

Pinoresinol-Lariciresinol Reduktasen mit unterschiedlicher Enantiospezifität

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Cosima von Heimendahl

aus Würselen

Januar 2007

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. A.W. Alfermann

Koreferent: Prof. Dr. P. Jahns

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2007

<u>1. Einleitung</u>	Seite
1.1 Pflanzliche Inhaltsstoffe	1
1.1.1 Sekundärmetabolite	1
1.2 Lignane und Lignin	3
1.3 Pflanzliche Zellkulturen	5
1.4 <i>Linum album</i> und <i>Linum usitatissimum</i>	7
1.5 Lignanbiosynthese	8
1.6 Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase	9
1.7 Zielsetzung	12
 <u>2. Material und Methoden</u>	 13
2.1 Pflanzenmaterial, Medien und Kulturbedingungen	13
2.2 Bakterien	14
2.2.1 Medien und Wachstumsbedingungen für <i>E.coli</i>	14
2.3 Charakterisierungen der <i>Linum</i> Suspensionskulturen	14
2.3.1 Kultivierung und Ernte der Pflanzenzellen	14
2.3.2 Bestimmungen der Mediumsparameter	15
2.3.3 Extraktion der Lignane	15
2.3.4 Enzympräparation	15
2.3.5 Elicitierung der Zellen	15
2.4 Erstellen eines Überexpressionskonstruktes für eine PLR aus <i>Linum usitatissimum</i>	16
2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden	16
2.4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	16
2.4.1.2 Extraktion der DNA aus Agarosegelen	16
2.4.1.3 Bestimmung der DNA Konzentration	16
2.4.1.4 Plasmidpräparation	16
2.4.1.5 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	17
2.4.2 c-DNA Synthese	17
2.5 His-6-Fusionsproteine	17
2.5.1 Überexpression der Fusionsproteine	18
2.5.1.1 Herstellung eines Enzymrohextraktes	18
2.5.1.2 Proteinaufreinigung mit der Ni-NTA-Affinitätschromatographie	19
2.5.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.5.2 PLR/ PCBER- Enzymtest	20
2.6 Chemische Synthese und Reinigung von PINO und DDC	20
2.7 HPLC-Analyse	21
2.7.1 Umkehrphasen HPLC	21
2.7.2 Chirale HPLC	22
2.8 Herstellung von Konstrukten zur Überexpression von Fusionsproteinen mit Gluthathion-S-transferase (GST-Tag)	24
2.8.1 PCR für die Kolonierung der ORF in pGEX-4T1	24
2.9 Mutagenese	25
2.10 Material	26
2.10.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26

2.10.2 Geräte	28
2.10.3 Enzyme	30
2.10.4 Puffer, Lösungen und Medien	30
<u>3. Ergebnisse</u>	33
3.1 Analytik	33
3.2 Charakterisierung von Zellkulturen von <i>Linum album</i> und <i>Linum usitatissimum</i>	34
3.2.1 Die Wachstumsparameter: Frisch- und Trockengewicht	35
3.2.2 Die Mediumsparameter: pH, Leitfähigkeit, Zuckerkonzentration	36
3.2.3 Lignanakkumulation	37
3.2.4 Elicitierung	39
3.3 PLRs aus <i>L. usitatissimum</i> und <i>L. album</i>	41
3.3.1 Blast P Vergleich der PLR-ORF Sequenzen von <i>L. album</i> und <i>L. usitatissimum</i>	41
3.3.1.1 Klonierung der LUS-PLR zur Überexpression in <i>E. coli</i>	42
3.3.2 Vergleichende Enzymtests der heterolog exprimierten <i>L. usitatissimum</i> und der <i>L. album</i> PLR	43
3.3.2.1 <i>L. usitatissimum</i> PLR-Fusionsprotein	43
3.3.2.2 <i>L. album</i> PLR-Fusionsprotein	44
3.4 Mutageneseversuche	46
3.4.1 Sequenzvergleich verschiedener PLRs, sowie IFRs und PCBERs	46
3.4.2 Mutationen	47
3.4.2.1 „Blockmutation“	49
3.4.2.2 Punktmutationen	49
3.5 PLR-ähnliche Gene von <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
3.5.1 AT 1	52
3.5.2 AT 2	53
3.5.3 AT 3	55
3.5.4 AT 4 bis AT 7	57
<u>4. Diskussion</u>	59
4.1 Charakterisierung von Zellkulturen von <i>L. album</i> und <i>L. usitatissimum</i>	59
4.2 PLRs aus <i>L. usitatissimum</i> und <i>L. album</i>	62
4.3 Vergleich der Aktivitäten der LA-PLR mit denen der LUS-PLR	63
4.4 Die molekularen Ursachen der Enantiospezifität von PLRs	65
4.5 <i>Arabidopsis</i> PLRs im Vergleich mit LA- und LUS-PLRs	67
<u>5. Zusammenfassung</u>	71
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	73
<u>7. Anhang</u>	79
7.1 Verzeichniss der Abbildungen und Tabellen	79
7.2 Abkürzungen	80
7.3 Publikationen/ Konferenzberichte	82

1. Einleitung

1.1 Pflanzliche Inhaltsstoffe

Pflanzen wurden schon immer von Menschen genutzt. Nach anfänglichem Einsatz als Nahrungsmittel, folgte doch bald die Nutzung als Lieferant für Baumaterialien, Kleidung, Gewürze, Aroma- und Duftmittel sowie für die Heilung verschiedenster Krankheiten. Auch heute noch haben die Naturheilmittel einen wichtigen Stellenwert in der Medizin. So sind gerade die armen ländlichen Bevölkerungsgruppen sehr stark auf die alt überlieferten Heilungsmöglichkeiten durch pflanzliche Inhaltsstoffe angewiesen. Aber auch in den Industriestaaten erlebt die Naturstoffmedizin eine Renaissance. Häufig gehören die pharmazeutisch nutzbaren Pflanzenstoffe zu den so genannten sekundären Pflanzenstoffen. Dabei ist der Begriff sekundäre Pflanzenstoffe irreführend, da in deren Stoffwechsel synthetisierte Substanzen ebenso essentiell für die Pflanze sind, wie die des Primärstoffwechsels. Kennzeichnend für Substanzen des Primärstoffwechsels ist, dass sie sich im Verlauf der Evolution kaum verändert haben, nahezu in allen Pflanzen vorkommen und dort auch die gleichen Funktionen übernehmen. Beispiele hierfür sind die Chlorophylle für die Photosynthese oder die Fettsäuren für die Lipidsynthese. Auch sind im Allgemeinen deren Funktion sowie deren Biosynthese gut untersucht.

1.1.1 Sekundärmetabolite

Sekundäre Pflanzenstoffe sind häufig nur auf einzelne Pflanzengattungen oder –arten beschränkt und stellen vielfach eine Antwort auf Umweltfaktoren dar. Da ihr Vorkommen oft nur auf bestimmte Pflanzengruppen begrenzt ist, eignen sie sich als taxonomische Merkmale für die systematische Einteilung einzelner Arten (Lüttge et al., 2002). Pflanzliche Sekundärstoffe sind häufig nur in bestimmten Zelltypen einzelner pflanzlicher Organe zu finden. Meist werden sie auch nur in einer zeitlich begrenzten Entwicklungsphase gebildet. Aufgrund ihrer recht heterogenen Verteilung im Pflanzenreich und ihrer vielfältigen Wirkungsmechanismen und chemischen Zusammensetzungen sind noch viele Sekundärstoffe unbekannt und/oder ihre Funktion ungeklärt.

Die Aufgaben der Sekundärmetabolite in den Pflanzen sind vielfältig. So dienen sie als Speicherstoffe, Lichtwandler, Phytohormone, Abwehrstoffe z.B. gegen Fraßfeinde, pathogene Mikroorganismen oder konkurrierende Arten, als Signalsubstanz für z.B. die Anlockung von Insekten zur Übertragung von Pollen, für die Ausbreitung der Samen oder als Grundbaustein essentieller komplexer Moleküle. Ihre Akkumulation wird von Temperaturschwankungen, der UV-Strahlung und der Wasserversorgung beeinflusst (Richter, 1998, Heldt, 1999). Daher könnten die sekundären Pflanzenstoffe zutreffender als „ökologisch wirksame Pflanzenstoffe“ bezeichnet und den primären als die „physiologisch wirksamen Pflanzenstoffe“ gegenüber gestellt werden (Strasburger, 1998)

Zu den bekanntesten pflanzlichen Sekundärstoffen gehören sicherlich die Geschmacks- und Duftstoffe wie Vanillin, Menthol oder Zimtalkohol. Aber natürlich auch das, nicht nur als Pestizid verwendete, Nicotin, sowie Koffein gehören in diese scheinbar nicht endende Liste (Kieran et al., 1997; Hess, 1991). Herzwirksame Glykoside und cytotoxische Lignane sind Beispiele für Arzneistoffquellen.

Die Einteilung pflanzlicher Sekundärstoffe erfolgt überwiegend in drei große Verbindungsklassen, nämlich die Alkaloide, die Phenylpropane und die Terpene (Isoprenoide).

Alkaloide sind stickstoffhaltige Verbindungen, die aus Aminosäuren synthetisiert werden. Aufgrund ihrer oft hohen Giftigkeit besteht ihre Funktion zumeist in der Verteidigung gegen Feinde, besonders gegen Säuger (Hartmann et al., 1991). Bekannte Alkaloide sind Nikotin, Koffein und Morphin, die als Genuss- und Schmerzmittel wirtschaftliche Bedeutung haben.

Terpene sind Kohlenwasserstoffe aber zum Teil auch sauerstoffhaltige Verbindungen wie Alkohole, Aldehyde und Ketone (Terpenoide). Sie werden aus Acetyl-CoA oder aus Zwischenprodukten der Glykolyse gebildet (Taiz und Zeiger, 2000). Sie sind häufig Bestandteile von Harzen, Milchsaft, Wachsen und Ölen und dienen dem Schutz der Pflanze vor Tierfraß, Pilz- und Bakterieninfektion. Zu den Terpenen gehören auch eine Reihe von Pigment- und Duftstoffen von Blüten und Früchten. Ein Beispiel für pharmazeutisch wirksame Terpenoide sind die Carotinoide, von denen sich z.B. Lycopin aus Tomaten in vielerlei Hinsicht positiv auf die Gesundheit des Menschen auswirken soll. So sind anticancerogene Wirkungen beispielsweise im Zusammenhang mit Darmkrebs nachgewiesen worden (Erhardt et al., 2003).

Die am frühesten entstandenen chemischen Abwehrstoffe waren in der Regel unspezifisch wirkende **Phenylpropankörper** (Harze, Lignin), Phenolderivate (kondensierte Gerbstoffe) und Flavonoide (Heldt, 1999; Larcher, 1994). Chemische Bestandteile des Phenylpropan-Syntheseweges sind z.B. Phenylalanin und Tyrosin sowie die Shikisäure, welche zu den Phenolkörpern wie z.B. den Phenylpropanen oder Gerbstoffen führen. Die Substanzklasse der Phenylpropane umfasst zudem noch eine Vielzahl von aromatischen Verbindungen. Weitere Vertreter der Phenylpropane sind die Tannine, Lignane und das Lignin. Kennzeichnend für diese phenolischen Verbindungen ist, dass alle einen mit einer C3-Seitenkette substituierten Benzolring besitzen. Die Aufgaben der Phenylpropane in den Pflanzen sind vielfältig, so dienen sie häufig als Fraßschutz und Antibiotika (z.B. Cumarine, Lignane und Tannine). Die Lignine, Cutin und Suberin werden als Zellwandbestandteile, für die Festigung des Gewebes oder als Isolierschichten benötigt. Letztendlich gehören auch die Flavonoide, welche z.B. als Blütenfarbstoffe oder Lichtschutzsubstanzen fungieren, zu den Phenylpropanen.

1.2 Lignane und Lignin

Das **Lignin** ist aufgrund der ähnlichen Bezeichnung leicht mit den Lignanen zu verwechseln. Aber es unterscheidet sich grundsätzlich in seiner Struktur und Funktion von den Lignanenen. Während die Lignane meist nur aus zwei Monolignolmolekülen bestehen, handelt es sich bei Lignin um ein ungeordnetes, stark vernetztes Phenylpropanpolymer, welches extrazellulär durch radikalische Polymerisation aus einem Gemisch der drei Vorstufen p-Cumaryl-, Sinapyl- und Coniferylalkohol gebildet wird (Heldt, 1999). In kovalenter Bindung mit Cellulose trägt das Lignin in den sekundären Zellwänden lignifizierter Zellen wesentlich zur Festigung des Gewebes bei. Besonders Zellen des Festigungsgewebes und der Wasserleitbahnen sind bevorzugt mit Lignininkrustierungen ausgestattet (Richter, 1997).

Lignane können bei Moosen, Farnen, Angio- und Gymnospermen gefunden (Lewis, Davin, 1999) und aus nahezu allen Pflanzenteilen isoliert werden (MacRae und Towers, 1984). Lignane schützen die Pflanzen aufgrund ihrer antimikrobiellen, antiviralen, antioxidativen, und insektiziden Wirkungen. Viele Bäume erlangen z.B. ihre Resistenz gegenüber Pilzen durch die Einlagerung von Lignanenen ins Kernholz (Lewis und Davin, 1999). Bei *Thuja plicata* machen Lignane etwa 20 % des Trockengewichts aus (MacLean und Gardner, 1956).

Lignane besitzen u. a. pharmazeutische Eigenschaften (Ayres und Loike, 1990). Neben den cytotoxischen Lignanenen wie z.B. dem Podophyllotoxin (PTOX), sind auch die nicht toxischen Lignane wie Matairesinol (MATAI) oder Secoisolariciresinol (SECO) und deren Glucoside, welche u. a. in Leinsamen gefunden wurden, von Interesse (Meagher et al., 1999). Diese Lignane können von der menschlichen Darmflora u. a. in Enterodiol und Enterolacton umgewandelt werden (Abb. 1.1). Diesen „Säugetier-Lignanenen“ schreibt man eine Schutzfunktion gegen hormonabhängige Krebserkrankungen zu (Petersen, Alfermann 2001). Vermutlich erlangen sie diese Funktion durch ihren antagonistischen Effekt auf endogenes Östrogen welches im Zusammenhang zum Wachstum von Brust- und Prostata-Krebs steht (Otto, 2000).

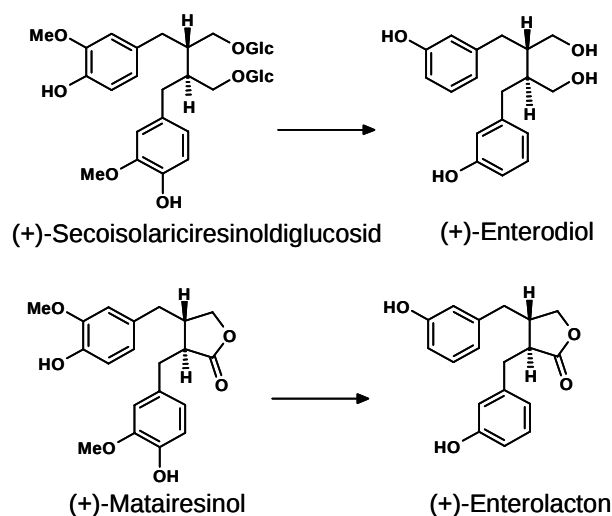


Abb.1.1: Die Darmflora des menschlichen Verdauungstraktes wandelt Secoisolariciresinoldiglucosid in Enterodiol und Matairesinol in Enterolacton um

Strukturell gesehen sind Lignane Phenylpropanoide, eine Klasse von Phenolderivaten. Sie sind meist chirale Verbindungen, die durch die Dimerisierung des achiralen Coniferylalkohols gebildet werden. Je nachdem, ob die Bindung über die C8-C8' Atome der Seitenketten oder über andere Atome wie z.B. C3-C3' und C8-C3' gebildet wird, unterteilt man die Verbindungen in Lignane und Neolignane. Auch Oligomere aus Phenylpropanen treten auf. Durch verschiedene Reaktionen wie Ringschluss und -spaltung sowie Substitutionsreaktionen entsteht aus den primären Dimerisierungsprodukten eine strukturelle Vielfalt an Lignanenen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen. Eine Einteilung der Lignane in weitere Untergruppen erfolgt anhand der chemischen Struktur der Seitenketten und der Substitutionsmuster der aromatischen Ringe. In Bezug auf die chemische Konstitution der Seitenketten unterscheidet man zwischen Furofuran-Lignanenen (z.B. Pinoresinol), Furan-Lignanenen (z.B. Lariciresinol), Dibenzylbutan-Lignanenen (z.B. Secoisolariciresinol), Dibenzylbutyrolacton-Lignanenen (z.B. Matairesinol) und den Aryltetrahydronaphthalin-Lignanenen (z.B. Podophyllotoxin) (Abb. 1.2) (Umezawa et al., 1997).

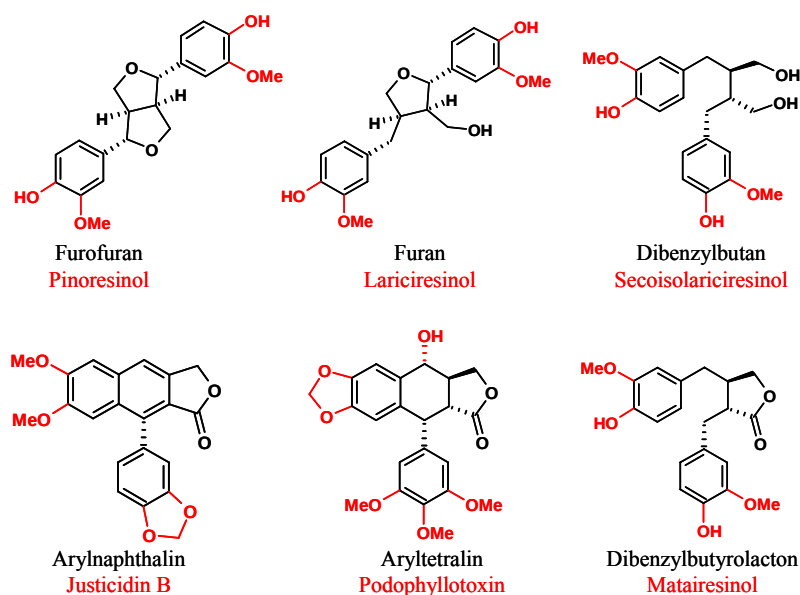


Abb. 1.2: Grundstrukturen verschiedener Lignanklassen mit Beispielen

Die meisten Lignane aus Pflanzen sind optisch aktiv. Normalerweise sind sie enantiomerenrein, d.h. es kommt jeweils nur das (-)- oder das (+)-Enantiomer in der Pflanze oder im Pflanzenorgan vor. Ein Beispiel ist das Pinoresinol (PINO) das in seiner rechtsdrehenden Form in *Forsythia spec.* und in der linksdrehende Form in *Xanthoxylum ailanthoides* zu finden ist (Katayama et al., 1997).

Lignane können alternativ (wie alle Sekundärstoffe) in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die einen werden in der Pflanze unabhängig von einer Infektion kontinuierlich synthetisiert und die anderen (die so genannten Phytoalexine) werden nur dann gebildet, wenn ihre Synthese durch einen Pathogenbefall am Infektionsort induziert wird. Ein Beispiel hierfür ist das von der norwegischen Fichte *Picea abies* gebildete Matairesinol als Reaktion auf einen Befall mit dem Pilz *Fomes annosus* (Shain und Hillis, 1971).

Das Lignan Podophyllotoxin (PTOX) (Abb. 1.3) ist ein Mitosegift und wirkt phytotoxisch, insektizid, antiviral und cytotoxisch (MacRae, 1984). Aufgrund der hohen Toxizität des PTOX ist sein medizinischer Anwendungsbereich eingeschränkt. Es wird äußerlich zur Behandlung von Genitalwarzen (*Condyloma acuminata*), verursacht durch das Human-Papilloma-Virus, eingesetzt. Heute werden wesentlich besser verträgliche, semisynthetische Derivate des PTOX, Etoposid (VP-16-213, Vepesid[®]), Teniposid (VM-26, Vumon[®]) und Etopophos[®] (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, USA) (Abb. 1.3), zur Behandlung von kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Testikularkarzinomen und anderen Tumorerkrankungen eingesetzt (van Uden et al., 1989). Die semisynthetischen Derivate des PTOX sind Topoisomerase II-Hemmer und besitzen somit einen anderen Wirkmechanismus als ihre Ausgangsverbindung.

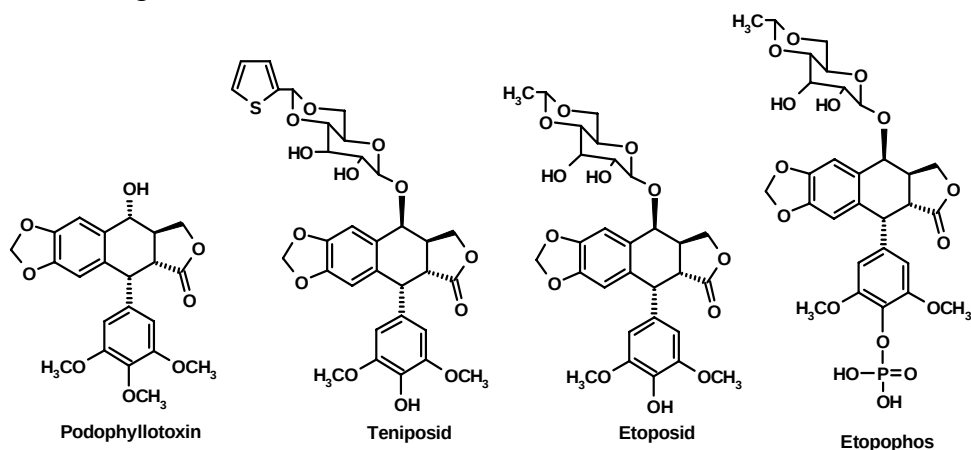


Abb. 1.3: Podophyllotoxin und seine semisynthetischen Derivate Etoposid, Teniposid und Etopophos[®]

Da die chemische Synthese von PTOX zwar möglich, jedoch sehr unökonomisch ist, wird es heute immer noch aus *Podophyllum*-Arten gewonnen, wodurch *P. hexandrum* mittlerweile in Indien als im Bestand als bedroht gilt. Auf der Suche nach anderen Quellen für PTOX wurden Zellkulturen von *P. hexandrum* und *Linum*-Arten angelegt (Van Uden et al, 1989).

1.3 Pflanzliche Zellkulturen

Seit vielen Jahrhunderten nutzt der Mensch pflanzliche Sekundärstoffe, zumeist gewonnen aus höheren Pflanzen. Auch wenn sich die technischen Möglichkeiten stark verbessert haben, stellen auch heute noch die Pflanzen eine der wichtigsten Quellen für viele chemische Verbindungen dar. Viele Verbindungen wie beispielsweise Paclitaxel (Taxol[®]) können aufgrund der hohen Komplexität ihrer Struktur und ihrer optischen Isomerie chemisch nicht oder nur schwer hergestellt werden (Pezzuto, 1997). Viele chemisch synthetisierte Substanzen liegen zudem als Racemate vor, wohingegen die Pflanzen meist nur eines der Enantiomere bilden. Häufig zeigt auch nur eines der Enantiomere eine medizinisch wirksame Eigenschaft. Teilweise ist sogar das andere Enantiomer gesundheits-

schädlich (z.B. bei Contergan®).

Traditionell stammt das verwendete Pflanzenmaterial entweder von wild wachsenden oder von landwirtschaftlich angebauten Pflanzen. Eine gute Alternative dazu ist die seit mehreren Jahren etablierte Nutzung von pflanzlichen Zellkulturen (Kieran et al., 1997). Aus allen Organen von Pflanzen kann man regenerationsfähige Gewebe isolieren und daraus unterschiedliche Formen von Zell- und Gewebekulturen anlegen; auch in Form differenzierter Gewebe in Spross- und Wurzelkulturen. Pflanzliche Zellkulturen weisen eine Vielzahl von Vorteilen auf. So ist die Produktion in vitro unabhängig von limitierenden Faktoren wie z.B. Klima, Wetter, Jahres- und Tageszeiten, Bodenbeschaffenheit, Krankheiten, Fraßfeinden, aber auch von der politischen Situation der Anbauländer.

Ein weiterer Vorteil ist, dass der Zeitraum, der zur Synthese der Sekundärstoffe benötigt wird, erheblich verkürzt werden kann, da die Pflanzenzellen in der Kultur schneller wachsen. Wohingegen differenzierte Pflanzen mehrere Monate bis Jahre zum Wachstum benötigen können und deren Sekundärstoffproduktion häufig auf bestimmte Gewebe oder Organe der Pflanze beschränkt ist (Zenk, 1991). Zudem ist die Ernte der Zellkulturen einfacher. Da Pflanzliche Zellkulturen stets unter sterilen Bedingungen kultiviert werden, können Kontaminationen verschiedenster Art ausgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil und zugleich auch Nachteil von Suspensionskulturen ist deren Fähigkeit zur somaklonalen Variation. Dadurch können die Kulturen Substanzen akkumulieren, die die Pflanze normalerweise nicht synthetisiert (Hess, 1991), aber auch ihre Fähigkeit bestimmte Pflanzenstoffe zu bilden verlieren (Seitz et al. 1985). Letzteres ist ein Nachteil bei den Versuchen zur Standardisierung der Produktion von pflanzlichen Sekundärstoffen in Suspensionskulturen. 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 Beispiele für die erfolgreiche Nutzung von pflanzlichen Zellkulturen 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 β -Methyl-digitoxin durch Biotransformation in *Digitalis lanata* (Seitz et al., 1985). Ein Beispiel für die kommerzielle Nutzung sind Zellkulturen von *Taxus spec.*, die für die Produktion des Krebstherapeutikums Paclitaxel (Taxol®) genutzt werden. Für die traditionelle Isolierung des Alkaloides aus Pflanzenmaterial wären pro Gramm Taxol® 9.000 kg Eibenrinde erforderlich (Heldt, 1999).

Zellsuspensionskulturen von *Podophyllum hexandrum* weisen eine lange Wachstumsdauer auf und liefern nur geringe Mengen Podophyllotoxin (Fujii, 1991). Zellsuspensionskulturen von *Linum album* dagegen zeigen ein schnelles Wachstum und stellen eine effektive Quelle für Podophyllotoxin und 6-Methoxypodophyllotoxin (6-MPTOX) dar.

1.4 *Linum album* und *Linum usitatissimum*

Die Gattung *Linum* gehört zur Familie der Linaceae (Leingewächse). Die Mitglieder dieser Familie sind meist Kräuter oder Stauden mit meist wechselständigen ungeteilten Blättern ohne Stipeln. Die Blüten sind zwittrig, radiär, vier- bis fünfzählig mit vier, fünf oder zehn Fruchtblättern und oberständigen Fruchtknoten. Die Früchte sind Kapseln mit je zehn Samen. Weltweit sind ca. 200 Arten bekannt mit Vorkommen in den gemäßigten und subtropischen Zonen.



Abb. 1.4: *Linum album* Ky



Abb. 1.5: Zellsuspension
von *Linum album*



Abb. 1.6: *Linum usitatissimum*

Einer der bekanntesten Vertreter der Gattung ist wohl *Linum usitatissimum* (Saat-Lein, echter Lein, Flachs) (Abb. 1.6). Er ist ein einjähriges 30-120 cm hohes Kraut mit lanzenförmigen Blättern und himmelblauen Blüten. Der Flachs gehört zu einer der ältesten Kulturpflanzen. Wie wichtig er für die Menschen war und ist, zeigt schon sein Name *usitatissimum* (lat. der Allernützlichste). So dient er der Faser- und Ölgewinnung und seine Samen werden als Nahrungs- und Heilmittel verwendet. Gleichzeitig zeichnet er sich dadurch aus, dass er keine hohen Ansprüche an den Boden stellt. Waren die blauen Leinfelder früher auch in Deutschland weit verbreitet, liegen seine Hauptanbaugebiete heute vorwiegend in Kanada, Argentinien und Indien. Dabei hat sich die Gewinnung der Fasern zugunsten der Ölgewinnung verschoben, so dass heute 79 % der angebauten Pflanzen als Öllieferanten genutzt werden. Typische Produkte aus/mit Leinfasern sind u. a. Berufskleidung, Bett- und Tischwäsche, Nähzwirn oder auch Luftfilter und ultraleichtes Druckpapier.

Die Inhaltsstoffe der Leinsamen können je nach Sorte variieren. Die Samen enthalten bis zu 50 % fettes Öl. Dessen Hauptbestandteil ist das Linolen (ca. 50%) gefolgt von Linolsäure (ca. 20 %), Ölsäure (ca. 15 %) und etwas Stearin- und Palmitinsäure. Weitere Bestandteile der Leinsamen sind Ballaststoffe (24 %), Proteine (3 %) und Schleimstoffe (3-10 %) wie beispielsweise die Polygalacturonsäure (Flachs-Pektin). In geringeren Konzentrationen

kommen cyanogene Glycoside (Linamarin, Lotaustralin), und die Lignane Secoisolariciresinoldigluconid (SDG) und Matairesinol vor. Genauso vielfältig wie die Inhaltsstoffe sind auch die Anwendungsmöglichkeiten der Leinsamen. So dienen sie als Nahrung für Menschen und Tiere und als milde Abführmittel. Des Weiteren werden sie für die Heilung von Hautausschlägen, Verbrennungen und Gürtelrose sowie als Schmerzmittel gegen Halsschmerzen, Heiserkeit und Zahnfleischentzündungen verwendet. Das aus ihnen gewonnene Öl wird sowohl als Speiseöl als auch für Anstrichfarben, Lacke und Schmierseifen genutzt. Von großem Interesse ist auch die Hemmung der Entwicklung von östrogenabhängigen Tumoren durch die enthaltenen Lignane (Strasburger, 1998, Bickel-Sandkötter, 2001).

Ein weiterer Vertreter der Gattung ist *Linum album* (weiße Lein) (Abb.1.4). Es ist ein im Iran beheimatetes Wildkraut und wächst dort bevorzugt in Gebirgssteppen. Es handelt sich um eine mehrjährige krautige Pflanze mit wechselständigen, ungegliederten Blättern und radiär gebauten weißen Blüten. Die Staubblätter der fünfzähligen Blüte sind zu einem Tubus verwachsen (Urania, 1991). Bereits 1975 berichteten Weiss et al., über das Vorkommen cytotoxischer Lignane wie Podophyllotoxin (PTOX), α - und β -Peltatin sowie 3'-Demethylpodophyllotoxin in *Linum album*-Pflanzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Suspensionskulturen von *Linum album* Ky. durchgeführt. Die Samen wurden von Dr. Abbas Shasavari (Research Institute of Forest and Rangelands, Teheran, Iran) in der Umgebung Teherans gesammelt und unter sterilen Bedingungen nach Standardmethoden zum Keimen gebracht. Über Spross- und Kalluskulturen wurden Suspensionskulturen angelegt (Smolny, 1992).

Die Zellsuspensionskulturen von *L. album* stellen nicht nur eine mögliche alternative PTOX-Quelle im Gegensatz zur Gewinnung aus Rhizomen und Wurzeln von *Podophyllum* Pflanzen dar, sie eignen sich auch hervorragend für die grundlegende Erforschung der Lignanbiosynthese.

1.5 Lignanbiosynthese

Die ersten Schritte in der Lignanbiosynthese wurden in *Forsythia intermedia* und *Forsythia suspensa* biochemisch und molekularbiologisch aufgeklärt; erste Versuche fanden Anfang der 1990er Jahre statt (Umezawa et al., 1991). Der erste Schritt besteht in der Verknüpfung von zwei Molekülen Coniferylalkohol, welche aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel stammen, zu Pinoresinol (PINO). PINO wird zu Lariciresinol (LARI) und weiter zu Secoisolariciresinol (SECO) reduziert, wobei beide Schritte vom gleichen Enzym, der Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR), katalysiert werden. Die SDH (Secoisolariciresinol-Dehydrogenase) katalysiert die Reaktion von SECO zu Matairesinol (MATAI) (Abb. 1.7) (Xia et al., 2001). MATAI wird als zentrales Intermediat in der Biosynthese verschiedenster Lignane (z.B. PTOX) diskutiert (Davin und Lewis, 2003).

Für *F. intermedia* ist beschrieben, dass in der Pflanze nur das (+)-Enantiomer des PINOs

entsteht. Dabei wird die PINO Bildung von der Pinoresinol-Synthase (PS), einem radikalbildenden Enzym (wahrscheinlich eine Laccase), und einem dirigierenden, selbst nicht katalytisch aktiven Protein (DIR) katalysiert. Das dirigierende Protein steuert die Stereospezifität der Pinoresinolbildung (Davin et al., 1997, Davin, Lewis, 2000).

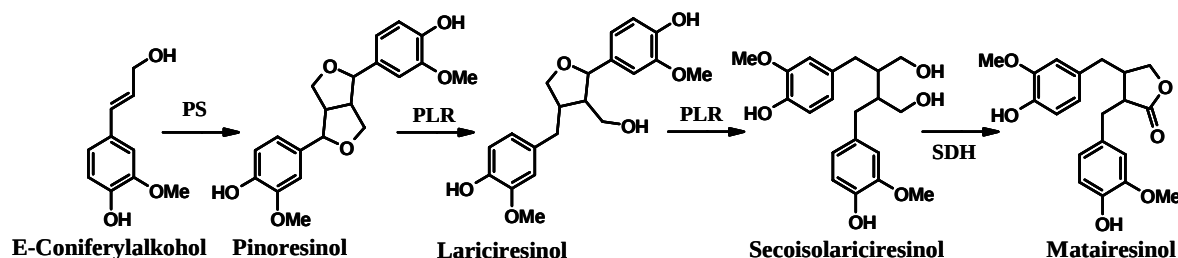


Abb. 1.7: Biosyntheseweg von Matairesinol. PS: Pinoresinol-Synthase; PLR: Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase; SDH: Secoisolariciresinol-Dehydrogenase

Bei anderen Pflanzenarten wird die Stereospezifität erst in späteren Biosyntheseschritten festgelegt, z.B. durch die SDH in *Wikstroemia sikokiana* (Umezawa et al., 1997). Dabei geht die weitere Synthese bei *W. sikokiana* von (+)-SECO aus, im Gegensatz zu dem (-)-SECO bei *F. intermedia*. Die Akkumulation unterschiedlicher Lignanenantiomere konnte auch innerhalb einer Gattung und sogar in verschiedenen Organen einer Pflanzenart beobachtet werden. So enthalten *Linum usitatissimum* Samen nahezu reines (+)-SECO, wohingegen *Linum album* Zellkulturen (-)-SECO enthalten sollte, da dieses Enantiomer durch weitere Biosyntheseschritte zu (-)-Podophyllotoxin umgewandelt wird. (Petersen und Alfermann, 2001).

1.6 Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase

Die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR) katalysiert die schrittweise Umsetzung des C8-C8'-verknüpften Lignans Pinoresinol (PINO) über Lariciresinol (LARI) zu Secoisolariciresinol (SECO). Zum ersten Mal wurde diese Reaktionsabfolge bei Extrakten löslicher Proteine aus *F. intermedia* gezeigt. Es konnten dabei nur geringe Mengen des Enzyms aufgereinigt werden. Daher besteht die Vermutung, dass die Expression der PLR in *F. intermedia* nur gering ist. Die isolierte PLR reduziert nur ein Enantiomer der Lignane. Nur das (+)-Enantiomer (R-Konfiguration) des PINOs wird in *F. intermedia* von der PLR über (+)-LARI zu (-)-SECO umgewandelt (Dinkova-Kostova et al., 1996). Wichtig ist dabei zu beachten, dass sich im zweiten Schritt das Vorzeichen der optischen Drehung umkehrt, d.h. aus (+)-LARI entsteht (-)-SECO (Die R'R-Konfiguration an C8-C8' bleibt erhalten!). So wird auch bei Zugabe eines racemischen Substratgemisches von (+)- und (-)-PINO nur die rechtsdrehende Form reduziert (Katayama et al., 1993). Während der gesamten Aufreinigung konnten die Umsetzungen von (+)-PINO zu (+)-LARI und von

(+)-LARI zu (-)-SECO nie getrennt voneinander beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass beide Schritte von dem gleichen Enzym katalysiert werden und das Substrat während der beiden Reduktionsschritte an die Reduktase gebunden bleibt.

Bei der Charakterisierung der PLRs interessieren u.a. die verschiedenen Stereoselektivitäten je nach Pflanzenart. Die Stereochemie ist das Teilgebiet der Chemie, das sich mit den Konsequenzen der dreidimensionalen Struktur von Verbindungen für deren Reaktivität und Verhalten in chemischen Reaktionen beschäftigt (Hellwich, 2002). Eine Pflanze kann beide Enantiomere eines Lignans produzieren, wobei die Zusammensetzung in den verschiedenen Teilen der Pflanze variieren kann. In Blattstielen von *Arctium lappa* wurde z.B. (+)-SECO gefunden, in den Samen dagegen überwiegend (-)-SECO (Suzuki et al., 2002). Es wird angenommen, dass hier zwei Isoformen der PLR existieren, die verschiedene Stereoselektivitäten aufweisen, bisher wurde aber noch keine PLR aus *A. lappa* isoliert. Aus *Thuja plicata* wurden mehrere PLR-Isoformen mit z.T. entgegengesetzter Enantioselektivität isoliert (Fujita et al., 1999), aber es wurde noch nicht die enantiomere Zusammensetzung in der Pflanze untersucht. Somit bleibt die Frage weiterhin offen, ob die unterschiedliche enantiomere Zusammensetzung in einer Pflanze aufgrund der Aktivität mehrerer PLRs mit entgegengesetzten Enantiospezifitäten zustande kommt, oder nur durch eine enantiounspezifische PLR. Isolierte PLRs weisen ihre Selektivität häufig schon bei der Reaktion von PINO zu LARI auf. Zum Teil besteht sie aber erst im zweiten Umwandlungsschritt von LARI zu SECO wie bei den PLRs aus *Thuja plicata* (Fujita et al., 1999). Eine dieser PLRs kann im ersten Schritt beide Enantiomere von PINO umsetzen, eines davon aber sehr schlecht.

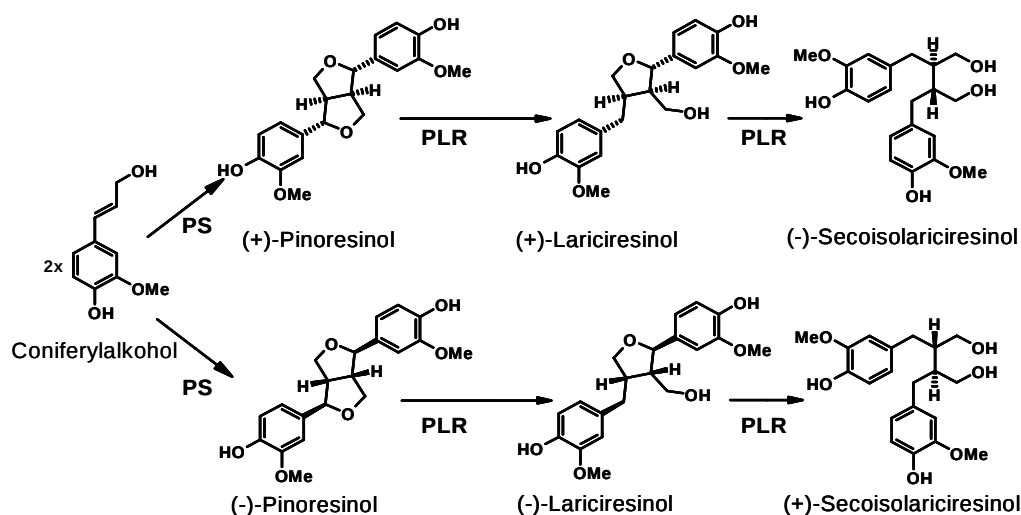


Abb. 1.8: In verschiedenen Pflanzen wurden entgegengesetzt enantiospezifische Lignanbiosynthesen gefunden.

Oben: Lignanbiosynthesen in *F. intermedia* und *L. album*

Unten: Lignanbiosynthese in *W. sikokiana* und *L. usitatissimum*

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit und der Gleichartigkeit der von ihnen katalysierten

Reaktionen stellte Gang et al. (1999) die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktasen (PLRs) zusammen mit den Isoflavon-Reduktasen (IFRs) und den Phenylcumaran-Benzylether-Reduktasen (PCBERs) in eine gemeinsame Familie (Familie der PIP-Reduktasen) phylogenetisch verwandter, NADPH-abhängiger Reduktasen (Abb. 1.9).

Im Unterschied zu PLRs, welche die C8-C8'-verknüpften Lignane PINO und LARI als Substrat gebrauchen, verwenden PCBERs C8-C5'-verknüpfte Lignane (Phenylcoumarane z.B. Dehydrodiconiferylalkohol und Dihydrodehydrodiconiferylakohol) als Substrate. IFRs wiederum katalysieren die Reduktion des heterocyclischen Ringes von Isoflavonen, wodurch sie zu Isoflavanonen umgewandelt werden. Sowohl die PLRs als auch die IFRs katalysieren regio- und stereospezifische Reaktionen. Die von den PCBERs katalysierte Reduktion von Phenylcumaran-Benzylethern verläuft ebenfalls regio-, jedoch nicht stereospezifisch. Aufgrund der Ähnlichkeit der Substratmoleküle vermuten Gang et al. (1999) jedoch einen ähnlichen Reaktionsmechanismus, der sich auch in der stark konservierten Aminosäuresequenz der drei Reduktaseklassen widerspiegelt. Dieser Umstand, zusammen mit der Tatsache, dass IFRs auf die Leguminosen beschränkt sind, hat zu der Annahme geführt, dass die „nur“ regioselektiven PCBERs als entwicklungsgeschichtliche Vorläufer der PLRs und IFRs, welche eine höhere Spezifität besitzen, anzusehen sind (Gang et al., 1999).

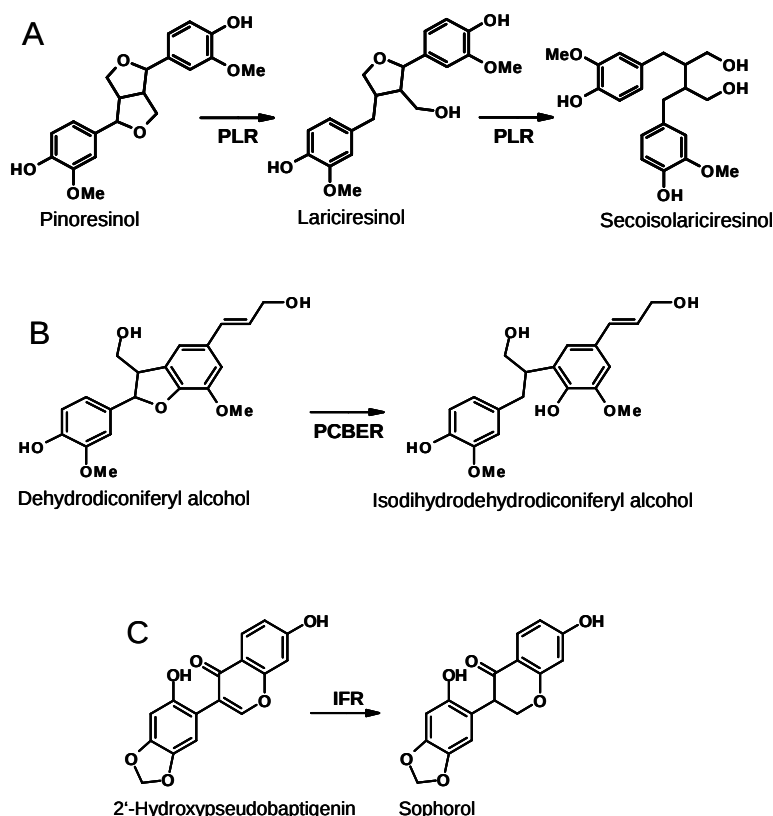


Abb.1.9: Umsetzung durch PIP-Reduktasen. A: Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR); B: Phenylcumaran-Benzylether-Reduktasen (PCBER); C: Isoflavon-Reduktasen (IFR)

1.7 Zielsetzung

Linum album (LA) Suspensionskulturen akkumulieren (-)-Podophyllotoxin (PTOX). Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die Vorstufe des PTOX, das Secoisolariciresinol (SECO) enantiomerenrein vorliegt. Es wurde ebenfalls in früheren Arbeiten die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR), welche die Synthese des SECOS aus Pinoresinol (PINO) katalysiert, isoliert und untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die LA-PLR enantiospezifisch arbeitet. Des Weiteren war bekannt, dass in den Samen von *Linum usitatissimum* (LUS) die zu LA entgegengesetzten Enantiomere von PINO, Secoisolariciresinoldiglucosid (SDG), welches aus dem (+)-SECO entstanden ist und Lariciresinol (LARI) vorkommen.

Diese Tatsachen warfen mehrere Fragen auf:

Ab welchem Schritt in der Synthese sind die Lignane enantiomerenrein? Zeigt die aus der *L. usitatissimum* Suspensionskultur isolierte PLR in der Tat die zur *L. album* PLR entgegengesetzte Enantiospezifität?

Bei Untersuchungen an *A. lappa* wurde (+)-SECO in den Blattstielen und (-)-SECO in den Samen gefunden (Suzuki et al., 2002). Die Annahme, dass hier zwei Isoformen der PLR vorliegen, konnte bisher noch nicht bewiesen werden. Dagegen wurden aus *Thuja plicata* mehrere PLR-Isoformen mit z.T. entgegengesetzter Enantioselektivität isoliert (Fujita et al., 1999), aber noch nicht die enantiomere Zusammensetzung der Lignane in der Pflanze untersucht. Somit stellte sich die Frage, ob die unterschiedliche enantiomere Zusammensetzung in einer Pflanze aufgrund der Aktivität mehrerer PLRs mit entgegengesetzten Enantiospezifitäten zustande kommt, oder nur durch eine enantiounspezifische PLR.

Treml (2005) hat im Rahmen seiner Diplomarbeit bei einer Datenbanksuche PLR ähnliche ORFs in *Arabidopsis thaliana* gefunden und diese versucht, in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Erste Enzymtests zeigten, dass die beiden PLR ähnlichsten *A. thaliana* Enzyme das gesamte racemische Substrat PINO verbrauchten. Dies führte zu der Frage, ob die enantiomere Zusammensetzung in einer Pflanze durch eine unspezifisch arbeitende PLR oder durch mehrere PLRs zustande kommen kann. Dafür sollten mit den *A. thaliana*-PLR-ähnlichen Enzymen weitere Tests durchgeführt werden.

Auch konnte erstmals in ersten Tests zeigen, dass ein weiteres PLR ähnliches *A. thaliana* Enzym gute PCBER-, aber auch PLR-Aktivität aufwies. Diese Ergebnisse könnten Vermutungen in Bezug auf die Verwandtschaft zwischen PLR, PCBER und IFR bestätigen oder widerlegen, sowie die Frage der Enantioselektivität von PLRs beantworten.

Letztlich stellte sich noch die Frage, wo die molekularen Ursachen für die verschiedenen Enantioselektivitäten zu finden sind.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial, Medien und Kulturbedingungen

Es wurden Suspensionskulturen von *Linum album* (Weißer Lein) und *Linum usitatissimum* (Flachs) verwendet. Die *L. album* Kulturen wurden nach Standardverfahren (Seitz et al., 1985) über Samen gewonnen (Smolny, 1993). Die *L. usitatissimum* Kulturen (Nr. PC-1017) wurden von der DMSZ (Braunschweig) erworben. Die Kulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben auf einem Rundschtüttler mit 120 Upm und 5 cm Auslenkung bei 25 °C im Dauerdunkel kultiviert. Die Subkultivierung der Zellen fand in Abstand von 7 Tagen statt, indem unter sterilen Bedingungen 5 g Zellen in 50 ml frisches MS-*Linum*-Medium (Tabelle 2.1) überführt wurden. Dabei handelt es sich um ein optimiertes Grundmedium nach Murashige und Skoog (1962).

Tab. 2.1: Zusammensetzung des MS-Mediums für *Linum*-Zellsuspensionskulturen (modifiziertes MS-Medium, MURASHIGE und SKOOG; 1962)

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

2.2 Bakterien

Plasmide wurden im *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5 α vermehrt; die *E. coli* Stämme BL21(DE3)pLysS und BL21(DE3)RIL wurden für die IPTG-induzierte, heterologe Expression der His₆-PLR-Fusionsproteine verwendet (Kapitel 2.5).

Genotypen der verwendeten *E. coli* Stämme:

DH5 α TM	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15(<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR</i> 17 (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE</i> 44 λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)
BL21(DE3)RIL	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]

2.2.1 Medien und Wachstumsbedingungen für *E.coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C auf einem Schüttler mit 200 Upm. Die Kolonien wurden auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die Anzucht der Bakterien in flüssigem LB-Medium erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmyerkolben, wobei das Mediumvolumen maximal 1/5 des Kolbenvolumens betrug. Als Selektionsmarker wurde Ampicillin (100 μ g/ml) verwendet.

2.3 Charakterisierungen der *Linum* Suspensionskulturen

Es wurden Suspensionkulturen von *L. album* und *L. usitatissimum* über einen Zeitraum von 22 Tagen charakterisiert. Dabei wurden Frisch- und Trockengewichte der Zellen, die Mediumsparameter, die Aktivität der PLR sowie die Lignangehalte von PINO, LARI und SECO bestimmt.

2.3.1 Kultivierung und Ernte der Pflanzenzellen

Für die Charakterisierung wurden 5 g Zellen in frisches MS-*Linum*-Medium (Tab. 2.1) in 300 ml Erlenmyerkolben überführt. Sie wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben behandelt jedoch ohne Subkultivierung nach 7 Tagen. An ausgewählten Kulturtagen wurden die Zellen geerntet. Dabei wurde das Nährmedium über eine Filternutsche durch eine Lage Miracloth abgesaugt. Das Frischgewicht wurde bestimmt und zu einem Teil gefriergetrocknet, zum anderen Teil für die Aktivitätsbestimmung der PLR verwendet. Von den gefriergetrockneten Zellen wurden die Trockengewichte bestimmt und jeweils 200 mg für die Extraktion der Lignane verwendet.

2.3.2 Bestimmungen der Mediumsparameter

Die Bestimmung erfolgte im von Zellen befreiten Nährmedium

Der Zuckergehalt wurde mit Hilfe eines Handrefraktometers über den Brechungsindex ermittelt.

Der pH-Wert wurde Hilfe einer pH-Elektrode bestimmt.

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

2.3.3 Extraktion der Lignane

Jeweils 0,20 g der fein gemörserten, gefriergetrockneten Zellen (Kapitel 2.3.1) wurden mit 2 ml Methanol p.A. versetzt und zweimal für 30 s mit einer 30 sekundigen Pause auf Eis im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml bidest. Wasser wurde der pH-Wert der Suspension mit o-Phosphorsäure auf pH 5 eingestellt. Nach Zugabe von 1mg β -Glucosidase (in 100 μ l H₂O, 1000 U/mg Roth) wurde die Suspension 1,5 h bei 35 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat, jeweils unterbrochen durch 10 min. Zentrifugation bei 5000 Upm und Abnahme der Ethylacetatphase. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 3 x 600 μ l Methanol p.A. rückgelöst und 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Für die HPLC Analyse wurden 100 μ l verwendet.

2.3.4 Enzympräparation

Die vom Nährmedium getrennten Zellen (Kapitel 2.3.1) wurden mit 1/5 des Frischgewichtes Polyclar 10 versetzt und 1 ml Aufarbeitungspuffer pro Gramm Trockengewicht zugegeben. Die Homogenisierung des Gemisches erfolgte mittels Ultraturrax (Stufe 4) drei mal 30 s mit jeweils einer 30 sekundigen Pause auf Eis. Der Zellbrei wurde bei 4 °C zwanzig Minuten bei 20.000 rpm (Sorvall, Rotor SS34) zentrifugiert und anschließend über Glaswolle filtriert. Untersucht wurde die Aktivität der PLR, der Reaktionsansatz erfolgte wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben

2.3.5 Elicitierung der Zellen

Für die Herstellung einer sterilen 200 mM Methyljasmonat-Stammlösung wurde das erforderliche Volumen an Methyljasmonat in 50 %-igen Ethanol gelöst und steril filtriert.

Zu den Suspensionskulturzellen wurde am 3. Versuchstag 25 μ l der Stammlösung des Methyljasmonates unter sterilen Bedingungen gegeben (Endkonzentration 100 μ M). Um einen Elicitierungseffekt des Ethanols auszuschließen, wurden zu 1/3 der Kolben 25 μ l 50 %-iges Ethanol zugegeben. Als „Kontrolle“ blieben 1/3 der Kolben unbehandelt.

2.4 Erstellen eines Überexpressionskonstruktes für eine PLR aus *Linum usitatissimum*

2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardmethoden wie z.B. DNA-Ligationen, Transformationen und Restriktionshydrolysen wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Bei allen Restriktionshydrolysen wurden die, für die jeweiligen Enzyme, geeigneten Reaktionspuffer der Firma Fermentas eingesetzt. Bei dem Umgang mit DNA und RNA wurden sterile Materialien verwendet. Lösungen (z.B. Antibiotika), die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit Einwegfiltern (Porengröße: 0,2 µm) steril filtriert.

2.4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % (w/v) (DNA-Fragmente > 1 kb) bis 1,5 % (w/v) (DNA-Fragmente ≤ 1 kb) verwendet. Sie erfolgte in 1 x TAE-Puffer und einem maximalen Strom von 120 mA. Den DNA-Ansätzen wurden 1/10 des Volumens DNA-Probenpuffer zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für ca. 20 Minuten in einem TAE-Ethidiumbromid-Färbebad (5,2 µM) inkubiert und auf einem UV-Tisch fotografiert.

2.4.1.2 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Geeignete DNA Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und nach Herstelleranweisungen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) extrahiert.

2.4.1.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration wurde entweder durch den Vergleich über einem im Gel mitlaufenden DNA-Massenstandard ermittelt oder photometrisch. Die photometrische Bestimmung erfolgte mit Hilfe des „Genequants“ der Firma Pharmacia, wobei es über die Berechnung des Quotienten aus den Absorptionen bei 280 nm und 260 nm möglich war, eine Aussage über die Reinheit der DNA-Präparation zu treffen.

2.4.1.4 Plasmidpräparation

Die für Klonierungsexperimente und zur Sequenzanalyse benötigte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert.

Plasmidpräparationen, bei denen die Reinheit nicht von Bedeutung war, wurden aus Kostengründen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit der TENS-Methode (Zhou et al., 1990) angefertigt.

2.4.1.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Bei der Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5 λ TM bzw. BL21) wurde eine Behandlung der Zellen mit Rubidiumchlorid nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.4.2 c-DNA Synthese

Die Gesamt-RNA einer 5 Tage alten *L. usitatissimum* Suspensionskultur wurde mit dem RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN) laut Angaben des Herstellers extrahiert. Die so gewonnene RNA diente als Vorlage für eine Reverse Transkription mit dem „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche) nach Herstellerangaben. Die Reinigung der cDNA erfolgte mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Es folgte die Ligation der cDNA mit dem pET-15b Vektor (NOVAGEN) über die Enzyme *Nde*I und *Bam*HI- pCH 25-2- und anschließende Transformation in DH5 α TM und BL21(DE3)pLysS *E. coli*.

PCR-Programm:

94 °C → 3 min	
94 °C → 30 s	} 39 Zyklen
59 °C → 30 s	
72 °C → 1 min	
72 °C → 3 min	

Primer:

Forward: LUSPLR-ATG-F

5'-GGA ATT CCA TAT GGG GCG GTG CAG AGT TCT-3'

Reversed-Primer: LUSPLR-TGA-R

5'-CGC GGA TCC TCA AAG GTA GAT CAT CAG ATA ATC-3'

2.5 His-6-Fusionsproteine

Es wurden PLR-homologe ORFs folgender Pflanzen in *E. coli* exprimiert: *Linum album*, *Linum usitatissimum* und *Arabidopsis thaliana*. (Schäfer, 2001; Trembl, 2005)

Für die Expression der verschiedenen PLR-ORFs in *E. coli* wurde das pET-Expressionssystem der Firma Novagen (USA) verwendet als Wirtsstämme für die IPTG-induzierte, heterologe Expression der His₆-PLR-Fusionsproteine dienten dabei die *E. coli* Stämme BL21(DE3)pLysS und BL21(DE3)RIL (Kapitel 2.2).

Tab. 2.2: Bezeichnung der exprimierten Proteine

Wirtspflanze	Plasmid	Bezeichnung des exprimierten Proteins
<i>L. album</i>	pKS2K9	LA-PLR
<i>L. usitatissimum</i>	pCH25-2	LUS-PLR
<i>A. thaliana</i>	pMT26.3K1	AT 1
<i>A. thaliana</i>	pMT22.3K3	AT 2
<i>A. thaliana</i>	pMT23.3K1	AT 3
<i>A. thaliana</i>	pMT24.1K1	AT 4
<i>A. thaliana</i>	pMT25.3K2	AT 5
<i>A. thaliana</i>	pMT21.1K2	AT 6
<i>A. thaliana</i>	pMT27.3K2	AT 7
<i>A. thaliana</i>	pMT28.1K1	AT 8

2.5.1 Überexpression der Fusionsproteine

Für die Überexpression des jeweiligen Fusionsproteins wurde eine 10 ml Bakterien-vorkultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 200 ml Kultur in LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 30 min bei 28 °C und 200 Upm inkubiert. Die Induzierung der Expression des Fusionsproteins erfolgte durch die Zugabe von 1mM IPTG. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 28 °C und 200 Upm wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 Upm (Eppendorf) für 10 min und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in max. 5 ml Aufarbeitungspuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.5.1.1 Herstellung eines Enzymrohextraktes

Um einer Degradation der Proteine durch Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt bzw. mit auf Eis gekühlten Puffern.

Der bei -20 °C gelagerten Probe wurde vor dem Auftauen 1 mM PMSF, 5 µg/ml Leupeptin und 100 µg/ml Lysozym zugesetzt; was dem Abbau von Proteinen durch Proteasen entgegenwirkt und den Aufschluss der Zellen bewirkt. Der endgültige Aufschluss der Zellen sowie die Zerkleinerung der hochmolekularen DNA erfolgte mit einer Ultraschallbehandlung (Sonifer B12, Stufe 2, Branson Sonic, USA). Die Zellen wurden in 4 Intervallen von 30 s mit je 30 s Pause aufgeschlossen. Die Pelletierung der unlöslichen Bestandteile erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13.000 Upm). Das lösliche

Protein befand sich im Überstand; dieser wurde über eine Sephadex PD-10 Säule gereinigt und umgepuffert.

Die Sephadex PD-10 Säule arbeitet nach dem Prinzip der Gelfiltration. Die Säule wurde vor dem Gebrauch mit 30 ml Extraktionspuffer äquilibriert. Es wurden 2,5 ml Probe auf die Säule gegeben und das Protein anschließend mit 3 ml Extraktionspuffer eluiert.

2.5.1.2 Proteinaufreinigung mit der Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der His₆-Fusionsproteine erfolgte über eine Ni-NTA-Matrix der Firma QIAGEN (The QIAexpressionistTM, 2001 QIAGEN). Jeweils zwei der sechs Histidin-Basen des Proteins binden an ein Nickel-Ion, welches in die NTA (Nⁱtilotriacetic acid)-Matrix eingebettet ist. Nach einer Reinigung mit Waschpuffer erfolgte die Elution des Proteins durch Waschen mit einer hohen Konzentration an Imidazol, welches Anstelle der Histidin-Base an die Nickel-Ionen bindet, so dass das Protein heraus gewaschen werden kann.

Nach Reinigung und Umpuffern mit dem Extraktionspuffer über eine Sephadex PD-10 Säule wurden 6 ml der Proteinlösung zu 2,5 ml der Ni-NTA Lösung gegeben und für 1 Stunde bei 4 °C und 200 rpm gerührt. Diese Suspension wurde in eine Säule, mit einer Fritte vor dem Ausfluss gegeben und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 7 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 6 Schritten à 830 µl mit Elutionspuffer. Die Proteingehalte der Eluate wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Die drei Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden vereinigt und über eine Sephadex PD-10 Säule für den Enzymtest umgepuffert (Aufarbeitungspuffer) und der Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt. Eine Überprüfung auf die Reinheit der Proben erfolgte mit einem SDS-Gel (Kapitel 2.5.1.3).

2.5.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte elektrophoretisch nach Laemmli (1970). Das Polyacrylamidgel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurde nach Anleitung des QIAGEN Guide to Analytical Gels (McGarvey (Hrsg.), QIAGEN News, No. 5, 2000) hergestellt. Je 10 µl Proteinlösung (25 µg) wurden mit 1 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und zentrifugiert; ebenso wurde mit 5 µl eines Markers (Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas) verfahren. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA bis alle Proben in das Gel eingelaufen waren. Die weitere Elektrophorese fand bei 30 mA statt, bis der Blaumarker die Gelunterkante erreicht hatte.

Das Trenngel wurde für 1 Stunde unter sanftem Schütteln in Coomassie[®]-Blitzfärberlösung gefärbt und anschließend über Nacht in 10 %iger Essigsäure ebenfalls unter sanftem Schütteln entfärbt.

2.5.2 PLR/ PCBER- Enzymtest

Für die Ermittlung der PLR bzw. PCBER-Aktivität wurde folgender Reaktionsansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt.

340 µl	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7
100 µl	Proteinextrakt
10 µl	PINO bzw DDC (9 mM)

Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 30 °C vorinkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl 25 mM NADPH.

Durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat und gründliches Schütteln wurde die Reaktion gestoppt. Die Ethylacetatphase wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge) von der wässrigen Phase getrennt und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Ausschütteln wurde noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Ethylacetatphasen der jeweiligen Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze mit denaturiertem Enzymextrakt (Denaturierung: 15 min bei 95 °C) bzw. ohne Zugabe von PINO oder vor dem Start mit Ethylacetat abgestoppte Reaktionsansätze.

Für die HPLC-Analyse wurde das Pellet in 100 µl Methanol p.A. gelöst.

2.6 Chemische Synthese und Reinigung von PINO und DDC

Die Substrate PINO und DDC waren nicht im Handel erhältlich und mussten daher, ausgehend von Coniferylalkohol, selber synthetisiert werden, [abgewandelt nach Xia et al. (2001)]. Für die Synthese wurden zu 7 ml Coniferylalkohol (1mM in Aceton) 24 ml $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (2,6 mmol in wässriger Lösung) gegeben und für 10 min gerührt. Das Gemisch wurde mit jeweils 30 ml Diethylether im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden wiederum zweimal mit je 20 ml Wasser extrahiert, um darin verbliebenes Eisenchlorid zu entfernen. Die Etherphase wurde ca. 1 Stunde mit Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren des Natriumsulfates bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in einer möglichst kleinen Menge (ca. 5 ml) Dichlormethan rückgelöst.

Um zu überprüfen, ob sich PINO gebildet hat wurde ein mit Methanol verdünntes Aliquot (1:10 verdünnt) mittels Umkehrphasen-HPLC (Kapitel 2.7.1) untersucht.

Aufreinigung der Produkte durch Säulenchromatographie

Die durch die radikalische Verknüpfung von Coniferylalkohol entstandenen Produkte PINO und DDC wurden durch Chromatographie in einer Kieselgelsäule von weiteren Produkten und Syntheserückständen getrennt.

Für die Herstellung der Kieselgel-Säule (2,5 x 20 cm) wurde das Kieselgel (230-400 mesh) mit Dichlormethan/Diethylether (4:1) aufgeschlämmt und nach Füllen der Säule mit einem Liter dieses Lösungsmittelgemisches gewaschen. Selbiges Lösungsmittelgemisch wurde auch für die Elution des PINOs von der Säule verwendet. Es wurden 15 Fraktionen von je 50 ml gesammelt, zur Trockene eingedampft und in 3 x 500 µl Methanol rückgelöst.

Das DDC wurde im Anschluss an die PINO-Elution durch Änderung der Laufmittelzusammensetzung hin zu hydrophileren Bedingungen gewonnen (Tab. 2.3).

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren PINO bzw. DDC Gehalt mittels Umkehrphasen-HPLC untersucht (Kapitel 2.7.1).

Tab. 2.3: Laufmittelzusammensetzung zur Elution von DDC

Laufmittelgemisch	Anzahl und Größe der Fraktionen
Dichlormethan/Aceton = 1/10	2 x 100 ml
Dichlormethan/Aceton = 1/0,15	1 x 100 ml
Dichlormethan/Aceton = 1/0,20	1 x 100 ml
Dichlormethan/Aceton = 1/0,25	9 x 50 ml
Dichlormethan/Aceton = 1/0,30	3 x 50 ml
Dichlormethan/Aceton = 1/0,40	3 x 50 ml

2.7 HPLC-Analyse

2.7.1 Umkehrphasen HPLC

Bei dem HPLC-Analysesystem (high performance liquid chromatography) handelt es sich um eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie, bei der das zu trennende Substanzgemisch durch Adsorptions- und/oder Verteilungsvorgänge aufgetrennt wird. Die stationäre Phase besteht bei der „Reversed-Phase“-HPLC (RP-HPLC) aus einem hydrophoben Säulenmaterial (C18-Kohlenwasserstoffverbindungen, die über OH-Gruppen mit Kieselgel verestert sind). Die mobile Phase ist hydrophil und besteht aus einem Acetonitril/Wasser-Gemisch. Für das Laufmittel werden gefiltertes, angesäuertes Wasser (mit 0,01 % Phosphorsäure, 85 % v/v) und Acetonitril verwendet. Durch die Ansäuerung werden die Moleküle der Probe gegebenenfalls vollständig protoniert und laufen somit als scharfe „Peaks“ von der Säule.

2.7.2 Chirale HPLC

Für die stereospezifische Untersuchung von PINO, LARI und SECO wurden gereinigte Proben auf eine geeignete chirale Säule gegeben. Das Säulenmaterial besteht aus einem Cellulosederivat mit 3,5-Dimethylphenylcarbonat als spezifischem Rest. Die Cellulose ist an ein Silicagel als Trägermaterial gebunden. Die chirale Analyse der Komponenten erfolgt mittels „normal-phase“-HPLC (die stationäre Phase ist hydrophil, das Laufmittel hydrophob). Eine Auftrennung von Enantiomeren kommt auf dieser Säule durch die unterschiedliche räumliche Struktur der (+)- und (-)-Antipoden, und der dadurch bedingten, unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Moleküle mit dem Säulenmaterial zustande.

Extraktion von PINO, LARI oder SECO für die chirale Säule

Für die chirale Säule müssen die Lignane in möglichst reiner Form vorliegen. Dazu wurden die Proben auf eine semipräparative Trennsäule (Gromsil) gegeben und die zu untersuchende Lignane in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Das Eluat wurde 3 x mit einem Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und bis zur Trockene eingengt. Für die Auftragung auf die chirale Säule wurden die Proben in 70 µl Methanol p.A. rückgelöst (20 µl Injektionsvolumen/Analyse).

Tab.2.4: HPLC-Säulen, Laufmittel und Gradientenprogramme

Analyse:	Säule:	Laufmittel-Zusammensetzung		Programm:			
		Pumpe A	Pumpe B	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
a) Versuch zur Pino-Gewinnung	GROM-Sil 120 ODS-5 ST (250 x 4 mm, 5 µm) mit Vorsäule (20 x 4 mm, 5 µm)	H ₂ O mit 0,01 % o-Phosphorsäure (85 %)	Acetonitril	0	0,8	70,0	30,0
				30	1,0	45,0	55,0
				33	1,0	55,0	45,0
				38	1,0	30,0	70,0
				40	0,8	70,0	30,0
b) PLR-Enzymtest	Hypersil HyPURITY™ Elite C 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) mit Vorsäule (50 x 4,6 mm, 5µm)	H ₂ O mit 0,01 % o-Phosphorsäure (85 %)	Acetonitril	0	1,1	79,5	20,5
				35	1,1	79,5	20,5
				45	1,1	35,0	65,0
				47	1,1	35,0	65,0
				51	1,1	79,5	20,5
				55	1,1	79,5	20,5

Fortsetzung auf der folgenden Seite

2. Material und Methoden

Fortsetzung von der vorherigen Seite

Analyse:	Säule:	Laufmittel- Zusammensetzung		Programm:			
		Pumpe A	Pumpe B	Zeit [min]	Fluss [ml/ min]	A [%]	B [%]
c) PLR- Enzymtest (modifiziert 35 min Lauf)	Hypersil HyPURITY™ Elite C 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) mit Vorsäule (50 x 4,6 mm, 5µm)	H ₂ O mit 0,01 % o-Phosphor- säure (85 %)	Acetonitril	0	1,1	79,0	21,0
				15	1,1	79,0	21,0
				25	1,1	55,0	45,0
				27	1,1	30,0	70,0
				28	1,1	30,0	70,0
				31	1,1	79,5	20,5
				35	1,1	79,5	20,5
d) Isolierung von PINO, LARI und SECO	GROM-Sil 120 ODS-5 ST (250 x 8 mm, 5 µm) mit Vorsäule (20 x 4 mm, 5 µm)	H ₂ O	Acetonitril	0	2	72	28
				25	2	62	38
				30	2	40	60
				35	2	72	28
				40	2	72	28
e) Isolierung von PINO, LARI und SECO (modifiziert 30 min Lauf)	GROM-Sil 120 ODS-5 ST (250 x 8 mm, 5 µm) mit Vorsäule (20 x 4 mm, 5 µm]	H ₂ O	Acetonitril	0	2	71	29
				9	2	70	30
				12	2	69	31
				14	2	62	38
				18	2	54	46
				20	2	25	75
				21	2	25	75
				24	2	71	29
				30	2	71	29
f) chirale Analyse von PINO	CHIRACEL OD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm) Vorsäule (0,4 cm Ø x 1 cm) Chiralcel	Ethanol	n-Hexan	0	0,5	50,0	50,0
				45	0,5	60,0	40,0
g) chirale Analyse von SECO	CHIRACEL OD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm) Vorsäule (0,4 cm Ø x 1 cm) Chiralcel	Ethanol	n-Hexan	0	0,5	25,0	75,0
				35	0,5	25,0	75,0

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Fortsetzung von der vorherigen Seite

Analyse:	Säule:	Laufmittel- Zusammensetzung		Programm:			
		Pumpe A	Pumpe B	Zeit [min]	Fluss [ml/ min]	A [%]	B [%]
h) chirale Analyse von LARI	CHIRACEL OC (250 x 4,6 mm, 5 µm) Vorsäule (0,4 cm Ø x 1 cm) Chiralcel	Ethanol	n-Hexan	0	0,5	80,0	20,0
				30	0,5	80,0	20,0
i) DDC- Enzymtest	GROM-Sil 120 ODS-5 ST (250 x 4 mm, 5 µm) mit Vorsäule (20 x 4 mm, 5 µm)	H ₂ O mit 0,01 % o-Phosphor- säure (85 %)	Acetonitril	0	1,0	75,0	25,0
				22	1,0	75,0	25,0
				29	1,0	57,0	43,0
				32	1,0	25,0	75,0
				33	1,0	25,0	75,0
				36	1,0	75,0	25,0
				40	1,0	75,0	25,0

2.8 Herstellung von Konstrukten zur Überexpression von Fusionsproteinen mit Gluthathion-S-transferase (GST-Tag)

Das GST-Tag gehört mit 26 kDA zu den großen Tags. Das GST bindet an Glutathion welches wiederum an eine Matrix wie Sepharose gebunden ist. Eluiert wird mit reduziertem Glutathion unter physiologischen Bedingungen. Häufig erhöht das Tag die Stabilität und Löslichkeit des Proteins.

Es wurde das Plasmid pGEX-4T1 verwendet (Amersham, Pharmacia). Die Aufreinigung des Fusionsproteins sowie die Abspaltung des GST-Tags erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8.1 PCR für die Klonierung der ORFs in pGEX-4T1

Für die Klonierung der PLR mit hoher Sequenzidentität der ORFs von AT4, AT5 und AT8 (Kapitel 2.5) in pGEX-4T1 mussten neue Primer kreiert werden. Mit der Synthese wurde die Firma MWG beauftragt (Tabelle 2.5).

Tab. 2.5: Primer für die Klonierung der ausgewählten *A. thaliana* ORFs

Kurz-bezeichnung	Template	Primer-bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AT 4	pMT14.3K2	FMT-14-EcoGEX	CGG AAT TCA TGG CGT CAG AGA AAA GC
		RMT-14-XhoGEX	CCG CTC GAG TTA GGT GTT TAA TGA AGT T
AT 5	pMT25.3K2	FMT-15-EcoGEX	CGG AAT TCA TGA CGA GCA AGA TTC TA
		RMT-15-XhoGEX	CCG CTC GAG TCA GAT AAA CCG GTT AA
AT 8	pMT18.4K2	FMT-18-EcoGEX	CGG AAT TCC TCG AGG AGG AGA AGA A
		RMT-18-NotGEX	TAT TGC GGC CGC CTA GAG AAG AGT AT

PCR-Programm:

94 °C → 3 min	}	29 Zyklen
94 °C → 30 s		
60 °C → 40 s		
72 °C → 1 min		
72 °C → 3 min		

2.9 Mutagenese

Für die Herstellung der Mutanten I und II wurden folgende Primer verwendet. Mit der Synthese wurde die Firma MWG beauftragt.

Mutante I

λ: GCA AGT TGT ACT GAC GCA CCT TTA TCA CGT

β: CCG CTC GAG CTA GAC GTA ACG CTT TAG ATA TTC C

γ: GGA ATT CCA TAT GGG TTC CCT GGG GAA AGT G

Mutante II

λ : GCA AGT TGT ACT GAC GCA CCT TTA TCA CGT

β : GCG CTC GAG CTA GAC GTA ACG CTT TAG ATA TTC CTC C

γ : GGA AAA TGC GTT GGA GCC AG

δ : GGA ATT CCA TAT GGG TTC CCT GGG GAA AGT G

Für die Einfügung der Mutationen diente die PLR-Sequenz von *Linum album* als Template. Es mussten zwei bzw. drei aufeinander aufbauende PCRs durchgeführt werden. Für die erste PCR wurden λ und β als Primer verwendet. Das daraus resultierende PCR Produkt wurde zusammen mit γ als Primer für die zweite PCR verwendet. Für die dritte PCR wurde das Produkt aus der zweiten PCR wiederum als Primer verwendet und zusammen mit δ als Primer für die dritte PCR genutzt.

Als Endprodukt entstand so eine *L. album* PLR mit drei bzw. vier Punktmutationen.

2.10 Material

2.10.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton p.A.	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Acetonitril, HPLC-Reagenz	VWR International GmbH, Wien, Österreich
Acrylamid (gebrauchsfertige Lösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α - ³² P-dATP	Amersham Buchler, Braunschweig
Agar-Agar	Duchefa, Haarlem, Holland
Agarose	Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland
Albumin, Bovine (BSA) 96-99 % Fraktion V	Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
Ammoniaklösung 25 % p.A.	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Ampicillin (Binotal)	Grünenthal GmbH, Aachen
Bacto [®] -Trypton	DIFCO laboratories, Detroit, USA
Borsäure p.A.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt
Celluloseacetat Filter, 0,2 μ m	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
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

2. Material und Methoden

CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Serva GmbH & Co, Heidelberg
DEAE-Sepacel	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Diammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Dichlormethan, p.A.	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
DNA-Agar	Marine BioProducts Inc., Delta, Canada
Dowex 1x2 pract.	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
EDTA (Titrplex III)	Merck KGaA, Darmstadt
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
Filterpapier, 0,8 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Formaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
Formamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
β -Glucosidase aus Mandeln, 7,1 U/mg	Serva, Heidelberg
Glutathion	Amersham Biosciences; USA
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Biosciences; USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland
Imidazol, 99%	Acros Organics, New Jersey, USA
Isoamylalkohol	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropyl- β -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
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kieselgel 60 (0,040- 0,063 mm)	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Leupeptin	USB, Cleveland, USA
Lithiumchlorid p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methyljasmonat	SERVA GmbH & Co, Heidelberg
Miracloth	Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA
MN Polyamid SC6 (Polycaprolactam) Korngröße 0,05-0,16 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
myo-Inosit	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
NADPH	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Naphtylelessigsäure (NAA)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt

2. Material und Methoden

Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck KgaA, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumpyrosulfit	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumsulfat p.A. 99 %	Grüssing GmbH, Filsum
Nescofilm®	Azwell Inc., Osaka, Japan
Nickel-NTA Agarose	QIAGEN GmbH, Hilden
pGEM-T Vektorsystem	Promega GmbH, Mannheim
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
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy® Plant Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Rubidiumchlorid p.A.	Merck KgaA, Darmstadt
Saccharose (Kölner Raffinade Zucker)	Pfeifer & Langen, Köln
Salzsäure (36-38%) p.A.	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Sephadex (Columns PD-10) G-25 M	Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Schweden
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TEMED, reinst	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Titriplex III (Na ₂ -EDTA)	Merck KgaA, Darmstadt
Titron X-100	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tris (TRIZMA BASE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thrombin	Amersham Biosciences; USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Whatman-Filterpapier	Whatman plc, Brentford, Großbritannien
X-GAL	Bts, St. Leon-Roth

Hochreines Wasser

Bei allen biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten wurde hochreines Wasser verwendet, welches mit Hilfe einer E-Pure-Reinstwasseranlage über Filterkartuschen deionisiert wurde.

2.10.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	Gelkammer und Gelschlitten: Eigenanfertigung, Universität Düsseldorf Netzteil: 2303 MultiDrive 1 Power Supply, Pharmacia
Anlysenwaage	MC 210 S (Sartorius AG, Göttingen)
Autoklav	Webeco Typ No. 5, Lüdenscheid
Edelstahl-Vakuumfiltrationsgerät	Edelstahl-Vakuumfiltrationsgerät 16201, Sartorius AG, Göttingen
Evaporatorzentrifuge	Univapo 150 H + Unijet II Waterjet Aspirator mit Kältebad regelbar (UniEquip Laborgerätebau, Martinsried)

2. Material und Methoden

Gefriertrockner	Alpha 1-4, Christ, Osterode Vakuumpumpe: Pfeiffer, Balzers Gruppe, Vaduz
Gefriertrockner	Alpha 1-4, Christ, Osterode Vakuumpumpe: Pfeiffer, Balzers Gruppe, Vaduz
HPLC	Thermoquest, Thermo Separation® Products, Egelsbach mit: Laufmittel-Entgaser Probengeber: Spectra SYSTEM AS1000 Detektor: Spectra SYSTEM UV6000LP Pumpe: Spectra SYSTEM P2000 LDC/Milton Roy, Riviera Beach, USA Controler: LDC Analytical MP3000E Pumpe: Milton Roy constaMetric® I & II Detektor: LDC Analytical spectroMonitor®3200
HPLC-Säulen	-Hypersil Hypurity™ Elite C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) mit Vorsäule (50 x 4,6 mm, 5 µm), Thermoquest, Kleinostheim -GROM-SIL 120 ODS-5 ST(250 x 4 mm, 5 µm) mitVorsäule (20 x 4 mm, 5 µm), GROM, Herrenberg-Kayh -Chiracel OD-H (250 x 4,6 mm; 5 µm), Daicel GmbH, Eschborn
Laufkammer für SDS-Gele	SE250/SE260 Mighty Small II (Hoefer, Inc., San Francisco, USA)
Leitfähigkeitselektrode	Batteriekonduktometer LF 91 mit Standardmeßzelle KLE 1/T, WTW Weilheim
Magnetrührer	Ikamag® Ret-G(IKA®-Labortechnik, Janke und Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen)
pH-Elektrode	Mettler Toledo, Udorf, Schweiz InLab®, Mikro pH-Einstabmesskette 423
pH-Meter	WTW pH 523, Knick, Weilheim Digital-pH-Meter 646
Photometer	GeneQUANT II, Pharmacia, Uppsala, Schweden Uvikon 930 Spektrometer, Kontron Instruments, Tegimenta, Schweiz
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	Thermomix, B. Braun, Melsungen Schüttelwasserbad: Julabo SW 20, Seelbach
Wassersystem	E-PURE: Reinstwasseranlage, Barnstead, Wilhelm Werner GmbH, Wete A Wassertechnische Anlagen, Leverkusen

2. Material und Methoden

Zentrifugen	Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode Eppendorf Tischzentrifuge, Netheler Hettich Universal, Tuttlingen Sorvall Superspeed RC-5B, Rotor SS34 u. GSA-Rotor, Kendro Laborating Products GmbH Eppendorf 5804 R
-------------	--

2.10.3 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, MBI Fermentas
<i>Eco</i> RV	10 U/μl, Roche Mannheim
<i>Hind</i> III	10 U/μl, Roche Mannheim
<i>Nde</i> I	10 U/μl, MBI Fermentas
<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> I	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) Serva GmbH & Co, Heidelberg
Lysozym, aus Huhn-Eiweiß	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Thrombin Protease	100 U/mg; Amersham Biosciences, USA

2.10.4 Puffer, Lösungen und Medien

Bradford-Reagenz	Coomassie® Brillantblau G250	100
	mg/l	
	Ethanol p.A.	50
	ml/l	
	o-Phosphorsäure	100 ml/l
Waschpuffer (für His ₆ -Tag Proteinaufreinigung)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	16
	mM	
	pH 8,0	
Extraktionspuffer (für His ₆ -Tag Proteinaufreinigung)	Imidazol	5
	mM	
	Tris	20 mM
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	0,25 mM
	pH 7,09	

2. Material und Methoden

Elutionspuffer (für His ₆ -Tag Proteinaufreinigung)	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol mM pH 8	50 mM 300 mM 250
Aufarbeitungspuffer (Proteinaufreinigung)	Tris EDTA DTT pH 7	20 mM 2 mM 5 mM
DNA-Probenpuffer	Saccharose Bromphenolblau (w/v) In 1 x TAE	50 % (w/v) 0,25 %
50 x TAE-Puffer	Tris EDTA Essigsäure M	2 M 0,25 M 1
LB-Medium	NaCl g/l Bacto®-Trypton g/l Hefeextrakt für Agarplatten: + Agar Agar (w/v) pH 7	10 10 5 g/l 15 %
PBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ mM KH ₂ PO ₄	140 mM 2,7 mM 10 1,8 mM
Elutionspuffer (GST)	Glutathione mM Tris pH 8,0	10 50 mM

3. Ergebnisse

3.1 Analytik

Die Identifizierung und Quantifizierung der Lignane erfolgte mittels HPLC-Analysen (Kapitel 2.7.), dabei werden die Lignane aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen durch Adsorptions- und Verteilungsvorgänge aufgetrennt. Den Lignanen können spezifische Retentionszeiten und Absorptionsspektren zugeordnet werden, wodurch eine weitgehend eindeutige Bestimmung möglich ist. Für die Bestimmung der enantiomeren Zusammensetzung der Lignane wurde der „Peak“ des jeweiligen Lignans zunächst mit einer semi-präparativen RP 18 Säule getrennt gesammelt und aufgereinigt. Die gereinigten Lignane wurden mittels einer chiralen Säule (Kapitel 2.7.2) in die (+)-und (-)-Antipoden getrennt. Die Auftrennung auf der chiralen Säule erfolgt durch die unterschiedliche räumliche Struktur der (+)-und (-)-Antipoden und die damit einher laufenden unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Moleküle mit dem Säulenmaterial.

Das ursprüngliche Programm für die Identifizierung der Lignane dauerte für eine Probe 55 Minuten (von Heimendahl, 2003). Aufgrund der hohen Anzahl an Proben, wurde das Programm auf eine kürzere Laufzeit hin modifiziert. Ein weiteres Problem stellte die Trennung der Lignane SECO und LARI dar. Auch hier musste das Programm so geändert werden, dass das getrennte Sammeln dieser Lignane möglich war. Das in Abb. 3.1 gezeigte Chromatogramm mit Standards von SECO, LARI und PINO zeigt für SECO und LARI eine gute Trennung bis auf die Grundlinie bei einer verkürzten Laufzeit auf 30 Minuten.

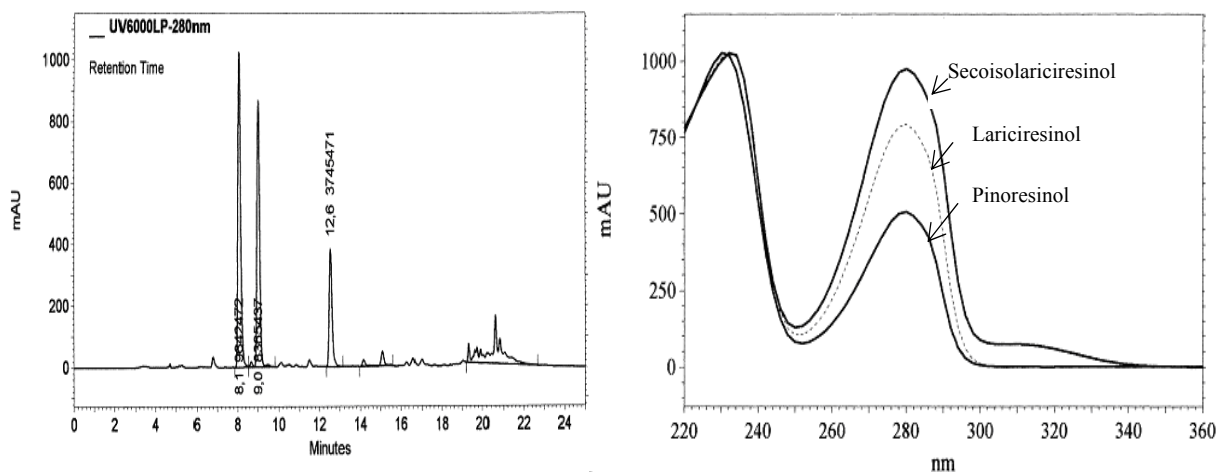


Abb. 3.1: rechts: Chromatogramm eines Standards der Lignane SECO (8,1 min), LARI (9,0 min) und PINO (12,6 min) bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm; sowie deren Absorptionsspektren (links).

3. Ergebnisse

Die Auftrennung der Enantiomere erfolgte mittels chiraler HPLC-Säulen. Standards von racemischen PINO, LARI und SECO zeigen die Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4. Das Programm für die Trennung der LARI Enantiomere (Abb. 3.3) wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert (modifiziert nach Xia et al., 2000).

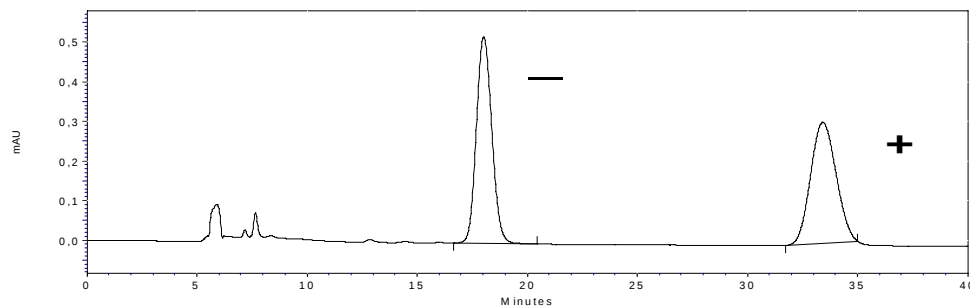


Abb. 3.2: Standard von racemischen Pinoresinol-Enantiomeren, getrennt über eine chirale Säule

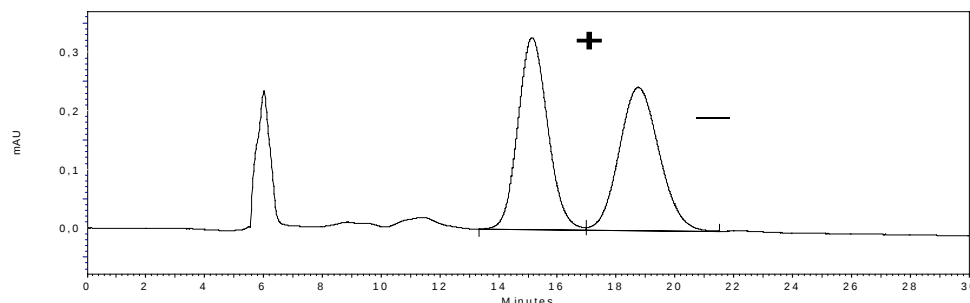


Abb.3.3: Standard von racemischen Lariciresinol-Enantiomeren, getrennt über eine chirale Säule

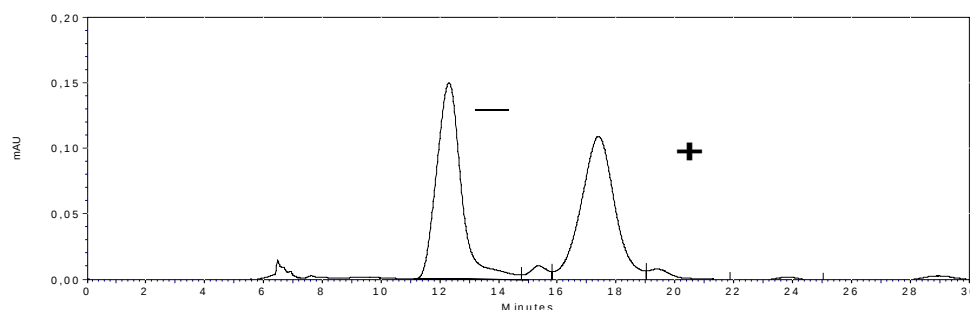


Abb. 3.4: Standard von racemischen Secoisolariciresinol-Enantiomeren, getrennt über eine chirale Säule

3.2 Charakterisierung von Zellkulturen von *Linum album* und *Linum usitatissimum*

In dieser Arbeit sollten Zellkulturen von *Linum album* und *Linum usitatissimum* dazu genutzt werden, die Lignanakkumulation von PINO, SECO und LARI sowie deren enantiomeren Zusammensetzung zu untersuchen und zu vergleichen. Des Weiteren sollte die *L. usitatissimum* Kultur für die Gewinnung der cDNA genutzt werden.

Zellkulturen können aufgrund möglicher somaklonaler Variationen Veränderungen unterworfen sein, welche sich sowohl auf das Wachstumsverhalten der Kultur als auch in der Expression verschiedener Enzyme und daraus folgend der Produktion der Sekundärstoffe auswirken können. Daher ist es essentiell, die Kulturen in regelmäßigen Abständen zu überprüfen, insbesondere, wenn eine cDNA Synthese beabsichtigt ist.

Im Rahmen der Charakterisierung wurden das Frisch- und Trockengewicht der Zellen, der pH-Wert, die Leitfähigkeit, die Zuckerkonzentration des Mediums und das Vorkommen der Lignane PINO, LARI und SECO in den Zellen untersucht.

3.2.1 Die Wachstumsparameter: Frisch- und Trockengewicht

Die in Abb.3.5 gezeigten Kurvenverläufe der beiden *Linum* Arten weisen ein charakteristisches Bild für pflanzliche Suspensionskulturen auf. Die lag-Phase, also diejenige Zeit, in der sich die Zellen auf das neue Nährmedium einstellen müssen, dauerte bei beiden Kulturen zwei Tage. Da nur an jedem zweiten Tag Proben genommen wurden, ist die kurze log-Phase an ca. Tag 2 nicht gut zu sehen. Die daran anschließende lineare Phase hielt bis zum 8. Tag bzw. bei der *L. album* Kultur bis zum 10. Tag an. Dabei stieg das Frischgewicht der *L. album* Kultur um das 6,3 fache und das der *L. usitatissimum* um das 8,3 fache des Ausgangswertes an. Die stationäre Phase verlief bei beiden Kulturen bis zum 14. Tag. Aufgrund des starken Wachstums und der damit einher laufenden Verarmung des Mediums an Nährsalzen, sowie der Verbrauch der Saccharose als Kohlenstoffquelle und die Abgabe von toxischen Substanzen in das Medium, schließt sich eine Absterbephase an. Am Ende des Charakterisierungszeitraumes wiesen die Frischgewichte nur noch das 5,6 fache des Ausgangswertes auf. Die Trockengewichtskurven verliefen ähnlich denen des Frischgewichtes, nur dass die Kurven um zwei Tage nach vorne verschoben waren.

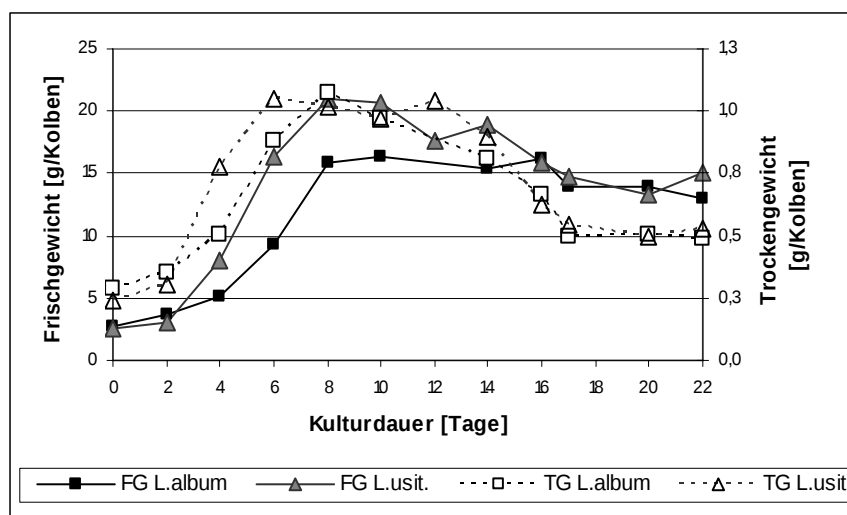


Abb. 3.5: Veränderung der Frischgewichte (FG) und Trockengewichte (TG) der *L. album* und *L. usitatissimum* (*L.usit*) Suspensionskulturen über eine Kultivierungsdauer von 22 Tagen.

3.2.2 Die Mediumsparameter: pH, Leitfähigkeit, Zuckerkonzentration

Es wurden über den Kulturverlauf die Mediumsparameter pH, Leitfähigkeit und Zuckerkonzentration bestimmt. Beide Kulturen wiesen die gleiche Tendenz auf. So ist zu erkennen, dass sich der pH-Wert im Kulturverlauf nur unerheblich veränderte. Er fiel am dritten Tag bei der *L. album* Kultur (Abb.3.6) ausgehend von pH 4,8 auf pH 4,4. Ab diesem Tag stieg er bis zum 15 Tag auf pH 6,7, um dann wieder leicht auf pH 6,5 abzufallen.

Die Leitfähigkeit ist ein Maß für den Ionengehalt des Mediums. Das MS-Medium hat einen hohen Anteil an Nitrationen. Daher ist die Leitfähigkeit ein guter Anhaltspunkt für die gegenwärtige Nitratkonzentration. Die Leitfähigkeitskurve verhält sich spiegelbildlich zur Frischgewichtskurve Am Überimpftag lag sie bei der *L. album* Kultur bei 5,3 mS/cm. Aufgrund der Ionenaufnahme in die Pflanzenzelle sank die Leitfähigkeitskurve bis 0,9 mS/cm an Tag 12. In der folgenden Zeit kam es zu einer Absterbephase der Zellen, sichtbar durch das Steigen der Leitfähigkeitskurve im Medium. Die Leitfähigkeit erreicht am Ende der Charakterisierung einen Wert von 4,7 mS/cm.

Der refraktometrisch bestimmte Zuckergehalt des Nährmediums ist nur ein Annäherungswert, da im Medium noch weitere lichtbrechende Substanzen vorliegen. So haben auch die Nitrationen einen Anteil an der Lichtbrechung. Daher und auch durch andere Faktoren wie z.B. die Verdunstung des Wassers während des Autoklavierens wurde zu Beginn der Charakterisierung eine Zuckerkonzentration von 3,5 % ermittelt. Die ermittelten Werte fielen auf 0,4 % am 9. Tag und stiegen bis zum Tag 19 wieder leicht an. Am Ende der Charakterisierung wurde eine Zuckerkonzentration von 0,9 % ermittelt. Der erwartete Nullwert wurde aufgrund der anderen lichtbrechenden Substanzen nicht erreicht.

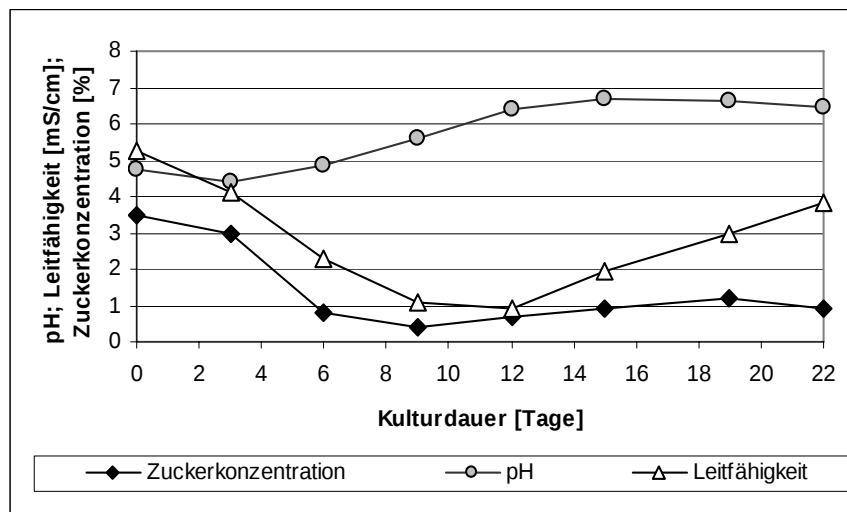


Abb. 3.6: Entwicklung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und der Zuckerkonzentration im Kulturverlauf der *L. album* Kultur

Auch bei der *L. usitatissimum* Kultur (Abb. 3.7) war ein geringfügiger pH-Abfall am dritten Tag zu beobachten. Der pH-Wert fiel von pH 5,6 auf pH 5,2. Er stieg bis zum 19. Kulturtag

auf pH 8,5 an und fiel ab auf pH 7,9. Der Abfall des pH-Wertes am Tag 9 beruht vermutlich auf einem Messfehler.

Die Ionenkonzentration bei der *L. usitatissimum* Kultur fiel analog zu der von *L. album*. Sie fiel von 5,3 mS/cm am Überimpftag auf 0,3 mS/cm am 9. Tag und stieg wieder auf 4,7 mS/cm am letzten Charakterisierungstag an.

Der Zuckergehalt der *L. usitatissimum* Kultur fiel ausgehend von 3,3 % auf 0,1 % am 9. Tag; stieg bis zum 15. Tag leicht auf 0,4 % an und erreichte am Ende der Charakterisierung eine Konzentration von 1,2 %. Die Konzentrationserhöhung am 19. Tag beruht vermutlich auf einem Ablesefehler des Refraktometers.

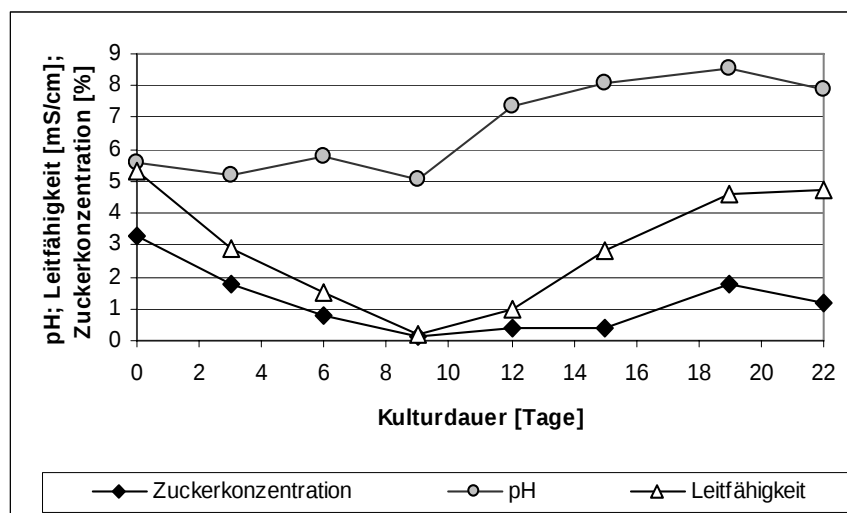


Abb. 3.7: Entwicklung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und der Zuckerkonzentration im Kulturverlauf der *L. usitatissimum* Kultur

3.2.3 Lignanakkumulation

Während der Charakterisierung wurden die Zellen auf die gebildeten Lignane PINO, LARI und SECO untersucht. Die Lignane wurden, wie in Kap. 2.3.3 beschrieben, extrahiert und mittels HPLC-Analyse quantifiziert. Die Zellen der *L. album* Kultur wiesen am Tag der Subkultivierung nur geringe Gehalte der untersuchten Lignane auf, so konnten nur 0,08 mg/g TG PINO und 0,04 mg/g TG SECO gefunden werden (Abb. 3.8). Am dritten Tag der Charakterisierung war auch 0,04 mg/g TG LARI zu detektieren. Die Gehalte aller drei Lignane stiegen an, bis PINO und LARI am 12. Kultivierungstag und SECO am 15. Tag ihre höchsten Konzentrationen mit 0,23 mg/g TG PINO, 0,34 mg/g TG LARI und 0,28 mg/g TG SECO erreichten. Die Lignankonzentrationen fielen bis zum Ende des untersuchten Zeitraumes auf 0,11 mg/g TG PINO, 0,04 mg/g TG LARI und 0,17 mg/g TG SECO.

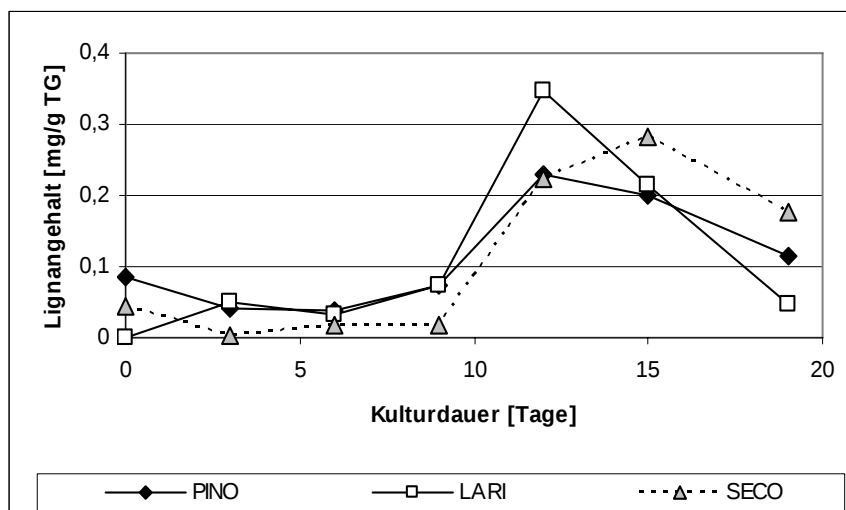


Abb.3.8: PINO-, LARI- und SECO-Gehalte der *L. album* Suspensionskultur im Kulturverlauf

Bei der *L. usitatissimum* Kultur (Abb. 3.9) wurde eine Akkumulation von 0,11 mg/g TG PINO, 0,02 mg/g TG LARI und 0,01 mg/g TG SECO zum Beginn der Kultivierung gefunden. Die Lignangehalte von PINO und LARI fielen bis zum 4. Kulturtag. Die höchsten Lignangehalte waren am 10. Tag zu verzeichnen mit 0,1 mg/g TG PINO, 0,11 mg/g TG LARI und 0,10 mg/g TG SECO. Bis zum Ende der Kulturperiode fielen die Kurve wieder auf Konzentrationen von 0,01 mg/g TG PINO, 0,02 mg/g TG LARI und 0,03 mg/g TG SECO.

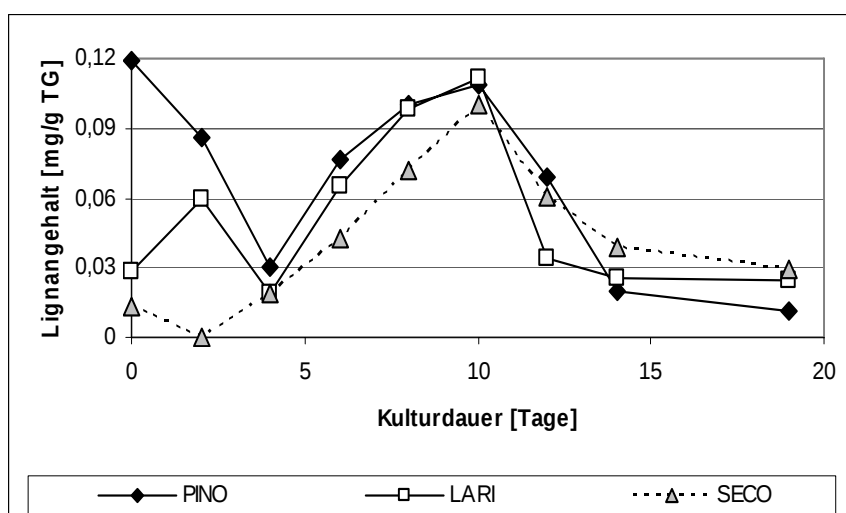


Abb.3.9: PINO-, LARI- und SECO-Gehalte der *L. usitatissimum* Suspensionskultur im Kulturverlauf

Enantiomere Gegenüberstellung

Es wurden aus der *L.album* Kultur am 12. Tag und aus der *L.usitatissimum* Kultur am 10. Tag die Lignane PINO und SECO gesammelt und ihre Enantiomere Zusammensetzung bestimmt (Abb. 3.10). Als vergleichende Standards wurden racemisches PINO im Verhältnis (+):(-) = 50:50 (Abb. 3.10 A) und racemisches SECO im Verhältnis (+):(-) = 50:50 (Abb. 3.10 B) verwendet. In den *L. usitatissimum* Zellsuspensionskulturen liegt PINO als Gemisch beider Enantiomere im Verhältnis (+):(-) = 40: 60 vor (Abb. 3.10 C), SECO liegt als reines (+)-Enantiomer vor (Abb. 3.10 D). In den *L. album* Zellsuspensionskulturen liegt PINO als Gemisch beider Enantiomere im Verhältnis (+):(-) = 52: 48 vor (Abb. 3.10 E), SECO liegt als reines (-)-Enantiomer vor (Abb. 3.10 F).

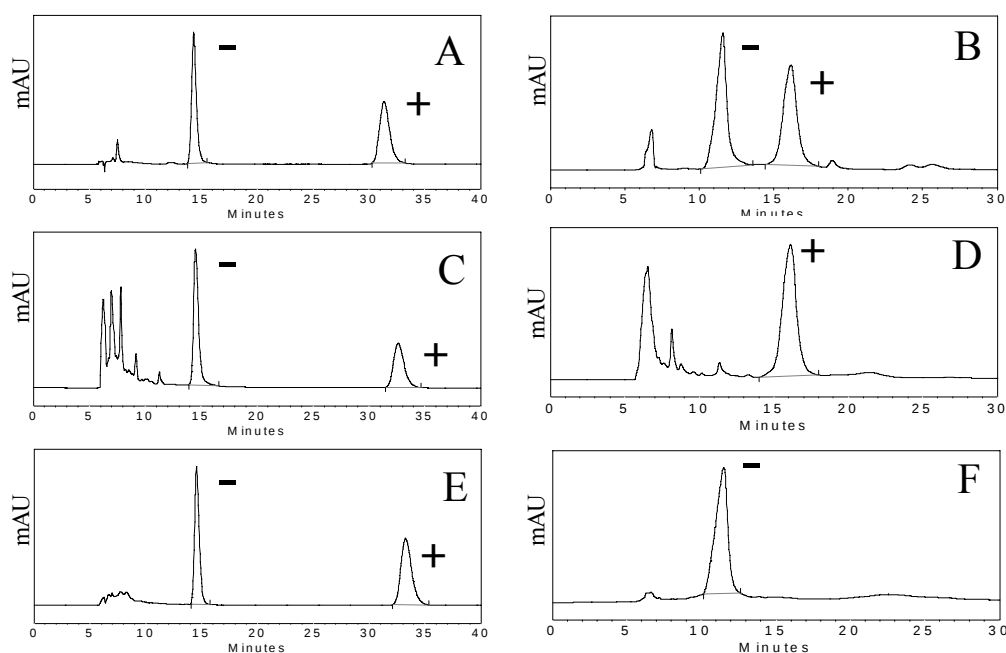


Abb. 3.10: Vergleich der enantiomeren Zusammensetzung der Lignane PINO und SECO in Zellkulturen von *L. usitatissimum* und *L. album* an Tag 10 bzw. Tag 12.

3.2.4 Elicitierung

Für die Erhöhung der Lignankonzentration bei *L. usitatissimum* Suspensionskulturen wurde ein Elicitierungsversuch mit 100 μ M Methyljasmonat durchgeführt.

Das Methyljasmonat führte ab Tag 9 der Kulturperiode zur Erniedrigung des Frischgewichtes um den Faktor 1,6 (Abb. 3.11). Drei Tage nach Elicitierung zeigte die Frischgewichtsmenge der elicitierten Zellen noch keinen signifikanten Unterschied zu den Vergleichszellen. Ab dem vierten Tag stieg die Frischgewichtsmenge der Vergleichszellen stark an und die Kultur erreichte am 9. Tag mit 15,2 g/FG die stationäre Phase. Die elicitierten Zellen erreichten die stationäre Phase an Tag 12 mit 8,6 g/FG. Die mit Ethanol, versetzten Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen.

3. Ergebnisse

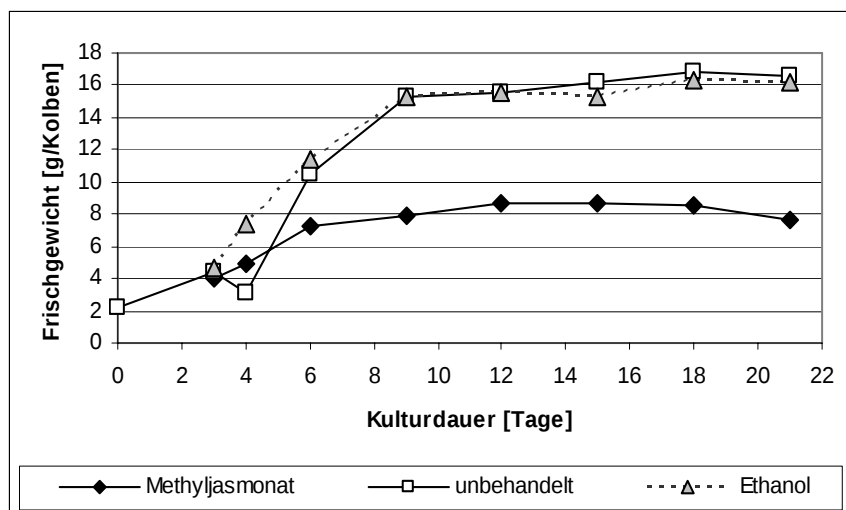


Abb. 3.11: Vergleich der Frishgewichte einer *L. usitatissimum* Kultur nach Zugabe von Methyljasmonat bzw. Ethanol mit einer unbehandelten Kultur.

Die Elicitierung zeigte auch Auswirkungen auf die Lignanakkumulation. Wie auch die Frishgewichte nehmen die Lignangehalte ab (Abb. 3.12) Am dritten Kultivierungstag wurde eine SECO Konzentration von 0,17 mg/g TG bei den elicitierten Zellen und von 0,32 mg/g TG bei den Vergleichszellen gemessen. Am 6. Tag konnte nur noch 0,02 mg/g TG SECO in den elicitierten Zellen nachgewiesen werden und ab Tag 12 keines mehr. Der SECO Gehalt der Vergleichszellen stieg bis Tag 15 auf 0,65 mg/g TG an. Die mit Ethanol versetzten Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied der Lignangehalte zu den unbehandelten Zellen.

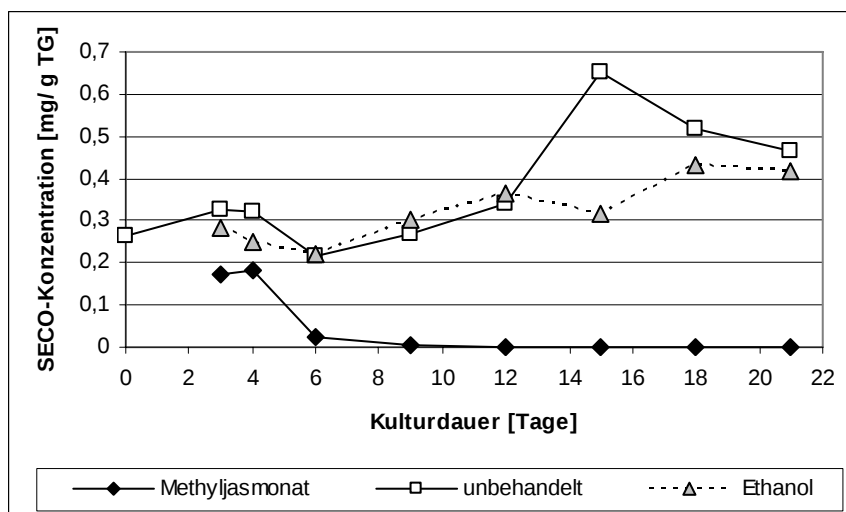


Abb. 3.12: Vergleich der SECO-Konzentrationen einer *L. usitatissimum* Kultur nach Zugabe von Methyljasmonat bzw. Ethanol mit einer unbehandelten Kultur.

Es wurden Charakterisierungsuntersuchungen an einer Zellkultur von *L. album* und erstmals an einer Zellkultur von *L. usitatissimum* durchgeführt. Beide Kulturen wiesen die für Zellkulturen typischen Wachstumskurven auf. Gleiches gilt auch für die Mediumsparameter pH-Wert, Leitfähigkeit und Zuckerkonzentration. Die *L. album* Kultur zeigte die höchste Akkumulation der Lignane PINO, LARI und SECO am 12. Kulturtag. Erstmals wurde die Akkumulation dieser Lignane in Zellsuspensionskulturen von *L. usitatissimum* nachgewiesen. Sie erreichten ihre höchsten Konzentrationen am 10. Tag. Ein Elicitierungsversuch der *L. usitatissimum*-Kultur mit Methyljasmonat führte zu einer Erniedrigung des Frischgewichtes und der Lignangehalte. Bei der Untersuchung der enantiomeren Zusammensetzung wurden bei beiden Kulturen nahezu racemisches PINO gefunden. Im Gegensatz dazu akkumulierte die Kultur von *L. usitatissimum* nur (+)-SECO und die von *L. album* nur (-)-SECO.

3.3 PLRs aus *L. usitatissimum* und *L. album*

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war eine cDNA der *Linum album* PLR (LA-PLR) isoliert und für die Expression in *E. coli* in den Vektor pET-15b kloniert und als His₆-PLR aufgereinigt worden (Fuß, Schäfer, 2001). Aus Versuchen war bekannt, dass diese *L. album* PLR enantiospezifisch arbeitet (von Heimendahl et al., 2003). Literaturdaten (Ford et al., 2001; Sicilia et al., 2003) wiesen darauf hin, dass die Samen von *L. usitatissimum* das dem in der Biosynthese des (-)-Podophyllotoxins in *L. album* entgegen gesetzte Enantiomer des SECOs akkumulieren. Für die Erforschung der Hintergründe der verschiedenen Enantiospezifitäten der PLRs sollte die Sequenz der *L. usitatissimum* PLR ebenfalls in den pET-15b Vektor kloniert werden.

Beim Durchsuchen der Datenbanken nach PLR-Sequenzen von *L. usitatissimum* wurde ein ORF gefunden (Akzessions Nr. AX191955, Lewis, 2001). Es waren aber keine detaillierten Angaben zur Funktion des Proteins beschrieben.

Daher wurde aus 5 Tage alten *L. usitatissimum* Suspensionskulturzellen die Gesamt RNA extrahiert, Primer für die cDNA Synthese kreiert und das ORF einer *L. usitatissimum* PLR (LUS-PLR) kloniert (Kapitel 2.4.2).

Das ORF (PLR-LU1, Accession No. AJ849359) codiert ein 312 Aminosäure großes Protein. Im Vergleich mit der Datenbanksequenz konnte ein Austausch von 13 Nukleotiden und 4 Aminosäuren bei der LUS-PLR1 gefunden werden.

3.3.1 Blast P Vergleich der PLR-ORF Sequenzen von *L. album* und *L. usitatissimum*

Der in Tab. 3.1 gezeigte Vergleich der ORF-Sequenzen der LUS-PLR und LA-PLR gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei den beiden untersuchten ORFs um PLRs handelt. Die LUS-PLR weist zur LA-PLR eine mit 66 % hohe Übereinstimmung und 75 % Ähnlich-

3. Ergebnisse

keit auf. Auch konnte im Vergleich mit der *Forsythia intermedia* PLR1 eine 60 %ige - bei der LUS-PLR und eine 75 %ige- Übereinstimmung bei der LA-PLR gefunden werden. Dagegen lag die Übereinstimmung mit der *Pinus* PCBER-Sequenz bei nur 46 bzw 47 %. Die *B. pendula* IFR weist sogar nur eine 43 %ige Übereinstimmung zu der LUS-PLR und eine 47 %ige zu der LA-PLR auf.

Tab. 3.1: Ergebnis einer Blast P Suche mit der LUS-PLR und LA-PLR als Suchsequenzen

Sequenz	% Übereinstimmung		% Ähnlichkeit	
	LUS	LA	LUS	LA
<i>Linum album</i> PLR	66	100	75	100
<i>Forsythia intermedia</i> PLR1	60	75	77	85
<i>Thuja plicata</i> PLR2	61	60	74	76
<i>Tsuga heterophylla</i> PLR2	58	60	73	76
<i>Pinus taeda</i> PBCR	46	47	64	66
<i>Betula pendula</i> IFR	43	47	63	63

3.3.1.1 Klonierung der LUS-PLR zur Überexpression in *E. coli*

Für die Erforschung der Hintergründe der verschiedenen Enantiospezifitäten wurde der ORF einer PLR codierender Sequenz aus *L. usitatissimum* Suspensionskulturen in den Expressionsvektor pET-15b kloniert (Abb 3.13). Der Vektor bindet am N-Terminal eine 6-Histidin Sequenz. Die Überexpression des LUS-PLR-ORFs in *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurde anhand von SDS-PAGE (Kap. 2.5.1.3) überprüft und bestätigt. Die Aufreinigung des His₆-Fusionsprotein erfolgte über eine Ni-NTA-Matrix der Firma QIAGEN (Kap. 2.5.1.2). Das Enzym konnte erfolgreich aufgereinigt werden und war enzymatisch Aktiv.

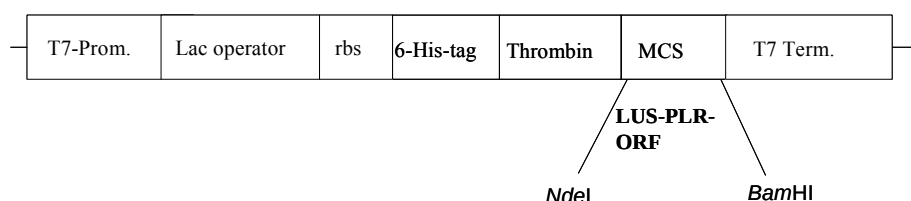


Abb. 3.13: schematische Übersicht der Expressionsregion des pET-15b- Vektors mit der Klonierung des LUS-PLR-ORFs

3.3.2 Vergleichende Enzymtests der heterolog exprimierten *L. usitatissimum* und der *L. album* PLR

Von früheren Versuchen war bekannt, dass die LA-PLR enantiospezifisch arbeitet. Von der LUS-PLR wurde erwartet, dass sie die zu der LA-PLR entgegengesetzte Enantiospezifität aufweisen sollte. Es sollte die Funktionsweisen der beiden PLRs untersucht und die Enantiospezifität aufgeklärt werden. Dazu wurden wie in Kapitel 2.5.2 beschriebene PLR Enzymtests durchgeführt. Als Substrat wurde racemisches PINO eingesetzt und über steigende Proteinkonzentrationen bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden die katalytische Aktivität der PLRs, durch die Bestimmung der gebildeten Lignane LARI und SECO und des verbliebenen PINOs sowie deren enantiomeren Zusammensetzung, ermittelt. In mehreren Vorversuchen wurde bewiesen, dass Zeit- und Proteinabhängigkeitskurven analoge Ergebnisse liefern.

3.3.2.1 *L. usitatissimum* PLR-Fusionsprotein

Bis zu einer Proteinkonzentration von 2 µg/ml im Ansatz war nur SECO als Produkt detektierbar (Abb 3.14). Die SECO-Konzentration stieg bis auf 3,8 mM bei einer Proteinkonzentration von 18 mM. Die SECO-Konzentration stagnierte bei 3,8 mM auch bei steigender Proteinkonzentration. Erst bei einer Proteinkonzentration von 485 µg/ml stieg die SECO-Konzentration auf 4,2 mM.

LARI wurde bei einer Proteinkonzentration von 6 µg/ml mit 0,2 mM detektiert. Die LARI-Konzentration stieg bis zu einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml auf 3,9 mM. Die Konzentration fiel auf 3,7 mM bei der Proteinkonzentration von 485 µg/ml.

Die PINO Konzentration fiel kontinuierlich. Ab einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml konnte kein PINO mehr detektiert werden.

Die bei dem Enzymtest entstandenen Lignane LARI und SECO sowie das verbliebene PINO wurden mittels chiraler HPLC (Kap.2.7.2) auf die Zusammensetzung ihrer Enantiomere untersucht.

Ausgehend vom racemischen PINO wird das (-)-PINO schnell umgesetzt, so dass es ab einer Proteinkonzentration von 18 µg/ml nicht mehr detektierbar ist. Das (+)-PINO wird bis zu einer Enzymkonzentration von 12 µg/ml nur langsam umgesetzt, dann schnell verbraucht und ist ab einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml nicht mehr detektierbar.

Es konnte kein (-)-LARI nachgewiesen werden. Die (+)-LARI Konzentration stieg ab einer Proteinkonzentration von 6 µg/ml kontinuierlich auf 3,9 mM bei einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml. Es konnte bei der Proteinkonzentration von 485 µg/ml eine Abnahme der (+)-LARI Konzentration auf 3,7 mM nachgewiesen werden.

Bis zu der Proteinkonzentration von 100 µg/ml wurde nur (+)-SECO gebildet. Vom anschließend gebildeten (-)-Seco konnten maximal 0,3 mM gefunden werden.

3. Ergebnisse

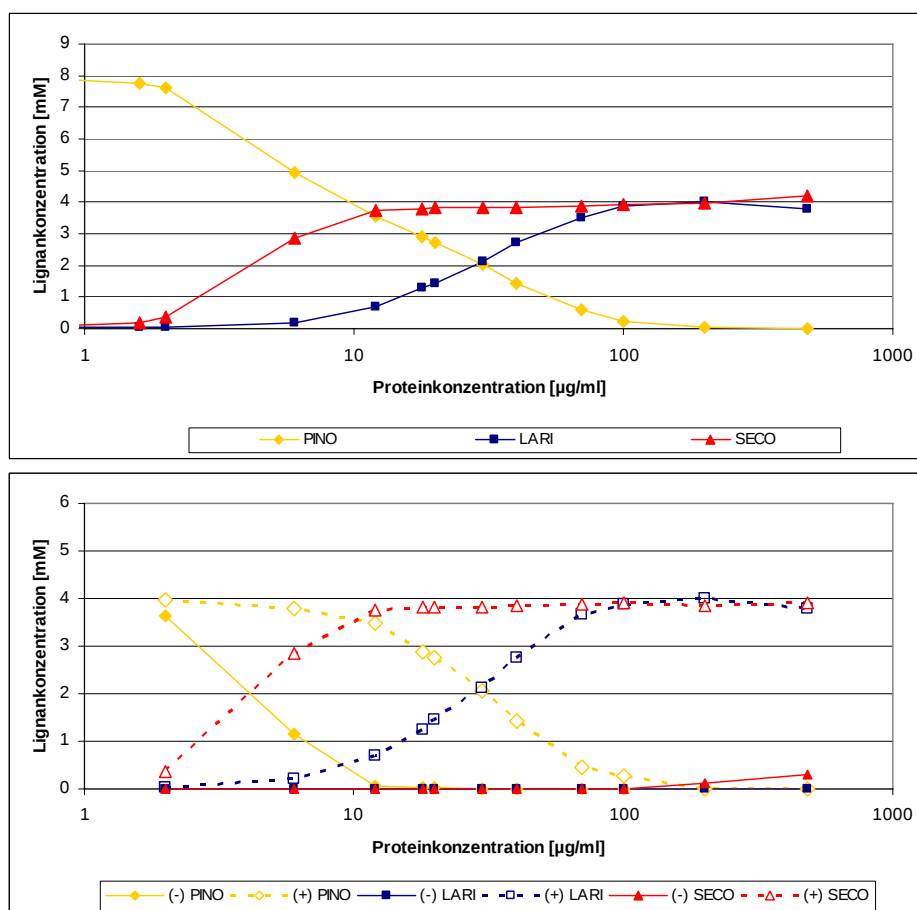


Abb. 3.14: oben: Proteinabhängigkeit der vom *L. usitatissimum* PLR Fusionsprotein katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat. unten: Enantiomere Zusammensetzung der Lignane

Die untersuchte LUS-PLR setzt also (-)-PINO zu (+)-SECO über (-)-LARI um. Ist nahezu das gesamte (-)-PINO verbraucht, reduziert die LUS-PLR das (+)-PINO zu (+)-LARI. Erst bei hohen Enzymkonzentrationen, und wenn keinerlei PINO mehr vorliegt, findet die Reduktion des (+)-LARI zu (-)-SECO statt.

3.3.2.2 *L. album* PLR-Fusionsprotein

Bis zu einer Proteinkonzentration von 0,4 µg/ml im Ansatz katalysiert die LA-PLR nur die Reaktion von PINO zu LARI. Erst ab 0,6 µg/ml entsteht auch SECO. Ab einer Konzentration von 1,8 µg/ml bis 12 µg/ml ist kein LARI mehr detektierbar, das PINO stagniert mit 4,3 mM bei in etwa der Hälfte der eingesetzten Menge und das entstandene SECO erreicht ein Plateau von ca. 3,7 mM. Erst ab einer 20-fachen Erhöhung der Proteinkonzentration ist die Bildung von LARI wieder beobachtbar, verbunden mit der Abnahme des verbliebenen PINOs. Bei einer Konzentration von 817,2 µg/ml Protein steigt die SECO-Konzentration von 3,9 auf 4,8 mM. Die Kurve des LARIs steigt bei dieser Proteinkonzentration auf 2,6 mM, verbunden mit dem Absinken der PINO Kurve auf 0,5 mM.

3. Ergebnisse

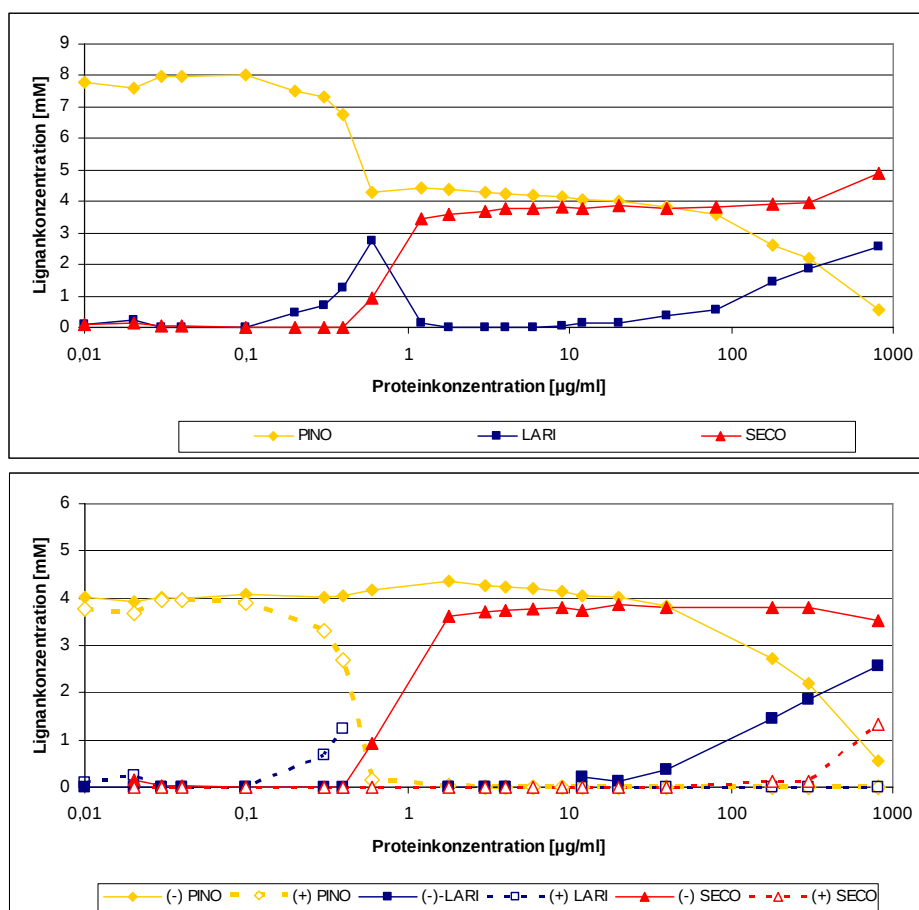


Abb.3.15: oben: Proteinabhängigkeit der vom *L. album* PLR Fusionsprotein katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat.
unten: Enantiomere Zusammensetzung der Lignane

Die bei dem Enzymtest entstandenen Lignane LARI und SECO sowie das verbliebene PINO wurden mittels chiraler HPLC (Kap.2.7.2) auf die Zusammensetzung ihrer Enantiomere untersucht.

Ausgehend vom racemischen PINO wird das (+)-PINO schnell umgesetzt, so dass es ab einer Proteinkonzentration von 1,8 µg/ml nicht mehr detektierbar ist. Das (-)-PINO stagniert bei etwa bei 4 mM bis zu der Enzymkonzentration von 40 µg/ml und nimmt dann schnell ab.

Die Untersuchung des gebildeten LARI zeigte, dass solange (+)-PINO vorhanden war, nur (+)-LARI gebildet wurde. Ab den hohen Proteinkonzentrationen von 12 µg/ml wurde nur (-)-LARI gefunden. Die Konzentration des (-)-LARIs stieg bis auf 2,6 mM bei der maximal eingesetzten Enzymmenge.

Bis zu der Proteinkonzentration von 180 µg/ml wurde nur (-)-SECO gebildet. Vom anschließend gebildetem (+)-Seco konnten maximal 1,3 mM gefunden werden.

Die untersuchte LA-PLR setzt also, im Unterschied zur LUS-PLR, (+)-PINO zu (+)-LARI um. Wenn das gesamte (+)-PINO verbraucht ist, reduziert die LA-PLR das (+)-LARI zu (-)-SECO. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die LA-PLR bei sehr hohen Enzymkonzentrationen auch die Umsetzung der entgegen gesetzten Enantiomere von (-)-PINO über (-)-LARI zu (+)-SECO katalysiert. Die LA-PLR und die LUS-PLR weisen entgegengesetzte Enantiospezifitäten auf.

3.4 Mutageneseversuche

Die gefundenen Daten warfen die Frage auf, wo die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Enantiospezifitäten der PLRs zu suchen sind. Strukturaufklärung der PLR aus *T. plicata* (Min et al., 2003) sowie Computersimulationen zu den räumlichen Strukturen (Lushta, 2007) zeigten das es sich bei den PLRs sehr wahrscheinlich um Monomere handelt.

3.4.1 Sequenzvergleich verschiedener PLRs, sowie IFRs und PCBERs

Für die Aufklärung der Frage, warum die Enzyme unterschiedlich enantioselektiv arbeiten, wurden zunächst die Sequenzen (-)-SECO formender PLRs denen (+)-SECO formender PLRs aber auch IFRs und PCBERs gegenüber gestellt (Abb.3.17).

a) Spezifisch (-)-SECO formende PLRs:

Linum album (PLR-La1, Accession no. AJ849358)

Forsythia intermedia (PLR-Fi1, Accession no. U81158)

Thuja plicata (PLR-Tp2, Accession no. AF242504)

b) Spezifisch (+)-SECO formende PLRs:

L. usitatissimum (PLR-Lu1, Accession no. AJ849359)

Thuja plicata (PLR-Tp1, Accession no. AF242503)

c) IFR:

Medicago sativa (IFR-Ms1, Accession no. U17436)

Cicer arietum (IFR-Ca1, Accession no. Q00016)

Pisum sativum (IFR-Ps1, Accession no. S72472)

d) PCBER:

Populus trichocarpa (PCBER-Pb, Accession no. AJ132262)

Pinus taeda (PCBER-Pt, Accession no. AF242490)

Beim Vergleich der Sequenzen wurden vier Positionen gefunden, an denen alle bevorzugt (+)-SECO katalysierende PLRs eine andere Aminosäure aufweisen als diejenigen die bevorzugt (-)-SECO synthetisieren, was als Hinweis auf die molekulare Ursache der verschiedenen Stereospezifitäten diskutiert wurde. Zwei dieser Aminosäure-Positionen sind identisch mit denen die auch von Min et al. (2003) als mögliche Kandidaten gehandelt wurden.

3.4.2 Mutationen

Infolge der in Kapitel 3.4.1 gefundenen verschiedenen Aminosäuren wurden Mutationen an der LA-PLR Sequenz durchgeführt (Abb. 3.16).

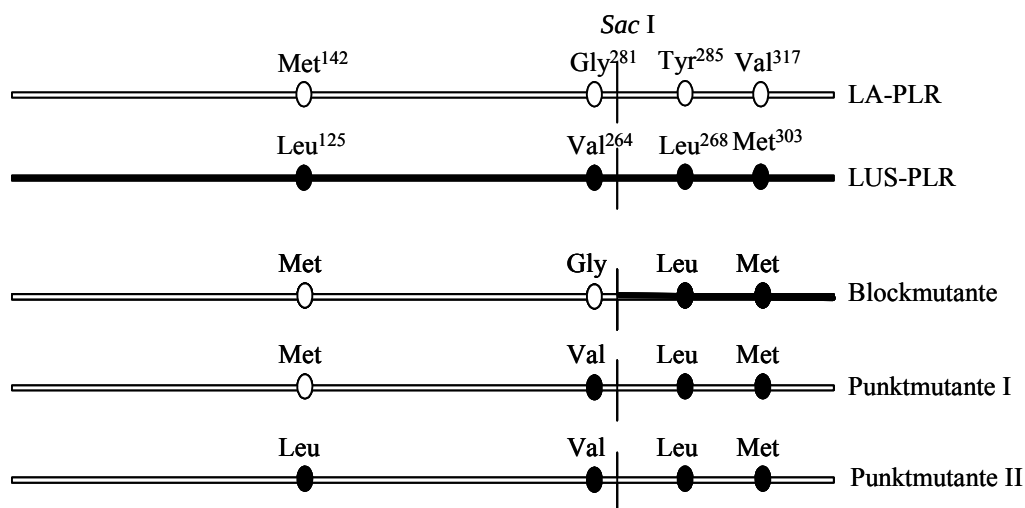


Abb.3.16: Schematische Darstellung der Primärstruktur der LA-PLR (-)-SECO spezifisch und der LUS-PLR (+)-SECO spezifisch mit Angabe der Position der Aminosäuren, die für die Enantiospezifität der Enzyme verantwortlich sein könnten. Mit Sac I wurde das hintere Drittel der LA-PLR gegen die vordere Hälfte der LUS-PLR getauscht.

3. Ergebnisse

PLR-La1	MGSLGKVNNEIPTKSSGGSKVLVI	GGTGYLGKRLVKASLDSGHDTYVMHRPE-----	52
PLR-Fi1	-----	MGKSKVLIIGGTGYLGRRLVKASLAQGHETYILHRPE-----	37
PLR-Tp2	-----	MEESSRLVIVGGTGYIGRRIVKASIALGHPTFIFLRKE-----	38
PLR-Lu1	-----	MGRCRVLVVGGTGYIGKRIVKASIEHGHDTYVLKRPE-----	37
PLR-Tp1	-----	MDKKSRLVIVGGTGYIGKRIVNASISLGHPTYVLFPRPE-----	38
IFR-Ms1	-----	MATENKILILGPTGAIGRHIVWASIKAGNPTYALVRKTPGNVNPKP	46
IFR-Ca1	-----	MASQNRILVLGPTGAIGRHVVWASIKAGNPTYALIRKTPGDINKPS	46
IFR-Ps1	-----	MATENKILILGATGAIGRHIVWASIKAGNPTYALVRKTSNDVNPKP	46
PCBER-Pb	-----	MADKSKILIIIGGTGYIGKFIVEASAKAGHTFALVRES-----	38
PCBER-Pt	-----	MGSRSRILLIGATGYIGRHVAKASLDLGHPTFLLVRES-----	38
PLR-La1	---	IGVDIEKVQLLSFKMQGAHLVSASFDDQSRSLVDAVKLVDDVICAISGVHIRSHQIL	109
PLR-Fi1	---	IGVDIDKVEMLISFKMQGAHLVSGSKDFNSLVEAVKLVDDVISAISGVHIRSHQIL	94
PLR-Tp2	---	VVSDVEKVEMLLSFKKNGAKLLEASFDDHESLVDVAVKQVDVVISAVAGNHMRHH-IL	94
PLR-Lu1	---	TGLDIEKFQLLSFKKQGAHLVEASFSDHESLVRVAVKLVDDVICTVSGAHSRS--LL	92
PLR-Tp1	---	VVSNIDKVQMLLYFKQLGAKLIEASLDDHQRLVDALKQVDVVISALAGGVLSHH-IL	94
IFR-Ms1		LITAAANPETKEELIDNYQSLGVILLEGDINDHETLVKAIKQVDIVICAAG-----	101
IFR-Ca1		LVAAANPESKEELLQSFKAAGVILLEGDMNDHEALVKAIKQVDTVICTFG-----	101
IFR-Ps1		LTEAANPETKEELLKNYQASGVILLEGDINDHETLVNAIKQVDTVICAAG-----	101
PCBER-Pb		--TVS-DPVKRELVEKFNKLGVTLIHGDVDGHDNLVKAIKQVDVVISAIIG-----	90
PCBER-Pt		--TASSNSEKAQLLESFKASGANIVHGSIDDHASLVEAVKNVDVVISTVG-----	91
PLR-La1		LQLKLVEAIEAGNVKRFVPSEFGTDPAR-MENAM	168
PLR-Fi1		LQLKLVEAIEAGNVKRFVPSEFGMDPAKFMDTAM	154
PLR-Tp2		QQLKLVEAIEAGNIKRFVPSEFGMDPGL-MEHAM	153
PLR-Lu1		LQLKLVEAIEAGNVKRFVPSEFGMDPAR-MGDALE	151
PLR-Tp1		EQKLVEAIEAGNIKRFVPSEFGMDPI-MEHAL	153
IFR-Ms1		DQVKIIKAIKEAGNVKRFVPSEFGLDVR--HEAVEPVRQVFEEKASIRRVIEAEGVPYT	159
IFR-Ca1		DQVKIIKAIKEAGNVKRFVPSEFGLDVR--HDAVDPVRPVFDEKASIRRVIEAEGVPYT	159
IFR-Ps1		DQVKVIKAIKEAGNVKRFVPSEFGLDVR--HDAVEPVRQVFEEKASIRRVIEAEGVPYT	159
PCBER-Pb		DQTKIIAAIEAGNVKRFVPSEFGMDVDH--VNAVEPAKTAFAKMAQIRRAIEAAGIPYT	148
PCBER-Pt		SQVNIKAIKEVGTVKRFVPSEFGNDVDN--VHAVEPAKSVFEVKAIVRAIEAEGIPYT	149
PLR-La1		YVSANCFAGYFLGGLCQPGY---ILPSRDHVTLLGDGDKGVYVDEDDTAAYTLRAIDDP	225
PLR-Fi1		YVSANCFAGYFLGGLCQFGK---ILPSRDFVIHGDGNKKAIVNNEDDIATYAIKTINDP	211
PLR-Tp2		YISANIFAGYLVGGLAQLGR---VMPPSEKVILYGDGNVKAVWDEDDVGIYTIKAIDDP	210
PLR-Lu1		YISANCFGGYFVGNLSQLGP---LTPPSDKVTIYGDGNVKVVMDEDDVATYTIMTIEDD	208
PLR-Tp1		YVSSNMFAGYFAGSLAQLDG--HMMPPRDKVLIYGDGNVKGIVWDEDDVGTYTIKSIDDP	211
IFR-Ms1		YLCCHAFTGYFLRNLAQLDT---TDPPRDKVILGDGNVKGAYVTEADVGTFTIRAANDP	216
IFR-Ca1		YLCCHAFTGYFLRNLAQFDA---TEPPRDKVILGDGNVKGAYVTEADVGTFTIRAANDP	216
IFR-Ps1		YLCCHAFTGYFLRNLAQIDA---TDPPRDKVILGDGNVKGAYVTEADVGTFTIRAANDP	216
PCBER-Pb		YVPSNFFFAAYVLPFLAQLGFL---TAPPRDKITILGDGNKLVFNKEDDIGTYTIKAVDDA	205
PCBER-Pt		YVSSNCFAGYFLRSLAQAAGL---TAPPRDKVILGDGNARVVFVKEEDIGTFTIKAVDDP	206
PLR-La1		RTLNKTIYVKPPKNVLSQREVVGWEKYIGKELQKITLSEQDFLATMREQNYAEQVGLTH	285
PLR-Fi1		RTLNKTIYISPPKNILSQREVVTWEKLIGKELQKITLSKEDFLASVKELEYAQVGLSH	271
PLR-Tp2		HTLNKTMYIRPPLNILSQKEVVEKWEKLSGKSLNKINISVEDFLAGMEGQSYGEQIGISH	270
PLR-Lu1		RTLNKTMYLRPPEENVITHRQLVETWEKLSGNLQKTELSSQDFLALMEGKDVAEQVIGH	268
PLR-Tp1		QTLNKTMYIRPPMNILSQKEVIQIWERLSEQNLDKIYISSQDFLADMKDKSYEEKIVRCH	271
IFR-Ms1		NTLNKAHVHIRLPENYLTQNEVIALWEKKIGKTEKTYVSEEQVLKDIQESSFPFNHLLAL	276
IFR-Ca1		RTLNKAVHIRLPHNYLTSENVVSLWEKKIGKTEKTSYISEEKVLKDINVSTFPFNHLLAL	276
IFR-Ps1		NTLNKAHVHIRLPNNYLTANEVIALWEKKIGKTEKTYVSEEQVLKDIQTSSFPFNHLLAL	276
PCBER-Pb		RTLNKTVLIKPPKNYTSFNLIDLWEKKIGKTEKTFVPEEKLLKDIQESPIPINIVLSI	265
PCBER-Pt		RTLNKTIYLRPLPANTLSLNLVALWEKKIDKTEKAYVPEEEVLKLIADTPFPANISIAI	266
PLR-La1		YHVCYEGCLSNFEVD---DEQEASKLYPDVHYTTVEEYLKRYV	326
PLR-Fi1		YHDVNYQCCLTSFEIG---DEEEASKLYPEVKYTSVEEYLKRYV	312
PLR-Tp2		FYQMFYRGDLNFEIGP--NGVEASQLYPEVKYTTVDSYMERYL	312
PLR-Lu1		LYHIYYEGCLTNFDIDAQDQVEASSLYPEVEYIRMKDYLMIYL	312
PLR-Tp1		LYQIFFRGDLNFEIGP--NAIEATKLYPEVKYTTMSYLERYL	313
IFR-Ms1		YHSQQIKGD-AVYEIDPA-KDIEASEAYPDVYTTADEYLNQFV	318
IFR-Ca1		YHSQQIKGD-AVYEIDPA-KDAEAYDLYPDVKYTTADEYLDQFV	318
IFR-Ps1		YHSQQIKGD-AVYEIDPA-KDVEAYDAYPDVKYTTADEYLNQFV	318
PCBER-Pb		NHSALVNGDMTNFEIDPS-WGLEASELYPDVKYTTVEEYLDQFV	308
PCBER-Pt		SHSIFVKGDTNFEIGP--AGVEASQLYPDVKYTTVDEYLSNFV	308

Abb. 3.17: Aminosäure-Vergleich zwischen PLRs, welche spezifisch (-)-SECO formen (blau) zu spezifisch (+)-formenden (rot), sowie zu IFRs und PCBERs (schwarz). Die grau unterlegte Sequenz stellt die NADPH-Bindedomäne dar. Die schwarzen Quadrate und fett gedruckten Buchstaben markieren solche Aminosäurepositionen in PLRs, in denen sich die bevorzugt (+)-und (-)-SECO formende PLRs unterscheiden. In dem Zusammenhang zeigen die schwarzen Punkte diejenigen Positionen, welche nah am katalytischen Zentrum liegen (Min et al., 2003). Die schwarzen Dreiecke zeigen diejenige Positionen, die nach Min et al. (2003) an der Sterospezifität beteiligt sein sollen.

3.4.2.1 „Blockmutation“

Bei der Konstruktion der „Blockmutaten“ wurde das letzte Drittel der LA-PLR Sequenz gegen das der LUS-PLR ausgetauscht. Dabei umfasst dieser Teil die zwei hinteren Aminosäuren der in Abb.3.17 vorgeschlagenen Mutationsstellen.

Für die Herstellung des auszutauschenden Blocks wurde die LUS-PLR Sequenz als Template verwendet. Mit Hilfe der in Kap. 2.10 dargestellten Primer konnte ein PCR-Produkt gewonnen werden, welches die Schnittstelle für *SacI* und die Sequenz der LUS-PLR trug. Mittels Restriktionshydrolyse wurde das Gegenstück zu dem amplifizierten LUS-PLR Stück aus der LA-PLR herausgeschnitten. Die DNA wurde über Gelelektrophorese aufgereinigt und das LUS-PLR Stück in die verbliebene $\frac{3}{4}$ LA-PLR ligiert. Die entstandene Blockmutante konnte erfolgreich als His₆-Fusionsprotein gewonnen werden.

Die Mutante zeigte nur sehr geringe Aktivität, so dass keine signifikante Aussage zu ihrer Enantiospezifität gewonnen werden konnte.

3.4.2.2 Punktmutationen

Es wurden zwei verschieden punktmutierte LA-PLRs hergestellt. Bei beiden wurde die Sequenz der LA-PLR als Grundlage verwendet und nur an spezifischen Stellen wurden ein bis zwei Nukleotide pro Codon ausgetauscht, so dass an dieser Stelle die entsprechende Aminosäure der LUS-PLR expremiert wurde. Als Expressionsvektor diente pET-15b.

Bei der ersten Punktmutante (I) wurden die hinteren drei der in Abb. 3.16 gezeigten Aminosäuren der LA-PLR gegen die der LUS-PLR ausgetauscht.

Für die Herstellung dieser Punktmutanten wurde die in Kapitel 2.10 beschriebenen Primer hergestellt. Als Template wurde die DNA der LA-PLR verwendet. Dabei wurden im ersten Schritt Primer (λ und β) verwendet, die für den Austausch der spezifischen Aminosäuren die entsprechenden Nukleotide besaßen. Das durch PCR mit diesen Primern entstandene DNA Fragment enthielt die erwünschte Mutation. Es wurde als Rückwärts Primer verwendet, um zusammen mit dem γ - Primer den vollständigen ORF der PLR zu amplifizieren.

Bei der zweiten Punktmutante (II) wurden alle vier in Abb.3.16 gezeigten Aminosäuren ausgetauscht.

Der erste Mutationsschritt verlief analog der Punktmutation (I). Das entstandene PCR Produkt wurde als Primer verwendet, zusammen mit einem weiteren Primer (γ), welcher die Sequenz für die vierte Mutation enthielt. Das wiederum daraus entstandene PCR-Produkt wurde als Rückwärts Primer verwendet, um zusammen mit dem δ - Primer den vollständigen ORF der PLR zu amplifizieren.

Die Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Punktmutante (I):

Bei dieser Mutante wurden drei Aminosäuren der LA-PLR gegen die entsprechenden Aminosäuren der LUS-PLR ausgetauscht. Es wurde 8 mM racemisches PINO als Substrat, sowie 0,267 µg/ml Enzym eingesetzt um die Reaktion der PLR über die Zeit zu verfolgen. Die PINO Kurve fällt konstant von 7,6 mM nach 10 min Inkubation auf 3,9 mM nach 15,5 Stunden. Die LARI und SECO Kurven steigen linear von 0,3 mM und 10 min auf 3,1 mM nach 15,5 Stunden bei der LARI Kurve bzw. etwas flacher bei der SECO-Kurve von 0 mM auf 0,9 mM nach 15,5 Stunden (Abb. 3.18).

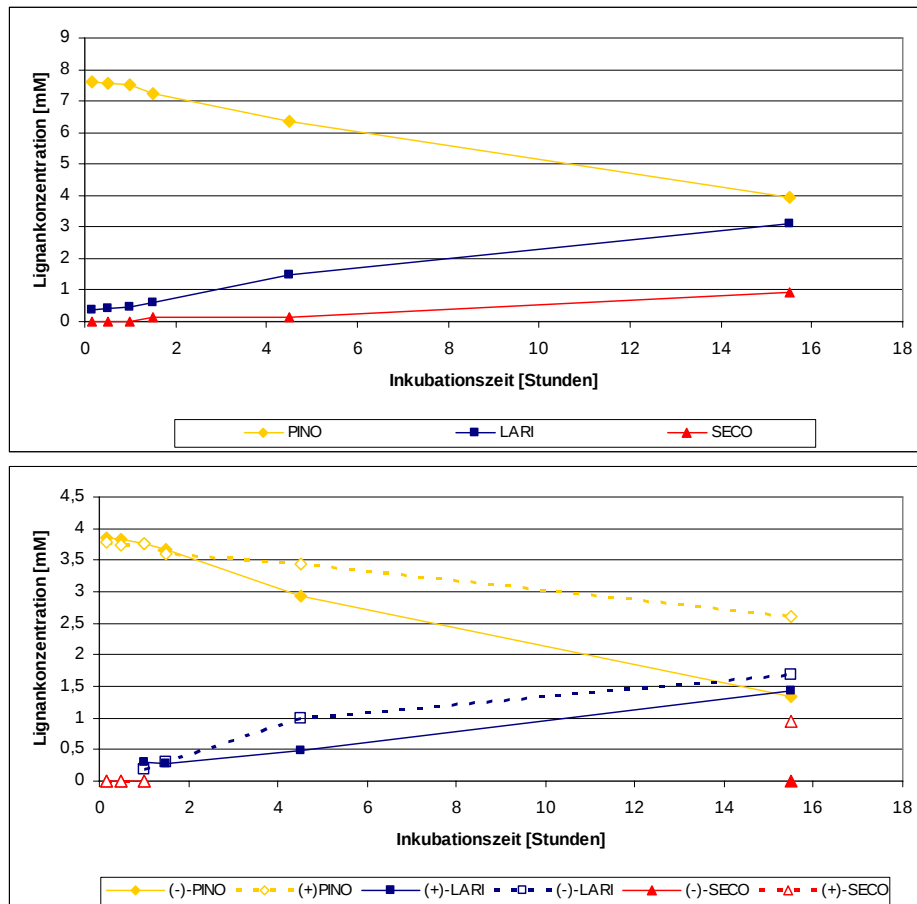


Abb. 3.18: oben Enzymtest mit der Punktmutante
unten: Enantiomere Zusammensetzung der Lignane

Ausgehend von dem eingesetzten racemischen Pino fiel die (-)-PINO-Kurve von 3,8 mM nach 10 min auf 1,3 mM nach 15,5 Stunden Inkubation (Abb. 3.18). Etwas flacher fiel die (+)-PINO-Kurve sie begann mit 3,7 mM bei 10 min und fiel auf 2,6 mM nach 15,5 Stunden. Die Konzentration von (-)-LARI stieg etwas steiler als die des (+)-LARIs. Die (-)-LARI Kurve begann bei 0,2 mM und 1 Stunde und erreichte nach 15,5 Stunden die Konzentration von 1,7 mM. (+)-LARI stieg im selben Zeitraum von 0,3 mM auf 1,4 mM. Nach 15,5 Stunden Inkubation konnte nur (-)-SECO detektiert werden.

Im Gegensatz zur LA-PLR setzt die Punktmutante bevorzugt (-)-PINO zu (+)-LARI um. Auch zeigt die Mutante nicht mehr die eindeutige Enantioselektivität der LA-PLR

Punktmutation (II):

Das an vier Stellen mutierte Enzym zeigte nur sehr geringe Aktivität, so konnten bei verschiedenen Enzymkonzentrationen und 24 Stunden Inkubation nur minimale Werte von LARI ermittelt werden. Noch geringer fiel die Bildung von SECO aus. Insgesamt waren die Konzentrationen zu gering um deren Enantiomeren Zusammensetzung zu ermitteln.

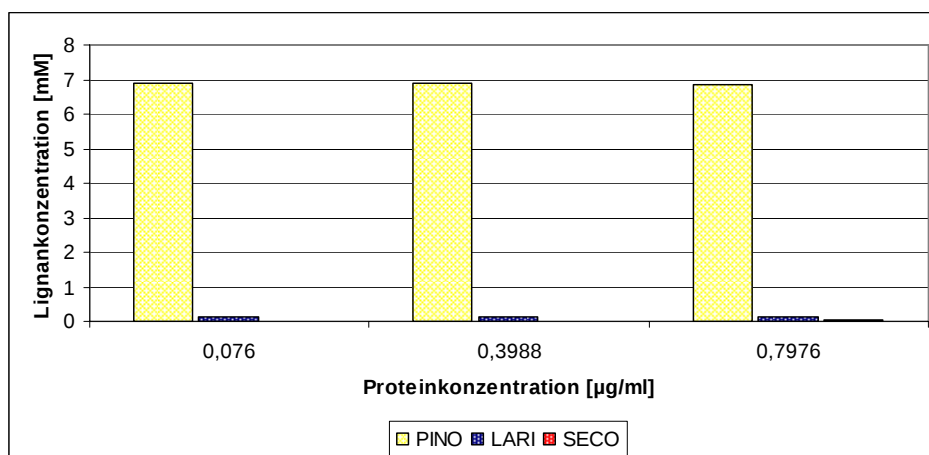


Abb. 3.19: Enzymtest mit der Punktmutante II.

Es wurden mutierte LA-PLRs hergestellt. Nur diejenige „neue“ PLR zeigte Aktivität, bei der die hinteren drei in Abb. 3.16 schematisch dargestellten Aminosäuren ausgetauscht wurden. Diese PLR bevorzugt das (-)-PINO als Substrat im Gegensatz zu der „Mutter“ LA-PLR, welche selektiv für das (+)-PINO Enantiomer ist.

3.5 PLR ähnliche Gene von *Arabidopsis thaliana*

Treml (2005) hat acht PLR ähnliche Gene über eine Datenbanksuche aus *A. thaliana* ausgewählt und die ORFs von fünf dieser Gene in *E. coli* exprimiert. Es wurden Aktivitätstest durchgeführt und die Aminosäuresequenzen verglichen. Anhand dieser Daten konnten erste Vorhersagen gegeben werden. Demnach handelt es sich bei AT 1 und AT 2 wahrscheinlich um PLRs und bei AT 3 um eine PCBER. In Ergänzung dieser Arbeit wurden die in *E. coli* exprimierten PLR ähnliche Gene von *Arabidopsis thaliana* (AT 1 bis AT 7) weitergehend untersucht. Analog zu den Untersuchungen an der LA-PLR und LUS-PLR (Kap. 3.3.2) wurden Proteinabhängigkeitstest durchgeführt und die verbliebenen bzw. gebildeten Lignane auf ihrer enantiomere Zusammensetzung hin untersucht. Zudem wurde DDC als Substrat für PCBERs eingesetzt, um zu testen, ob es sich bei den exprimierten Enzymen um PCBERs handelt.

3.5.1 AT 1

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen weist darauf hin, dass die AT 1 eine PLR sein sollte. Die Aktivität des Enzyms wurde mit verschiedenen Proteinmengen gemessen und die enantiomere Zusammensetzung der Lignane bestimmt (Abb. 3.20).

Das als Substrat eingesetzte racemische PINO wurde vollständig zu LARI umgewandelt. Daher fiel die Kurve schnell von 7,7 mM bei einer Proteinkonzentration von 0,1 µg/ml auf 0 mM und einer Proteinkonzentration von 1,8 µg/ml. Der glockenförmige Kurvenverlauf von LARI erreichte sein Maximum bei 7,2 mM und einer Enzymkonzentration von 0,6 µg/ml. Ab einer AT 1 Konzentration von 40 µg/ml war kein LARI mehr detektierbar. Der sigmoide Kurvenverlauf der SECO-Kurve begann seine Steigung bei 1,2 µg/ml mit 0,8 mM. Die Steigung hielt kontinuierlich an bis zur AT 1 Konzentration von 20 µg/ml. Ab dieser Konzentration ging die Kurve in die Waagerechte über mit 7,8 mM SECO.

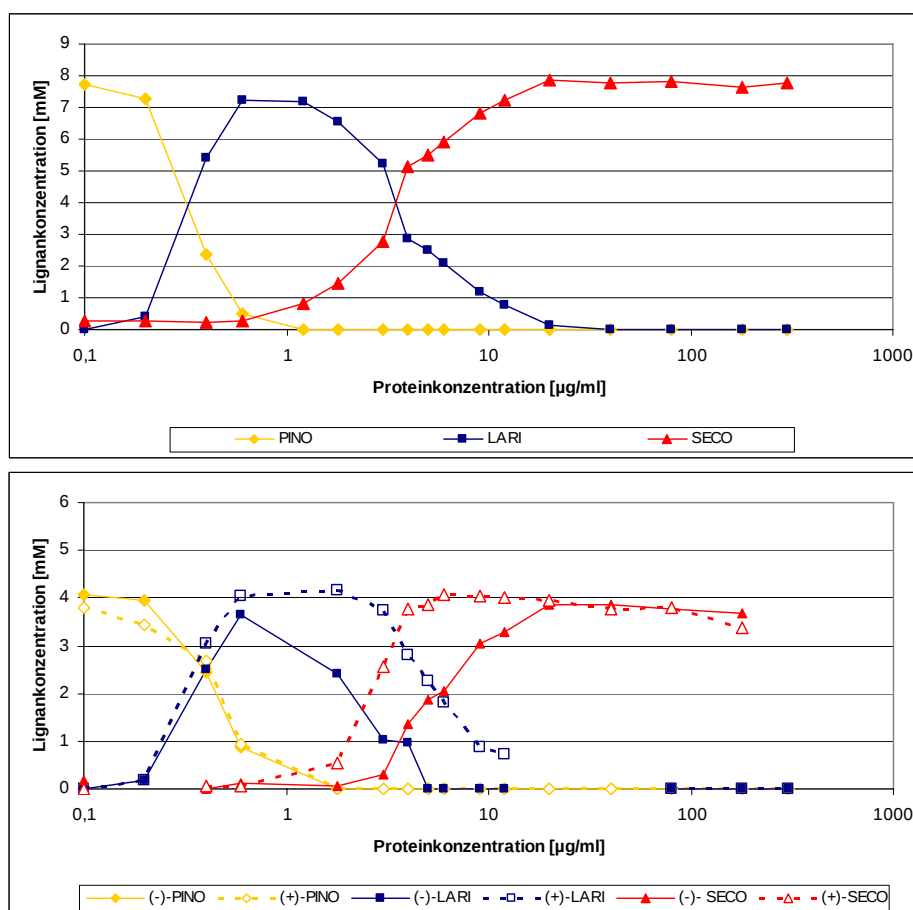


Abb.3.20: oben: Proteinabhängigkeit der von der AT 1 katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat unten: Enantiomere Zusammensetzung der Lignane

Bei der Untersuchung der enantiomeren Zusammensetzung der Lignane, zeigte sich, dass es keinen Unterschied im Verbrauch zwischen den beiden PINO Enantiomeren gab. Wie zu erwarten stieg die Konzentration von (+)- und (-)-LARI im gleichen Maße an. Dann nimmt die (-)-LARI Konzentration aber schneller und früher (ab 0,6 µg/ml AT 1) ab als die des

(+)-LARI (Abnahme ab 1,8 $\mu\text{g/ml}$ AT 1). Entsprechend ist erst die Bildung von (+)-SECO ab einer AT 1 Konzentration von 1,8 $\mu\text{g/ml}$ zu beobachten.

Für die Überprüfung auf PCBER Aktivitäten wurde DDC im Vergleich zu PINO als Substrat eingesetzt. Es wurde eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt. Das PINO wurde vollständig zu SECO umgesetzt. Das DDC wurde nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen in geringer Menge zu IDDDC reduziert.

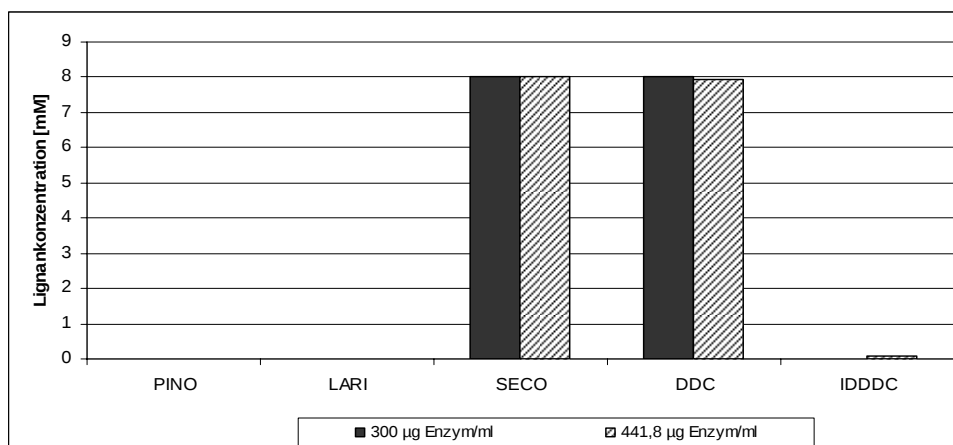


Abb. 3.21: Enzymtests mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen über Nacht mit PINO und DDC als Substrat.

AT 1 ist also eine PLR, die aber geringfügig PCBER-Aktivität zeigt. Als PLR ist sie für PINO nicht enantioselektiv. Im zweiten von PLRs katalysierten Reaktionsschritt bevorzugt die AT 1 aber (-)-LARI.

3.5.2 AT 2

Analog zu AT 1 weist der Vergleich der Aminosäuren darauf hin, dass es sich bei AT 2 um eine PLR handeln müsste. Die Aktivität des Enzyms wurde mit verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen und die enantiomere Zusammensetzung der Lignane bestimmt.

Die PINO Konzentration fiel von 7,5 mM und einer Proteinkonzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$. PINO war nicht mehr detektierbar ab einer Proteinkonzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$. Die LARI-Kurve stieg kontinuierlich an und erreichte bei einer AT 2 Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ mit 7,4 mM ihr Maximum. Die Kurve fiel anschließend auf 2,6 mM bei einer Proteinkonzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$. Die SECO Kurve begann mit ihrer Steigung an dem Punkt, an dem die LARI Kurve ihr Maximum hatte. Entgegengesetzt synchron zu dem Fallen der LARI Kurve stieg die SECO Kurve.

3. Ergebnisse

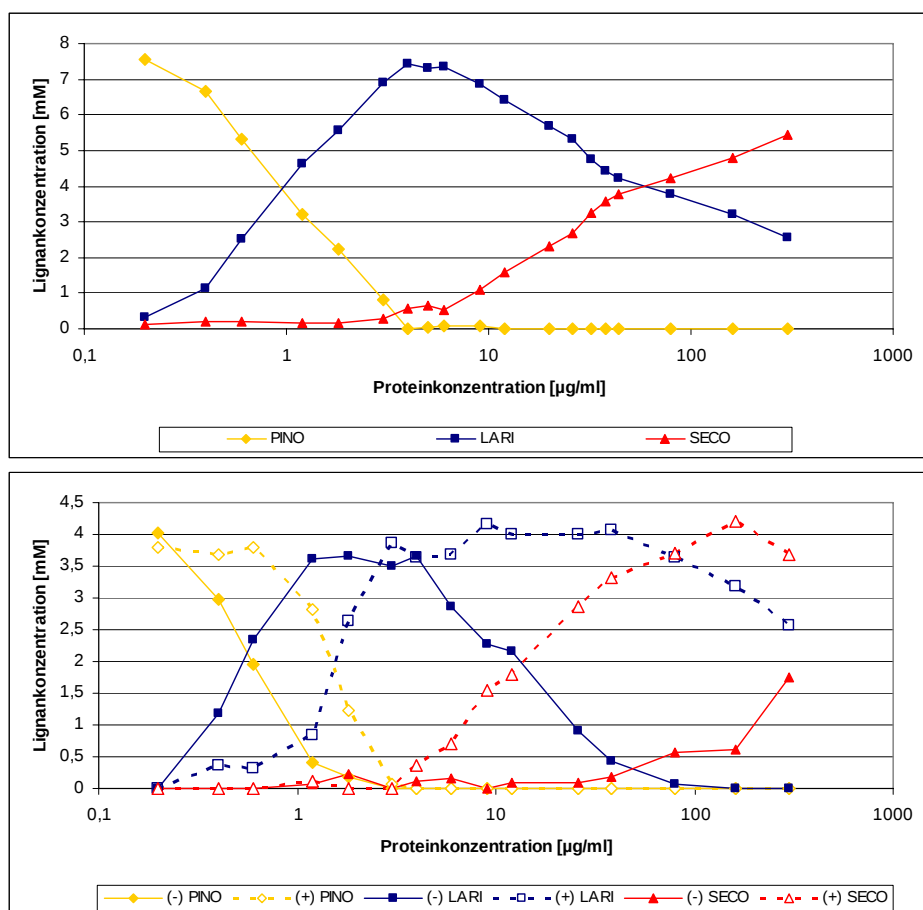


Abb.3.22: oben: Proteinabhängigkeit der von der AT 2 katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat unten: Enantiomere Zusammensetzung der Lignane

Bei der Bestimmung der enantiomeren Zusammensetzung wurde folgendes gefunden: Die (+)-PINO-Kurve fiel schneller als die (-)-PINO Kurve. Die Kurve des (-)-LARI zeigte eine Glockenform mit einem Maximum von 3,6 mM bei der Proteinkonzentration an der kein PINO mehr detektierbar war. Ab der AT 2-Konzentration von 80 µg/ml war kein (-)-Lari mehr zu finden. Die (+)-LARI Kurve begann ihre Steigung bei einer Proteinkonzentration von 1,2 µg/ml bis zu der AT 2-Konzentration 3 µg/ml und 4 mM. Bis zur Enzymkonzentration von 38 µg/ml blieb die Kurve auf dem Plateau und fiel dann im selben Maße ab wie die (+)-SECO Kurve anstieg. (+)-SECO war ab einer Proteinkonzentration von 3 µg/ml zu finden. Die Kurve stieg linear an, erreicht bei 160 µg/ml ihr Maximum und fiel dann wieder etwas ab.

AT 2 zeigt keine PCBER Aktivität mit DDC als Substrat. Das racemische PINO wurde bei gleichen Proteinkonzentrationen vollständig zu LARI und SECO umgewandelt (Abb.3.23).

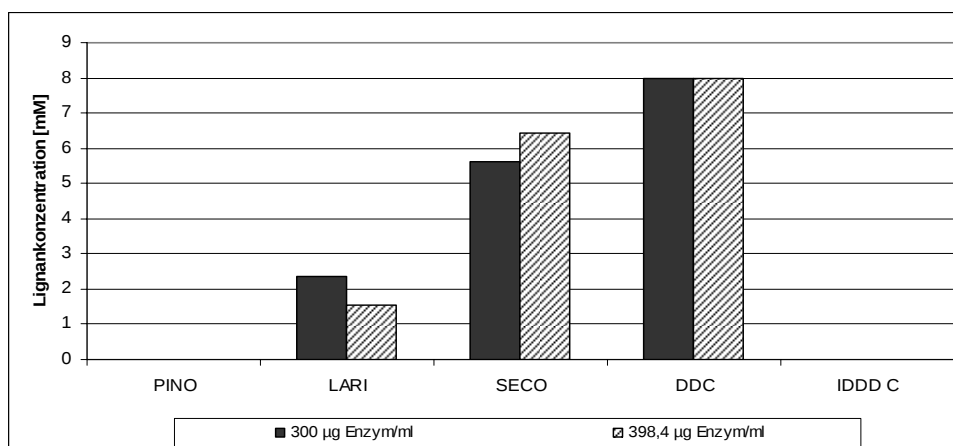


Abb. 3.23: Enzymtests mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen über Nacht mit PINO und DDC als Substrat.

AT 2 ist also eine PLR, die keine PCBER-Aktivität zeigt. Sie zeigt eine leichte Selektivität für (-)-PINO und (-)-LARI.

3.5.3 AT 3

Aminosäuresequenzvergleiche gaben erste Hinweise darauf, dass es sich bei der AT 3 nicht um eine PLR handelt. Auch hier wurde die Aktivität des Enzyms mit verschiedenen Proteinmengen und racemischem PINO als Substrat, gemessen und die enantiomere Zusammensetzung der Lignane bestimmt. Außerdem wurde DDC für die Überprüfung eventueller PCBER Aktivität eingesetzt.

PINO und DDC wurden in gleicher Konzentration eingesetzt und 24 Stunden im Enzymtest inkubiert. Die PINO Konzentration fiel langsam von 7,6 mM auf 6,1 mM bei steigender Proteinkonzentration von 20 µg/ml bis 204 µg/ml. Spiegelbildlich zur PINO Kurve stieg die LARI Konzentration von 0,4 mM auf 1,9 mM. SECO konnte nicht gefunden werden. Die Reaktion von DDC zu IDDDC verlief schneller, so fiel die Konzentration vom DDC schnell von 5,7 mM auf 0,8 mM bei den Enzymkonzentrationen 20 µg/ml bis 204 µg/ml. Z.B. war bei der Proteinkonzentration von 120 µg/ml nur 12,4 % des PINOs umgesetzt, wohingegen bei selber Enzymkonzentration 71,9 % des DDC umgesetzt wurde. Die Konzentration von IDDDC stieg auch hier spiegelbildlich zur DDC Kurve von 2,3 mM auf 7,2 mM.

3. Ergebnisse

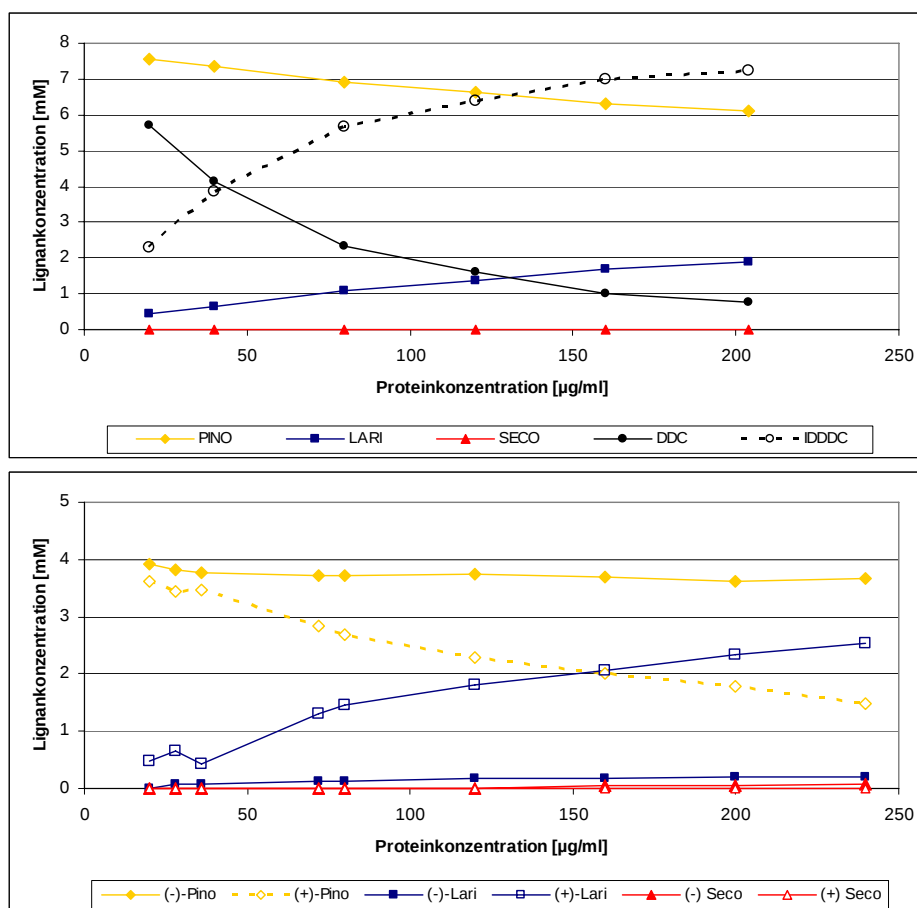


Abb.3.24: oben: AT 3; Abhängigkeit der PLR/PCBER-Aktivität von der Proteinmenge im Reaktionsansatz
unten: Enantiomere Zusammensetzung Lignane PINO, LARI und SECO

In Abb. 3.24 ist ein typischer Verlauf der enantiomeren Verteilung von PINO, LARI und SECO gezeigt. Ausgehend vom racemischen PINO fiel die (+)-PINO Kurve bei steigender Proteinkonzentration schnell ab, hier von 3,6 mM auf 1,8 mM bei Proteinkonzentrationen von 20 bis 240 µg/ml, spiegelbildlich dazu verlief die (+)-LARI Kurve sie fiel von 4,6 mM auf 2,5 mM. Die Konzentration des (-)-PINOs fiel nur minimal von anfänglich 3,9 mM auf 3,6 mM. Vergleichbar dazu stieg die (-)-LARI-Kurve leicht von 0 mM auf 0,2 mM an. (+)-SECO konnte nicht detektiert werden und (-)-SECO nur in Mengen von 0,05 mM ab einer Proteinkonzentration von 160 µg/ml.

AT 3 zeigte eindeutige PCBER-Aktivitäten und reduzierte das Substrat DDC zu IDDDC. Im Vergleich wurde PINO nur in geringen Maße reduziert; auch konnte die Reaktion nur bis zum LARI ablaufen. Dabei zeigte die AT 3 eine Bevorzugung für (+)-PINO.

3.5.4 AT 4 bis AT 7

AT 4 und AT 5 konnten nicht als His₆-Fusionsprotein exprimiert werden. Änderungen an den Versuchsbedingungen wie z.B. verschiedene Expressionstemperaturen oder verschiedene IPTG Konzentrationen zeigten keine Auswirkungen. Auch der Versuch AT 4 und AT 5 mittels GST-Tag in löslicher Form zu exprimieren schlug fehl. Da AT 4 und AT 5 von der Sequenz den PCBERs zugeordnet werden können, wurde von weiteren Expressions Versuchen abgesehen. AT 6 und AT 7 konnten als His₆-Fusionsproteine expimiert werden und über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt werden. In Enzymtests analog zu denen von AT 1, AT 2 und AT 3 konnten bei AT 6 und AT 7 weder gute PLR noch PCBER Aktivitäten nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zellkulturen von *L. album* und *L. usitatissimum*

Pflanzliche Suspensionskulturen bestehen aus undifferenzierten Zellen, die genetisch sehr instabil sind und deshalb z.B. leicht die Fähigkeit zur Synthese bestimmter Inhaltsstoffe verlieren. Dieser Vorgang wird als somaklonale Variation bezeichnet. Es ist daher unablässig in regelmäßigen Abständen Charakterisierungsarbeiten durchzuführen.

Zellkulturen von *L. album* und *L. usitatissimum* wurden über eine Kulturperiode von 22 Tagen charakterisiert. Dabei wurden die Frisch- und Trockengewichte, sowie die Veränderungen des Nährmediums anhand des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und des Brechungsindex bestimmt. Zudem wurden die Lignangehalte und der Einfluss von Methyljasmonat auf die Zellen untersucht.

Die Charakterisierung der *L. usitatissimum* Kultur wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Wachstumsparameter: Wachstumskurven pflanzlicher Zellkulturen ähneln, mit leichten Unterschieden, denen von Mikroorganismen (Muttazzl, 1993). Charakteristische Wachstumskurven weisen eine anfängliche lag-Phase, gefolgt von einer exponentiellen Phase, eine lineare Phase und eine eher kurze stationäre Phase und anschließende Absterbephase auf. Die in Abb. 3.5 gezeigten Frisch- und Trockengewichtskurven der *Linum* Suspensionskulturen zeigen einen typischen Verlauf, welcher auch schon in früheren Charakterisierungen von *L. album* Zellsuspensionen beobachtet werden konnte (von Heimendahl et al., 2003; Windhövel, 1998). Nach dem Transfer der Suspensionszellen in frisches Nährmedium muss sich deren Stoffwechsel auf die neuen Bedingungen einstellen, so dass das Teilungswachstum der Zellen stark eingeschränkt ist. Nach einer kurzen exponentiellen Phase schließt sich vom 3. bis 8. Tag bei der *L. album* bzw. vom 3. bis 10. Tag bei der *L. usitatissimum* die lineare Phase an. In dieser Periode findet das maximale Wachstum durch erhöhte Zellteilungsaktivität statt. Vergleicht man die Frisch- und Trockengewichtskurven der beiden Kulturen so ist auffällig, dass die Zellen der *L. usitatissimum* Kultur ein stärkeres Wachstum im Gegensatz zu den *L. album* Zellen aufweisen. Das Nährmedium ist so optimiert worden, dass die *L. album* Zellen eine möglichst hohe Akkumulation von Podophyllotoxin aufweisen, das Zellwachstumsverhalten spielte dabei nur eine sekundäre Rolle. Möglicherweise bewirkt dieses Nährmedium ein stärkeres Zellwachstum der *L. usitatissimum* Zellen. Häufig wachsen Zellen mit geringerer Zellaggregatgröße aufgrund höherer Nährstoffversorgung besser. Da aber die Aggregate der *L. usitatissimum* Kultur gröber sind, kann das geringere Wachstum der *L. album* Zellen auch damit nicht begründet werden. Die *L. album* Suspensionskultur wird schon seit vielen Jahren subkultiviert, möglicherweise hat sie aufgrund somaklonaler Variation oder auch nur alterungsbedingt ihre Zellteilungsaktivität etwas eingeschränkt. Bislang weisen aber Vergleiche mit älteren Wachstumskurven nicht darauf hin.

Es zeigt sich, dass die Trockengewichtsmaxima beider Kurven um zwei Tage nach vorne verschoben sind. Das Verhältnis von Frisch- und Trockengewicht kann als Maß für die Vakuoliesierung der Zellen genutzt werden. Junge Pflanzenzellen weisen nur kleine Vakuolen auf, wodurch die Aufnahme von Flüssigkeit in diese nur eingeschränkt möglich ist. Mit zunehmenden Alter steigt der Vakuolisierungsgrad und damit einhergehend die Flüssigkeitsaufnahme. Daher steigt zum Ende der Hauptwachstumsphase das Frischgewicht, nicht jedoch das Trockengewicht. Nach dem Scheitelpunkt zeigen die Kurven einen Abfall. In dieser Absterbephase kommt es zu einer Zersetzung der Zellen. Die Zellen sterben aufgrund schlechter Mediumsbedingungen wie beispielsweise Nährstoffmangel oder auch gebildeter toxischer Substanzen ab.

Mediumsparameter: Die Entwicklungen der pH-Werte, der Leitfähigkeiten und der Zuckerkonzentrationen Abb. 3.6 und 3.7 im Kulturverlauf der beiden *Linum* Kulturen zeigen den für pflanzliche Suspensionskulturen typischen Verlauf. Die über die Leitfähigkeit bestimmte Ionengehalte der Medien sowie die Änderungen der Zuckerkonzentrationen verlaufen spiegelbildlich zu den Trockengewichtskurven. Die Saccharose dient als Kohlenstoffquelle zum Aufbau zelleigener Substanzen sowie für den Metabolismus. Ist diese Quelle verbraucht, ist kein weiteres Wachstum möglich. Die Leitfähigkeit ist ein Maß für die Änderung der Ionenkonzentration im Medium. Die Hauptmasse spiegeln dabei die Nitrat-Ionen wider, welche als Stickstoff-Lieferanten dienen. Während des gesamten Wachstums, auch während der Vakuoliesierung, nehmen die Zellen Nitrat-Ionen aus dem Medium auf. Mit dem Absterben der Zellen gelangen die Ionen wieder in das Medium, was zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit führt. Das geringere Wachstum der *L. album* Kultur spiegelt sich auch in der Zuckerkonzentrations- und Leitfähigkeitskurve wieder. Im Gegensatz zu den *L. usitatissimum* Kurven ist der Abfall der Zuckerkonzentrationskurve und der Leitfähigkeitskurve schwächer. Auch erreichen sie nicht den Wert Null. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass aufgrund anderer lichtbrechender Substanzen, welche auch bei der Messung erfasst werden, der Nullpunkt nicht erreicht werden kann. Auch die anschließende Zunahme der Zuckerkonzentration kann mit solchen anderen lichtbrechenden Substanzen erklärt werden.

In dem verwendeten MS-Li-Medium wird der pH-Wert hauptsächlich durch die Pufferwirkung der Phosphationen bestimmt. Charakteristischerweise kommt es bei pflanzlichen Zellkulturen zu einem Abfall des pH-Wertes am 1. Tag mit folgendem Anstieg an den folgenden Tagen. Ein Erklärungsversuch für dieses Phänomen ist, dass es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einer schnellen Aufnahme von Phosphat- und Nitrationen kommt (Schönell, 1996; Empt, 2000). Die Aufnahme von Nitrationen ist bei Pflanzen mit der Aufnahme von Protonen gekoppelt (Heldt, 1999). Demnach könnte man den Anstieg des pH-Wertes ab dem ersten Tag durch die schnelle Aufnahme von Nitrationen und die fehlende Pufferwirkung der Phosphationen erklären. Der Abfall des pH-Wertes der *L. usitatissimum*-Kultur am 9. Tag beruht vermutlich auf einem Meßfehler.

Es ist bekannt, dass bei der Lyse der Zellen PTOX ins Medium abgegeben wird (Henges, 1999). Podophyllotoxin hemmt den Aufbau der Mikrotubuli bei der Mitose (Oliva et al., 2002) und verzögert so das Wachstum der Zellen. Bisher konnte kein hemmender

Einfluß auf *L. album* Zellen gefunden werden. *L. album* Zellen können zugesetztes DOP vollständig aus dem Medium aufnehmen und in Form von PTOX-Glucosid in der Vakuole akkumulieren, wodurch es für die Zellen unschädlich wird (Henges, 1999). *L. usitatissimum* Kulturen akkumulieren kein Podophyllotoxin, daher kann es sich auch bei der Zelllyse nicht negativ auf das Wachstum der Zellen auswirken.

Lignangehalte: Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass die *L. usitatissimum* Suspensionskultur die Lignane PINO, LARI, und SECO akkumuliert (Abb. 3.9). Attoumbré et al. (2006) dagegen konnten diese Lignane kaum bzw. überhaupt nicht detektieren. PINO, LARI und SECO gehören zu den frühen Lignanen des Podophyllotoxin-Stoffwechselweges. Wie viele Substanzen des Sekundärstoffwechselweges werden auch die Lignane bevorzugt in differenzierten Zellen gebildet, wo sie häufig der Pathogen-Abwehr dienen. Erwartungsgemäß zeigen die Kurven dieser drei Lignane der *L. album* Zellen ihr Maximum zum Ende des Wachstums (Abb. 3.8). Auffallend ist die Verschiebung des Maximums auf den zwölften Tag. Dies ist ungewöhnlich, da bei früheren Untersuchungen der *L. album* Zellen X4Mi die höchsten Konzentrationen dieser Lignane in direkter Korrelation zum Frischgewichtsmaximum standen (Siemeling, (2001). Siemeling (2001) konnte über den gesamten Charakterisierungszeitraum diese Lignane nachweisen. Die verwendete *L. album* Suspensions-Kultur von Siemeling (2001) stammt von einer anderen Pflanze als die in dieser Arbeit verwendete. Da sich das Genom jeder Pflanze unterscheidet, können die verschiedenen Akkumulationen mit den verschiedenen Genomen erklärt werden. Insbesondere da die *L. album* Kulturen über Samen von wild wachsenden Pflanzen gewonnen wurden. Wild wachsende Pflanzen sind meist Hybride bei welchen sich das Genom stärker unterscheidet. Bei Kulturpflanzen sind so starke Abweichungen innerhalb einer Art, welche zudem noch unter denselben Bedingungen gewachsen sind eher unwahrscheinlich. Auffallend ist die vergleichsweise hohe Ansammlung von LARI. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass der Schritt vom LARI zum SECO bei der LA-PLR der Geschwindigkeits-bestimmende ist (Kapitel 4.3). Dies würde sich auch mit der Beobachtung decken, dass der höchste SECO-Gehalt erst am 15. Charakterisierungstag, also später als die Maxima von PINO und LARI, zu finden ist.

Die Zellsuspensionskulturen von *L. usitatissimum* (Abb. 3.9) weisen zu Beginn hohe Werte von PINO und LARI auf. Vermutlich handelt es sich dabei aber um eine Verschleppung der Lignane. Zum Ende des Zellwachstums sind, wie auch bei *L. album*, die höchsten Konzentrationen von PINO, LARI und SECI zu finden. Anders als die untersuchte *L. album* Kultur sind die Lignane über den gesamten Charakterisierungszeitraum nachweisbar. PINO und LARI kommen in annähernd gleichen Konzentrationen vor, wohingegen die Konzentrationen vom SECO im Allgemeinen unter denen der beiden anderen Lignane liegen. Die Enzymtests mit der heterolog exprimierten LA-PLR zeigten, dass SECO erst gebildet wird, wenn kein (+)-PINO mehr verfügbar war. Legt man die Vermutung zugrunde (Kapitel 4.3), dass der Schritt von PINO zum LARI der Geschwindigkeitsbestimmende ist, so erstaunt dieses Ergebnis, waren doch eher hohe SECO Werte zu erwarten.

Elicitierung: Für den Versuch der Erhöhung der Lignangehalte in *L. usitatissimum* Zellkulturen wurde ein Elicitierungsversuch mit Methyljasmonat durchgeführt. Methyljasmonat stellt einen Teil des Signaltransduktionsweges dar, der z.B. nach einer Verwundung oder Pathogenbefall zur Expression spezifischer Gene in Pflanzen führt. Es zeigte sich, dass Methyljasmonat als Elicitor für *L. usitatissimum* Zellen ungeeignet ist. Die Zugabe von Methyljasmonat führte zu einer Erniedrigung des Zellwachstums sowie zu einer Abnahme der Lignangehalte. Methyljasmonat ist ein Derivat des Phytohormons Jasmonsäure. Bisher konnten in Pflanzen nur die (-)-Jasmonsäure und die (+)-7-iso-Jasmonsäure nachgewiesen werden (Sembdner, Parthier, 1992). Anders ist dies bei *L. album* Zellen, dort führt die Zugabe von Methyljasmonat zu einem signifikanten Anstieg von PTOX (van Fürden, 2004), auch konnte ein Anstieg von PINO und MATAI in *Forsythia x intermedia* nachgewiesen werden (Schmitt, Petersen, 2001). Die verschiedenen *Linum* Arten können aufgrund von chemosystematischen Analysen in verschiedene Sektionen unterteilt werden. *L. usitatissimum* gehört zu der Sektion *Linum* für welche die Lignanklasse Arylnaphthaline kennzeichnend ist. Bislang konnte noch keine Suspensionskultur der Sektion *Linum* mit Methyljasmonat erfolgreich elicitiert werden. Anders bei Pflanzen der Sektion *Syllinum*, kennzeichnend durch die Lignanklasse der Aryltetraline, zu welcher *L. album* gehört. Demnach scheint die Lignanklasse mit ausschlaggebend zu sein, ob und mit welcher Substanz *Linum* Kulturen elicitiert werden können. Hano et al. (2006) konnte ebenfalls keine Erhöhung der Lignanakkumulation bei *L. usitatissimum* Zellkulturen finden. Er diskutiert, dass evtl. durch die Elicitierung der Vorläufer der Lignane, nämlich der Coniferylalkohol, statt in Lignane in Lignin umgewandelt wird und so die Zellwände verstärkt. Hano et al. (2006b) zeigte, dass die Flachs PLR-Gene hauptsächlich in der Samenschale exprimiert werden. Vermutlich übernehmen die Lignane dort die Aufgabe des Schutzes des Embryos.

4.2 PLRs aus *L. usitatissimum* und *L. album*

Pflanzliche Zellsuspensionskulturen bestehen aus undifferenzierten, genetisch instabilen Zellen. Für die Charakterisierung der Aktivitäten von Stoffwechselenzymen ist es wichtig, möglichst gleich bleibende Ausgangsbedingungen zu haben. Dies ist bei den Suspensionskulturen nur in geringem Maß gegeben. Zudem sollte das zu untersuchende Enzym in möglichst reiner Form vorliegen. Die Aufreinigung von Enzymen aus Suspensionskulturen ist häufig eine schwierige und aufwendige Arbeit. Es bietet sich daher an, die zu untersuchenden Enzyme heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ORF einer PLR-codierenden Sequenz in den Expressionsvektor pET-15b zur Überexpression in *E. coli* kloniert. Das gebildete LUS-PLR-Fusionsprotein konnte erfolgreich über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt werden.

Ein durchgeführter Blast P Vergleich der ORFs der LUS-PLR und der LA-PLR mit bekannten PLR Sequenzen zeigt, dass es sich bei beiden ORFs um PLRs handelt. Bei dem

Vergleich der LUS-PLR mit der LA-PLR konnte mit 66 %iger Übereinstimmung und 75 % Ähnlichkeit die Sequenz der PLR zugeordnet werden. Ein Blast P Vergleich mit den PLR verwandten Sequenzen von der IFR aus *Betula pendula* und der PCBER aus *Pinus taeda* konnte nur Übereinstimmungen von 46 bzw. 43 % zeigen, bei einer Ähnlichkeit von 64 bzw. 63 %. All dies indiziert, dass es sich bei der LUS-PLR um eine PLR handelt (Tab. 3.1).

Untersuchungen der Kristallstruktur der *Thuja plicata*-PLR zeigten, dass es sich bei diesem Enzym um ein Monomer handelt (Min et al., 2003). Die Ergebnisse der Cross-linking Versuche der LA- und LUS-PLR sowie Untersuchungen der Modellstruktur der verschiedenen PLRs (Lushta, 2007) weisen darauf hin, dass auch die LA- und LUS-PLRs Monomere sind.

Southern-Blot Analysen der genomischen DNA von *L. album* und *L. usitatissimum* (von Heimendahl, 2005) weisen darauf hin, dass die LA-PLR nur als „single copy“ Gen im Genom von *L. album* vorkommt, da für die meisten Restriktionshydrolyse nur eine Bande gefunden wurde. Die Southern-Blot Analyse der genomischen DNA von *L. usitatissimum* ergab jeweils mindestens drei Banden, was auf die Anwesenheit von drei PLRs hinweist. Da beide Enantimere von SECO (wenn auch im Verhältnis 99:1) in Samen von *L. usitatissimum* vorliegen, lässt dies auf die Anwesenheit mindestens zweier PLRs mit entgegengesetzter Enantiospezifität schließen. Kürzlich wurden bei der Untersuchung von in Blüten stehenden *L. usitatissimum* Pflanzen Lignane mit entgegengesetzter enantiomeren Zusammensetzung zu der im Samen gefunden (Schmidt et al., 2006), was auf die Anwesenheit einer zweiten PLR schließen lässt. Es konnte unlängst aus Blättern von in Blüten stehenden *L. usitatissimum* Pflanzen eine PLR isoliert werden, welche eine größere Ähnlichkeit zur PLR aus *L. album* als zu der ersten aus *L. usitatissimum* Suspensionskulturen isolierten PLR aufweist und welche (+)-PINO gegenüber von (-)-PINO bevorzugt (Hemmati, persönliche Mitteilung).

4.3 Vergleich der Aktivitäten der LA-PLR mit denen der LUS-PLR

Die Sequenzen, welche für die PLR aus *L. album* und *L. usitatissimum* codieren, wurden isoliert und die PLRs bezüglich ihrer Umsetzungscharakteristika verglichen. Dabei lag der Fokus auf der Enantiospezifität der Enzyme. In verschiedenen Pflanzen variiert derjenige Syntheseschritt, an welchem enantiomerenreine Lignane gebildet werden. So wurde in *Forsythia intermedia* ein dirigierendes Enzym gefunden, welches in der Kopplung von zwei Molekülen Coniferylalkohol in reines (+)-PINO involviert ist, ohne dabei eigene katalytische Aktivität aufzuweisen (Davin et al., 1997, Gang et al., 1999). Bisher konnte dieses dirigierende Enzym in *L. album* Kulturen nicht gefunden werden (Siemeling, 2001). Die Stereospezifität von Lignanen variiert in den verschiedenen *Linum* Spezies. Zellkulturen von *L. album* akkumulieren (-)-PTOX zusammen mit reinem (-)-SECO. Deren Vorläufer, das PINO existiert jedoch mit beiden Enantiomeren in den Zellkulturen

(Abb. 3.12). Dies indiziert, dass in *L. album* die Reaktion von PINO zu SECO den ersten enantiospezifischen Schritt in der Biosynthese des PTOX darstellt. Es war bekannt, dass die Samen von *L. usitatissimum* zu 99% reines (+)-SECOdiglucosid, ein Derivat von (+)-SECO, enthalten (Ford et al., 2001, Sicilia et al., 2003). Ford et al. (2001) hat in den Lein-Samen auch ein dirigierendes Protein gefunden, welches die Bindung von zwei Coniferylalkoholmoleküle zu (-)-PINO unterstützt. In Zellkulturen von *L. usitatissimum* konnten beide Enantiomere des PINOs, aber nur (+)-SECO gefunden werden (Abb. 3.12). Dies lässt erstens den Schluss zu, dass auch hier der Schritt vom PINO zum SECO der erste enantiospezifische Schritt ist, und zweitens, dass das dirigierende Protein in den Zellkulturen entweder nicht in genügender Konzentration exprimiert wurde oder aber seine „Aktivität“ verloren hat.

Die in den Zellkulturen gefunden Ergebnisse sollten mit heterolog exprimierten Enzymen untersucht werden. Die Enantiomeren-entstehung wurde dabei mittels Proteinabhängigkeitsversuchen untersucht. In Vorversuchen zeigte sich, dass Zeitabhängigkeitsversuche zu den gleichen Ergebnissen kamen wie die Proteinabhängigkeitsversuche. Daher wurde aus methodischen Gründen Versuche mit verschiedenen Proteinkonzentrationen vorgezogen.

Die heterolog exprimierte LA-PLR setzt (+)-PINO über (+)-LARI in (-)-SECO um. Erst nach langer Inkubationszeit und bei sehr hohen Enzymmengen katalysiert sie auch die Umsetzung von (-)-PINO über (-)-LARI zu (+)-SECO. (Abb. 3.15) Demnach weist die LA-PLR eine sehr hohe Selektivität für (+)-PINO auf. Die beste Möglichkeit ein Enzym zu charakterisieren besteht darin, den K_m -Wert zu bestimmen. Die K_m -Wert Bestimmung erweist sich bei der PLR als ungewöhnlich schwierig. Erstens katalysiert dasselbe Enzym zwei aufeinander folgende Reaktionen. Zweitens ist die Beschaffung von enantiomerenreinen PINO, LARI oder SECO sehr arbeitsaufwendig und/oder kostspielig und ist zum Teil erst seit kurzer Zeit möglich. Daher war es nicht möglich, die Spezifität der PLRs über den K_m -Wert zu bestimmen. Einzig racemisches PINO konnte durch die Reduzierung von Coniferylalkohl, welches im Handel erhältlich ist, selber hergestellt werden. Daher wurde für die Charakterisierung des Enzyms dieses racemische PINO verwendet und die Entstehung von LARI über die PINO Abnahme verfolgt. Es bestand die Vermutung, dass sich das (-)-PINO im racemischen Ansatz hemmend auf das Enzym auswirken könnte. Daher wurden zum Vergleich auch Enzymtests mit reinem (+)-PINO durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das (-)-PINO keinen Einfluss auf die Umsetzungskinetik des (+)-PINOs hatte. Für die weiteren Versuche wurde daher mit dem racemischen PINO gearbeitet. Vergleicht man die enantiomere Zusammensetzung der eingesetzten bzw. gebildeten Lignane, so zeigt sich, dass von dem eingesetzten racemischen PINO zunächst nur das (+)-PINO zu (+)-LARI katalysiert wird. Erst wenn alles (+)-PINO verbraucht ist, findet der nächste Schritt zum (-)-SECO statt. Aus den ermittelten LA-PLR-Daten kann geschlossen werden, dass in der Reaktionsabfolge (+)-PINO zu (+)-LARI zu (-)-SECO der Schritt von LARI zum SECO der geschwindigkeitsbestimmende ist, d.h. es wäre zu erwarten, dass der Schritt vom PINO zum LARI einen niedrigeren K_m -Wert aufweist. Bei hohen Proteinkonzentrationen und langen Inkubationszeiten setzte die LA-PLR auch (-)-PINO zu (+)-SECO über (-)-LARI um. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine PLR

die Reduktion beider Enantiomere eines Lignans katalysieren kann. Dabei ist diese Reaktion in vivo vermutlich nicht beobachtbar, da so hohe Enzymkonzentrationen und so lange Inkubationszeiten eher artifiziell sind.

Im Gegensatz zur LA-PLR weist die LUS-PLR eine hohe Enantioselektivität für (-)-PINO auf. (Abb. 3.14) Diese deckt sich mit den Beobachtungen von Davin und Lewis (2003). Sie ist gleichwohl geringer als die der LA-PLR, da hier schon geringere Enzymmengen genügen, um das entgegen gesetzte Enantiomer zu katalysieren. Die LUS-PLR bindet (-)-PINO und konvertiert es über (-)-LARI zu (+)-SECO. Es war nahezu nie (-)-LARI detektierbar. Demnach muss die Reaktion von (-)-LARI zu (+)-SECO sehr schnell ablaufen, was als Hinweis für einen geringen K_m -Wert LARI gewertet werden kann. Demzufolge ist die Reaktion von (-)-PINO zu (-)-LARI im Kontrast zu der LA-PLR der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Auch bei der LUS-PLR konnte erstmals beschrieben werden, dass sie auch die Reaktion mit dem (+)-PINO katalysiert. Es ist denkbar, dass sich das eigentliche Substrat, das (-)-PINO hemmend auf die Bindung des (+)-PINOs auswirkt. Erst nachdem nahezu alles (+)-PINO verbraucht worden ist, konnte (+)-SECO nachgewiesen werden, bis dahin gab es eine Akkumulation vom (+)-LARI. Das heißt, dass in dieser zweiten von der LUS-PLR katalysierten Reaktion eine höhere Spezifität für das (+)-PINO vorliegt, so dass das (+)-LARI eine geringer „Konkurrenzkraft“ besitzt.

Im Vergleich zeigt die LA-PLR eine höhere Aktivität bei der Reduktion des PINOs. und des LARIs So ist bei der LA-PLR schon bei einer Proteinkonzentration von 1,2 µg/ml die Hälfte des racemischen PINOs umgesetzt, wohingegen die LUS-PLR die zehnfache Menge, 12 µg/ml Protein benötigt um die selbe Konzentration von racemischen PINO zur Hälfte umzusetzen. Die ist erstaunlich, da aufgrund der höheren Enantioselektivität eher eine geringere Aktivität zu erwartet wäre. Vermutlich bindet das (+)-PINO besser an das aktive Zentrum des Enzyms, so dass die Reduktion zum LARI schneller erfolgen kann. Das würde auch übereinstimmen mit der Beobachtung, dass die Reduktion des „Enantiomerenfremden“ Lignans von der etwas unspezifischen LUS-PLR schon bei niedrigeren Proteinmengen beobachtbar ist. Im Vergleich: Die *F. intermedia* PLR reduziert (+)-PINO zu (+)-LARI mit einer hohen enantiospezifischen Präferenz (>99:1) (Katajama et al., 1993).

4.4 Die molekularen Ursachen der Enantiospezifität von PLRs

Über den Vergleich aller bekannten PLR Sequenzen konnten einige Aminosäuren gefunden werden, welche im Verdacht standen, für die unterschiedliche Enantioselektivität der PLRs verantwortlich zu sein (Abb 3.16). Es konnten vier einzelne Positionen mit einem hohem Konservierungsgrad für einzelne Aminosäuresequenzen für (-) SECO bildende PLRs gefunden werden, an selber Stelle wurden andere hoch konservierte Aminosäuresequenzen für (+)-SECO bildende PLRs gefunden. Diese vier Aminosäuren sind bei der (-)-SECO bildenden PLR aus *L. album*: Met¹⁵², Gly²⁸¹, Phe²⁹⁵ und Val³¹⁷ Anstelle von Leu¹³⁵, Val²⁶²,

Leu²⁷⁸ und Met³⁰³ der (+)-SECO bildenden LUS-PLR. Dabei liegen die Aminosäuren der Positionen 265 und 269 nahe am aktiven Zentrum des Enzyms (Min et al., 2003, Lushta 2007). Min et al. schlägt außerdem noch die Aminosäure Phe¹⁶⁴ als mitverantwortlich für die Enantiospezifität der *T. plicata* PLRs vor. Jedoch zeigt unser Sequenzvergleich, dass PLRs entgegengesetzter Enantiospezifität an dieser Position Phe aufweisen. Schon Nakajima et al. (1998) hat anhand der Tropinon-Reduktase gezeigt, dass der Austausch von fünf Aminosäuren im aktivem Zentrum ausreicht, um die Stereospezifität dieses Enzyms umzukehren.

Der Vergleich der bekannten PLR Sequenzen mit denen der verwandten IFRs und PCBERs zeigt, dass es einen Sequenzabschnitt gibt, der nur in PLRs vorkommt und demnach vermutlich für ihre Substratspezifität verantwortlich ist. Ein anderer Sequenzabschnitt scheint nur in IFRs vorzukommen (Kap. 4.6)

Es wurden drei LA-PLR Mutanten hergestellt. Bei der Blockmutante wurde das hintere drittel der LA-PLR gegen das der LUS-PLR ausgetauscht. Bei der Punktmutante I wurden drei Aminosäuren der LA-PLR gegen die der LUS-PLR an selbiger Stelle ausgetauscht. Bei der Punktmutante II wurden vier dieser Aminosäuren ausgetauscht.

Es konnten Mutanten hergestellt werden, bei denen ein größerer Sequenzabschnitt der LA-PLR-Sequenz gegen einen Sequenzabschnitt der LUS-PLR ausgetauscht wurde. Diese Mutanten konnten über Ni-NTA aufgereinigt werden, zeigten aber nur sehr geringe Aktivität. Vermutlich ist durch den Austausch des größeren Sequenzabschnittes die Fähigkeit zur Bindung der Substrate verloren gegangen. Es wäre denkbar, dass es aufgrund der geänderten AS Zusammensetzung zu Fehlfaltungen des Enzyms gekommen ist. Gleiches kann auch für die Mutante II angenommen werden.

Dagegen konnten katalytische Aktivitäten bei der Mutante I beobachtet werden. Bei dieser Mutante wurden nur drei Aminosäuren der LA-PLR gegen die entsprechenden der LUS-PLR ausgetauscht. Es zeigt sich, dass schon der Austausch dieser drei AS ausreicht, um eine nahezu vollständige Umkehr der Enantioselektivität der PLR zu erreichen. Vom racemischen PINO wurde bevorzugt das (-)-PINO reduziert, wohl aber auch (+)-PINO. Demnach hat diese neue PLR die starke Selektivität der LA-PLR verloren und weist nun eher die Eigenschaften der LUS-PLR auf. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Enantioselektivität um eine entwicklungsgeschichtlich eher junge Eigenschaft der PLRs handelt. Im Gegensatz zum stark konservierten NADPH bindenden Sequenzabschnitt, scheint die Enantioselektivität nicht überlebenswichtig für die Pflanze zu sein. Auf der anderen Seite, ist es auffällig, dass die eher zytotoxischen Lignane alle R,R-Konfiguration am C8-C8' aufweisen. Da sich die Konfiguration während eines Stoffwechsels in der Regel nicht ändert, gehen diese Lignane, wenn sie vom PINO ausgehen, immer vom (+)-PINO aus. Daher könnte die Enantioselektivität für die Pflanze doch überlebenswichtig sein. Dies würde auch erklären, warum in einer Pflanze mehrere PLRs verschiedener Selektivität vorkommen können. Es wäre interessant zu untersuchen, ob besonders wichtige Bereiche der Pflanze die (+)-PINO katalysierende PLR codieren.

Vergleiche mit den Sequenzen der nicht bzw. wenig enantioselektiven AT 1 und AT 2 zeigt, dass ihnen der konservierte Sequenzabschnitt fehlt, welcher kennzeichnend für selektiv (-)- bzw. (+)-SECO bildende PLRs ist. (TREML 2005)

4.5 *Arabidopsis* PLRs im Vergleich mit LA- und LUS-PLRs

PLRs, Phenylcumar Benzylether Reduktasen (PCBER) und Isoflavon Reduktasen (IFR) sind in der PIP-Familie, einer Familie von eng verwandten Reduktasen zusammengefasst (Gang et al., 1999). Kennzeichnend für die PLRs und IFRs ist deren enantioselektivität, im Gegensatz zu den PCBERs.

Für die Klärung der Frage, wie sich die Enantiospezifität der PLR entwickelt haben könnte, wurden PLR-ähnlichen Enzyme aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* kloniert und auf ihre Funktionalität hin untersucht. Der Vorteil von *A. thaliana* liegt darin, dass ihr Genom vollständig sequenziert ist, so dass alle Gene, unabhängig von ihrem Expressionsstatus erfasst werden können. Es wurden 8 Mitglieder der PIP-Familie im Genom von *A. thaliana* identifiziert. Über die Einordnung der Proteine in einen Stammbaum konnte erwartet werden, dass es sich bei AT1 und AT2 um PLRs handelt. Dies konnte mit den heterolog exprimierten Proteinen bestätigt werden (Abb. 3.20 bis 3.24)

AT 1 zeigt eindeutige PLR Aktivitäten. Dabei ist sie für PINO nicht enantioselektiv, zeigt aber eine leichte Bevorzugung für (-)-LARI gegenüber (+)-LARI (Abb. 3.20). Sie zeigt nur bei hohen Proteinkonzentrationen geringfügige PCBER Aktivitäten.

Auch AT 2 weist eindeutige PLR Aktivitäten auf. Sie zeigt eine leichte Selektivität für (-)-PINO und (-)-LARI. PCBER Aktivitäten konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

AT 3 zeigt eindeutige PCBER Aktivitäten und reduziert das Substrat DDC zu IDDDC. Ihre PLR Aktivität ist nur gering und zeigt eine Bevorzugung für (+)-PINO. Auch konnte die Reaktion nur bis zum LARI ablaufen.

Bei der AT 1 handelt es sich um die erste klonierte PLR, welche auf der PINO Ebene enantiounspezifisch arbeitet. Vergleicht man die AT-PLRs mit den LA- und LUS-PLRs so findet man eine aufsteigende Enantioselektivität. AT 1 katalysiert auf der PINO Ebene enantiounspezifisch, AT 2 zeigt nur leichte enantiospezifitäten gefolgt von der LUS-PLR welche schon starke enantiospezifitäten zeigt. Die LA-PLR zeigt die stärkste enantiospezifität. Somit kann angenommen werden, dass die unterschiedliche enantiomere Zusammensetzung in einer Pflanze sowohl aufgrund der Aktivität mehrerer PLRs mit entgegengesetzter Enantiospezifität zustande kommen kann, aber auch durch eine enantiounspezifisch arbeitende PLR. Es gibt Hinweise das in *L. usitatissimum* mindestens zwei entgegengesetzt enantiospezifisch arbeitende PLRs vorkommen. So konnte jüngst Hemmati (persönliche Kommunikation) aus den Blättern von in Blüten stehenden *L. usitatissimum* Pflanzen eine PLR isolieren die die entgegengesetzte Enantiospezifität zu der hier untersuchten LUS-PLR aufweist. Es gibt Pflanzen wie *Articum lappa* die verschiedene Enantiomere desselben Lignans in einzelnen Pflanzenorganen akkumulieren

(Suzuki et al., 2002). Es wäre interessant zu untersuchen, ob und welche Enantioselektivität dessen PLRs aufweisen.

Obwohl die Aminosäuresequenz der AT 3 schon Hinweise darauf gab, dass es sich bei diesem Enzym um eine PCBER handeln könnte (Trembl, 2005), wurde sie in die Untersuchung mit aufgenommen. Auch Enzymtests zeigten, dass es sich bei der AT 3 sehr wahrscheinlich um ein PCBER handelt, welche aber auch PLR Aktivität aufweist, wobei sie bevorzugt (+)-PINO verbraucht (Abb. 3.24). Dies ist erstaunlich, denn obwohl das PINO ein dem DDC relativ ähnliches Substrat ist, konnten die bisher klonierten PCBERs in keinem Fall PINO umsetzen (Gang et al., 1999). AT 3 zeigt, dass das PINO in der Substratbindetasche der PCBER gebunden und zum LARI reduziert werden kann. Die Position im PINO Substratmolekül, an welcher die Wasserstoff Übertragung erfolgt, ist der Position im DDC Molekül sehr ähnlich. Somit kann die Reduktion des PINOs mit der PCBER erklärt werden. Anscheinend weicht die molekulare Struktur des LARIs zu weit ab, so dass es nicht reduziert werden kann. Min et al. (2003) hat mittels Röntgenstrukturanalyse eine deutlich größere Substratbindetasche für die PCBER aus *P. taeda* gegenüber der untersuchten PLR aus *T. plicata* festgestellt und als möglicher Erklärung für die nur regiospezifische Aktivität herangezogen. Demnach kann geschlossen werden, dass die Größe der Bindetasche entscheidend für die Selektivität des jeweiligen Enzyms ist.

Gang et al. (1999) postulierten, dass es sich bei der PCBER um entwicklungsgeschichtliche Vorläufer von PLRs und IFRs handelt, da sie keine Stereospezifität, vermutlich aufgrund der großen Substratbindetasche, aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei AT1 eindeutig um eine PLR ohne Enantioselektivität handelt und AT 2 nur geringe Enantioselektivität aufweist, darf diese Aussage angezweifelt werden.

AT 6 und AT 7 zeigten weder gute PLR noch PCBER Aktivitäten, können aber aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen den PCBER-artigen zugeordnet werden (Trembl 2005). Ebenso wie AT4 und AT 5, welche kaum oder gar nicht in *E. coli* in löslicher Form exprimiert werden konnten. Es ist bekannt, dass die heterologe Expression von Enzymen in *E. coli* mit Schwierigkeiten verbunden sein kann (Baneyx, 1999). Dies kann unter anderem daran liegen, dass durch den Einsatz eines T7-Promoters die Transkription unnatürlich schnell statt findet und es so beispielsweise zu einer Fehlfaltung des Proteins kommen kann. Auch der Versuch AT 4 und AT 5 mittels GST-Tag in löslicher Form zu exprimieren schlug fehl. Vermutlich liegen die rekombinante Proteine in Form von so genannten Einschlusskörperchen vor. Diese kommen vermutlich dadurch zustande, dass es aufgrund der hohen Aktivität, mit der die Translation während der Überexpression abläuft, zu fehlerhaften Faltung des Proteins kommt und es sich so ein unlösliches inaktive Enzyme bildet (Baneyx, 1999; Baneyx, Mujacic, 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf PLRs lag und da anhand von Sequenzvergleiche AT 4 und AT 5 als PCBER eingeordnet werden konnten, wurden keine weiteren Versuche zur Expression dieser Enzyme unternommen.

Gang et al. (1999) postuliert, dass es sich bei der PCBER um entwicklungsgeschichtliche

4. Diskussion

Vorläufer von PLRs und IFRs handelt, da sie keine Stereospezifität, vermutlich aufgrund der großen Substratbindetasche, aufweisen. Aufgrund des dargestellten Kladogramms und der Tatsache, dass es sich bei AT1 und AT1 eindeutig um PLRs ohne Enantioselektivität handelt darf diese Aussage angezweifelt werden.

Zusammenfassung

Lignane, welche nahezu immer als chirale Verbindungen vorliegen, stellen eine im Pflanzenreich weit verbreitete Naturstoffgruppe dar. Zellsuspensionskulturen von *Linum album* akkumulieren (-)-Podophyllotoxin (PTOX) und (-)-6-Methoxypodophyllotoxin zusammen mit reinem (-)-Secoisolariciresinol (SECO). Deren Vorläufer, das Pinoresinol (PINO), das bei der Dimerisierung zweier achiraler Conyferylalkohole entsteht, existiert jedoch als Enantiomergemisch in den Zellkulturen. Dies indiziert, dass in *L. album* die Reaktionen von PINO über Lariciresinol (LARI) zu SECO welche von der Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR) katalysiert werden, die ersten enantiospezifischen Schritte in der Biosynthese des PTOX darstellen.

Erstmals wurde nachgewiesen, dass Zellsuspensionskulturen von *Linum usitatissimum* PINO, LARI und SECO akkumulieren. Dabei konnten ebenfalls beide PINO Enantiomere, jedoch nur (+)-SECO detektiert werden, demnach scheinen auch hier die von der PLR katalysierten Reaktion die ersten enantiospezifischen Schritte zu sein.

Es wurde jeweils eine PLR aus *L. album* (LA-PLR) und eine aus *L. usitatissimum* (LUS-PLR) heterolog in *E. coli* exprimiert und in Hinblick auf ihre Enantiospezifität untersucht. LA-PLR setzt (+)-PINO über (+)-LARI in (-)-SECO um. Dabei findet die Reduktion des (+)-LARI zum (-)-SECO erst statt, nachdem (+)-PINO vollständig umgesetzt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass der Schritt von LARI zum SECO der geschwindigkeitsbestimmende ist. Nach langer Inkubationszeit mit hohen Enzymmengen katalysiert die LA-PLR auch die Reaktion von (-)-PINO über (+)-LARI zu (+)-SECO. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine PLR die Reduktion beider Enantiomere eines Lignans katalysieren kann.

Im Gegensatz zur LA-PLR bevorzugt die LUS-PLR (-)-PINO und konvertiert es über (-)-LARI zu (+)-SECO. Bei der LUS-PLR ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Reaktion von (-)-PINO zu (-)-LARI. Die schnelle Reaktion vom (-)-LARI zu (+)-SECO lässt hier auf einen niedrigen K_m -Wert für (-)-LARI schließen.

Im Sequenzvergleich aller bekannten PLRs konnten 3 Aminosäure-Positionen gefunden werden, welche für die unterschiedliche Stereoselektivität der PLRs verantwortlich sein könnten. Der Austausch dieser drei Aminosäuren in der LA-PLR reichte aus, um eine nahezu vollständige Umkehr der Enantioselektivität dieser PLR zu bewirken.

Heterolog exprimierte PLRs aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden auf ihre Funktionalität hin untersucht. Über Sequenzvergleiche mit bekannten PLRs und PCBERs konnte geschlossen werden, dass es sich bei AT1 und AT2 um PLRs und bei AT3 um eine PCBER handelt. Enzymtests mit dem heterolog exprimierten Protein konnten dies bestätigen. Dabei zeigt AT 1 für PINO keine Enantioselektivität. Es handelt sich um die erste klonierte PLR, welche auf der PINO Ebene enantiounspezifisch arbeitet. Mit AT 3 konnte erstmals eine PCBER gefunden werden, welche auch die Fähigkeit besitzt, PINO zu LARI zu reduzieren.

Summary

Lignans are a class of secondary metabolites, which usually are optical active. The lignan podophyllotoxin (PTOX) is used for semisynthesis of anti-cancer drugs.

In *Linum album* suspension cultures pinoresinol (PINO) consists of a mixture of both enantiomers, (-)-secoisolariciresinol (SECO) was the first pure enantiomer within the lignan biosynthetic pathway. Therefore, it is possible that the steps which are catalysed by the pinoresinol-lariciresinol reductase (PLR) leading from PINO to SECO are the first stereospecific steps of PTOX biosynthesis in *L. album*.

Suspension cultures of *Linum usitatissimum* accumulate PINO, lariciresinol (LARI) and SECO. PINO consists of a mixture of both enantiomers. In contrast to *L. album* only (+)-SECO could be detected in *L. usitatissimum*. Therefore, it seems that the step leading from PINO via LARI to SECO is the first stereospecific in *L. usitatissimum*, too.

One PLR of *L. album* (LA-PLR) and one of *L. usitatissimum* (LUS-PLR) were heterologously expressed in *E. coli*. LA-PLR is highly enantiospecific. It uses (+)-PINO from a racemate as substrate and forms via (+)-LARI (-)-SECO. The LA-PLR catalyses the reactions from (-)-PINO to (-)-LARI and to (+)-SECO only after long incubation and with high protein concentrations. The first product of LUS-PLR is (+)-SECO in a reaction with racemic PINO as substrate. The LUS-PLR catalyses the reaction (+)-PINO to (+)-LARI to (-)-SECO only after long incubation and with high protein concentrations.

A mutagenesis approach revealed that three amino acid positions are determining the different enantiospecificities of PLRs. The change of these three amino acids leads to an almost complete change of enantiospecificity.

We could identify two genes encoding PLRs and six additional genes with sequence similarity to the genome of *Arabidopsis thaliana*. The proteins were heterologously expressed in *E. coli*. AT 1 doesn't show enantiospecificity for PINO, AT 2 slightly prefers (-)-PINO. AT 3 is a phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER) which has some PLR activity. Herewith, it was shown for the first time that a PLR can be not enantiospecific with respect to PINO (AT 1) and that a PCBER has some PLR activity (AT 3).

- Attoumbré, J., Charlet, S., Baltora-Rosset, S., Hano, S., Raynaud-Le Grandic, S., Gillet, F., Bensaddek, L., Mesnard, F., Fliniaux, M.A.** (2006). *Plant Cell Rep.* **25**: 859-864
- Ayres, D.C., Loike, J.D.** (1990). *Lignans- Chemical, biological and clinical properties. Chemistry and pharmacology of natural products* (Cambridge University Press)
- Baneyx, F.** (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 411-421
- Baneyx, F., Mujacic, M.** (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1399-1408
- Bickel-Sandkötter, S.** (2001). *Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. Quelle und Meyer Verlag GmbH und Co., Wiebelsheim*
- 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
- Damayanthi, Y., Lown, J.W.** (1998). Podophyllotoxins: Current status and recent developments. *Curr. Med. Chem.*, **5**, 205-252
- Davin, L.B., Wang, H.B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M. Sarkanen, S., Lewis, N.G.** (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362-366.
- Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2000). Dirigent Proteins and Dirigent Sites Explain the Mystery of Specificity of Radical Precursor Coupling in Lignan and Lignin Biosynthesis. *Plant Physiology*, **123**, 453-461
- Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2003). An historical perspective on lignan biosynthesis: monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolim. *Phytochem. Rev.* **2**, 257-288
- Dewick, P.M.** (1989). *Biosynthesis of Lignans*. Amsterdam, Oxford, New York, Tokio; Elsevier
- Dinkova-Kostova, A., Gang, D., Davin, L., Bedgar, D., Chu, A., Lewis, L.** (1996). (+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reductase from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29473-29482
- Erhardt, J.G., Meisner, C., Bode, J.C., Bode, C.** (2003). Lycopene, beta-carotene, and colorectal adenomas. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 1219-1224
- Ford, J.D., Huang, K.S., Wang, H.B., Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2001) Biosynthetic pathway of the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglycoside-hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J. Nat. Prod.* **64**, 1388-1397
- Fujii Y.** (1991): *Podophyllum spp.*: in vitro regeneration and the production of podophyllotoxin. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **15**: 362-375.
- Fujita, J.D., Gang, D.R., Davin, L.B., Lewis, N.G.** (1999). Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from Western Red Cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversion. *J. Biol. Chem.* **274**, 618-627

- Gang, D.R., Costa, M.A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A.T., Wang, H.B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L.B., Lewis, N.G.** (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem. Biol.* **6**, 143-151
- Gang, D.R., Kasahara, H., Xia, Z.Q., Vander Mijnsbrugge, K., Bauw, G., Boerjan, W., Van Montagu, M., Davin, L.B., Lewis, N.G.**, (1999b). Evolution of plant defense mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 7516-7527
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. : *J. Mol. Bio.* **166**: 557-580
- Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Crônier, D., Baltora-Rosset, S., Doussot, J., Maury, S., Mesnard, F., Chabbert, B., Hawkins, S., Lainé, E., Lamblin, F.** (2006). Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* **223**: 975-989
- Hano, C., Martin, I., Fliniaux, O., Legrand, B., Gutierrez, L., Arroo, R.R.J., Mesnard, F., Lamblin, F., Lainé, E.** (2006 b). Pinoresinol-lariciresinol reductases gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta* **224**: 1291-1301
- Hartmann T.** (1991): *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites.* Akademik Press, San Diego 1991, 2. Auflage.
- Heldt, H.W.** (1999): *Pflanzenbiochemie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford
- Hellwich, K.H.** (2002): *Stereochemie: Grundbegriffe.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Henges, A.** (1999). Biosynthese und Kompartimentierung von Lignan in Zellkulturen von *Linum album*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hermanson, G.T.** (1996). *Bioconjugate Techniques.* Academic Press Inc., San Diego CA, USA 1996
- Hess, D.** (1991); *Pflanzenphysiologie- Molekulare und biochemisch-physiologische Grundlagen von Stoffwechsel, Entwicklung und Ökologie.* Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer
- Imbert, T.F.** (1998). TF: Discovery of podophyllotoxins. *Biochemie* **80**, 207-222
- Katajama, T., Davin, L.B., Chu, A., Lewis, N.G.**, (1993). Novel benzylic ether reduction in lignan biogenesis in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **33**, 581-591
- Katayama, T., Masaoka, T., Yamada, H.** (1997). Biosynthesis and stereochemistry of lignans in *Zanthoxylum ailanthoides* I. (+)-lariciresinol formation by enzymatic reduction of (+/-)-pinoresinol. *Mokuzai Gakkaishi* **43** (7), 580-588
- Kieran, P.M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M.** (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* **59**, 39-52
- Knippers, R.** (2001). *Molekulare Genetik*, 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Larcher, W. (1994). *Ökophysiologie der Pflanzen*. 5. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Lewis, N.G., Davin, L.B., (1999), lignans: biosynthesis and function. In Barton, D., K., Nakanishi, O. Meth-Cohn (Hrsg.): *comprehensive natural products chemistry*, Vol. **1**, 639-713. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, Elsevier

Lewis, N.G., Davin, L.B., Dinkova-Kostova, A.T., Fujita, M., Gang, D.R., (2001). Recombinant pinoresinol/lariciresinol reductase, recombinant dirigent protein, and methods of use. Patent: WO 0149833

Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., 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

Lushta, D. (2007). Der Zusammenhang zwischen Struktur und Enantiospezifität von Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktasen

Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G. (2002): *Botanik*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

MacLean, H., Gardner, J.A.F. (1956). Distribution of fungicidal extractives (Thujaplicin and watersoluble phenols) in western red cedar heartwood. *Forest Prod. J.* **6**. 510-516

MacRae, W.D., Towers, G.H.N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, **23**, 1207-1220

Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W. (1999). Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinolariciresinol, in flaxseed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3173-3180

Min, T., Kasahara, H., Bedgar, D.L., Youn, B., Lawrence, P.K., Gang, D.R., Halls, S.C., Park, H., Hilsenbeck, J.L., Davin, L.B., Lewis, N.G., Kang, C. (2003). Crystal structure of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductase and their relationship to isoflavone reductases. *J. Biol. Chem.* **278**: 50714-50723

Molog, G.A., Empt, U., Kuhlmann, S., van Uden, W., Pras, N., Alfermann, A.W., 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

Moraes, R.M., Burandt, C., Ganzera, M., Xingli, L., Kahn, I., Canel, C., (2000). The American mayapple revisited –*Podophyllum peltatum*- still a potential cash crop? *Economic Botany* **54** (4), 471-476

Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497

Muttzall, K. (1993). *Fermentationstechnik*. In Muttzall K (ed) *Einführung in die Fermentationstechnik*. Behr's Verlag

6. Literatur

- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y., Hashimoto, T.** (1999). Site-directed Mutagenesis of Putative Substrat-binding Residues Reveals a Mechanism Controlling the Different Stereospecificities of Two Tropinone Reductases. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 16563-16568
- 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
- Otto, M.** (2000). Phytoestrogene: Potentielle Wirkstoffe zur Prävention und Therapie des Mammacarcinoms. *Pharmazie in unserer Zeit* **29**, 40-45
- Petersen, M., Alfermann, A.W.** (2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 135-142
- Petersen, M., Strack, D., Matern, U.** (1999). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compound. Wink, M. (Hrsg.). *Annual Plant Reviews Vol. 2. Biochemistry of plant secondary metabolites*, 151-221. Sheffield: Sheffield Academic Press
- Pezzuto, J.M.** (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* **53**, 121-133
- Richter, G** (1996), *Biochemie der Pflanzen*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Richter, G.** (1998), *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. 6. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Manniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schäfer, K.M.** (2001). Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pinoresinol-Lariciresinol-Reductase aus *Linum album*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit)
- Schmidt, T.J., Hemmati, S., Fuss, E., Alfermann, A.W.** (2006). A combined HPLC-UV and HPLC/MS-MS method for the identification of lignans and its application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. and *Linum bienne* L. *Phytochemical Analysis* **17**, 299-311
- Schmitt, J., Petersen, M.** (2001). Influence of methyl jasmonate and coniferyl alcohol on pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* suspension cultur. *Plant Cell reports* **20**, 885-889
- Schönell, B.** (1996): *Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von Linum album*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität
- Schütte, H.R.** (1993). Secondary plant substances: Further topics of the phenylpropanoid metabolim. *Botany* **54**, 218-236
- Seitz, H.U., Seitz U. und Alfermann, A.W.** (1985). *Pflanzliche Gewebekultur- Ein Praktikum* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Sembdner, G., Parthier, B.** (1992). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Bio.* **44**, 569-589

- Shain, L., Hillis, W.E.** (1971). Phenolic extractives in Norway spruce and their effects on *Fomes annosus*. *Phytopathology* **61**, 841-845
- Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M., Metzler, M.** (2003). Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1181-1188
- Siemeling, H.** (2001) Biosynthesis of cytotoxic lignans: search for the dirigent protein in *Linum album*.
- Smollny, T.** (1993). Bildung von Lignanen bei Zellkulturen von *Linum album*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit)
- Smollny, T., Wichers, H., Derijk, T., van Zwam, A., Shasavari, A., Alfermann, A.W.** (1992). Formation of lignans in suspension cultures of *Linum album*. *Planta Med.* **58**, Supplement Issue 1, A622-A624
- Stähelin, H.F., von Wartburg, A.** (1991). The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide. Ninth Cain memorial award lecture. *Cancer Research* **51**, 5-15
- Strassburger** (1998); Lehrbuch der Botanik, 34. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M.** (2002). Stereochemical diversity in lignan biosynthesis of *Arcticum lappa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1262-1269
- Tabata, M., Fujita, Y.** (1985). Production of shikonin by plant cell cultures. *Biotechnology in plant science*, M. Zaitlin, P. Day, and A.Hollaender, Hrsg. (London, Academic Press), 207-218
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., Konoshima, M.** (1974). Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* **13**, 927-932
- Taiz L., Zeiger E.** (2000): Physiologie der Pflanze. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Treml, M.** (2005). Pinoresinol-Lariciresinol-Reductasen aus *Arabidopsis thaliana*. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit)
- Ulbrich, B., Wiesner, W., 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., Lewis, N.G.** (1990). Formation of the lignan, (-)-secoisolariciresinol, by cell-free extracts of *Forsythia intermedia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 1008-1014
- Umezawa T., Davin L. B., Lewis N. G.** (1991): Formation of lignans (-)-Secoisolariciresinol and (-)-Matairesinol with *Forsythia intermedia* cell free extracts. *J. Biol. Chem.* **266**: 10210-10217.
- Umezawa, Z., Shimada, M.** (1996). Formation of the lignan (+)-secoisolariciresinol by cell-free extracts of *Articum lappa*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 736-737

- Umezawa, T., Okunishi, T., Shimada, M.** (1997). Stereochemical diversity in lignan biosynthesis. *Wood Research*, **84**, 62-75
- Urania** (1991). *Urania Pflanzenreich, Die große farbige Enzyklopädie, Blütenpflanzen 1.* Urania- Verlag Leipzig
- van Fürden, B.** (2004). Einfluß von Methyljasmonat auf die Lignanakkumulation und Genexpression in Kulturen von *Linum album* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit)
- van Uden, W., Oeij, H., Woerdenbag, H.J., Pras, N.** (1993). Glucosylation of cyclodextrin-complexed podophyllotoxin by cell cultures of *Linum flavum* (L.) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **34**, 169-175
- van Uden, W., H.J., Pras, N., Visser, J.F., Malingre, T.M.** (1989). Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* royle. *Plant Cell Reports*, **8**, 165-168
- von Heimendahl, C.,** (2003). Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase aus *Linum album*: Biochemische Charakterisierung und Studien zur Expression in *Arabidopsis thaliana* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Diplomarbeit)
- von Heimendahl, C., Schäfer, K.M., Eklund, P., Sjöholm, R., Schmidt, T.J., Fuss, E.** (2005). Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*.: *Phytochemistry* **66**, 1254-1263
- Weiss, S.G., Tin-Wa, M., R.E. Perdue, J., Farnsworth, N.R.** (1975). Potential anticancer agents II: Antitumor and cytotoxic lignans from *Linum album* (Linaceae). *Journal of Pharmaceutical Science* **64**, 95-98
- Windhövel, J.** (1998). Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*: Untersuchungen zur Cinnamoyl-CoA: NADP Oxidoreduktase. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
- Wong, S.S.** (1991). *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking* CRC Press Inc., Boca Raton FL, USA 1991
- Xia, Z.Q., Costa, M.A., Proctor, J., Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2000). Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* **55**, 537-549
- Xia, Z.Q., Costa, M.A., Pélissier, H.C., Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2001). Secoisolariciresinol Dehydrogenase Purification, Cloning and Functional Expression. *J. Biol. Chem.* **276**: 12614-12623
- 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., Jong, A.Y.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

	Seite
Abb. 1.1: Die Darmflora des menschlichen Verdauungstraktes wandelt Secoisolariciresinoldiglucosid in Enterodiol und Matairesinol in Enterolacton um	3
Abb. 1.2: Grundstrukturen verschiedener Lignanklassen mit Beispielen	4
Abb. 1.3: Podophyllotoxin und seine semisynthetischen Derivate Etoposid, Teniposid und Etopophos [®]	5
Abb. 1.4: <i>Linum album</i> Ky	7
Abb. 1.5: Zellsuspension von <i>Linum album</i>	7
Abb. 1.6: <i>Linum usitatissimum</i>	7
Abb. 1.7: Biosyntheseweg von Matairesinol.	9
Abb. 1.8: In verschiedenen Pflanzen wurden entgegengesetzt enantiospezifische Lignanbiosynthesen gefunden.	10
Abb. 1.9: Umsetzung durch PIP-Reduktasen.	11
Abb. 3.1: Chromatogramm eines Standards der Lignane SECO, LARI und PINO	33
Abb. 3.2: Standard von racemischen Pinoresinol-Enantiomere,	34
Abb. 3.3: Standard von racemischen Lariciresinol-Enantiomere,	34
Abb. 3.4: Standard von racemischen Secoisolariciresinol-Enantiomere,	34
Abb. 3.5: Veränderung der Frischgewichte und Trockengewichte der <i>L. album</i> und <i>L. usitatissimum</i> Suspensionskulturen	35
Abb. 3.6: Entwicklung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und der Zuckerkonzentration im Kulturverlauf der <i>L. album</i> Kultur	36
Abb. 3.7: Entwicklung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und der Zuckerkonzentration im Kulturverlauf der <i>L. usitatissimum</i> Kultur	37
Abb. 3.8: PINO-, LARI- und SECO-Gehalte der <i>L. album</i> Suspensionskultur im Kulturverlauf	38
Abb. 3.9: PINO-, LARI- und SECO-Gehalte der <i>L. usitatissimum</i> Suspensionskultur im Kulturverlauf	38
Abb. 3.10: Vergleich der enantiomeren Zusammensetzung der Lignane PINO und SECO in Zellkulturen von <i>L. usitatissimum</i> und <i>L. album</i>	39
Abb. 3.11: Vergleich der Frischgewichte einer <i>L. usitatissimum</i> Kultur nach Zugabe von Methyljasmonat bzw. Ethanol mit einer unbehandelten Kultur	40
Abb. 3.12: Vergleich der SECO-Konzentrationen einer <i>L. usitatissimum</i> Kultur nach Zugabe von Methyljasmonat bzw. Ethanol mit einer unbehandelten Kultur.	40
Abb. 3.13: schematische Übersicht der Expressionsregion des pET-15b-Vektors mit der Klonierung des LUS-PLR-ORFs	42

Abb. 3.14:	Proteinabhängigkeit der vom LUS-PLR Fusionsprotein katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemische PINO als Substrat	44
Abb. 3.15:	Proteinabhängigkeit der vom LA-PLR Fusionsprotein katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemische PINO als Substrat	45
Abb. 3.16:	Schem. Primärstruktur der LA-PLR und der LUS-PLR mit Position der AS, die für die Enantiospezifität der PLRs verantwortlich sein könnten	47
Abb. 3.17:	AS-Vergleich zwischen PLRs, IFRs und PCBERs	48
Abb. 3.18:	Enzymtest mit der Punktmutante I	50
Abb. 3.19:	Enzymtest mit der Punktmutante II	51
Abb. 3.20:	Proteinabhängigkeit der von der AT 1 katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat	52
Abb. 3.21:	Enzymtests unterschiedlicher Proteinkonzentrationen über Nacht mit PINO und DDC als Substrat	53
Abb. 3.22:	Proteinabhängigkeit der von der AT 2 katalysierten Reaktion unter Verwendung von racemischen PINO als Substrat	54
Abb. 3.23:	Enzymtests mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen über Nacht mit PINO und DDC als Substrat	55
Abb. 3.24:	AT 2: Abhängigkeit der PLR/PCBER-Aktivität von der Proteinmenge im Reaktionsansatz	56
Tab. 2.1:	Zusammensetzung des MS-Mediums für <i>Linum</i> -Zellsuspensionskulturen (modifiziertes MS-Medium, MURASHIGE und SKOOG; 1962)	13
Tab. 2.2:	Bezeichnung der exprimierten Proteine	18
Tab. 2.3:	Laufmittelzusammensetzung zur Elution von DDC	21
Tab. 2.4:	HPLC-Säulen, Laufmittel und Gradientenprogramme	22
Tab. 2.5:	Primer für die Klonierung der ausgewählten <i>A. thaliana</i> ORFs	25
Tab. 3.1:	Ergebnis einer Blast P Suche mit der LUS-PLR und LA-PLR als Suchsequenzen	42

7.2 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheiten
BLAST	Basic Local Alignment Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CoA	Coenzym A

CONALC	Coniferylalkohol
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIR	Dirigierendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DOP	Desoxypodophyllotoxin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat (Titriplex)
FG	Frischgewicht
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IFR	Isoflavon-Reduktase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kpi-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LA	<i>Linum album</i>
LA-PLRI	<i>Linum album</i> Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase-I
LARI	Lariciresinol
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LUS	<i>Linum usitatissimum</i>
LUS-PLR	<i>Linum usitatissimum</i> Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase
MATAI	Matairesinol
6-MPTOX	6-Methoxypodophyllotoxin
MS-Medium	Medium nach Murashig und Skoog, 1962
NAA	Naphtylelessigsäure
NADP+	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
p.A.	zur Analyse (pro analysi)
PCBER	Phenylcumarin-Benzylether-Reduktasen
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PINO	Pinoresinol
PLR	Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ppm	parts per million
PS	Pinoresino-Synthase
PTOX	Podophyllotoxin
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	Reversed-Phase-HPLC
RT	Raumtemperatur
SDG	Secoisolariciresinoldiglucoosid
SDH	Secoisolariciresinol-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SECO	Secoisolariciresinol
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tag-Polymerase	Polymerase aus <i>Termophilus aquaticus</i>
TG	Trockengewicht
T _m	Schmelztemperatur (melting temperature)
Tris	TRIZMA (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)
Triton	Octophenolpoly(ethylenglycoether) _n
tRNA	Transfer-RNA
Tween	Poly(oxyethylen) _n -sorbitanmonooleat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-GAL	5-Brom-4-chloro-indolyl- β -galactoside
z.B.	zum Beispiel

7.3 Publikationen/ Konferenzberichte

Cosima von Heimendahl, Kathrin Schäfer, Elisabeth Fuss
biosynthesis of lignans in *Linum album*: Pinoresinol-lariciresinol reductase: International Meeting; Phytochemistry and Biology of Lignans. Bornheim-Walberberg 2003 (Poster)

von Heimendahl, C.; Schäfer, K.; Eklund, P.; Sjöholm, R.; Fuss, E.
Stereochemical diversity in lignan biosynthesis: Pinoresinol-lariciresinol reductase from *Linum album* and *Linum usitatissimum*. Future Trends in Phytochemistry. Gargnan (Italien) 2004 (Poster)

von Heimendahl, Cosima
Stereochemical diversity in lignan biosynthesis: pinoresinol-lariciresinol reductase from *Linum album* and *Linum usitatissimum*. Seminar des Graduiertenkolleg Molekulare Physiologie und Stoffumwandlung. Maria in der Aue 2004 (Vortrag)

von Heimendahl, Cosima; Schäfer, Kathrin; Eklund, Patrik; Sjöholm, Reiner; Fuss, Elisabeth: Pinoresinol-lariciresinol reductases from *Linum album* and *Linum usitatissimum* responsible for stereospecificity in lignan biosynthesis: Botanikertagung Braunschweig 2004 (Poster)

C. von Heimendahl, E. Fuss
Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktasen mit unterschiedlicher Enantiospezifität aus verschiedenen Leinarten. 4. Treffen der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft. Kaub 2005 (Vortrag)

von Heimendahl, C., Schäfer, K.M., Eklund, P., Sjöholm, R., Schmidt, T.J., Fuss, E. (2005). Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*.: Phytochemistry 66, 1254-1263

Danksagung

Ich danke allen, die mich in irgendeiner Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. A. W. Alfermann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seinem Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seiner Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Elisabeth gilt mein besonderer Dank für ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft sowie ihre fachliche und moralische Unterstützung.

Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern für die gute Teamarbeit, fachliche Anregungen und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.
Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mich in jeglicher Weise unterstützt und immer wieder moralisch aufgebaut hat.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung 57 der DFG“ und dem Schwerpunktprogramm 1142 der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Evolution Metabolischer Diversität“ danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 12.01.2007