A G R Y L C A E S V L H R G E                                       | -    |
| 901  | GTGTTGAAAATCCTCGCCAAGTTGTTTCCTGACTACCCTGTCCCTACCAAGTGTTCGGAT                  | 960  |
|      | V V E I L A K L F P D Y P V P T K C S D                                       | -    |
| 961  | GAGAAGAACC CAAGAGCAAAGGCGTACAAGTTCTCATGCCAGAACTGAAGGACCTTGGG                  | 1020 |
|      | E K N P R A K A Y K F S C Q K L K D L G                                       | -    |
| 1021 | CTGGAGTTCACACCGGCGAAGCAGTGCCTGTATGAAACGGTGACCTCCCTCCAGGAAAAG                  | 1080 |
|      | L E F T P A K Q C L Y E T V T S L Q E K                                       | -    |
| 1081 | GGCCACCTTGCTCTTCCCTGCCTCCAAACAACAGGAGGAACCCATCAAGATCCAGTCTTCT                 | 1140 |
|      | G H L A L P A S K Q Q E E P I K I Q S S                                       | -    |
| 1141 | <b>TGA</b> CAACATATATTACATACACAGAGGCAAGGCGCCGGCTAGGGACTGACTACCA <b>AAACAG</b> | 1200 |
|      | *   |      |
| 1201 | <b>GAAGGAAGGAAGGAGGCTGAACAACAAACCACCCTACAAC TACAAC TTTACCAATTTGCA</b>         | 1260 |
| 1261 | <b>GCAGCTAGCAATTACGTCTCAGTCAGTCAGTCAGTCCGTCCTCTCGCCGTGTTCTTTGT</b>            | 1320 |
| 1321 | <b>TTCTTCTTTTGATTGGATCGCGCGCATCAATTTACATATATATCCCAAGTACTGTTGT</b>             | 1380 |
| 1381 | <b>AACTTGCTACTTTTCTTGATCCTGTAATTTAAATTTAAACCCTGTCTGTACTGCCATTTCA</b>          | 1440 |
| 1441 | <b>AGGGTGCTCATCAG</b> TTTtagttccattattactattataaaaaaaaaa                      | 1488 |

**Abb. 17:** Nukleotidsequenz der cDNA und Aminosäuresequenz des offenen Leserasters der CCR aus *Linum album* (AC.-Nr.: AJ440712)

Start- und Stopcodon des ORFs sind rot, die putative NADPH-Bindestelle ist blau und die Sequenz der 3'-UTR-Sonde (III.4) ist grün hervorgehoben. Die hochkonservierte Sequenz „NWYCY“ ist fett gedruckt und unterstrichen.

Das 1026 bp lange offene Leseraster des Vollängenklons codiert ein etwa 37 kDa großes Protein. Wie aufgrund der Sondenbeschaffenheit zu erwarten war, enthielt die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäurefolge das in allen bisher gefundenen CCRs konservierte Motiv „NWYCY“. Eine putative NADP-Bindedomäne befindet sich im N-terminalen Bereich des ORFs (Abb. 17, blau markiert), deren Aminosäuresequenz in einigen Abwandlungen auch in anderen Enzymen gefunden werden kann, die NAD bzw. NADP als Cosubstrat nutzen (LACOMBE et al., 1997) (III.3).

### **III.3 Sequenzvergleich der putativen *L. album*-CCR mit verschiedenen CCRs unterschiedlichster pflanzlicher Herkunft**

Ein Aminosäuresequenzvergleich diverser CCRs zeigt eine große Übereinstimmung der aus den unterschiedlichsten Pflanzen stammenden Enzyme. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um Mono- oder Dikotyle handelt.

Alle CCR-Sequenzen beinhalten das bereits beschriebene hochkonservierte Aminosäuremotiv „NWYCY“ (III.2.1, III.2.2) (Abb. 18), das möglicherweise eine biologische Bedeutung im katalytischen Zentrum der CCRs hat (LACOMBE et al., 1997). Der Vergleich mit einer aus *Vitis vinifera* stammenden Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) offenbart eine große Ähnlichkeit zu den CCRs. Ein Sequenzmotiv im N-terminalen Bereich, das in Abb. 18 mit „+“ gekennzeichnet ist, kommt mit kleinen Abwandlungen sowohl bei den CCRs als auch bei der DFR vor. Wie zuvor erwähnt (III.2.2) wird vermutet, daß diese Aminosäureabfolge eine Rolle bei der Bindung des Cosubstrats NAD(P) spielt (LACOMBE et al., 1997).

|        |     |                    |                          |                       |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|-----|--------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|------------|----------|-------|--------|---------|---------|------|-------|----|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LACCR1 | 1   | -----MPADSSSLPCHGQ | TVCVTGAGGFIASWIVKLLLD    | RGYSVKGTVRNPDD        |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 1   | -----MPVDASSLS     | QGGTICVTGAGGFIASWIVKLLLD | KGYTVRGTARNPAD        |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 1   | -----MPVDVASPA--   | GKTVCVTGAGGYIASWIVKILL   | RGYTVKGTVRNPDD        |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 1   | -----MLVD-----     | GKLVCVTGAGGYIASWIVKLLLD  | RGYTVRGTVRNP          |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 1   | MPTAEATTPVPP       | ELSSGQGR                 | TVCVTGAGGFIASWIVKRLLE | KGYTVRGTVRNPVD          |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 1   | -----MGSQ-----     | SETVCVTGASG              | FIGSWLVMRLL           | RGYTVRATVRDPTN          |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|        |     |                    | +++++                    |                       |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| LACCR1 | 49  | PKNA-HLRALEG       | ADERLTLCKADLLDYQ         | SLREAISGCQ            | GVFHTASPV---TDDPE       |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 49  | PKNS-HLRELEG       | AERLTLCKADLLDYE          | SLKEAIQGC             | DGVFHTASPV---TDDPE      |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 47  | PKNT-HLRELEG       | GKERLTLCKADLQ            | DYEALKA               | AIDGCDGVFHTASPV---TDDPE |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 42  | PKNN-HLREL         | QAKERLTLHSADLLD          | YEALCATID             | GCDGVFHTASPM---TDDPE    |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 56  | PKND-HLRAL         | DGAVDRLVLLRADLLD         | PQSLAEAF              | SGCDGVFHAASPV---TDDPE   |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 42  | VKKVKHLLDLP        | KAETHLTLWKADL            | ADEGSFDEAI            | KGCTGVFHVATPMD          | FESKDPE    |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| LACCR1 | 100 | -QMVEPAVE          | GTKNVINAAAEAK-           | VRRVFTSSIGAVY         | MDPNRSPD                | TVVDESCWSD |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 100 | -EMVEPAVNG         | TKNVIIAAAEAK-            | VRRVFTSSIGAVY         | MDPNKGP                 | DVVDESCWSD |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 98  | -QMVEPAVNG         | AKFVINAAAEAK-            | VKRVVITSSIGAVY        | MDPNRDP                 | EAVDESCWSD |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 93  | -TML               | EPAVNGAKFVIDAA           | AKAK-VKR              | VFTSSIGAVY              | MNPNRDTQAI | VDENCWSD |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 107 | -MMIEPA            | IRGTRYVMAA               | ADDAG-VKR             | VFTSSIGT                | VYMN       | PNYRDP   | SKP   | VDDT   | CWSD    |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 97  | NEVIKPT            | IEGMLGIMK                | SCAAAKT               | VRR                     | LVFTSS     | AGT      | VNI   | QEHQLP | --VY    | DESCWSD |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| LACCR1 | 153 | LEFCKNTKN---       | WYCYGKTVAEQA             | AWE                   | MAKEKEVD                | VVVN       | PV       | LV    | LG     | PLLQ    | STINA   |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 153 | LEFCKNTKN---       | WYCYGKVAEQA              | AWDMAKE               | KGVDL                   | VVVN       | PV       | LV    | LG     | PLLQ    | PTVNA   |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 151 | LD                 | FCKNTKN---               | WYCYGKMVAEQA          | AWE                     | TAK        | KGVDL    | VV    | LN     | PV      | LV      | LG   | PP    | LQ | PTINA |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 146 | LD                 | FCKNTKN---               | WYCYGKMLAEQ           | SAWE                    | TAK        | KGVDL    | VV    | LN     | PV      | LV      | LG   | PP    | LQ | SAINA |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 160 | LE                 | YCKNTQN---               | WYCYAKTVAE            | QGAWE                   | VARKR      | GLDL     | VVVN  | PV     | LV      | LG      | PLLQ | PTVNA |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 150 | MEFCRAK            | MTAWMYFV                 | SKTLAEQA              | AWKYAK                  | ENNID      | FIT      | IIP   | TLV    | VG      | PF      | IM   | SM    | PP |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|        |     |                    | *                        | ****                  |                         |            |          |       |        |         |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| LACCR1 | 205 | SITHILKYL          | TGSAKTYANSVQ-            | AYTHVKD               | VALSHIL                 | VFEN       | PSAAG    | RYL   | CAES   | VLH     |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 205 | SITHILKYL          | TGSAKTYANSVQ-            | AYVHVRD               | VALAHIL                 | VFET       | PSAS     | GRYL  | CS     | ES      | VLH     |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 203 | SLYHVLKYL          | TGSAKTYANLTQ-            | AYVDVRD               | VALAHV                  | LVYE       | APSAS    | GRYLL | AES    | ARH     |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 198 | SLVHILKYL          | TGSAKTYANLTQ-            | VYVDVRD               | VALGHV                  | LVYE       | APSAS    | GRYIF | AE     | TALD    |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 212 | STDHVMKYL          | TGSATTYVNA               | AQ-AYVHVRD            | VAE                     | AHVR       | VYE      | APHA  | HGRYI  | CAESTLH |         |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 205 | SLITALSP           | ITGNEAHYSI               | IRQ                   | QEVH                    | DDLC       | NAH      | YLF   | EN     | PKA     | EGRYI   | CS   | SHDCI |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| LACCR1 | 259 | RGEVVEILAK         | LFDPYPVPTKCS             | SDEKN                 | PRAKAYK                 | FS         | CQ       | KLK   | D      | L       | G       | L    | E     | F  | T     | P | A | K | Q | C | L | Y | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 259 | RGEVVEILAK         | FFPEYPIPTKCS             | SDEKN                 | PRKQ                    | PYKFS      | NQ       | KL    | R      | D       | L       | G    | F     | E  | F     | T | P | V | K | Q | C | L | Y | E |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 257 | RGEVVEILAK         | LFPEYPLPTKCK             | SDEKN                 | PRAKPYK                 | FTN        | Q        | K     | I      | K       | D       | L    | G     | L  | E     | L | T | S | T | K | Q | S | F | Y | D |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 252 | RGEVVEILAK         | FFPEYPLPTKCS             | SDEKN                 | PRAKPYK                 | FTT        | Q        | K     | I      | K       | D       | L    | G     | L  | E     | F | K | P | I | K | Q | S | L | Y | E |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 266 | RGDL               | CRVLAKLFPEY              | PVPTKCKD              | QVNP                    | PV         | VGYK     | FTN   | Q      | R       | L       | K    | D     | L  | G     | M | D | F | V | P | V | L | Q | C | L | Y | E |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 260 | ILD                | LAKMLREK                 | YPEYNIP               | TE                      | FKG-V      | DENL     | K     | S      | V       | C       | F    | S     | S  | K     | L | T | D | L | G | F | E | F | K | Y | S | L | E | D | M | F | T |
| LACCR1 | 314 | -TVTSLQEK          | GHLALPAS-----            | KQ                    | EE                      | P          | I        | K     | I      | Q       | S       | S    |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| PTCCR1 | 314 | -TVKSLQEK          | GHLPIP-----              | QA                    | EE                      | S          | L        | K     | I      | Q       | --      |      |       |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR1 | 312 | -TVKSLQEK          | GHLAPPPPP                | SASQ                  | ES                      | V          | E        | N     | G      | I       | K       | I    | G     | S  | -     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ATCCR2 | 307 | -SVKSLQEK          | GHLPLP-----              | Q                     | S                       | N          | Q        | E     | V      | I       | I       | E    | S     | -  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| ZMCCR2 | 321 | -TVTSLQEK          | GMLPVLP-----             | K                     | Q                       | D          | H        | Q     | L      | G       | K       | S    | --    |    |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| VVDFR  | 314 | GAVD               | TCRAKGL                  | LLPS-----             | H                       | E          | K        | P     | V      | D       | G       | K    | T     | -  |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

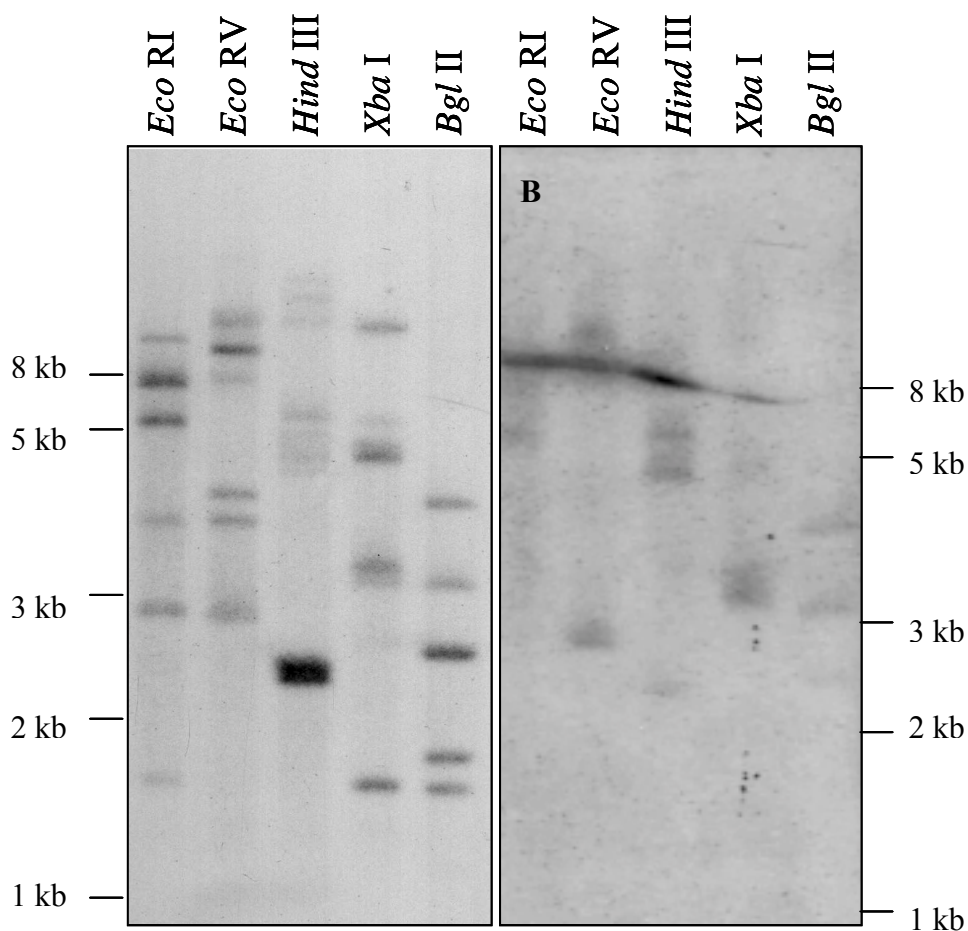
**Abb. 18:** Multipler Sequenzvergleich unterschiedlicher CCRs und einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR): LA = *L. album*, PT = *Populus trichocarpa*, AT = *Arabidopsis thaliana*, ZM = *Zea mays*, VV = *Vitis vinifera*

Mit „+“ wurde die putative NAD(P)-Bindedomäne, mit „\*“ die konservierte Sequenz „NWYCY“ gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind schwarz, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind grau unterlegt.

### III.4 Southern-Analyse

Um herauszufinden, ob es in *L. album* CCR-Isoformen gibt, wurden Southern-Transfers mit genomischer *L. album*-DNA durchgeführt, die entweder mit der gesamten CCR-cDNA (Abb. 19, A) oder mit einem Stück des 3'-untranslatierten Bereichs der CCR-cDNA (Abb. 19, B) (Abb. 17) hybridisiert wurden. Das Ergebnis der Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten Sonden wurde auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

Der Röntgenfilm von Membran A (Abb. 19) zeigt in allen Spuren komplexe Bandenmuster. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, daß es in *L. album* mehrere CCR-Isoformen gibt. Die aus der *L. album*-cDNA-Bank gewonnene CCR-cDNA wird von den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III und *Xba* I nicht, von *Bgl* II nur (II.2.8.3) einmal geschnitten. Das Bandenmuster kann also kaum aufgrund der Fragmentierung des CCR-Gens durch die



**Abb. 19:** Southern-Transfer-Analyse von genomischer DNA von *L. album* X4  
Genomische DNA wurde mit *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Xba* I und *Bgl* II geschnitten, auf 0,8 %igen Agarosegelen fraktioniert und auf Nylon-Membranen transferiert.

Membran A wurde mit der gesamten CCR-cDNA bei 68 °C, Membran B mit der 3'-untranslatierten Region der cDNA (Abb. 17) bei 64 °C hybridisiert.

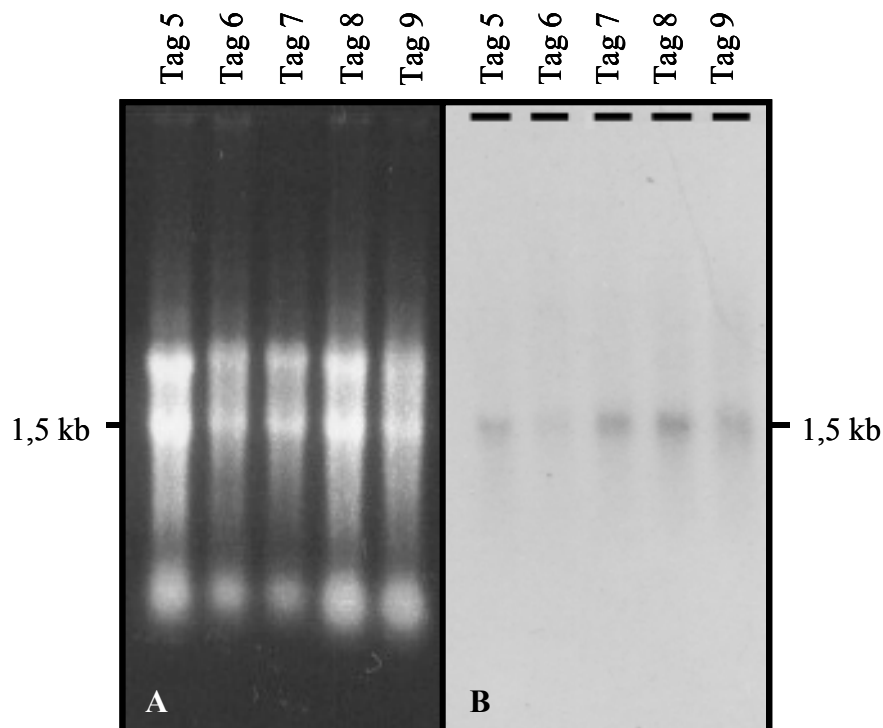
eingesetzten Enzyme erklärt werden, es sei denn, die Schnittstellen befänden sich alle in Introns. Die aus der gesamten CCR-cDNA bestehende Sonde könnte an alle Fragmente binden, die durch Schnitte in den Intronbereichen entstanden sind, solange die DNA-Stücke auch Exonsequenzen der CCR besitzen. Diese Hypothese konnte jedoch auf der cDNA-Ebene nicht untersucht werden, da die Intronsequenzen fehlen.

Der Vergleich mit dem Röntgenfilm von Membran B (Abb. 19), bei der der 3'-untranslatierte Bereich der CCR-cDNA als Sonde eingesetzt wurde, zeigt eine Abnahme der Bandenanzahl in den verschiedenen Spuren. Die untranslatierten Bereiche gelten als äußerst spezifisch für eine spezielle Genkopie. Aus diesem Grund sollte die 3'-UTR-Sonde nur an ein bestimmtes CCR-Gen binden. Da immer noch jeweils mehrere Banden in einer Spur sichtbar sind, kann man auf zusätzliche DNA-Bereiche schließen, die große Ähnlichkeiten mit der 3'-UTR der CCR haben. DNA-Fragmente, die aufgrund von Schnittstellen in den Introns entstanden waren, konnten mit der 3'-UTR-Sonde nicht detektiert werden, da unter der Voraussetzung vollständiger Restriktionshydrolysen die Sonde nur in einem kleinen Sequenzabschnitt binden konnte, der nicht mehrere Exon-Intron-Bereiche umfaßte. Das Verschwinden einiger Banden läßt jedoch wiederum auf mehrere CCR-Gene im *L. album* Genom schließen.

### III.5 Untersuchung zum Transkriptionslevel der CCR in *L. album*

Zur Untersuchung des Transkriptionslevels der CCR im Zeitraum des Kulturverlaufs, in dem das Enzym maximale spezifische Aktivitäten aufwies (III.1.3.5), wurde aus *L. album*-Suspensionskulturen vom 5. bis zum 9. Tag der Kulturperiode RNA isoliert (II.2.8.4). Für die RNA/DNA-Hybridisierung wurde als Sonde das radioaktiv markierte offene Leseraster der CCR-cDNA eingesetzt (II.2.8.6.1).

Das Gelfoto (Abb. 20, A) zeigt, daß die RNA-Mengen in den einzelnen Spuren nicht übereinstimmen. Daher ist es schwierig, eindeutige Aussagen über die Transkriptionsstärke der CCR zu machen. Betrachtet man den Röntgenfilm für die Membran des Northern-Transfers (Abb. 20, B), so erkennt man, daß an allen Untersuchungstagen ein Hybridisierungssignal bei etwa 1,5 kb auftritt. CCR-mRNA wurde also synthetisiert. Außerdem ist das Signal am 7. Tag eindeutig stärker als am 6. Kulturtag. Da an diesen beiden Tagen die aufgetragene RNA-Menge ungefähr gleich war (Abb. 20, A), kann man auf eine Zunahme der CCR-mRNA schließen. Des weiteren ist die Schwärzung auf dem Röntgenfilm am 7. Kulturtag ebenfalls intensiver als am 5. (Abb. 20, B), obwohl die eingesetzte RNA-Menge geringer war (Abb. 20, A). Dies spricht für eine höhere CCR-mRNA-Menge am 7. Kulturtag. Das Ergebnis des 8. Kulturtages ist schwierig zu interpretieren, denn die aufgetragene RNA-Menge war höher als am 6., 7. und 9. Tag, und die Schwärzung auf dem Röntgenfilm ist dementsprechend stärker. Die Transkriptmenge für die CCR war zwar eindeutig höher als am 5. Kulturtag, aber es läßt sich keine Aussage darüber machen, wie die Relation zum 7. und 9. Kulturtag war. Die Transkription des CCR-Gens scheint am 9. Kulturtag geringer zu sein als am 7. Tag, da das Hybridisierungssignal am 9. Tag etwas schwächer ist, obwohl das Gelfoto (Abb. 20, A) annähernd gleiche RNA-Mengen zeigt.



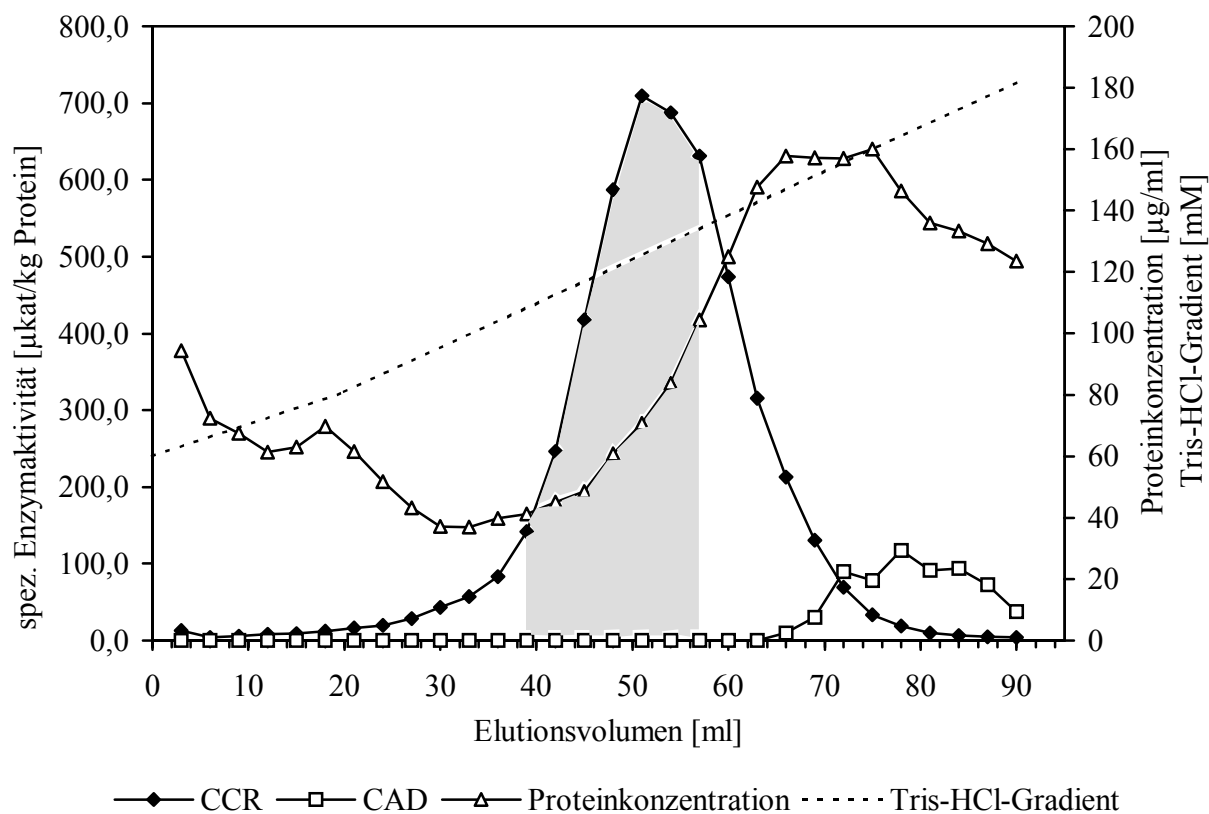
**Abb. 20:** A: 0,9 %iges Agarosegel für den Northern-Transfer  
 RNA aus *L. album* Zellsuspensionskulturen wurde jeweils am 5., 6., 7., 8. und 9. Kulturtag aus den Zellen isoliert und mit Hilfe einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt.  
 B: Nach dem Northern-Transfer des RNA-Gels (A) auf eine Nylonmembran wurde mit dem ORF der *L. album*-CCR-cDNA bei 64 °C hybridisiert. Das Hybridisierungsergebnis wurde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### III.6 Gewinnung der Enzymextrakte für die Untersuchung der CCR aus *L. album*-Suspensionskulturen

Im Rahmen einer Diplomarbeit (WINDHÖVEL, 1998) war bereits die Methodik zur Herstellung eines Proteinextrakts zur Untersuchung der CCR etabliert worden. Dabei wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt (II.1.3), die es jedoch nicht ermöglichte, die CAD, die sich auf die Analyse der Enzymtests störend auswirkte, zuverlässig von der CCR zu trennen. Daher wurde die CCR mit Hilfe einer DEAE-Sephacel-Anionenaustauscher-Chromatographie von der CAD gereinigt (II.1.4). Zur Elution des Proteins wurde ein Tris-HCl-Gradient pH 7,5 verwendet. Die CCR wurde in einem Bereich von 95 bis 160 mM Tris, die CAD ab 145 mM Tris von der Säule gewaschen (Abb. 21). Die höchsten spezifischen CCR-Aktivitäten wurden in der Anstiegsphase der Gesamtproteinkonzentration gemessen. Das Proteinmaximum wurde erst in den Elutionsfraktionen erreicht, in denen die CCR-Aktivität wieder abfiel und die der CAD anstieg. Für die anschließende Einengung des Enzymextrakts mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren wurden nur diejenigen Fraktionen vereinigt, die CCR- aber keine CAD-Aktivität aufwiesen (Abb. 21, grau unterlegter Bereich). Der CAD-Anteil des zu reinigenden Proteinextrakts konnte variieren, da die vorhergehende

Ammoniumsulfatfällung immer einer gewissen Schwankungsbreite unterworfen war und weil sich die Zellkulturen in ihrer Stoffwechselaktivität nicht immer konstant verhielten. Aus diesem Grund fielen die CAD-Aktivitäten im Elutionsprofil von einer Aufreinigung zur nächsten unterschiedlich hoch aus. Manchmal konnten überhaupt keine CAD-Aktivitäten in den eluierten Fraktionen nachgewiesen werden.

In Tabelle 8 ist ein Beispiel für einen Aufreinigungsprozeß der CCR dargestellt. Da der Rohextrakt generell keine zuverlässigen CCR-Aktivitäten lieferte, manchmal konnte in ihm überhaupt keine CCR nachgewiesen werden, wurde die Gesamtaktivität des gefällten Extrakts gleich 100 % gesetzt und diente als Referenzwert zur Berechnung der erlangten Aktivitätsausbeuten in den weiteren Reinigungsstufen. Auch bei der Bestimmung des Reinigungsfaktors wurde die spezifische CCR-Aktivität des gefällten Extrakts als Bezugswert gewählt. Wie ungenau die Meßwerte im Rohextrakt sind, zeigt sich darin, daß die Gesamtaktivität nur etwa 7 % der im gefällten Extrakt bestimmten Aktivität beträgt, obwohl aufgrund der bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung auftretenden Enzym-Verluste der Wert im Rohextrakt höher sein sollte als in der gefällten Proteinlösung. Auch innerhalb der anderen Reinigungsstufen traten Schwankungen auf. So konnte beim Schritt vom gefällten zum über DEAE-Sephacel gereinigten Extrakt eine 5 bis 10 fache Aufreinigung erzielt werden.



**Abb. 21:** Anionenaustauschchromatographie von Protein einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (30 – 45 %) über eine DEAE-Sephacel-Säule  
Der Elutionsbereich, der die Fraktionen mit CCR-Aktivität enthielt, die gereinigt wurden, ist grau unterlegt.



| Extrakt                    | Gesamtprotein [mg] | Gesamtaktivität [pkat] | spez. CCR-Aktivität [ $\mu$ kat/kg] | Reinigungsfaktor [x-fach] | Ausbeute an Gesamtaktivität [%] |
|----------------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Rohextrakt                 | 103,4              | 279,2                  | 2,7                                 | -                         | -                               |
| nach Ammoniumsulfatfällung | 29,6               | 3794,7                 | 128,2                               | -                         | 100                             |
| nach DEAE-Sephacel         | 2,5                | 1483,8                 | 593,5                               | 4,6                       | 39,1                            |
| nach Konzentration         | 0,9                | 595,9                  | 662,1                               | 5,2                       | 15,7                            |

**Tab. 8:** Aufreinigungsschema der CCR

### III.7 Heterologe Expression der CCR aus *L. album* im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS

Um das Ergebnis des Sequenzvergleichs (III.3), daß die in der *L. album*-cDNA-Bank gefundene cDNA für eine CCR codierte, zu bestätigen, wurde das offene Leseraster der putativen CCR-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A über die Restriktionsschnittstellen *Nco* I und *Xba* I kloniert.

Zu diesem Zweck wurde der ORF mittels PCR amplifiziert, wobei die Oligonukleotide CCRLA 118F und CCRLA 1143R (II.3.8) Verwendung fanden. Beim Entwurf der Primersequenzen wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen angehängt. Zum Einführen einer *Nco* I-Erkennungsregion am Startcodon mußte bei CCRLA 118F das für die Aminosäure Prolin codierende Triplet „CCG“ gegen ein Valin (GTG) ausgetauscht werden.

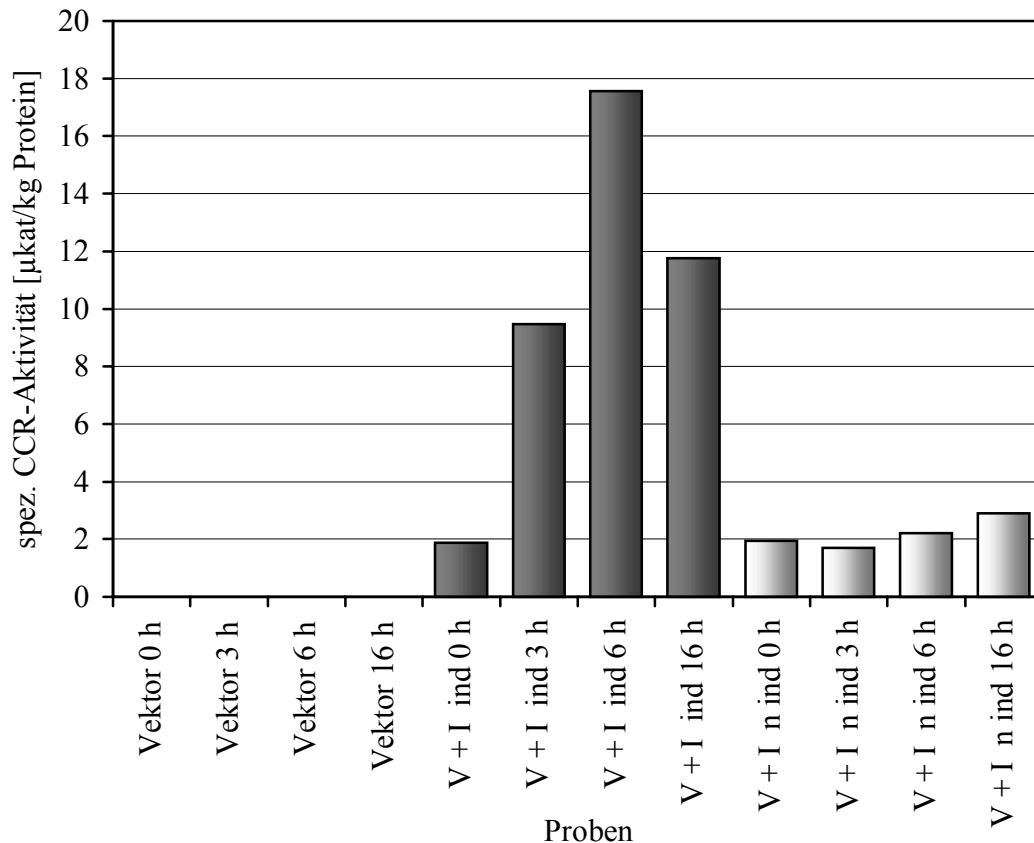
#### III.7.1 Optimierung der Induktionsdauer

Die Dauer der Bakterienkultivierung nach der Induktion mit IPTG sollte im Hinblick auf eine möglichst hohe CCR-Aktivität bei praktikablen Induktionsdauern optimiert werden (II.2.10.2.1). Die höchste spezifische CCR-Aktivität wies der Bakterienrohextrakt innerhalb der gewählten Zeiträume nach einer Inkubationsdauer von 6 h nach der Induktion auf (Abb. 22). Bei einer Inkubation von 16 h nahm die spezifische CCR-Aktivität wieder ab. Bei den Meßwerten zu den Proteinmengen der Bakterienrohextrakte war bis zu einer Inkubationszeit von 6 h ein Anstieg zu verzeichnen. Die Proteingehalte nach 6 und 16 h waren nahezu gleich.

Das Kontrollexperiment mit dem Expressionsstamm, der zwar den Vektor pTrc99A, jedoch nicht den ORF der CCR enthielt, zeigte, daß BL21(DE3)pLysS keine zelleigene CCR besitzt, d.h. daß die gemessene Enzymaktivität auf das heterolog exprimierte Protein zurückgeführt werden kann.

Der Kontrollversuch mit den nicht induzierten Bakterien, die das vollständige Konstrukt aus

Expressionsvektor und Insertion beinhalteten, ergab geringe CCR-Aktivitäten (1,9 - 2,9  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein) in den Extrakten der unterschiedlich lang inkubierten Bakterien. Diese waren in ihrer Höhe mit dem Nullwert (1,9  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein) der induzierten Bakterienkultur vergleichbar. Die CCR wurde also auch ohne Induktion ständig in geringem Maße exprimiert.



**Abb. 22:** Optimierung der Induktionsdauer zur Expression der *L. album*-CCR in *E. coli* BL21(DE3)pLysS: Die Bakterienkulturen wurden 0, 3, 6 und 16 h inkubiert. Kontrollexperimente, bei denen die Bakterien nur den Expressionsvektor ohne Insertion (Vektor) enthielten, und bei denen BL21(DE3)pLysS das vollständige Konstrukt besaß, aber nicht induziert wurde (V + I n ind), wurden parallel zum Induktionsversuch (V + I ind) durchgeführt. (V = Vektor, I = Insertion, ind = induziert, n ind = nicht induziert)

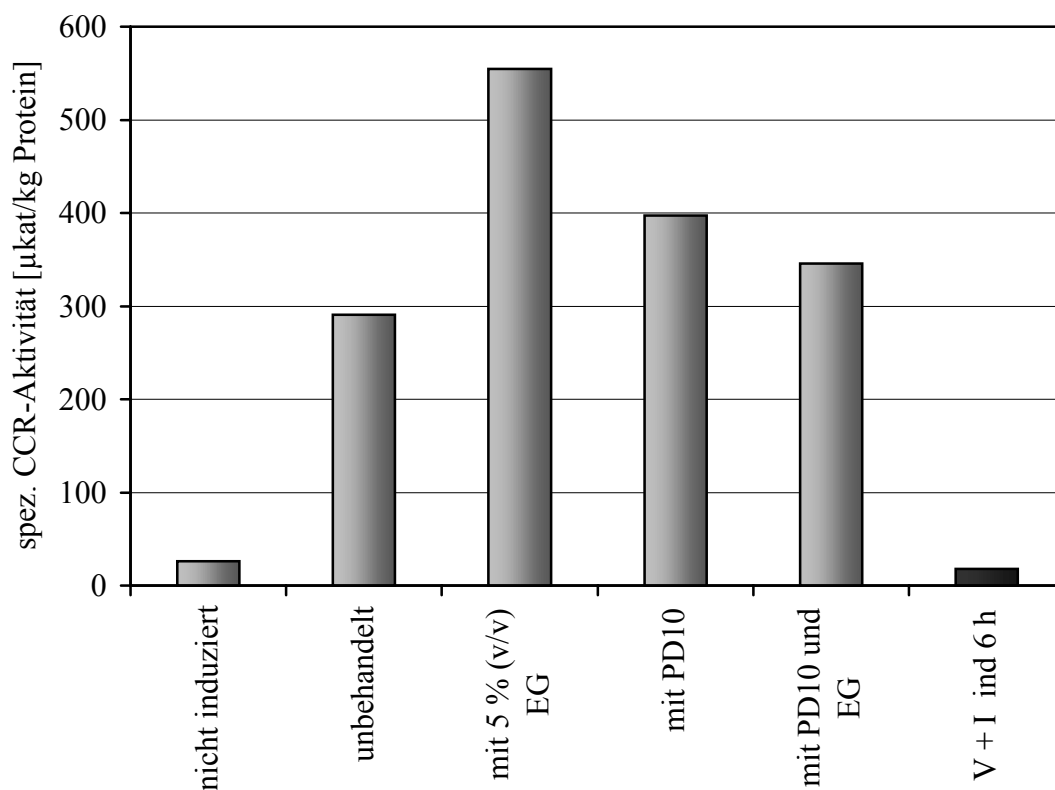
### III.7.2 Stabilisierung des Enzymrohextrakts

Die aus den Bakterien gewonnenen Rohextrakte wiesen nur geringe CCR-Aktivitäten auf (III.7.1). Dies war teilweise auf das Ausflocken des Proteins nach dem Auftauen (die Extrakte wurden zur Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren), aber auch auf unzureichenden Aufschluß der Zellen bei der Ultraschallbehandlung zurückzuführen. Daher wurden Experimente zur Stabilisierung der Enzymextrakte und zur Steigerung der CCR-Aktivitäten durchgeführt.

Die Dauer des Bakterienaufschlusses mittels Ultraschall wurde von 4 Intervallen zu je 15 s (II.2.10.2.1) auf 5 Intervalle zu jeweils 30 s erhöht. Der positive Effekt des gründlicheren

Aufschlusses ist ersichtlich, wenn man der spezifischen CCR-Aktivität des unbehandelten Rohextraktes (ohne Ethylenglykol-Zusatz und/oder Sephadex PD-10 Säulen-Reinigung) (Abb. 23) die Aktivität des aus 6 h inkubierten, induzierten Bakterien gewonnenen Extraktes aus III.7.1 (Abb. 22) als Referenzwert zugrunde legt. Obwohl die Kultivierungsbedingungen der Zellen vergleichbar waren, konnte die Enzymaktivität von 17,6  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein auf 290,6  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein um das 16,5-fache gesteigert werden.

Eine weitere Steigerung war durch den Zusatz von 5 % (v/v) Ethylenglykol und durch Reinigung des Rohextraktes mittels Gelfiltration über eine Sephadex PD-10 Säule zu verzeichnen, wobei die besseren Ergebnisse durch den Zusatz des Ethylenglykols erzielt wurden (554,7  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein mit Ethylenglykol, 397  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  Protein mit Sephadex PD-10). Die Kombination aus Additiv und Gelfiltration ergab keine weitere Steigerung der CCR-Aktivität. Alle *E. coli*-Extrakte, die in weiteren Experimenten Verwendung fanden, wurden zur Stabilisierung mit Ethylenglykol versetzt.



**Abb. 23:** Stabilisierung der heterolog exprimierten CCR

Zum Vergleich wurde der CCR-Aktivitätsbalken für den aus 6 h inkubierten, induzierten Bakterien gewonnenen Extrakt (V + I ind 6 h) aufgetragen (III.7.1, Abb. 22).

EG = Ethylenglykol

PD10 = Extrakt wurde über eine Sephadex PD-10 Säule gereinigt

### III.8 Vergleichende Charakterisierung der aus *L. album*-Suspensionskulturen extrahierten und der heterolog exprimierten CCR

Die optimalen Testbedingungen für die CCR aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen wurden bestimmt und mit den ermittelten Charakteristika der heterolog exprimierten CCR verglichen. Es ist möglich, daß es in *L. album* ebenso mehrere Isoformen der CCR gibt wie in *Zea mays* (PICHON et al., 1998) oder *Arabidopsis thaliana* (LAUVERGEAT et al., 2001), die unterschiedliche Substratspezifitäten, pH- und Temperatur-Optima besitzen könnten. Die Charakterisierungsexperimente sollten Aufschluß darüber geben, ob es sich bei der im *E. coli*-Stamm exprimierten CCR tatsächlich um dasselbe Enzym handelte wie im Pflanzenzellextrakt oder ob es ein Isoenzym der CCR war, das in den Enzymtests mit dem pflanzlichen Zellextrakt nicht in Erscheinung tritt bzw. keine entscheidende Rolle spielt. Da der Pflanzenzellextrakt angereinigt wurde, kann es sein, daß Isoenzyme dabei beseitigt wurden.

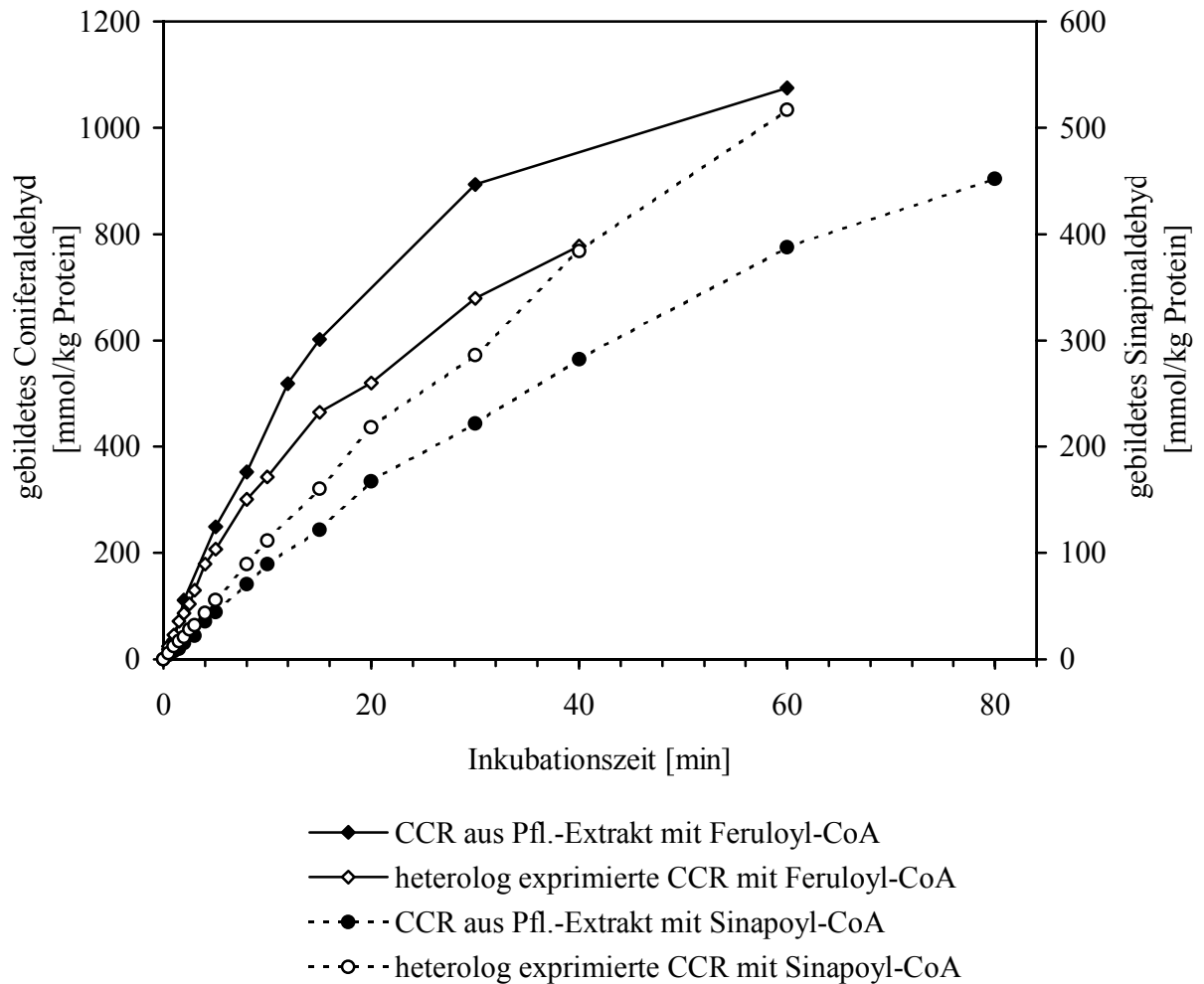
In den folgenden Kapiteln werden exemplarisch Kurvenverläufe gezeigt, die sich für das jeweils untersuchte CCR-Charakteristikum als typisch erwiesen. Die Experimente zur Bestimmung der Zeit- und Proteinabhängigkeiten sowie der Temperatur- und pH-Optima wurden in mindestens zwei, die  $K_M$ -Wert-Messungen in drei unabhängigen Testreihen, die jeweils aus Doppelproben bestanden, durchgeführt. Bei der  $K_M$ -Wert-Bestimmung mit dem gereinigten pflanzlichen Extrakt und Sinapoyl-CoA wurden zwei Meßreihen erstellt.

Durch das Anfertigen von Nullproben, bei denen die Essigsäure vor dem Reaktionsstart mit NADPH zugesetzt wurde, konnte ausgeschlossen werden, daß in den Versuchsansätzen vor Reaktionsbeginn bereits Produkt vorhanden war.

#### III.8.1 Zeitabhängigkeit

Die Bestimmung der Abhängigkeit der durch die CCR katalysierten Produktbildung von der Inkubationszeit ist bei der eingesetzten diskontinuierlichen Meßtechnik ein notwendiger Vorversuch für die Ermittlung von  $K_M$ -Werten, pH- und Temperatur-Optima. Es mußte für die unterschiedlichen Extrakte mit den verschiedenen Substraten jeweils derjenige Zeitbereich gefunden werden, in dem die gebildete Produktmenge proportional zur Inkubationszeit anstieg.

Beim *L. album*-Zellextrakt befand sich der lineare Bereich mit Feruloyl-CoA zwischen 0 und 12 min, mit Sinapoyl-CoA zwischen 0 und 20 min (Abb. 24). Bei Verwendung des *E. coli*-Rohextrakts im Testansatz verhielt sich die Produktbildung mit Feruloyl-CoA bis 5 min und mit Sinapoyl-CoA bis 20 min proportional zur Inkubationszeit. In den folgenden Experimenten wurde die Inkubationszeit so gewählt, daß sie innerhalb der jeweiligen linearen Bereiche lag, da bei einer zu langen Inkubationsdauer die ermittelten Enzymaktivitäten fälschlicherweise zu niedrig ausfallen. Bei den  $K_M$ -Wert-Bestimmungen wurden die Inkubationszeiten verkürzt, damit sich geringe Substratmengen nicht limitierend auf die CCR-Aktivität auswirkten.



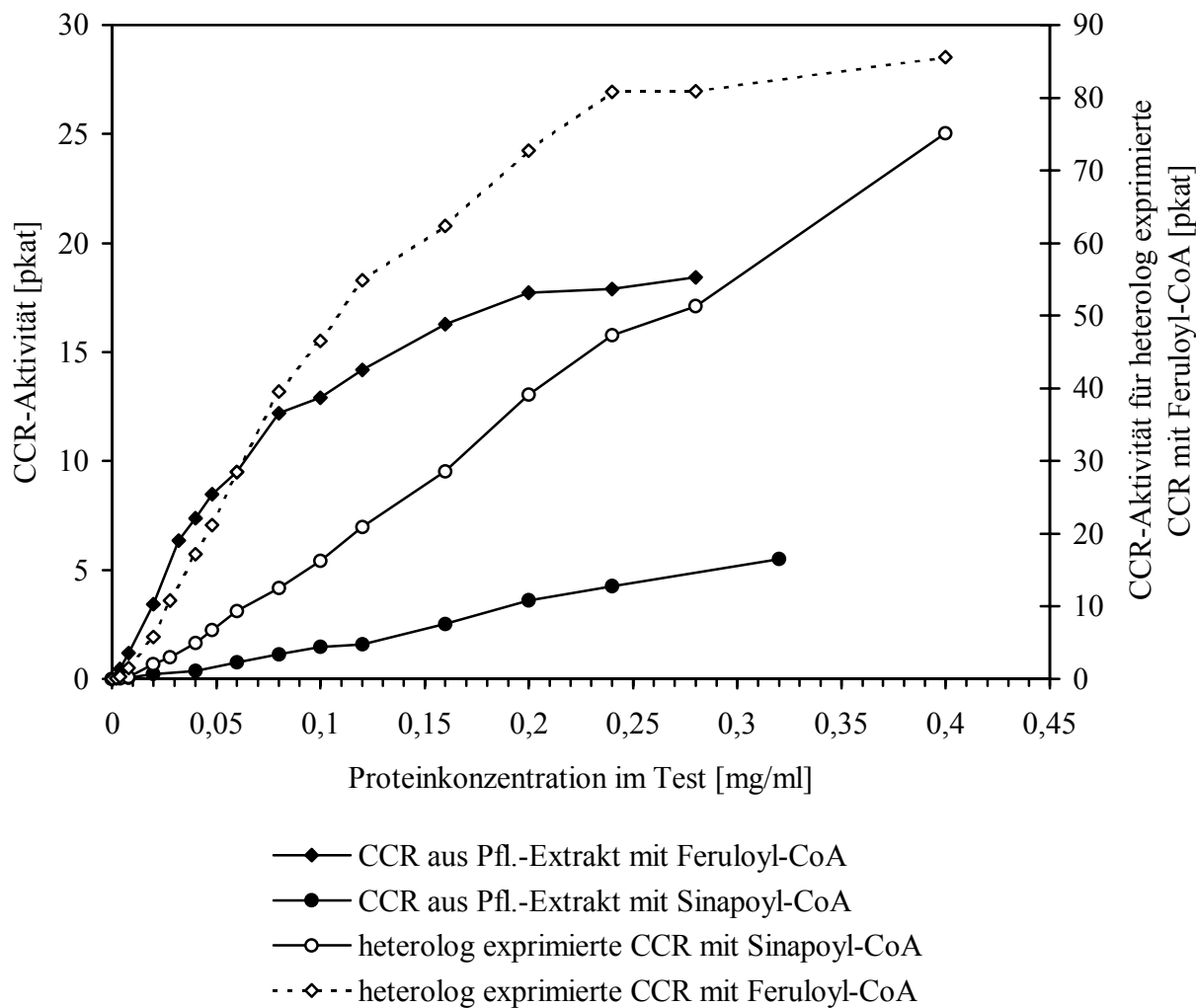
**Abb. 24:** Zeitabhängigkeit des aus *L. album*-Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts (Pfl.-Extrakt) im Vergleich zu der heterolog in *E. coli* exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA

### III.8.2 Proteinabhängigkeit

Die Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der im Test eingesetzten Proteinmenge zählt genauso wie die Untersuchung der Zeitabhängigkeit (III.8.1) zu den notwendigen Experimenten, die der Ermittlung von  $K_M$ -Werten, pH- und Temperatur-Optima vorausgehen. Es mußte in der graphischen Darstellung der lineare Bereich gefunden werden, in dem die CCR-Aktivität proportional zur Proteinmenge im Testansatz anstieg.

Mit Sinapoyl-CoA als Substrat erstreckte sich der lineare Bereich beim *L. album*-Zellextrakt mindestens bis 0,32 mg/ml, beim *E. coli*-Extrakt wenigstens bis 0,4 mg/ml. Es war bei diesen Proteinkonzentrationen noch kein Abflachen der CCR-Aktivitätskurven zu erkennen (Abb. 25).

Bei Verwendung von Feruloyl-CoA war die Zunahme der CCR-Aktivität mit der pflanzlichen Enzymlösung bis 0,04 mg/ml, mit dem Bakterienrohextrakt bis 0,08 mg/ml proportional zur eingesetzten Proteinkonzentration.

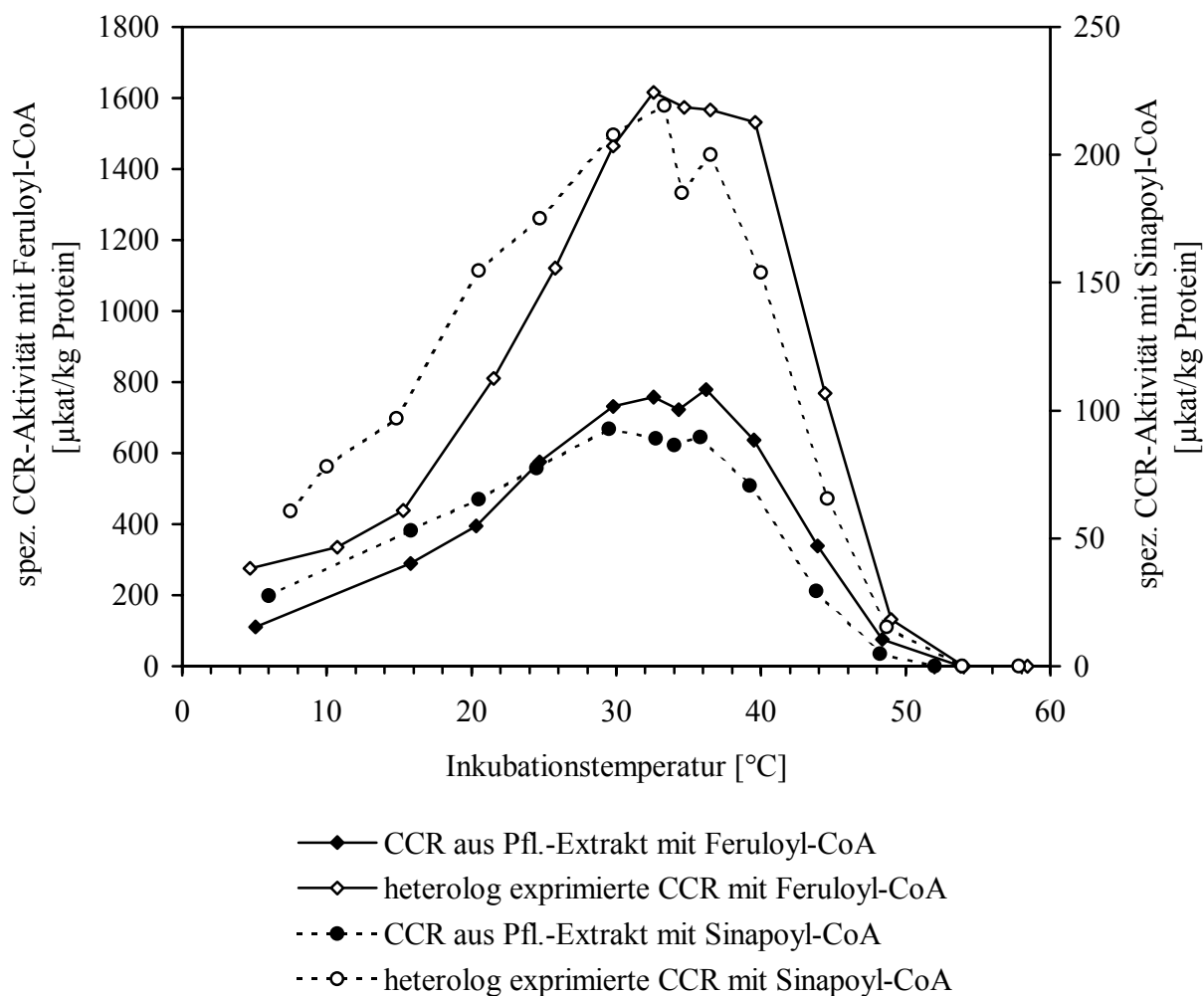


**Abb. 25:** Proteinabhängigkeit des aus *L. album*-Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts (Pfl.-Extrakt) im Vergleich zu der heterolog in *E. coli* exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA

### III.8.3 Temperaturabhängigkeit

Das Temperaturoptimum lag bei beiden Enzymextrakten mit Sinapoyl-CoA zwischen 28 °C und 38 °C. Während die CCR im *L. album*-Zellextrakt mit Feruloyl-CoA als Substrat ebenfalls in diesem Temperaturbereich maximale Aktivität aufwies, befand sich das Optimum mit dem *E. coli*-Extrakt zwischen 30 °C und 40 °C (Abb. 26).

Alle weiteren CCR-Experimente wurden bei 35 °C inkubiert. Da diese Temperatur inmitten des optimalen Bereichs liegt, sollte die Gefahr der Enzymdenaturierung vernachlässigbar sein.



**Abb. 26:** Temperatur-Abhängigkeit des aus *L. album*-Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts (Pfl.-Extrakt) im Vergleich zu der heterolog in *E. coli* exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA

### III.8.4 pH-Abhängigkeit

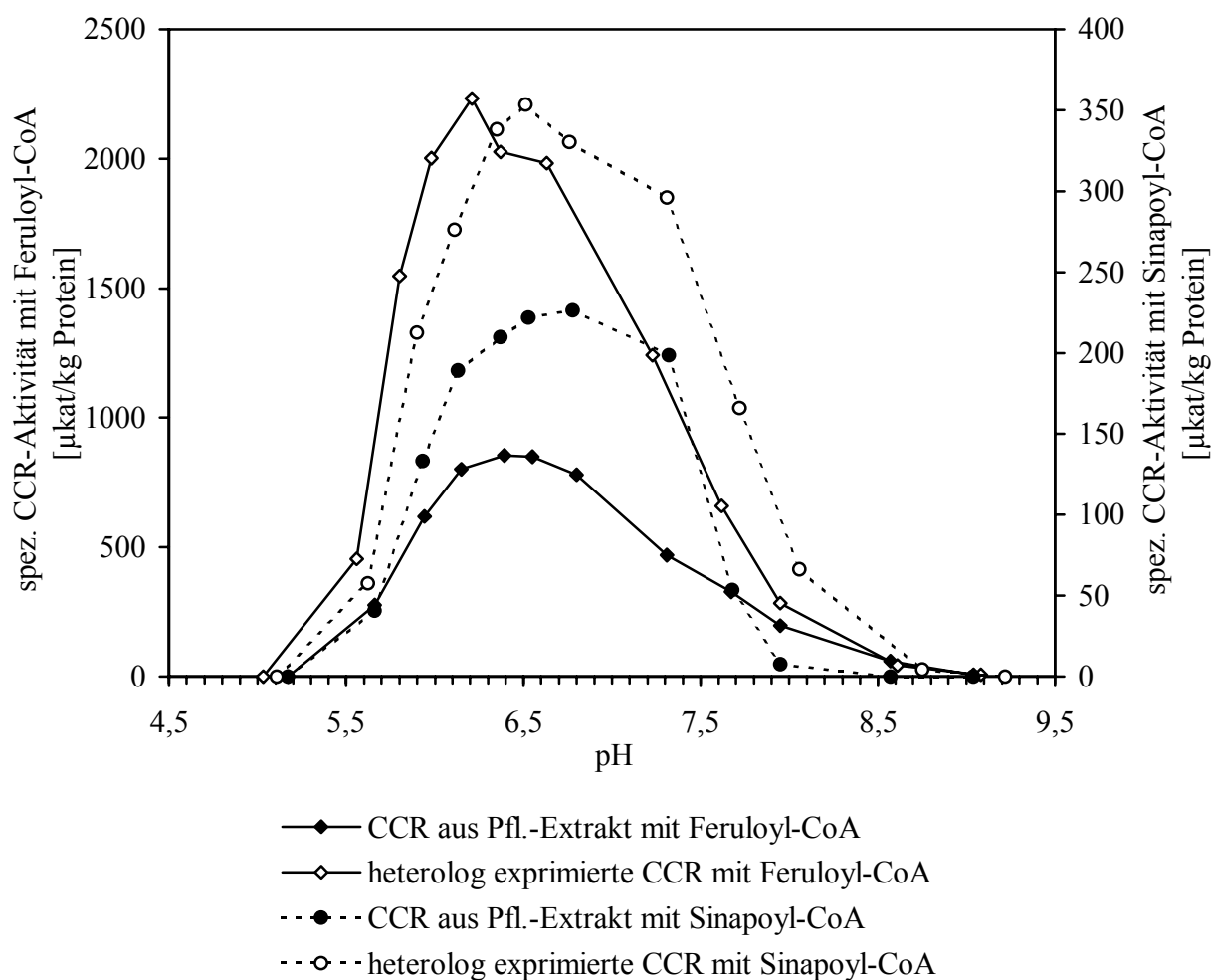
Die pH-Abhängigkeit der CCR wurde in einem Puffersystem aus KPi und Na<sub>2</sub>-EDTA/NaOH in einem Bereich zwischen pH 5,0 und pH 9,0 untersucht. Die tatsächlichen pH-Werte wurden direkt im Testansatz mit Hilfe einer pH-Elektrode bestimmt. Die pH-Optima der Enzymextrakte lagen mit Feruloyl-CoA als Substrat zwischen pH 6,0 und pH 6,7. Mit Sinapoyl-CoA waren sie etwas mehr ins Basische verschoben und befanden sich zwischen pH 6,3 und pH 7,4 (Abb. 27). Die beiden unterschiedlich gewonnenen Proteinextrakte zeigten demnach für das jeweilige Substrat in denselben pH-Bereichen optimale CCR-Aktivitäten.

Als problematisch erwies sich die hohe DTT-Konzentration (5 mM) im *E. coli*-Rohextrakt bei der Ermittlung des pH-Optimums mit Feruloyl-CoA als Substrat, da der CoA-Ester mit dem DTT reagieren konnte, was sich dadurch bemerkbar machte, daß auf dem HPLC-Chromatogramm ein neuer bisher unbekannter „Peak“ erschien. Dieses Produkt wurde bereits bei GROSS und KREITEN (1975) als Feruloyl-Dithiothreitol beschrieben. Die Reaktion der beiden Testkomponenten war um so größer, je basischer das Testmilieu wurde. Es konnte

aber anhand einer Zeitreihe, bei der die Enzymtests unterschiedlich lange inkubiert wurden, festgestellt werden, daß trotz dieser Reaktion so viel Substrat für die CCR im Testansatz verblieb, daß die Enzymaktivität nicht durch Mangel an Feruloyl-CoA limitiert wurde. Dennoch kann eine geringe Verminderung der CCR-Aktivität durch weniger zur Verfügung stehendes Substrat nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Dagegen spricht, daß der Kurvenverlauf mit dem Resultat für den *L. album*-CCR-Extrakt mit Feruloyl-CoA als Substrat übereinstimmt. Bei dem Pflanzenzellextrakt wurde die Reaktion zwischen DTT und CoA-Ester nicht festgestellt, da nur 0,5 mM DTT in der Proteinlösung vorlag.

Es konnte bei dem Bakterienrohextrakt auch keine Abhilfe durch Einsatz geringerer DTT-Mengen oder durch Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol anstelle des DTTs geschaffen werden, da die CCR-Aktivitäten stark vermindert wurden.

In den anderen Experimenten zur Charakterisierung der CCR wurde ein Puffersystem mit einem pH-Wert von 6,0 verwendet, was im Testansatz einem Wert von etwa pH 6,1 entsprach. Bei diesem pH-Wert war eine Reaktion von DTT und Feruloyl-CoA nicht nachweisbar.



**Abb. 27:** pH-Abhängigkeit des aus *L. album*-Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts (Pfl.-Extrakt) im Vergleich zu der heterolog in *E. coli* exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA



### III.8.5 Aktivitätsexperimente mit Caffeoyle-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA

Eine eindeutige Aussage, ob die CCR in *L. album* Caffeoyle-CoA oder *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat verwerten kann, war nicht möglich, da Caffeoylealdehyd und *p*-Cumaraldehyd nicht als Standards für die HPLC-Analyse verfügbar waren. Die beiden Aldehyde waren weder kommerziell erhältlich, noch konnten sie in angemessenem Aufwand chemisch synthetisiert werden, da sie äußerst instabil sind.

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme von Enzymtests mit denen von Nullproben (II.1.5) ergab ebensowenig eindeutige Ergebnisse wie ein Vergleich mit den chromatographierten Substraten. Auf den Chromatogrammen waren keine Signale zu sehen, die als Produkt-„Peaks“, die aus den enzymatischen Umsetzungen der beiden CoA-Ester stammten, in Frage kamen.

### III.8.6 $K_M$ -Wert-Bestimmung für Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und NADPH

Der  $K_M$ -Wert entspricht der Substratkonzentration, bei der die Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit beträgt (WILSON u. GOULDING, 1991). Er ist somit ein Maß dafür, wie hoch die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat ist. Bei der von der CCR katalysierten Umwandlung eines Cinnamoyl-CoA-Esters in einen Zimtaldehyd handelt es sich um eine Reaktion 2. Ordnung, da als Cosubstrat NADPH benötigt wird. Da die Michaelis-Menten-Kinetik nur für Reaktionen 1. Ordnung gilt, wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß bei der  $K_M$ -Wert-Bestimmung immer eines der beiden Substrate in Sättigung vorlag. Auf diese Weise wurde eine Reaktion Pseudo-1. Ordnung geschaffen, auf die sich die Michaelis-Menten-Gleichung anwenden läßt.

Die ermittelten  $K_M$ -Werte der CCR für Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und NADPH bei Verwendung der aus *L. album* gewonnenen Proteinlösung oder des *E. coli*-Rohextrakts im Versuchsansatz sind in Tabelle 9 bzw. 10 aufgeführt. Die Affinitätskonstanten wurden mit Hilfe unterschiedlicher graphischer Verfahren ermittelt, die die Meßwerte eines Experiments verschieden stark gewichten. Aus diesem Grund variieren die Resultate bei den eingesetzten Auswertungsmethoden.

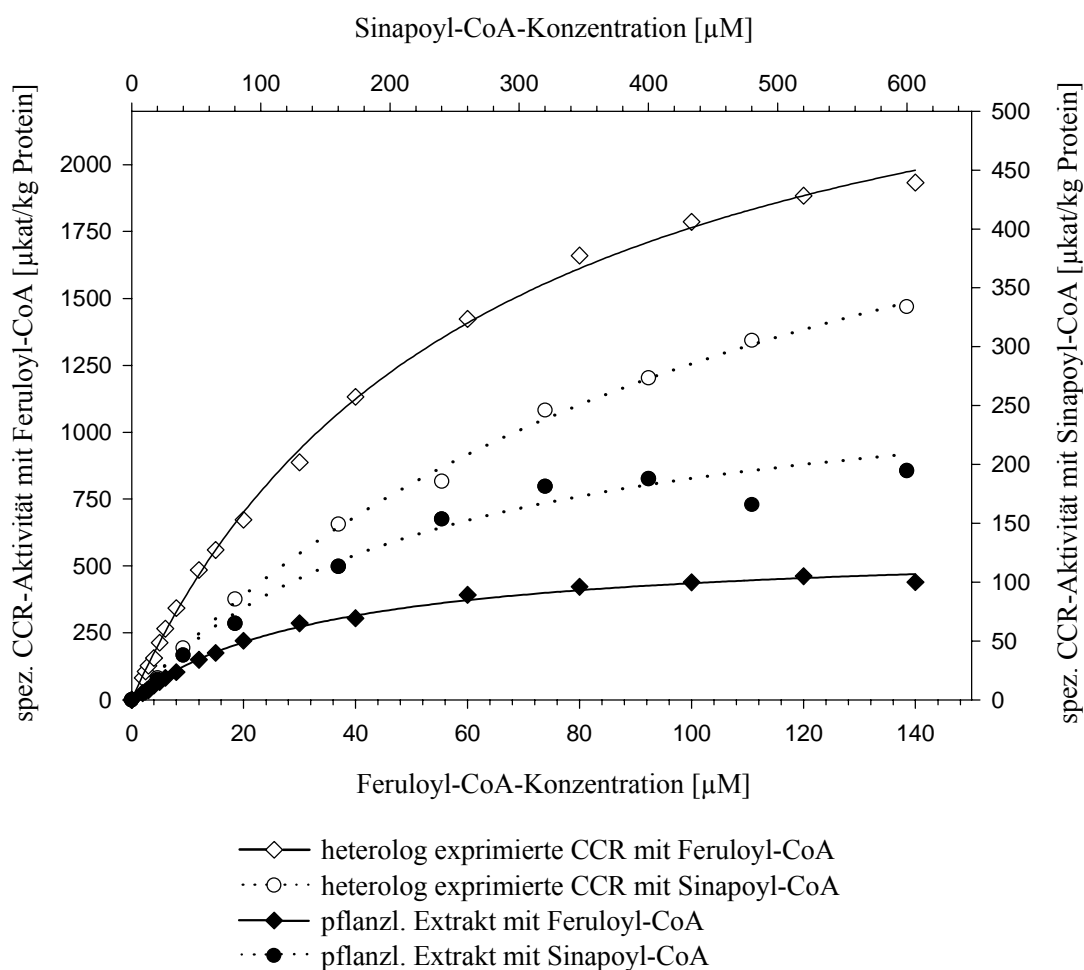
Die Bestimmung der  $K_M$ -Werte aus der graphischen Darstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 28 und 29) ist mit der Schwierigkeit verbunden, die maximale Geschwindigkeit

|                         | Michaelis-Menten | Lineweaver-Burk | Hanes        |
|-------------------------|------------------|-----------------|--------------|
| Feruloyl-CoA [ $\mu$ M] | $39 \pm 13$      | $58 \pm 9$      | $45 \pm 11$  |
| NADPH [ $\mu$ M]        | $34 \pm 8$       | $31 \pm 4$      | $31 \pm 7$   |
| Sinapoyl-CoA [ $\mu$ M] | $479 \pm 50$     | $279 \pm 38$    | $331 \pm 89$ |

**Tab. 9:** Gemittelte Resultate der  $K_M$ -Wert-Bestimmung mit pflanzlichem Zellextrakt mit Standardabweichungen

|                                | Michaelis-Menten | Lineweaver-Burk | Hanes        |
|--------------------------------|------------------|-----------------|--------------|
| Feruloyl-CoA [ $\mu\text{M}$ ] | $63 \pm 3$       | $93 \pm 11$     | $66 \pm 9$   |
| NADPH [ $\mu\text{M}$ ]        | $27 \pm 4$       | $32 \pm 4$      | $30 \pm 5$   |
| Sinapoyl-CoA [ $\mu\text{M}$ ] | $568 \pm 104$    | $565 \pm 70$    | $571 \pm 85$ |

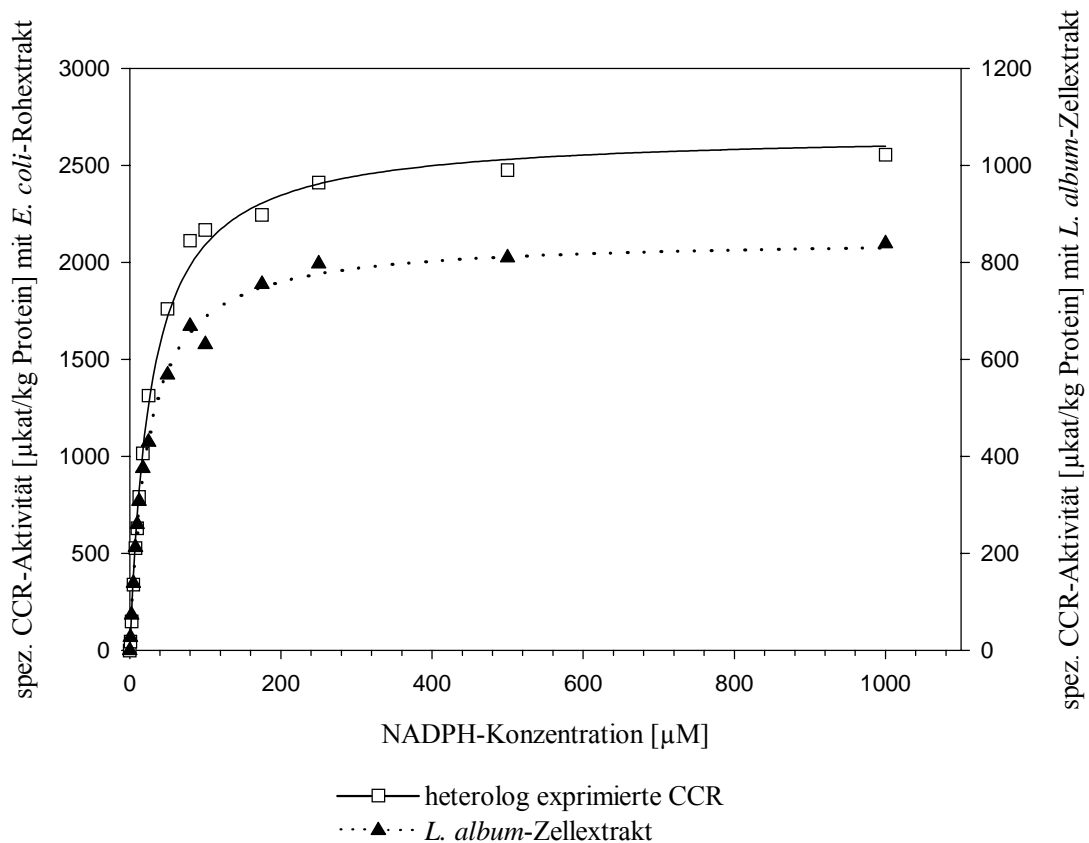
**Tab. 10:** Gemittelte Resultate der  $K_M$ -Wert-Bestimmung mit der in *E. coli* heterolog exprimierten *L. album*-CCR mit Standardabweichungen



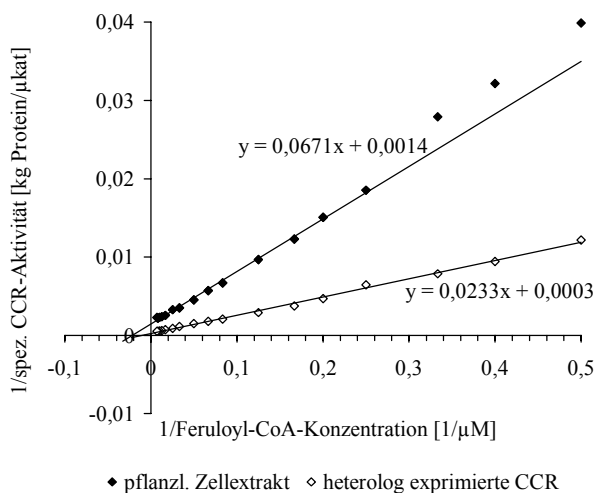
**Abb. 28:** Michaelis-Menten-Kinetiken für Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA bei Verwendung der in *E. coli* heterolog exprimierten CCR und der aus den *L. album*-Zellsuspensionskulturen gewonnenen Proteinlösung

( $V_{\max}$ ) bzw. die höchste spezifische Enzymaktivität festzustellen, da sich die Kurve asymptotisch dem Maximalwert nähert. Aus diesem Grund wurde hier eine computergestützte Auswertung der Versuchsdaten mit dem Programm „Grafit“ (Version 3.01, Erithacus Soft-

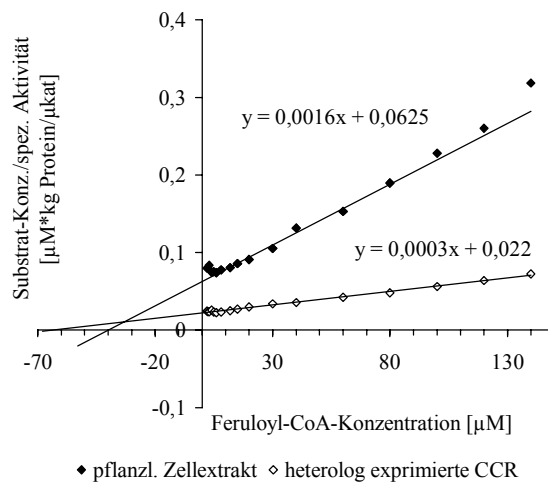
ware Ltd.) vorgenommen, bei der  $V_{\max}$  und  $K_M$  über die mathematische Funktion der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt wurde. Bei der Verwendung hoher Feruloyl-CoA-Konzentrationen von über  $140 \mu\text{M}$  in Experimenten mit dem pflanzlichen Zellextrakt trat eine Substrathemmung auf, so daß der theoretische Wert für  $V_{\max}$  nicht erreicht werden konnte. Dies läßt sich in Abb. 28 bereits erahnen, da die spez. CCR-Aktivität bei  $140 \mu\text{M}$  Feruloyl-CoA wieder ein wenig abnimmt. Experimente mit darüber hinausgehenden Substratkonzentrationen zeigten einen weiteren Rückgang der spezifischen Enzymaktivitäten (nicht abgebildet). Die Michaelis-Menten-Funktion berücksichtigt solche durch Substrathemmung hervorgerufenen Abweichungen nicht. Sie wurden bei der Bestimmung des  $K_M$ -Wertes vernachlässigt. Ob es bei beiden Enzymextrakten und allen Substraten zu Inhibitionserscheinungen kommt, wurde nicht untersucht. Die Produktausbeute bei der CoA-Ester-Synthese (II.1.2) fiel nicht immer gleich gut aus, so daß dadurch der Einsatz hoher Substratkonzentrationen eingeschränkt wurde. Zudem wurde die Auswertung der HPLC-Chromatogramme von Enzymtests mit hohen Sinapoyl-CoA-Konzentrationen durch eine unbefriedigende Probenauftrennung erschwert. Durch Änderung des Säulensystems konnte dieses Problem zum Teil beseitigt werden (II.1.7).



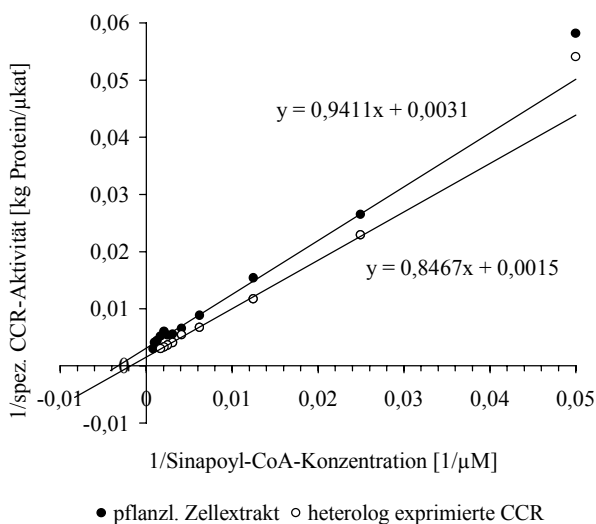
**Abb. 29:** Michaelis-Menten-Kinetiken für NADPH (Feruloyl-CoA im Überschuß) bei Verwendung der in *E. coli* heterolog exprimierten CCR und der aus den *L. album*-Zellsuspensionskulturen gewonnenen Proteinlösung



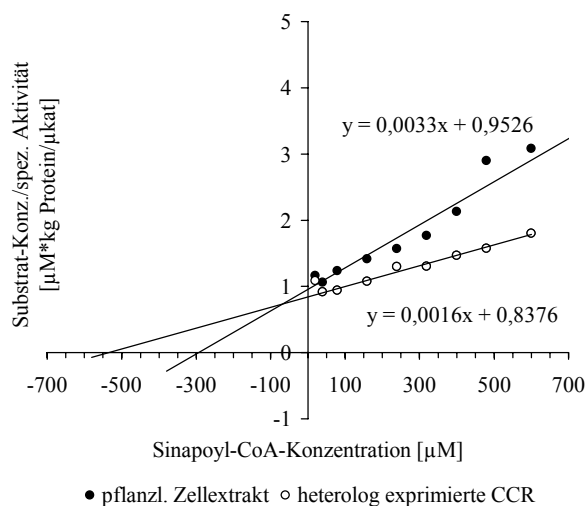
**Abb. 30:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für Feruloyl-CoA



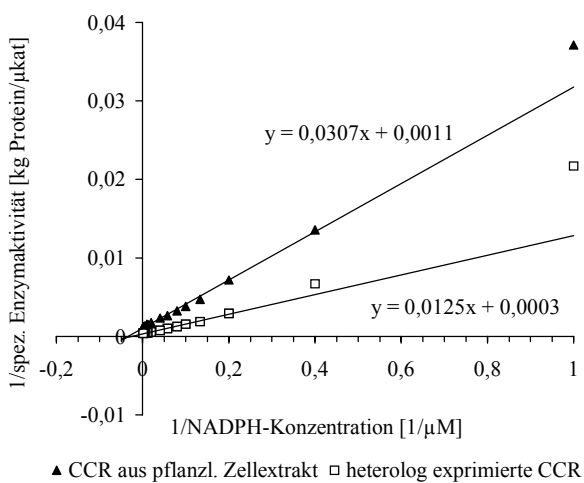
**Abb. 31:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für Feruloyl-CoA



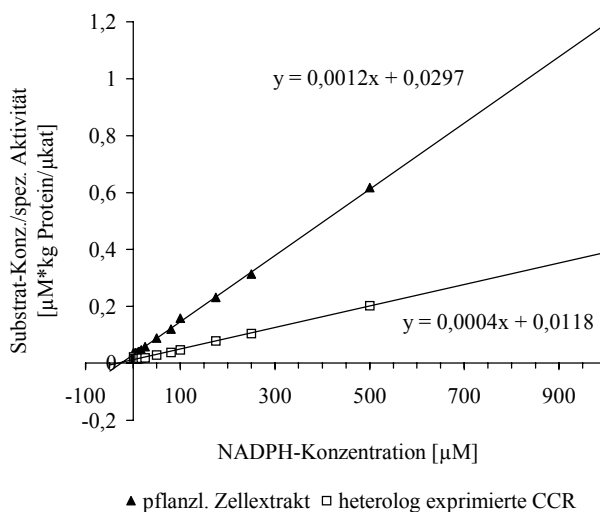
**Abb. 32:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für Sinapoyl-CoA



**Abb. 33:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für Sinapoyl-CoA



**Abb. 34:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für NADPH



**Abb. 35:**  $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für NADPH

Beispiele für die verschiedenen angewendeten Auswertungsverfahren sind in Abb. 28 bis Abb. 35 dargestellt. Bei den graphischen Darstellungen nach Lineweaver-Burk und Hanes mußten einige Meßwerte für besonders kleine Substratkonzentrationen bei der linearen Regression vernachlässigt werden, da diese von der allgemeinen Tendenz der übrigen Meßpunkte zu stark abwichen. Neben den jeweiligen Ausgleichsgeraden sind die zugehörigen mathematischen Funktionsgleichungen angegeben, über die die  $K_M$ -Werte ermittelt wurden. Die Abweichungen der für den *E. coli*-Rohextrakt und den *L. album*-Proteinextrakt ermittelten  $K_M$ -Werte lassen sich besonders gut an der Auftragung nach Hanes erkennen, da sich die Konstante direkt als Betrag des Schnittpunkts der Regressionsgeraden mit der Abszisse ablesen läßt.

Die ermittelten  $K_M$ -Werte für NADPH stimmen sowohl bei den verschiedenen Auswertungsverfahren als auch bei den beiden unterschiedlichen Proteinlösungen gut überein. Für den *L. album*-Extrakt betrug er durchschnittlich 32  $\mu\text{M}$  (Mittelwert der Auswertungen nach Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk und Hanes), für die in *E. coli* exprimierte CCR 30  $\mu\text{M}$ . Bei den CoA-Estern waren die Abweichungen größer. Der für Feruloyl-CoA bestimmte Wert war beim pflanzlichen Extrakt 47  $\mu\text{M}$  und beim *E. coli*-Rohextrakt 74  $\mu\text{M}$ . Die Messungen für Sinapoyl-CoA als Substrat ergaben Mittelwerte von 363  $\mu\text{M}$  (*L. album*-Zellextrakt) bzw. 568  $\mu\text{M}$  (*E. coli*-Extrakt).

## IV DISKUSSION

### IV.1 Charakterisierung einer Zellsuspensionskultur von *L. album* X4

Im Rahmen einer Charakterisierung der Zellsuspensionskultur von *L. album* X4 wurden über einen Zeitraum von drei Wochen Frisch- und Trockengewicht sowie Veränderungen des Nährmediums anhand des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und des Brechungsindex verfolgt, um Aufschlüsse über das Wachstumsverhalten zu bekommen. Des Weiteren wurden die Aktivitäten einiger Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels und der PTOX-Gehalt in den Zellen bestimmt.

Charakterisierungsexperimente werden üblicherweise in regelmäßigen Abständen durchgeführt, um die jeweiligen Kulturen bezüglich ihrer Eigenschaften zu kontrollieren. Es ist möglich, daß hochproduzierende Zelllinien aufgrund somaklonaler Variation ihre Syntheseleistung verlieren oder im Laufe der Zeit neue Eigenschaften hinzugewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Charakterisierung zusätzlich ein geeigneter Zeitraum für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek zur Suche nach cDNAs, die CCRs codieren, gefunden werden.

#### IV.1.1 Das Wachstumsverhalten von *L. album*-Suspensionskulturen der Zelle X4 – Wachstums- und Mediumsparameter

Die Wachstumskurven für Frisch- und Trockengewicht (Abb. 7) zeigen den für pflanzliche Suspensionskulturen typischen Verlauf, der auch schon in früheren Charakterisierungen der *L. album*-Zellsuspensionskulturen beobachtet werden konnte (WINDHÖVEL, 1998; HENGES, 1999). Das Maximum des Frischgewichts lag am 10. Kulturtag bei etwa 25 g pro Kolben a 50 ml Medium, das des Trockengewichts am 8. Tag bei 0,88 g pro Kolben. Die zeitliche Differenz zwischen den Maxima zeigt die zunehmende Vakuolisierung der Zellen und die Wassereinlagerung, die dem Aufbau der Zelltrockenmasse folgten. Während an den Scheitelpunkten maximalen Frisch- und Trockengewichts ein Fließgleichgewicht zwischen Wachstum bzw. Zellteilung und Abbau von sterbenden Zellen bestand, überwog in der anschließenden Absterbephase die Zersetzung der Zellen. Dies wurde durch die stetig schlechter werdenden Mediumsbedingungen hervorgerufen. Spiegelbildlich zum Anstieg des Trockengewichts nahm die Zuckerkonzentration (Brechungsindex, Abb. 8) im Nährmedium ab, da die Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle zum Aufbau zelleigener Substanz metabolisiert wurde. Nach dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffreserven des Mediums war kein Wachstum mehr möglich. Die nach dem 10. Kulturtag langsam einsetzende Absterbephase bewirkte eine geringe Zunahme des Brechungsindex, weil in diesem Stadium aufgrund der Zersetzung abgestorbener Zellen lichtbrechende Substanzen in das Medium freigesetzt wurden. Bei der Lyse der Zellen wird auch PTOX ins Medium abgegeben (HENGES, 1999). Während manche Pflanzen durch einige Aryltetralin-Lignane, zu denen auch das PTOX gehört, in ihrem Wachstum gehemmt werden, indem der Aufbau der Mikrotubuli bei der Mitose verhindert wird (OLIVA et al., 2002), scheinen Lignane das Wachstum der *L. album*-Zellen nicht negativ zu beeinflussen. So berichtet HENGES (1999), daß im Rahmen von Biotransformationsexperimenten zu den Suspensionskulturen zugegebenes DOP kein Absterben der Zellen, son-

dern sogar eine Erhöhung des Frischgewichts zur Folge hatte. *L. album*-Zellen nehmen zugesetztes DOP vollständig aus dem Medium auf und akkumulieren es in Form von PTOX in der Vakuole (HENGES, 1999), wodurch es für die Zellen unschädlich wird.

Die im Kulturverlauf gemessene Leitfähigkeit des Mediums ist ein Maß für die Veränderungen der Ionenkonzentration und somit vor allem für das Vorkommen von Nitrat, das die Hauptmasse der Ionen im MS-Medium ausmacht. Die Leitfähigkeitskurve (Abb. 8) verläuft spiegelbildlich zur Zunahme des Frischgewichts, da im Gegensatz zur Beziehung zwischen Trockengewicht und Zuckerkonzentration während des gesamten Zellwachstums zuzüglich der Vakuolisierung und der Wassereinlagerung, Ionen aus dem Medium aufgenommen wurden. In der Absterbephase gelangte ein großer Teil der Ionen wieder in das Nährmedium, was sich im Anstieg der Leitfähigkeit äußerte.

Der pH-Wert des MS-Mediums stieg im Verlauf der Charakterisierung, von kleinen Schwankungen abgesehen, kontinuierlich bis zum 16. Kulturtag von pH 4,9 auf pH 6,6 an (Abb. 8). Danach sank er geringfügig bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ab. Diese Entwicklung wies keine offensichtliche Korrelation zu den übrigen Wachstums- bzw. Mediumparametern auf. Dennoch bestätigte sie, genauso wie die Messungen zu den übrigen Parametern, Ergebnisse früherer Charakterisierungen (WINDHÖVEL, 1998; HENGES, 1999).

#### IV.1.2 Stoffwechseluntersuchungen – Enzymaktivitäten und PTOX-Synthese

Die Proteinkonzentrationen der angefertigten Enzymextrakte (II.1.9.3) erreichten zwischen dem 2. und 5. Kulturtag ihr Maximum und fielen bis zum Ende der Charakterisierung stetig ab (Abb. 9). Die nahezu übereinstimmenden Kurvenverläufe der beiden Proteinlösungen zeigen, daß sich die Konzentrationsveränderungen der fraktionierten Extrakte ähnlich verhalten wie die der Rohextrakte. Die hohen Proteinmengen zu Beginn der Zellkultivierung fallen mit dem steilen Anstieg der beiden Wachstumskurven (Abb. 7) zusammen, da in dieser Phase besonders viele Enzyme für die mit der Zellteilung und dem Wachstum verbundenen Stoffwechselwege benötigt werden.

Die PAL wies im Kulturverlauf zwei Maxima auf (Abb. 10). Die Aktivitätssteigerung der PAL zum 1. Kulturtag wird im allgemeinen mit dem sogenannten „Verdünnungseffekt“, einer Streßantwort der Zellen auf das Überimpfen in frisches Nährmedium, erklärt (HAHLBROCK, 1976). In einer cDNA-Bibliothek von *L. album*-Zellsuspensionskulturen konnten bisher Sequenzen für zwei unterschiedliche PAL-Isoformen gefunden werden (SCHWELM, 2001). Möglicherweise ist eine der Isoformen für die Streßantwort verantwortlich, während die andere *trans*-Zimtsäure für die Lignanproduktion bereitstellt. Bei der von SCHWELM (2001) beschriebenen Charakterisierung zweier *L. album*-Zellkulturen war bei den auf das Frischgewicht bezogenen PAL-Aktivitäten kein zweites Maximum vorhanden. Bei den spezifischen PAL-Aktivitäten waren die zweiten Maxima nicht so ausgeprägt wie in der hier beschriebenen Charakterisierung. Die Kulturen produzierten aber auch dort mit 200 bzw. 350 µg/g TG wesentlich geringere Mengen an PTOX als es hier der Fall war (ca. 3,5 mg/g TG, III.1.4). Auch bei früheren Charakterisierungsexperimenten trat bei der PAL ein ausgeprägtes zweites Aktivitätsmaximum auf, und die Kulturen synthetisierten ebenfalls größere Mengen PTOX (WINDHÖVEL, 1998, HENGES, 1999). Da die PAL jedoch direkt am Anfang des Phenyl-

propanstoffwechsels steht und somit das Substrat für viele nachfolgende Biosynthesewege liefert, ist die Korrelation zwischen dem zweiten Aktivitätsmaximum und dem PTOX-Gehalt der Zellen sehr spekulativ. Es ist aber auffällig, daß alle untersuchten Enzyme (PAL, 4CL, CCR, CAD (III.1.3.2 – III.1.3.5)), die bei der Synthese der Lignane eine Rolle spielen, im Zeitraum um den 5. Kulturtag erhöhte, auf das Frischgewicht bezogene Aktivitäten aufwiesen. Dabei handelte es sich jeweils nicht um das Hauptmaximum, das schon früher erreicht wurde.

Die Höhe der gemessenen Enzymaktivitäten alleine erlaubt keine endgültige Identifizierung geschwindigkeitsbestimmender Schritte im Phenylpropanstoffwechsel, da die *in vitro*-Messungen nicht zwingend die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln. So ist es zwar möglich, daß Enzymaktivitäten im Testansatz vergleichsweise niedrig ausfallen, wie z.B. bei der 4CL, doch weiß man nicht, ob die Bedingungen in den Zellen nicht gerade dieses Enzym begünstigen, während dies für andere Enzyme nicht zutrifft. Man muß davon ausgehen, daß die meisten Enzyme *in vivo* nicht unter optimalen Bedingungen arbeiten und daher niemals ihre Maximalaktivitäten erreichen (KRESSE, 1998). Die CCR-Aktivitäten lassen sich nicht direkt mit denen der anderen Enzyme vergleichen, da die im Test eingesetzte Proteinlösung für die CCR aufgrund der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung etwas angereinigt war, während für die anderen Enzymtests ein Rohextrakt benutzt wurde. Aus diesem Grund sind die für die CCR bestimmten Aktivitäten wahrscheinlich relativ zu hoch.

Die untersuchten Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels wiesen am 7. und 8. Tag der Kulturperiode im Vergleich zu den auf das Frischgewicht bezogenen Substratumsätzen erhöhte spezifische Aktivitäten auf, die zeigen, daß in dieser Zeit der Anteil dieser Enzyme am Gesamtprotein erhöht war.

Leider konnten die oben aufgeführten Resultate keine eindeutigen Hinweise darauf liefern, ob die CCR eine regulierende Funktion in der Anlieferung der Lignanvorstufe Coniferylalkohol besitzt. Es könnte sich auch die CAD-Aktivität limitierend auswirken, da sie ab dem 1. Kulturtag, bis auf kleine Schwankungen, ständig abnahm. Betrachtet man jedoch die auf das Frischgewicht bezogenen Enzymaktivitäten der CCR und CAD (Abb. 12 und 13), so sind die Aktivitäten der CAD, trotz ständiger Abnahme, immer noch höher als die der CCR. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die CAD in der Lage ist, mehr Coniferylalkohol für die Lignansynthese anzuliefern, wenn die CCR mehr Coniferaldehyd als Substrat für die CAD produzierte. Es ist aber auch nicht bekannt, wie hoch die Enzymaktivitäten *in vivo* sein müssen, um den Lignanstoffwechsel ausreichend mit Monolignolen als Substrat zu versorgen.

Während die untersuchten Enzyme ihre Maxima zu Beginn der Kultivierung hatten, erreichte der PTOX-Gehalt der Kultur am 10. Tag sein Maximum von etwa 3,5 mg/g TG (Abb. 14). Über den Phenylpropanstoffwechsel werden zunächst die Coniferylalkoholmoleküle als Ausgangssubstanz für die Lignanbiosynthese bereitgestellt, bevor die PTOX-Bildung in den Zellen stattfinden kann. Dennoch ist es schwierig, die Aktivitäten der hier untersuchten Enzyme mit der PTOX-Akkumulation in Zusammenhang zu bringen, weil es sich nur um frühe Biosyntheseschritte handelte, die auch zu anderen Produkten wie z.B. Lignin führen können.

Die PTOX-Ausbeute entsprach mit 0,35 % des TGs in ihrer Größenordnung den in der Literatur angegebenen Werten. So berichteten SMOLLNY et al. (1998) über eine Lignanausbeute in *L. album*-Zellkulturen von 0,2 % bis 0,5 % des TG, wobei der Hauptanteil aus PTOX bestand.



EMPT et al. (2000) ermittelten PTOX-Mengen, die bei 0,2 % des TG lagen. Vergleicht man diese Werte mit den in *Podophyllum peltatum*- (0,25 - 4,9 %) oder *Podophyllum hexandrum*-Pflanzen (1,0 - 4,9 %) erreichten PTOX-Gehalten (PETERSEN und ALFERMANN, 2001), so sieht man, daß die Syntheseleistung der *L. album*-Suspensionskulturen gut ist, zumal diese mit einer Produktionsdauer von 10 bis 12 Tagen viel schneller synthetisieren als die *Podophyllum*-Pflanze, die für die PTOX-Akkumulation 5 bis 7 Jahre benötigt (SMOLLYNY et al., 1998). Wenn die Kultivierung hochproduzierender *L. album*-Zelllinien in großen Bioreaktoren bei gleichbleibender Syntheseleistung gelänge, könnte dieses System eine Alternative zur PTOX-Gewinnung aus *Podophyllum*-Pflanzen werden.

## IV.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur CCR aus *L. album* X4

### IV.2.1 Herstellung und Sichtung einer *L. album*-cDNA-Bank

Nachdem aus der Charakterisierung der Zellsuspensionskultur von *L. album* X4 ersichtlich war, daß die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels ihre maximalen Aktivitäten innerhalb der ersten 10 Tage der Kulturperiode aufwiesen, wurde eine cDNA-Bank aus den mRNAs 4 bis 7 Tage alter Zellen hergestellt. Während die hohen Enzymaktivitäten in den ersten Tagen des Kulturverlaufs vermutlich auf den Überimpfstreß zurückgeführt werden konnten, waren die späteren Tage (4. bis 7. Tag) möglicherweise entscheidend für die Lignansynthese. Ähnlich wie für die PAL bereits diskutiert (IV.1.2), könnten verschiedene Isoformen der Enzyme jeweils für die Streßantwort bzw. die Lignansynthese verantwortlich sein. Da nur diejenige CCR von Interesse war, die bei der Anlieferung der Monolignole für die Lignansynthese beteiligt ist, wurden die ersten Kultivierungstage bei der Herstellung der cDNA-Bank nicht berücksichtigt.

Die Bibliothek enthielt wegen der vorausgegangenen Fraktionierung der cDNAs (III.2) nur Nukleotidsequenzen mit einer Größe zwischen 0,8 und 2,8 kb. Die Einschränkung der cDNAs auf diesen Größenbereich sollte die Suche nach CCRs, die nach den bis dahin veröffentlichten Angaben zwischen 1200 bis 1500 bp lang waren (LACOMBE et al., 1997; PICHON et al., 1998), erleichtern. Bei der Sichtung der Bank fand eine homologe *L. album*-Sonde Verwendung, die aufgrund ihrer Sequenzbeschaffenheit spezifisch für CCRs sein sollte (Abb. 15). Nach drei Sichtungsdurchgängen wurden 7 Phagenklone näher untersucht. Der *in vivo* Exzision folgte eine Gelelektrophorese der restriktionshydrolysierten cDNAs (Abb. 16), die eine Einteilung der cDNAs in drei Gruppen ergab. Von jeder Gruppe wurde ein cDNA-Klon sequenziert. Neben einer vollständigen cDNA mit einem offenen Leseraster aus 1026 bp, das von einem 5'- und einem 3'-untranslatierten Bereich mit Polyadenylierung am 3'-Ende flankiert wurde (Abb. 17), ergab die Sequenzierung der anderen beiden Klone eine cDNA, die bis auf eine Verkürzung mit der ersten identisch war, und eine weitere, die auf Artefakten beruhende Veränderungen besaß. Sechs der sieben Klone waren den Ergebnissen der Gelelektrophorese (Abb. 16) und der Sequenzierung zufolge gleich (III.2.2), nur daß zwei verkürzt vorlagen. Wahrscheinlich handelte es sich also um einen in der Bank häufig vorkommenden Klon.

Das von der Vollängen-cDNA codierte Protein wies große Sequenzübereinstimmungen zu bereits identifizierten CCRs anderer Pflanzen auf. So enthielt es die bisher in allen CCRs ge-

fundene hochkonservierte Aminosäuresequenz „NWYCY“, die möglicherweise bei der Umsetzung der Cinnamoyl-CoA-Ester eine Rolle spielt (PICHON et al., 1997; LAUVERGEAT et al., 2001). Am N-Terminus befand sich ein Abschnitt, der in vielen Enzymen, die NAD(P)H als Cosubstrat benötigen, in ähnlicher Form gefunden werden kann (LACOMBE et al., 1997; LAUVERGEAT et al., 2001). Sequenzvergleiche erbrachten außerdem Ähnlichkeiten zu Dihydroflavonol-4-Reduktasen (DFR), die zusammen mit den CCRs, den Säugetier-3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen, den bakteriellen UDP-Galaktose-4-Epimerasen und den erst vor kurzer Zeit in *Arabidopsis thaliana* gefundenen Cinnamoyl-CoA Reduktase ähnlichen Proteinen (CRL) die Familie der Säugetier-3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen/Pflanzen-Dihydroflavonol-Reduktasen bilden (BAKER et al., 1990; BAKER und BLASCO, 1992; ØSTERGAARD et al., 2001). Vergleicht man die Aminosäuresequenz der putativen *L. album*-CCR mit denen der CCRs von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*, so ist sie denjenigen CCRs ähnlicher, von denen man annimmt, daß sie an der konstitutiven Lignifizierung der jeweiligen Pflanze beteiligt sind. Die Übereinstimmungen mit denjenigen CCRs, die eher an der Synthese anderer Sekundärstoffe wie z.B. der Lignane beteiligt sind, war geringfügig kleiner (LAUVERGEAT et al., 2001; PICHON et al., 1998). Dennoch bedeutet dieses Ergebnis nicht zwangsläufig, daß die putative *L. album*-CCR keine Rolle in der Lignansynthese spielen kann, da die Zuordnung der CCR-Isoenzyme zu den einzelnen Stoffwechselwegen keineswegs eindeutig geklärt ist.

Expressionsstudien (Überexpression, Antisense) in *L. album* könnten hier näheren Aufschluß geben, waren aber aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

#### IV.2.2 Heterologe Expression der putativen *L. album*-CCR

Um die putative *L. album*-CCR tatsächlich als CCR bestätigen zu können, wurde das offene Leseraster der cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A kloniert und im *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS heterolog exprimiert. Der Vorteil des ausgewählten Vektors liegt darin, daß nur der ORF exprimiert und nicht, wie bei einer Vielzahl anderer Expressionsvektoren, ein Fusionsprotein synthetisiert wurde, das möglicherweise durch das Anhängen von Aminosäuresequenzen an das eigentliche Peptid keine katalytische oder eine veränderte Aktivität besitzt. Auf diese Weise konnten Enzymtests mit dem *E. coli*-Rohextrakt durchgeführt werden, ohne erst das Fusionsprotein durch Abspalten der zusätzlichen Aminosäuren aufarbeiten zu müssen. Der Vorteil von pTrc99A war jedoch zugleich sein Nachteil. So erlaubte er nicht eine einfache Proteinaufreinigung über eine Affinitätschromatographie aufgrund z.B. einer angehängten Histidin-Sequenz.

Die Enzymaktivität der CCR konnte im Bakterienrohextrakt eindeutig nachgewiesen werden. Durch Zugabe des Frostschutzmittels Ethylenglykol wurde die CCR in der Proteinlösung stabilisiert, so daß eine Lagerung der Extrakte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität führte. Ohne Ethylenglykol war nach dem Einfrieren ein Teil des Proteins irreversibel ausgeflockt, so daß nur unbefriedigend kleine CCR-Aktivitäten meßbar waren. Neben der Zugabe des Additivs wurde auch eine Reinigung des Rohextrakts, mit und ohne Ethylenglykolzusatz, über eine Sephadex PD-10 Säule durchgeführt. In beiden Fällen steigerte dies zwar die CCR-Aktivität im Vergleich zum unbehandelten Extrakt, doch wurden ohne

Gelfiltration, allein durch die Zugabe von Ethylenglykol bessere Ergebnisse erzielt. Weiterhin zeigte sich, daß die Lysefunktion des Expressionsstammes nicht ausreichend war. Obwohl ein Ultraschallaufschluß der Zellen von 4 Intervallen zu je 15 s vorgenommen wurde, war dies offensichtlich für eine optimale Proteinausbeute nicht genug. So konnte die CCR-Aktivität durch verlängerte Ultraschallbehandlung der Bakterienzellen wesentlich (16,5-fach) gesteigert werden (III.7.2). Die optimale Inkubationsdauer der mit IPTG induzierten Bakterien zur heterologen Expression des CCR-Proteins lag im Untersuchungszeitraum bei 6 h. Eine Inkubation von 16 h ergab keine Steigerung der spezifischen CCR-Aktivität, sondern eine Verminderung. Da die Gesamtproteinmenge der Extrakte aus den nach 6 h und nach 16 h geernteten Bakterien nahezu gleich war, wurde die Abnahme der spezifischen CCR-Aktivität wahrscheinlich durch den Abbau der CCR in den Bakterien hervorgerufen. Es wäre aber auch eine Inhibition der CCR möglich.

Nähere biochemische Untersuchungen zur heterolog exprimierten CCR werden in IV.3 diskutiert.

### IV.2.3 Die Suche nach CCR-Isoformen mittels Southern-Analyse

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob es sich in *L. album* X4 nur um eine CCR-Isoform oder um eine Genfamilie mit mehreren Isoformen handelt, wurden Southern-Transfers angefertigt, die entweder mit der radioaktiv markierten Vollängen-cDNA der CCR oder mit einer 260 bp langen Sequenz aus der 3'-untranslatierten Region bei einer Temperatur von 68 °C bzw. 64 °C hybridisiert wurden (III.4). Das komplexe Bandenmuster bei der Hybridisierung mit der gesamten CCR-cDNA (Abb. 19, A) deutete darauf hin, daß im *L. album*-Genom mehrere CCR-Gene vorhanden sind. Die für die Restriktionshydrolysen der *genomischen L. album*-DNA ausgewählten Endonukleasen besaßen keine Restriktionsschnittstellen in der CCR-cDNA-Sequenz, außer *Bgl* II, das einmal schnitt. Das bedeutet, daß auch diese Schnittstellen in den Exonbereichen des CCR-Gens fehlen sollten. Die Vielzahl der Banden kann daher entweder durch Schnittstellen in den Intronsequenzen oder durch das Vorhandensein von CCR-Isoformen erklärt werden. Bei den CCRs aus *Arabidopsis thaliana* und *Eucalyptus gunnii* ist die Anzahl der Introns und ihre jeweilige Lage bekannt (LAUVERGEAT et al., 2001; LACOMBE et al., 1997). Während für die *AtCCR1* aus *Arabidopsis* und die CCR aus *Eucalyptus* je vier Introns gefunden wurden, die sich an identischen Positionen im ORF befinden, fehlt der *AtCCR2* die erste Intronsequenz. In allen drei Fällen befindet sich Intron III genau vor der hochkonservierten Sequenz „NWYCY“. Die Möglichkeit für Restriktionsschnittstellen in den Intronsequenzen ist also gegeben.

Eine zusätzliche Erklärung wären CCR-ähnliche Sequenzen, wie sie z.B. bei den DFRs vorkommen. Da vor allem Regionen wie die NADPH-Bindedomänen recht konserviert sind, könnte die Sonde aus der gesamten CCR-cDNA mit solchen Bereichen hybridisieren. Dabei müssen die Sequenz-Übereinstimmungen aufgrund der stringenten Hybridisierungsbedingungen jedoch hoch sein.

Bei Verwendung der 3'-untranslatierten Region als Sonde war die Anzahl der Hybridisierungssignale trotz niedrigerer Hybridisierungstemperatur (64 °C) in den jeweiligen DNA-Spuren geringer, doch blieben immer mindestens zwei Banden vorhanden (Abb. 19, B). Da

die untranslatierten Regionen einer mRNA normalerweise besonders spezifisch für eine bestimmte Genkopie sind, sollte die Sonde nur an die Sequenz einer einzigen CCR-Genkopie binden. Demnach sind im *L. album*-Genom auch zusätzliche DNA-Bereiche, die große Ähnlichkeit mit dem 3'-UTR aufweisen. Alle Banden waren auch bei der stringenteren Hybridisierung bei 68 °C mit der gesamten CCR-cDNA als Sonde vorhanden. Es könnte sich um eine zweite CCR-Isoform mit einem ähnlichen 3'-Bereich handeln.

Die Frage, ob es neben der bisher in *L. album* identifizierten CCR weitere Isoformen des Enzyms gibt, konnte also nicht eindeutig beantwortet werden, auch wenn das Ergebnis der Southern-Hybridisierungen dies vermuten läßt.

#### IV.2.4 Transkriptionsstudien mittels Northern-Analyse

Die Northern-Analyse (Abb. 20, B) 5 bis 9 Tage alter *L. album* X4-Zellsuspensionskulturen zeigte die Anwesenheit von CCR-mRNAs an allen Untersuchungstagen. Obwohl in den Spuren des Agarosegels für jeden Tag geringfügig unterschiedliche RNA-Mengen aufgetragen wurden (Abb. 20, A), lassen sich dennoch einige Aussagen über die Entwicklung des CCR-mRNA-Spiegels in den Zellen der verschiedenen Kulturstage treffen. So stieg die mRNA-Menge für die CCR im Vergleich vom 5. über den 6. auf den 7. Tag an. Danach war eine Abnahme der CCR-Transkripte vom 7. zum 9. Kulturtag zu verzeichnen. Dieses Ergebnis korreliert gut mit dem Kurvenverlauf der spezifischen CCR-Aktivität der Charakterisierung (Abb. 13), die einen Aktivitätszuwachs vom 5. bis zum 7. Tag und danach einen Rückgang der spezifischen CCR-Aktivität zeigt, was aber wahrscheinlich lediglich auf die Abnahme des Gesamtproteingehaltes zurückzuführen ist. Bei den auf das Frischgewicht bezogenen CCR-Aktivitäten, die die Verhältnisse in den Zellen besser widerspiegeln sollten, gab es keine Übereinstimmung mit den mRNA-Mengen der Kulturstage. Es war ein Aktivitätsanstieg vom 6. auf den 7. Charakterisierungstag zu verzeichnen, dem ein starker Aktivitätsrückgang folgte. Diese Abweichung könnte dadurch erklärt werden, daß die für die Charakterisierung verwendeten Zellkulturen evtl. nicht völlig denen zur RNA-Isolierung für die Northern-Analyse entsprachen. Es handelte sich in beiden Fällen zwar um *L. album*-Zellen der Linie X4, doch wurden die Charakterisierungsexperimente etwa 30 Monate vor den Versuchen zur Bestimmung des CCR-mRNA-Spiegels durchgeführt, so daß sich der Stoffwechsel der Zellen in der Zwischenzeit etwas verändert haben könnte. Des weiteren müssen Enzymaktivitäten nicht zwangsläufig mit dem jeweiligen mRNA-Spiegel korrelieren, da neben der Kontrolle der Genexpression auf Transkriptionsebene auch Kontrollen durch Spleißen der mRNA, auf Translationsebene oder posttranslational erfolgen können.

Da bei der Northern-Analyse das gesamte offene Leseraster der CCR-cDNA als Sonde eingesetzt wurde, war die Hybridisierung nicht spezifisch für eine bestimmte CCR-mRNA, weil der ORF im Gegensatz zu den untranslatierten Bereichen aufgrund seiner Funktionalität bei allen CCR-Isoformen hochkonserviert sein sollte. Wenn man davon ausgeht, daß die mRNAs verschiedener CCR-Isoformen ähnlich groß sind, so könnten die Hybridisierungssignale auf dem Röntgenfilm von jeweils unterschiedlichen oder von einem Gemisch von CCR-mRNAs stammen.

### **IV.3 Biochemische Untersuchungen zur CCR aus *L. album* X4**

Eine biochemische Charakterisierung der CCR war bereits im Rahmen einer Diplomarbeit (WINDHÖVEL, 1998) begonnen worden, konnte aber nicht vollständig durchgeführt werden, weil in dem für die Untersuchungen verwendeten Proteinextrakt noch die Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) vorhanden war, die durch die Umwandlung des CCR-Produkts die korrekte Auswertung der Experimente erschwerte bzw. unmöglich machte.

Im folgenden wird die Reinigung des Proteinextrakts zur Beseitigung der CAD und ein Vergleich der biochemischen Eigenschaften dieses aus *L. album*-Zellen gewonnenen Extrakts und der in *E. coli* heterolog exprimierten CCR erörtert.

#### **IV.3.1 Reinigung des gefällten *L. album*-Proteinextrakts durch Chromatographie mit DEAE-Sephacel**

Ziel der Anionenaustausch-Chromatographie mittels DEAE-Sephacel (III.6) des zuvor durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereinigten *L. album*-Proteinextrakts war eine Trennung der CCR von der CAD, um die Bestimmung der CCR- $K_M$ -Werte für verschiedene Substrate zu ermöglichen. Für die vollständige Isolierung der CCR aus dem Pflanzenextrakt wären weitere zeitaufwendige Reinigungsstufen notwendig gewesen, wie sie beispielsweise in der Literatur bei WENGENMAYER et al. (1976), LÜDERITZ und GRISEBACH (1981) und GOFFNER et al. (1994) beschrieben werden. Aus diesem Grund fiel auch der Reinigungsfaktor mit einem Wert von 5,2 niedrig aus (Tab. 8). Da das Zellmaterial von *L. album* selbst innerhalb der Linie X4 Qualitätsschwankungen unterworfen war und weil bei der Extraktbearbeitung geringfügige Unterschiede auftreten konnten, wurden teilweise auch Reinigungsfaktoren von 10 erreicht.

Bei der Reinigungsstufe mit DEAE-Cellulose, einem Material, das aufgrund der DEAE-Gruppen ähnliche Eigenschaften wie DEAE-Sephacel hat, wurde bei WENGENMAYER et al. (1981) auch lediglich ein Faktor von 9 und bei GOFFNER et al. (1994) ein Wert von 9,4 erzielt. Die prozentuale Ausbeute lag aber jeweils höher als die hier erreichten 39,1 %. Man muß aber auch beachten, daß in den beiden erwähnten Arbeiten die CCR-Aktivität des Rohextrakts als Referenzwert genommen wurde, während das hier aufgrund der unbrauchbaren Meßergebnisse für den Rohextrakt nicht möglich war. Die hier erzielte Aufreinigung ist demzufolge im Vergleich zu den Literaturwerten genauso gut, wenn nicht sogar besser. Ob für die schlechten Ergebnisse mit dem Rohextrakt ebenfalls wie bei den Zellkulturen der Sojabohne (LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981) das Verschwinden des Feruloyl-CoAs aus dem Testansatz wegen anderer Aktivitäten verantwortlich war, kann nicht gesagt werden, da Feruloyl-CoA mit der HPLC nicht zusätzlich detektiert wurde.

Ein Vergleich mit Literaturangaben kann aufgrund der experimentellen Unterschiede bei der Herstellung des Rohextrakts und der Verschiedenheit des pflanzlichen Ausgangsmaterials nur Anhaltspunkte liefern.

#### **IV.3.2 Vergleich von pflanzlichem und bakteriellem Proteinextrakt**

Bei der biochemischen Charakterisierung der CCR wurden Eigenschaften wie  $K_M$ -Werte für

unterschiedliche Substrate, pH- und Temperaturoptimum untersucht. Diese Charakteristika wurden mit einem angereinigten Proteinextrakt von *L. album*-Zellsuspensionskulturen und einem Proteinextrakt aus *E. coli*-Zellen, die die CCR heterolog exprimierten, bestimmt. Die jeweiligen Resultate wurden miteinander verglichen, um herauszufinden, ob es sich bei der heterolog exprimierten CCR um das gleiche Enzym handelte wie im angereinigten Zellextrakt. Zwar stammte die im *E. coli*-Stamm produzierte CCR auch aus *L. album* X4, doch könnte es sich hierbei um eine Isoform handeln, die andere biochemische Eigenschaften aufweist als die aus dem pflanzlichen Zellextrakt. In *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* wurden bereits solche CCR-Isoformen gefunden (PICHON et al., 1998; LAUVERGEAT et al., 2001). Dabei handelte es sich jedoch um organspezifische (*Zea mays*) bzw. durch Pathogene induzierte (*Arabidopsis thaliana*) Formen der CCR, die möglicherweise in sterilen Zellkulturen nicht exprimiert werden. Die Ergebnisse der Southern-Transfers (III.4) deuteten darauf hin, daß das *L. album*-Genom unterschiedliche CCR-Gene besitzen könnte, so daß die CCRs aus den beiden Proteinextrakten nicht übereinstimmen müßten (IV.2.3). Auch wäre es möglich, wenn auch unwahrscheinlich, daß schon bei der Herstellung des pflanzlichen Extrakts, z.B. bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, die CCR-Isoform verloren ging, die dem heterolog exprimierten Enzym entsprach. Der 7. Tag der Kulturperiode war der Zeitpunkt der Zellernte für die Präparation des Proteinextrakts. CCR-Isoformen, die an diesem Tag in der Zellkultur nicht vorhanden waren, da sie entweder früher oder später exprimiert wurden, gingen in die Aktivitätsmessungen ebenfalls nicht ein. Für die *L. album*-cDNA-Bibliothek wurden 4 bis 7 Tage alte Zellen verwendet, so daß die mRNAs aller CCRs aus diesem Zeitraum vorhanden sein sollten. In der cDNA-Bank könnten jedoch auch aufgrund der Amplifikation CCR-Isoformen verloren gegangen oder wegen ihrer Seltenheit übersehen worden sein. Außerdem waren CCR-mRNAs, die nur vor dem 4. und nach dem 7. Kulturtag in den Zellsuspensionen vorlagen, in der cDNA-Bank nicht vorhanden. Aus diesen Gründen war ein Vergleich der beiden unterschiedlichen Proteinextrakte interessant. Vor allem im Hinblick auf die PTOX-Biosynthese könnte das Auffinden von auf verschiedene Stoffwechselfaufgaben spezialisierten CCRs bedeutsam sein.

Für die Bestimmung der CCR-Charakteristika wurde ein diskontinuierliches Testverfahren mit HPLC-Detektion der Endprodukte verwendet (II.1.5 – II.1.7). Bei dieser Methodik ist es notwendig, die Zeitspanne zu ermitteln, während der die Reaktion mit konstanter Geschwindigkeit verläuft, um eine zuverlässige Messung der Anfangsgeschwindigkeit der „Steady-state“-Kinetik zu erhalten. Mit „Steady-state“ (Fließgleichgewicht) wird der Zeitraum der enzymatischen Reaktion bezeichnet, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit und die Konzentrationen der Zwischenprodukte relativ konstant bleiben (WILSON und GOULDING, 1991). Um den linearen Bereich der Enzymreaktion herauszufinden, wurden zunächst die Abhängigkeiten der Enzymaktivitäten von der Inkubationszeit und der im Test eingesetzten Proteinkonzentration für die Proteinextrakte (*L. album*, *E. coli*) untersucht. Für die folgenden Experimente zur Bestimmung der CCR-Charakteristika wurden Inkubationszeiten und Proteinkonzentrationen gewählt, die sich inmitten der Bereiche konstanter Reaktionsgeschwindigkeiten befanden. Bei der Verwendung von Sinapoyl-CoA als Substrat konnten die Testansätze länger inkubiert und mehr Protein eingesetzt werden als mit Feruloyl-CoA, da der Substratumsatz wesentlich langsamer erfolgte und somit die linearen Bereiche ausgedehnter waren.

Die Enzymkatalyse wird stark vom pH-Wert beeinflusst, weil sich der pH-abhängige Ladungszustand katalytisch wichtiger ionisierbarer Aminosäureseitenketten sowohl auf die Substratbindung als auch auf die Enzymaktivität auswirkt (KRESSE, 1998). Des Weiteren kann ein pH-Profil eines Enzyms auch durch eine pH-abhängige Konformationsänderung des Proteins bestimmt werden, wobei es zum Aktivitätsverlust durch Verformung des aktiven Zentrums kommt (TAIZ und ZEIGER, 2000).

Bei den Experimenten zur Bestimmung des pH-Optimums der CCR wurde ein Gemisch aus Kaliumphosphatpuffer und einer Na<sub>2</sub>-EDTA/NaOH-Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt, das ein konstantes Milieu in den Testansätzen gewährleistete. Die pH-Werte wurden mit Hilfe einer pH-Elektrode während der gesamten Inkubationszeit überprüft. Die jeweiligen Meßreihen mit den beiden Enzymextrakten und Feruloyl- bzw. Sinapoyl-CoA als Substrat ergaben in der graphischen Darstellung die für pH-Abhängigkeiten typischen glockenförmigen Kurven (Abb. 27). Dabei fielen die Optima bei Verwendung von Sinapoyl-CoA mit einem Bereich zwischen pH 6,3 und pH 7,4 etwas breiter aus als mit Feruloyl-CoA (pH 6,0 bis pH 6,7). Nach WILSON und GOULDING (1991) können glockenförmige pH-Aktivitätsprofile mit einem engen pH-Optimum durch zwei entscheidend wichtige Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum erklärt werden, während Profile mit einem Plateau auf eine für die Katalyse essentielle Aminosäureseitenkette im aktiven Zentrum hindeuten. Da kein wirkliches Plateau vorhanden ist, sprechen die für die CCR ermittelten Kurvenformen trotz relativ breiter Maxima wohl eher für die erste Theorie, die zwei wichtige Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum vorhersagt. Die geringe Verschiebung des pH-Optimums zu höheren pH-Werten bei Anwesenheit von Sinapoyl-CoA hängt möglicherweise mit den im Vergleich zu Feruloyl-CoA schwächeren Bindungseigenschaften an die CCR zusammen. Durch die zusätzliche Methoxygruppe an Position 5 des aromatischen Ringes bei Sinapoyl-CoA könnte die Interaktion des Moleküls mit dem aktiven Zentrum der CCR etwas anders sein als mit Feruloyl-CoA. Das im Rahmen einer Diplomarbeit (WINDHÖVEL, 1998) bereits mit gefällttem *L. album*-Extrakt und Feruloyl-CoA als Substrat ermittelte pH-Optimum von pH 6,0 bis pH 6,5 konnte weitgehend bestätigt werden, da mit der angereinigten Proteinlösung Aktivitätsmaxima im Bereich zwischen pH 6,0 und pH 6,7 gefunden wurden. Der geringe Unterschied zu dem zuvor bestimmten Resultat kann durch die Eingrenzung des Optimums zustande kommen, da aufgrund schwankender Meßergebnisse das pH-Optimum nicht auf einen bestimmten Wert, sondern auf einen pH-Bereich festgelegt wurde.

Der Vergleich mit Literaturwerten ergibt eine gute Übereinstimmung. So wurde für die CCR aus *Populus X euramericana* ein optimaler pH-Bereich von pH 6,0 bis pH 6,5 gefunden, wobei sich jedoch die maximale Enzymaktivität mit der Art des eingesetzten Puffersystems veränderte (SARNI et al., 1984). Die CCR aus *Glycine max* wies bei Verwendung eines 200 mM Citrat-Puffers ein pH-Optimum von pH 6,0 bis pH 6,2 auf (WENGENMAYER et al., 1976). Für die CCR aus *Eucalyptus gunnii* variierten die pH-Werte je nach Art des verwendeten Puffers zwischen pH 5,3 bis pH 6,5 (Phosphatpuffer 100 mM) und pH 6,0 bis pH 6,5 (Citrat/NaOH 100 mM) (GOFFNER et al., 1994). Auch das bei der CCR aus *Picea abies* mit pH 6,3 in 100 mM Phosphatpuffer gemessene pH-Optimum (LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981) fiel in den gleichen Rahmen wie die pH-Werte der anderen CCRs. Allein das Ergebnis für die CCR aus *Forsythia suspensa* weicht mit einem optimalen pH-Bereich zwischen pH 7,4

und pH 7,8 (in Phosphat oder Tris-HCl-Puffer) von den anderen Literaturwerten und dem für Feruloyl-CoA bestimmten Optimum ab (GROSS und KREITEN, 1975). Mit Sinapoyl-CoA als Substrat wurde für die *L. album*-CCR immerhin auch ein Optimumsbereich ermittelt, der mit pH 6,3 bis pH 7,4 etwas basischer ausfiel als bei den Referenzen.

Betrachtet man dieses Ergebnis vor dem Hintergrund, daß alle bisher gefundenen CCRs die hochkonservierte Aminosäuresequenz „NWYCY“ beinhalten, die eine wichtige Funktion in der Katalyse besitzen soll (LACOMBE et al., 1997), so verwundert die große Übereinstimmung der pH-Optima nicht weiter. Wenn diese Sequenz tatsächlich essentiell für die katalytische Wirksamkeit des aktiven Zentrums der CCR sein sollte, so zeigt sie in allen Enzymen dieselbe pH-abhängige Ionisierbarkeit der Aminosäure-Seitenketten. Wodurch die Verschiebung zu basischeren Werten bei *Forsythia suspensa* hervorgerufen wurde, kann hier nicht geklärt werden. Die Sequenz der CCR dieser Pflanze ist nicht bekannt. Es könnte möglicherweise eine Veränderung in dem hochkonservierten Sequenzbereich vorliegen.

Die für die meisten chemischen Reaktionen gültige Temperaturabhängigkeit wird auch bei enzymatischen Reaktionen gefunden. Die Geschwindigkeit einer Reaktion steigt exponentiell mit zunehmender Temperatur an (TAIZ und ZEIGER, 2000). Im einfachsten Fall kann die Temperaturabhängigkeit mit der sogenannten Arrhenius-Gleichung beschrieben werden (KRESSE, 1998). Bei einer Temperatursteigerung um 10 °C verdoppelt sich die Geschwindigkeit der Reaktion. Dies konnte auch bei den untersuchten Temperaturabhängigkeiten mit dem angereinigten pflanzlichen Extrakt und der *E. coli*-Proteinlösung bei Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA beobachtet werden (Abb. 26). Das Temperaturoptimum lag zwischen 28 °C und 38 °C und beim *E. coli*-Extrakt mit Feruloyl-CoA, ein wenig abweichend, zwischen 30 °C und 40 °C.

Da es sich bei Enzymen um Proteine handelt, wirkt ab einer gewissen Temperatur die Denaturierung der Aktivitätssteigerung entgegen. Während sich am Temperaturoptimum Aktivitätssteigerung und –abnahme durch Denaturierung noch die Waage halten, überwiegt oberhalb des Optimums die Inaktivierung des Proteins. Für die *L. album*-CCR galt, daß die Denaturierung oberhalb 52 °C vollständig war und keinerlei Enzymaktivität mehr gemessen werden konnte. Um möglichst hohe Produkt-„Peaks“ an der HPLC detektieren zu können, wurden die Enzyme im Bereich des Temperaturoptimums bei 35 °C inkubiert. Die Denaturierung sollte bei dieser Temperatur noch nicht so sehr ins Gewicht fallen, da der optimale Bereich bis 38 °C bzw. 40 °C reicht. In der Literatur wurden die Enzymtests zumeist photometrisch bei 30 °C durchgeführt (GROSS und KREITEN, 1975; SARNI et al., 1984; GOFFNER et al., 1994). Temperaturoptima wurden nicht angegeben.

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) ist für ein Enzym-Substrat-System charakteristisch und gibt die Substratkonzentration an, die benötigt wird, um das Enzym halb zu sättigen, d.h. um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}/2$ ) zu erreichen (TAIZ und ZEIGER, 2000). Sowohl der  $K_M$ -Wert als auch  $V_{max}$  sind pH- und temperaturabhängig. Daher gelten  $K_M$  und  $V_{max}$  nur unter den jeweiligen Testbedingungen, unter denen sie bestimmt wurden (KRESSE, 1998). Die Michaelis-Menten-Gleichung gilt nur für Reaktionen 1. Ordnung, d.h. Enzymkinetiken mit einem Substrat, die beim Erreichen der Substratsättigung in die 0. Ordnung übergehen. Bei der durch die CCR katalysierten Umwandlung von Cinnamoyl-CoA-Estern in ihre korrespondierenden Zimtaldehyde handelt es sich jedoch um eine Zwei-



Substrate-Reaktion, da neben dem CoA-Ester auch das Cosubstrat NADPH für die Ausführbarkeit der Reaktion benötigt wird. Um dennoch die  $K_M$ -Werte für die Substrate der CCR bestimmen zu können, wurden Reaktionen Pseudo-1. Ordnung geschaffen, indem eines der Substrate, entweder NADPH oder der CoA-Ester, wenigstens annähernd in Sättigung vorgelegt wurde, während das andere Substrat in seinen Konzentrationen variierte. Da die CoA-Ester unter zeitlichem Aufwand in Eigensynthese hergestellt werden mußten (II.1.2), waren die Ressourcen dieser Substrate begrenzt. Um eine angemessene Anzahl an Enzymtests durchführen zu können, wurden in den Experimenten nur 120  $\mu\text{M}$  Feruloyl-CoA eingesetzt. Diese Konzentration befand sich noch relativ am Anfang des Sättigungsbereichs der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 28) und nicht wie theoretisch erforderlich bei  $V_{\text{max}}$ . Die  $K_M$ -Werte für NADPH sind also mit einem systematischen Fehler behaftet, dessen Größe schwer abzuschätzen ist. Dennoch sind die Messungen sinnvoll, weil es vornehmlich darauf ankam, die beiden Enzymextrakte (*L. album*, *E. coli*) miteinander zu vergleichen, um mögliche Isoformen der CCR ausfindig zu machen. Da die Testbedingungen für beide Proteinlösungen übereinstimmten, sind die gewonnenen Resultate der apparenten  $K_M$ -Werte vergleichbar.

Die  $K_M$ -Werte für Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und NADPH wurden mit Hilfe diverser Auswertungsverfahren (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk und Hanes) bestimmt, die sich durch eine unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Meßpunkte auszeichnen. Da die Fehlerraten der Meßwerte dennoch üblicherweise größer sind als die der graphischen Methoden zur  $K_M$ -Wert-Bestimmung, wurden zur Fehlerreduzierung alle Messungen mindestens in zwei, maximal in sechs unabhängigen Testreihen, die aus Doppelproben bestanden, durchgeführt.

Bei hohen Feruloyl-CoA-Konzentrationen und Verwendung des angereinigten *L. album*-Zellextrakts im Experiment kam es zur Substratinhibition, bei der die spezifische Enzymaktivität abnahm.

Die Werte für  $V_{\text{max}}$  variierten in den verschiedenen Meßreihen deutlich, da die eingesetzten Proteinlösungen trotz übereinstimmender Konzentrationen unterschiedlich beschaffen waren, weil sie aus verschiedenen Präparationen stammten. Bei der Extrakterstellung flossen sowohl experimentelle Schwankungen als auch die natürlichen Stoffwechselveränderungen der Pflanzen- bzw. Bakterienzellen in die Güte der jeweiligen Proteinlösung ein. Wegen mangelnder Aussagekraft wurden die einzelnen  $V_{\text{max}}$ -Werte nicht weiter berücksichtigt.

Ein Vergleich der  $K_M$ -Werte der CCR für die jeweiligen Substrate (Tab. 9 und 10) ergab eine Bevorzugung des Feruloyl-CoAs gegenüber dem Sinapoyl-CoA. Mittelte man die durchschnittlichen  $K_M$ -Werte der verschiedenen Auswertungsverfahren, so erhielt man für Feruloyl-CoA 47  $\mu\text{M}$  beim pflanzlichen Extrakt und 74  $\mu\text{M}$  beim *E. coli*-Rohextrakt. Für Sinapoyl-CoA betrug die Mittelwerte 363  $\mu\text{M}$  bei der angereinigten *L. album*-Proteinlösung und 568  $\mu\text{M}$  beim Bakterienextrakt. Während sich die Werte der beiden Proteinextrakte bei Verwendung des jeweils gleichen Substrats lediglich um einen Faktor von 1,6 unterschieden, so war der  $K_M$ -Wert für Sinapoyl-CoA jeweils um das 7,7-fache größer als der für Feruloyl-CoA. Diese Ergebnisse deuten zwar darauf hin, daß die CCRs in den beiden Proteinextrakten identisch waren, doch muß man auch beachten, daß sich die Enzyme trotz teilweise identischer Eigenschaften in anderen Aspekten unterscheiden können, die hier nicht untersucht wurden. Im Falle identischer CCRs könnten die geringen Abweichungen zwischen den  $K_M$ -

Werten durch die mehr oder weniger vorhandenen Störfaktoren in den nicht reinen CCR-Extrakten erklärt werden, da auch andere Proteine vorhanden waren, die sicherlich Auswirkungen auf die CCR-Reaktion hatten. Ungewöhnlich dabei ist jedoch, daß sich die  $K_M$ -Werte für NADPH (ca. 30  $\mu\text{M}$  bei beiden Extrakten) nicht unterschieden. Des weiteren besteht auch die Möglichkeit, daß in dem pflanzlichen Extrakt eine Mischreaktion aus verschiedenen CCR-Isoformen mit unterschiedlicher Substrataffinität gemessen wurde, wobei aber diejenige CCR die Reaktion dominierte, die auch in *E. coli* heterolog exprimiert wurde. So könnte erklärt werden, warum die  $K_M$ -Werte zwar etwas niedriger, aber dennoch nicht vollständig anders waren. Dieser Erklärungsversuch müßte aber durch entsprechende Experimente weiter begründet werden.

Üblicherweise werden  $K_M$ -Werte als wirklich verschieden eingestuft, wenn sie sich mindestens um eine Zehnerpotenz voneinander unterscheiden. Der Faktor von 7,7 zwischen den  $K_M$ -Werten für Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA kommt näherungsweise an diese Zehnerpotenz heran. Alle Versuchsergebnisse im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der CCR wiesen auf eine Bevorzugung von Feruloyl-CoA als das *in vivo* Substrat hin.

Wie bereits erwähnt, war der  $K_M$ -Wert für NADPH bei Verwendung von Feruloyl-CoA als Substrat im pflanzlichen und im *E. coli*-Extrakt gleich, was unter dem zuvor diskutierten Vorbehalt auf eine identische CCR in beiden Proteinlösungen hindeutet. Die  $K_M$ -Werte für NADPH mit Sinapoyl-CoA wurden nicht untersucht.

Die übereinstimmenden Eigenschaften der in *E. coli* synthetisierten CCR mit dem Enzym aus den Pflanzenzellen zeigten, daß der Aminosäureaustausch von Prolin zu Valin direkt hinter dem Startcodon bei der Klonierung des ORFs in den Expressionsvektor (III.7) keine großen Auswirkungen auf die katalytischen Fähigkeiten der CCR hatte und daß die Faltung des Proteins im Bakterium mit der in den Pflanzenzellen identisch oder zumindest dazu äußerst ähnlich war. Dies muß bei der heterologen Expression eines eukaryotischen Proteins in Prokaryonten nicht immer der Fall sein.

In der Literatur findet man teilweise  $K_M$ -Wert-Bestimmungen für die CCR, bei denen Feruloyl-CoA ebenfalls dem Sinapoyl-CoA vorgezogen wird (WENGENMAYER et al., 1976; LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981; LAUVERGEAT et al., 2001), zum Teil aber auch Fälle, bei denen sich die Konstanten für die beiden Substrate kaum unterscheiden (GOFFNER et al., 1994; SARNI et al., 1984; LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981). Die Ergebnisse scheinen zum einen erwartungsgemäß pflanzenspezifisch zu sein, zum anderen aber auch lediglich von den Testbedingungen abzuhängen. Ein gutes Beispiel hierfür bieten die Untersuchungen von LÜDERITZ und GRISEBACH (1981) an *Glycine max* L. und *Picea abies* L., da sie die starke Abhängigkeit der  $K_M$ -Werte vom Puffersystem aufzeigen. So betrug die Werte für Feruloyl-CoA im Kambiumsaft der Fichte mit Phosphatpuffer 5,2  $\mu\text{M}$  und mit Citrat-Puffer 59  $\mu\text{M}$ . Ähnliches ergaben Messungen mit Sojabohnen-Zellkulturen, bei denen für Feruloyl-CoA ein  $K_M$ -Wert von 5,2  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer und einer von 73  $\mu\text{M}$  in Citrat-Puffer bestimmt wurde. Zwischen den verschiedenen Ergebnissen liegt ungefähr eine Zehnerpotenz. Es lassen sich in der Literatur  $K_M$ -Werte der CCRs anderer Pflanzen für diverse Substrate finden, die zum Teil in der gleichen Größenordnung liegen wie bei der CCR aus *L. album* X4 (z.B. 73  $\mu\text{M}$  für Feruloyl-CoA, 28  $\mu\text{M}$  für NADPH, 400  $\mu\text{M}$  für Sinapoyl-CoA in Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* (WENGENMAYER et al., 1976) und 22  $\mu\text{M}$  für Feruloyl-CoA,

45  $\mu\text{M}$  für NADPH in *Forsythia suspensa* (GROSS und KREITEN, 1975)). Teilweise sind die Werte aber auch um mehr als eine Zehnerpotenz kleiner (LAUVERGEAT et al., 2001; SARNI et al., 1984). Angesichts der Tatsache, daß die Michaelis-Menten-Konstanten stark vom Testsystem beeinflusst werden, darf man solche Literaturvergleiche demnach nicht zu hoch bewerten.

Die meisten biochemischen Untersuchungen zur CCR anderer Pflanzenspezies zeigen eine Akzeptanz von *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeooyl-CoA als Substrate (GOFFNER et al., 1994; LAUVERGEAT et al., 2001; WENGENMAYER et al., 1976; SARNI et al., 1984; LÜDERITZ und GRISEBACH, 1981). Leider konnte für die CCR aus *L. album* X4-Zellsuspensionskulturen keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Substrate umgesetzt werden können, da die entsprechenden Standardsubstanzen für die eindeutige Identifikation der Produkte auf den HPLC-Chromatogrammen nicht beschafft werden konnten (III.8.5).

#### IV.4 Abschließende Bemerkungen

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden, in denen über eine Veränderung der Monolignolbiosynthese an gentechnisch veränderten Pflanzen berichtet wurde (z.B. PIQUEMAL et al., 1998; PINÇON et al., 2001; CHABANNES et al., 2001; RUEL et al., 2001). Diese Untersuchungen beschäftigten sich aber bisher immer mit den Auswirkungen auf die Lignifizierung der Pflanze und nicht mit Konsequenzen auf die Lignanproduktion.

Da es sich bei den Lignanen um eine sowohl medizinisch als auch wirtschaftlich interessante Stoffklasse handelt (I.2, I.3), wären gentechnische Experimente zur Steigerung der pflanzlichen Lignanproduktion sinnvoll. Die für die Lignifizierung festgestellte Schlüsselfunktion der CCR (PIQUEMAL, 1998) könnte auch bei der Lignanbiosynthese von Bedeutung sein. Während es jedoch bei den bisher veröffentlichten Ergebnissen darauf ankam, den Ligningehalt der Pflanzen durch Herunterregulierung der CCR zu senken, um so das Holz für die Papierherstellung zu optimieren, müßte für eine mögliche Erhöhung der Lignanproduktion die Transkriptionsrate und somit die Enzymaktivität der CCR gesteigert werden. Die Auswirkungen eines solchen gentechnischen Eingriffs auf *L. album* können kaum abgeschätzt werden, da man nicht weiß, welche regulierenden Funktionen im Stoffwechsel bei einer starken Überexpression der CCR auftreten. So berichteten CHABANNES et al. (2001) beispielsweise bei einer gleichzeitigen Herunterregulierung der CCR und der CAD in Tabakpflanzen über biochemische Veränderungen der Polysaccharide, der phenolischen Komponenten der Zellwand und der löslichen Phenole. Ein weiteres Beispiel lieferte die Überexpression eines Stilben-Synthase-Gens in Tabakpflanzen. Dabei konkurrierten wahrscheinlich die Stilben-Synthase und die endogene Chalkon-Synthase um die Substrate *p*-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA, wodurch eine Veränderung der Blütenfarbe und Sterilität bei männlichen Pflanzen hervorgerufen wurde (FISCHER et al., 1997).

Die im Rahmen dieser Arbeit referierten Ergebnisse mit dem Auffinden einer vollständigen CCR-cDNA können einen grundlegenden Schritt zu Transformationsversuchen der *L. album*-Pflanze bzw. der Zellkultur hinsichtlich einer CCR-Überexpression liefern. Die Charakterisierung der CCR zeigte, daß die in der *L. album*-cDNA gefundene CCR aufgrund ihrer Substratspezifität bei der Anlieferung des Lignanausgangsstoffes Coniferylalkohol beteiligt sein

kann. Anders wäre es gewesen, wenn sie Feruloyl-CoA nur schlecht oder gar nicht hätte umsetzen können. Das Ausschalten der hier gefundenen CCR durch Antisense-Experimente mit *L. album*-Pflanzen und Zellkulturen könnte genauso Hinweise über die Beteiligung in der Lignanbiosynthese liefern wie die Überexpression des Enzyms. Ein erstes Antisense-Konstrukt zur Transformation von *L. album* mit Hilfe eines Agrobakterienstammes wurde bereits hergestellt. Der Gentransfer könnte sowohl mit *L. album*-Pflanzen als auch mit Protoplasten versucht werden. Ein Protokoll zur Protoplastenisolierung aus *L. album* X4-Zellsuspensionskulturen ist vorhanden (HENGES, 1999), und es gibt diverse Veröffentlichungen über die Transformation von Protoplasten anderer Pflanzenspezies mittels *Agrobacterium tumefaciens* (LING und BINDING, 1997; KARESCH et al., 1991; BINNS, 1991). Welche Methode effizienter und erfolgreicher ist, muß sich zeigen.

## V ZUSAMMENFASSUNG

Zellkulturen von *Linum album* sind in der Lage, größere Mengen des Lignans Podophyllotoxin (PTOX) zu synthetisieren, das in Form seiner semisynthetischen Derivate Teniposid, Etoposid und Etopophos<sup>®</sup> in der Krebstherapie eingesetzt wird.

Die Biosynthese der Lignane beginnt wahrscheinlich mit der Dimerisierung zweier Coniferylalkohol-Radikale, die dem Monolignolzweig des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels entstammen. In bezug auf die Lignifizierung von Pflanzen wurde bereits festgestellt, daß die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase (CCR), das erste Enzym des Monolignolsyntheseweges, eine regulierende Funktion bei der Anlieferung der Cinnamylalkohole besitzt. Sie wandelt in Anwesenheit von NADPH Cinnamoyl-CoA-Ester in ihre korrespondierenden Cinnamaldehyde um. Möglicherweise dient die CCR bei der Lignanbiosynthese ebenfalls als Kontrollpunkt, so daß eine gezielte gentechnische Manipulation eine Steigerung der PTOX-Synthese bewirken könnte. Die CCR wies im Kulturverlauf eine geringere auf das Frischgewicht bezogene Enzymaktivität auf als die Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD). Dies könnte als Hinweis auf eine Regulationsfunktion der CCR gedeutet werden, da die CAD mehr Coniferylalkohol zur Lignansynthese produzieren könnte, wenn genügend Coniferaldehyd als Substrat der CAD von der CCR angeliefert würde.

Bei einer Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen von *L. album* X4 über einen Zeitraum von drei Wochen lag der maximale PTOX-Gehalt von 3,5 mg/g TG am 10. Kulturtag. Aus den über die Kulturperiode gewonnenen Daten konnten Aktivitätsprofile der CCR und anderer Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels erstellt werden, die deutlich machten, daß sich der geeignete Zeitraum für die mRNA-Isolierung aus den Zellen zur Herstellung einer cDNA-Bank vom 4. bis zum 7. Kulturtag erstreckte. Die cDNA-Bibliothek wurde mit einer 346 bp langen homologen Sonde aus *L. album* nach CCR-Isoformen gesichtet. Es wurde ein 1488 bp langer Vollängenklon, der für ein etwa 37 kDa großes Protein codiert, isoliert, der mit Hilfe von Sequenzvergleichen und durch heterologe Expression des ORFs in *E. coli* eindeutig als CCR identifiziert werden konnte.

Southern-Analysen wiesen darauf hin, daß es in *L. album* nicht nur eine, sondern mehrere CCR-Isoformen geben könnte.

Ein aus *L. album*-Zellsuspensionskulturen gewonnener Proteinextrakt wurde nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung im Bereich von 30 bis 45 % Sättigung weiter durch Anionenaustausch-Chromatographie über DEAE-Sephacel gereinigt. Dabei wurde die CCR von der CAD abgetrennt, so daß eine Bestimmung der CCR-K<sub>M</sub>-Werte möglich wurde.

Die biochemischen Charakteristika wie K<sub>M</sub>-Werte, pH- und Temperaturoptima der CCR aus dem angereinigten Pflanzenzellextrakt und des in *E. coli* heterolog exprimierten Enzyms wurden verglichen. Das Temperaturoptimum der CCR lag bei beiden Extrakten mit Sinapoyl-CoA als Substrat zwischen 28 °C und 38 °C. Bei Verwendung von Feruloyl-CoA als Substrat wurde mit der pflanzlichen Proteinlösung derselbe Optimumsbereich wie mit Sinapoyl-CoA festgestellt, während beim *E. coli*-Extrakt die höchsten Enzymaktivitäten bei Temperaturen zwischen 30 und 40 °C erreicht wurden. Die pH-Optima befanden sich mit Feruloyl-CoA zwischen pH 6,0 und pH 6,7 und mit Sinapoyl-CoA in einem Bereich von pH 6,3 bis pH 7,4. Die K<sub>M</sub>-Wert-Bestimmungen für Feruloyl-CoA, Sinapoyl-CoA und NADPH ergaben nahezu

übereinstimmende Konstanten bei beiden Proteinextrakten, wobei die Affinität der CCR zu Feruloyl-CoA ( $K_M$  mit *L. album*-Zellextrakt: 47  $\mu\text{M}$  und mit *E. coli*-Extrakt: 74  $\mu\text{M}$ ) höher war als zu Sinapoyl-CoA ( $K_M$  mit *L. album*-Zellextrakt: 363  $\mu\text{M}$  und mit *E. coli*-Extrakt: 568  $\mu\text{M}$ ). Der  $K_M$ -Wert für NADPH lag in beiden Fällen bei etwa 30  $\mu\text{M}$ .

Mit Hilfe der biochemischen Charakteristika wurden zwar keine CCR-Isoformen entdeckt, doch schließen die Ergebnisse dieser Arbeit auch nicht das Vorkommen von CCR-Isoformen in *L. album* aus.

Zukünftige Transformationsstudien an *L. album* können zeigen, ob die gefundene CCR regulierende Eigenschaften auf die Lignan-Biosynthese besitzt.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

- Ayres, D.C. und Loike, J.D.** (1990). Lignans - Chemical, biological and clinical properties. In Chemistry and pharmacology of natural products (Cambridge University Press).
- Baker, M.E. und Blasco, R.** (1992). Expansion of the mammalian 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose 4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. *FEBS LETTERS* **301**, 89-93.
- Baker, M.E., Luu-The, V., Simard, J. und Labrie, F.** (1990). A common ancestor for mammalian 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and plant dihydroflavonol reductase. *Biochemistry Journal* **269**, 558-559.
- Binns, A.** (1991). Transformation of wall deficient cultured tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **96**, 498-506
- Boehringer Mannheim GmbH** (1995). The dig system user's guide for filter hybridization.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Broomhead, A.J., Rahman, M.M., Dewick, P.M., Jackson, D.E. und Lucas, J.A.** (1991). Matairesinol as precursor of *Podophyllum* lignans. *Phytochemistry* **30**, 1489-1492.
- Canel, C., Moraes, R.M., Dayan, F.E. und Ferreira, D.** (2000). Molecules of interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry* **54**, 115-120.
- Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J.M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J. und Boudet, A.M.** (2001). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal* **28**, 257-270.
- Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J.-P. und Boudet, A.-M.** (2001 b). In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *The Plant Journal* **28**, 271-282.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A.K., Bhojwani, S.S. und Bisaria, V.S.** (2001). Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for production of podophyllotoxin. *Biotechnology Letters* **23**, 2063-2066.
- Damayanthi, Y. und Lown, J.W.** (1998). Podophyllotoxins: Current status and recent developments. *Current Medicinal Chemistry* **5**, 205-252.
- Davin, L.B. und Lewis, N.G.** (1991). Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In Phenolic Metabolism in Plants, H.A. Stafford and R.K. Ibrahim, Hrsg. (New York, London: Rec. Adv. Phytochem., Plenum Press), 325-375.
- Davin, L.B., Wang, H.-B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S. und Lewis, N.G.** (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362-366.
- Dewick, P.M.** (1989). Biosynthesis of Lignans. (Amsterdam, Oxford, New York, Tokio: Elsevier).

- Doyle, J.J. und Doyle, J.L.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Empt, U., Alfermann, A.W., Pras, N. und Petersen, M.** (2000). The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* **74**, 145-150.
- Fischer, R., Budde, I. und Hain, R.**, (1997). Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *The Plant Journal* **11** (3), 489-498.
- Goffner, D., Campbell, M.M., Campargue, C., Clastre, M., Borderies, G., Boudet, A. und Boudet, A.M.** (1994). Purification and characterization of cinnamoyl-Coenzyme A: NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiology* **106**, 625-632.
- Gross, G.G.** (1985). Biosynthesis and metabolism of phenolic acids and monolignols. In *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, T. Higuchi, Hrsg. (New York: Academic Press), 229-271.
- Gross, G.G. und Kreiten, W.** (1975). Reduction of coenzyme A thioesters of cinnamic acids with an enzyme preparation from lignifying tissue of *Forsythia*. *FEBS LETTERS* **54**, 259-262.
- Hahlbrock, K.** (1976). Regulation of phenylalanine ammonia-lyase activity in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* **63**, 137-145.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Hande, K.R.** (1998). Clinical Oncology Update - Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer* **34**, 1514-1521.
- Heldt, H.-W.** (1999). *Pflanzenbiochemie*. (Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl.).
- Heller, W. und Forkmann, G.** (1993). Biosynthesis of flavonoids. In *The flavonoids: Advances in research since 1986*, J.B. Harborne, Hrsg. (London: Chapman & Hall), 499-535.
- Henges, A.** (1999). *Biosynthese und Kompartimentierung von Lignanen in Zellkulturen von Linum album*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Dissertation).
- Hess, D.** (1991). *Pflanzenphysiologie - Molekulare und biochemisch-physiologische Grundlagen von Stoffwechsel, Entwicklung und Ökologie*. (Stuttgart: Verl. Eugen Ulmer).
- Imbert, T.F.** (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* **80**, 207-222.
- Karesch, H., Bilang, R., Mittelsten Scheid, O. und Potrykus, I.** (1991). Direct gene transfer to protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **9**, 571-574
- Katayama, T., Davin, L.B., Chu, A. und Lewis, N.G.** (1992). Novel benzylic ether reductions in lignan biogenesis in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **33**, 581-591.
- Keen, N.T. und Littlefield, L.J.** (1979). The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*. *Physiological Plant Pathway* **14**, 265-280.
- Kieran, P.M., MacLoughlin, P.F. und Malone, D.M.** (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* **59**, 39-52.
- Kreße, G.-B.** (1998). Enzymatische Aktivitätstests. In *Bioanalytik*. F. Lottspeich und H. Zorbas, Hrsg. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), 49-65.



- Lacombe, E., Doorselaere, J.V., Boerjan, W., Boudet, A.M. und Grima-Pettenati, J.** (2000). Characterization of *cis*-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *The Plant Journal* **23**, 663-676.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Doorselaere, J.V., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A.-M. und Grima-Pettenati, J.** (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *The Plant Journal* **11**, 429-441.
- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. und Grima-Pettenati, J.** (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* **57**, 1187–1195.
- Lewis, N.G. und Davin, L.B.** (1994). Evolution of lignan and neolignan biochemical pathways. In *Evolution of Natural Products*, D. Nes, Hrsg. (Washington DC: ACS Symposium Series), 202-246.
- Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T. und Chiang, V.L.** (2000). 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 6537-6545.
- Ling, H.-Q. und Binding, H.** (1997). Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffruticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology* **151**, 479-488
- Lüderitz, T. und Grisebach, H.** (1981). Enzymic synthesis of lignin precursors: comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP<sup>+</sup> dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Biochemistry* **119**, 115-124.
- MacRae, W.D. und Towers, G.H.N.** (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **23**, 1207-1220.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P. und Li, B.W.** (1999). Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3173-3180.
- Meinhard, E.J.** (1995). Identifizierung und Reinigung der Rosmarinsäure-Synthase aus Zellkulturen von *Coleus blumei*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Dissertation).
- Molog, G.A., Empt, U., Kuhlmann, S., van Uden, W., Pras, N., Alfermann, A.W. und Petersen, M.** (2001). Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans. *Planta* **214**, 288-294.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nadeem, M., Palni, L.M.S., Purohit, A.N., Pandey, H. und Nandi, S.K.** (2000). Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. *Biological Conservation* **92**, 121-129.
- Oliva, A., Moraes, R. M., Watson, S. B., Duke, S. O. und Dayan, F. E.** (2002). Aryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **72**, 45-54

- Østergaard, L., Lauvergeat, V., Naested, H., Mattsson, O. und Munday, J.** (2001). Two differentially regulated *Arabidopsis* genes define a new branch of the DFR superfamily. *Plant Science* **160**, 463-472.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W. und Dixon, R.A.** (2001). Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. *The Plant Journal* **25**, 193-202.
- Petersen, M. und Alfermann, A.W.** (2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 135-142.
- Petersen, M., Strack, D. und Matern, U.** (1999). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In *Biochemistry of plant secondary metabolism*, M. Wink, Hrsg. (Sheffield Acad. Press), 151-221.
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A.-M. und Grima-Pettenati, J.** (1998). Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant Molecular Biology* **38**, 671-676.
- Pinçon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J.-P., Boudet, A.M. und Legrand, M.** (2001). Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-*O*-methyltransferase I and cinnamoyl coenzyme A reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiology* **126**, 145-155.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. und Boudet, A.-M.** (1998). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **13**, 71-83.
- Rhodes, M.J.C. und Wooltorton, L.S.C.** (1974). Reduction of the CoA thioesters of *p*-coumaric and ferulic acids by extracts of aged *Brassica Napo-Brassica* root tissue. *Phytochemistry* **13**, 107-110.
- Richter, G.** (1998). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen - Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels.* (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl.).
- Römpp-Lexikon.** (1997). *Naturstoffe*, W. Steglich, B. Fugmann, and S. Lang-Fugmann, Hrsg. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl.).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarni, F., Grand, C. und Boudet, A.M.** (1984). Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). *European Journal of Biochemistry* **139**, 259-265.
- Schmitt, J. und Petersen, M.** (2002). Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* cell suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**, 91-98.
- Schütte, H.R.** (1993). Secondary plant substances: Further topics of the phenylpropanoid metabolism. *Progress in Botany* **54**, 218-236.
- Schwelm, A.** (2001). *Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an Zellkulturen von Linum album mit unterschiedlicher Akkumulation von Lignan.* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit).
- Seidel, V., Windhövel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroyo, R.R.J., Medarde, M., Petersen, M. und Woolley, J.G.** (2002). Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album*

- cell cultures. zur Veröffentlichung eingereicht
- Seitz, H.U., Seitz, U. und Alfermann, A.W.** (1985). Pflanzliche Gewebekultur - Ein Praktikum. (Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- Smollny, T.** (1993). Bildung von Lignanen bei Zellkulturen von *Linum album*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit).
- Smollny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shahsavari, A., Petersen, M. und Alfermann, A.W.** (1998). Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry* **48**, 975-979.
- Stähelin, H.F. und von Wartburg, A.** (1991). The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: Ninth Cain memorial award lecture. *Cancer Research* **51**, 5-15.
- Stöckigt, J., Mansell, R.L., Gross, G.G. und Zenk, M.H.** (1973). Enzymic reduction of p-coumaric acid via p-coumaroyl-CoA to p-coumaryl alcohol by a cell-free system from *Forsythia* sp. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **70**, 305-307.
- Stöckigt, J. und Zenk, M.H.** (1975). Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung* **30c**, 352-358.
- Strack, D., Keller, H. und Weissenböck, G.** (1987). Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparations from rye (*Secale cereale*) primary leaves. *Journal of Plant Physiology* **131**, 61-73.
- Tabata, M. und Fujita, Y.** (1985). Production of shikonin by plant cell cultures. In *Biotechnology in plant science*, M. Zaitlin, P. Day, and A. Hollaender, Hrsg. (London: Academic Press), 207-218.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N. und Konoshima, M.** (1974). Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* **13**, 927-932.
- Taiz, L. und Zeiger, E.** (2000). *Physiologie der Pflanzen*. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad. Verl.).
- Ulbrich, B., Wiesner, W. und Arens, H.** (1985). Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, K.-H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard, Hrsg. (Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer Verlag), 293-303.
- Umezawa, T., Davin, L.B. und Lewis, N.G.** (1991). Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 10210-10217.
- Weiss, S.G., Tin-Wa, M., R. E. Perdue, J. und Farnsworth, N.R.** (1975). Potential anticancer agents II: Antitumor and cytotoxic lignans from *Linum album* (Linaceae). *Journal of Pharmaceutical Science* **64**, 95-98.
- Wengenmayer, H., Ebel, J. und Grisebach, H.** (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors: purification and properties of a cinnamoyl-CoA: NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *European Journal of Biochemistry* **65**, 529-536.
- Whetten, R. und Sederoff, R.** (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1001-1013.
- Wichers, J.H., Harkes, M.P. und Arroo, R.R.J.** (1990). Occurrence of 5-methoxypodophyllotoxin in plants, cell cultures and regenerated plants of *Linum flavum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **23**, 93-100.

- Wilson, K. und Goulding, K.H.** (1991). Methoden der Biochemie. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag).
- Windhövel, J.** (1998). Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*: Untersuchungen zur Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit).
- Winkler, H.** (1931). Linaceae. In Die natürlichen Pflanzenfamilien, A. Engler, Hrsg. (Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann), 112-120.
- Wyrambik, D.** (1977). Zur Biosynthese von Ligninvorstufen – Reinigung und Charakterisierung von Zimtalkohol-Dehydrogenasen aus Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* L. (Zimtalkohol: NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase). (Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Breisgau: Dissertation)
- Zenk, M.H.** (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861-3863.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A.Y.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.

## VII ANHANG

### VII.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

|                |   | Seite |
|----------------|---|-------|
| <b>Abb. 1</b>  | Podophyllotoxin und seine semisynthetischen Derivate Teniposid, Etoposid und Etopophos  | 2     |
| <b>Abb. 2</b>  | <i>Linum album</i> Kotschy  | 4     |
| <b>Abb. 3</b>  | Zellsuspensionskulturen von <i>Linum album</i>  | 5     |
| <b>Abb. 4</b>  | vom Medium befreite Zellaggregate von <i>Linum album</i>  | 5     |
| <b>Abb. 5</b>  | Allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel  | 7     |
| <b>Abb. 6</b>  | Hypothetischer Biosyntheseweg von Podophyllotoxin und verwandten Lignan   | 9     |
| <b>Abb. 7</b>  | Veränderung von Frisch- und Trockengewicht im Laufe der Kulturdauer   | 42    |
| <b>Abb. 8</b>  | Abhängigkeit der Mediumsparameter pH-Wert, Leitfähigkeit und Zuckerkonzentration vom Alter der <i>L. album</i> -Suspensionskultur | 44    |
| <b>Abb. 9</b>  | Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Kulturdauer   | 45    |
| <b>Abb. 10</b> | Die Aktivität der Phenylalanin Ammonium-Lyase im Kulturverlauf  | 46    |
| <b>Abb. 11</b> | Veränderung der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase-Aktivität im Kulturverlauf bei Verwendung von Ferulasäure als Substrat                | 47    |
| <b>Abb. 12</b> | Zimtalkohol-Dehydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit Coniferylalkohol als Substrat                         | 48    |
| <b>Abb. 13</b> | Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit Feruloyl-CoA als Substrat                    | 49    |
| <b>Abb. 14</b> | PTOX-Gehalt pro Gramm Trockengewicht einer Suspensionskultur von <i>L. album</i> in Abhängigkeit vom Kulturalter                  | 49    |
| <b>Abb. 15</b> | Homologe CCR-Sonde aus <i>Linum album</i> X4  | 50    |
| <b>Abb. 16</b> | Gelfoto der elektrophoretischen Auftrennung von Restriktionshydrolysen zur Identifizierung unterschiedlicher CCR-Klone            | 51    |
| <b>Abb. 17</b> | Nukleotidsequenz der cDNA und Aminosäuresequenz des offenen Leserasters der CCR aus <i>Linum album</i>                            | 52    |
| <b>Abb. 18</b> | Multipler Sequenzvergleich unterschiedlicher CCRs und einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR)                                     | 54    |
| <b>Abb. 19</b> | Southern-Transfer-Analyse von genomischer DNA von <i>L. album</i> X4  | 55    |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>Abb. 20</b> | Agarosegel mit RNA und Northern-Transfer   | 57 |
| <b>Abb. 21</b> | Anionenaustauschchromatographie von Protein einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (30-45 %) über eine DEAE-Sephacel-Säule   | 58 |
| <b>Abb. 22</b> | Optimierung der Induktionsdauer zur Expression der <i>L. album</i> -CCR in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS   | 60 |
| <b>Abb. 23</b> | Stabilisierung der heterolog exprimierten CCR  | 61 |
| <b>Abb. 24</b> | Zeitabhängigkeit des aus <i>L. album</i> -Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts im Vergleich zu der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA        | 63 |
| <b>Abb. 25</b> | Proteinabhängigkeit des aus <i>L. album</i> -Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts im Vergleich zu der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA     | 64 |
| <b>Abb. 26</b> | Temperatur-Abhängigkeit des aus <i>L. album</i> -Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts im Vergleich zu der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA | 65 |
| <b>Abb. 27</b> | pH-Abhängigkeit des aus <i>L. album</i> -Zellen gewonnenen pflanzlichen CCR-Extrakts im Vergleich zu der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten CCR unter Verwendung der Substrate Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA         | 66 |
| <b>Abb. 28</b> | Michaelis-Menten-Kinetiken für Feruloyl-CoA und Sinapoyl-CoA bei Verwendung der in <i>E. coli</i> heterolog exprimierten CCR und der aus den <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen gewonnenen Proteinlösung             | 68 |
| <b>Abb. 29</b> | Michaelis-Menten-Kinetiken für NADPH (Feruloyl-CoA im Überschuß) bei Verwendung der in <i>E. coli</i> heterolog exprimierten CCR und der aus den <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen gewonnenen Proteinlösung         | 69 |
| <b>Abb. 30</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für Feruloyl-CoA   | 70 |
| <b>Abb. 31</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für Feruloyl-CoA   | 70 |
| <b>Abb. 32</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für Sinapoyl-CoA   | 70 |
| <b>Abb. 33</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für Sinapoyl-CoA   | 70 |
| <b>Abb. 34</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Lineweaver-Burk für NADPH  | 70 |
| <b>Abb. 35</b> | $K_M$ -Wert-Bestimmung nach Hanes für NADPH  | 70 |

|                |  |       |
|----------------|--|-------|
| <b>Abb. 36</b> | pGEM-T-Klonierungsvektor der Firma Promega (USA)   | 97    |
| <b>Abb. 37</b> | pBK-CMV-Phagemid-Vektor der Firma Stratagene (USA)   | 98    |
| <b>Abb. 38</b> | pTrc99A-Expressionsvektor der Firma Amersham Pharmacia   | 99    |
| <b>Abb. 39</b> | 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)  |       |
|                |  | Seite |
| <b>Tab. 1</b>  | Zusammensetzung des veränderten MS-Mediums für <i>L. album</i> -Zellsuspensionskulturen  | 14    |
| <b>Tab. 2</b>  | UV-Absorptionsdaten für Hydroxycinnamoyl-CoA-Derivate  | 16    |
| <b>Tab. 3</b>  | Gradientenprogramm zur Elution der CCR   | 17    |
| <b>Tab. 4</b>  | Zusammensetzung des CCR-Testansatzes   | 17    |
| <b>Tab. 5</b>  | Gradientenprogramm bei Verwendung des GROM-SIL-Säulensystems   | 19    |
| <b>Tab. 6</b>  | Gradientenprogramm bei Verwendung des Hypersil-Säulensystems   | 20    |
| <b>Tab. 7</b>  | Gradientensystem zur Detektion von Podophyllotoxin   | 22    |
| <b>Tab. 8</b>  | Aufreinigungsschema der CCR  | 59    |
| <b>Tab. 9</b>  | Gemittelte Resultate der $K_M$ -Wert-Bestimmung mit pflanzlichem Zellextrakt mit Standardabweichungen  | 67    |
| <b>Tab. 10</b> | Gemittelte Resultate der $K_M$ -Wert-Bestimmung mit der in <i>E. coli</i> heterolog exprimierten <i>L. album</i> -CCR mit Standardabweichungen | 68    |

## VII.2 Abkürzungen und Maßeinheiten außerhalb des SI-Systems

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| $\alpha$ - <sup>32</sup> -P-dATP | 2'-Desoxyadenin-5'-Triphosphat, mit radioaktivem Phosphor markiert |
| $\alpha$ -PEL                    | $\alpha$ -Peltatin   |
| Abb.                             | Abbildung  |
| ATP                              | Adenosintriphosphat  |
| AU                               | Absorptionseinheiten   |
| $\beta$ -PEL                     | $\beta$ -Peltatin  |
| $\beta$ -PEL-A-Metet             | $\beta$ -Peltatin-A Methyl ether 4-Hydroxylase                     |
| $\beta$ -PEL-6-OMT               | $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase                            |
| BLAST                            | Basic Local Alignment Tool   |
| bp                               | Basenpaare   |
| BSA                              | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)                          |
| CAD                              | Zimtalkohol-Dehydrogenase  |
| CAH                              | Zimtsäure 4-Hydroxylase  |
| CCR                              | Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase                                 |
| 4CL                              | Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase  |
| cDNA                             | komplementäre DNA (complementary DNA)                              |
| CoA                              | Coenzym A  |
| CONALC                           | Coniferylalkohol   |
| CTAB                             | Cetyltrimethylammoniumbromid                                       |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| dATP                  | Desoxyadenosin-5'-triphosphat   |
| dUTP                  | Desoxyuracil-5'-triphosphat   |
| DEAE                  | Diethylaminoethyl   |
| DFR                   | Dihydroflavonol-4-Reduktase   |
| DIG                   | Digoxygenin   |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure  |
| DNase                 | Desoxyribonuklease  |
| dNTP                  | Desoxyribonukleotid   |
| DOP                   | Desoxypodophyllotoxin   |
| DOP-6-H               | Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase   |
| DOP-7-H               | Desoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase   |
| DTT                   | Dithiothreitol  |
| EB                    | Elutionspuffer (elution buffer)   |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDTA                  | Ethylendinitrilotetraacetat (Titriplex III)   |
| EGTA                  | Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (Titriplex VI)  |
| ε                     | Epsilon, Extinktionskoeffizient   |
| F.-CoA                | Feruloyl-CoA  |
| FG                    | Frischgewicht   |
| G <sub>2</sub> -Phase | zweite Ruhephase (Gap 2-Phase)  |
| h                     | Stunde  |
| HIV                   | Humanes Immundefizienz-Virus  |
| HPLC                  | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography) |
| IPTG                  | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid  |
| kb                    | Kilobasen   |
| kDa                   | Kilodalton  |
| K <sub>M</sub>        | Michaelis-Menten Konstante  |
| KPi-Puffer            | Kalium-Phosphat-Puffer  |
| <i>L. album</i>       | <i>Linum album</i>  |
| λ                     | Lambda, Wellenlänge   |
| LARI                  | Lariciresinol   |
| LB-Medium             | Luria-Bertani-Medium  |
| LBM-Medium            | Luria-Bertani-Medium mit Maltose  |
| MAT                   | Matairesinol  |
| min                   | Minute(n)   |
| MOPS                  | 3-Morpholino-1-propansulfonsäure  |
| MPTOX                 | 6-Methoxypodophyllotoxin  |
| MS-Medium             | Medium nach Murashige und Skoog, 1962   |
| mRNA                  | messenger RNA   |
| NAA                   | Naphtylessigsäure   |
| NAD <sup>+</sup>      | Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)   |
| NADH                  | Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)  |
| NADP <sup>+</sup>     | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)   |
| NADPH                 | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)  |
| NZY-Medium            | NZ-Amine-Hefeextrakt-Medium (NZ-amine-yeast)  |
| OD                    | optische Dichte   |
| OMT                   | O-Methyltransferase   |
| ORF                   | Offener Leserahmen, offenes Leseraster (open reading frame)   |
| p.A.                  | zur Analyse (pro analysi) (Reinheitsgrad)   |
| <i>P. hexandrum</i>   | <i>Podophyllum hexandrum</i>  |
| <i>P. peltatum</i>    | <i>Podophyllum peltatum</i>   |
| PAL                   | Phenylalanin Ammonium-Lyase   |
| PCR                   | Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)   |
| pfu                   | Plaque-bildende Einheiten (plaque forming unit(s))  |



|                           |  |
|---------------------------|--|
| PINO                      | Pinoresinol  |
| PLR                       | Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase  |
| PMSF                      | Phenylmethansulfonylfluorid  |
| Pol I                     | Polymerase I   |
| Poly(A) <sup>+</sup> -RNA | polyadenylierte Ribonukleinsäure   |
| PS                        | Pinoresinol-Synthase   |
| PTOX                      | Podophyllotoxin  |
| RNA                       | Ribonukleinsäure   |
| RNase                     | Ribonuklease   |
| rRNA                      | ribosomale RNA   |
| RT                        | Raumtemperatur   |
| RT-PCR                    | Reverse Transkriptase PCR  |
| S.-CoA                    | Sinapoyl-CoA   |
| SDH                       | Secoisolariciresinol Dehydrogenase   |
| S-Phase                   | Synthese-Phase   |
| SDS                       | Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)                                    |
| SECO                      | Secoisolariciresinol   |
| SSC                       | <u>S</u> odium chloride <u>S</u> odium <u>C</u> itrate                           |
| SSPE                      | <u>S</u> odium chloride <u>S</u> odium dihydrogen <u>P</u> hosphate <u>E</u> DTA |
| Tab.                      | Tabelle  |
| TAE                       | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA                                      |
| Taq-Polymerase            | Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>                                     |
| TENS                      | <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA- <u>N</u> aOH- <u>S</u> DS                            |
| TE-Puffer                 | <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA   |
| TFB1                      | Transferpuffer 1 (transfer buffer 1)   |
| TFB2                      | Transferpuffer 2 (transfer buffer 2)   |
| TG                        | Trockengewicht   |
| Tris                      | TRIZMA (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)  |
| tRNA                      | Transfer-RNA   |
| Tween                     | Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -sorbitanmonooleat                                 |
| Upm                       | Umdrehungen pro Minute   |
| usw.                      | und so weiter  |
| UTR                       | Untranslatierte Region   |
| UV                        | Ultraviolett   |
| V <sub>max</sub>          | Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion   |
| v/v                       | Volumen pro Volumen  |
| w/v                       | Gewicht pro Volumen (weight per volume)  |
| X-GAL                     | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid                                    |
| z.B.                      | zum Beispiel   |

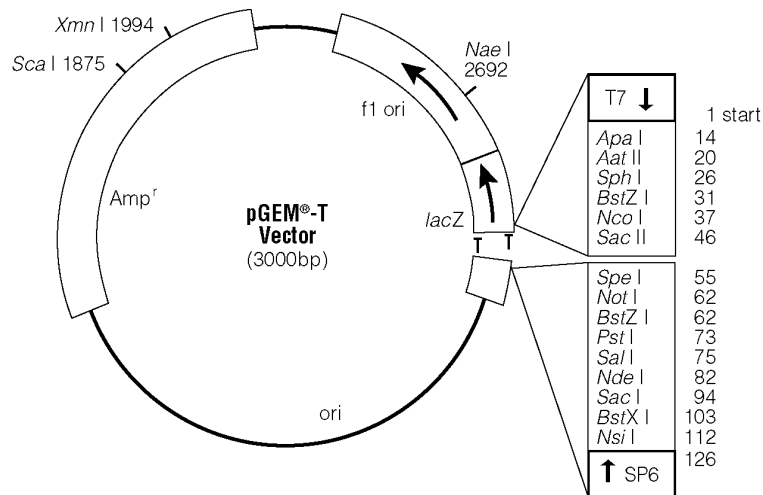
### VII.3 Nukleinsäuren

|   |         |   |        |
|---|---------|---|--------|
| A | Adenin  | G | Guanin |
| C | Cytosin | T | Thymin |

## VII.4 Aminosäuren

|   |       |                |   |       |            |
|---|-------|----------------|---|-------|------------|
| A | (Ala) | Alanin         | M | (Met) | Methionin  |
| C | (Cys) | Cystein        | N | (Asn) | Asparagin  |
| D | (Asp) | Asparaginsäure | P | (Pro) | Prolin     |
| E | (Glu) | Glutaminsäure  | Q | (Gln) | Glutamin   |
| F | (Phe) | Phenylalanin   | R | (Arg) | Arginin    |
| G | (Gly) | Glycin         | S | (Ser) | Serin      |
| H | (His) | Histidin       | T | (Thr) | Threonin   |
| I | (Iso) | Isoleucin      | V | (Val) | Valin      |
| K | (Lys) | Lysin          | W | (Trp) | Tryptophan |
| L | (Leu) | Leucin         | Y | (Tyr) | Tyrosin    |

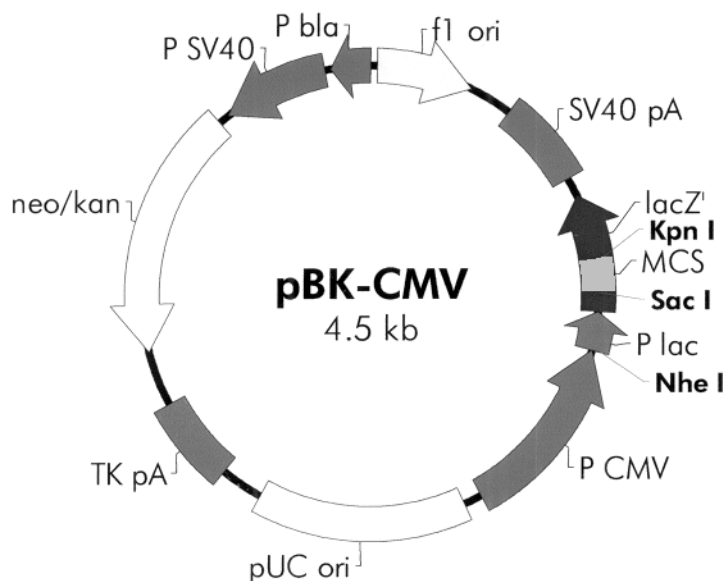
## VII.5 Vektorkarten



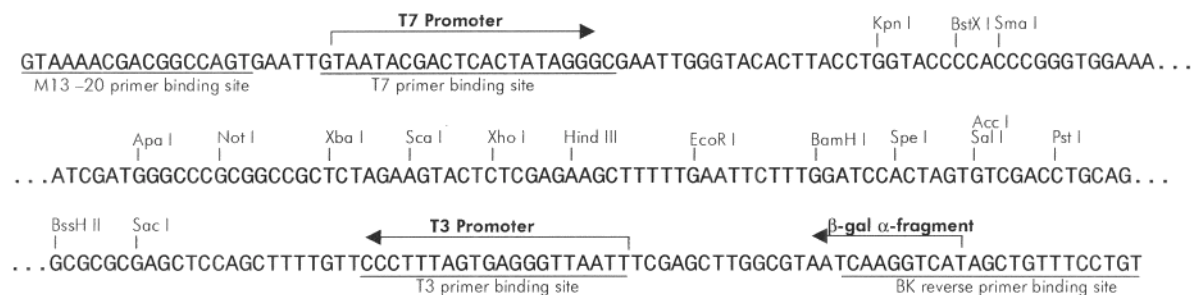
### pGEM<sup>®</sup>-T Vector Sequence reference points:

|   |                    |
|---|--------------------|
| T7 RNA Polymerase transcription initiation site   | 1                  |
| SP6 RNA Polymerase transcription initiation site  | 126                |
| T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)            | 2984-3             |
| SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)           | 124-143            |
| multiple cloning region                           | 10-113             |
| <i>lacZ</i> start codon                           | 165                |
| <i>lac</i> operon sequences                       | 2821-2981, 151-380 |
| <i>lac</i> operator                               | 185-201            |
| $\beta$ -lactamase coding region                  | 1322-2182          |
| phage f1 region                                   | 2365-2820          |
| binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer | 2941-2957          |
| binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer | 161-177            |

Abb. 36: pGEM-T-Klonierungsvektor der Firma Promega (USA)

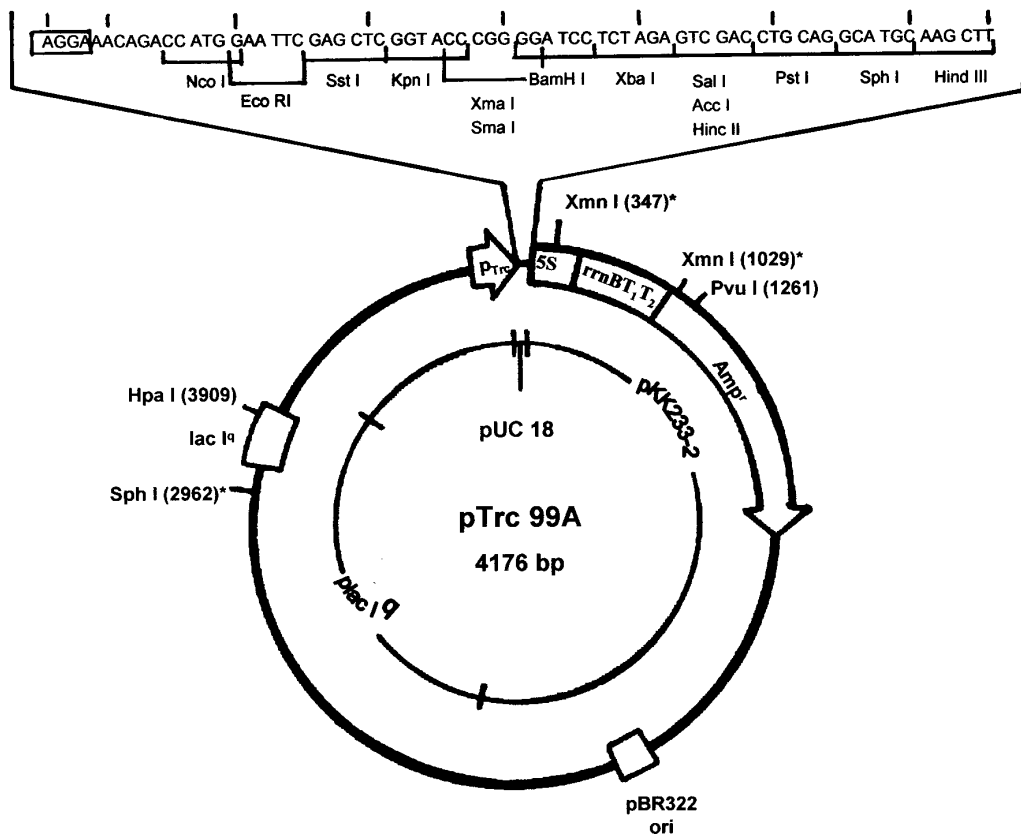


**pBK-CMV Multiple Cloning Site Region  
(sequence shown 952–1196)**



| Feature  | Nucleotide Position |
|--|---------------------|
| f1 origin of ss-DNA replication  | 24–330              |
| SV40 polyA signal  | 469–750             |
| $\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence ( <i>lacZ'</i> ) | 812–1183            |
| multiple cloning site  | 1015–1122           |
| <i>lac</i> promoter  | 1184–1305           |
| CMV promoter   | 1306–1895           |
| pUC origin of replication  | 1954–2621           |
| HSV-thymidine kinase (TK) polyA signal                                     | 2760–3031           |
| neomycin/kanamycin resistance ORF  | 3209–4000           |
| SV40 promoter  | 4035–4373           |
| <i>bla</i> promoter  | 4392–4518           |

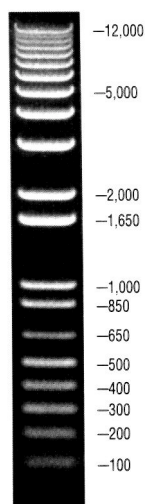
**Abb. 37:** pBK-CMV-Phagemid-Vektor der Firma Stratagene (USA)



**Control Regions:** Expression control region: *trc* promoter: -10: 216-222; -35: 193-198; Ribosome binding site: 255. **MCS:** 265-314. ***rrnB* operon region:** 5S rRNA region: 409-528; *rrnB* T1 terminator: 532-575; *rrnB* T2 terminator: 707-734.  **$\beta$ -lactamase gene region:** Promoter: -10: 799-804; -35: 776-781; Start codon (ATG): 846; Stop codon (TAA): 1704. ***lac I<sup>q</sup>* gene region:** Start codon (GTG): 3055; Stop codon (TGA): 4135. **Plasmid replication region:** Site of replication initiation: 2465-2467; Region necessary for replication: 1771-2467.

**Abb. 38:** pTrc99A-Expressionsvektor der Firma Amersham Pharmacia

## VII.6 DNA-Größenstandard



0.9 µg/lane; 0.9% agarose gel stained with ethidium bromide.

**Abb. 39:** 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

## VII.7 Publikationen / Konferenzberichte

### Poster:

Windhövel, J., Alfermann, A. W. (1998): Cinnamoyl-CoA: NADP oxidoreductase of cell suspension cultures of *Linum album*. Future Trends in Phytochemistry (A Young Scientists Symposium of the Phytochemical Society of Europe); Kerkrade NL

Windhövel J., Alfermann, A. W. (1998): Cinnamoyl-CoA: NADP oxidoreductase in the biosynthesis of lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. 4<sup>th</sup> Dutch-German Workshop on Regulation of Secondary Metabolism; Bad Herrenalb

Windhövel, J., Fuss, E., Alfermann, A. W. (2000): Lignan production in cell suspension cultures of *Linum album*. Biosynthesis and accumulation of secondary products: Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Society of Medicinal Plant Research, German Botanical Society, Section of Plant Natural Products; Halle

Windhövel, J., Fuss, E., Alfermann, A. W. (2001): Die Biosynthese von cytotoxischen Lignanen in *Linum album*: Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., XXXVI. Vortragstagung, Jena

Windhövel, J., Fuss, E., Alfermann, A. W. (2001): The biosynthesis of lignans in *Linum album*: Cinnamoyl-CoA: NADP oxidoreductase. Traits, tracks, traces: International Congress and 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research; Erlangen

### Vorträge:

Windhövel J., Alfermann, A. W. (1998): Cinnamoyl-CoA: NADP oxidoreductase of cell suspension cultures of *Linum album*. Klausurseminar des Graduiertenkollegs Molekulare Physiologie; Bad Kreuznach

- Windhövel J., Alfermann, A. W. (1999): Die Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase aus Zellsuspensionskulturen von *Linum album*. 2. Sektionstreffen der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft; Bonn-Röttgen
- Windhövel J., Alfermann, A. W. (1999): Biosynthesis of lignans in cell suspension cultures of *Linum album* and its possible biotechnological application. Winterseminar des Graduiertenkollegs; Bornheim / Walberberg
- Windhövel J., Alfermann, A. W. (2000): Biochemical and molecular biological investigations on cinnamoyl-CoA: NADP oxidoreductase in cell suspension cultures of *Linum album*. Seminar des Graduiertenkollegs Molekulare Physiologie; Bad Fredeburg
- Windhövel J., Alfermann, A. W. (2001): The biosynthesis of cytotoxic lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. Workshop des Graduiertenkollegs Molekulare Physiologie; Bad Neuenahr-Ahrweiler

**Publikationen:**

- Windhövel, J., Fuss, E., Alfermann, A. W. (2001): Die Biosynthese von cytotoxischen Lignanen in *Linum album*: Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase. DGQ-Tagungsband: Gewürz- und Heilpflanzen, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., XXXVI. Vortragstagung, Jena
- Seidel, V., Windhövel, J., Eaton, G., Alfermann, A. W., Arroo, R. R. J., Medarde, M., Petersen, M., and Woolley, J. G. (2002). Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. zur Veröffentlichung eingereicht

## Danksagung

Ich danke allen, die mich in irgendeiner Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben. Dabei gilt mein Dank im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. A. W. Alfermann, in dessen Arbeitsgruppe diese Dissertation angefertigt wurde. Ich danke ihm für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, hilfreiche Diskussionen, seine Hilfsbereitschaft, jegliche große und kleine Probleme zu lösen und meine finanzielle Absicherung für die Dauer dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Westhoff für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Elisabeth Fuß, die mich in der Methodik molekularbiologischer Arbeiten unterwies und mich immer hilfsbereit mit Rat und Tat unterstützte.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ für die finanzielle Unterstützung.

Allen jetzigen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern für die gute Teamarbeit, fachliche Anregungen und die gute Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich: Alexandra Henges, Hermann Garden, Ute Hegener, Ursula Empt, Arne Schwelm, Kathrin Schäfer, Thomas Smollny, Sabine Klauke, Jens van de Flierdt, Susanne Garbisch, Harolf Siemeling und Anja Berger.

Prof. Dr. Maike Petersen für manche hilfreiche Ratschläge und für die Zusammenarbeit bei der Herstellung der *L. album*-cDNA-Bank.

Susanne Paradies für die gute Teamarbeit und die fachkundige Hilfe bei der RNA-Isolierung für die Herstellung der cDNA-Bank.

Andrea Windhövel und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. P. Westhoff für gute Tipps beim molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. G. Wulff, Karsten Knorr und Peter Kunz für die Hilfe bei dem Versuch, Caffeoyl-aldehyd chemisch zu synthetisieren, bzw. auf anderem Wege zu beschaffen.

meinen Eltern, Kirsten, Maija, Horst und Roswitha, die mich in jeglicher Weise unterstützt und immer wieder moralisch aufgebaut haben.