

# Die Biosynthese cytotoxischer Lignane aus

*Linum nodiflorum* L. (Linaceae):

**$\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Kerstin Kranz**

**aus Kassel**

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 19.7.2004 angenommen.

Erstgutachter Frau Professor M. Petersen

Zweitgutachter Herr Professor A. W. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung am 20.7.2004

*„Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,  
dass das Unbegreifliche begreiflich sei;  
er würde sonst nicht forschen.“*

-J. W. von Goethe-

## Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

### *Vorträge und Poster:*

J. Schmitt, K. Kranz, S. Kuhlmann, M. Petersen: Studies on lignan production and lignan biosynthesis in plant cell cultures,  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. (Vortrag)

4. EU-Symposium LIGNOCANCER, April 2001, Düsseldorf

S. Kuhlmann, K. Kranz, B. Lücking, A. W. Alfermann, M. Petersen: Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*. (Poster)

PSE-Symposium "Plant Biotechnology – Better Products from Better Plants", Juni 2001, Helsinki (Finnland)

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase aus Zellkulturen von *Linum nodiflorum* (Linaceae). (Vortrag)

3. Sektionstagung, Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Juli 2001, Halle-Wittenberg

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from cell cultures from *Linum nodiflorum*. (Poster)

Tagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, September 2001, Erlangen

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from *Linum nodiflorum* (Linaceae): characterisation and purification. (Poster)

Botanikertagung, September 2002, Freiburg i. Br.

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase: an enzyme of the lignan pathway in *Linum nodiflorum* (Linaceae). (Vortrag)

4. Kurt-Mothes Workshop für Doktoranden, Oktober 2002, Jena

S. Kuhlmann, K. Kranz, M. Petersen: Enzymes of the biosynthesis of cytotoxic lignans in *Linum* species – deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase. (Vortrag von Herrn Dr. Kuhlmann)

Tagung "Phytochemistry and Biology of Lignans", April 2003, Walberberg

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum* (Linaceae). (Poster)

Tagung "Phytochemistry and Biology of Lignans", April 2003, Walberberg

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase aus *Linum nodiflorum* (Linaceae). (Vortrag)

Institutsseminar der Pharmazeutischen Biologie, November 2003, Marburg

### ***Publikationen:***

S. Kuhlmann, K. Kranz, B. Lücking, A. W. Alfermann, M. Petersen: Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*.

Phytochemistry Reviews 2002; 1, 37-43

K. Kranz, M. Petersen:  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*.

Phytochemistry 2003; 64, 453-458

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

<b>1.1. Lignane</b>	11
1.1.1. Allgemeiner Aufbau und Vorkommen der Lignane	11
1.1.2. Biologische Aktivität der Lignane und Wirkweise medizinisch relevanter Vertreter	12
1.1.3. Lignanbiosynthese	13
1.1.4. Lignane in Pflanzen	16
1.1.5. Lignane in <i>Linum</i>	18
1.1.6. Lignane in pflanzlichen Zellkulturen	20
<b>1.2. O-Methyltransferasen</b>	21
1.2.1. Aufgaben von Methyltransferasen	21
1.2.2. Benennung von O-Methyltransferasen	22
1.2.3. Einteilung der O-Methyltransferasen	23
1.2.4. Konservierte Regionen der Methyltransferasen	24
1.2.5. Kristallisationen von Methyltransferasen	26
<b>1.3. Zielsetzung der Arbeit</b>	28
<b>2. Material und Methoden</b>	
<b>2.1. Zellkulturen</b>	29
2.1.1. Kultivierung von Suspensionskulturen	29
2.1.2. Elicitierung mit Methyljasmonat	29
<b>2.2. Proteinbiochemische Methoden</b>	31
2.2.1. Aufarbeitung von Pflanzenzellen	31
2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.2.3. HPLC-Analytik	32
2.2.4. Überprüfung verschiedener Zellkulturlinien auf $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase-Aktivität	33
2.2.5. NMR-Analytik	33
2.2.6. Standardenzymtest und Abwandlungen	34
2.2.6.1. Substratspezifität	34
2.2.6.2. Hemmstoffe und Cofaktoren	35
2.2.6.3. Hemmung durch S-Adenosylhomocystein	36
2.2.6.4. Stabilität der Enzymaktivität beim Einfrieren	36
<b>2.3. Reinigung der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	36
2.3.1. Reinigungsschritte ohne HPLC	36
2.3.1.1. Fällung mit Ammoniumsulfat	36
2.3.1.2. Fällung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln	37
2.3.1.3. Fällung mit Polyethylenglykol	37
2.3.1.4. Fällung mit Protaminsulfat	37
2.3.1.5. Fällung über den pH-Wert	38
2.3.1.6. Reinigung über Farbsäulen	38

2.3.1.7.	Chromatographie mit Phenylsepharose	39
2.3.1.8.	Natives Polyacrylamidgel	39
2.3.2.	Reinigungsschritte mit einer Proteinreinigungs-HPLC-Anlage	40
2.3.2.1.	Q-Sepharose Fast Flow	40
2.3.2.2.	DEAE-Sepharcel	41
2.3.2.3.	SAH-EAH-Sepharose	41
2.3.2.4.	Adenosin-Agarose	42
2.3.2.5.	Größenausschlusschromatographie	44
2.3.2.6.	Hydroxylapatit-Chromatographie	44
2.3.2.7.	Hydrophobe Interaktion (HIC)	45
2.3.3.	Kontrolle der Proteinreinigung über ein SDS-Polyacrylamidgel	46
2.3.3.1.	Vorbereitung des Gels	46
2.3.3.2.	Probenvorbereitung	47
2.3.3.3.	Gelfärbemethoden	48
<b>2.4.</b>	<b>Charakterisierung der Suspensionskultur von <i>Linum nodiflorum</i></b>	49
2.4.1.	Mediumsparameter	49
2.4.1.1.	Bestimmung des Ammoniumgehaltes	50
2.4.1.2.	Bestimmung des Nitratgehaltes	51
2.4.1.3.	Bestimmung des Phosphatgehaltes	52
2.4.2.	Wachstumsparameter	53
2.4.3.	Lignanextraktion	54
<b>2.5.</b>	<b>Fütterungsversuch mit markierter [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimsäure (MDCA)</b>	54
2.5.1.	Synthese von [2- <sup>13</sup> C]3',4'-Methylenedioxyzimsäure (MDCA)	54
2.5.2.	Test auf Identität und Reinheit	55
2.5.3.	Fütterung der synthetisierten [2- <sup>13</sup> C]3',4'-Methylenedioxyzimsäure	55
2.5.4.	Auswertung der LC-MS-Methode	56
<b>2.6.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	57
2.6.1.	RNA-Isolierung	57
2.6.2.	cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	58
2.6.3.	Polymerase Kettenreaktion zur Amplifizierung von cDNA	58
2.6.4.	Agarosegelelektrophorese	60
2.6.5.	DNA-Extraktion aus dem Gel mit Nucleo Trap®	61
2.6.6.	DNA-Extraktion aus dem Gel mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	61
2.6.7.	Ligation mit dem pGEM-T® Vektor	62
2.6.8.	Transformation mit Roti®-Transform	62
2.6.9.	Anlegen einer Bakteriendauerkultur	63
2.6.10.	Plasmidextraktion mit dem Qiagen® Plasmid Mini Kit	63
2.6.11.	Restriktionsverdau der isolierten Plasmide	64
2.6.12.	Quantifizierung der DNA	65
2.6.13.	Sequenzierung	65

2.6.14.	Datenbankvergleich mit der FASTA-Datenbank	65
2.6.15.	Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit dem GeneRacer™ Kit	66
2.6.16.	Amplifizierung der 5'- und 3'-Enden mittels PCR	69
2.6.17.	Ligation und Transformation mit dem TOPO TA Cloning® Kit	72
2.6.18.	PCR-Amplifikation der Vollängesequenz	73
2.6.19.	Aufreinigung mit Qiaquick® spin Säulen	75
2.6.20.	Einbau der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pTrc99a	75
2.6.21.	Heterologe Expression der Methyltransferase	76
2.6.22.	Reinigung des exprimierten Enzyms	77
2.6.23.	Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität	78
<b>3. Ergebnisse</b>		
<b>3.1.</b>	<b>Beschreibung der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	<b>81</b>
3.1.1.	Nachweis der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase	81
3.1.2.	Untersuchung verschiedener Zellkulturlinien	81
3.1.3.	NMR-Analytik des $\beta$ -Peltatin-A Methylether	82
3.1.4.	Bestimmung von Enzymcharakteristika der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase	86
3.1.4.1.	pH-Optimum	86
3.1.4.2.	Inkubationszeit	86
3.1.4.3.	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration	87
3.1.4.4.	Inkubationstemperatur	88
3.1.4.5.	$K_m$ -Wert für $\beta$ -Peltatin	88
3.1.4.6.	$K_m$ -Wert für S-Adenosylmethionin	90
3.1.4.7.	Substratspezifität	91
3.1.4.8.	Hemmstoffe	93
3.1.4.9.	Hemmung durch S-Adenosylhomocystein (SAH)	95
3.1.4.10.	Stabilität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase bei Lagerung bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ und $-70\text{ }^\circ\text{C}$	96
3.1.4.11.	Einfluss von Methyljasmonat auf die Aktivität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in Zellen von <i>Linum nodiflorum</i>	97
<b>3.2.</b>	<b>Reinigung der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	<b>98</b>
3.2.1.	Reinigungsschritte ohne HPLC	98
3.2.1.1.	Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat	98
3.2.1.2.	Fällung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln	99
3.2.1.3.	Fällung mit Polyethylenglykol	102
3.2.1.4.	Fällung mit Protaminsulfat	103
3.2.1.5.	Fällung durch Veränderung des pH-Wertes	104
3.2.1.6.	Reinigung über Farbsäulen	105
3.2.1.7.	Chromatographie mit Phenylsepharose	106
3.2.1.8.	Reinigung über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	107
3.2.2.	Reinigungsschritte mit einer Proteinreinigungs-HPLC-Anlage	108
3.2.2.1.	Q-Sepharose Fast Flow	108



3.2.2.2.	DEAE-Sephacel	109
3.2.2.3.	SAH-EAH-Sepharose	109
3.2.2.4.	Adenosin-Agarose	110
3.2.2.5.	Größenausschlusschromatographie	111
3.2.2.6.	Chromatographie an Hydroxylapatit	112
3.2.2.7.	Hydrophobe Interaktionschromatographie	113
3.2.2.8.	Reinigung der $\beta$ -Peltatin 6- <i>O</i> -Methyltransferase durch aufeinanderfolgende Chromatographieverfahren	113
3.2.3.	Kontrolle der Reinigung über ein SDS-Polyacrylamidgel	114
<b>3.3.</b>	<b>Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Linum nodiflorum</i></b>	116
3.3.1.	Mediumsparameter	116
3.3.1.1.	Volumenänderung über den Kulturverlauf	116
3.3.1.2.	Änderung des pH-Wertes über den Kulturverlauf	116
3.3.1.3.	Leitfähigkeit	117
3.3.1.4.	Gesamtzuckergehalt	117
3.3.1.5.	Ammoniumgehalt im Medium über den Kulturverlauf	118
3.3.1.6.	Nitratgehalt im Medium über den Kulturverlauf	118
3.3.1.7.	Phosphatgehalt im Medium über den Kulturverlauf	119
3.3.2.	Wachstumsparameter	119
3.3.2.1.	Frischgewicht und Trockengewicht	119
3.3.2.2.	Enzymaktivität der $\beta$ -Peltatin 6- <i>O</i> -Methyltransferase über den Kulturverlauf	121
3.3.3.	Lignangehalt	122
3.3.3.1.	Lignane in den Zellen	122
3.3.3.2.	Lignane im Medium	125
<b>3.4.</b>	<b>Fütterungsversuch mit markierter [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methyldioxy- zimtsäure</b>	127
3.4.1.	Identität und Reinheit der [2- <sup>13</sup> C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure	127
3.4.2.	Ergebnis der Fütterung von [2- <sup>13</sup> C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure an Zellen von <i>Linum nodiflorum</i>	131
<b>3.5.</b>	<b>Versuche zur cDNA-Klonierung</b>	135
3.5.1.	Entwurf von Primern für eine Methyltransferase	135
3.5.2.	Polymerase Kettenreaktion mit Primern gegen die konservierten Regionen	135
3.5.3.	Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit dem GeneRacer™ Kit	139
3.5.4.	Bestimmung der Gensequenz von MT1	142
3.5.5.	Bestimmung der Schnittstellen in der MT1-Sequenz	142
3.5.6.	Primerdesign und PCR über die komplette Länge der MT1-Sequenz	142
3.5.7.	Sequenz der MT1-Vollängesequenz	144
3.5.8.	Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Methyltransferasen	146
3.5.9.	Aufreinigung des exprimierten Proteins	149
3.5.10.	Substrattests mit dem exprimierten Protein	150

<b>4. Diskussion</b>	
<b>4.1. Aktivität der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase in verschiedenen Zellkulturen</b>	153
<b>4.2. Substratspezifität der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	154
<b>4.3. Beschreibung der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	154
<b>4.4. Reinigung der <math>\beta</math>-Peltatin 6-O-Methyltransferase</b>	161
<b>4.5. Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Linum nodiflorum</i></b>	164
4.5.1. Mediumsparameter	164
4.5.2. Enzymaktivität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase	165
4.5.3. Vergleich der Lignane in den Zellen und im Medium	165
<b>4.6. Fütterungsversuch mit [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylendioxyzimtsäure</b>	167
<b>4.7. Klonierung und Expression einer Methyltransferase aus <i>Linum nodiflorum</i></b>	168
4.7.1. Herstellung der degenerierten Primer	168
4.7.2. Datenbankvergleich der beiden gefundenen Methyltransferasesequenzen	169
4.7.3. Verlängerung der cDNA zu einer Vollängesequenz von MT1	170
<b>4.8. Aufreinigung der heterolog exprimierten Methyltransferase</b>	172
<b>4.9. Suche nach einem geeigneten Substrat für MT1</b>	172
<b>4.10. Vergleich der berechneten dreidimensionalen Struktur von MT1 mit anderen Methyltransferasen</b>	173
<b>5. Ausblick</b>	
<b>6. Zusammenfassung</b>	
<b>7. Anhang</b>	
7.1. Geräteliste	180
7.2. Chemikalien	181
7.3. Internetadressen	183
7.4. Abkürzungen	183
7.5. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide	186
7.6. Literaturverzeichnis	187

# 1. Einleitung

## 1.1. Lignane

### 1.1.1. Allgemeiner Aufbau und Vorkommen der Lignane

Lignane gibt es in über 55 Pflanzenfamilien, sie sind im Pflanzenreich damit weit verbreitete phenolische Verbindungen. Sie kommen fast nur in Landpflanzen vor. Innerhalb der Landpflanzen kann man Lignane in Gymnospermen, Angiospermen, Moosen und Farnen finden (Lewis und Davin 1999). Sie sind daher wohl eine evolutionsbiologisch alte Gruppe von Inhaltsstoffen. Als Vorstufen für die Lignanbiosynthese dienen Hydroxycinnamsäurederivate, meist Coniferylalkohol. Zwei Moleküle dieser Phenylpropane dimerisieren stereospezifisch über eine C-C-Verknüpfung, wie in Abbildung 1 gezeigt. Je nachdem, ob die Bindung über die C8-C8'-Atome der Seitenketten oder über andere Atome gebildet wird, unterteilt man die Verbindungen in Lignane und Neolignane, wobei diese Bezeichnungen in der Literatur noch nicht einheitlich verwendet werden. Auch höhere Oligomere der Vorstufen sind unter dem Namen Sesquilignane bekannt. Fehlt das C9 oder C9'-Atom oder eine komplette Methoxygruppe am aromatischen Ring, spricht man von Norlignanen oder, bei anderer Verknüpfung als über C-8-8', von Norneolignanen. Einen umfassenden Überblick über die strukturelle Vielfalt geben vier Artikel von Ward et al. aus den Jahren 1993, 1995, 1997 und 1999. Eine kleine Gruppe innerhalb der Lignane bilden die Aryltetralinlignane, die über ein geschlossenes Ringsystem von vier Ringen verfügen. Zu dieser Gruppe gehören Lignane wie Desoxypodophyllotoxin (DOP), Podophyllotoxin (PTOX),  $\beta$ -Peltatin ( $\beta$ -PEL),  $\beta$ -Peltatin-A Methyl ether (PAM) und 6-Methoxypodophyllotoxin (6-MPTOX). Die IUPAC hat eine Empfehlung zur Nummerierung der C-Atome herausgebracht, die hier zu einer Einheitlichkeit und Vereinfachung der Nomenklatur der Lignane führen soll. Diese Nummerierung wurde in dieser Arbeit verwendet. Nachzulesen ist diese Richtlinie im Internet unter <http://www.chem.mw.ac.uk/iupac/lignan/>.

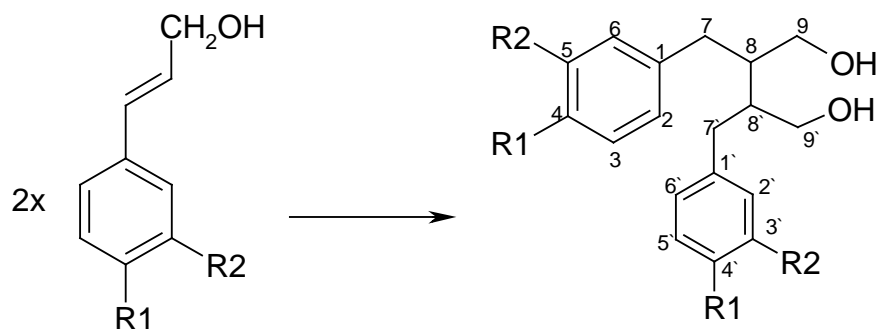


Abb. 1: Lignan-Grundgerüst und die Verknüpfung über die 8-8'-C-Atome der Monolignoleinheiten.

### 1.1.2. Biologische Aktivität der Lignane und Wirkweise medizinisch relevanter Vertreter

In den Pflanzen übernehmen Lignane vielfältige Aufgaben, wobei es hauptsächlich um die Bekämpfung von Krankheitserregern und Fraßfeinden geht. Es gibt antimykotisch, antiviral und antibakteriell wirkende Lignane. Daher sind Lignane auch für die Anwendung als Arzneimittel am Menschen interessant. Secoisolariciresinol und Matairesinol, die Hauptlignane aus dem Leinsamen, werden im Darm von Bakterien zu den hormonähnlichen Strukturen Enterolacton und Enterodiol umgebaut, die einen protektiven Effekt gegen hormonabhängigen Krebs wie z. B. Brustkrebs besitzen. Diese Schutzwirkung konnte in klinischen Studien belegt werden (Adlercreutz 1999, Cho et al. 1999). Auch in der Therapie besitzen Lignane im menschlichen Körper interessante Einsatzgebiete. Aufgrund seiner zytotoxischen und antiviralen Eigenschaften wird Podophyllotoxin medizinisch gegen Feig- und Genitalwarzen (Condyloma acuminata) verwendet, die vom Papilloma-Virus hervorgerufen werden. Hierbei hemmt Podophyllotoxin den Microtubuli-Aufbau, da es an die  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimere bindet, und verhindert damit die Zellteilung (Canel et al. 2000). Diese Wirkung wäre auch für den Einsatz als Zytostatikum denkbar, da sich Krebszellen im Körper dann nicht weiter vermehren könnten. Podophyllotoxin ist aber für einen solchen Einsatz zu toxisch, seine Anwendung damit auf das äußerliche Einsatzgebiet begrenzt. Bei dem Versuch, semisynthetische Derivate zu entwickeln, die weniger toxisch aber genauso wirksam sind, wurden die Krebstherapeutika Etoposid, Teniposid und Etopophos<sup>®</sup> entwickelt, die heute als Zytostatika gegen meist hormonabhängige Krebsarten (Leukämie, Ovarial-, Brust- und Pankreas- und Lungenkrebs) und das Non-Hodgkin-Syndrom genutzt werden und in Abbildung 2 dargestellt sind (Canel et al. 2000). Diese Derivate werden durch Demethylierung am C4'-Atom von Ring E, Epimerisierung am C4-Atom von Ring C und durch Substituenten an die OH-Gruppen gebildet.

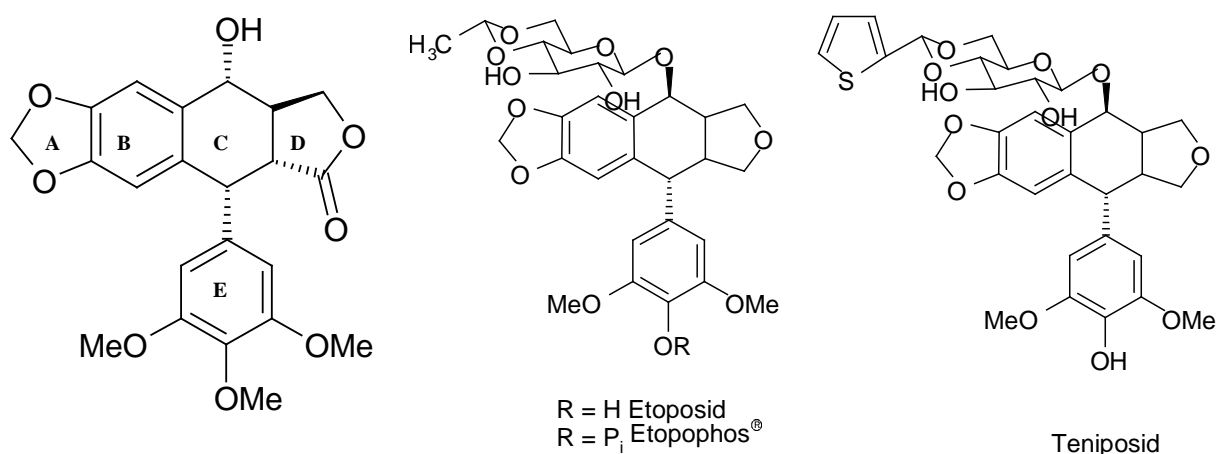


Abb. 2: Podophyllotoxin und dessen Derivate mit krebshemmender Wirkung: Etoposid, Teniposid und Etopophos<sup>®</sup>.

Obwohl für die Wirkung des Podophyllotoxins die OH-Gruppe am C-Ring besonders wichtig zu sein scheint, wurden hier Veränderungen in Form von Substituenten an dieser OH-Gruppe durchgeführt. Für eine Wirkung ist nach wie vor essentiell, dass die Ringe E und D zueinander in trans-Position stehen. Interessanterweise hat sich mit der Veränderung der Moleküle auch die Wirkweise verändert. Die oben genannten Chemotherapeutika binden an den DNA-Topoisomerase II-Komplex und führen dadurch zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Damit kann die Zelle die G2-Phase ihres Teilungszyklus nicht mehr verlassen und stirbt ab (Canel et al. 2000). Das neueste dieser Krebstherapeutika ist das 1996 von Bristol-Myers-Squibb zugelassene Etopophos<sup>®</sup>, das als Prodrug fungiert und im Körper zu Etoposid umgebaut wird. Der Vorteil seiner Phosphatgruppe liegt in einer höheren Wasserlöslichkeit der Verbindung und daher in einer leichteren Applikation als intravenöse Injektion (Schacter 1996). Untersuchungen der Firma Sandoz haben ergeben, dass die in *Podophyllum* vorkommenden Lignane als Glykoside in den Pflanzen vorkommen, die weniger gastrointestinale Nebenwirkungen verursachen als die Aglyka. In dem selben Maße wie aber die Nebenwirkungen reduziert sind, nimmt auch die Wirkstärke der Krebshemmer ab (Stähelin und von Wartburg 1991). Die Suche nach Derivaten mit weniger Nebenwirkungen konzentrierte sich daher auf glykosidische Verbindungen, deren Wirkstärke erhalten blieb. Ein derivatisiertes Glykosid des Podophyllotoxins macht sich den ursprünglichen Mechanismus der Mitosehemmung zu Nutze und wird unter dem Namen Rheumacon<sup>®</sup> gegen rheumatoide Arthritis getestet. Neben vielversprechenden klinischen Studien zu dieser Substanz (Svensson und Pettersson 2003) gibt es aber auch Hinweise auf eine erbgutschädigende Nebenwirkung (Dahlqvist und Nordenson 1996).

### 1.1.3. Lignanbiosynthese

In der Lignanbiosynthese unterscheidet man zwischen der Bildung von Monolignoleinheiten, frühen und späten Lignanbiosyntheseschritten. Die zur Lignansynthese genutzten Vorstufen (Monolignole) sind dieselben wie die für Lignin, nämlich Hydroxycinnamylalkohole wie z.B. 4-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol oder auch Sinapylalkohol. Diese Bausteine der Lignane kommen aus dem Phenylpropanoid-Weg und entstehen damit aus der Aminosäure Phenylalanin. Diese wird in einem ersten Schritt zu Zimtsäure desaminiert, eine Reaktion, die von der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert wird. Die entstandene Zimtsäure wird von der Zimtsäure 4-Hydroxylase in 4-Cumarsäure überführt. Diese Verbindung kann entweder zu Kaffeesäure an Position C3 hydroxyliert oder in 4-Cumaroyl-CoA überführt werden. 4-Cumaroyl-CoA verestert dann mit Shikimisäure oder mit Chinasäure unter Bildung der jeweiligen Ester Cumaroyl-Shikimat und Cumaroyl-Chinat (Van Doorselaere et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die beiden Ester anschließend an der Position C3 des Cumaroyl-Restes hydroxyliert werden. Die Produkte dieser Hydroxylierung sind die Caffeoylester der Shikimisäure und der Chinasäure (Schoch et al. 2001, Franke et al. 2002). Aus diesen entsteht nach Bildung der CoA-Ester und Methylierung durch die Caffeoylester-CoA

*O*-Methyltransferase (CCoAOMT) Feruoyl-CoA (Kneusel et al. 1989), welches über Coniferaldehyd weiter zu Coniferylalkohol umgesetzt wird. Die beiden katalysierenden Enzyme sind die Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) und die Cinnamylalkohol Dehydrogenase (CAD). Der Coniferylalkohol ist maßgeblich an der Synthese der Lignane vom Podophyllotoxin-Typ beteiligt, während die Lignine auch aus Cumarylalkohol und Sinapylalkohol hervorgehen. Lignane sind im Gegensatz zu Lignin, welches nach Cellulose das häufigste pflanzliche Polymer ist, häufig optisch aktiv und haben ein niedriges Molekulargewicht. Die Dimerisierung zu den Lignan en im engen Sinn ist in vielen Fällen stereospezifisch und wird durch die Pinoresinol-Synthase oder ähnlichen Enzymsystemen katalysiert (Abbildung 3). Dieses Enzymsystem besteht aus einem radikalformenden Enzym (Laccase) und einem katalytisch inaktiven „dirigierenden Protein“, das die Stereospezifität vermittelt (Davin et al. 1997, Davin und Lewis 2000). Dabei kommen bestimmte Stereoformen der Lignane nur in bestimmten Pflanzen vor. So gibt es zum Beispiel (+)-Pinoresinol in *Forsythia*-Arten, in *Linum usitatissimum* kommt dagegen nur (-)-Pinoresinol vor. Pinoresinol wird nun zu Lariciresinol und weiter zu Secoisolariciresinol reduziert, wobei beide Schritte von demselben Enzym katalysiert werden, der Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (PLR). Diese ist abhängig von NADPH und seit kurzem kloniert und kristallisiert. Die Kristallstruktur zeigt eine Verwandtschaft zu Isoflavon Reduktasen (Chu et al. 1993, Dinkova-Kostova et al. 1996, Min et al. 2003).

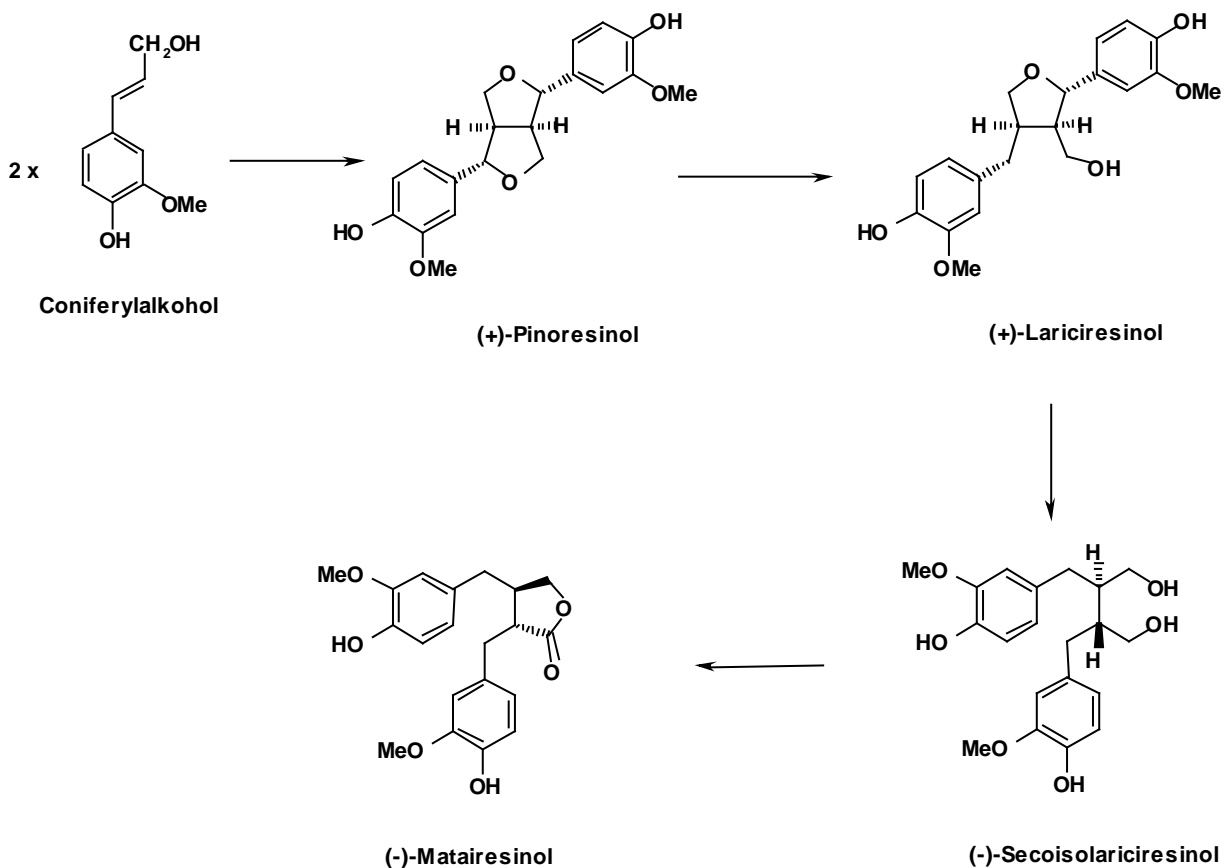


Abb. 3: Frühe Lignanbiosyntheseschritte ausgehend von Coniferylalkohol bis Matairesinol.

Die Arbeitsgruppe von Umezawa entdeckte 1991 in *Forsythia intermedia* die Secoisolariciresinol Dehydrogenase, das Enzym, welches den Lactonring zwischen C9 und C9' verknüpft. Diese Dehydrogenase konnte 2001 aus *Forsythia intermedia* und *Podophyllum peltatum* aufgereinigt, kloniert und heterolog exprimiert werden. Es handelt sich hierbei um ein NAD-abhängiges Enzym mit einer Größe von 32 kDa (Xia et al. 2001).

Die Bildung der Lignane ausgehend von Matairesinol ist noch nicht so gut untersucht. Diese Syntheseschritte werden auch als späte Lignanbiosyntheseschritte zusammengefasst (Abbildung 4). Es wurden zur Aufklärung der einzelnen Zwischenstufen auf dem Weg zu Podophyllotoxin verschiedene Fütterungsversuche mit markierten Vorstufen durchgeführt. Leider wurden für diese Versuche unterschiedliche Pflanzenarten und Kultivierungssysteme benutzt, so dass sich die einzelnen Ergebnisse nicht immer aufeinander übertragen lassen. Fütterungsversuche mit <sup>13</sup>C-Ferulasäure an *Linum album* und mit Ferulasäure, Zimtsäure und Phenylalanin an *Podophyllum hexandrum* belegten die Verknüpfung des frühen und des späten Lignansyntheseweges. So wurden die Vorstufen in diesen Pflanzen in Desoxypodophyllotoxin und Podophyllotoxin eingebaut (Seidel et al. 2002, Jackson et al. 1984). Diese beiden Lignane sind Vertreter der O-Methyl-Serie, die von der Gruppe der 4'-Demethyl-Serie (4'-Demethyl-desoxypodophyllotoxin, α-Peltatin, 4'-Demethylpodophyllotoxin) unterschieden werden. Radioaktiv markiertes Matairesinol konnte in beide Gruppen eingebaut werden und dient damit wohl als Vorläufer für beide Substanzgruppen (Broomhead et al. 1991). Auf der Stufe von DOP bzw. 4'-Demethylpodophyllotoxin sind die beiden Gruppen nicht mehr ineinander überführbar wie Versuche von Jackson et al. (1984) zeigten. Yatein wurde in *Podophyllum hexandrum* in PTOX, nicht aber in Podorhizol oder Anhydropodorhizol eingebaut (Kamil et al. 1986). Dagegen wurde Yatein in *Anthriscus silvestris* nicht in Podophyllotoxin inkorporiert (Koulman 2003). Es wäre also möglich, dass unterschiedliche Pflanzen einen leicht variierten Syntheseweg zu den Podophyllotoxinderivaten beschreiten. Ebenfalls in *Podophyllum hexandrum* wurde gezeigt, dass 4'-Demethyl-DOP in α-Peltatin, DOP in β-Peltatin umgesetzt wird (Kamil et al. 1986). Van Uden et al. fanden in Suspensionskulturen von *Linum flavum* den Umbau von DOP in PTOX und in 6-MPTOX, wobei auch β-Peltatin als Intermediat gezeigt werden konnte. Bei diesen Versuchen zeigte sich zudem, dass sich PTOX nicht mehr in 6-MPTOX überführen lässt. Auch in Suspensionskulturen von *Podophyllum hexandrum* konnte eine Umwandlung von DOP in PTOX und das entsprechende Glucosid gezeigt werden (Van Uden et al. 1992, 1995 und 1997). Ausgehend von DOP werden also entweder PTOX oder 6-MPTOX als Endprodukte gebildet. Beide Endstufen werden von den Pflanzen als Glucoside in den Vakuolen gelagert (Henges 1999), da sie auch für die Pflanze in höheren Dosen giftig sind. Die Abfolge der späten Lignanbiosyntheseschritte ist in Abbildung 4 dargestellt. Dabei geht man davon aus, dass Matairesinol zu Yatein umgesetzt wird, welches dann zu Desoxypodophyllotoxin umgewandelt wird. DOP ist dann Ausgangspunkt für die Bildung von PTOX und 6-MPTOX, die bekanntesten Aryltetralinlignane.

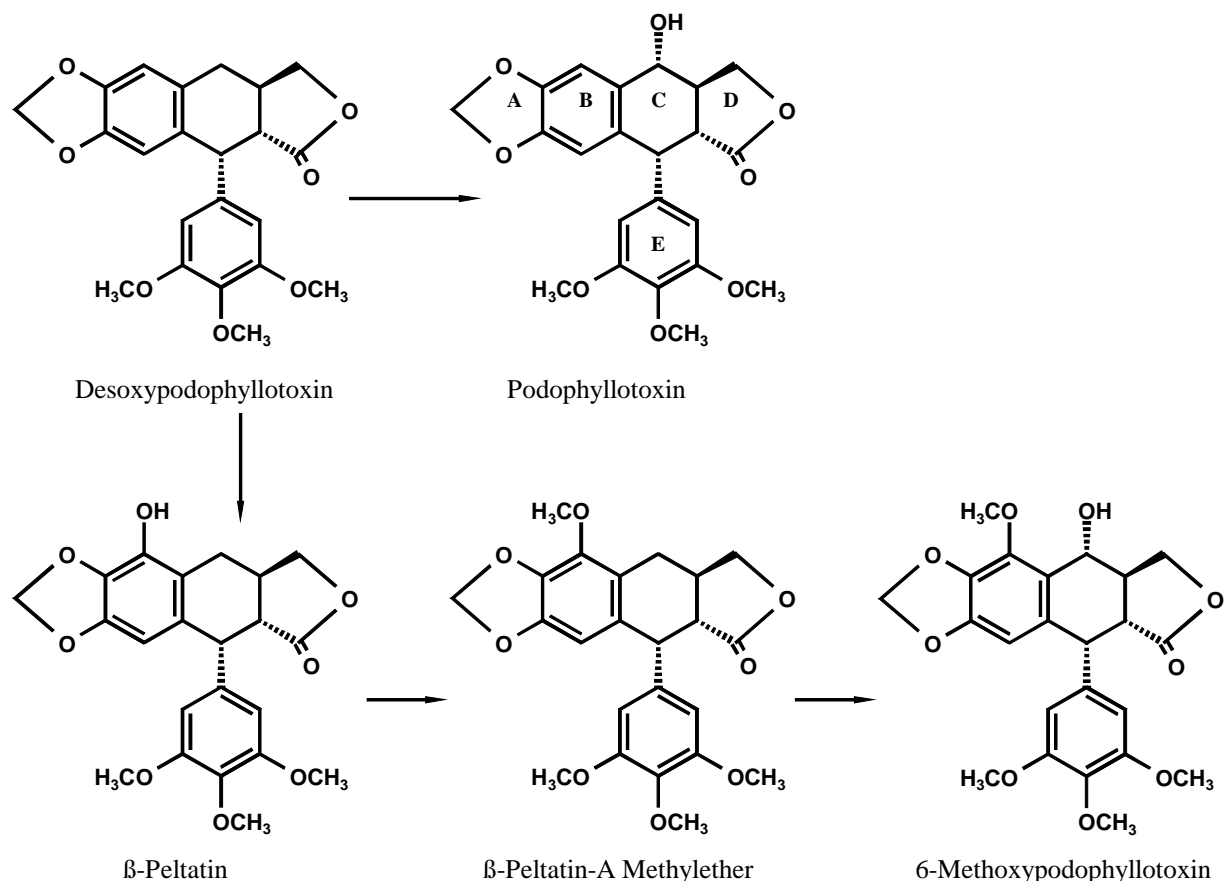


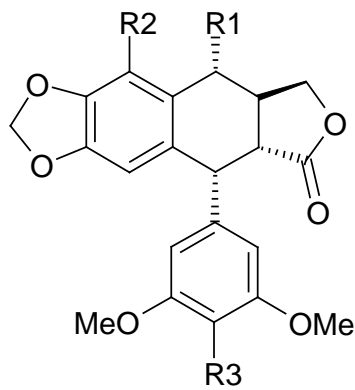
Abb. 4: Biosyntheseschritte von Desoxypodophyllotoxin zu Podophyllotoxin und 6-Methoxypodophyllotoxin.

#### 1.1.4. Lignane in Pflanzen

Obwohl Podophyllotoxin als Ausgangsstoff der semisynthetischen Derivate auch vollsynthetisch hergestellt werden könnte, ist es wirtschaftlicher, es aus natürlichen Quellen zu isolieren. So kann es aus den Rhizomen von *Podophyllum hexandrum* (syn. *Podophyllum emodi*) und *Podophyllum peltatum* (Podophyllaceae) gewonnen werden, wobei nur *P. peltatum* bei uns als offizinelle Droge gilt. *P. hexandrum* kommt aus dem Himalaya, *P. peltatum* aus Nordamerika. Nach umfangreichen Wildsammlungen wurde *Podophyllum hexandrum* aus dem Himalaya in die Liste der bedrohten Pflanzen aufgenommen (Appendix II der Convention for International Trades in Endangered Species CITES; World Conservation Monitoring Centre 2001). Schon die Ureinwohner Amerikas erkannten den medizinischen Nutzen dieser Pflanze und verabreichten das Harz und wässrige Auszüge der Pflanze als Laxans, Anthelminthikum, zur Tumorbehandlung und als Antidot bei Schlangenbissen. Die europäischen Siedler wandelten diese Einsatzgebiete noch etwas ab und schrieben dem Harz auch emetische und cholagoge Wirkung zu (Imbert 1998, Lloyd 1910, Bohlin und Rosén 1996). Dieses Harz wurde unter dem Namen Podophyllin ab 1850 auch kommerziell vertrieben und zur Behandlung von Feigwarzen eingesetzt. Es hielt dabei auch Einzug in die US Pharmacopoeia, wo es bis 1942 erhalten blieb. Auch in China wurde schon vor 2000 Jahren die Heilwirkung von *Podophyllum emodi* (Synonym zu *P. hexandrum*)



beschrieben (Trease und Evans 1978). Erst 1951 konnte die Struktur von Podophyllotoxin als wirksamkeitsbestimmendem Stoff aufgeklärt werden. Seit 1973 ist Podophyllin auch im Deutschen Arzneimittelcodex (DAC) monographiert. Auch andere europäische Länder haben eine Arzneibuchmonographie für Podophyllin. So ist es Bestandteil der British Pharmacopoeia seit 1902, wobei hier als einzigem europäischen Land die Droge von *Podophyllum hexandrum* und nicht von *Podophyllum peltatum* stammen muss. Das Podophyllin beider Pflanzen unterscheidet sich in Bezug auf seine Lignanzusammensetzung und den Gehalt der einzelnen Komponenten. So enthält *Podophyllum peltatum* 0,25–1,0 % Podophyllotoxin im Trockengewicht der Pflanze und im Podophyllin 20 % Podophyllotoxin und 10 %  $\beta$ -Peltatin. Bei *Podophyllum hexandrum* sind dies 4,9 bis 10 % Podophyllotoxin im Trockengewicht der Pflanze, das Harz besteht zu 40 % aus Podophyllotoxin, während  $\beta$ -Peltatin so gut wie nicht vorkommt (Hänsel und Sticher 2004). Bisher stammt das zur Isolierung des Podophyllotoxins gesammelte Pflanzenmaterial aus Wildsammlungen. Auch wenn es in Amerika ein reiches Vorkommen von *Podophyllum peltatum* gibt, kann die Pflanze den Bedarf an der Vorstufe zur Synthese der Krebsmedikamente nicht auf lange Sicht decken. Alle Versuche, Zellkultursysteme zu etablieren oder einen großflächigen Anbau durchzuführen, scheiterten bislang, so dass nach einer alternativen Quelle für diese Lignane gesucht werden muss. Wie bereits eingangs erwähnt, findet man Lignane nicht nur in Podophyllaceae, sondern noch in vielen anderen Pflanzenfamilien. So enthalten zum Beispiel Juniperaceae, vor allem *Juniperus chinensis*, Cupressaceae, hier vor allem *Callitis drummondii*, und einige *Linum*-Arten (Linaceae) nennenswerte Gehalte an Lignanen. Aber auch Berberidaceae, Polygalaceae, Apiaceae, Pinaceae, Hernandaceae, Euphorbiaceae und Ranunculaceae enthalten diese Gruppe von Pflanzeninhaltsstoffen (Imbert 1998). Die Gattung *Linum* innerhalb der Linaceae ist besonders interessant, da sie dieselben Lignane akkumuliert wie Podophyllaceae. Die Abbildung 5 zeigt die Strukturen unterschiedlicher Aryltetralinlignane.



	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>Podophyllotoxin</b>	OH	H	OCH <sub>3</sub>
<b>6-Methoxypodophyllotoxin</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>Desoxypodophyllotoxin</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>α-Peltatin</b>	H	OH	OH
<b>β-Peltatin</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>β-Peltatin-A Methyleneether</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>4'-Demethyl-Serie</b>	--	--	OH

Abb. 5: Struktur unterschiedlicher Aryltetralinlignane.

### 1.1.5. Lignane in *Linum*

Der bekannteste Vertreter der Familie der Linaceae ist sicher *Linum usitatissimum*. Schon der lateinische Name „usitatissimum“ (überaus nützlich) deutet auf seine vielfältigen Einsatzmöglichkeiten hin. Seine Fasern werden seit langer Zeit versponnen. Die ersten Belege dafür finden sich aus der Zeit von 5000 v. Chr. in Ägypten (Judd 1995). Lein dient außerdem zur Gewinnung des Leinöls, seine Samen werden gegessen. In Leinsamen sind die Lignane Secoisolariciresinoldiglycosid und Matairesinol enthalten, denen eine krebsprotektive Wirkung zugesprochen wird. Einen Überblick über die Verwendung einiger Lein-Sorten gibt Muir (2003). Von den vielen Pflanzenfamilien, die Lignane produzieren, eignen sich die Linaceae besonders, um nach alternativen Quellen für Podophyllotoxin und andere Aryltetralinlignane zu suchen. In Zellkulturen von *Linum*-Arten können beträchtliche Mengen an Lignan gebildet werden (siehe hierzu auch 1.1.6.). Die Gattung *Linum* der Linaceae zählt mit ca. 230 Vertretern zu den größten (Van Uden et al. 1994) und kann in fünf Sektionen unterteilt werden, wobei in jeder Sektion Vertreter mit Lignan zu finden sind. Für die Aufteilung der Gattung *Linum* gibt es verschiedene Möglichkeiten. Engler (1931) unterteilte in die taxonomischen Sektionen Eulinum, Linastrum, Cathartolinum, Syllinum und Cliococca. Hier soll die Einteilung nach Davis und Ockendon und Walters verwendet werden, nach der auch in fünf Sektionen gegliedert wird. Diese Sektionen heißen: Linum, Syllinum, Dasyllinum, Linastrum und Cathartolinum (Davis 1970, Ockendon und Walters 1968). Besonders interessant für diese Arbeit sind die Vertreter der Sektion Syllinum, da hier besonders viele Pflanzen mit Lignan vom Podophyllotoxin-Typ vorkommen. Innerhalb

dieser Sektion gibt es eine weitere Aufteilung in Pflanzen, die Podophyllotoxin und welche die eher 6-Methoxypodophyllotoxin bilden. Die erste Gruppe zeichnet sich durch weiße, heterostyle Blüten und eine ausdauernde Lebensweise aus, die zweite Gruppe enthält Pflanzen, die nicht ausdauernd sind, mit gelben, homostylen Blüten (Mohagheghzadeh et al. 2003). Bei dieser Aufteilung gibt es einen Vertreter der Syllinum-Sektion, der keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden kann: *Linum nodiflorum* hat gelbe, aber homostyle Blüten, ist nicht ausdauernd und unterscheidet sich auch durch seinen Gehalt an Tocopherol und den enthaltenen Fettsäuren von allen sonstigen Vertretern der Sektion (Velasco et al. 2000). Während die gelb blühenden Vertreter dieser Sektion normalerweise 6-MPTOX bilden (Broomhead et al. (1990) finden MPTOX in *L. flavum*), kommt in den weiß blühenden Vertretern PTOX vor (Weiss et al. (1975) weisen PTOX in *L. album* nach). In der gelb blühenden Art *Linum nodiflorum* akkumuliert 6-Methoxypodophyllotoxin (Konuklugil 1996). Die Abbildung 6 zeigt eine Zeichnung und ein Foto der Pflanze als Herbarmaterial. Deutlich sind die lineal lanzettlichen Blätter und die gelben, kleinen Blüten zu erkennen.



Abb. 6: *Linum nodiflorum* in einer Zeichnung und einem Foto der herbarisierten Pflanze.

### 1.1.6. Lignane in pflanzlichen Zellkulturen

Wann immer man pflanzliche Inhaltsstoffe anreichern oder ihren Syntheseweg erforschen möchte, können Zellkulturen eine wichtige Alternative zur Arbeit mit der ganzen Pflanze sein. Sie können leicht und schnell in großen Mengen kultiviert werden und sind von äußeren Einflüssen wie Regen, Temperatur und Jahreszeit weitestgehend unabhängig. Fütterungsversuche und die Zugabe bestimmter Vorstufen können problemlos durchgeführt werden. Allerdings können Suspensions- und Kalluskulturen aufgrund geringer Stabilität die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Inhaltsstoffe im Laufe der Kulturzeit verlieren (Seitz et al. 1985). Ein weiteres Einsatzgebiet pflanzlicher Zellkulturen ist die Vermehrung ganzer Pflanzen aus sterilen Explantaten oder Kallusgewebe, die Mikropropagation (Alfermann et al. 1994), wie sie bereits zur Vermehrung von Erdbeeren, Orchideen, Nelken oder Usambara-Veilchen verwendet wird. Um große Mengen eines Inhaltsstoffs zu isolieren, können pflanzliche Zellkulturen in Bioreaktoren unterschiedlicher Volumina kultiviert werden. Solche Bioreaktoren werden industriell bereits bei der Gewinnung des Spindelgiftes Taxol<sup>®</sup> (Paclitaxel) aus *Taxus*-Zellkulturen benutzt. Einen Überblick über die verwendeten Zellkulturen für die Lignanproduktion geben Petersen et al. (2001). So können aus Zellkulturen von *Linum album* bis zu 28 mg Podophyllotoxin pro Liter extrahiert werden (Smollny et al. 1998, Empt et al. 2000). In Kulturen von *Linum flavum* können bis zu 121 mg pro Liter 6-MPTOX gewonnen werden, wie Berlin et al. (1986) zeigen konnten. Untersuchungen an Kulturen von *Podophyllum hexandrum* zeigten, dass unter optimalen Bedingungen die Ausbeute an Podophyllotoxin bei 48,8 mg / Liter nach einer Kulturzeit von 60 Tagen liegen können (Chattopadhyay et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit Suspensionskulturen und mit Kalluskulturen unterschiedlicher *Linum*-Arten gemacht, wie sie in Abbildung 7 gezeigt sind.

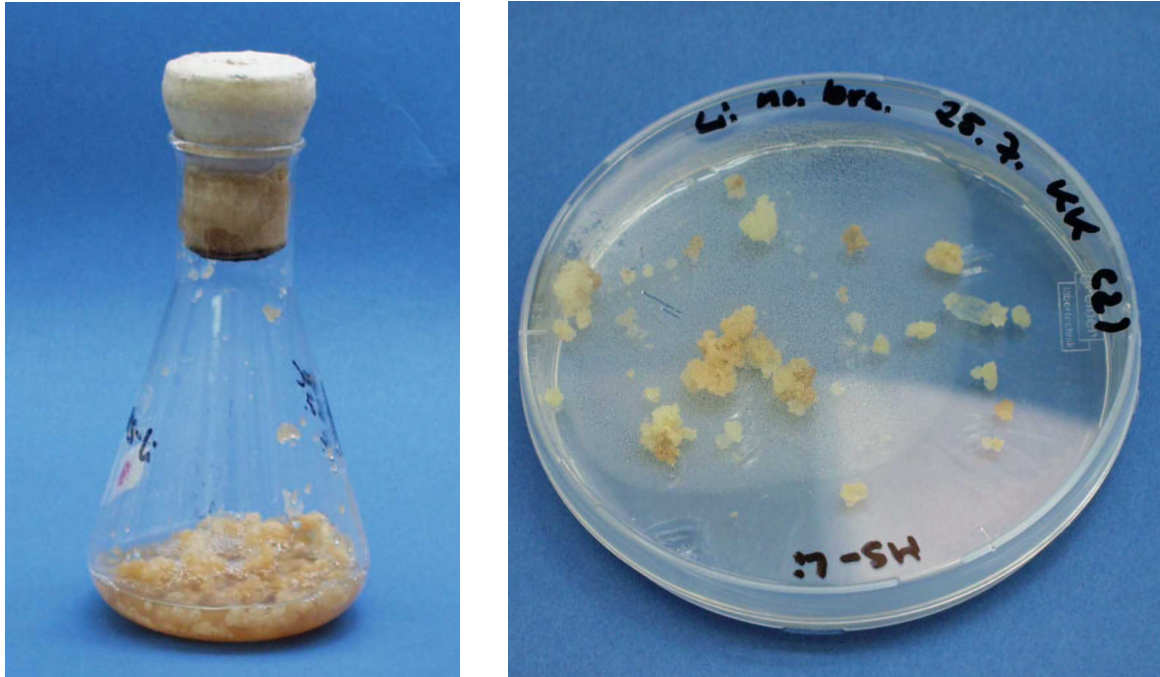


Abb. 7: Suspensionskultur und Kalluskultur von *Linum nodiflorum*.

## 1.2. O-Methyltransferasen

### 1.2.1. Aufgabe von Methyltransferasen

Methylierungen sind weit verbreitete Reaktionen, um Stoffe zu deaktivieren, zu entgiften oder wasserlöslich zu machen. Unterschiedliche Methyltransferasen methylieren an C-, O-, N- oder S-Atomen und werden demzufolge C-Methyltransferase, O-Methyltransferase, N-Methyltransferase oder S-Methyltransferase genannt, auch Halogene können methyliert werden. Im menschlichen Körper kommen Methylierungsreaktionen beispielsweise bei der Synthese von Neurotransmittern und bei der Cholesterolsynthese vor. Sie spielen daher bei vielen Krankheiten eine Rolle. So metabolisiert die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Norepinephrin, einen Neurotransmitter mit Auswirkung auf den Blutdruck (Jordan et al. 2002). Dasselbe Enzym baut auch den Neurotransmitter Dopamin ab, wodurch ein Effekt auf die Neurotransmitterkonzentration im Gehirn ausgeübt wird. Ein Defekt dieser Methyltransferase, lokalisiert auf Chromosom 22, wird für die Entstehung einiger Schizophrenie-Formen diskutiert (Akil et al. 2003, Shifman et al. 2002). Der Zusammenhang zwischen der COMT und Dopamin legt einen Einsatz von Inhibitoren der COMT bei Parkinson-Erkrankten nahe, bei denen ein Dopaminmangel im Gehirn herrscht. 1999 wurden die ersten Studien von Rabasseda zu diesem Thema veröffentlicht, in denen ein Inhibitor der COMT, Entacapone, bei Dopaminmangel getestet wurde. Bei gleichzeitiger Gabe von Levodopa hemmt dieser Inhibitor die Methylierung und damit den Abbau des Arzneimittels. Die Wirkung von Levodopa wird verstärkt, und es konnte gezeigt werden, dass es nicht so

schnell zu einem Wirkverlust des Levodopa kam. Die Dosis des eingesetzten Levodopa konnte bei gleichbleibender Wirkung verringert werden.

Auch für Pflanzen spielen Methylierungen eine wichtige Rolle. Viele Naturstoffe wie Terpenoide und Alkaloide sind methylierte nicht-phenolische Inhaltsstoffe. Neben den nicht phenolischen Inhaltsstoffe, spielen die phenolischen Komponenten eine große Rolle in der Pflanze. So sind methylierte Phenylpropane und Flavonoide für die Entwicklung der Pflanze und ihr Wachstum nötig, Intermediate des Phenylpropanstoffwechsels wie Zimtsäure und ihre Derivate sind an der Verteidigung gegen Mikroorganismen beteiligt. Für methylierte Flavonoide sind viele Aufgabengebiete in den Pflanzen bekannt, so sind sie als Stimulatoren der Pollenreifung (Ylstra et al. 1992), gegen mikrobiellen Befall (Dakora et al. 1996, Akashi et al. 2003), als Signalmoleküle in der Pflanzen-Symbionten-Interaktion (Pueppke et al. 1998) und natürlich als UV-Schutz und Blütenfarbstoff für die Pflanze wichtig. Viele Vorstufen in der Lignan- und Lignin-Biosynthese sind methyliert. Bei der Lignin-Synthese sollen die Guaiacyl-Einheiten mit Hilfe von Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen (CCoAOMT) (Ye et al. 1994 und 2001), die Syringyl-Einheiten über eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase (COMT) gebildet werden (Atanassova et al. 1995). Von diesen meist multifunktionellen Enzymen werden die Vorstufen umgesetzt, wie in Kapitel 1.1.3. bereits erläutert wurde. Die Alkohole und Aldehyde der Kaffee- und Ferulasäure gehören zu den Substraten dieser Methyltransferasen (Li et al. 2000, Parvathi et al. 2001, Zubieta et al. 2002). Außerdem sind Methyltransferasen an der Bildung von Lock- und Duftstoffen wie Orcinol, Eugenol und Chavicol, methylierten Phenolderivaten, beteiligt (Wang et al. 1999, Lavid et al. 2002).

### **1.2.2. Benennung von *O*-Methyltransferase-Genen**

Auch wenn zwischen pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Enzymen nur 20–25 % Identität bei der Aminosäuresequenz besteht, gibt es einige wichtige Gemeinsamkeiten. Es wird durch die *O*-Methyltransferase immer eine Methylgruppe von einem Methylgruppendonor, meist *S*-Adenosylmethionin (SAM), auf die Hydroxy-Gruppe eines Akzeptormoleküls übertragen und dabei der demethylierte Donor, meist *S*-Adosylhomocystein (SAH), gebildet. Dabei unterscheiden sich die unterschiedlichen Methyltransferasen hinsichtlich der Spezifität und der Stereochemie der Akzeptormoleküle teilweise erheblich. Fast immer handelt es sich um cytosolische Enzyme, was die Arbeit mit ihnen erleichtert. Außerdem gibt es häufig eine Glycin-reiche Signatur von 36 Aminosäuren im letzten Drittel der Sequenz. Hier befinden sich auch weitere konservierte Regionen, die später noch näher erläutert werden.

Anhand dieser Gemeinsamkeiten werden die *O*-Methyltransferasen von der Commission of Plant Gene Nomenclature (CPGN), einer Organisation, die die formale Struktur von Pflanzengen-Namen festlegt, benannt. Jeder Name besteht aus drei Kürzeln, wobei das erste für die Species steht, aus der die Methyltransferase stammt, dabei wird die Benennung nach SwissProt benutzt. Das zweite Kürzel legt den Namen der Gen-Familie fest. Als drittes Kürzel

dient eine Nummer, die sich aus einer Nummer für die umgesetzte Stoffklasse (z.B. Flavonoide) und innerhalb dieser Untergruppen einer Nummer nach der Chronologie der Genbank-Einträge in EMBL zusammensetzt. Ein Beispiel (entommen aus: Ibrahim et al. 1998) soll diese Einteilung erläutern: Das Gen U16794, eine Flavonol *O*-Methyltransferase aus *Chrysosplenium americanum* hat den Namen: Chram.OmtB1.1. Nach der ersten Nennung muss die Pflanzenspecies nicht mehr mit angegeben werden, es verkürzt sich zu OmtB1. Ist das Gen induzierbar, hängt man ein „a“ für Induktion durch Mikroorganismen, ein „b“ für durch Umgebungsstress induzierte Gene und ein „c“ für abiotische und biotische Elicitoren an.

### 1.2.3. Einteilung der *O*-Methyltransferasen

Eine erste Einteilung pflanzlicher Methyltransferasen in zwei Gruppen wurde von Joshi und Chiang (1998) vorgenommen: in der ersten Gruppe finden sich Methyltransferasen mit einem Molekulargewicht von 23–27 kDa. Sie benötigen  $Mg^{2+}$ -Ionen und akzeptieren als Substrat nur Caffeoyl-CoA. In Zukunft könnten aber auch Methyltransferasen für andere Substrate in diese Gruppe eingeordnet werden. Die zweite Gruppe besteht aus magnesiumunabhängigen Methyltransferasen mit einem Molekulargewicht von 38–43 kDa. Außerdem können die *O*-Methyltransferasen nach ihren akzeptierten Substraten in vier Klassen und diese noch einmal in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden (Ibrahim et al. 1998 und die darin zitierte Literatur):

- Klasse A: Methylierung an Phenylpropanoid-Komponenten
  - 1 Kaffee-/5-OH-Ferulasäure
  - 2 CoA-Ester der Kaffee- und 5-OH-Ferulasäure
  - 3 Andere Phenylpropanoide
  - 4 Einfache Phenole und Phenolester
  - 5 Polyketide
- Klasse B: Methylierung von Flavonoiden
  - 1 Flavonole und Flavone
  - 2 Chalcone und Flavanone
  - 3 Pterocarpane und ihre Isoflavon-Vorstufen
  - 4 Flavane und Anthocyane
- Klasse C: Methylierung von Alkaloiden
  - 1 Benzylisochinolin-Alkaloide
  - 2 Morphin-Alkaloide
  - 3 Carboxymethylierung von Secologanin, Lysergsäure und anderen
- Klasse D: Methylierung aliphatischer Akzeptoren

Seit dem Beginn der Kristallisation von Methyltransferasen kommt eine neue Einteilung nach strukturellen Merkmalen auf. Schubert et al. (2003) unterscheiden in fünf unterschiedliche Klassen, wobei noch mehr Daten von anderen Methyltransferasen benötigt werden, um eine sichere Einteilung zu gewährleisten.

#### 1.2.4. Konservierte Regionen der Methyltransferasen

Nachdem einige Gene von Methyltransferasen in Internetdatenbanken zur Verfügung standen, haben verschiedene Arbeitsgruppen damit begonnen, diese zu vergleichen. Zu einem ersten Vergleich zogen Kagan et al. (1994) *O*-, *S*- und *N*-Methyltransferasen, aber auch SAM-Synthasen, -Decarboxylasen und SAH-Hydrolasen heran. Für diesen Vergleich wurden nur 6 pflanzliche Methyltransferasen aus 4 verschiedenen Substratgruppen, aber 84 Methyltransferasen aus Prokaryonten und Eukaryonten herangezogen. In diesen unterschiedlichen Genen konnten sie drei Sequenzmotive finden, die offensichtlich bei Methylierungsreaktionen eine Rolle spielen. Es wird eine gemeinsame Struktur vermutet, die mit der SAM-Bindung und der Übertragung der Methylgruppe in Zusammenhang gebracht wird. Da jedoch die verglichenen Gene aus Pflanzen, Bakterien und Tieren stammten, wundert es wenig, dass es bei diesen Motiven noch zu vielen Variationsmöglichkeiten kommt, weshalb die gemeinsamen Sequenzen nicht auf alle Methyltransferasen übertragen werden können. In der Tabelle 1 sind die konservierten Regionen von Kagan et al. (1994) gezeigt. Die Aminosäuren in Klammern zeigen die in unterschiedlichen Genen an dieser Stelle vorkommenden Aminosäuren. Die Analyse von 56 verschiedenen Methyltransferasen aus Pflanzen, die Joshi und Chiang (1998) durchführte, zeigt bei den hier gefundenen Konsensussequenzen eine höhere Übertragbarkeit der Motive. Hierfür wurden neben *O*-Methyltransferasen aus dem Flavonoid-, Alkaloid- und Ligninstoffwechsel auch *C*-Methyltransferasen der Phytosterolbiosynthese und eine Putrescin *N*-Methyltransferase in die Analyse mit einbezogen. Auch in dieser Arbeit konnten die drei konservierten Regionen gefunden werden, sie sind in dieser speziellen Gruppe ausgewählter Methyltransferasegene zueinander ähnlicher (bis zu 98 % konserviert bei maximal drei variablen Aminosäuren). Diese Regionen sind in Tabelle 1 mit denen von Kagan et al. (1994) verglichen. Das dritte Motiv von Kagan kann in den pflanzlichen Methyltransferasen nicht wieder gefunden werden und ist wohl nicht an der SAM-Bindestelle beteiligt. Interessanterweise stehen die Motive immer in einem festen Abstand zueinander. Sie werden deshalb mit der SAM-Bindung in Zusammenhang gebracht, da die Aminosäuren an der Bildung der sterisch festgelegten Substratbindetasche beteiligt sein könnten. Alle verglichenen Methyltransferasen ließen sich in zwei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe lagen 19 Aminosäuren zwischen Motiv A und Motiv B und 24 Aminosäuren zwischen B und C. In der zweiten Gruppe waren Motiv A und B durch 50 und Motiv B und C durch 30 Aminosäuren getrennt. Bei diesen Gruppen handelt es sich um eine Magnesiumionen-abhängige Gruppe von Methyltransferasen mit 231-248 Aminosäuren und eine große Gruppe von Methyltransferasen mit 344-383 Aminosäuren, die keine



Magnesiumionen als Cofaktor braucht. Diese Einteilung bestätigt die Einteilung von Joshi und Chiang (1998), wie sie bereits in Kapitel 1.2.3. gezeigt wurde.

Motiv	Kagan et al. (1994)	Joshi und Chiang (1998)
A	(L/I/V)(V/L)(E/D)(V/I)G(C/G)G(P/T)	(V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)GGXX(G/A)
B	(G/P)(T/Q)(A/Y/F)DA(Y/V/I)(I/F)(L/V/C)	(V/I/F)(A/P/E)X(A/P/G)DAXXXK(W/Y/F)
C		(A/P/G/S)(L/I/V)(A/P/G/S)XX(A/P/G/S)(K/R)(V/I)(E/I)(L/I/V)

Tab. 1: Vergleich der Methyltransferase-Sequenzmotive von Kagan et al. (1994) und Joshi und Chiang (1998).

Noch spezifischer werden die Aussagen zu konservierten Regionen, betrachtet man nur eine Gruppe von Methyltransferasen, wie es Ibrahim et al. (1998) in ihrer Arbeit über *O*-Methyltransferasen gemacht haben. Anhand von unterschiedlichen OMTs, die im Lignin-, Flavonoid-, Alkaloid- und Furanocumarinstoffwechsel vorkommen, wurde nach gemeinsamen Motiven gesucht. Auch hier konnten fünf Regionen mit großer Ähnlichkeit gefunden werden (92-100%). Diese Regionen liegen alle im letzten Drittel des Gens und sind reich an der Aminosäure Glycin, wie in Abbildung 8 zu sehen ist. Genauere Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei dem ersten und dem vierten Motiv um eine Bindestelle für SAM und eine Metallbindestelle handelt. Interessant ist, dass diese beiden Regionen auch in bakteriellen und tierischen Methyltransferasen konserviert sind, obwohl nur 20–25 % der Sequenzen passen. Bis zur ersten Kristallisation einer Methyltransferase mit gebundenem SAM und Substrat blieben die Aussagen zu Bindestellen aber noch ungenau. Anhand von Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei tatsächlich um die SAM-Bindestelle handelt. Außerdem konnten noch die Motive II, III und V als beteiligt an der SAM-Bindestelle identifiziert werden (Zubieta et al. 2001, Zubieta et al. 2002, Gang et al. 2002). Bei allen kristallisierten Methyltransferasen konnte dem Motiv IV keine Aufgabe zugeordnet werden. Das könnte daran liegen, dass alle bislang kristallisierten pflanzlichen *O*-Methyltransferasen nicht abhängig von zweiwertigen Ionen wie  $Mg^{2+}$  waren. Bei dem Motiv IV könnte es sich also um die Metallionenbindestelle handeln, die noch in den eigentlich magnesiumunabhängigen Methyltransferasen konserviert ist. Weitere Kristallstrukturen müssen noch zeigen, wie bei einer magnesiumabhängigen Methyltransferase dieser Cofaktor gebunden wird.

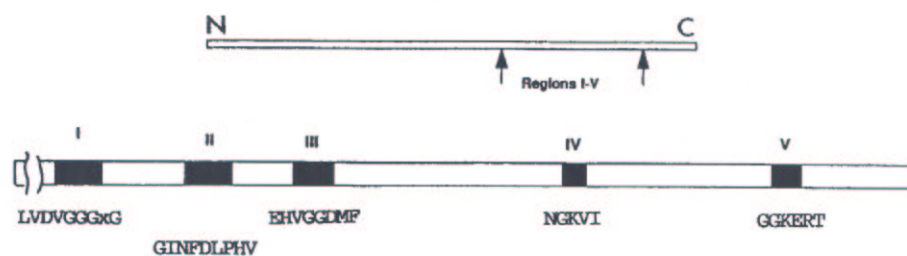


Abb. 8: Oben: Die relative Position der Konsensusmotive I-V auf Methyltransferasegenen. Unten: Sequenzen der fünf konservierten Regionen nach Ibrahim et al. (1998).

### 1.2.5. Kristallisationen von Methyltransferasen

Die erste kristallisierte Methyltransferase war die HhaI DNA-(Cytosin-5)- Methyltransferase mit gebundenem SAM. Erste Aminosäuren konnten der SAM-Bindetasche zugeordnet werden (Cheng et al. 1993). 1994 wurde die Catechol *O*-Methyltransferase der Ratte von Vidgren et al. kristallisiert und als Monomer beschrieben. Hier konnten mehrere Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung des SAM beteiligt sind, so zum Beispiel auch das von Joshi und Chiang (1998) postulierte Motiv A. Außerdem fanden sich Mg<sup>2+</sup>-Bindestellen und Hinweise auf die Substratbindetasche. Vergleiche mit anderen Methyltransferasen ähnlicher Aminosäuresequenz zeigten Ähnlichkeiten mit Caffeyl-CoA *O*-Methyltransferasen (CCoAOMT). Wie bereits beschrieben wurde, heben diese sich aber von den anderen Methyltransferasen ab, da sie kleiner sind und Magnesiumionen benötigen. Die Ergebnisse sind daher weniger gut auf andere pflanzliche Methyltransferasen übertragbar. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in Vergleichen mit der CCoAOMT aus *Zinnia elegans* nur 33 % der an der SAM-Bindung beteiligten Aminosäuren zugeordnet werden konnten (Ye et al. 1994). Erst die Kristallisation der ersten pflanzlichen Methyltransferasen brachte 1992 und 1996 neue Erkenntnisse über die unterschiedlichen konservierten Regionen und ihre Aufgaben. Zunächst konnten die Strukturen der Chalcon *O*-Methyltransferase und der Isoflavon *O*-Methyltransferase aus *Medicago sativa* aufgeklärt werden (Maxwell et al. 1992, He et al. 1996, Zubieta et al. 2001). Ebenfalls aus *Medicago sativa* wurde ein Jahr später die Struktur der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase durch Kristallisation aufgeklärt, der eine wichtige Rolle bei der Lignin-Synthese zukommt (Zubieta et al. 2002). Dabei handelt es sich um ein Enzym von 43 kDa Masse, das ein breites Spektrum an Substraten umsetzen kann. Dazu gehören Kaffeesäure, 5-Hydroxyferulasäure, Caffeyl-Aldehyd, 5-Hydroxyconiferylaldehyd, Caffeyl-Alkohol und 5-Hydroxyconiferylalkohol. Nach der Kristallisation kann gesagt werden, dass es sich bei diesem Enzym um ein Dimer handelt, bei dem eine kleine N-terminale Domäne die Bindung der Dimere bewirkt und eine größere C-terminale Domäne für die Bindung der Substrate und des SAM verantwortlich ist. Die Abbildung 9 zeigt die Kristallstruktur dieses Enzyms mit gebundenem 5-Hydroxyconiferylaldehyd als Substrat und SAM als Methylgruppendonor.

Das  $\beta$ -Faltblatt-Motiv am C-Terminus, das auch „ $\alpha/\beta$ -Rossmann fold“ genannt wird (Schubert et al. 2003), ist in allen SAM-bindenden Methyltransferasen zu finden und bildet ein stabiles Gerüst an der Rückseite der Methyltransferase. Die Bindung phenolischer Substrate findet auch am C-Terminus statt, wobei beide Monomere beteiligt sind. Das zweite Monomer verengt die aktive Tasche. Der N-Terminus begünstigt die Dimerisierung durch Ausbildung von van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen der beiden  $\alpha$ -Helices der Monomere. Dadurch wird die Rückseite der Bindetaschen gebildet und ein lösungsmittelfreies Milieu für die Reaktion geschaffen. Für die Bindung von SAM in den Bindetaschen konnten einige Aminosäuren bestimmt werden, die in den meisten

Methyltransferasen hoch konserviert sind, wie zum Beispiel Lys-265, Asp-206 und Asp-231. Auch für die Bindung des phenolischen Substrates konnten Aminosäuren zugeordnet werden, die das Substrat für die anschließende Methylgruppenübertragung fixieren. Diese sind zum Beispiel Phe-176, Met-130 und His-166. Anders als bei den zuvor kristallisierten Methyltransferasen wurde hier eine geräumige Bindetasche gefunden, was den Umsatz der verschiedenen Substrate erklärt.

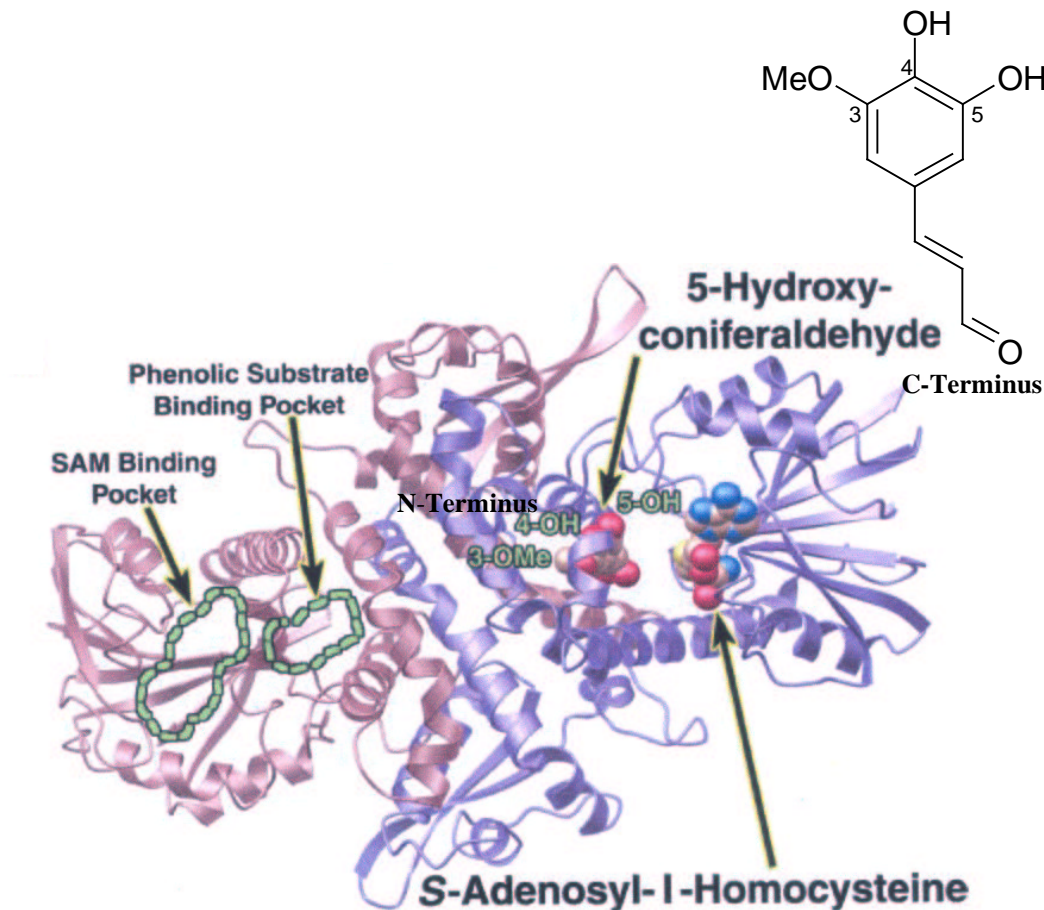


Abb. 9: Kristallstruktur der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-O-Methyltransferase. Die beiden Monomere sind blau bzw. rot dargestellt. Auf der linken Seite ist die Lage der Bindetaschen für die Reaktionspartner gezeigt, auf der rechten Seite sind die Van-der-Waals-Modelle der Substrate in den Bindetaschen des Enzyms gezeigt (aus Zubieta et al. 2002).

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Cytotoxische Lignane wie Podophyllotoxin sind Vorstufen für in der Krebstherapie wichtige Medikamente oder haben das Potential dazu. Um semisynthetische Derivate von ihnen herzustellen, benötigt man große Mengen an den Pflanzeninhaltsstoffen. Zellkultursysteme könnten zur Gewinnung der gewünschten Lignane genutzt werden. Darüber hinaus können Zellkulturen als Systeme zur Untersuchung von Biosynthesewegen nützlich sein, da durch sie ständig Pflanzenmaterial für biochemische und molekularbiologische Experimente zur Verfügung steht.

In dieser Arbeit soll versucht werden, den Syntheseweg der cytotoxischen Lignane weiter aufzuklären. Gerade über den späten Syntheseweg der Lignane vom Aryltetralintyp ab dem Desoxypodophyllotoxin ist noch wenig bekannt. Die Umsetzung von Desoxypodophyllotoxin zu  $\beta$ -Peltatin konnte erstmals von Molog et al. (2001) gezeigt und das dazugehörige Enzym beschrieben werden (Molog et al. 2001, Kuhlmann et al. 2001 und Kuhlmann 2003). Um den Umsatz von  $\beta$ -Peltatin zu dem entsprechenden Methylether zu zeigen, muss das Enzym nachgewiesen und ein Testsystem dafür etabliert werden. Dieses Enzym soll charakterisiert und gereinigt werden. In einem molekularbiologischen Ansatz wird dann versucht, die für dieses Enzym codierende cDNA zu ermitteln. Die erhaltene Sequenz ist mit anderen Methyltransferasesequenzen zu vergleichen.

Eine Kulturcharakterisierung von Zellkulturen von *Linum nodiflorum* über einen längeren Zeitraum kann wichtige Informationen über die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in der Suspensionskultur liefern. Neben den üblichen Parametern wie Ionen- und Zuckergehalt, soll hierbei vor allem auf die Akkumulation der verschiedenen Lignane in den Zellen und im Medium geachtet werden. Aus den Ergebnissen können dann Aussagen über die Anreicherung der Lignane und damit über eine mögliche wirtschaftliche Nutzung der Kultur getroffen werden.

In einem Fütterungsversuch soll über das Zufüttern einer möglichen  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorstufe der Lignanbiosynthese, Methylendioxyzimtsäure, der Einbau in Lignane gemessen und daraus Rückschlüsse über den späten Syntheseweg gezogen werden. Das Wissen über den genauen Syntheseweg und die daran beteiligten Enzyme könnte man nutzen, um größere Mengen an Lignanen zu produzieren, die dann semisynthetisch verändert werden könnten. Der Weg zu neuen Arzneimitteln stünde damit offen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkulturen

#### 2.1.1. Kultivierung von Suspensionskulturen

Als Untersuchungsgrundlage standen Zellen von verschiedenen *Linum*-Arten als Suspensionskultur zur Verfügung. Die Kulturen wurden einmal in der Woche unter der Sterilbank in frisches MS-Li-Medium überimpft. Dazu wurden 5 g Zellen mit einem perforierten Impflöffel steril in 50 ml Medium überführt. Nach dem Umsetzen wurde die Kultur im Tageslicht und zusätzlich 24 Stunden mit weißem Licht durch handelsübliche Leuchtstoffröhren beleuchtet und bei 26 °C kultiviert. Zur Versorgung der Zellen mit O<sub>2</sub> wurden die Kulturen mit 150 UpM geschüttelt.

#### MS-Li-Medium

40 ml	MS-Makroelemente (25x)
10 ml	MS-Mikroelemente (100x)
100 mg	myo-Inosit
30 g	Saccharose
2 ml	NAA-Lösung (20 mg/100 ml)
1 ml	Vitamin-Lösung
1 ml	Glycin-Lösung (200 mg/100 ml)
auf 1000 ml	demineralisiertes Wasser

Mit 0,5 N KOH wird das Medium auf pH 5,8 eingestellt.

#### MS-Makroelemente (25x)

KNO <sub>3</sub>	190 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	37 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	17 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	44 g/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165 g/l

Diese Lösung wird nach der Zubereitung autoklaviert.

### MS-Mikroelemente (100x)

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620,00 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	860,00 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1690,00 mg/l
KI	83,00 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	25,00 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2,50 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,50 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,78 g/l
Na <sub>2</sub> x EDTA	3,37 g/l

### **Vitamin-Lösung**

Thiamindichlorid	100 mg/100 ml
Pyridoxin x HCl	500 mg/100 ml
Nicotinsäure	500 mg/100 ml

### **2.1.2. Elicitierung mit Methyljasmonat**

Bei Kontakt von Pflanzen mit UV-Licht, Fraßfeinden oder Bakterien, können sehr schnell große Mengen an Schutzstoffen produziert werden. Die dazu benötigten Enzyme zeigen nach Exposition mit einem möglichen Pathogen eine sehr hohe spezifische Aktivität. Dieser Effekt kann auch in Zellkulturen durch Fütterung sogenannter Elicitoren beobachtet werden. Um zu testen, ob auch die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase auf diese Weise anregbar ist, wurde ein Versuch mit Methyljasmonat (MJ) durchgeführt. Am sechsten Kulturtag wurde den Suspensionskulturen MJ in verschiedenen Konzentrationen oder Lösungsmittel als Kontrolle gefüttert. Nach 24 Stunden wurden diese Kolben geerntet und die spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in den Zellen bestimmt. Ein unbehandelter Kolben wurde als Kontrolle und Nullwert getestet. Daneben wurde eine Probe mit 28,6  $\mu$ l sterilfiltriertem Ethanol, eine mit 28,6  $\mu$ l 87,5 mM Methyljasmonat (= 50  $\mu$ M) und eine mit 28,6  $\mu$ l 175 mM MJ (= 100  $\mu$ M) untersucht.

## **2.2. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.1. Aufarbeitung der Pflanzenzellen**

Zellen von *Linum* -Arten wurden für sieben Tage bei 26 °C Raumtemperatur und permanenter Lichteinstrahlung auf dem Schüttler in MS-Li-Medium kultiviert. Nach dieser Zeit wurden sie mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe über einen Büchnertrichter mit Filterpapier abgenutscht. Danach wurde auf zwei verschiedene Weisen mit dem halbtrockenen Zellkuchen verfahren. Entweder konnte er direkt verarbeitet oder mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen wurde mit den gefrorenen Zellen wie mit frischen weitergearbeitet. Zu den trockengesaugten Zellen wurde 1/10 des Zellgewichts an Polyclar 10 gegeben. Dies soll phenolische Substanzen binden und damit die Aktivität proteininaktivierender Phenolasen unterbinden. Dann wurde alles mit einem dem Gewicht der Zellen entsprechenden Volumen Puffer versetzt. Es handelte sich um einen 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, der zum Schutz der SH-Gruppen der Enzyme 1 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt. Als Reduktionsmittel wirkt DTT dabei der Bildung von Disulfidbrücken entgegen. Das Gemisch wurde auf Eis gekühlt und mit dem Ultraturrax, einem Schlagmesserhomogenisator, viermal je 30 Sekunden zerkleinert, wobei nach jedem Zerkleinerungsschritt 30 Sekunden auf Eis gekühlt wurde. Zum Abtrennen der festen Zellbestandteile wurde der Ansatz dann für 20 Minuten in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge bei 10000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der flüssige Überstand bildete den Rohextrakt (RE), mit dem bereits Enzymtests durchgeführt werden konnten.

### **2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben wurde die Methode nach Bradford (1976) benutzt. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 im sauren Milieu an die Proteine gebunden wird. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nach 595 nm. Bei dieser Wellenlänge kann man nun die Absorption der Proben messen. Vergleicht man sie mit einem Standard aus bovinem Serumalbumin (BSA), eingestellt auf 1 mg/ml Protein, und einer Referenz mit Wasser statt Proteinlösung, so kann man die Proteinkonzentration errechnen.

Das Bradford-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen:

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G 250
50 ml	96% Ethanol
100 ml	85% o-Phosphorsäure
850 ml	dest. Wasser

Dieser Ansatz muss zum Entfernen der Schwebeteilchen zweimal filtriert werden.

Der Ansatz zur Bestimmung der Proteinkonzentration setzt sich wie folgt zusammen:

- 10 µl Puffer als Referenz (meist 0,1 M Tris-HCl pH 7,5)
- oder 10 µl BSA-Standard 1 mg/ml
- oder 10 µl Rohextrakt (auch verdünnt möglich)
- 2 ml Bradford-Reagenz

Diese Ansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend bei 595 nm gegen die Referenz im Photometer vermessen.

### 2.2.3. HPLC-Analytik

Die resuspendierten und bei 16100 g zentrifugierten Proben des Enzymtests (2.2.6.) wurden über eine HyPurity Elite C18 Säule, 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5µ, in der HPLC-Anlage (High Pressure Liquid Chromatography, Kontron Instruments) analysiert. Bei der Säule handelt es sich um eine Reversed Phase C18-Säule mit einer 2 cm langen Vorsäule. Das System nennt sich Reversed Phase, da an das polare SiO<sub>2</sub> der ursprünglichen Säulenoberfläche ein C18-Schwanz gehängt wurde, der unpolar ist. Somit wurde die Oberfläche von polar zu unpolar geändert. Mit einem polaren Fließmittel können nun Stoffe voneinander getrennt werden. Es wurde ein isokratisches System mit einem Fluss von 1,25 ml/min benutzt. Als mobile Phase kamen Laufmittel mit 30–50 % wässrigem Acetonitril (v/v), abhängig von der Trennbarkeit der zu detektierenden Substanzen, zum Einsatz. Das Fließmittel wurde gemischt und vor dem Lauf im Ultraschallbad entgast. Die Laufzeit betrug je nach Fließmittel 10 bis 60 Minuten, als Standard wurden Lignane in Konzentrationen von 0,1 mM verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Um sicherzugehen, dass bei dieser Wellenlänge auch wirklich der β-Peltatin 6-O-Methylether erfasst wird, wurde zuvor ein Spektrum dieser Verbindung, gelöst in 40 % Acetonitril im Bereich von 200 bis 400 nm mit dem Spektralphotometer aufgenommen.

Als Referenzsubstanzen standen folgende Lignane zur Verfügung:

Coniferylalkohol	Fluka, Buchs, Schweiz
4'-Demethylpodophyllotoxin	Silva, Univ. Salamanca, Spanien
Desoxypodophyllotoxin	Arbeitsgruppe Pras, Univ. Groningen, Niederlande
7-Hydroxymatairesinol	Eckermann, Abo-Akademie, Finnland
Matairesinol	Medarde, Univ. Salamanca, Spanien
β-Peltatin	Medarde, Univ. Salamanca, Spanien
β-Peltatin-A Methylether	Medarde, Univ. Salamanca, Spanien
D-Pinoresinol	Heller, GSF, Oberschleißheim
	Lewis, Washington State Univ., Pullman, USA
(-)-Podophyllotoxin	Roth, Karlsruhe



Secoisolariciresinol	Spiteller, Univ. Bayreuth Metzler, Univ. Karlsruhe Medarde, Univ. Salamanca, Spanien
Yatein	Medarde, Univ. Salamanca, Spanien

#### 2.2.4. Überprüfung verschiedener Zellkulturlinien auf $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase-Aktivität

Bevor mit den eigentlichen Tests zur Charakterisierung der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase (POMT) begonnen werden konnte, musste zunächst eine geeignete Zelllinie von *Linum spec.* gefunden werden. Da sich die einzelnen Suspensionskulturen in der Art und Menge der gebildeten Lignane stark unterscheiden, ist es verständlich, dass auch das Vorkommen bzw. die Aktivität der an der Bildung der Lignane beteiligten Enzyme schwankt. Von jeder zur Verfügung stehenden Suspensionskultur wurden 5 g Zellen aufgearbeitet und dem in Kapitel 2.1.7. beschriebenen Test auf Methyltransferasen unterzogen. Auf diese Weise konnten alle Linien gut miteinander verglichen werden. Als Kulturen wurden dazu benutzt: *Linum nodiflorum* grün, *Linum nodiflorum* braun, *Linum nodiflorum* braun im Dunkeln kultiviert, *Linum album* und *Linum album* X4 (eine Variation mit kleineren Zellaggregaten als *Lin. alb.*), *Linum catharticum*, *Linum sulcatum* SL, drei Linien von *Linum africanum* (SL1, SD2K und SD1K), *Linum marginale* SD3 und *Linum flavum*. Die Kultur von *Linum flavum* wurde am siebten und am 14. Kulturtag geerntet, weil sie als einzige einen zweiwöchigen Überimpfrhythmus hat. Die Auswertung erfolgte wieder über HPLC.

#### 2.2.5. NMR-Analytik

Um zu beweisen, dass es sich bei dem Umsetzungsprodukt der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase tatsächlich um die in der HPLC als  $\beta$ -Peltatin-A Methylether (PAM) identifizierte Substanz handelt, wurden hiermit weitere analytische Tests durchgeführt. Die rückgelösten eingedampften Extrakte einiger Enzymtests wurden hierzu vereinigt und gegen 0,1 mM PAM als Standard auf eine semipräparative HPLC-Säule gegeben. Als Säule wurde eine Hypersil ODS Säule (250 x 8,0 mm, Partikelgröße 5 $\mu$ , mit 4 cm Vorsäule) benutzt, als mobile Phase diente hierbei 30% Methanol. Der Fluss betrug 4 ml/min, die Detektionswellenlänge betrug 280 nm. Der  $\beta$ -Peltatin-A Methylether wurde mit Hilfe des Standards identifiziert und gesammelt. Nach Eindampfen der gesammelten Fraktionen wurde die weiße Substanz zur weiteren Reinigung in Methanol p.a. wieder aufgenommen und erneut eingetrocknet. Nun konnten die entstandenen kleinen Nadeln über NMR auf ihre Identität getestet werden. Die Kernresonanzspektren wurden bei einer Messfrequenz von 500 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) oder 125 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) bei 25 °C aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und auf den internen Tetramethylsilan-Standard bezogen. Die

Substanz wurde für die Messung in  $\text{CDCl}_3$  gelöst und von Dr. Mike Needham (De Montford University, Leicester, UK) mit dem Bruker 400 Ultra Shield™ vermessen.

### 2.2.6. Standardenzymtest und Abwandlungen

Da die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase ein noch unbekanntes Enzym war, musste der Enzymtest dazu noch entwickelt werden. Dies geschah unter Einbeziehung anderer Enzymtests bekannter Methyltransferasen. Fast alle bekannten Methyltransferasen beziehen die einzubauende Methylgruppe aus S-Adenosylmethionin (SAM). Also wurde dies dem Test zugesetzt. Außer dem zu methylierenden Substrat wurde nur noch Puffer und Enzymlösung verwendet, da es keine einheitlichen Aussagen zu nötigen Cofaktoren gab. Für die unterschiedlichen Charakterisierungsversuche, wie die Bestimmung des optimalen pH-Wertes, einer Zeitreihe, der Proteinkonzentration und der besten Inkubationstemperatur, wurde der jeweils zu bestimmende Parameter verändert, ansonsten aber der unten beschriebene Standardtest durchgeführt. Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte für  $\beta$ -Peltatin und SAM wurden die Proben nur 30 Minuten bei 38 °C inkubiert. Um bei der Suche nach dem pH-Optimum die Pufferkapazität des Rohextraktes möglichst gering zu halten, wurde für den Zellaufschluss abweichend von der Standardmethode ein 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 verwendet. In den einzelnen Testansätzen wurde dann der pH-Wert mit 1 M Tris-HCl-Puffer mit je nach Ansatz unterschiedlichem pH erreicht. Um den genauen Wert in jeder einzelnen Probe zu kennen, wurde mittels einer kleinen pH-Elektrode der pH-Wert noch einmal im Versuchsansatz auf dem Wasserbad bei 38 °C bestimmt. Dieses Vorgehen ist bei Tris-HCl-Puffer sehr wichtig, da es sich hierbei um ein stark temperaturabhängiges Puffersystem handelt.

Der Standardenzymtest enthielt:

50,0 $\mu\text{l}$	1 mM SAM
37,5 $\mu\text{l}$	1 mM $\beta$ -Peltatin
100,0 $\mu\text{l}$	Proteinrohextrakt (meist eingestellt auf 1 mg/ml Protein)
62,5 $\mu\text{l}$	0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5

Die Ansätze wurden auf dem Wasserbad bei 38 °C für 1-2 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie mit 50  $\mu\text{l}$  6 N HCl abgestoppt und dreimal mit je 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat ausgeschüttelt. Die gesammelten Ethylacetatfraktionen trockneten im Exsiccator unter Vakuum. Anschließend wurden die Rückstände mit 50  $\mu\text{l}$  50 % Methanol resuspendiert und mittels HPLC-Analytik untersucht.

#### 2.2.6.1. Substratspezifität

Im Stoffwechselweg der Lignane gibt es mehrere *O*-Methylierungsreaktionen. Es ist interessant zu sehen, inwieweit das Enzym andere Lignane als Substrat umsetzen kann. Da

nicht alle in Frage kommenden Substanzen verfügbar waren, wurde der Test auf Spezifität auf folgende Substrate beschränkt:  $\beta$ -Peltatin, (-)-Matairesinol, 7-Hydroxymatairesinol, (+)-Pinoresinol, Podophyllotoxin, 6-Methoxypodophyllotoxin, 4'-Demethoxypodophyllotoxin, Hydrokaffeesäure, Kaffeesäure, Kaffeesäuremethylester, Caffeoyl-CoA, Ferulasäure, Feruloyl-CoA, 4-Cumarsäure, Cumaroyl-CoA, Coniferylalkohol, Protocatechin-aldehyd und Daphnetin. Mit allen Substanzen wurde der gleiche Testansatz mit gleichen Konzentrationen und unter gleichen Inkubationsbedingungen wie bei  $\beta$ -Peltatin durchgeführt. Da einige Methyltransferasen abhängig von zweiwertigen Ionen wie  $Mg^{2+}$  sind, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurde dem Enzymtest 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 zugesetzt, im zweiten Fall der gleiche Puffer mit Zusatz von 0,1 M  $MgCl_2$ . Da nicht zu allen getesteten Substanzen HPLC-Standards zur Verfügung standen, wurde dieser Test mit radioaktiv markiertem SAM durchgeführt. Es wurde [Methyl- $^{14}C$ ]-S-Adenosyl-L-methionin der Firma Hartmann Analytic benutzt, in 500  $\mu$ l sind 370 kBq oder 10  $\mu$ Ci enthalten.

Der Enzymtest enthielt:

5 $\mu$ l	10 mM Substrat
100 $\mu$ l	Enzymextrakt
50 $\mu$ l	50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, mit oder ohne 1mM $MgCl_2$
1 $\mu$ l	$^{14}C$ -markiertes SAM (740 Bq)

Dieser Ansatz wurde bei 30 °C für zwei Stunden inkubiert, bevor er mit 400  $\mu$ l Ethylacetat ausgeschüttelt wurde. Nach dem Zentrifugieren bei 16100 g für fünf Minuten wurden 200  $\mu$ l der Ethylacetatphase in 5 ml Rotiszint<sup>®</sup> eco plus für hydrophobe Proben gegeben und über eine Zählzeit von fünf Minuten im 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter ausgewertet.

#### 2.2.6.2. Hemmstoffe und Cofaktoren

Um mögliche Cofaktoren zu ermitteln, wurden dem Enzymtest verschiedene Substanzen zugesetzt. Außerdem konnten so potenzielle Hemmstoffe der Enzymreaktion festgestellt werden. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 0,1; 1 und 10 mM im Test eingesetzt. Bei den beiden vermuteten Hemmstoffen DTT und  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden außerdem noch die Konzentrationen 0,5 und 5 mM, bei Zinksulfat, Natriumchlorid und Natriumsulfat zusätzlich noch 0,05 mM getestet. Ethanol und Methanol als gängige Lösungsmittel wurden bis zu Endkonzentrationen von 50 und 100 mM zusätzlich getestet. Es wurden untersucht: Calciumchlorid, DTT, EDTA, Eisen(III)chlorid, Eisen(II)sulfat, Ethanol, Kupfersulfat, Magnesiumchlorid, Mangansulfat, Natriumchlorid, Natriumsulfat, Methanol,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Zinksulfat.

### **2.2.6.3. Hemmung durch S-Adenosylhomocystein (SAH)**

SAM als Methylgruppendonor wird bei der Reaktion in SAH umgewandelt. Es ist daher von Interesse, einen möglichen Einfluss von SAH auf die Methylierung von  $\beta$ -Peltatin zu ermitteln. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von SAH zu dem normalen Enzymtest zugegeben und der Umsatz zu  $\beta$ -Peltatin-A Methylether erfasst. Außerdem wurde versucht, aus den erhaltenen Daten einen Hinweis auf die Art der Hemmung zu erhalten. Da SAM an das Enzym binden kann, ist eine kompetitive Hemmung denkbar, bei der das inaktive SAH das aktive Zentrum am Enzym blockiert und somit die Umsetzung hemmt. Dieser Effekt ist durch Zugabe höherer Konzentrationen an Substrat wieder aufhebbar.

### **2.2.6.4. Stabilität der Enzymaktivität beim Einfrieren**

Um eine Aussage über die Einfrierbarkeit über einen längeren Zeitraum treffen zu können, wurden Aliquots des Rohextrakts über 25 Wochen eingefroren. Dabei wurden sie für die einzelnen Tests bereits vorportioniert, um den Einfluss mehrmaliger Auftauvorgänge und des Einfrierens auf die spezifische Enzymaktivität bei den Proben auszuschalten. Zusätzlich wurde bei diesem Einfriertest noch nach einem Unterschied zwischen der Gefriertemperatur  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gefrierfach) und  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Laborgefriertruhe) und nach einem möglichen Einfluss von 10 % Glycerinzugabe im Rohextrakt auf den Aktivitätsverlust während des Gefrierens gesucht. Dazu wurden Doppelproben von Rohenzym in allen vier möglichen Kombinationen getestet. Die untersuchten Einfrierzeiträume waren: 0, 2, 4, 6, 8, 12 und 25 Wochen.

Um zu testen, wie resistent das Enzym gegen mehrmaliges Auftauen und Einfrieren ist, wurde ein Test dazu durchgeführt. Es wurde frischer Rohextrakt bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  und ohne Zugabe von Glycerin eingefroren und direkt oder nach bis zu 11-maligem Auftauen dem Standardenzymtest unterzogen.

## **2.3. Reinigung der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase**

### **2.3.1. Reinigungsschritte ohne HPLC**

Da in dem aufgearbeiteten Enzymrohextrakt viele verschiedene Proteine vorhanden sind, ist eine Aufreinigung für weitergehende Versuche mit der Methyltransferase vorteilhaft. Neben den unten beschriebenen säulenchromatographischen Methoden wurde auch versucht, das Enzym durch Fällung mit verschiedenen Chemikalien anzureichern.

#### **2.3.1.1. Fällung mit Ammoniumsulfat**

Die am häufigsten verwendete Fällungsmethode ist die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat. In Versuchen wurde ermittelt, in welchen Fraktionen die gesuchte Methyltransferase aktiv ist. Dazu wurden Schritte von jeweils 20 % Ammoniumsulfatsättigung mit den dazugehörigen Sedimenten und Überständen getestet.

Später wurde in einer ersten Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung tropfenweise unter Rühren bis zu einer Endkonzentration von 40 % Sättigung gefällt. Der gesamte Prozess musste auf Eis durchgeführt werden, um einen proteolytischen Abbau der Enzyme weitestgehend zu vermeiden. Nach der Ammoniumsulfatzugabe wurde der Ansatz noch 30-40 Minuten auf Eis gerührt, um eine Durchmischung und Verteilung des Salzes zu gewährleisten. Dann wurde das ausgefällte Protein durch Zentrifugieren bei 4 °C für 20 Minuten bei 20000 g gesammelt. Der feste Rückstand wurde verworfen, und der Überstand bis zu einer Sättigungskonzentration von 80 % weiter mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30–40 Minuten auf Eis gerührt und anschließend zentrifugiert wie oben. Nach diesem zweiten Fällungsschritt wurde der Überstand verworfen und das Sediment aus gefällttem Protein weiterverarbeitet. Es wurde in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gelöst, so dass ein Gesamtvolumen von 2,5 ml entstand. Diese Lösung wurde zum Abtrennen überschüssigen Ammoniumsulfats über eine mit Puffer äquilibrierte PD10-Sephadex<sup>®</sup>-Säule gegeben. Mit 3,2 ml Puffer wurde das Protein von der Säule eluiert.

#### **2.3.1.2. Fällung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln**

Alle hier aufgeführten Fällungen wurden mit den Konzentrationen 15 %, 30 %, 45 % und 60 % Lösungsmittel durchgeführt, wobei das Lösungsmittel tiefgekühlt zum Enzymextrakt getropft wurde. Während der Zugabe wurde der Ansatz auf Eis ständig gerührt, um eine lokal höhere Konzentration an Lösungsmittel zu verhindern. Nach jedem Schritt der Zugabe wurde für 10 Minuten bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Sowohl die erhaltenen Sedimente als auch die Überstände wurden auf Aktivität getestet, wobei die Sedimente in 500 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert wurden. Auf diese Weise wurden Ethanol, Methanol und Aceton untersucht. Da zu Beginn der Tests kein Einfluss der Lösungsmittel auf die Enzymaktivität festgestellt werden konnte, mit Ausnahme von Aceton, welches aber durch Umpuffern über PD-10-Säulen nicht aus dem Ansatz hätte entfernt werden können, wurden die einzelnen Proben nicht umgepuffert, sondern die Lösungsmittelzusätze in den Enzymtests toleriert.

#### **2.3.1.3. Fällung mit Polyethylenglykol**

Für die Fällung mit Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000) nach einer Anleitung von Johnson et al. (1997) wurde eine 50-prozentige Stammlösung hergestellt, mit der im Rohextrakt Konzentrationen von 5, 10, 15 und 20 % PEG 8000 eingestellt wurden. Direkt nach der PEG-Zugabe wurde bei 4 °C mit 12000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der PEG Stammlösung weiter behandelt, das Sediment in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert. In einem Enzymtest wurden alle erhaltenen Fraktionen auf Aktivität getestet.

#### **2.3.1.4. Fällung mit Protaminsulfat**

Das Prinzip dieser Methode zur Aufkonzentrierung ist die Ausfällung von freien Nukleinsäuren. Da an ihnen auch Proteine hängen können, kann bei manchen Proteinen ein

Aufreinigungseffekt beobachtet werden. Unter Umständen kann man dabei das gewünschte Protein aufkonzentrieren. Mit einer 4-prozentigen Stammlösung von Protaminsulfat in Wasser wurde durch langsames Zutropfen eine Konzentration von 0,1 % eingestellt. Dieser Ansatz wurde für fünf Minuten auf Eis gerührt, bevor er bei 10000 g fünf Minuten zentrifugiert wurde. Obwohl im Überstand die Proteine angereichert werden sollten, wurde auch das Sediment in 500 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert und auf Methyltransferaseaktivität getestet.

#### **2.3.1.5. Fällung über den pH-Wert**

Diese Fällung wurde in zwei Ansätzen durchgeführt, wobei im ersten Ansatz ein 0,1 M Tris-HCl-Aufschlusspuffer mit pH 7,5 und im zweiten ein Aufschlusspuffer mit pH 9 benutzt wurde. Bei dem 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 kann der pH mit NaOH verändert werden. Es wurden so die pH-Werte 7,88; 8,41; 8,82; 9,43 und 10,37 eingestellt. Da sich keine Sedimente abzentrifugieren ließen, wurden Aliquots der erhaltenen Lösungen getestet. Alle pH-Werte wurden mit einer pH-Elektrode direkt im Reaktionsgefäß bei der Inkubationstemperatur von 38 °C gemessen. Nach dem Aufschluss in 1 M Tris-HCl-Puffer pH 9 wurde der pH-Wert mit HCl verändert. Es wurden die pH-Werte direkt im Ansatz gemessen. So getestet wurden 9,5; 9,06; 7,89 und 6,64. Auch bei diesem Versuch konnten keine Sedimente abzentrifugiert werden. Wieder wurden die Lösungen auf Enzymaktivität getestet.

#### **2.3.1.6. Reinigung über Farbsäulen**

Für die Aufreinigung über Säulen ohne FPLC-Anlage stand ein Sigma Affinity Set zur Verfügung. Bei allen getesteten Säulen wurde zuerst mit 45 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 äquilibriert und dann 5 ml Proteinextrakt auf die jeweilige Säule gegeben. Nach dem Einsickern der Proteinlösung wurde die Säule mit 30 ml Puffer nachgewaschen. Mit 30 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 1,5 M Ammoniumsulfat wurden die Proteine wieder von dem Säulenmaterial abgelöst. Vor der Lagerung in 0,2 % Natriumazid bei 4 °C wurden die Säulen noch mit Wasser gespült. Während des Laufes wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt und auf Enzymaktivität getestet. Bei den Säulenmaterialien handelt es sich um an Agarose gekoppelte Farbstoffmoleküle mit Ähnlichkeiten zu möglichen Cofaktoren. Nach dieser Anleitung wurden folgende Säulenmaterialien getestet:

Reactive Yellow 3 Agarose R-3757

Reactive Yellow 86 Agarose R-2382

Reactive Red 120 Agarose R-0503

Reactive Brown 10 Agarose R-2757

Reactive Green 5 Agarose R-2257

Reactive Green 19 Agarose R-2882

Reactive Blue 4 Agarose R-2507

Cibacron Blue 36 A Agarose Typ 3000-Cl C-1535

Reactive Blue 72 Agarose R-2632

### **2.3.1.7. Chromatographie mit Phenylsepharose**

Dem Trennmaterial Phenylsepharose 4-CL (Pharmacia) liegt als Trennprinzip eine hydrophobe Interaktion der zu trennenden Proteine mit dem Material zugrunde. Mit abnehmender Ionenstärke, herbeigeführt durch einen stufenweise absteigenden Salzgradienten, können die Proteine voneinander getrennt von der Phenylsepharose gelöst werden. Diese Chromatographie wurde über einen Büchnertrichter durchgeführt. Der Proteinextrakt wurde mit eingestellter Ammoniumsulfatlösung vorsichtig auf einen Salzgehalt von 1,3 M titriert. Dabei wurde der Ansatz auf Eis gerührt, um zu starke lokale Konzentrationen und Ausfällungen zu vermeiden. Das Trennmaterial wurde gut mit Wasser gewaschen und in

0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert. Da 100 ml Phenylsepharose 1,5 g Protein binden können, wurde zuerst der Proteingehalt des Rohextraktes mit dem bereits beschriebenen Test nach Bradford bestimmt und anschließend beide Komponenten in entsprechenden Volumina bzw. Mengen über Nacht auf Eis geschüttelt. Für den Lauf wurde ein Textilfilter auf einen Büchnertrichter gelegt, worüber dann der Ansatz geschüttet wurde. Darüber wurde ein zweiter Filter gelegt, um ein Wegspülen des Materials beim Waschen zu verhindern. Nun wurde mit jeweils 10 ml Puffer mit stufenweise absteigendem Ammoniumsulfatgehalt gespült. Dabei wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt und wie bisher beschrieben getestet. Als Puffer wurde ein 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 1,3 M, 0,8 M, 0,5 M, 0,25 M, 0,1 M und 0 M Ammoniumsulfat benutzt.

### **2.3.1.8. Natives Polyacrylamid-Gel**

Die Herstellung des Gels erfolgte wie unter 2.3.3. beschrieben. Da aber das Detergens Natriumdodecylsulfat die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase hemmen könnte, indem sie das Protein denaturiert, wurde kein SDS in das Gel gegeben. Das auspolymerisierte Gel wurde bei 4 °C in eine vorgekühlte Elektrophoresekammer gestellt. Nach Zusatz des Elektrophoresepuffers, 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,3 mit 0,192 M Glycin, war der Aufbau bereit für den Lauf. Für die Probenvorbereitung wurden die Proteinfractionen auf Eis mit doppelt konzentriertem Probenpuffer 1:1 gemischt und fünf Minuten inkubiert. Als Standard wurde ein Low molecular weight (LMW) Standard (Pharmacia) benutzt, der noch mit doppelt konzentriertem Probenpuffer 1:1 auf 50  $\mu$ l gemischt und für 2 Minuten gekocht wurde. Anschließend wurde er für 5 Minuten bei 16100 g zentrifugiert.

Nach dem Auftragen aller Proben und des LMW-Markers in die Probenkammern lief die Elektrophorese mit 30 - 60 mA für acht bis zwölf Stunden bei 4 °C.

Um aktive Fraktionen zu finden, wurden die Laufbahnen des Gels in Stücke von 1 cm<sup>2</sup> Größe zerschnitten. Dabei wurden die Markerbahn und eine Bahn ausgespart, die anschließend angefärbt wurden. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden mit je 300  $\mu$ l 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 über vier Stunden im Kühlschrank extrahiert. Mit einem möglichst großen

Volumen jeder Fraktion wurde anschließend ein Enzymtest und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

### **2.3.2. Reinigungsschritte mit einer Proteinreinigungs-HPLC-Anlage**

Bei der HPLC-gestützten Reinigung von Proteinen werden Proteine bei höheren Laufmittelflüssen über Säulen auf Grund unterschiedlichster Eigenschaften getrennt. Je nach Säulenmaterial dienen unter anderem Größe, Ladung, Affinitäten oder der isoelektrische Punkt der Proteine als Trenncharakteristika.

#### **2.3.2.1. Q-Sepharose Fast Flow**

Sepharose ist eine Agarose-Matrix, deren Oberfläche durch Vernetzen stabil gemacht wurde und an deren Monosaccharideinheiten über Etherbindungen Ionenaustauscher gehängt wurden. Bei der Q-Sepharose Fast Flow besteht die Matrix aus 90 µm kleinen Agarose-Kügelchen. „Q“ steht für den starken Anionenaustauscher  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$ , mit dem die Matrix verknüpft wurde. Das Säulenmaterial hat eine pH-Stabilität von pH 2 bis 12 und eine totale Ionenkapazität von 180 – 250 µmol/ml Gel. Es muss vor dem Benutzen mit Anionen beladen werden. Deswegen wurden Säule und Anlage vor dem Lauf mit 30 ml Puffer B gespült. Um ungebundene Anionen zu entfernen, wurde mit 30 ml Puffer A nachgewaschen. Die Säule hatte bei einer Länge von 10,5 cm und einem Durchmesser von 1 cm ein Bettvolumen von 8,3 ml. Der hier durchgeführte Lauf wurde durch Aufspülen von 2,5 ml über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Proteinextrakt gestartet, der zuvor über eine PD-10-Säule in Puffer A umgepuffert und durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße von Schwebstoffen befreit wurde. Der Fluss betrug durchgängig 1 ml/min.

Der hier benutzte Gradient sah folgenden Verlauf vor:

0 – 20 min 100 % Puffer A  
20 – 60 min 100 % Puffer A → 100 % Puffer B  
60 – 80 min 100 % Puffer B

Puffer A: 20 mM Bis-Tris-Propan pH 6,0 mit 1 mM DTT

Puffer B: 20 mM Bis-Tris-Propan pH 6,0 mit 1 M NaCl und 1 mM DTT

Während des gesamten Laufes wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet und Fraktionen von 2 ml gesammelt, die anschließend auf Enzymaktivität und Proteinkonzentration überprüft wurden. Die Säule wurde anschließend mit 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert.



### 2.3.2.2. DEAE-Sephacel

Bei DEAE-Sephacel handelt es sich um einen Ionenaustauscher aus hochreiner mikrokristalliner Cellulose. Cellulose ist ein natürlich vorkommendes Polymer aus  $\beta(1-4)$ -verknüpften Glucoseeinheiten. Bei Sephacel handelt es sich um ein Säulenmaterial mit einer Partikelgröße von 40 – 160  $\mu\text{m}$ . Durch Veresterung der endständigen Glucose ergibt sich ein schwacher Anionenaustauscher mit der folgenden funktionellen Gruppe:



Bei diesem Anionenaustauschmaterial handelt es sich um ein etwas schwächeres Material als bei der Q-Sepharose, was die Bindungsstärke anbetrifft. Auch für diesen Lauf wurde der Enzymrohextrakt über eine PD-10-Säule umgepuffert in einen 20 mM Bis-Tris-Propan-Puffer pH 6,0. Die so vorbereitete Proteinlösung konnte dann mit 1 ml/min auf die Säule (10 cm Länge, 1 cm Durchmesser, Bettvolumen 7,5 ml) gespült werden, womit der Lauf direkt gestartet wurde. Das Gradientenprogramm sah folgendermaßen aus:

0 – 20 min 100 % Puffer A  
20 – 60 min 100 % Puffer A → 100 % Puffer B  
60 – 80 min 100 % Puffer B

Puffer A: 20 mM Bis-Tris-Propan pH 6,0 mit 1 mM DTT

Puffer B: 20 mM Bis-Tris-Propan pH 6,0 mit 1 M NaCl und 1 mM DTT

Es wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt und auf spezifische Methyltransferaseaktivität getestet. Der gesamte Lauf wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch verfolgt und aufgezeichnet. Die Säule wurde anschließend mit 20 % Ethanol durchspült und bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2.3. SAH-EAH-Sepharose

Dieses Säulenmaterial wurde selbst hergestellt nach einer Anleitung von Sharma und Brown (1978). Es wurden 8 ml AH-Sepharose 4B über eine Filternutsche von der Flüssigkeit abgetrennt und mit 400 ml 0,5 M NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde zum Ansäuern das Material mit 100 ml Wasser pH 4,6 gespült. In einem anderen Gefäß wurden 30,8 mg S-Adenosylhomocystein (SAH) in 8 ml Wasser pH 4,6 gelöst, es war damit eine Konzentration von 3,85 mg/ml gegeben. Diese Lösung wurde mit der Gelmatrix gemischt und der pH-Wert mit HCl wieder auf pH 4,6 eingestellt. Nun wurden 0,14 mol Carbodiimid (200 mg) zugegeben. Dieser Ansatz reagierte unter Schütteln für 24 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde überschüssiges Carbodiimid mit viel auf pH 4,6 eingestelltem Wasser entfernt. Das abgefilterte Säulenmaterial wurde nun in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen und in eine Säule gefüllt. Nach dem Durchspülen mit 0,02 % Natriumazid, um Bakterienbefall zu verhindern, konnte die Säule bei 4 °C gelagert werden.

Für einen Lauf wurden zunächst 2,5 ml Enzymextrakt, der aus den Fraktionen mit hoher spezifischer  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität einer vorhergehenden Anionenaustauschchromatographie bestand, mit einem Fluss von 0,2 ml/min auf die Säule gespült und diese zum Binden des Enzyms an das Säulenmaterial zwei Stunden im Kühlschrank inkubiert. Die Säule war 8 cm lang, 1 cm breit und hatte ein Volumen von 6,4 ml. Nach dieser Zeit wurde mit einem Fluss von 0,5 ml/min folgender Fließmittelgradient durchgespült:

0 – 20 min 100 % Puffer A

20 – 100 min 100 % Puffer A  $\rightarrow$  100 % Puffer B

Puffer A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 1 mM DTT

Puffer B: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 2 M KCl und 1 mM DTT

Dieses Programm entspricht einer Änderung der Salzkonzentration von 0,025 M/ml. Es wurden über den gesamten Verlauf Fraktionen von 1 ml gesammelt und auf  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität überprüft. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

#### **2.3.2.4. Adenosin-Agarose**

Auch das Säulenmaterial für diese Affinitätschromatographie wurde selbst hergestellt nach einer Anleitung von Attieh et al. (Attieh et al. 1995). Dazu wurden 4 ml Adenosin 5'-Monophosphat Agarose von Sigma für eine Stunde in destilliertem Wasser vorgequollen. Nach dieser Zeit wurden 5 ml Puffer 1 und 800 Einheiten alkalische Phosphatase (1U/ $\mu$ l) zugesetzt. Über Nacht wurde der Ansatz bei 37 °C geschüttelt, damit die Phosphatase die endständigen Phosphatreste abspalten konnte. Anschließend wurde das Material über eine Filternutsche von der Flüssigkeit getrennt, wobei diese aufgefangen wurde. Auch das Waschwasser, mit dem die freien Phosphatreste ausgewaschen wurden, wurde gesammelt. Die Agarose wurde nun noch einmal in Puffer 1 resuspendiert und über Nacht mit alkalischer Phosphatase behandelt und wie beschrieben nachgewaschen. Mit den verschiedenen Waschwasserproben wurde ein Test auf freie Phosphatgruppen durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase vollständig gearbeitet hatte. Nachdem keine Phosphatreste mehr im Waschwasser nachgewiesen werden konnten, wurde das fertige Säulenmaterial in Wasser resuspendiert und in eine FPLC-Säule (HR 5/10 von Pharmacia, Füllhöhe 9 cm, Durchmesser 0,5 cm, eingefülltes Säulenmaterial 3,5 ml) eingefüllt. Die fertige Säule wurde mit 0,02 % Natriumazid vor Bakterienbefall geschützt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### Puffer 1

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM ZnCl<sub>2</sub>

10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,3

Für den Test auf Phosphatreste wurden die einzelnen Proben wie folgt behandelt:

250 µl Waschlösung

1 ml schwefelsaure Ammoniummolybdatlösung

125 µl Reduktionslösung

1,125 ml destilliertes Wasser

wurden gemischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Photometer gegen Wasser bei 660 nm vermessen.

### Schwefelsaure Ammoniummolybdatlösung

625 µl 10 N Schwefelsäure

1,25 ml 2,5 % Ammoniummolybdat

8,125 ml destilliertes Wasser

### Reduktionslösung

0,6 g Natriumdisulfit

15 mg Methylaminophenolsulfat (Metol, Photorex)

auf 1,5 ml destilliertes Wasser

Da das Säulenmaterial sehr empfindlich ist, wurde nur über Anionenaustauschchromatographie vorgereinigtes Protein auf die Säule gespült. Damit wurde ein Lauf gestartet, der bei 280 nm mit dem Photometer beobachtet wurde. Die an diese Säule gebundenen Proteine wurden durch ansteigenden SAM-Gehalt im Puffer wieder abgelöst, da das SAM mit dem Adenosin der Säule konkurriert. Für den Lauf wurde folgendes Protokoll verwendet:

0 – 40 min 100 % Puffer A

40 – 81 min 85 % Puffer A, 15 % Puffer B

81 – 122 min 100 % Puffer A

122 – 222 min 100 % Puffer A → 100 % Puffer C

222– 320 min 100 % Puffer A

Puffer A: 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 + 14 mM Mercaptoethanol

Puffer B: 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 + 2 M NaCl + 14 mM Mercaptoethanol

Puffer C: 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 + 2 mM SAM + 14 mM Mercaptoethanol

Fraktionen von 1 ml wurden bei einem Fluss von 1 ml/min gesammelt. Die Fraktionen wurden auf Enzymaktivität überprüft, wobei das bereits in einigen Fraktionen durch Puffer C enthaltene SAM bei der Zusammensetzung der Enzymtests Berücksichtigung fand. Die Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf die Anzahl der Proteinbanden hin untersucht.

### **2.3.2.5. Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie wurde der komplette Proteinextrakt über eine Gelmatrix gegeben, bei der kleinere Proteine kleine Kanäle im Material durchwandern können. Demzufolge verändert sich je nach Größe der Proteine der zurückzulegende Weg, wodurch die Elutionszeit verändert wird. Kleinere Proteine verlassen die Säule also später als große.

Zuerst muss die Säule geeicht werden, um Aussagen über die tatsächlichen Proteingrößen treffen zu können. Mit Blue Dextran (2000 kDa) wurde zunächst das Totvolumen der Anlage inklusive Schläuchen und Säule ermittelt, da das sehr große Molekül nur den kürzest möglichen Weg durch die Säule nehmen kann. Dann wurden Eichproteine unterschiedlicher Größe auf die Säule gegeben und deren Retentionszeiten verzeichnet. Es wurde die Zusammenstellung der Firma Sigma benutzt, die folgende Proteine enthielt: Cytochrom c (12,4 kDa), Carboanhydrase (29,0 kDa), BSA (66,0 kDa), Alkoholdehydrogenase (150,0 kDa) und  $\beta$ -Amylase (200,0 kDa). Mit diesen Werten wurde dann eine Eichgerade erstellt.

Die verwendete Säule trägt die Bezeichnung Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) und konnte mit einem Fluss von 0,5 ml/min betrieben werden. Die Angaben 30/10 im Säulennamen bezeichnen die Länge (30 cm) und den Durchmesser (10 mm), daraus ergibt sich ein Bettvolumen von 24 ml. Der Lauf wurde auch hier photometrisch bei 280 nm überwacht und aufgezeichnet. Um eine scharfe Trennung zu erreichen, wurden nur 100  $\mu$ l vorgereinigtes Protein auf die Säule gegeben. Zum Vorreinigen wurde Proteinextrakt über eine Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt und die Fraktionen mit der höchsten spezifischen  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität vereinigt. Da die einzelnen Fraktionen der Größenausschlusschromatographie dadurch nur noch wenig Protein enthielten und mit großen Verdünnungseffekten gerechnet werden musste, wurden die Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 ml klein gehalten. Für den Enzymtest wurde die komplette Fraktion benutzt, um eine Methyltransferaseaktivität mit dem Standardenzymtest nachweisen zu können. Da die Trennung bei diesem Verfahren nur nach der Größe, nicht aber durch Anheftungseffekte durch Protein an die Säule zustande kommen sollte, konnte isokratisch mit 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl und 1 mM DTT eluiert werden.

### **2.3.2.6. Hydroxylapatit-Chromatographie**

Bei Hydroxylapatit handelt es sich um eine kristalline Form von Calciumsulfat mit dem Aufbau  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . Im Gegensatz zu Trennmethoden wie der Anionenaustausch-

chromatographie, bei denen ein einzelner, reversibler Schritt die Trennung hervorruft, handelt es sich hier um verschiedene ineinandergreifende Effekte, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Hauptsächlich beruht die Trennung wohl auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Amino- und Carboxylgruppen der Proteine und den überwiegend negativ geladenen Phosphatgruppen der Hydroxylapatitkristalloberfläche. Während die Aminogruppen in statische Wechselwirkungen mit den Kristallen treten, werden die Carboxylgruppen zwar abgestoßen, aber gleichzeitig von den Calciumionen komplexiert. Bei der Elution werden immer zuerst basische, dann neutrale und zuletzt saure Proteine von der Säule gespült. Einen starken Einfluss auf die Trennleistung kann auch ein Phosphatgradient haben, wie er bei diesem Lauf benutzt wurde. Die Hydroxylapatit-Säule, die hier verwendet wurde, hat eine Länge von 11 cm, einen Durchmesser von 1 cm und 8,6 ml Gelbettvolumen. Mit einem Fluss von 1 ml/min wurde ein Probenvolumen von 2,5 ml durch Filtration von Schwebeteilchen befreiter Proteinlösung auf die Säule gespült. Von jeder Fraktion von 2 ml wurden die Absorption, der Proteingehalt und die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase ermittelt. Das Programm lief folgendermaßen ab:

0 – 20 min 100 % Puffer A  
20 – 70 min 100 % Puffer A → 100 % Puffer B  
70 – 90 min 100 % Puffer B

Puffer A: 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 6,8 mit 1 mM DTT

Puffer B: 500 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 6,8 mit 1 mM DTT

### **2.3.2.7. Hydrophobe Interaktion (HIC)**

Bei der hydrophoben Interaktion werden Proteine an eine hydrophobe Oberfläche gebunden. Dies geschieht bei einem hohen Salzgehalt, was die Methode besonders gut durchführbar nach einem Reinigungsschritt mit einem salzhaltigen Elutionspuffer macht. Demzufolge wurde die Methode im Anschluss an eine Anionenaustauschchromatographie benutzt, nachdem die aktiven Fraktionen der Vorgängersäule ermittelt und vereinigt worden waren. Durch ein Absenken des Salzgehaltes können die Proteine wieder von der Matrix gelöst werden. Bei dem verwendeten Säulenmaterial handelte es sich um Fractogel TSK Butyl 650-M. Es wurden 2,5 ml Proteinlösung nach dem Entfernen der Schwebeteilchen durch Filtration durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  auf die Säule aufgebracht und bei einem Fluss von 1 ml/min nach folgendem Programm wieder heruntergewaschen:

0 – 10 min 100 % Puffer A  
10 – 55 min 100 % Puffer A → 100 % Puffer B  
55 – 65 min 100 % Puffer B  
65 - 84 min 100 % Puffer C

Puffer A: 10 mM Tris-HCl pH 7,0 + 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 1 mM DTT

Puffer B: 10 mM Tris-HCl pH 7,0 + 1 mM DTT

Puffer C:  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 mM DTT

Der Lauf wurde bei einer Absorption von 280 nm verfolgt, die Fraktionen mit einem Volumen von je 2 ml mit dem Standardenzymtest auf spezifische Enzymaktivität überprüft.

### **2.3.3. Kontrolle der Proteinreinigung über ein SDS-Polyacrylamidgel**

Um die Reinheit der erhaltenen Fraktionen und Proteinextrakte zu überprüfen, wurden sie auf ein Polyacrylamidgel mit Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetragen. Die Proteine binden hier das Detergens SDS und bilden einen negativ geladenen Protein-SDS-Komplex. Nach vorheriger Reduktion der Proteine durch DTT und Denaturierung durch SDS werden Proteine entfaltet und Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert und die Proteine nur nach ihren jeweiligen hydrodynamischen Eigenschaften getrennt. Es wurde eine Methode nach Lämmli (1970) verwendet, bei der statt der ursprünglich unterschiedlichen Tris-Glycin-Puffer nur ein Puffer verwendet wurde.

#### **2.3.3.1. Vorbereitung des Gels**

Es wurde zunächst in einer vorbereiteten Gelgießkammer ein Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Dazu wurden die unten aufgeführten Bestandteile unter Rühren vermischt und nach Eingießen zwischen die Glasplatten mit 1-Butanol überschichtet, um eine sauerstofffreie Oberfläche zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Sammelgel zusammengemischt und nach Entfernen des 1-Butanols über das Trenngel gegossen. In dieses noch flüssige Sammelgel wurde ein Probenauftragskamm eingesetzt, bevor es auspolymerisierte. Nach Überführen des Aufbaus in die Elektrophoresekammer wurden die vorbereiteten Proben eingebracht und die Elektrophorese bei 60 mA über Nacht (8 – 10 Stunden) durchgeführt.

Trenngel (10 % Acrylamid)

10,0 ml	1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8
0,2 ml	20 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
13,3 ml	Lösung aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
0,2 ml	5 % N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
15,9 ml	destilliertes Wasser
0,4 ml	3 % Ammoniumperoxydisulfat (APS)

#### Sammelgel (5 % Acrylamid)

2,5 ml	0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8
0,1 ml	20 % SDS
3,3 ml	Lösung aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
0,1 ml	5 % TEMED
13,4 ml	destilliertes Wasser
0,6 ml	3 % APS

#### 2.3.3.2. Probenvorbereitung

Die Proteinproben konnten entweder direkt oder nach Fällung mit Trichloressigsäure verwendet werden. Für die Fällung wurde jeder Probe ein ihrem Volumen entsprechendes Volumen an 40 % Trichloressigsäurelösung zugemischt. Im Kühlschrank wurden die Proteine innerhalb von 60 Minuten ausgefällt. Zum Abtrennen der Proteine wurde die Mischung bei 4 °C für 20 Minuten bei 16100 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde zweimal mit je 500 µl eiskaltem Aceton (80 %) gewaschen und nach Abnehmen des Acetons 20 Minuten bei einem Unterdruck von 400 mbar im Exsiccator getrocknet. Die trockenen Sedimente wurden in 20 µl 0,1 M Natriumcarbonatlösung mit 10 % Saccharose resuspendiert. Anschließend wurden sie wie ungefällte Proteinzubereitungen behandelt, indem sie mit einem äquivalenten Volumen an 2x-Probenpuffer vermischt wurden. Die Mischung wurde zum Denaturieren der Proteine für 2 Minuten gekocht, kurz zentrifugiert und konnte dann in die Probenkammer gegeben werden.

Auf die gleiche Weise wurde mit dem Größenmarker verfahren, bei dem es sich um einen Low molecular weight Marker (LMW-Marker, Pharmacia) handelt. Dieser Marker besteht aus folgenden Proteinen:

Phosphorylase b	94,0 kDa
BSA	67,0 kDa
Ovalbumin	43,0 kDa
Carboanhydrase	30,0 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

#### Probenpuffer (2x)

6,25 ml	0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8
10,00 ml	10 % SDS
2,50 ml	Glycerin
31,25 ml	destilliertes Wasser
0,02 ml	1 % Bromphenolblau
0,40 g	DTT

Elektrophoresepuffer pH 8,8

0,025 M	Tris-HCl
0,192 M	L-Glycin
0,1 %	SDS

### **2.3.3.3. Gelfärbemethoden**

Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis mit zwei unterschiedlichen Färbemethoden sichtbar gemacht.

#### **Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250**

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel für 1 – 2 Stunden in die Coomassie-Färbelösung gelegt und dabei leicht bewegt. Anschließend wurde es in ein Entfärbebad gegeben, in dem Coomassie-Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde. Der Entfärbvorgang dauerte zwischen 2 und 8 Stunden, bis kaum noch Hintergrundfärbung zu erkennen war. Das fertige Gel wurde dann in eine Lösung von 5 % Glycerin in Wasser eingelegt, fotografiert und zum dauerhaften Aufbewahren zwischen Cellophanfolie getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
227 ml	destilliertes Wasser
227 ml	Methanol p.a.
46 ml	Eisessig

Coomassie-Entfärbelösung

227 ml	destilliertes Wasser
227 ml	Methanol p.a.
46 ml	Eisessig

#### **Silberfärbung nach Blum (1987)**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst über Nacht in ein Fixierbad gelegt. Es wurde dann dreimal mit je 200 ml 20 % Ethanol gewaschen, wobei jeder Waschschrift 20 Minuten dauerte. Anschließend wurde eine Lösung aus 40 mg Natriumthiosulfat in 200 ml Wasser für eine Minute zu dem Gel gegeben. Es wurde dreimal mit je 200 ml Wasser je 20 Sekunden lang nachgewaschen, bevor das Gel für 1,5 Stunden in die Imprägnierlösung gelegt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 ml destilliertem Wasser für je 20 Sekunden wurde das Gel in die Entwicklungslösung gelegt, bis die Banden deutlich zu sehen, der Hintergrund aber noch nicht zu dunkel war. Reste der Entwicklungslösung wurden mit 200 ml destilliertem Wasser abgewaschen, dann wurde das Gel zum Abstoppen in eine Lösung aus 100 ml Methanol, 24 ml Essigsäure und 76 ml Wasser 10 Minuten lang inkubiert. Auch nach



dieser Färbung wurde das Gel in eine Lösung von 5 % Glycerin in Wasser gelegt, fotografiert und zwischen Cellophanfolie getrocknet.

#### Fixierlösung

100 ml	Methanol p.a.
24 ml	Essigsäure
100 µl	37 % Formaldehydlösung
auf 200 ml	destilliertes Wasser

#### Imprägnierlösung

0,3 g	Silbernitrat
122 µl	37 % Formaldehydlösung
auf 150 ml	destilliertes Wasser

#### Entwicklungslösung

12 g	Natriumcarbonat
100 µl	37 % Formaldehydlösung
4 ml	Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l)
auf 200 ml	destilliertes Wasser

## **2.4. Charakterisierung der Suspensionskultur von *Linum nodiflorum***

Die in MS-Li-Medium kultivierte Kultur *Linum nodiflorum* braun wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen in Bezug auf die üblichen Wachstumsparameter, Enzymaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase und Vorhandensein verschiedener Lignane charakterisiert. Dabei wurde die erste Probe am Überimpftag als Wert 0 genommen und dann täglich eine weitere Probe untersucht. Die Suspensionskulturen wurden über einen Büchnertrichter mit Filterpapier abgenutscht und so Medium von festen Zellbestandteilen getrennt. Das erhaltene Medium wurde auf die Mediumsparameter und den Lignangehalt, die Zellen auf Wachstumsparameter, Enzymaktivität und Lignangehalte hin untersucht.

### **2.4.1. Mediumsparameter**

An jedem Kulturtag wurden Volumen, pH-Wert, Leitfähigkeit und Zuckergehalt des erhaltenen Mediums getestet. Anhand des Brechungsindex kann man auf den Gesamtzuckergehalt schließen. Außerdem wurde der Gehalt an den Ionen Ammonium, Nitrat und Phosphat bestimmt.

Bei jeder Ernte wurden die Zellen abgenutscht. Das erhaltene Medium wurde in einem Standzylinder gemessen und auf einen einzelnen Kolben berechnet.

Der pH-Wert wurde mittels einer Glaselektrode in nicht verdünntem Medium gemessen.

Für die Leitfähigkeitsmessung wurden die einzelnen Mediumsproben 1:4 mit Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung mit einer Leitfähigkeitselektrode.

Der Zuckergehalt wurde mit einem Handrefraktometer gemessen. Da aber auch andere lichtbrechende Substanzen im Medium vorhanden waren, können die erhaltenen Werte nur Annäherungen an den tatsächlichen Zuckergehalt darstellen.

#### **2.4.1.1. Bestimmung des Ammoniumgehaltes**

Zur Bestimmung des Ammoniumgehaltes wurde ein photometrisches Verfahren nach Barthlen (1983) verwendet. Hierfür wurden folgende Lösungen benötigt:

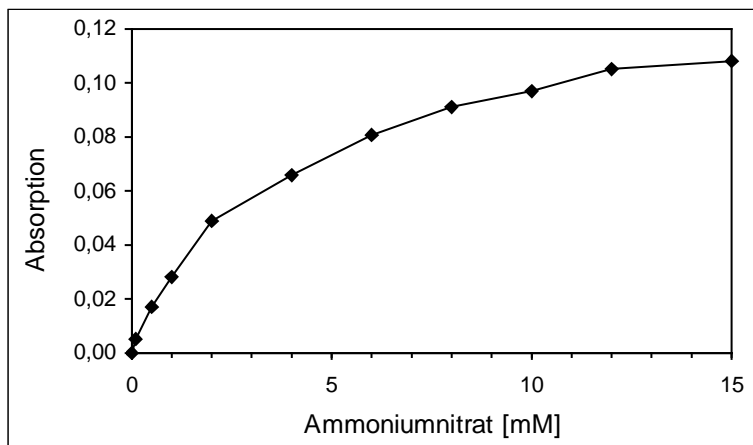
Hypochloritlösung:	0,5 ml	Natriumhypochlorit mit 15 % Chlor
	0,75 ml	8,25 M NaOH
	ad 1000 ml	dest. Wasser

Phenollösung:	9,980 g	Phenol
	0,051 g	Nitroprussidnatrium
	0,200 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	dest. Wasser

Durch die Zugabe von Natronlauge in Hypochloritlösung wird aus dem Ammoniumsalz des Mediums Ammoniak, der mit Hypochlorit zu Monochloramin reagiert. Nach der Zugabe der Phenollösung wird ein blaues Indophenol gebildet, das photometrisch bei 570 nm bestimmt werden kann. Als Nullabgleich diente eine Probe, bei der Wasser statt Medium eingesetzt wurde. Von jeder Mediumsprobe wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

Jede Probe bestand aus:	50 µl Medium 1:10 verdünnt
	1,25 ml Phenollösung
	1,25 ml Hypochloritlösung

Die Ansätze wurden gemischt und im Wasserbad bei 36 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und photometrisch bei 570 nm gegen den Nullabgleich mit Wasser gemessen. Um von der Absorption auf den Ammoniumgehalt schließen zu können, musste eine Eichreihe erstellt werden. Es wurden 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 und 15 mM Ammoniumnitrat getestet und die erhaltenen Absorptionen in einer Eichkurve eingetragen.



#### 2.4.1.2. Bestimmung des Nitratgehaltes

Die Methode der Nitratbestimmung wurde von Sawicki und Scaringelli (1971) übernommen. Hierbei wird das vorhandene Nitrat durch Hydrazinsulfat zu Nitrit reduziert. Bei diesem Schritt dient Kupfer als Katalysator. Nitrit reagiert nun mit Sulfanilamid zu einem intensiv rot gefärbten Azofarbstoff. Für diesen Reaktionsschritt wird N-Naphthyl-(1)-ethylendi-ammoniumdichlorid als Kopplungsreagenz und Aceton als Farbstabilisator zugegeben. Auch hier wurde für die Auswertung eine Eichreihe mit Kaliumnitrat in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 35 und 40 mM  $\text{KNO}_3$  gemessen. Medium und Eichlösungen wurden 1:500 verdünnt.

Die verwendeten Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Kupfersulfatlösung:	3,94 mM	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Natronlauge:	0,10 M	NaOH
Hydrazinsulfatlösung:	0,21 %	(w/v) Hydrazinsulfatlösung
Aceton:	10,00 %	Aceton
Diazolösung:	10,00 %	o-Phosphorsäure
	4,00 %	(w/v) Sulfanilamid
	0,20 %	N-Naphthyl-(1)-ethylendiammoniumdichlorid

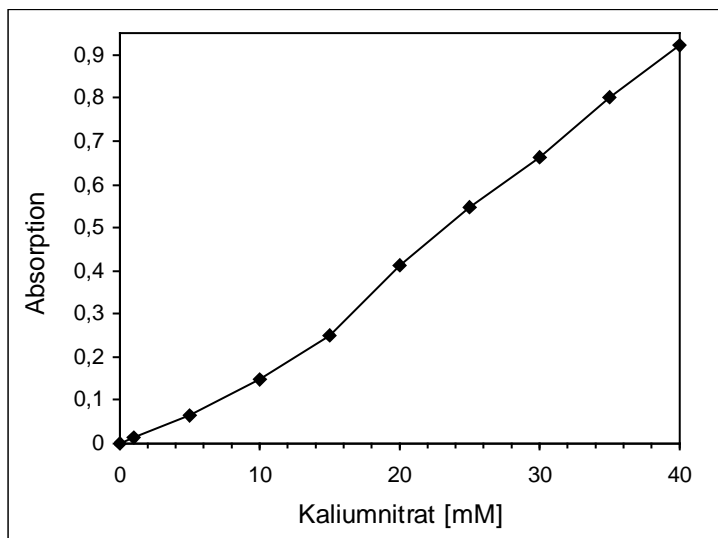
Für den Test wurden sie folgendermaßen zusammengegeben:

1,00 ml	Medium 1 : 500
50,00 $\mu\text{l}$	Kupfersulfatlösung
0,25 ml	0,1 M NaOH
50,00 $\mu\text{l}$	Hydrazinsulfatlösung

Diese Ansätze wurden nach intensivem Mischen bei 65 °C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die zuzugebenden Lösungen wurden alle auf Eis gelagert, um sie entsprechend zu temperieren.

100 µl	10 % Aceton
300 µl	Diazolösung
0,75 ml	dest. Wasser

Nach erneutem Mischen inkubierte man die Proben noch 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Photometer wurde dann die Extinktion bei 540 nm gemessen. Als Referenz diente eine mit Wasser statt Medium versetzte Probe. Von jeder Mediumsprobe wurden drei Bestimmungen durchgeführt.



### 2.4.1.3. Bestimmung des Phosphatgehaltes

Der Gehalt an anorganischem Phosphat im Medium wurde mit Hilfe des Testes von Gomorri (1942) bestimmt. Hierfür benutzt man folgende Lösungen:

Ammoniummolybdatlösung:

25 ml	10 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
50 ml	2,5 (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>
325 ml	dest. Wasser

Reduktionslösung:

40 g	Natriumdisulfit
1 g	Metol (= 4-(Methylamino)-phenolsulfat)
ad 100 ml	dest. Wasser

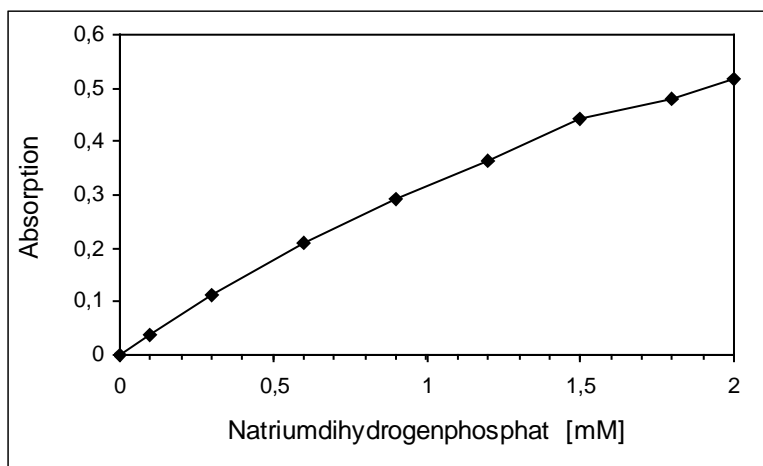
Mit der zugesetzten Ammoniummolybdatlösung bildet das anorganische Phosphat des Mediums Phosphormolybdat, welches von p-Methylaminophenolsulfat reduziert wird. Dabei

entsteht kolloidales Molybdänblau, welches photometrisch bei 660 nm bestimmt werden kann. Alle benötigten Reagenzgläser und Küvetten müssen vor dem Versuch mit destilliertem Wasser gespült werden, um phosphathaltige Spülmittelreste zu entfernen.

Die Proben waren wie folgt zusammengesetzt:

0,250 ml	unverdünntes Medium
1,000 ml	Ammoniummolybdatlösung
0,125 ml	Reduktionslösung
1,125 ml	dest. Wasser

Auch bei diesem Versuch wurden Dreifachproben durchgeführt. Die Ansätze wurden gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten sie gegen einen Ansatz mit Wasser statt Medium als Referenz im Photometer bei 660 nm vermessen werden. Als Eichreihe wurden verschiedene Konzentrationen  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  vermessen: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 und 2 mM.



#### 2.4.2. Wachstumsparameter

Nach dem oben bereits beschriebenen Abnutschen wurden die medienfreien Zellen vom Filterpapier in eine austarierte Petrischale überführt und gewogen. So wurde das Frischgewicht (FG) ermittelt. Für die Bestimmung des Trockengewichts wurde ein Aliquot der vom Medium befreiten Zellen eines jeden Kulturtages in einer austarierten Petrischale erst für mindestens drei Stunden bei  $-18\text{ °C}$  gefroren und dann gefriergetrocknet. Nach drei Tagen im Gefrier Trockner wurden die Zellen erneut gewogen und so das Trockengewicht (TG) festgelegt. Schließlich wurden noch Proteingehalt und spezifische Enzymaktivität mit Proteinextrakt aus den frischen Zellen nach den in Kapitel 2.2.2. und 2.2.6. beschriebenen Methoden ermittelt.

### 2.4.3. Lignanextraktion

Um die Art und Menge der enthaltenen Lignane festzustellen, wurden die Zellen jedes Kulturtages gefriergetrocknet. Nach dem Pulverisieren wurden jeweils genau 200 mg Pulver in ein Reagenzglas eingewogen. Dazu kamen 2 ml Methanol, mit dem die Ansätze zweimal für je 30 Sekunden im Ultraschallbad aufgeschlossen wurden. Dazwischen wurden die Proben immer wieder auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 8 ml mit Phosphorsäure auf pH 5,0 eingestelltes H<sub>2</sub>O und 1 mg  $\beta$ -Glucosidase ( $\geq 1000$  U/mg) aus Mandeln zugegeben. Diese Ansätze wurden auf dem Wasserbad bei 35 °C für drei Stunden inkubiert. Durch die Glucosidase sollen in dieser Zeit Zuckerreste abgespalten werden, was eine Bestimmung der Lignane als Aglyca ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die freien Lignane durch 30-minütiges intensives Rühren mit 10 ml Dichlormethan in die organische Phase überführt. Die Dichlormethanphase wurde durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g abgetrennt und in Spitzkolben überführt. Das Dichlormethan konnte nun mittels Rotationsverdampfer unter leichtem Erwärmen entfernt werden. Die Lignane wurden in dreimal 500  $\mu$ l 50 % Methanol gelöst. Gegen verschiedene Lignanstandards wurden die Proben mittels HPLC-Analyse vermessen. Als Laufmittel kamen 50 %, 40 % und 30 % Acetonitril zum Einsatz.

Um nicht nur die in den Zellen gelagerten Lignane zu erfassen, wurde auch das Medium in gleicher Weise untersucht. Es wurde hierzu genau 1 ml abgemessen, der mit Methanol, auf pH 5 eingestelltem Wasser und  $\beta$ -Glucosidase versetzt wurde. Hierdurch konnten auch die an das Medium abgegebenen Lignane nach Art und Menge bestimmt werden.

## 2.5. Fütterungsversuch mit markierter [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure (MDCA)

### 2.5.1. Synthese von [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure (MDCA)

In einen Rundkolben wurden 210 mg [2-<sup>13</sup>C]Malonsäure (2 mmol) und 150 mg Piperonal (1 mmol) eingewogen. Nach Zusatz von 2,5 ml Pyridin und einem Tropfen Piperidin wurde die Lösung bei 95 °C für 75 Minuten gerührt. Dieser Ansatz wurde zügig in 6 ml eiskalte 5 N HCl gegossen. Mit einer Pasteurpipette, deren Spitze mit Watte gefüllt war, um wie ein Filter Kristalle abzutrennen, wurden die dabei ausfallenden Nadeln von der Lösung getrennt, indem die Lösung vorsichtig abgesaugt wurde. Nach dem Waschen der Kristalle mit eiskaltem Wasser auf Eis wurden sie im Exsiccator getrocknet. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurden sie in wenig heißem Ethanol wieder gelöst und im Kühlschrank erneut auskristallisiert. Die langsam entstandenen weißen Nadeln wurden über ein Filterpapier von dem Ethanol abgetrennt und mit eiskaltem Ethanol nachgewaschen. Nach dem Trocknen war die <sup>13</sup>C-markierte Verbindung fertig für analytische Tests auf Identität und Reinheit der Substanz.

### 2.5.2. Test auf Identität und Reinheit

Mit der gewaschenen und getrockneten Substanz wurde eine Schmelzpunktbestimmung durchgeführt. Dazu wurden wenige Kristalle der Substanz in ein Schmelzkapillarröhrchen überführt und in einen Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli der Firma Büchi (Schweiz) gespannt. Der Apparat heizt das Röhrchen hoch und kühlt es danach wieder ab. Dadurch kann man den Schmelzpunkt von beiden Richtungen ermitteln.

Als zweite Prüfung der Identität und der Reinheit wurde ein NMR-Spektrum der Substanz aufgenommen. Dazu wurden einige der weißen Nadeln in  $\text{CDCl}_3$  gelöst und ein  $^1\text{H}$ - und ein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum erstellt. Um beide zu kombinieren, wurde noch eine COSY-Korrelation erstellt. Die einzelnen Proben wurden im Labor von Dr. Mike Needham (De Montford University, Leicester, UK) mit Hilfe des Bruker 400 Ultra Shield™ vermessen.

### 2.5.3. Fütterung der synthetisierten [2- $^{13}\text{C}$ ]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure

[2- $^{13}\text{C}$ ]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure wurde an Zellen von *Linum nodiflorum* gefüttert. Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Fütterung durchgeführt. Nach dem ersten Protokoll wurden 2,5 mg MDCA (entspricht einer Endkonzentration von 0,5 mM im Medium) in 500  $\mu\text{l}$  sterilfiltriertem Ethanol gelöst und in einen sterilen Kolben gegeben. Das Ethanol wurde unter der Sterilbank verdampft, die Substanz in dem Erlenmeyerkolben mit 25 ml autoklaviertem MS-Li-Medium mit Cyclodextrin (567,5 mg/l Medium) versetzt. Diese Mischung wurde über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei sollte das MDCA von dem Cyclodextrin komplexiert werden, da es für die Zellen toxisch sein könnte. In diese Mischung wurden dann unter sterilen Bedingungen 2,5 g Zellen der Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* transferiert. Sie sollen den Stoff inkorporieren und in weitere Lignane einbauen. Da das MDCA mit  $^{13}\text{C}$  markiert wurde, kann man dann einen Einbau in verschiedene andere Lignane feststellen und eine Aussage über den Biosyntheseweg treffen. Diese Pflanzenzellen wuchsen sieben Tage lang unter den normalen Kulturbedingungen, bevor eine Lignanextraktion (siehe Kapitel 2.4.3.) mit ihnen unternommen wurde.

Im zweiten Protokoll wurden 2,5 mg MDCA in 500  $\mu\text{l}$  Wasser mit 10  $\mu\text{l}$  1 N NaOH gelöst. Dabei entsteht das lösliche Natriumsalz der Verbindung. Diese Lösung konnte in einen leeren, autoklavierten Erlenmeyerkolben durch Sterilfiltration überführt werden. In diesen Kolben wurden unter sterilen Bedingungen sofort 25 ml Medium und 2,5 g Suspensionskultur gegeben und die Zellen unter Schütteln für sieben Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen über einen Büchnertrichter mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt. Medium und Zellen wurden gewogen und eingefroren, um später die enthaltenen Lignane nach Art und Menge zu bestimmen. Als Kontrolle dienten bei beiden Versuchen Kulturen, die auf die jeweils gleiche Art behandelt worden waren wie die Testkolben, bei denen aber kein MDCA sondern nur das jeweilige Lösungs- und Komplexmierungsmittel zugesetzt wurde.

#### 2.5.4. Auswertung mit der LC-MS-Methode

Um einen Einbau der markierten Vorstufe nachweisen zu können, musste die übliche HPLC-Methode mit einem Massenspektrometer gekoppelt werden. Diese Versuche wurden von Dr. Rainer Ebel an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Hier stand eine MS-Anlage (Finnigan LCQ/Deca) der Firma ThermoFinnigan zur Verfügung, gekoppelt mit einem Agilent 1100 HPLC-System. Die Lignanextrakte wurden 1:10 verdünnt und 10 µl dieser Verdünnung in das System injiziert. Mit einem Fluss von 0,4 ml/min wurde mit dem unten dargestellten Gradienten eluiert.

Bei der Massenspektrometrie (MS) betrug die Kapillartemperatur 260 °C, die Spannung für das Versprühen der Proben lag bei 4,5 kV. Von den Proben wurden sowohl die Daten für die positive als auch für die negative Ionisierung erfasst. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Xcalibur-Software.

Zur Elution wurde folgender Laufmittelgradient verwendet:

0 - 5 min	30 % Methanol
5 - 50 min	30 % → 70 % Methanol
50 - 60 min	70 % Methanol
60 - 65 min	70 % → 100 % Methanol
65 - 75 min	100 % Methanol

Folgende Substrate wurden als Standardsubstanzen eingesetzt:

3',4'-Methyldioxyzimtsäure	$M_r$ 192 + 1 (da mit $^{13}\text{C}$ markiert)
3',4'-Dimethoxyzimtsäure	$M_r$ 208 + 1 (da mit $^{13}\text{C}$ markiert)
Pinoresinol	$M_r$ 356
Lariciresinol	$M_r$ 358
Matairesinol	$M_r$ 358
Secoisolariciresinol	$M_r$ 362
Desoxypodophyllotoxin	$M_r$ 398
Yatein	$M_r$ 400
Podophyllotoxin	$M_r$ 414,4
β-Peltatin	$M_r$ 414,4
β-Peltatin-A Methylether	$M_r$ 428
6-Methoxypodophyllotoxin	$M_r$ 444



## 2.6. Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1. RNA-Isolierung

Bei der RNA-Isolierung nach Giuliano et al. (1993) muss sehr auf ubiquitär vorhandene RNasen geachtet werden. Um die empfindliche RNA vor Abbau zu schützen, wurden immer Handschuhe getragen und alle verwendeten Geräte und Lösungen doppelt autoklaviert oder zwei Stunden auf 200 °C erhitzt, um unerwünschte RNasen zu inaktivieren.

Es wurden sechs Tage alte Suspensionszellen von *Linum nodiflorum* durch Abnutschen vom Medium befreit und in flüssigem Stickstoff gefroren. Unter ständigem Ergänzen des Stickstoffs wurden sie in einem Porzellanmörser fein zermahlen. In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl Extraktionspuffer, 3,5 µl 2-Mercaptoethanol (entspricht 0,7 %) und 400 µl Puffer-äquilibriertes Phenol (in 0,1 M Citrat-Puffer pH 4,3 ± 0,2) vorgelegt und auf Eis gekühlt und ca. 500 mg der fein gemahlten Zellen zugemischt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde alles zwei Minuten lang kräftig gemischt und 20 Minuten auf Eis gestellt. Dadurch wurden Proteine aus der wässrigen Lösung entfernt. Anschließend zentrifugierte man die Proben 20 Minuten bei 4 °C und 16100 g. Der Überstand wurde ohne die Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen an Isopropanol für 40 Minuten auf Eis gestellt, um eine vollständige Fällung der RNA zu gewährleisten. Auf die Fällung folgte eine zweite Zentrifugation bei 4 °C und 16100 g für 30 Minuten. Das Sediment wurde vorsichtig vom Überstand befreit und das Reaktionsgefäß 10 Minuten umgekehrt auf ein Tuch zum Trocknen gestellt. Nach Zugabe von 500 µl TE-Puffer wurde die RNA eine Stunde lang auf Eis unter häufigem sanftem Aufwirbeln rückgelöst. Um noch vorhandene Polysaccharide auszufällen, wurden 100 µl Ethanol zugegeben und nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis bei 4 °C und 10000 g sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 200 µl 8 M LiCl für mindestens 90 Minuten auf Eis gestellt. Dabei fällt die RNA aus, die dann mittels Zentrifugation (20 Minuten bei 16100 g) von der Lösung abgetrennt werden konnte. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl 80 % Ethanol wurde das Sediment noch fünf Minuten getrocknet, bevor es in 50 µl sterilem Wasser oder TE-Puffer rückgelöst wurde. Die Qualität der erhaltenen RNA wurde nun auf einem Agarosegel (siehe 2.6.4.) untersucht.

#### Extraktionspuffer

4,230 M	Guanidinthiocyanat
0,007 M	Natriumsarcosinat
0,225 M	Natriumacetat pH 5,2

#### 1x TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl-Puffer pH 8,0
1 mM	EDTA

## 2.6.2. cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit

Laut Anweisung des Kits mischt man auf Eis:

X µl	RNA-Lösung, es sollten ca. 5 µg RNA enthalten sein
1 µl	Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer (0,5 µg/µl)
auf 12 µl	steriles, demineralisiertes Wasser

Diese Mischung inkubierte nun bei 70 °C für fünf Minuten, bevor die Tropfen herunterzentrifugiert wurden und sie wieder auf Eis gestellt werden konnte.

Dazu wurde gemischt:

4 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	10 mM dNTP-Mix

Nach kurzer Zentrifugation inkubierte die Mischung fünf Minuten bei 37 °C. Es wurde zugefügt:

1 µl	Revert Aid™M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
------	--

Hierbei handelt es sich um die Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit leichter RNase H-Aktivität.

Bei 42 °C fand die Reaktion für 60 Minuten statt, bis sie durch zehninütiges Erhitzen auf 72 °C abgestoppt wurde. Die erhaltene cDNA konnte direkt in einer Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) eingesetzt werden.

## 2.6.3. Polymerase Kettenreaktion zur Amplifizierung von cDNA

Da die SAM-Bindetasche bei den meisten Methyltransferasen eine hoch konservierte Region ist, können mit Primern gegen diese Region gezielt cDNAs von Methyltransferasegenen aus der gesamten cDNA amplifiziert werden. Die Aminosäuresequenz der Bindetasche lautet nach Ibrahim et al. (1998):

Aminosäure	L	V	D	V	G	G	G	X = T	G
Dafür	TTA	GTT	GAT	GTT	GGT	GGT	GGT	ACT	GGT
kodierende	TTG	GTC	GAC	GTC	GGC	GGC	GGC	ACC	GGC
Basentriplets	CTT	GTA		GTA	GGA	GGA	GGA	ACA	GGA
	CTG	GTG		GTG	GGG	GGG	GGG	ACG	GGG
	CTA								
	CTC								

Aus dieser Aminosäuresequenz ergibt sich eine Vielzahl an Möglichkeiten für die jeweilige Nukleotidsequenz. Um die Möglichkeiten nicht noch weiter zu erhöhen, wurde die mit „X“ angegebene Aminosäure als Threonin (T) festgesetzt, da dies bei den meisten bekannten pflanzlichen Methyltransferasen gilt. Da bei den Primern alle Möglichkeiten der Basentriplets berücksichtigt werden müssen, wurden sogenannte degenerierte Primer hergestellt. Auch der zweite Primer richtet sich gegen eine konservierte Region bei pflanzlichen Methyltransferasen. Sie wird von Dumas et al. (1992) beschrieben und auch von Frick et al. (1999) erfolgreich als Primersequenz benutzt.

Die verwendeten Primer lauten:

OMT1 mit 26 Basen und einem berechneten Schmelzpunkt von 67,2 °C:

5'-GTIGA(CT)GTIGGGIGGIGGIACIGGIGC-3'

Jedes I symbolisiert Inosin, das mit allen vier Basen Paarungen eingehen kann. Die Basen in Klammern sind zu gleichen Teilen an dieser Stelle eingebaut. Es handelt sich also um ein Primergemisch aus allen möglichen Kombinationen.

OMT2 mit 23 Basen und einem berechneten Schmelzpunkt von 61,5 °C:

5'-CA(AG)TGI(GT)C(AG)TCI(GC)ICCA(AG)TC(AG)TG-3'

Die einzelnen Ansätze für die PCR enthielten:

5 µl	10 x PCR-Puffer (mit oder ohne 200 mM Ammoniumsulfat)
3 - 4 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 mM dNTP-Mix
3 µl	cDNA als Kopiervorlage (hergestellt aus RNA vom 6. Kulturtag)
1-2 µl	10 mM Primer OMT1 (1 pmol/µl)
1-2 µl	10 mM Primer OMT2 (1 pmol/µl)
0,5 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
auf 50 µl	steriles Wasser

Die PCR wurde durchgeführt in einem Stratagene Robocycler mit geheiztem Deckel. Dieses Gerät kann einen Temperaturgradienten von bis zu 11 °C Temperaturunterschied einrichten.

Das benutzte Programm für diese PCR sah die folgenden Schritte vor:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	5 min
35	94 °C	30 sek
	40 °C	1 min
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min

Im Anschluss wurden die Ansätze in der Maschine auf 4 °C gekühlt und konnten anschließend im Gefrierschrank bei – 20 °C für längere Zeit gelagert werden.

10x PCR-Puffer ohne Ammoniumsulfat

100 mM Tris-HCl pH 8,8  
 500 mM KCl  
 0,8 % Nonidet P40

10x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat

750 mM Tris-HCl pH 8,8  
 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 0,1 % Tween 20

#### 2.6.4. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA- oder RNA-Fragmente verschiedener Länge erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen. Dabei wird 1 g Agarose NEEO in 100 ml 1x TBE-Puffer unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wird in eine Kammer mit Probenkamm gegossen und kühlt bis zum völligen Erstarren ab. Der Schlitten mit dem festen Gel wird in die Elektrophoresekammer gesetzt und das Gel mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Nach Aufbringen der mit 5x Probenpuffer versetzten Probe in die Probenkammer wurde bei Raumtemperatur eine Elektrophorese mit 90–120 mA durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente hierzu autoklavierter 1x TBE-Puffer. Nach dem Lauf wurde das Gel in einem Färbebad mit 20 µl 1% Ethidiumbromidlösung in 400 ml Wasser gefärbt, der Hintergrund durch Waschen in destilliertem Wasser wieder entfärbt und unter UV-Licht (254 nm) ausgewertet und fotografiert. Um die ungefähre Größe der DNA- oder RNA-Stücke zu bestimmen, wurden auf eine Bahn 10 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix von der Firma MBI Fermentas aufgetragen. Dieser Mix enthält 0,5 mg DNA pro ml in den Größen 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 und 10000 Basenpaaren.

#### 5x Probenpuffer

0,01 %	Bromphenolblau
0,01 %	Xylencyanol
30 %	Glycerin

#### 5X TBE-Puffer

54,00 g	Tris
27,50 g	Borsäure
4,65 g	EDTA

Mit Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren.

### **2.6.5. DNA-Extraktion aus dem Gel mit Nucleo Trap®**

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde in einigen Versuchen das NucleoTrap® Gel Extraction Kit von Clontech benutzt. Dazu wurde die zu isolierende DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem wurden 600 µl Puffer NT1 (300 µl/100 mg Gel) und 10 µl Nucleo Trap Suspension pipettiert. Bei der Suspension handelt es sich um kleine Glaskügelchen, an die sich DNA anheften kann, und die so von anderen Bestandteilen abgetrennt wird. TE-Puffer löst die DNA dann wieder von der Glasmatrix ab. Der Ansatz wurde unter häufigem sanften Vermischen 10 Minuten bei 50 °C zum Aufschmelzen des Agarosegels inkubiert. Alles wurde bei Raumtemperatur und 10000 g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit je 500 µl Puffer NT2 und zweimal mit je 500 µl Puffer NT3 gewaschen, unter Verwerfen des Überstandes. Das entstehende Sediment trocknete für 10 bis 15 Minuten. Nun wurde es in 50 µl TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert und bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Vermischen für 10 Minuten inkubiert. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 10000 g wurde der Überstand mit der eluierten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **2.6.6. DNA-Extraktion aus dem Gel mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System**

Die DNA-Bande sollte unter UV-Licht so genau wie möglich aus dem Agarosegel (siehe 2.6.4.) ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt werden. Hierzu wurden pro 10 mg Gel 10 µl Membrane binding solution pipettiert und der Ansatz unter Mischen auf 60 °C erwärmt. Nach dem Auflösen des Gels wurde die Flüssigkeit auf eine zum Kit gehörende Spin-Säule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei bleibt die DNA am Säulenmaterial hängen, die anderen Bestandteile nicht. Anschließend wurde die Säule bei 10000 g 60 Sekunden lang zentrifugiert. Sie wurde mit 700 µl und 500 µl Wash solution in zwei Waschschritten von Gelresten befreit, wobei nach dem ersten Waschen eine Minute bei 10000 g zentrifugiert wurde, nach dem zweiten fünf Minuten bei der gleichen Drehzahl. Nun

wurde das Säulchen in ein steriles Eppendorf-Gefäß gesetzt und mit 20 – 50  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser eluiert. Bei der Elution mit 50  $\mu\text{l}$  Wasser wurde noch eine Fällung mit 100  $\mu\text{l}$  Ethanol und 5  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat über Nacht bei  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Nach der Zentrifugation bei 16100 g für 45 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Sediment zweimal mit je 250  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

### 2.6.7. Ligation mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Vektor

Zum Einbringen der PCR-Produkte in *Escherichia coli* (*E. coli*) müssen diese zuerst in einen Vektor eingebaut werden. Die Firma Promega bietet hierzu den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor an, der am 3'-Ende einen T-Überhang, also eine freie Thymin-Base, besitzt. Dadurch kann der Vektor mit dem PCR-Produkt mit einem einzelsträngigen Adenin-Nukleotid am Ende, eingefügt von der *Taq* DNA-Polymerase, eine Basenpaarung eingehen. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurde der Ansatz wie unten angegeben vermischt und über Nacht im Kühlschrank bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Ansatz:	5 $\mu\text{l}$	PCR-Produkt, vorgereinigt oder direkt nach der PCR
	6 $\mu\text{l}$	2x Rapid Ligation buffer
	0,25 $\mu\text{l}$	pGEM <sup>®</sup> -T Vektor (50 ng/ $\mu\text{l}$ )
	1 $\mu\text{l}$	T <sub>4</sub> DNA-Ligase (3 U/ $\mu\text{l}$ )

Anschließend konnte der Ligationsansatz direkt in kompetente Bakterien eingebracht oder bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  einige Zeit lang gelagert werden.

### 2.6.8. Transformation mit Roti<sup>®</sup>-Transform

Für die Transformation wurden frisch kompetent gemachte Stämme von *E. coli* (JM 109 und DH5 $\alpha$ ) benutzt. Beide Stämme wurden unter sterilen Bedingungen auf LB-Agar ohne weitere Zusätze ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Von diesem Ansatz wurde je eine Einzelkultur mit einem sterilen Zahnstocher aufgepickt und in 2 ml LB-Flüssigmedium überführt. Diese Flüssigkultur wuchs über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und ständigem Schütteln bei 200 UpM. Von dieser Übernachtkultur wurden 300  $\mu\text{l}$  steril in einen 250 ml-Kolben mit 30 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Unter den gleichen Bedingungen wie die Übernachtkultur wuchsen auch diese Bakterien, bis sie eine optische Dichte von 0,4 bis 0,7, gemessen mit einem Spektrophotometer bei 600 nm, erreicht hatten. Nun wurden 10 mal je 2 ml dieser Bakteriensuspension in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei 3000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Sediment in 100  $\mu\text{l}$  kaltem LB-Flüssigmedium resuspendiert. Jeweils fünf Ansätze wurden wie in der Anleitung angegeben vereinigt, um weniger Pipettierarbeit zu haben. Zu jedem der zwei hieraus resultierenden Reaktionsgefäße kamen unter sterilen Bedingungen und vorsichtigem Mischen 450  $\mu\text{l}$  Roti<sup>®</sup>-

Transform 1. Nun wurden noch je 50  $\mu\text{l}$  Roti<sup>®</sup>-Transform 2 zugegeben und erneut gemischt. Nach Aufteilen dieses Ansatzes in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 180  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension wurden diese für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Zu den fertigen kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Transformationsansätze wurden auf Eis für 30–60 Minuten inkubiert und anschließend auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal (siehe unten) ausgestrichen. Diese Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht.

Um zu gewährleisten, dass nur Bakterien mit Vektor wachsen, wurden dem Medium 500  $\mu\text{l}$ /100 ml LB-Agar einer Ampicillin-Stammlösung mit 20 mg/ml (0,1 mg Ampicillin/ml Medium Endkonzentration) zugesetzt. Für einen Hinweis darauf, ob der Vektor ein DNA-Fragment aufgenommen hat, wurde eine Blau-weiß-Selektion durchgeführt. Sie beruht auf einer Unterbrechung des bakteriellen *lacZ'*-Gens, das für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Glucosidase kodiert. Alleine besitzt dieses Fragment keine Aktivität, kann aber zusammen mit dem ebenfalls inaktiven C-terminalen  $\omega$ -Fragment wieder aktiv werden. Bakterienkolonien, bei denen das *lacZ'*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört wurde, bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß. Klone ohne eingebaute Fremd-DNA exprimieren das  $\alpha$ -Fragment und färben sich blau. Für diese Selektion wurde auf jede Agarplatte 20  $\mu\text{l}$  X-Gal in einer Konzentration von 50 mg/ml und 100  $\mu\text{l}$  0,1 M IPTG aufgebracht und verteilt, bevor die Bakterien darauf ausplattiert wurden.

#### LB-Medium

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH	auf pH 7
Bei festen Medien 15 g/l Agar	

#### **2.6.9. Anlegen einer Bakteriendauerkultur**

Waren einzelne Kolonien auf dem Agar zu sehen, wurden diese steril mit einem Zahnstocher in 4 ml flüssiges LB-Medium mit 20  $\mu\text{l}$  Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml) überführt. Über Nacht inkubierte der Ansatz zum Vermehren der Bakterien bei 37 °C und ständigem Schütteln bei 200 UpM. Von dieser Bakteriensuspension wurden nun steril 425  $\mu\text{l}$  in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 75  $\mu\text{l}$  sterilem Glycerin vermischt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so behandelten Bakterien können bei -80 °C dauerhaft gelagert werden.

#### **2.6.10. Plasmidextraktion mit dem Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit**

Für die Plasmidextraktion wurden Einzelkolonien wie bei dem Anlegen der Bakteriendauerkultur in steriles Flüssigmedium mit Ampicillin überführt und über Nacht zum Wachsen gebracht. Jeweils 2 x 1,5 ml der Suspension wurden in einem sterilen Reaktions-

gefäß bei 2500 g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 300 µl Puffer P1 durch vorsichtiges Mischen resuspendiert und anschließend mit 300 µl Puffer P2 gemischt. Zum Lysieren der Bakterien musste alles 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, bevor 300 µl eiskalter Puffer P3 zugegeben wurde und der Ansatz für fünf Minuten auf Eis stand. Dieser Schritt fällt die Bakterienbestandteile aus, die nun durch fünfminütige Zentrifugation bei 16100 g abgetrennt wurden. Nach einem erneuten Mischen der entstehenden Phasen wurde die Zentrifugation noch 10 Minuten fortgesetzt. Die DNA des Überstandes kann entweder direkt gefällt werden oder über Qiagen-tips weiter gereinigt werden, was für eine anschließende Sequenzierung notwendig ist.

Für das schnelle Protokoll wurden 800 µl Überstand mit 560 µl Isopropanol und 80 µl steriler 3 M Natriumacetatlösung gemischt und zum Fällern der DNA 30 Minuten lang bei 16100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und von der Flüssigkeit befreit. Es trocknete noch 10 Minuten bei Raumtemperatur, bevor es in 10 – 20 µl TE-Puffer oder autoklaviertem, demineralisiertem Wasser rückgelöst wurde.

Um eine größere Reinheit der DNA für eine Sequenzanalyse zu erhalten, war die Aufreinigung über eine Säule nötig. Dafür wurde der Überstand der Zentrifugation nach den Puffern P1 bis P3 auf eine mit 1 ml QF-Puffer äquilibrierte Säule pipettiert und lief durch. Die Säule wurde nun mit 4 ml QBT-Puffer nachgewaschen und die DNA mit 800 µl QC-Puffer eluiert. Der Durchlauf wurde dann wie bei dem schnellen Protokoll mit 560 µl Isopropanol in der Zentrifuge bei 16100 g eine halbe Stunde lang gefällt und sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Sediment getrocknet und ebenfalls in 10–20 µl Wasser oder TE-Puffer rückgelöst.

### 2.6.11. Restriktionsverdau der isolierten Plasmide

Um den Einbau des gewünschten PCR-Fragments und dessen Größe zu kontrollieren, wurden die Stücke mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid ausgeschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. In Abhängigkeit vom benutzten Vektor müssen unterschiedliche Restriktionsendonukleasen benutzt werden, um die einligierte Sequenz herauszuschneiden. Dafür nimmt man gewöhnlich 1 U Enzym pro Schnittstelle, Stunde und µg Plasmid.

Die Zusammensetzung des Verdaus für den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor war:

2-5 µl	Plasmidpräparation (aus 2.6.10.)
1 µl	10x Y <sup>+</sup> /Tango <sup>™</sup> Puffer mit BSA
0,5 µl	<i>BcuI</i> ( <i>SpeI</i> ) (10 U/µl)
0,25 µl	<i>Cfr42I</i> ( <i>SacII</i> ) (10 U/µl)
auf 10 µl	steriles Wasser



Dieser Ansatz stand bei 37 °C für drei oder mehr Stunden, bevor er eingefroren oder auf ein Gel aufgetragen wurde.

Der Verdau für den TOPO<sup>®</sup>-TA-Vektor enthielt:

2-5 µl	Plasmidpräparation (aus 2.6.10.)
1 µl	10x Y <sup>+</sup> /Tango <sup>™</sup> Puffer mit BSA
0,5 µl	<i>EcoRI</i> (10 U/µl)
auf 10 µl	steriles Wasser

Dieser Ansatz inkubierte genau drei Stunden im Brutschrank bei 37 °C, da das Enzym andernfalls an unspezifischen Stellen DNA zu schneiden beginnt und wurde anschließend auf dem Gel untersucht oder bei -20 °C eingefroren.

### **2.6.12. Quantifizierung der DNA**

Für die Bestimmung der genauen Mengen an DNA wurde ein UV-Photometer benutzt. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg DNA oder 40 µg RNA pro Milliliter Lösung. Das Verhältnis von der Absorption bei 260 und 280 nm sagt etwas über die Reinheit der Probe und mögliche Verunreinigung durch Proteine aus und sollte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2 liegen.

### **2.6.13. Sequenzierung**

Für die Sequenzanalyse wurden zwischen 1 und 10 µg Plasmid eingeschickt. Ein Teil der DNA wurde zu der Firma MWG-Biotech geschickt. Andere Proben wurde von Dr. S. Zauner am Institut für Zellbiologie und Angewandte Botanik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Primer von Amersham/Pharmacia oder mit IRD700/IRD800 markierte M13-20 Standardprimer benutzt. Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierautomaten LI-COR 4200 der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Auch für diese Sequenzierung wurden zwischen 1 und 10 µg Plasmid benötigt.

### **2.6.14. Datenbankvergleich mit der FASTA-Datenbank**

Die erhaltenen Sequenzen wurden in die FASTA-Datenbank ([www.ebi.ac.uk/fasta33](http://www.ebi.ac.uk/fasta33)) (Pearson und Lipman 1988) eingegeben, wo sich Ähnlichkeiten mit bereits bekannten cDNA-Sequenzen von Methyltransferasen finden lassen. Nur wenn das möglich ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gefundenen Genfragment um ein Stück einer Methyltransferase handelt und sich eine Suche nach der vollen Länge der cDNA und Sequenz lohnt.

### 2.6.15. Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit dem GeneRacer™ Kit

Um die volle Länge der Methyltransferase-cDNA zu erfassen, musste die RACE-Methode (rapid amplification of cDNA ends) durchgeführt werden. Die Firma Invitrogen bietet mit dem GeneRacer™ Kit eine geeignete Zusammenstellung an Reagenzien dafür an. Als Ausgangsmaterial wurde RNA benutzt, die mittels der in Kapitel 2.6.1. beschriebenen Methode nach Giuliano et al. (1993) aus 6 Tage alten Zellen von *Linum nodiflorum* gewonnen wurde. Als nächster Schritt wurden RNAs, denen ein intaktes 5'-Ende (cap-Struktur) fehlt, durch das Enzym calf intestinal phosphatase (CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Auf intakte RNA hat diese Reaktion keinen Einfluss.



Für diesen Schritt wurde auf Eis in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt:

6,2 µl	RNA
1,0 µl	10x CIP Puffer
1,0 µl	RNase Out™ (40 U/µl)
1,0 µl	CIP (10 U/µl)
0,8 µl	DEPC-Wasser

Dieser Ansatz wurde bei 50 °C eine Stunde inkubiert, bevor er nach kurzem Zentrifugieren auf Eis gestellt wurde. Nun folgte eine RNA-Fällung:

90 µl	DEPC-Wasser
100 µl	Phenol-CHCl <sub>3</sub>

wurden zugesetzt und der Ansatz 30 Sekunden gemischt. Dann kam alles zur Fällung für fünf Minuten in die Zentrifuge bei 16100 g. Die Oberphase wurde nun abgenommen und versetzt mit:

2 µl	Muschelglykogen (10 mg/ml)
10 µl	3 M Natriumacetat pH 5,2
220 µl	95 % Ethanol

Alles wurde in flüssigem Stickstoff für 15 Minuten gefroren und dann 20 Minuten bei 4 °C und 16100 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Sediment mit 70 % Ethanol

gewaschen und nach zweiminütiger Zentrifugation zwei Minuten lang getrocknet. Es wurde dann durch vorsichtiges Drehen in 7 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Von der intakten RNA mit voller Länge wurde nun die Kappenstruktur abgespalten. Dafür wurde tobacco acid pyrophosphatase (TAP) benutzt.

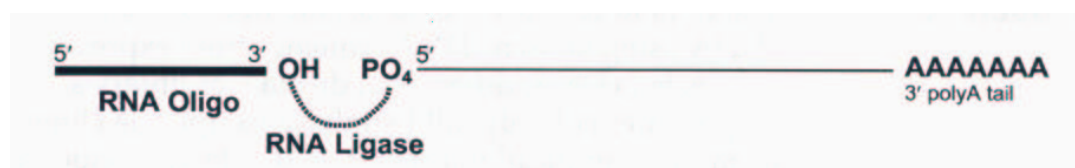


Es wurden bei 37 °C eine Stunde inkubiert:

7 µl	mit CIP vorbehandelte RNA
1 µl	10x TAP Puffer
1 µl	RNase Out™ (40 U/µl)
1 µl	TAP (0,5 U/µl)

Nach der Inkubation wurde wieder wie oben beschrieben eine RNA-Fällung mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Nachdem das entstandene Sediment in 7 µl DEPC-Wasser rückgelöst war, war es bereit für den nächsten Schritt, die Ligation des GeneRacer™ RNA Oligo an das 5'-Ende.

Durch diese Ligation wurde eine bekannte Sequenz für die GeneRacer™ PCR Primer eingefügt, mit denen nach Umschreiben der RNA in cDNA eine PCR durchgeführt werden kann.



Die Sequenz des GeneRacer™ RNA Oligo ist 44 Basen lang und lautet:

5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'

Für die Ligation wurden die 7 µl entkappte RNA in die vorportionierten Reaktionsgefäße mit GeneRacer™ RNA Oligo (je 0,25 µg) pipettiert und vorsichtig gemischt. Zum Öffnen der RNA-Sekundärstrukturen wurde der Ansatz fünf Minuten bei 65 °C erhitzt und dann zwei Minuten lang auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden folgende Reagenzien zugemischt:

1 µl	10x Ligase Puffer
1 µl	10 mM ATP
1 µl	RNase Out™ (40 U/µl)
1 µl	T4 RNA Ligase (5 U/µl)

Alles inkubierte bei 37 °C eine Stunde lang, wurde dann kurz zentrifugiert und der Ansatz auf Eis gestellt. Im Anschluss fand wieder eine RNA-Fällung statt, wie oben beschrieben. Das entstandene Sediment wurde in 10 µl DEPC-Wasser gelöst und konnte dann in cDNA umgeschrieben werden.

Bei diesem Schritt entstand cDNA mit bekannten Sequenzen am 5'- und 3'-Ende. Es wurde dazu das Enzym SuperScript™ III Reverse Transkriptase benutzt. Hierbei handelt es sich um eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MM LV-RT), die so modifiziert wurde, dass sie keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr besitzt und dadurch relativ lange Transkripte ermöglicht.



Als Primer diente der 60 Basen lange GeneRacer™ Oligo dT Primer. Dessen Sequenz lautet:  
 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub>-3'

Zu den 10 µl ligierter RNA wurde zugegeben:

1 µl	GeneRacer™ Oligo dT Primer
1 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
1 µl	steriles destilliertes Wasser

Zum Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen wurde wieder fünf Minuten bei 65 °C erhitzt, auf Eis eine Minute lang abgekühlt und kurz zentrifugiert. Dann wurden zugefügt:

4 µl	5x First Strand Puffer
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	RNase Out™ (40 U/µl)
1 µl	SuperScript™ III RT (200 U/µl)

Nach gutem Mischen und kurzem Zentrifugieren inkubierte die Reaktion bei 50 °C 50 Minuten lang. Ein Zeitraum von 30–60 Minuten wird von Invitrogen vorgeschlagen. Gestoppt

wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase durch Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurde zum Verdauen des RNA-Strangs 20 Minuten bei 37 °C inkubiert mit:

RNase H (2 U/μl) 1 μl

Die cDNA war nun fertig zum Amplifizieren in einem PCR-Ansatz mit genspezifischen Primern.

### 2.6.16. Amplifizierung der 5'- und 3'-Enden mittels PCR

In getrennten Ansätzen wurden das 5'- und das 3'-Ende der Methyltransferase amplifiziert. Um eindeutige Ergebnisse zu erzielen, wurde eine zweite PCR mit Primern durchgeführt, die innerhalb der bekannten Sequenz liegen. Diese Methode nennt man nested PCR. Es werden dadurch Fehler vermindert und deutlich definierte Banden auf dem Agarosegel erzielt.



Für den Ansatz am 5'-Ende wurden für die erste PCR folgende Primer benutzt:

GeneRacer™ 5'-Primer mit 23 Basen und einem angegebenen Schmelzpunkt von 74 °C. Berechnet man den Schmelzpunkt wie bei den selbstgemachten Primern über die Methode der Firma MWG ([www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)), ergibt sich ein Schmelzpunkt von 66 °C:

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

Dieser Primer liegt zu dem ersten Primer des Kits wie folgt:

GeneRacer™ RNA Oligo 5' **CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA** 3'

Die Primer sind wie folgt positioniert:

- GeneRacer™ 5' Primer: **CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA**
- GeneRacer™ 5' Nested Primer: **CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA**

Gen 1 5'-Primer (revers komplementär) mit 27 Basen und einem Schmelzpunkt von 65 °C:

5'-CATATCCCCTGCAATGAACTCAACACC-3'

Gen 2 5'-Primer (revers komplementär) mit 25 Basen und einem Schmelzpunkt von 69,5 °C:

5'-GGAAGGGACGGAGGCGAACATGTCG-3'

Die erste PCR für das 3'-Ende der cDNA wurde auf die gleiche Weise durchgeführt. Auch hier wurde im Anschluss noch eine zweite PCR durchgeführt, um die Qualität des Produkts zu verbessern. Dies sieht schematisch dargestellt so aus:



GeneRacer™ 3'-Primer mit 25 Basen und einem Schmelzpunkt von 76 °C. Nach Bestimmung des Schmelzpunktes durch die MWG-Methode ergibt sich ein Schmelzpunkt von 64,6 °C:  
5'-GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACG-3'

Gen 1 3'-Primer mit 24 Basen und einem Schmelzpunkt von 66,1 °C:  
5'-CCATCGCACTTTGCACACCTCAGC-3'

Gen 2 3'-Primer mit 27 Basen und einem Schmelzpunkt von 65 °C:  
5'-GGTGTGAGTTCATTGCAGGGGATATG-3'

Alle Ansätze für die PCR enthielten:

36,0 µl	Steriles Wasser
5,0 µl	10x Expand High Fidelity Puffer
3,0 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
1,0 µl	dNTP-Mix 10 mM
0,5 µl	cDNA (aus 2.6.15.)
1,2 µl	Genspezifischer Primer 10 mM
3,0 µl	GeneRacer™ 5'/3' Primer
0,5 µl	Expand High Fidelity Enzyme Mix (3,5 U/µl)

Bei dem Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche handelt sich um eine Mischung aus thermostabiler *Taq* DNA Polymerase und einer korrekturfähigen Proofreading-Polymerase, die vor Mutationen im PCR-Ansatz schützen soll.

Das Programm für die Reaktionen lautete wie folgt:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
5	94 °C	30 sek
	72 °C	1 min
25	94 °C	30 sek
	64 °C	30 sek
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min

Für die nested PCR wurde ein anderes Programm benutzt, da hier mit der Temperatur variiert wurde, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Für das 5'-Ende wurden folgende Primer eingesetzt:

GeneRacer™ 5'-Nested Primer, 26 Basen, Schmelztemperatur 78 °C (nach der Berechnung über die Internetseite von MWG 64,8 °C):

5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

Gen 1 5'-nested Primer (revers komplementär) mit Schmelzpunkt 67,7 °C und 22 Basen:

5'-CGTGCTTGACGCCAGGGAGAGG-3'

Für dieses Fragment genügte die PCR bei 67, 64 und 61 °C, um es einklonieren zu können.

Gen 2 5'-nested Primer (revers komplementär) mit Schmelzpunkt 64,4 °C und 24 Basen:

5'-CCGCGCACTTCATATCAGGAAACG-3'

Bei diesem Fragment mussten zwei Versuche unternommen werden, um eine genügend starke Bande auf dem Agarosegel zu sehen. Es wurden zuerst die Annealingtemperaturen 67, 64 und 61 °C getestet, dann in einer zweiten PCR 63, 60, 58 und 56 °C.

Für das 3'-Ende wurden als nested Primer verwendet:

GeneRacer™ 3'-Nested Primer mit 23 Basen und einem Schmelzpunkt von 64,2 °C nach MWG:

5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

Gen 1 3'-nested Primer mit 26 Basen und 64,8 °C Schmelzpunkt:

5'-GGTCAGTGGTCGTTATCTTACCTACC-3'

Für dieses Fragment war eine PCR bei 66, 63, 60 und 57 °C ausreichend.

Gen 2 3'-nested Primer mit 26 Basen und Schmelzpunkt 63,2 °C:

5'-GCAGACGCCATCTTACTCAAGGTAA-3'

Es wurde eine PCR bei 66, 63, 60 und 57 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde die PCR wiederholt mit 56, 55, 54 und 53 °C.

Für die PCR wurde jeweils folgender Ansatz gemischt:

36,5 µl	Steriles Wasser
5,0 µl	10x PCR Puffer
3,0 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
1,0 µl	dNTP- Mix (je 10 mM)
1,0 µl	GeneRacer™ 3'/5'-Nested Primer
1,0 µl	Genspezifischer nested Primer 10 mM
2,0 µl	cDNA der ersten PCR
0,5 µl	Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas)

Das Programm sah für alle nested PCR-Ansätze so aus:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
30	94 °C	30 sek
	53 – 67 °C	30 sek
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min

Nach der PCR wurde ein Aliquot von 4 µl jedes Ansatzes auf einem 0,7 % Agarosegel auf Erfolg überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt direkt in den TOPO<sup>®</sup> Vektor mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing von der Firma Invitrogen inkloniert.

### 2.6.17. Ligation und Transformation mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit

Für die im Kit der Firma Invitrogen enthaltenen chemisch kompetent gemachten *E. coli* Bakterienzellen OneShot<sup>®</sup> TOP10 war folgender Ligationsansatz nötig:

0,5 – 4 ml	PCR-Ansatz (aus 2.6.10.)
1 µl	Salzlösung
auf 5,3 µl	Steriles Wasser
0,7 µl	TOPO <sup>®</sup> TA Vektor



Alles wurde vorsichtig vermischt und inkubierte fünf bis 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde der Ansatz auf Eis gestellt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu einem Ansatz vorportionierte OneShot<sup>®</sup> TOP10 *E. coli* gegeben und vorsichtig gemischt. Der übrige Ligationsansatz wurde bei -20 °C eingefroren.

Der Transformationsansatz inkubierte auf Eis für zwanzig Minuten, wobei Invitrogen fünf bis dreißig Minuten vorschlägt. Die Bakterien wurden für dreißig Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Mit 250 µl S.O.C.-Medium wurden die Bakterien in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen horizontal mit 200 UpM bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden sie auf vorgewärmte LB-Platten mit 0,1 mg Ampicillin pro ml Medium ausgestrichen, wobei jeweils 50 µl, 75 µl oder 125 µl der Bakterien-suspension aufgebracht wurden. Diese Platten standen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, damit Einzelkolonien wachsen konnten. Die gewachsenen Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in 4 ml flüssiges LB-Amp-Medium überführt und wuchsen unter Schütteln bei 220 UpM bei 37 °C über Nacht. Nun konnten die Plasmide extrahiert und Dauerkulturen angelegt werden. Mit den gereinigten Plasmiden konnten die Sequenzen des 5'-Endes und des 3'-Endes bestimmt werden. Da die einzelnen Sequenzen partiell überlappten, konnte so die volle Länge der cDNA ermittelt werden.

#### **S.O.C. Medium**

2 %	Trypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glucose

#### **2.6.18. PCR-Amplifikation der Vollängesequenz**

Mit dem Wissen der gesamten cDNA-Sequenz der Methyltransferase konnten nun Primer für die DNA vom 5'- bis zum 3'-Ende bestellt werden. Da als nächstes die Expression des Proteins in *E. coli*-Stämmen erfolgen sollte, mussten spezielle Expressionsvektoren für die spätere Ligation gewählt werden. Abhängig vom benutzten System mussten Primer gewählt werden, die ein Einklonieren der Vollängesequenz in den Vektor möglich machen konnten. Dafür mussten mögliche Schnittstellen gefunden werden, die nicht in der Sequenz selbst vorkamen. Die im Gen befindlichen Schnittstellen wurden mit Hilfe der im Internet verfügbaren Software NebCutter V2.0 überprüft. Für den gewählten Vektor pTrc99a waren alle benutzbaren Schnittstellen auch im Gen vorhanden, daher mussten andere über die Primer in die cDNA gebracht werden. Außerdem musste über den 5'-3'-Primer eine Ribosomenbindestelle und in den 3'-5'-Primer ein Stopp-Codon eingefügt werden. Um eine spätere schnelle Möglichkeit der Proteinaufreinigung zu erhalten, wurde am C-Terminus eine

Poly-Histidinsequenz eingefügt, mit deren Hilfe eine Reinigung über eine Nickelmatrix ermöglicht wurde.

Die alle diese Voraussetzungen erfüllenden Primer waren folgendermaßen konstruiert:

MT volle Länge 5'-3'-Primer, mit 33 Basen und einem Schmelzpunkt von 58,2 °C im cDNA-bindenden Bereich:

5'-ATGAATTCAGGACATATGGGCTCAGCACCGGAA-3'

MT volle Länge 3'-5'-Primer, revers komplementär, mit 31 Basen und einem Schmelzpunkt von 62,1 °C im bindenden Teil:

5'-ATAGGTACCCTATCAGGCGGCAGTTTTGAGG-3'

MT volle Länge 3'-5'-Primer mit der Histidin-Markierung, revers komplementär, mit 49 Basen und einem Schmelzpunkt von 54,3 °C im bindenden Teil:

5'-ATAGGTACCCTATCAGTGATGATGATGATGGGCGGCAGTTTTGAGG-3'

Der 5'-3'-Primer wurde einmal zusammen mit dem ersten und einmal zusammen mit dem zweiten 3'-5'-Primer eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial wurde cDNA benutzt, die wie unter 2.6.1. und 2.6.2. beschrieben, hergestellt wurde. Der einzelne Ansatz für die PCR sah folgendermaßen aus:

5,0 µl	10 x PCR-Puffer ohne Ammoniumsulfat
3,0 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1,0 µl	10 mM dNTP-Mix
2,0 µl	cDNA als Vorlage
1,0 µl	10 mM 5'-3'-Primer MT volle Länge
1,0 µl	10 mM 3'-5'-Primer MT volle Länge mit oder ohne Histidin-Anhang
0,5 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)
36,5 µl	steriles Wasser

Für die Proben ohne Histidin-Markierung wurden 53 °C und 58 °C als Annealingtemperatur, für die anderen 50 °C und 55 °C gewählt. Das verwendete PCR-Programm lief wie folgt ab:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
30	94 °C	30 sek
	50 - 58 °C	30 sek
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min

Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel mit 1 % Agarose NEEO überprüft (s. 2.6.4.) Die PCR-Proben konnten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, bis sie weiter verarbeitet wurden.

### 2.6.19. Aufreinigung mit Qiaquick<sup>®</sup> spin Säulen

Direkt zu den Proben der Polymerase Kettenreaktion wurden fünf Volumina an Puffer PB zugesetzt und gemischt. Die Lösung wurde auf eine Qiaquick<sup>®</sup> Säule pipettiert und für 60 Sekunden bei 16200 g zentrifugiert. Die Säule wurde nun mit 750  $\mu\text{l}$  Puffer PE versetzt und zum Durchwaschen erneut für eine Minute zentrifugiert. Nach Abgießen des Durchlaufs wurde die Säule noch einmal 60 Sekunden leer zentrifugiert, um Reste des Puffers zu entfernen. Nun konnten die sauberen DNA-Stücke durch einminütige Inkubation mit 30  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer EB von der Säule gelöst werden und nach drei Minuten Zentrifugation bei 16200 g in ein sauberes Reaktionsgefäß gespült werden.

### 2.6.20. Einbau der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pTrc99a

Vor der Ligation der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pTrc99a mussten zuerst Vektor und DNA verdaut werden, um zueinander passende Enden zu generieren.

Für den Vektor wurde folgender Ansatz bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert:

5 $\mu\text{l}$	pTrc99a-Vektor (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
3 $\mu\text{l}$	10x Y <sup>+</sup> /Tango <sup>™</sup> Puffer mit BSA
2 $\mu\text{l}$	<i>KpnI</i>
20 $\mu\text{l}$	Steriles, demineralisiertes Wasser
1 $\mu\text{l}$	<i>EcoRI</i> , Zugabe nach sechs bis acht Stunden, danach noch 3 Stunden Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Das PCR-Produkt wurde über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  verdaut wie folgt:

30,0 $\mu\text{l}$	Aufgereinigtes PCR-Produkt
3,5 $\mu\text{l}$	10x Y <sup>+</sup> /Tango <sup>™</sup> Puffer mit BSA
1,0 $\mu\text{l}$	<i>KpnI</i>
0,5 $\mu\text{l}$	Steriles, demineralisiertes Wasser
1,0 $\mu\text{l}$	<i>EcoRI</i> , Zugabe nach sechs bis acht Stunden, danach noch 3 Stunden Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Sowohl der Vektor als auch die DNA wurden anschließend ein zweites Mal über Qiaquick<sup>®</sup> spin Säulchen aufgereinigt, wie bereits in Kapitel 2.6.19. beschrieben.

Nun folgte eine Ligation über Nacht mit ansteigender Temperatur von  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in dem Ansatz:

18 µl	vorverdautes PCR-Produkte
3 µl	10x Rapid Ligation buffer
5 µl	vorverdauter pTrc99a-Vektor
4 µl	T <sub>4</sub> DNA-Ligase (3 U/µl)

Wie in Kapitel 2.6.9. bereits beschrieben, konnten nun kompetente *E. coli* Bakterien vom Stamm JM 109 angelegt und 15 µl des Ligationsansatzes in die Bakterien eingebracht werden. Auf vorgewärmten LB-Festmedium-Platten mit 0,1 mg Ampicillin in 1 ml Medium wuchsen die Bakterien bei 37 °C über Nacht. Nach Plasmidpräparation und anschließendem Verdau konnten die Bakterienkolonien selektiert werden, die die komplette cDNA in ihrem Plasmid enthielten. Diese konnten nun zur Bildung von Protein induziert werden.

### 2.6.21. Heterologe Expression der Methyltransferase

Für die Expression der Methyltransferase wurde zunächst eine Übernachtskultur der *E. coli* Kultur mit kompletter cDNA-Sequenz im Plasmid pTrc99a angeimpft. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas von der gefrorenen Dauerkultur in steriles LB-Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml Medium gegeben. Diese Vorkultur wuchs bei 37 °C und Schütteln bei 200 UpM über Nacht. Von dieser Vorkultur wurde eine 1:10 Verdünnung mit frischem sterilem LB-Amp-Medium hergestellt. Dieser Ansatz wurde weiter geschüttelt und bei 37 °C inkubiert bis sich eine optische Dichte bei 600 nm von 0,9 messen ließ. Der Ansatz wurde nun in zwei gleich große Volumina geteilt, um später eine Kontrollprobe zum Vergleich zur Verfügung zu haben. Bei einem der beiden Teile wurde eine Endkonzentration von 1 mM sterilfiltriertem Isopropylthiogalactosid (IPTG) eingestellt. Fünf Stunden mussten der Induktionsansatz und die Kontrolle bei 37 °C unter Schütteln kultiviert werden, bis sie geerntet werden konnten. In dieser Zeit sollten die mit IPTG behandelten Bakterien das Protein exprimieren. Zum Ernten wurden die Bakterien bei 4 °C und 5537 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die entstehenden Bakteriensedimente wurden vom Überstand befreit, gewaschen, gewogen und über Nacht bei -70 °C gelagert. Die gefrorenen Bakterien wurden dann mit dem zehnfachen Volumen an Aufschlusspuffer wieder aufgetaut und mit dem Ultraschallprozessor bei 0,3 Cycles und 100 % für zwei mal 30 Sekunden zerstört.

#### Aufschlusspuffer:

20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8

1 mM EDTA

1 mM Benzamidin-HCl

5 mM 6-Aminocapronsäure

1 mM 1,4-Dithiothreitol (wurde bei Proben zur weiteren Aufreinigung nicht zugefügt, da DTT das Nickel der Matrix reduziert und das Material damit unbrauchbar machen würde)

Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 5050 g für 10 Minuten konnte der Überstand für erste Enzymtests benutzt werden. Alternativ konnte ein erster Reinigungsschritt über eine Nickelmatrix durchgeführt werden.

### **2.6.22. Reinigung des exprimierten Proteins**

Bei den heterolog exprimierten Methyltransferasen mit sechsfachem His-Anhang, konnte eine weitere Aufreinigung des Enzymextrakts erfolgen. Hierbei musste zunächst das Enzym vom Aufschlusspuffer in den His-Tag-Bindepuffer überführt werden. Dies geschah über eine PD-10-Säule, wie sie bereits zum Entsalzen der Enzymextrakte benutzt wurde. Auch hier wurden 2,5 ml Enzymextrakt aus Bakterien auf die Säule gegeben und nach Durchtropfen der Flüssigkeit mit 3,5 ml His-Tag-Bindepuffer wieder eluiert. Zu diesem Proteinextrakt wurden 700 µl konzentrierte suspendierte Nickel-Matrix (His-Slurry von der Firma Novagen) gegeben. Bei 4 °C wurde der Ansatz eine Stunde lang geschüttelt, damit die Histidin-Reste des Enzyms an die Nickelmatrix binden konnten. Anschließend wurde die Mischung in eine kleine Säule mit Filter überführt und bei 4 °C mit fünfmal 2 ml His-Tag-Waschpuffer gewaschen. Jede dieser Fraktionen wurde getrennt gesammelt. Nach dem Auswaschen überschüssigen Enzyms, bakteriellen Proteins und weiterer ungebundener Bestandteile wurde das Säulenmaterial nun mit viermal 500 µl His-Tag-Elutionspuffer vom exprimierten Enzym befreit. Dabei verdrängt ein hoher Gehalt an Imidazol die Histidinreste vom Nickel der Matrix. Zur Kontrolle des Reinigungseffekts wurde mit allen Proben eine Elektrophorese über ein SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt und mit Coomassie-Blue gefärbt (siehe 2.3.3.3.).

#### His-Tag-Bindepuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

#### His-Tag-Waschpuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

#### His-Tag-Elutionspuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

Neben dieser Aufreinigung wurde auch eine großvolumige Aufreinigung mit einer Trennung über eine HPLC-Säule durchgeführt. Dafür wurden 1000 ml Bakteriensuspension wie oben beschrieben angesetzt und mit IPTG induziert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und Trennung des Überstandes von dem Bakteriensediment wurden die Proben gewogen und bei -70 °C über Nacht gefroren. Zum Zerkleinern der Bakterien wurden die Sedimente mit dem 10-fachen Volumen an His-Tag-Bindepuffer versetzt und dreimal für je 30 Sekunden mit dem Ultraschallprozessor zerkleinert wie oben beschrieben. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei 4220 g und 4 °C zentrifugiert, wodurch der Enzymextrakt von den festen Bakterienbestandteilen getrennt wurde. Der Überstand wurde filtriert und direkt mit verschiedenen Substraten getestet oder säulenchromatographisch weiter aufgereinigt. Für diese Reinigung wurde eine His-NTA-Superflow Säule mit einer Länge von 11 cm, einem Durchmesser von 1 cm und einem Bettvolumen von 8,6 ml mit His-Tag Bindepuffer äquilibriert. Mit einem Fluss von 1 ml/min wurden dann 10 ml Proteinextrakt aufgespült, wobei Fraktionen von 5 ml gesammelt wurden. Nun wurde bis zu einer konstanten Absorption bei 280 nm mit His-Tag-Waschpuffer gespült. Die anschließende Elution der gebundenen Proteine erfolgte isokratisch durch Spülen mit His-Tag-Elutionspuffer. Die Fraktionen mit einer ansteigenden Absorption wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf die Proteinreinheit überprüft, da bei diesen das gesuchte Protein von der Säule verdrängt wurde.

### 2.6.23. Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität

Die heterolog exprimierte Methyltransferase wurde auf Aktivität mit verschiedenen Substraten getestet. Da nicht für alle verwendeten Substrate HPLC-Standardsubstanzen der potentiellen Produkte zur Verfügung standen, wurden diese Tests mit radioaktiv markiertem SAM durchgeführt. Dazu wurden die Enzymtests wie folgt angesetzt:

5 µl	10 mM Substrat
100 µl	Enzymextrakt
100 µl	50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	<sup>14</sup> C-markiertes SAM (370 kBq/500 µl)

Dieser Ansatz inkubierte eine Stunde bei 37 °C und wurde dann mit 400 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Von dieser organischen Phase wurden nach Zentrifugation für drei Minuten bei 16000 g 200 µl mit 5 ml Rotiszint<sup>®</sup> eco plus für hydrophobe Proben gemischt und im 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter der Firma Pharmacia LKB Wallac fünf Minuten lang vermessen. Auf diese Weise wurden die folgenden Substanzen als Substrate überprüft:

### Lignane

4'-Demethylpodophyllotoxin  
Desoxypodophyllotoxin  
Hydroxymatairesinol  
Matairesinol  
Pinoresinol  
β-Peltatin  
Yatein

### Phenole

2,3-Dimethoxyphenol  
2,4-Dihydroxybenzaldehyd  
3,4-Dimethoxyphenol  
3,5-Dihydroxyanisol  
3,5-Dihydroxybenzoesäure  
3,5-Dimethoxyphenol  
3-Methoxyphenol  
4-Methoxyphenol  
Brenzcatechin  
Carvacrol  
Guaiacol  
Iodophenol  
Isovanillinsäure  
m-Cresol

### Phenylpropane

4-Cumarsäure  
5-Hydroxyferulasäure  
3-Hydroxyzimtsäure  
Caffeoyl-CoA  
Coniferylalkohol  
4-Cumaroyl-CoA  
Eugenol  
Ferulasäure  
Ferulasäuresuccinat  
Feruloyl-CoA  
Hydrokaffeesäure  
Isoferulasäure  
Kaffeesäure  
Kaffeesäuremethylester  
Sinapinsäure  
Zimtsäure

### Triterpene

Aescin  
Ginsenosid  
g-Strophantin  
Lanatosid C

o-Cresol  
Orcinol  
Phenol  
Phloroglucin  
Protocatechualdehyd  
Protocatechusäure  
Resorcinol  
Salicylsäure  
Syringinsäure  
Syringylaldehyd  
Thymol (phenolisches Monoterpen)  
Vanillin  
Vanillinsäure

### Benzopyran-Derivate: Flavonoide und Catechine

Epicatechin  
5-Hydroxyflavanon  
7-Hydroxy-5-methoxyflavanon  
7-Hydroxyflavanon  
Apigenin (Flavon)  
Catechin  
Dihydrokämpferol  
Dihydroquercetin  
Dihydromyricetin  
Eriodictyol (Flavanon)  
Genistein (Isoflavon)  
Hesperidin  
Homoeriodictyol (Flavanon)  
Isorhamnetin  
Kämpferol  
Luteolin (Flavon)  
Naringenin (Flavanon)  
Pentahydroxyflavanon  
Pinocembrin (Flavanon)  
Quercetin  
Rutin  
Tricetin  
Vitexin-4'-rhamnosid

### Sonstige

2,4-Dihydroxychinolin  
Aloin (1,8-Dihydroxyanthrachinon)  
Atropin (Tropanalkaloid)  
Chlorogensäure  
Maniferin (Xanthonderivat)  
Menthol (alkoholisches Monoterpen)  
Nerolidiol (Monoterpen)  
Phenylalanylamin  
Phloretin (Phenyl-phenylethylketon)  
Resveratrol (Stilben)  
Shikimisäure  
Tannin

### Cumarine

5-Methoxyumbelliferon  
Bergapton  
Daphnetin  
Scopoletin



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Beschreibung der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase

#### 3.1.1. Nachweis der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase

Bisher war die Existenz dieses Enzyms in *Linum nodiflorum* nicht wissenschaftlich belegt. Es ist hier erstmals gelungen, ein Testsystem zu entwickeln, mit welchem der Umsatz von  $\beta$ -Peltatin zu  $\beta$ -Peltatin-A Methylether reproduzierbar nachgewiesen werden kann. Als Methylgruppendonator konnte SAM ermittelt werden. Da sich der entstehende  $\beta$ -Peltatin-A Methylether mit Ethylacetat ausschütteln lässt, kann er aus dem Versuchsansatz abgetrennt und nach dem Eintrocknen in Methanol rückgelöst werden. Die Aufnahme eines Absorptionsspektrums ergab eine maximale Absorption bei 280 nm. Also wurde diese Wellenlänge für die Detektion nach HPLC-Trennung benutzt. Als Laufmittel zeigten Acetonitril-Wassergemische mit 30 bis 50 % Acetonitril eine gute Auftrennung der verschiedenen Komponenten des Testansatzes, die sich in Ethylacetat lösen. Damit stand ein System zur Verfügung, um eine Charakterisierung des Enzyms durchzuführen.

#### 3.1.2. Untersuchung verschiedener Zellkulturlinien

Für die Suche nach einem geeigneten Zellkultursystem wurden Suspensionskulturen verschiedener *Linum*-Arten wie unter Kapitel 2.2.1. beschrieben aufgearbeitet und die spezifischen Aktivitäten der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase miteinander verglichen. Dabei konnten Kulturen gefunden werden, in denen die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase nicht oder kaum aktiv war, aber auch solche, die eine gute Aktivität aufwiesen. Einen Überblick über die Kulturen gibt die Abbildung 10. Die Kulturen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten sind demnach *Linum nodiflorum* braun, wenn sie im Licht kultiviert wurde, *Linum flavum* und zwei Linien von *Linum album*. Für die weiteren Enzymtests wurden deswegen Zellen der Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* braun benutzt.

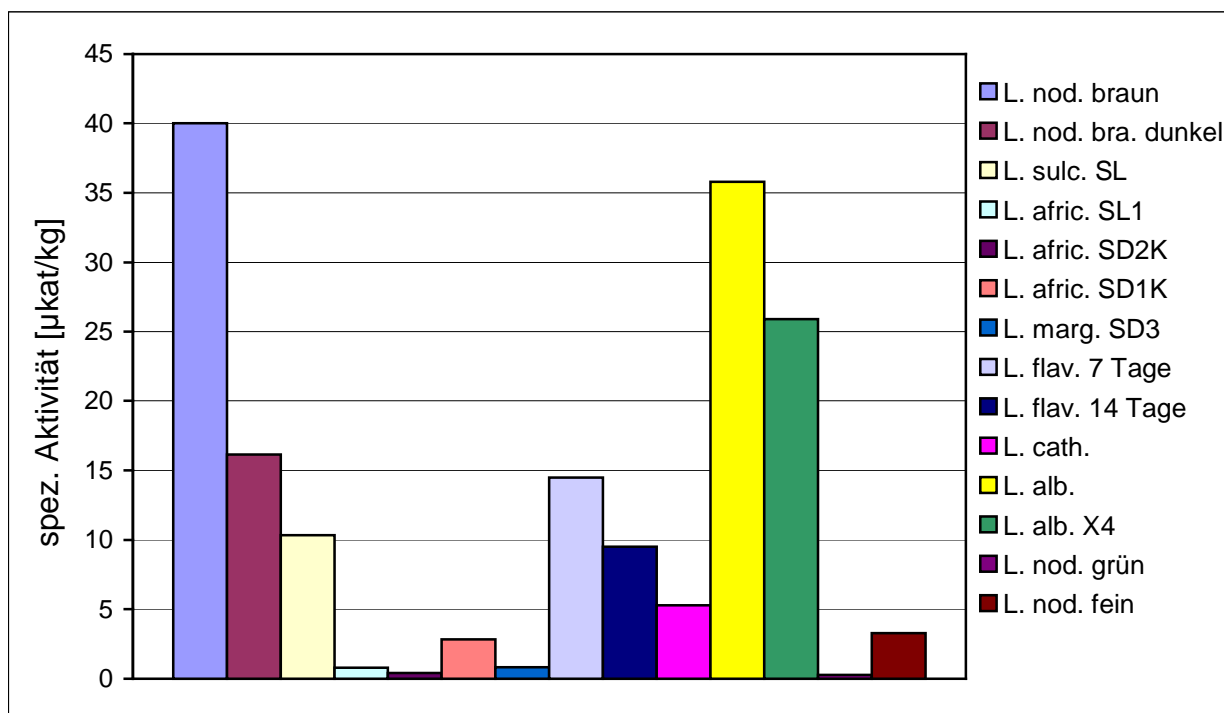


Abb. 10: Spezifische Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in Proteinextrakten aus unterschiedlichen Suspensionskulturen von *Linum*: *L. nod.*: *Linum nodiflorum*, *L. sulc.*: *Linum sulcatum*, *L. afric.*: *Linum africanum*, *L. marg.*: *Linum marginale*, *L. flav.*: *Linum flavum*, *L. cath.*: *Linum catharticum* und *L. alb.*: *Linum album*.

### 3.1.3. NMR-Analytik des $\beta$ -Peltatin-A Methylether

Mit den aus verschiedenen Enzymtests gesammelten Produktproben wurden NMR-Spektren aufgenommen um zu zeigen, dass hierbei wirklich  $\beta$ -Peltatin-A Methylether (PAM, Abbildungen 11 und 12) entstanden war. Die Abbildung 13 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der als PAM identifizierten Substanz. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und auf Tetramethylsilan (TMS) als internen Standard bezogen. Als Lösungsmittel wurde  $\text{CDCl}_3$  verwendet, welches daher auch in dem erhaltenen Chromatogramm zu finden ist. Die chemischen Verschiebungen wurden berechnet und mit dem erhaltenen Muster verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei der gesammelten Substanz um  $\beta$ -Peltatin-A Methylether handelt. Für die Zuordnung der einzelnen Peaks in den NMR-Spektren wurde das Molekül auf zwei unterschiedliche Arten durchgezählt. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen eine willkürliche Beschriftung, die dazu dient, die Peaks der Spektren zuordnen zu können. Unter Abbildung 12 steht die Nummerierung der C-Atome wie sie nur für die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums durchnummeriert wurden, um ähnlichen Strukturen ähnliche Nummern zuzuordnen und der H-Atome für die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums, die normalerweise nicht in einer festen Reihenfolge durchnummeriert werden.

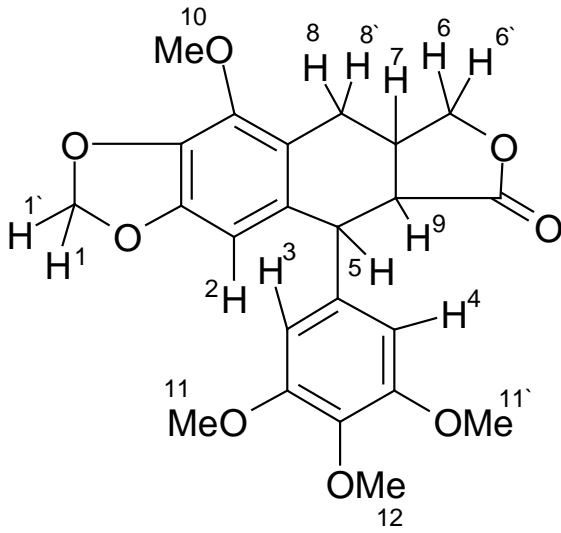


Abb. 11: Beschriftung von PAM für die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums.

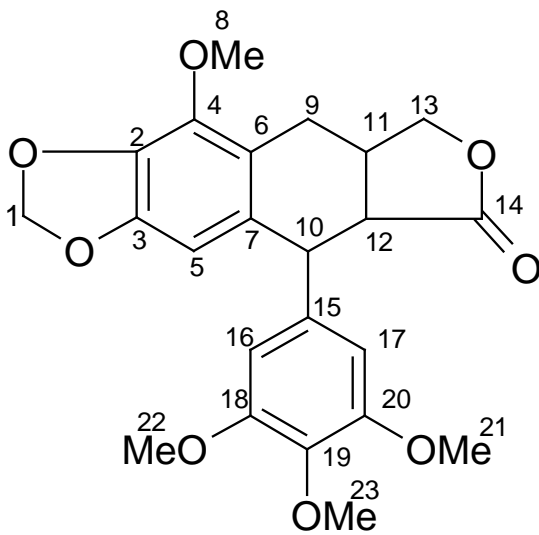
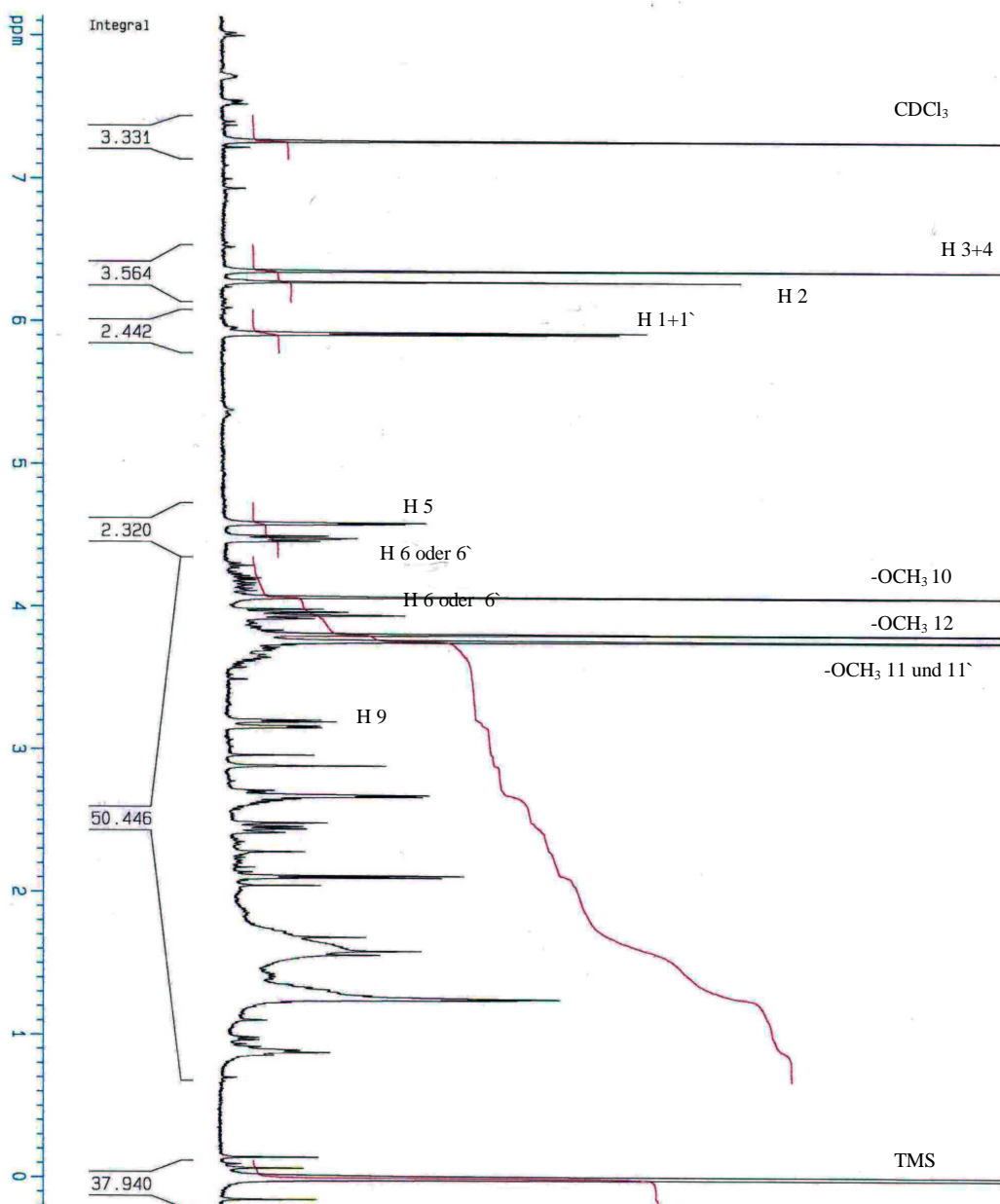


Abb. 12: Beschriftung von PAM für die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums.

Kerstin Kranz beta-Peltatin A-methylether  
 PROTON128 CDCl3 [c: \uj mneedham 4



Current Data Parameters  
 NAME Kranz  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20030305  
 Time 16.05  
 INSTRUM sv400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/15  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 1024  
 DS 0  
 SMH 8278.146 Hz  
 FIDRES 0.126314 Hz  
 AQ 3.9584243 sec  
 RG 1448.2  
 DM 60.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 2.00000000 sec

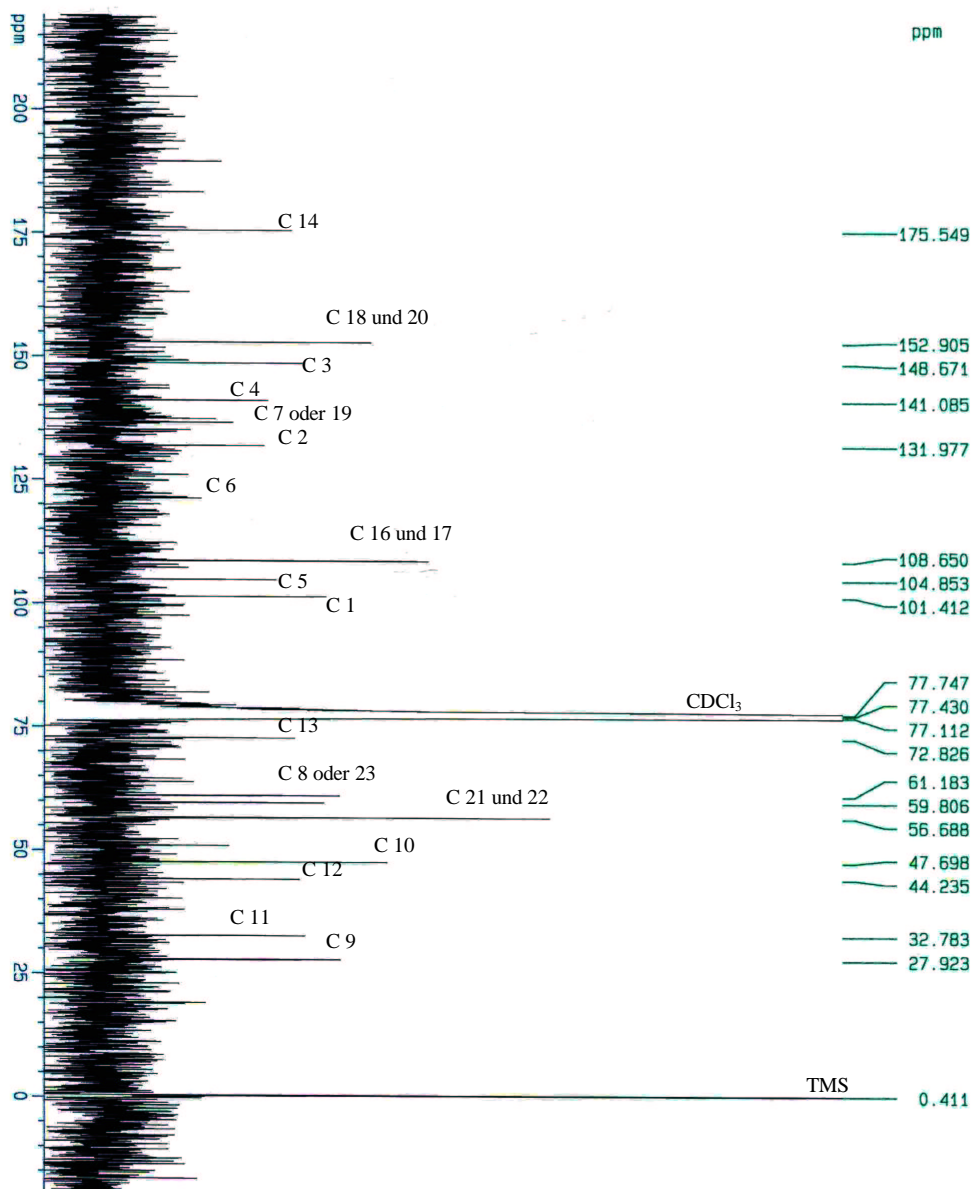
===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 8.50 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1300085 MHz  
 MDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 CY 0.00 cm  
 F1P 8.134 ppm  
 F1 3254.74 Hz  
 F2P -0.206 ppm  
 F2 -82.33 Hz  
 PPMCM 0.41700 ppm/cm  
 HZCM 166.85358 Hz/cm

Abb. 13: <sup>1</sup>H-NMR des β-Peltatin-A Methylether.

Kerstlin Kranz beta-Peltatin A-methylether  
 PROTON128 CDCl3 {C: Vuj mreedham 4



```

Current Data Parameters
NAME      Kranz
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20030305
Time     8.40
INSTRUM  vya400
PROBHD   5 mm QNP 1H/15
PULPROG  zgpg30
TO       65535
SOLVENT  CDCl3
NS       15384
DS       4
SMH      23980.814 Hz
FIDRES   0.365918 Hz
AQ        1.3654725 sec
RG        16384
DE        20.850 usec
TE        300.0 K
D1        2.00000000 sec
d11       0.03000000 sec
d12       0.00020000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        6.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1     100.6227899 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    80.00 usec
PL2       0.00 dB
PL12     12.00 dB
PL13     23.00 dB
SF02     400.1315005 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SE        100.5127290 MHz
MDW      EN
SSB      0
LB        3.00 Hz
GB        0
PC        1.40

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        0.00 cm
F1P       219.469 ppm
F1        20051.48 Hz
F2P       -19.479 ppm
F2        -1995.62 Hz
PRP/CM   11.9739 ppm/cm
HZCM     1199.04077 Hz/cm
  
```

Abb. 13: <sup>13</sup>C-NMR des β-Peltatin-A Methylether.

### 3.1.4. Bestimmung von Enzymcharakteristika der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase

#### 3.1.4.1. pH-Optimum

Das pH-Optimum wurde in 1 M Tris-HCl-Puffer bestimmt. Dadurch konnte nur ein Bereich von pH 5,5 bis 9,5 getestet werden. Innerhalb dieses Bereiches erkennt man ein Maximum bei pH 7,8 (Abbildung 14). Da die Aktivität danach sehr schnell wieder absinkt, wurde der Standardenzymtest bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt..

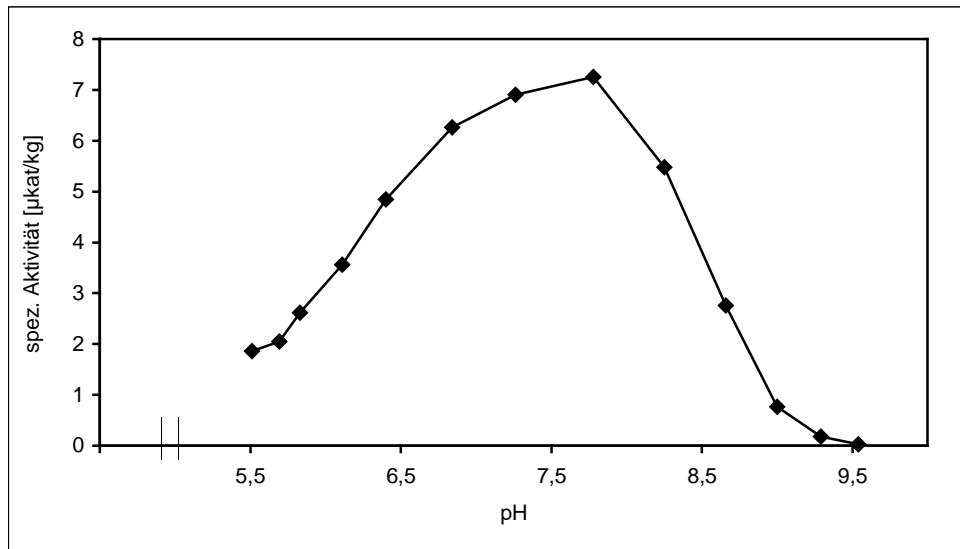


Abb. 14: pH-Optimum der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in 1 M Tris-HCl-Puffer.

#### 3.1.4.2. Inkubationszeit

Die Tests für die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden bei 38 °C durchgeführt, mit 6 N HCl zu unterschiedlichen Zeiten abgestoppt und sofort ausgeschüttelt. Wie man in Abbildung 15 sehen kann, erreicht die Menge an entstandenem  $\beta$ -Peltatin-A Methylether nach 300 Minuten ihren Höhepunkt. Bis zu dieser Zeit kann eine Verlängerung der Inkubationszeit noch sinnvoll sein, da zu wenig gebildetes Produkt in der HPLC unter Umständen nicht nachweisbar ist. Nach 300 Minuten hat eine längere Inkubationszeit keinen Einfluss mehr auf die gebildete Produktmenge und führt daher zu keiner Verbesserung. Auch nach 26 Stunden kann noch kein Abfall der  $\beta$ -Peltatin-A Methylether-Konzentration beobachtet werden. Dieses Produkt ist also sehr stabil und wird ohne Zugabe weiterer Substrate nicht von im Rohextrakt befindlichen anderen Enzymen abgebaut. Die Enzymtests werden routinemäßig für 60 bis 120 Minuten inkubiert, um im linearen Bereich zu bleiben. Für kinetische Untersuchungen wird ein Zeitrahmen von 30 Minuten gewählt, da auch bei kleinen Substratkonzentrationen der lineare Bereich der Enzymaktivität nicht überschritten werden sollte.

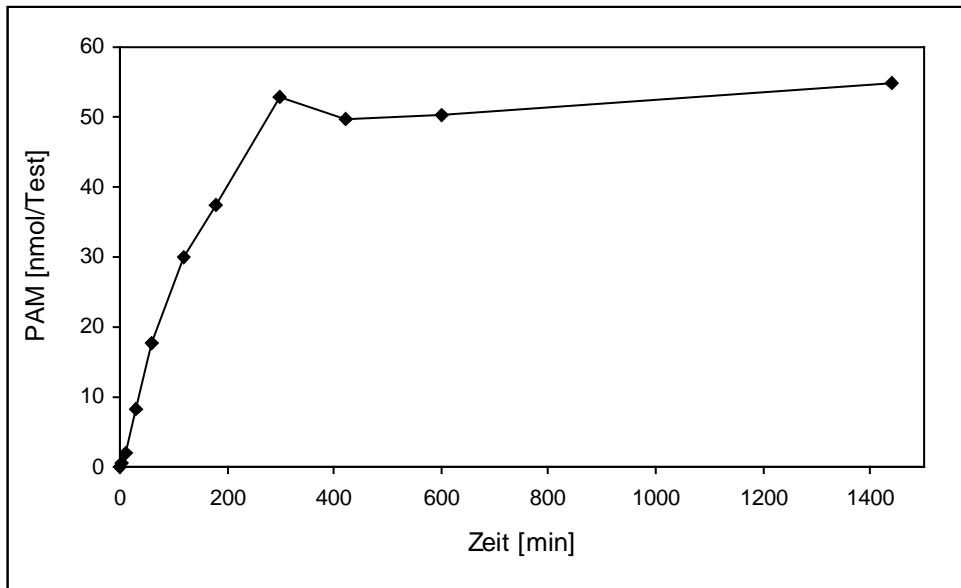


Abb. 15: Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase, gemessen bei 38 °C.

### 3.1.4.3. Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Wie man in Abbildung 16 sehen kann, ist schon bei einer geringen Proteinkonzentration von 50  $\mu\text{g}$  Protein aus dem Rohextrakt der lineare Bereich der Aktivität überschritten. Die Produktmenge nimmt aber bei höheren Proteinmengen noch zu, so dass für die bessere Auswertbarkeit der Tests per HPLC meist 75 – 100  $\mu\text{g}$  Protein im Rohextrakt eingestellt wurden.

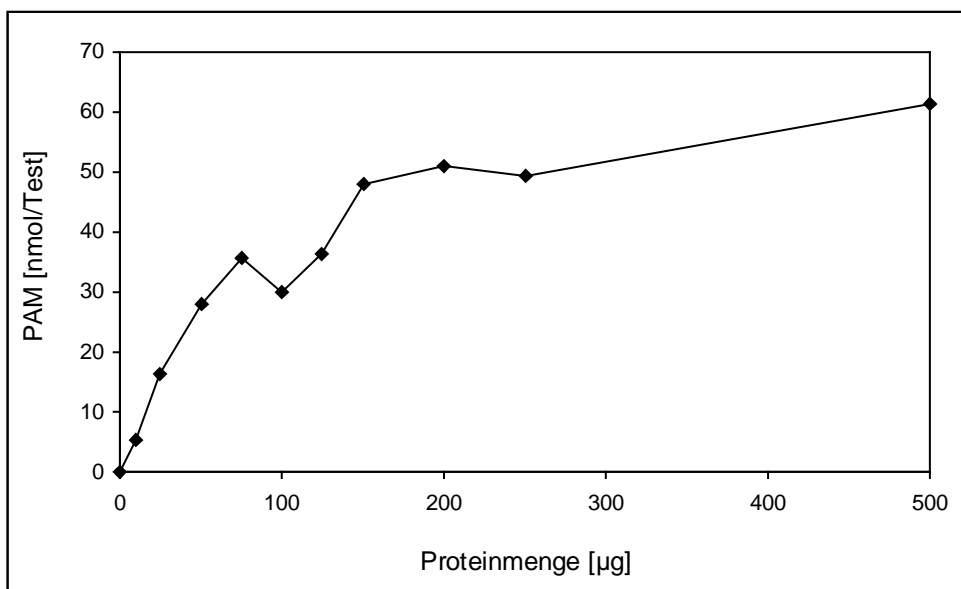


Abb. 16: Abhängigkeit der Bildung von PAM von der eingesetzten Proteinmenge im Test.

#### 3.1.4.4. Inkubationstemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurden die Enzymtests in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 50 °C inkubiert. Das Ergebnis wird in Abbildung 17 gezeigt. Die optimale Inkubationstemperatur liegt bei 40 °C. Da danach ein rascher Abfall der Enzymaktivität zu sehen ist und mit Denaturierung von Enzymen gerechnet werden muss, wurden alle Enzymtests bei 38 °C durchgeführt.

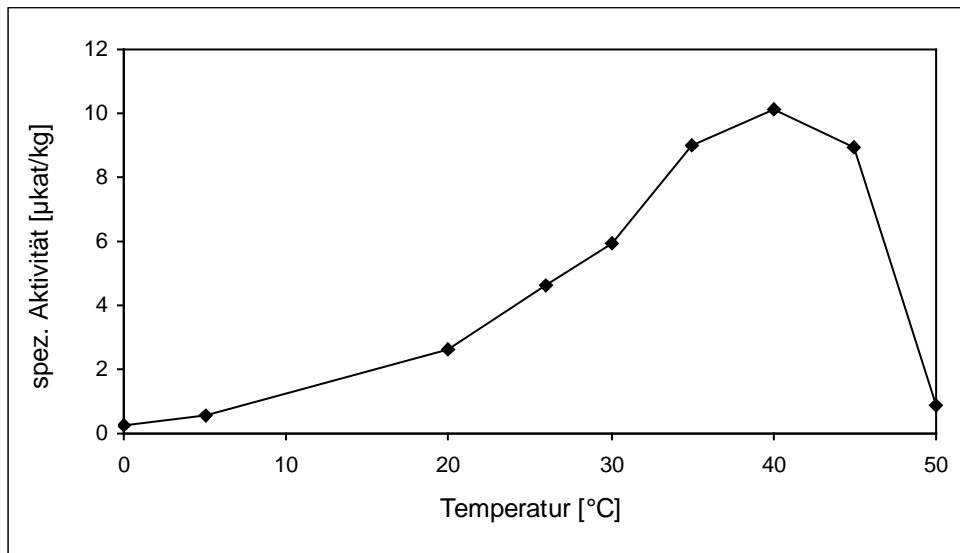


Abb. 17: Abhängigkeit der spezifischen  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferaseaktivität von der Inkubationstemperatur.

#### 3.1.4.5. $K_m$ -Wert für $\beta$ -Peltatin

An den Abbildungen 18a und b sieht man deutlich, dass eine höhere Konzentration an  $\beta$ -Peltatin mit einer Abnahme der spezifischen Enzymaktivität einhergeht. Dieses Phänomen nennt man Substrathemmung. Es kann durch sterische Behinderung an der Substratbindetasche ausgelöst werden. Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wird durch diesen Effekt erschwert. Die Inkubationszeit von zwei Stunden bei dem Test für die Abbildung 18a lässt jedoch keine  $K_m$ -Wertbestimmung zu. Nach Inkubation der Tests bei 38 °C für 30 Minuten kann ein apparenter  $K_m$ -Wert von 40  $\mu$ M bestimmt werden. Er wurde mit Hilfe von Lineweaver-Burk- und Hanes-Diagrammen ermittelt, wie sie in den Abbildungen 18c und 18d zu sehen sind. Die direkte Bestimmung ist hier nicht genau genug, da die Substrathemmung schlecht eine Sättigung erkennen lässt. Für die Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes ist aber die halbmaximale Sättigungskonzentration nötig.



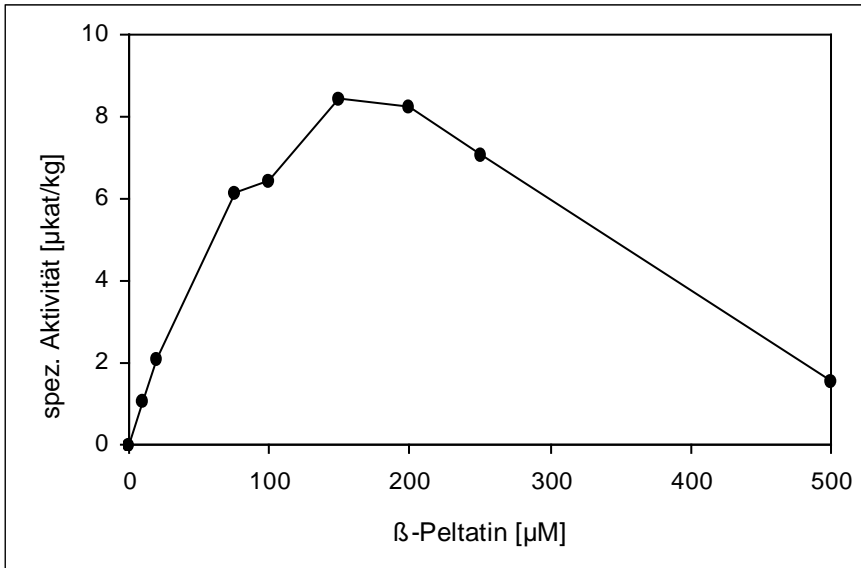


Abb. 18a: Substratsättigungskurve mit Substrathemmung durch höhere Konzentrationen an  $\beta$ -Peltatin bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden.

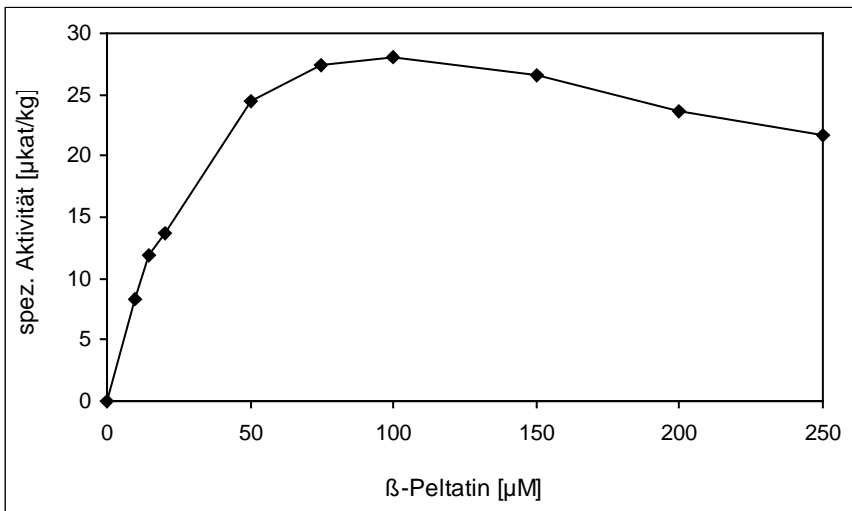


Abb. 18b: Sättigungskurve für  $\beta$ -Peltatin bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten.

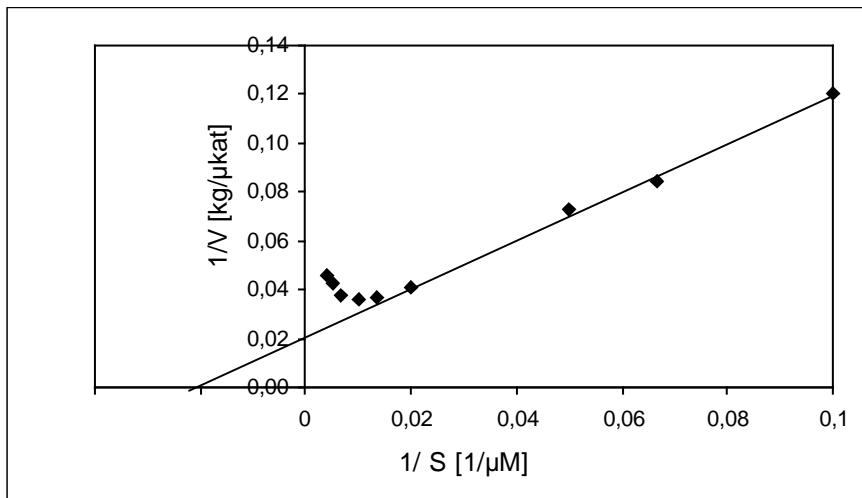


Abb. 18c: Lineweaver-Burk-Diagramm der Sättigungskurve für  $\beta$ -Peltatin; es ergibt sich einapparenter  $K_m$ -Wert von 42  $\mu\text{M}$ .

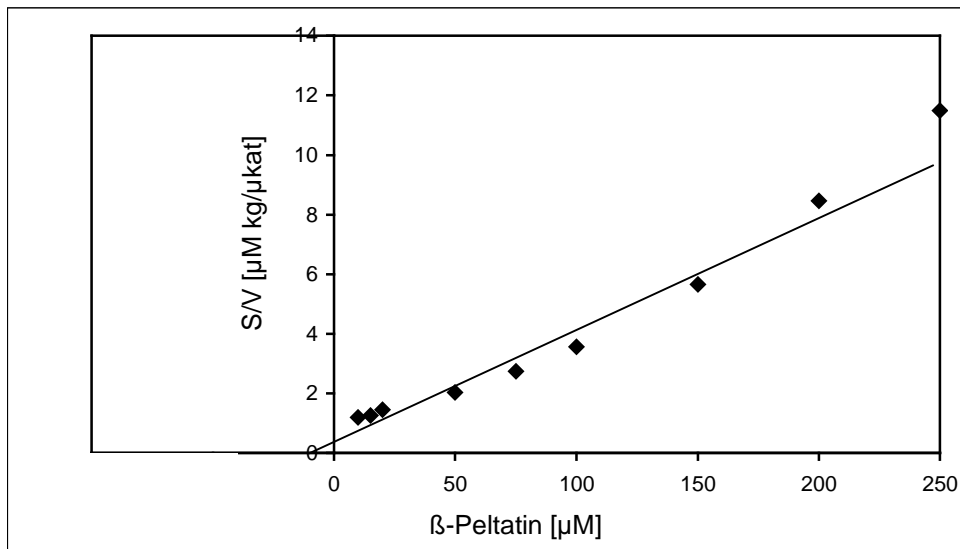


Abb. 18d: Hanes-Diagramm der Substratsättigungskurve für  $\beta$ -Peltatin. Es lässt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $40 \mu\text{M}$  ablesen.

### 3.1.4.6. $K_m$ -Wert für S-Adenosylmethionin

Bei S-Adenosylmethionin (SAM) kann man keine Substrathemmung beobachten (vgl. Abbildung 19a). Bei etwa  $120 \mu\text{M}$  stellt sich eine Sättigung ein. Der gemittelte apparente  $K_m$ -Wert für SAM liegt bei  $15 \mu\text{M}$ , was auf eine hohe Affinität zu dieser Substanz hindeutet. Der  $K_m$ -Wert wurde direkt über die halbmaximale Sättigung und mit Hilfe von Lineweaver-Burk- und Hanes-Diagrammen bestimmt (Abbildung 19b und 19c)

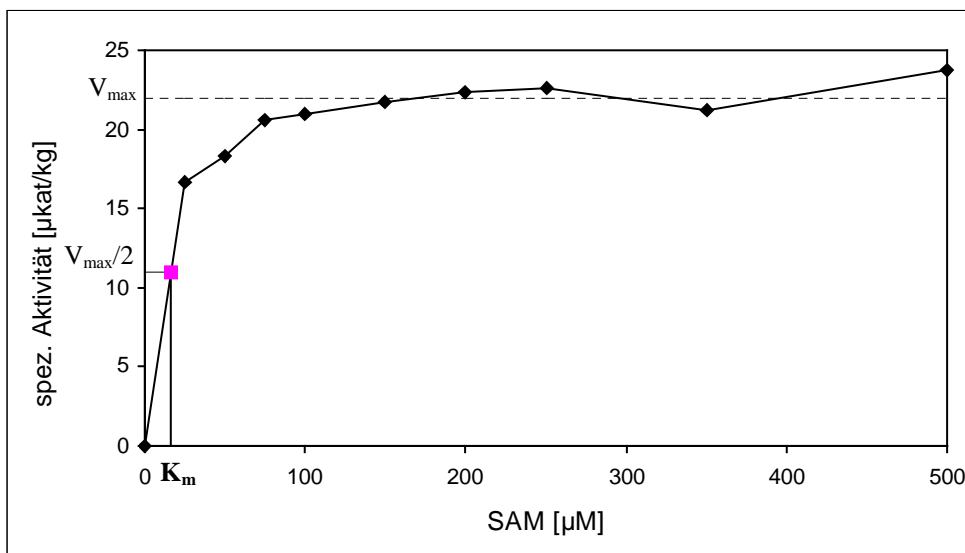


Abb. 19a: Sättigungskurve für SAM mit einem apparentem  $K_m$ -Wert von ca.  $16 \mu\text{M}$  SAM.

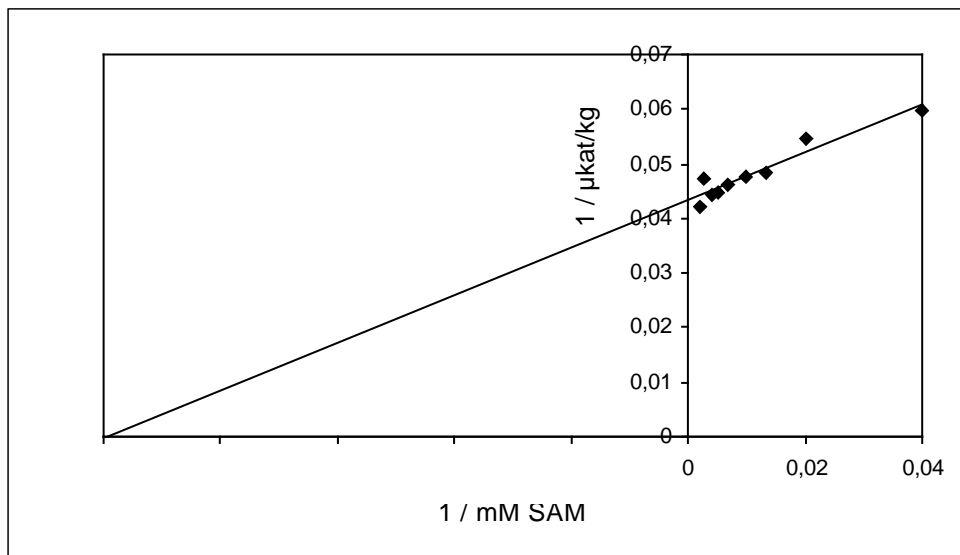


Abb. 19b: Lineweaver-Burk-Auftragung der Substratsättigungskurve für SAM, es ergibt sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$ .

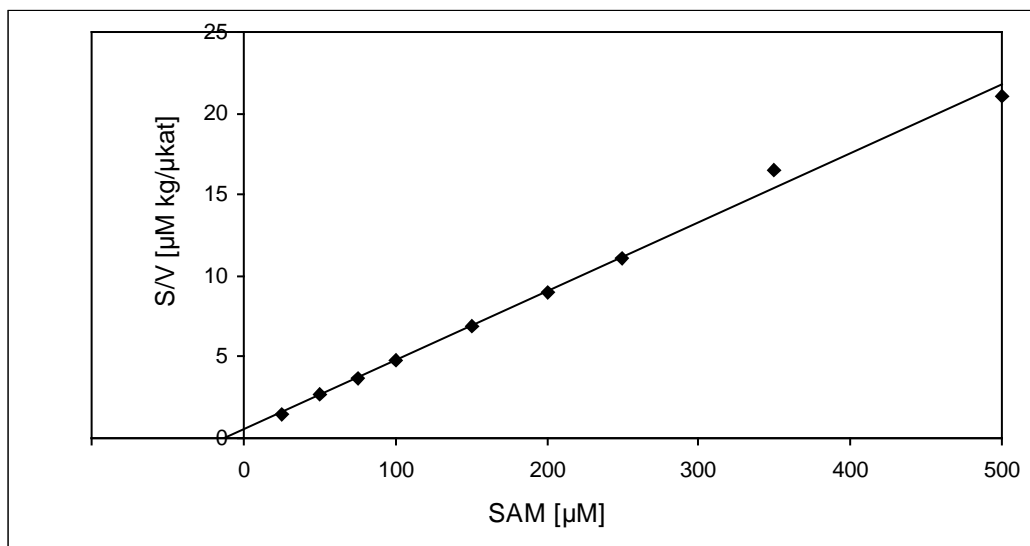


Abb. 19c: Hanes-Auftragung der Substratsättigungskurve für SAM, es ergibt sich ein Wert von 14  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.4.7. Substratspezifität

Da nicht für alle getesteten Substrate Standardsubstanzen der potenziellen Produkte für die HPLC zur Verfügung standen, wurde dieser Test mit radioaktivem S-Adenosyl-L-[methyl- $^{14}\text{C}$ ]-methionin durchgeführt. Setzt die Methyltransferase ein Substrat um, kann nach dem Ausschütteln mit Ethylacetat das Produkt der Methylierung mit der radioaktiven Methylgruppe detektiert werden, vorausgesetzt die Produkte akkumulieren in der Ethylacetatphase. Von all den getesteten möglichen Substraten wurden einige nicht akzeptiert, für andere zeigte die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase nur wenig Umsatz. Die besten Substrate sind in Abbildung 20 aufgeführt. Da der Enzymtest auf die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase optimiert wurde, ist es nicht verwunderlich, dass  $\beta$ -Peltatin das am besten umgesetzte Substrat dieser Testreihe ist. Es macht keinen Unterschied, ob im Puffer 1,5 mM

Magnesiumionen enthalten sind oder nicht. Eine Ausnahme bilden hier die Kaffeesäure und der Kaffeesäure-Methylester. Auch  $\beta$ -Peltatin wird besser methyliert in einem magnesiumhaltigen Puffer, allerdings ist der Zuwachs relativ zur Umsatzhöhe gesehen klein. Von Caffeoyl-CoA ist bereits bekannt, dass die zugehörige Methyltransferase magnesiumabhängig ist. Auch Protocatechinaldehyd und Kaffeesäuremethylester zeigen einen guten Umsatz mit dem Rohextrakt. Im Rohextrakt sind also Enzyme vorhanden, die diese Substanzen methylieren können. Pinoresinol, Daphnetin, Kaffeesäure und Coniferylalkohol können ebenfalls methyliert werden, auch wenn die Umsetzung nicht so hoch ist wie bei den anderen Substraten. Eine Änderung der Testbedingungen könnte dieses Ergebnis noch verändern.

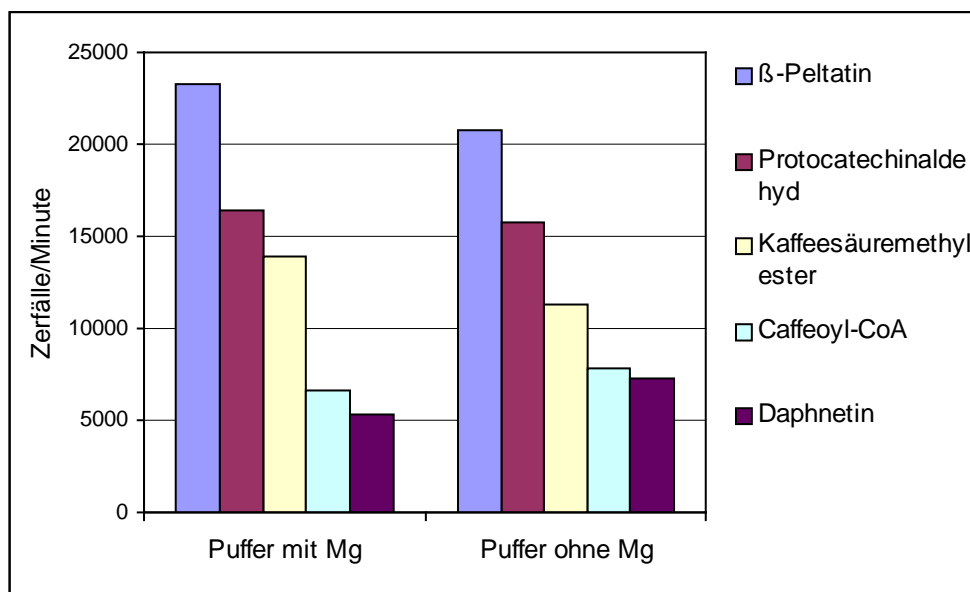


Abb. 20a: Enzymtest mit verschiedenen Substraten, die gut umgesetzt werden, in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit oder ohne 1,5 mM Magnesiumchlorid.

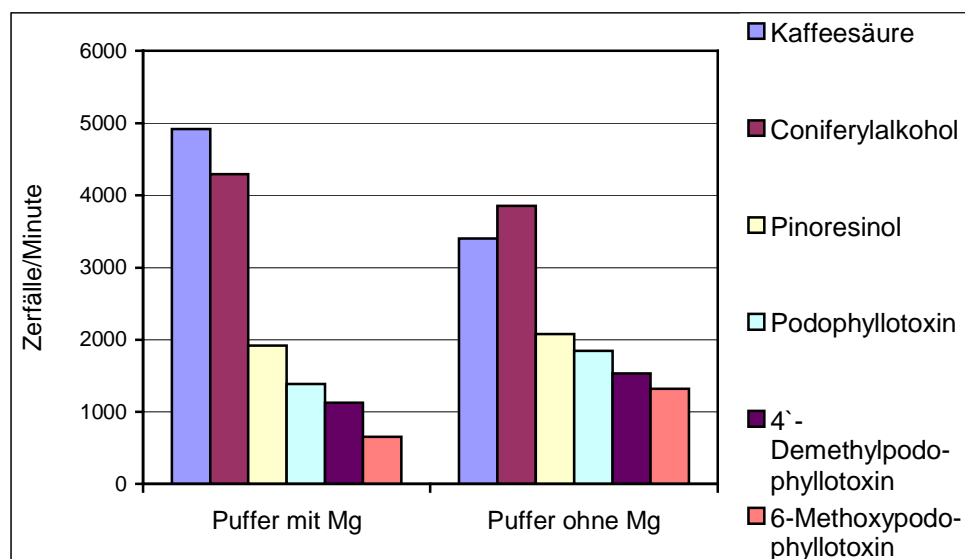


Abb. 20b: Enzymtest mit verschiedenen Substraten, die noch erkennbaren Umsatz zeigen, in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit oder ohne 1,5 mM Magnesiumchlorid.

### 3.1.4.8. Hemmstoffe

Die Suche nach Hemmstoffen und Cofaktoren wurde gemeinsam durchgeführt. Mit allen getesteten Substanzen wurde gleich verfahren und ein Standardtest durchgeführt, dem zusätzlich die zu testende Substanz zugesetzt wurde. Da oft organische Lösungsmittel zum Lösen der Substrate benutzt wurden, wurden diese auch in höheren Konzentrationen als den sonst üblichen 10 mM getestet. Die Abbildungen 21 a bis c geben einen Überblick über die Hemmstoffe, die Lösungsmittel und die Substanzen ohne Einfluss auf die Enzymaktivität.

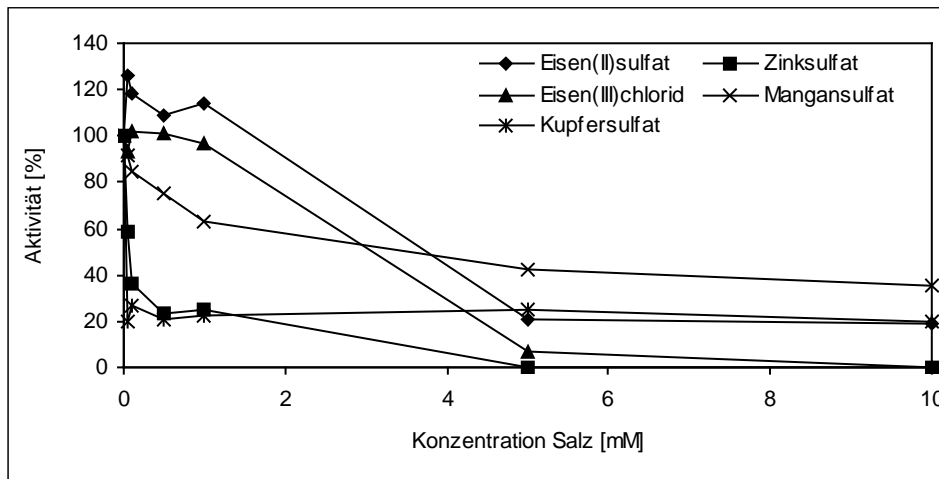


Abb. 21a: Hemmung der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase durch Eisensulfat, Eisenchlorid, Kupfersulfat, Zinksulfat und Mangansulfat.

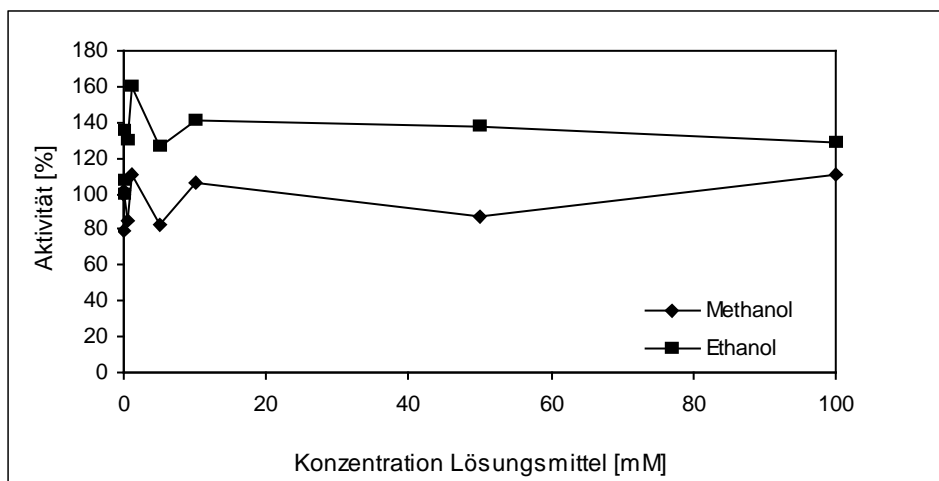


Abb. 21b: Einfluss der Lösungsmittel Methanol und Ethanol auf die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase.

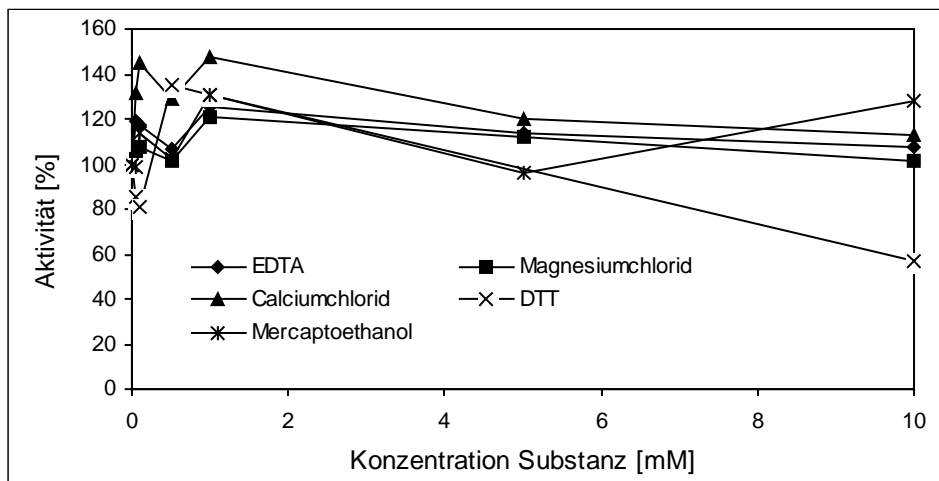


Abb. 21c: Hemmung der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase durch EDTA, Calciumchlorid, Mercaptoethanol, Magnesiumchlorid und DTT.

Die Abbildung 21a zeigt Hemmstoffe der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase. Demnach hemmt Zinksulfat die Reaktion in einer Konzentration von 5 mM komplett, während Eisensulfat oder Eisenchlorid in dieser Konzentration bis auf 35 % der ursprünglichen Aktivität hemmen können. Eisenchlorid kann in einer Konzentration von 10 mM ebenfalls eine vollständige Hemmung erzielen. Auch Mangansulfat hat eine Hemmwirkung, die aber nicht sehr stark ausgeprägt ist. 10 mM dieses Salzes hemmen die Aktivität des Enzyms auf 50 % der Ausgangsaktivität. Bereits kleine Mengen Kupfersulfat, wie hier 0,1 mM im Test, hemmen die Reaktion auf 25 % ihrer Ausgangsaktivität, ein Effekt, der sich auch bei vermehrter Zugabe nicht verstärken lässt. Es muss also auf Abwesenheit von diesen Substanzen in den Enzymtests geachtet werden.

Die beiden getesteten Lösungsmittel Ethanol und Methanol (siehe Abbildung 21b) zeigen auch bei hoher Zugabe von 100 mM im Testansatz keine Hemmung der Methyltransferase. Sie sind also als Lösungsmittel für die Substrate geeignet und stören den Enzymtest nicht.

Da es auch Methyltransferasen gibt, die Magnesium als Cofaktor benötigen, wurde dem Test ein Magnesiumsalz zugesetzt. Diese Testreihe ist in Abbildung 21c gezeigt. Calciumchlorid als Lieferant eines weiteren zweiwertigen Ions wurde genauso getestet wie EDTA, welches zweiwertige Ionen komplexiert und dadurch mögliche Cofaktoren aus dem Testansatz entfernt. Eine Erhöhung der Aktivität ist bei Konzentrationen bis 1 mM Calciumchlorid auf 140 % der Ursprungsaktivität feststellbar. Da sich diese Erhöhung aber nicht weiter steigern lässt, wird Calciumchlorid nicht als Cofaktor gewertet.

DTT, das den Enzymtests zum Schutz der SH-Gruppen der Proteine zugesetzt wird, hemmt in einer Konzentration von 10 mM auf 60 % der Aktivität. Da es im Test aber nur in einer Konzentration von 1 mM zugefügt wird, hat diese Hemmung praktisch keine Auswirkung, da in dieser Konzentration keine Hemmung beobachtet werden kann.

### 3.1.4.9. Hemmung durch S-Adenosylhomocystein (SAH)

In einem ersten Test kann zunächst gezeigt werden, dass eine Hemmung durch S-Adenosylhomocystein (SAH) nachweisbar und dass diese konzentrationsabhängig ist (Abbildung 22a). Inkubiert man bei verschiedenen Konzentrationen von SAM im Test mit unterschiedlichen Konzentrationen von SAH, kommt man zu Hemmgraphen, aus denen die Art der Hemmung abgelesen werden kann. Von einer kompetitiven Hemmung kann gesprochen werden, wenn sich die reziprok aufgetragenen Geraden der einzelnen Hemmkonzentrationen auf der Y-Achse schneiden. Dieser Hemmtyp liegt hier vor, wie man deutlich in Abbildung 22c sehen kann. In Abbildung 22b wird gezeigt, wie sich das Erreichen der Substratsättigung verschiebt, wenn unterschiedliche Konzentrationen an SAH zugesetzt werden. Durch höhere SAM-Zugabe wird SAH verdrängt, und es stellt sich dasselbe Gleichgewicht ein, wie es ohne SAH-Zugabe entsteht.

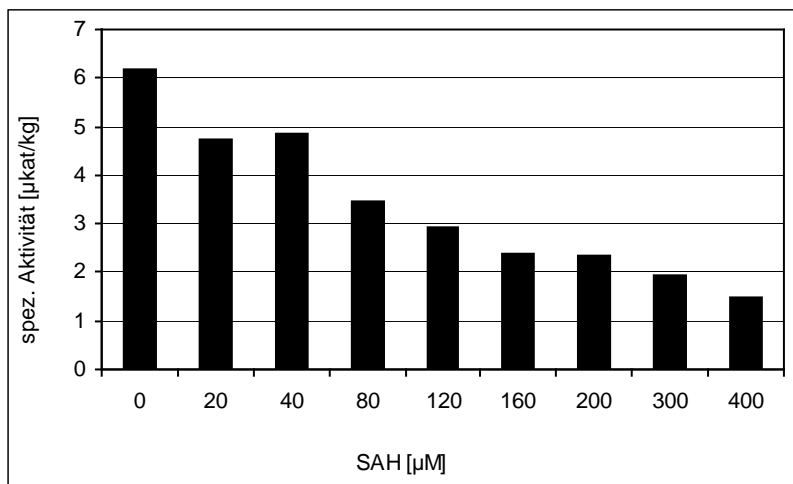


Abb. 22a: Einfluss des Hemmstoffs SAH auf die Enzymaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase

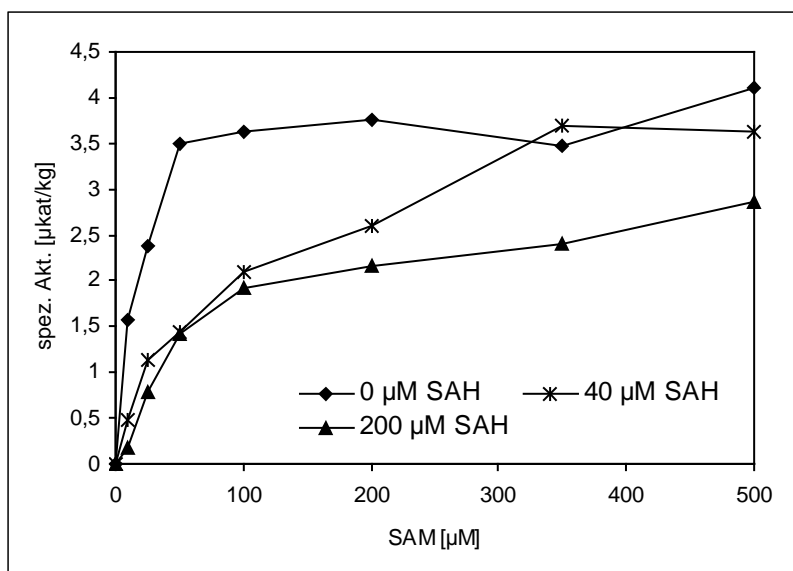


Abb. 22b: Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase bei verschiedenen SAH-Konzentrationen

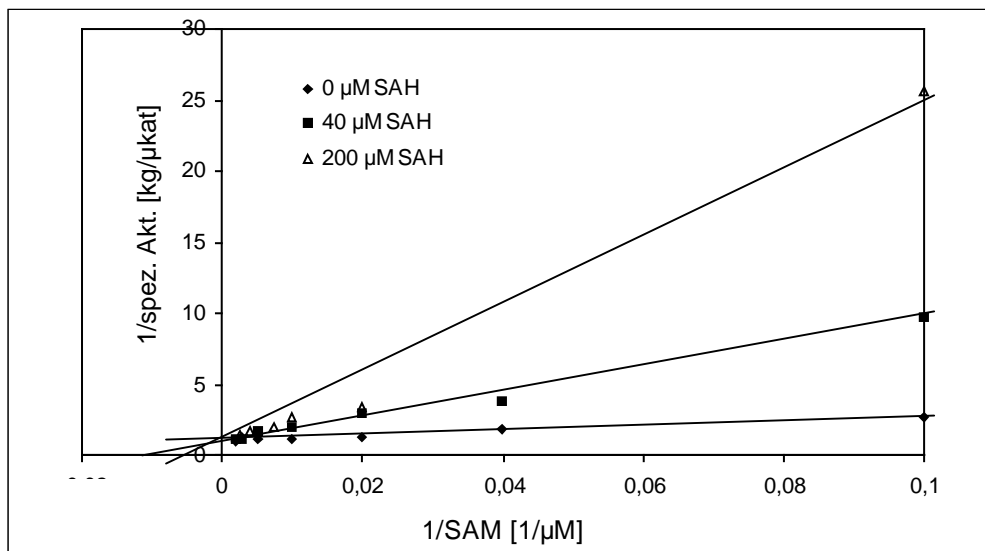


Abb. 22c: Doppelt reziproke Auftragung der Werte aus Abb. 22b. Der Schnittpunkt der Geradenschar auf der y-Achse deutet eine kompetitive Hemmung an.

### 3.1.4.10. Stabilität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase bei Lagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. Der erste Test erfasst den Zeitraum, über den das Protein bei zwei verschiedenen Temperaturen mit oder ohne Zugabe von 10 % Glycerin als Schutz gelagert wurde (Abbildung 23). Bei dem zweiten Test, der in Abbildung 24 dargestellt ist, wurde die Anzahl der Tauvorgänge auf ihre Wirkung auf das Protein untersucht. Das Enzym ist auch nach einer Lagerzeit von 20 Wochen noch aktiv. Die Aktivität ist größer, wenn es mit Glycerin vermischt und gelagert wurde. Am höchsten ist die spezifische Aktivität aber nach Lagerung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da hier abbauende Enzyme besser gehemmt werden können. Bei dieser Temperatur spielt die Zugabe von Glycerin keine so große Rolle mehr. Für den Stress, ausgelöst durch mehrmaliges Auftauen des Enzyms, spielt die Zugabe von Glycerin kaum eine Rolle, wie in dem zweiten Test gezeigt werden kann. Hierbei macht es auch kaum einen Unterschied, wie oft das Enzym diesem Stress ausgesetzt wurde. Generell kann man aber sagen, dass das Enzym ungefähr 75 % seiner Aktivität durch das Einfrieren und Auftauen schon beim ersten Vorgang einbüßt.



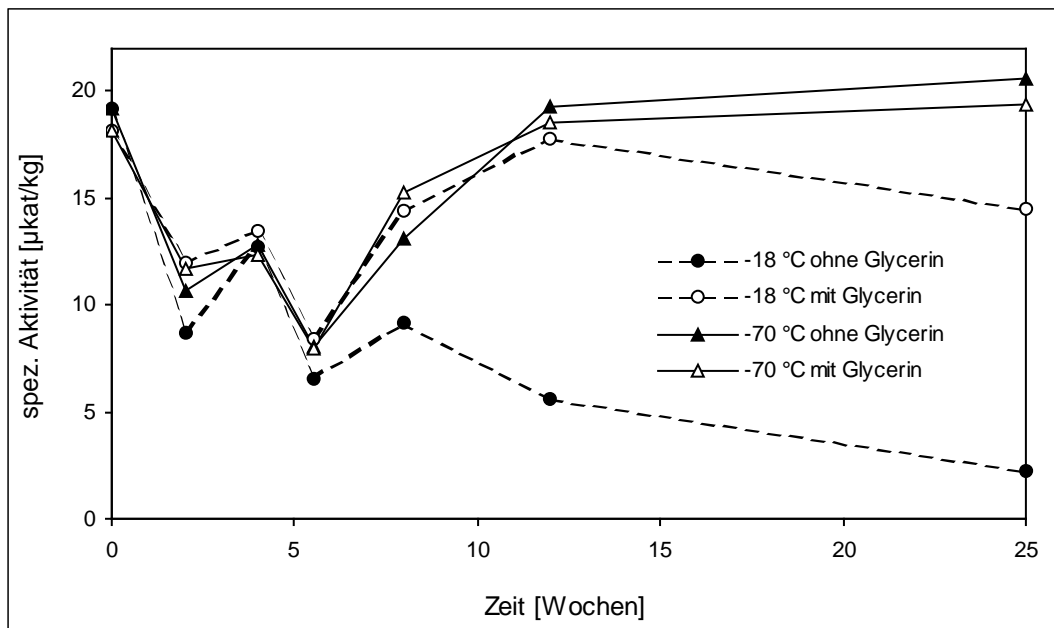


Abb. 23: Stabilität der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase-Aktivität bei Lagerung bei  $-18\text{ °C}$  und  $-70\text{ °C}$  mit und ohne Zugabe von 10 % Glycerin.

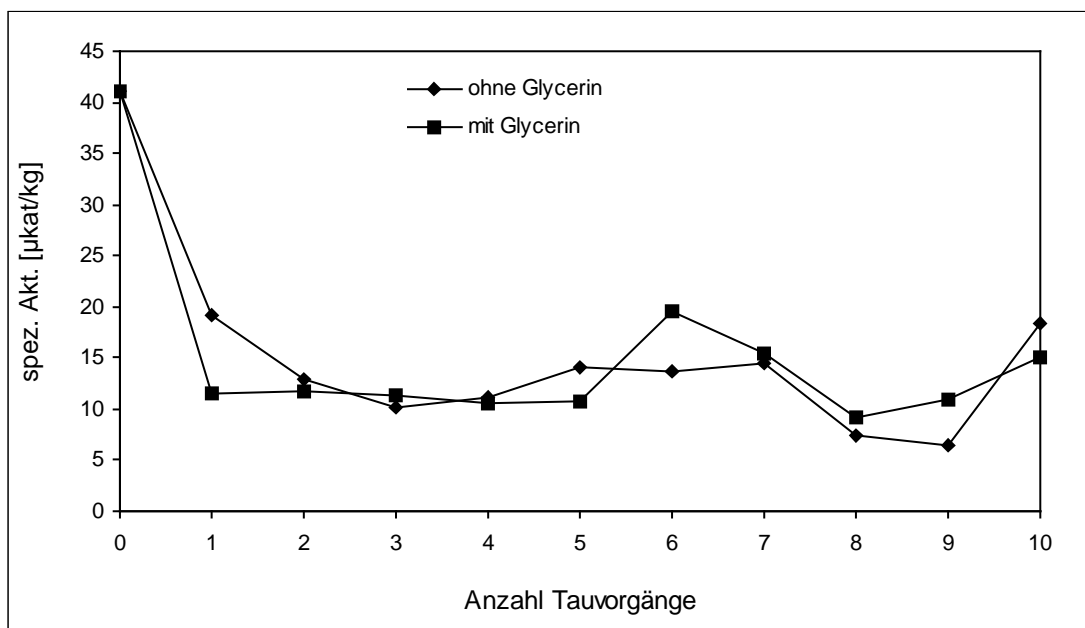


Abb. 24: Einfluss mehrfachen Einfrierens und Auftauens auf die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase.

### 3.1.4.11. Einfluss von Methyljasmonat auf die Aktivität der $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase in Zellen von *Linum nodiflorum*

Methyljasmonat ist eine Substanz, durch die Enzymaktivitäten verstärkt werden können, die in der Pathogenabwehr von Pflanzen eine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurden Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* über 24 Stunden mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat behandelt, die Zellen dann geerntet und aufgeschossen. Die Abbildung 25 zeigt, dass keine Steigerung der Aktivität der POMT beobachtet werden kann. Gegenüber der Kontrolle ohne Zusätze ist die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase vermindert.

Schon die Kontrolle mit zugefüttertem Ethanol zeigt eine niedrigere Enzymaktivität. Es liegt also keine Hemmung durch Methyljasmonat vor, sondern eher durch das Lösungsmittel Ethanol.

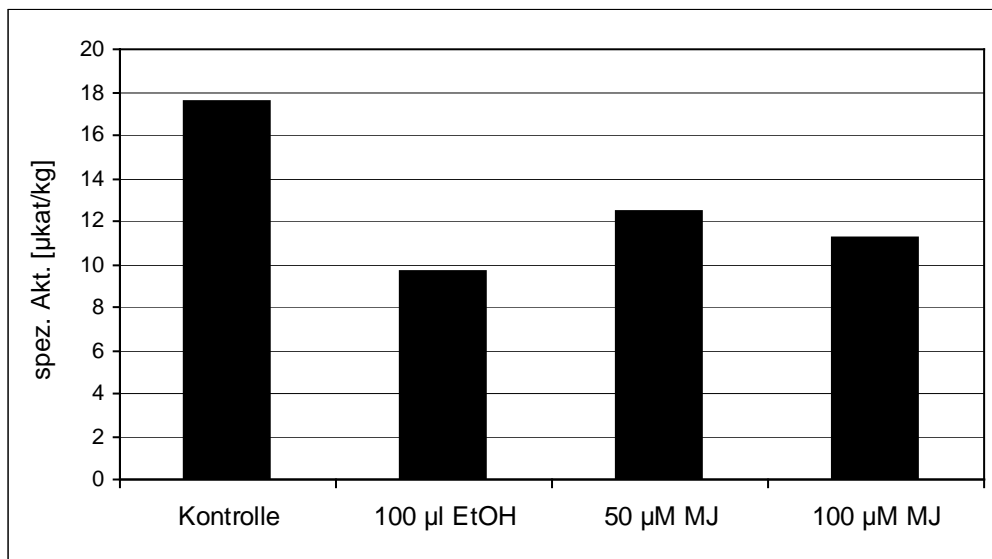


Abb. 25: Behandlung von Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* mit Methyljasmonat (MJ) und ihr Einfluss auf die Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase.

### 3.2. Reinigung der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase

#### 3.2.1. Reinigungsschritte ohne FPLC

##### 3.2.1.1. Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Für die Fällung mit Ammoniumsulfat wurde eine gesättigte Lösung von Ammoniumsulfat in Wasser hergestellt, auf pH 7,5 gebracht und damit die in Abbildung 26b angegebenen Sättigungskonzentrationen eingestellt. Die Sedimente mit 20 % und 40 % Sättigung an Ammoniumsulfat enthalten nur sehr wenig  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität (POMT-Aktivität), sie ist fast ausschließlich in dem Überstand zu finden. In den Proben mit höherer Salzkonzentration findet man das Enzym in den Sedimenten, aufgeteilt auf die Proben mit 60 % und 80 % Sättigung an Ammoniumsulfat. Die Abbildung 26a zeigt den Verlust an Gesamtaktivität, der bei dieser Reinigung erfolgt. Am wenigsten Verluste sind in dem Überstand mit 40 % Ammoniumsulfatsättigung zu sehen.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
0 % Überstand	5846
20 % Überstand	4879
40 % Überstand	4878
60 % Sediment	341
80 % Sediment	136

Abb. 26a: Gesamtaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in den Fraktionen der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat.

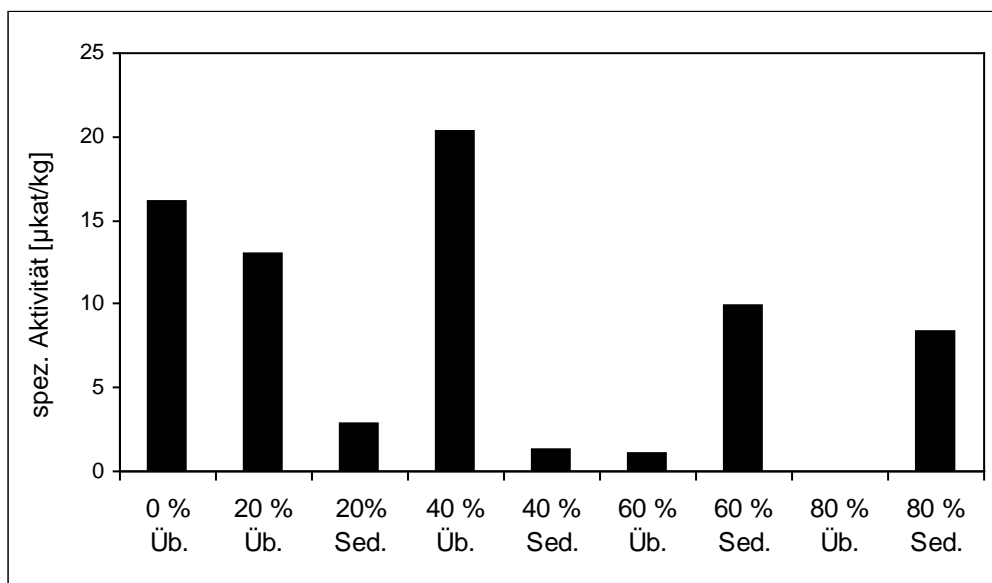


Abb. 26b: Fraktionierte Fällung der POMT mit Ammoniumsulfat, Üb.: Überstand, Sed.: Sediment, die Prozentzahlen bedeuten %-Sättigung an Ammoniumsulfat.

### 3.2.1.2. Fällung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln

Zunächst wurde in Stufen von 15 % Lösungsmittelzusatz mit Ethanol gefällt. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 27a und 27b zu sehen. Die höchste Enzymaktivität besitzt hierbei die Probe mit 30 % Ethanol, doch der Rohextrakt ist noch aktiver. Außerdem geht mit zunehmender Lösungsmittelkonzentration die Aktivität verloren und ist weder im Überstand noch im Sediment zu finden. Da keine Möglichkeit bestand, die jeweiligen Lösungsmittel zu entfernen, wurden die Tests mit den Lösungsmitteln in den Enzymtests inkubiert. Die Ergebnisse sind daher nur bedingt miteinander vergleichbar, da die Tests jeweils andere Zusammensetzungen enthalten. Es ist möglich, dass das Protein bei höherer Zugabe von organischem Lösungsmittel denaturiert und daher nicht mehr funktionsfähig ist, auch wenn der Test auf mögliche Hemmstoffe diese These nicht stützt (Kapitel 3.1.4.8.). Es kann keine Fällung aktiver  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase beobachtet werden. Auch die Gesamtaktivität, die wiedergefunden werden kann, ist bedeutend niedriger, als die vor der Fällung zu messende Aktivität. Die Abbildung 27a gibt einen Überblick über den Aktivitätsverlust.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
Rohextrakt vor der Fällung	5062,5
Überstand mit 15 % Ethanol	632,5
Sediment mit 15 % Ethanol	50
Überstand mit 30 % Ethanol	422,5

Abb. 27a: Gesamtaktivität der POMT ausgewählter Proben der Ethanol-Fällung.

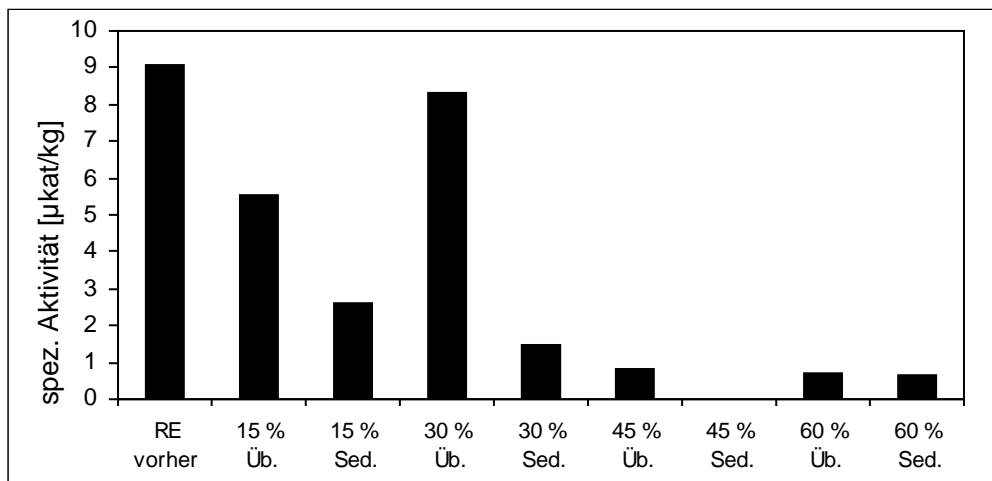


Abb. 27b: Fällung mit Ethanol, Üb.: Überstand, Sed.: Sediment.

Die Fällung mit Methanol (Abbildungen 28a und 28b) wurde in gleicher Weise durchgeführt. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber dem Rohextrakt in der Fraktion mit 60 % Lösungsmittel. Doch auch in dem Sediment ist noch eine hohe Restaktivität vorhanden. Die spezifische Aktivität der Proben steigt, was bedeutet, dass der Extrakt von anderen Proteinen gereinigt wurde und nun mehr  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase enthalten ist. Der Verlauf der Gesamtaktivität ist in Abbildung 28a gezeigt. Nach jedem Fällungsschritt lässt sich weniger Gesamtaktivität wiederfinden. In den jeweiligen Sedimenten findet sich fast keine Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase mehr. Zur Aufreinigung des Rohextraktes für eine spätere Säulenchromatographie ist diese Methode somit nicht geeignet.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
Rohextrakt vor der Fällung	5062,5
Überstand mit 15 % Methanol	618
Überstand mit 30 % Methanol	478,5
Überstand mit 45 % Methanol	109
Überstand mit 60 % Methanol	40
Sediment mit 60 % Methanol	7,5

Abb. 28a: Wiederfindung der Gesamtaktivität der POMT nach der fraktionierten Fällung mit Methanol.

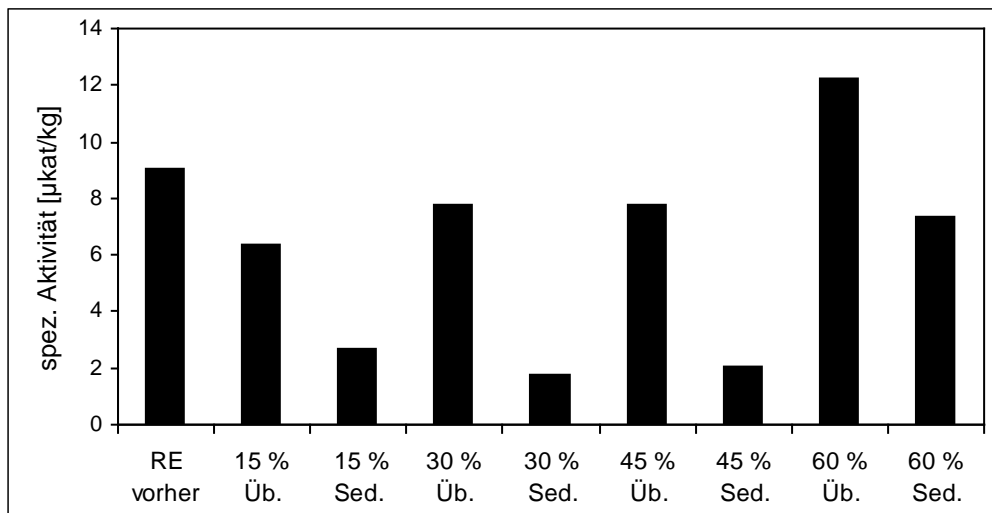


Abb. 28b: Fällung mit Methanol, Üb.: Überstand, Sed.: Sediment.

Auch Aceton wurde als Fällungsreagens getestet (Abbildungen 29a und 29b). Hierbei konnte eine leichte Aufkonzentrierung der POMT-Aktivität in den Fraktionen mit 15 % Lösungsmittelzusatz gefunden werden. Auch hier ist eine Aufteilung in den Überstand und das Sediment zu sehen. Der Rest des Enzyms findet sich in dem Sediment mit 30 % Aceton. Die Gesamtaktivität des Enzymextraktes nimmt stark ab, das Enzym geht verloren oder wird inaktiviert durch den Acetongehalt (siehe Abbildung 29a). Diese Methode ist also nicht besonders gut geeignet, um den Rohextrakt aufzukonzentrieren, da ein Verlust von 93 % Gesamtaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase nach der Acetonfällung beobachtet werden kann.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
Rohextrakt vor der Fällung	5062,5
Überstand mit 15 % Aceton	351
Sediment mit 15 % Aceton	7
Überstand mit 30 % Aceton	59
Sediment mit 30 % Aceton	6

Abb. 29a: Aufteilung der Gesamtaktivität der POMT nach der fraktionierten Fällung mit Aceton.

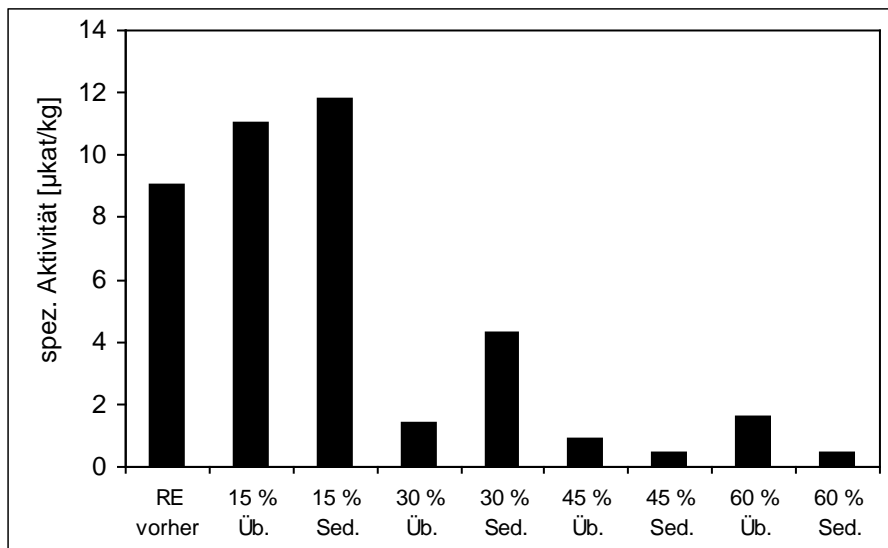


Abb. 29b: Fällung mit Aceton, Üb.: Überstand, Sed.: Sediment.

### 3.2.1.3. Fällung mit Polyethylenglycol

Für die Fällung mit PEG 8000 (Abbildungen 30 a und b) wurde eine 50 %ige Stammlösung hergestellt und dem Rohextrakt zugegeben. Diese Methode ist zur Aufreinigung des Rohextraktes geeignet, da eine Aktivitätserhöhung in dem Überstand und dem Sediment mit 20 % PEG 8000 besteht. Es sind hierbei beide in nahezu gleicher Weise aktiv. Diese Proben besitzen beide eine höhere spezifische Aktivität als der Rohextrakt, da viel weniger Protein enthalten ist. Die Gesamtaktivität ist allerdings deutlich niedriger, es ist ein Verlust von 80 % zu sehen. Dieser Verlust findet aber nur in dem ersten Fällungsschritt statt, danach spielt es für die Gesamtaktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase keine Rolle mehr, ob noch mehr PEG 8000 zugegeben wird, es finden sich in den jeweiligen Überständen die eingesetzten Aktivitäten mit gewissen Schwankungen wieder.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
Rohextrakt vor der Fällung mit PEG	3150
Überstand mit 5 % PEG	597,5
Sediment mit 5 % PEG	58,5
Überstand mit 10 % PEG	507,5
Sediment mit 10 % PEG	59
Überstand mit 15 % PEG	532
Sediment mit 15 % PEG	60
Überstand mit 20 % PEG	567,5
Sediment mit 20 % PEG	146

Abb. 30a: Gesamtaktivität der POMT in den Fraktionen der fraktionierten Fällung mit PEG 8000.

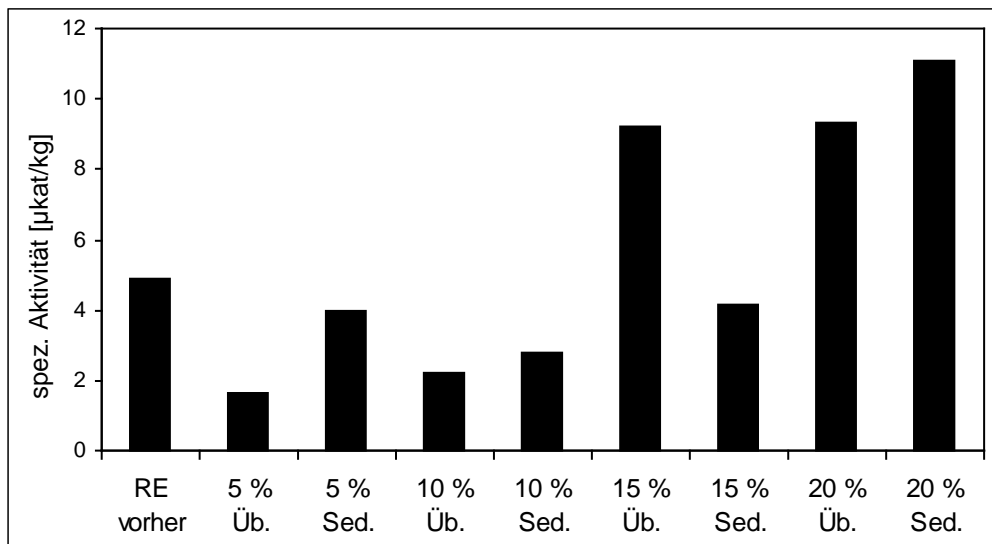


Abb. 30b: Fällung mit Polyethylenglycol, Üb.: Überstand, Sed.: Sediment.

### 3.2.1.4. Fällung mit Protaminsulfat

Nach der Protaminsulfatfällung sollte das Protein im Überstand sein und von allen DNA-Stücken abgetrennt vorliegen. Die Abbildungen 31a und 31b zeigen aber deutlich, dass die Enzymaktivität fast komplett im Sediment zu finden ist. Das Sediment enthält auch den größten Anteil an Protein nach der Proteinbestimmung nach Bradford, so dass es zu keiner Aufreinigung gekommen ist. Auch die Wiederfindung der Gesamtaktivität der POMT, die in Abbildung 31a angegeben ist, zeigt dieses Ergebnis. Es können nur 9 % der eingesetzten Aktivität in Sediment und Überstand nach der Protaminsulfatfällung wieder gefunden werden. Davon ist der größte Teil in dem Sediment, was nicht sein dürfte für eine gute Aufreinigung. Diese Methode ist also nicht anwendbar zur Aufreinigung der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase.

Probe	Gesamtaktivität [pkat]
Rohextrakt vor der Fällung mit Protamin	3150
Überstand nach der Protaminfällung	41,5
Sediment nach der Protaminfällung	231,5

Abb. 31a: Gesamtaktivität der POMT nach der Fällung mit 0,1 % Protaminsulfatsättigung.

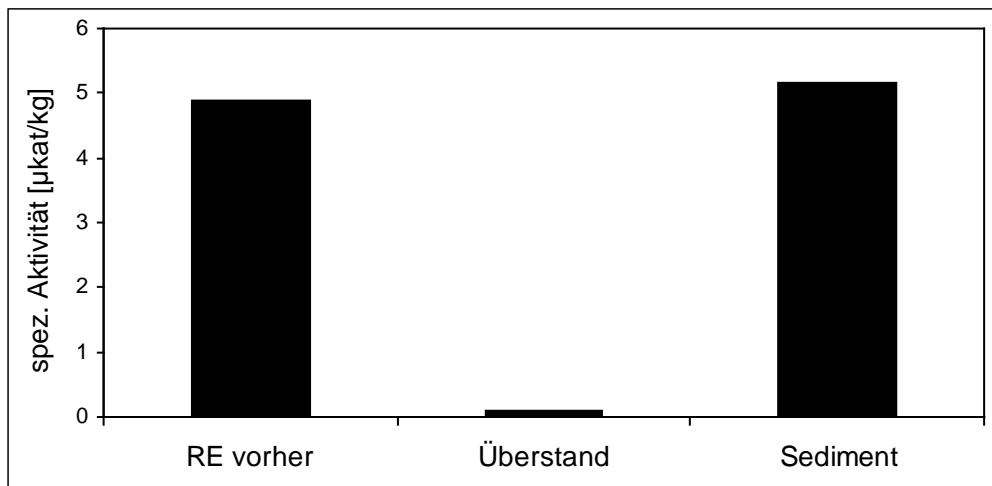


Abb. 31b: Spezifische Aktivität der POMT nach der Fällung mit Protaminsulfat.

### 3.2.1.5. Fällung durch Veränderung des pH-Werts

Für die pH-Wert-abhängige Fällung wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt, um einen breiteren pH-Bereich abzudecken. In dem ersten Test wurde ein neutraler Puffer schrittweise basisch gemacht. Die Sedimente und die Überstände wurden vermessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 32a zu sehen. Keine der Proben zeigt eine deutliche Erhöhung der spezifischen Aktivität verglichen mit Rohextrakt in neutralem Puffer. Auch bei einem pH-Wert von über 10 lässt sich das Protein nicht ausfällen, aber auch nicht von anderen Proteinen im Extrakt abtrennen. Von der eingesetzten Gesamtaktivität der POMT von 375 nkat finden sich in dem Überstand bei pH 10,37 nur noch 30 nkat, der Verlust bei dieser Methode ist mit 92 % sehr hoch. Diese Methode ist also nicht für die Reinigung des Enzymrohextraktes geeignet.

In dem zweiten Testansatz wurde ein leicht basischer Grundpuffer stufenweise angesäuert. Hier waren die Fraktionsvolumina so klein, dass keine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt werden konnte. Da in die spezifische Enzymaktivität der Proteingehalt eingerechnet wird, kann hier statt dessen nur die Aktivität des Enzyms und nicht die spezifische Aktivität aufgetragen werden (siehe Abbildung 32b). Aber auch hier erkennt man, dass sich die Enzymaktivität nicht nennenswert erhöht, was sie bei einer guten Aufreinigung oder Aufkonzentrierung tun müsste. Diese Methode ist also wenig geeignet, die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase anzureichern.



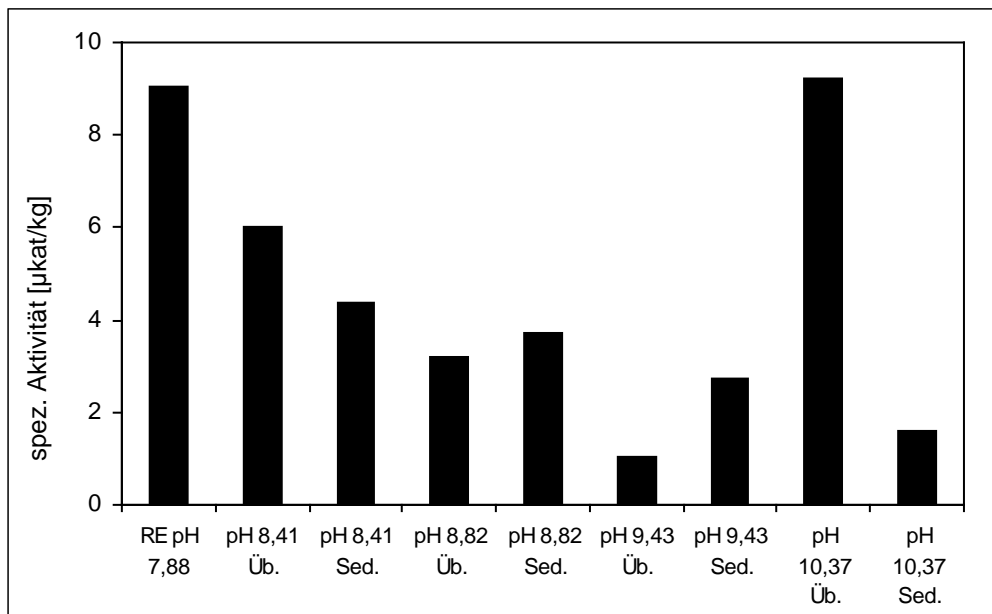


Abb. 32a: Fällung über den pH-Wert in den basischen Bereich hinein. Üb.: Überstand, Sed.: Sediment, RE: Rohextrakt.

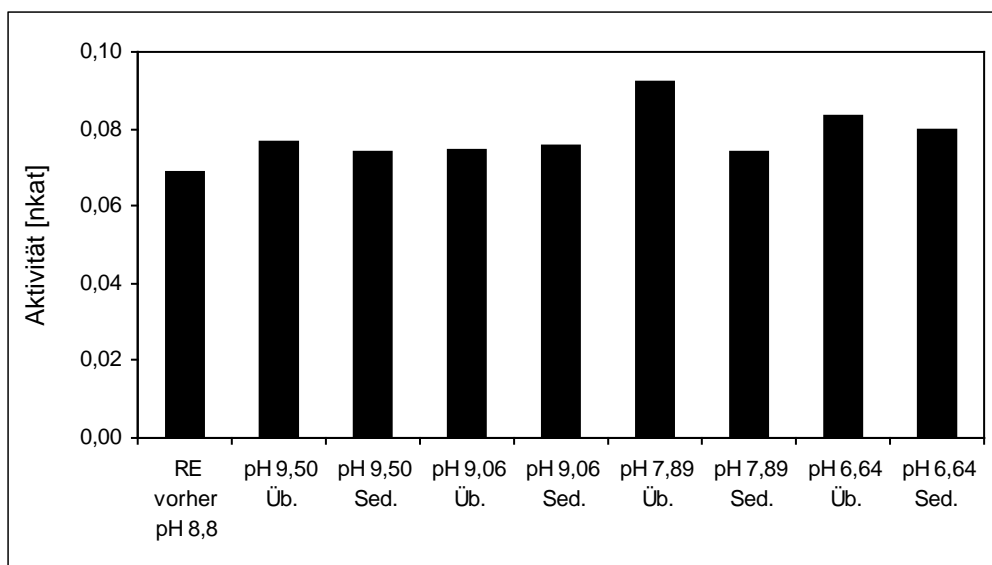


Abb. 32b: Fällung über den pH-Wert in den sauren Bereich hinein. Üb.: Überstand, Sed.: Sediment, RE: Rohextrakt.

### 3.2.1.6. Reinigung über Farbsäulen

Bei den Farbsäulen handelt es sich um kleine Säulen, gefüllt mit an Agarose gekoppelte Farbstoffmoleküle, die eine ähnliche Struktur wie einige Cofaktoren besitzen. Diese Ähnlichkeit soll genutzt werden, um Proteine an das Säulenmaterial zu absorbieren und mit einem salzhaltigen Puffer wieder abzulösen. Die Reinigung über die Farbsäulen hat bei einigen Proben längere Zeit in Anspruch genommen. Das bedeutet für den Enzymextrakt eine erhöhte Gefahr für Proteinabbau durch Proteasen und andere proteinzerstörende Enzyme. In den Abbildungen 33a und 33b sieht man vielleicht auch aus diesem Grund nur wenig

Enzymaktivität. Die Fraktionen wurden komplett auf Enzymaktivität getestet, weswegen kein Protein mehr für die Quantifizierung zur Verfügung stand; daher wird hier nur die Aktivität gezeigt. Von allen Säulen sind die ersten Fraktionen aktiv, was bedeutet, dass das Enzym an keines der Säulenmaterialien gebunden hat. Eine gewisse Ausnahme stellt die Reactive Brown 10 Agarose (R-2757) dar, bei der in der Fraktion 7 eine Erhöhung der Enzymaktivität gemessen werden kann.

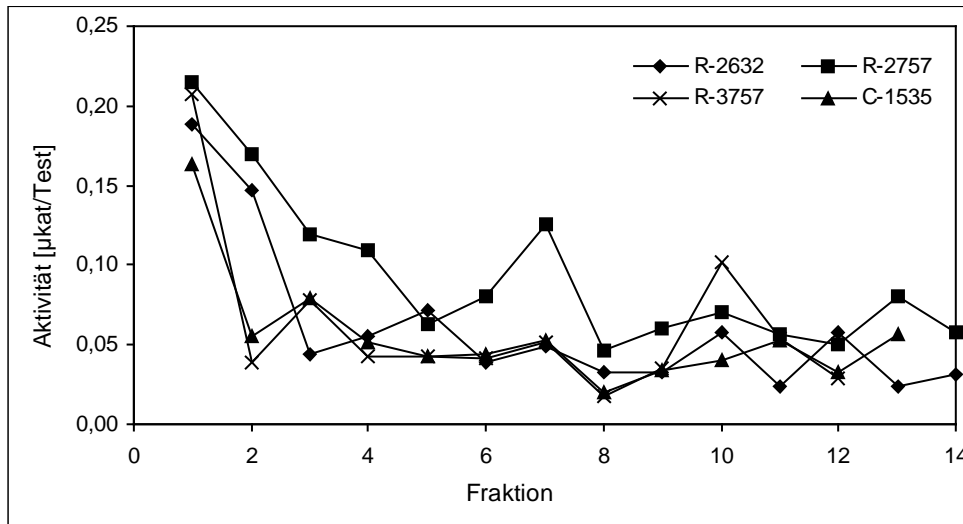


Abb. 33a: Reinigung der POMT über vier unterschiedliche Farbsäulen, wobei der erste Durchlauf die höchste Aktivität besitzt.

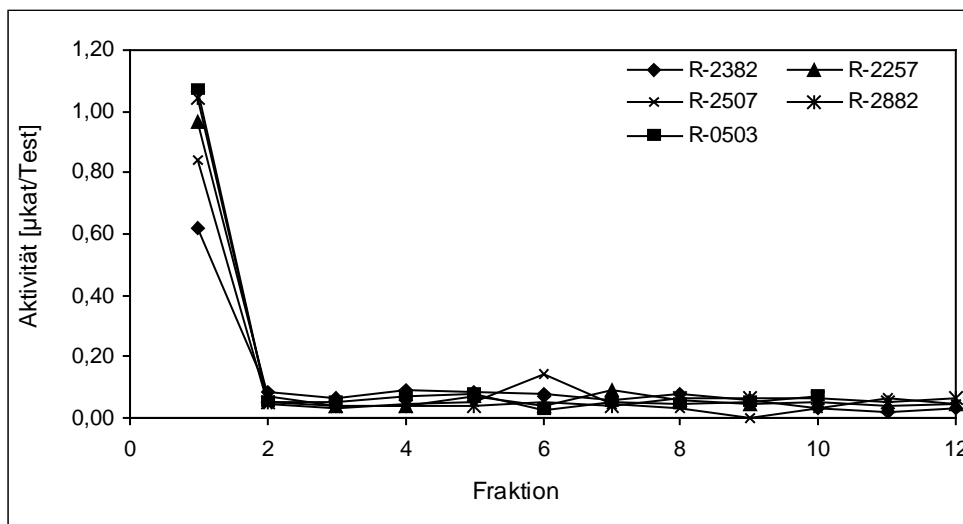


Abb. 33b: Reinigung der POMT über fünf weitere Farbsäulen ohne nennenswerte Aufreinigungseffekte.

### 3.2.1.7. Chromatographie mit Phenylsepharose

Bei dieser Methode soll das Protein über hydrophobe Wechselwirkungen an das Säulenmaterial gebunden und mit Hilfe eines absteigenden Salzgradienten wieder abgelöst werden. Dass diese Methode nicht zur Reinigung der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase (POMT) geeignet ist, zeigt die Abbildung 34. Man kann erkennen, dass sowohl im Durchlauf

zu Beginn des Laufes als auch bei einem Salzgehalt von 0,1 M Ammoniumsulfat POMT vom Säulenmaterial eluiert wird. Die hohe spezifische Aktivität zu Beginn des Laufes kann entweder auf eine Überladung des Säulenmaterials mit zuviel Protein oder auf eine schlechte Bindung zwischen Säulenmaterial und Protein hindeuten. Eine gute Reinigungseffekt ist auf jeden Fall nicht zu sehen. Da auch hier das gesamte Fraktionsvolumen auf Enzymaktivität getestet wurde, konnte keine Proteinbestimmung nach Bradford mehr durchgeführt werden. Demzufolge kann hier nur die Aktivität gezeigt werden. Betrachtet man die Gesamtaktivität der auf die Säule gegebenen POMT, so wurden 400,5  $\mu\text{kat}$  auf die Säule gegeben. Davon finden sich im Durchlauf 30  $\mu\text{kat}$  und in der Fraktion 9, der Fraktion mit der höchsten Aktivität der POMT 14,5  $\mu\text{kat}$  wieder. Der Verlust beträgt also 89 %. Die Fraktionen 20 bis 23 weisen dann noch einmal Methyltransferaseaktivität auf. Bei einer guten Trennung sollte das nicht der Fall sein.

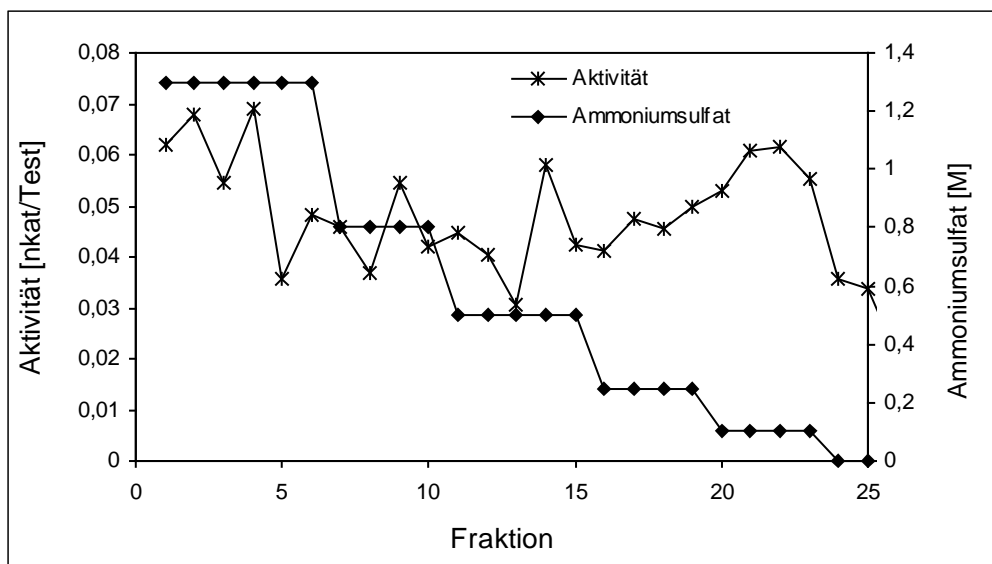


Abb. 34: Aufreinigung der POMT über Phenylsepharose

### 3.2.1.8. Natives Polyacrylamid-Gel

Nach der Elektrophorese über ein Polyacrylamidgel ohne SDS konnte keine aktive Methyltransferase mehr aus dem Gel isoliert werden. Das kann verschiedene Ursachen haben. Es wäre zum einen denkbar, dass die Aufbewahrung des Proteins über längere Zeit bei Raumtemperatur während der Elektrophorese einen zerstörerischen Einfluss hat. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass aktives Protein nicht mehr aus der Gelmatrix herausgelöst werden kann. Auch der angelegte Strom kann das Enzym inaktiviert haben, und es könnte zu Fehlfaltungen gekommen sein. Die Trennung der Proteine ist erfolgt, da die Färbung einer Proteinbahn mit der Methode mit Coomassie eine Auftrennung verschiedener Proteine gezeigt hat.

## 3.2.2. Reinigungsschritte mit FPLC

### 3.2.2.1. Q-Sepharose Fast Flow

Die Anionenaustauschchromatographie ist grundsätzlich gut geeignet, um spezielle Proteine aus einem Rohextrakt aufzureinigen. Die Abbildung 35 zeigt einen Lauf, bei dem durchgehend die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet wurde. Die Bestimmung der Methyltransferaseaktivität zeigt, dass einige Proteine nicht an die Säule gebunden haben, wobei es sich nicht um die gesuchte  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase handelte. Es werden erst bei einem angenommenen Natriumchlorid-Gehalt (errechnet aus dem Gradientenprogramm) von 0,2 M Fraktionen mit spezifischer Methyltransferaseaktivität von der Säule gespült. Da aber gleichzeitig auch der größte Anstieg der Absorption bei 280 nm zu beobachten ist, werden auch andere Proteine zusammen mit dem gesuchten eluiert. Trotzdem zeigt der Verlauf der Absorption, dass zu Beginn des Laufes und bei 0,5 M Natriumchlorid Proteine von der gesuchten Methyltransferase abgetrennt werden. Es erfolgt also eine Reinigung. Da das Protein auch noch nach der Reinigung Aktivität zeigt, kann diese Methode zur Vorbereitung des Enzymextraktes für weitere Reinigungsschritte benutzt werden. Von den aufgetragenen 506,2 pkat Gesamtaktivität des durch Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Proteins können in den aktiven Fraktionen 392 pkat wiedergefunden werden, das entspricht 77 %. Der Verlust ist also mit 23 % relativ gering. Dabei wird die spezifische Aktivität in den vereinigten Fraktionen 20 bis 22 von 7  $\mu$ kat/kg auf 14  $\mu$ kat/kg verdoppelt, in der Probe mit der höchsten spezifischen Aktivität können sogar fast 90  $\mu$ kat/kg gemessen werden, also um den Faktor 12 erhöht.

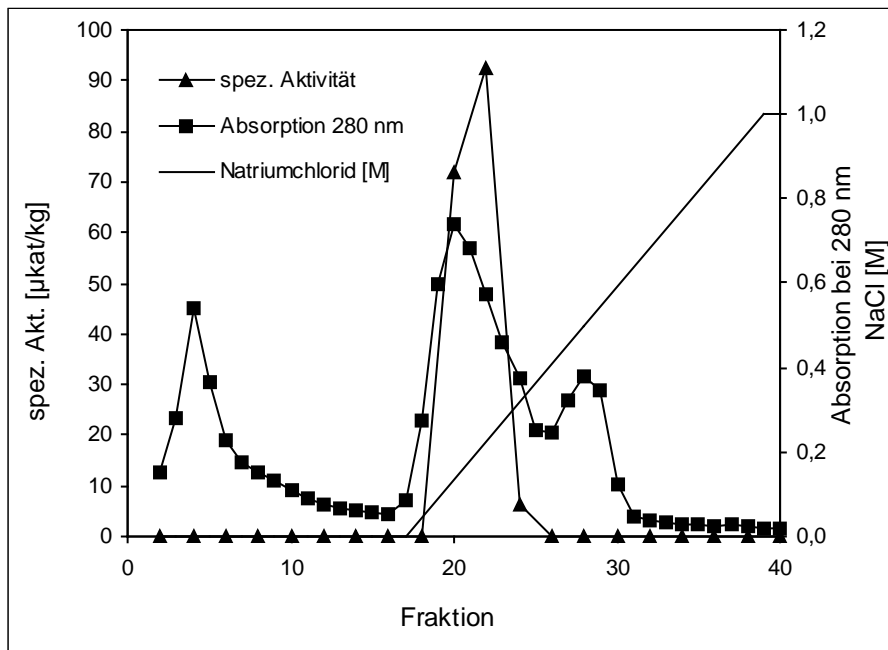


Abb. 35: Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose FF.

### 3.2.2.2. DEAE-Sephacel

Auch die Aufreinigung über einen schwächeren Anionentauscher kann zur Aufreinigung des Rohextraktes benutzt werden. Hierfür wurde DEAE-Sephacel benutzt. Der in Abbildung 36 gezeigte FPLC-Lauf ähnelt erwartungsgemäß dem Lauf über Q-Sepharose, da das gleiche Trennungsprinzip zugrunde liegt. Auch bei DEAE-Sephacel sieht man an der Absorption bei 280 nm die Abtrennung der nicht bindenden Proteine zu Beginn des Laufes. Ein weiteres Eluieren der Proteine ist bei einem Gehalt von 0,7 M Natriumchlorid zu sehen. Die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase wird auch hier von einigen anderen Proteinen abgetrennt, da sie erst bei 0,75 - 0,8 M Natriumchlorid im Puffer eluiert wird. Die Aktivität des Enzyms ist auch nach dem Lauf erhalten, was eine weitere Reinigung möglich macht. Von 525  $\mu\text{kat}$ , die auf die Säule aufgetragen wurden, können hinterher in den zwei aktivsten Fraktionen (20 und 21) 85  $\mu\text{kat}$  wiedergefunden werden. Das entspricht einem Verlust von 83,8 %. Dabei konnte die spezifische Aktivität von 3,6  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  auf 11  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  erhöht werden.

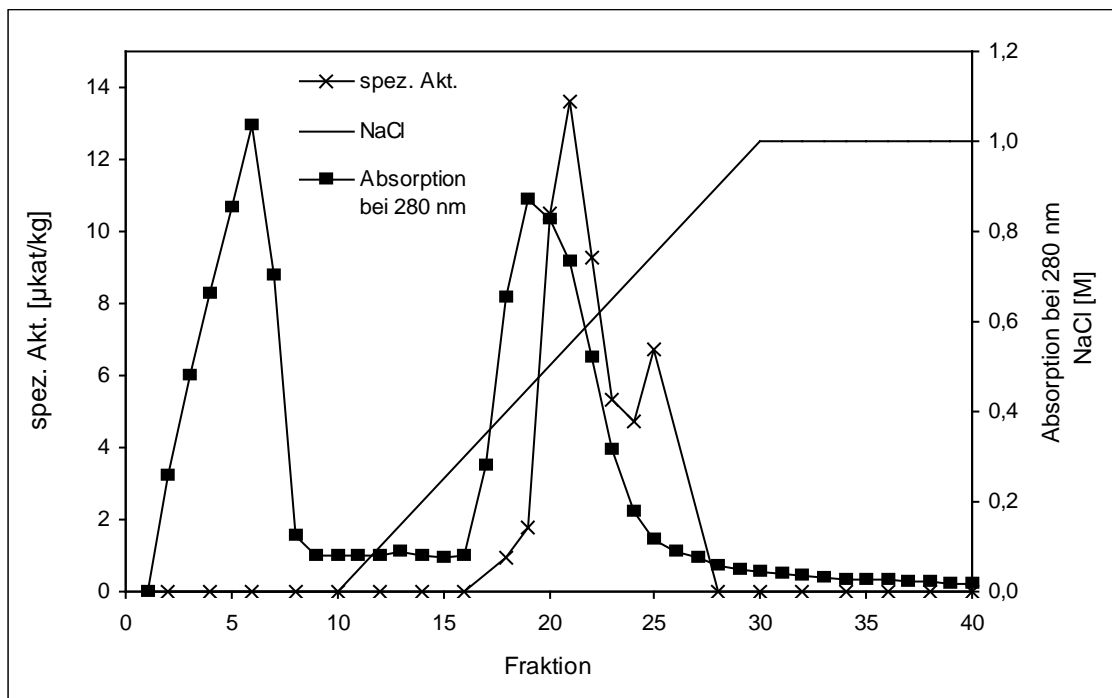


Abb. 36: Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel

### 3.2.2.3. SAH-EAH-Sepharose

Nach der ersten Aufreinigung des Rohextraktes über eine Anionenaustauschchromatographie konnte ein affines Säulenmaterial auf Reinigungseffekte überprüft werden. Dazu wurde die SAH-EAH-Sepharose generiert, da Methyltransferasen generell an SAH binden sollten (Sharma und Brown 1978). Der Lauf, der in Abbildung 37 gezeigt wird, zeigt, dass diese Überlegung auch hier zutrifft. Die Absorption bei 280 nm der Fraktionen 1 bis 8 zeigt das Abtrennen nicht bindender Proteine. Hier kann keine Aktivität der gesuchten Methyltransferase nachgewiesen werden. Auch bei einem ansteigenden Gehalt an Kaliumchlorid im Elutionspuffer werden viele Proteine von der Säule gespült, ohne dass hier

Enzymaktivität zu finden ist. Diese wird in den Fraktionen 27 bis 31 zwischen 0,4 und 0,6 M Kaliumchlorid im Puffer und dann noch einmal zwischen Fraktion 35 und 37 bei 0,8 M Kaliumchlorid gefunden. Es könnte sich bei diesem zweiten Protein um ein anderes Protein mit einer Nebenaktivität für  $\beta$ -Peltatin handeln. Auch die Trennung von zwei Isoformen der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase wäre denkbar. Bisher hat aber noch kein Hinweis auf die Existenz von Isoformen vorgelegen. Vergleicht man den aufgetragenen Enzymextrakt, der über eine Q-Sepharose und eine Ammoniumsulfatfällung vorgereinigt war, mit den aktivsten Fraktionen des Laufes, kann man eine deutliche Aufreinigung sehen. Die Gesamtaktivität sinkt zwar von 309  $\mu$ kat auf 150  $\mu$ kat, was einem Verlust von 51,5 % entspricht, aber die spezifische Aktivität steigt um den Faktor 5 von 20  $\mu$ kat/kg auf 100  $\mu$ kat/kg.

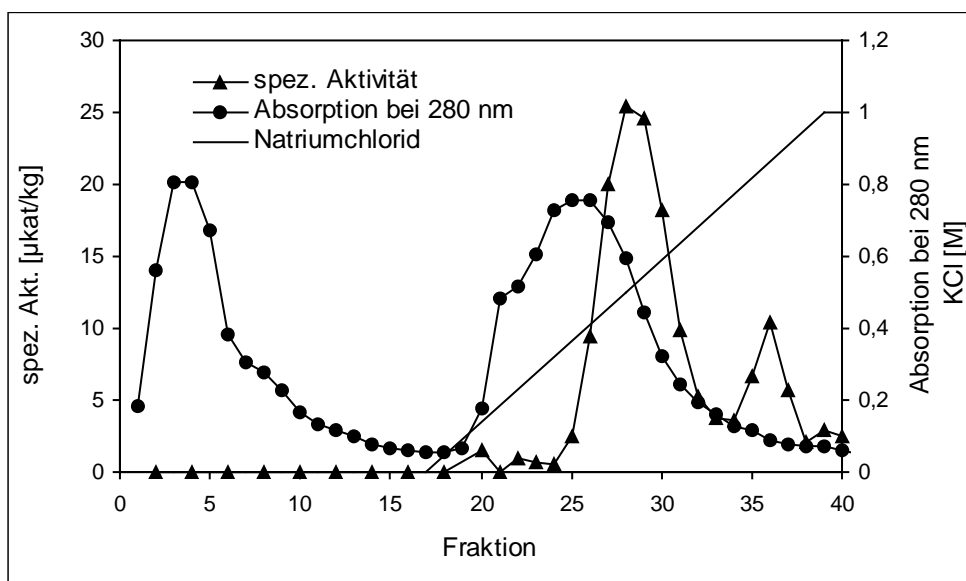


Abb. 37: Affinitätschromatographie über SAH-EAH-Sepharose.

### 3.2.2.4. Adenosin-Agarose

Auch für diese Affinitätschromatographie wurde das Säulenmaterial selbst hergestellt, indem durch Abspalten endständiger Phosphatgruppen von Adenosin 5'-Monophosphat Agarose mit alkalischer Phosphatase diese Agarose aktiviert wurde. Der Chromatographie-Lauf mit diesem aktivierten Säulenmaterial ist in Abbildung 38 gezeigt. An der Absorption bei 280 nm sieht man zwei große Bereiche, in denen Proteine von der Säule eluieren. Zuerst werden alle Proteine detektiert, die nicht an das Säulenmaterial binden können. Schon bei den Waschfraktionen 14 bis 22 wird viel Protein mit  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität von der Säule gespült. Das zeigt, dass entweder keine Bindung an das Säulenmaterial erfolgt oder zuviel Protein auf die Säule geladen wurde. Durch einen ansteigenden SAM-Gradienten wird dann die Methyltransferase spezifisch von der Säule eluiert. Auch hier gibt es Fraktionen mit Methyltransferaseaktivität. Die Methode ist also generell geeignet, Methyltransferasen aus einem chromatographisch vorgereinigten Extrakt aufzureinigen. Die Aktivität der Proben, die bei einem Gehalt von 0,8 M SAM eluiert wurden, ist aber nicht so hoch wie bei den nicht

gebundenen Proteinen zu Beginn des Laufes. Da jeweils die komplette Fraktion für den Enzymtest verwendet wurde, konnte auch hier keine Proteinkonzentration bestimmt werden, so dass keine spezifische Aktivität berechnet werden kann. Die Auftragung auf ein SDS-Gel zur Überprüfung der Reinheit zeigt nur noch wenige Proteinbanden. Es ist also eine Aufreinigung erfolgt, auch wenn nur noch wenig Enzymaktivität übrig bleibt. Von den 51 pkat Gesamtaktivität, die auf die Säule aufgetragen wurden, konnten nur 16 pkat in den aufgereinigten Fraktionen wiedergefunden werden. Das entspricht einem Verlust von 68 %, ein Reinigungseffekt kann nicht berechnet werden, da die Proteinmenge nicht quantifiziert wurde.

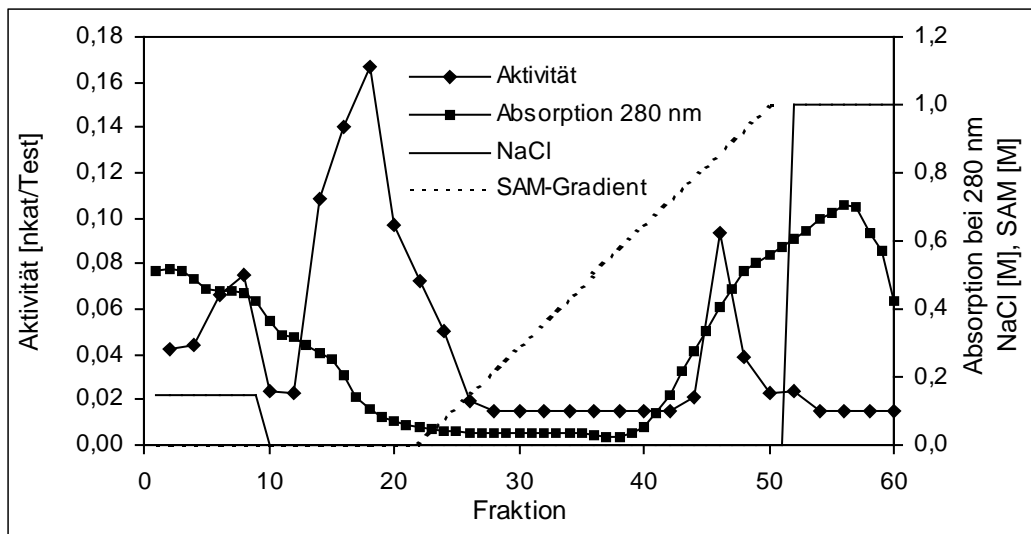


Abb. 38: Affinitätschromatographie über Adenosin-Agarose.

### 3.2.2.5. Größenausschlusschromatographie

Der in Abbildung 39a wiedergegebenen Lauf über eine Superdex 200 HR10/30-Säule zeigt deutlich, dass Proteine in unterschiedlichen Größenbereichen in dem aufgereinigten Enzymextrakt vorhanden sind. Da nur wenige Fraktionen eine spezifische Methyltransferaseaktivität besitzen, kann über den Vergleich mit Eichproteinen die Größe bestimmt werden. Dazu muss das Volumen zwischen Photometer und Probensammler ermittelt werden, da bei den Eichproteinen die Absorption gemessen wird, bei den Proben aber die Fraktionen gesammelt und auf Aktivität getestet werden. Die sich daraus ergebende Verzögerung stellte sich aber als vernachlässigbar gering heraus. Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wird anschließend auf der Eichgeraden (Abbildung 39b) eingetragen. So lässt sich die Größe der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase mit etwa 64 kDa bestimmen.

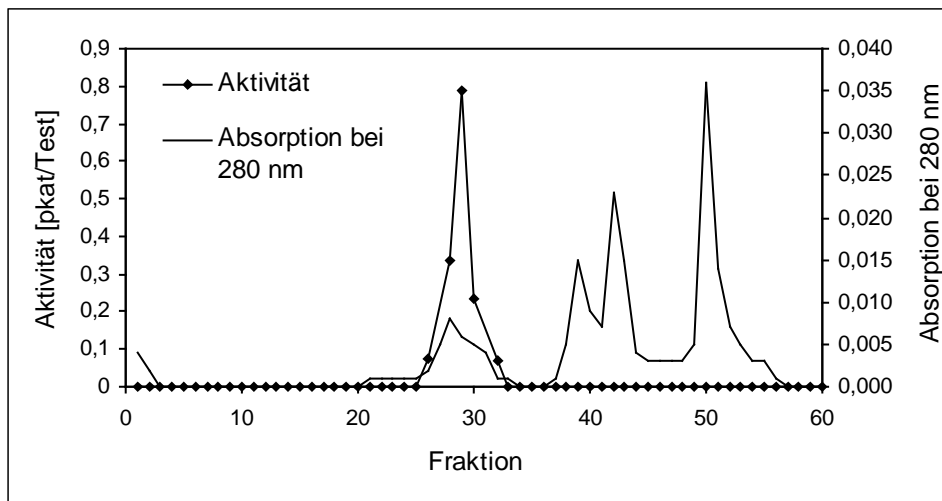


Abb. 39a: Größenausschlusschromatographie von vorgereinigtem Protein.

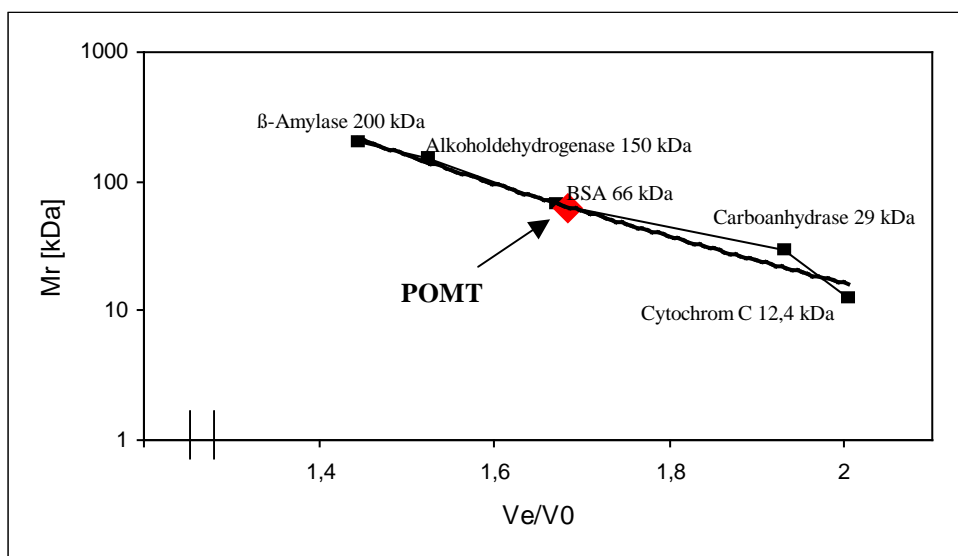


Abb. 39b: Eichgerade der Gelfiltrationssäule mit Markerproteinen. POMT: Lage der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase auf der Eichgeraden, es ergibt sich ein ungefähres Molekulargewicht von 64 kDa. Ve: Elutionszeit, V0: Leerwert zwischen Photometer und Fraktionssammler.

### 3.2.2.6. Chromatographie an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit eignet sich als Säulenmaterial nicht so gut, die POMT zu reinigen. Der Lauf wird unter Abbildung 40 gezeigt. Man sieht hier nur einen kleinen Bereich von aktivem Protein zwischen den Fraktionen 2 und 6, wobei es sich hier um nicht an das Säulenmaterial gebundene Proteine handelt. Ein gewisser Reinigungseffekt wird erzielt, da einige Proteine an das Säulenmaterial binden und erst zwischen den Fraktionen 14 und 24 eluiert werden. Diese Proteine besitzen zwar keine Methyltransferaseaktivität, werden aber aus dem Proteingemisch entfernt. Trotz allem ist aber der Verlust der Aktivität durch den Lauf höher als die hierbei erzielte Reinigung. Auch bei diesem Lauf wurden die kompletten Fraktionen auf Methyltransferaseaktivität untersucht und daher keine Proteinkonzentration mehr bestimmt.



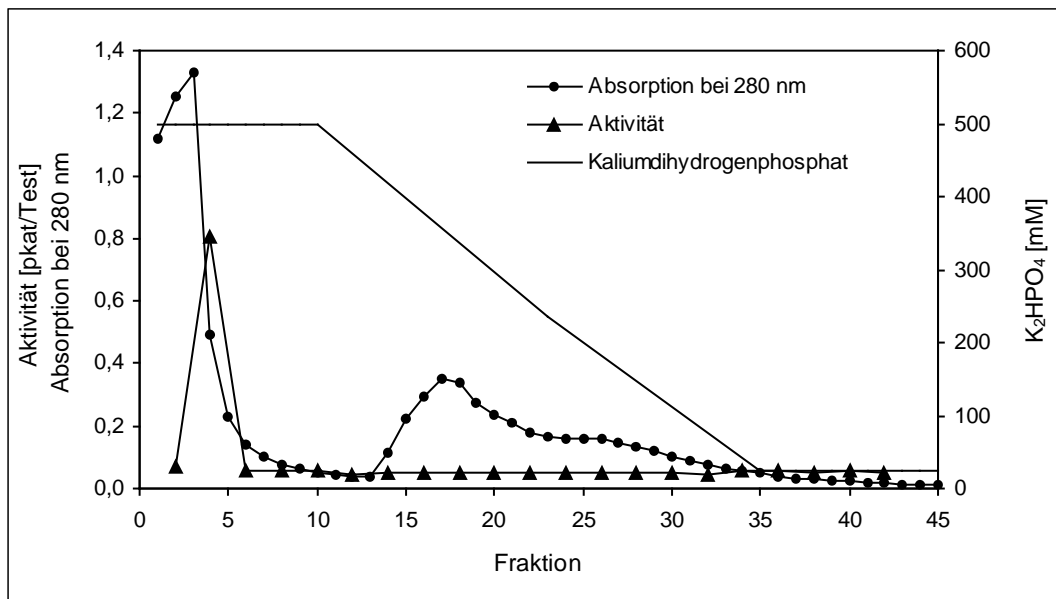


Abb. 40: Chromatographische Trennung über Hydroxylapatit.

### 3.2.2.7. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Nach dem Lauf über Fractogel TSK Butyl 650-M kann keine aktive Fraktion mehr gefunden werden. Diese Methode ist somit nicht geeignet, den Enzymrohextrakt aufzureinigen. Die  $\beta$ -Peltatin-6 *O*-Methyltransferase wird entweder gehemmt oder bei diesem Lauf inaktiviert.

### 3.2.2.8. Reinigung der $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase durch aufeinanderfolgende Chromatographien

Nachdem nun einige erfolgreiche Möglichkeiten zur Aufreinigung der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase (POMT) zur Verfügung stehen, kann damit begonnen werden, sie hintereinander anzuwenden. Dabei werden zunächst weniger spezifische Reinigungsmethoden wie die Ausfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung oder die Anionenaustauschchromatographie benutzt und im Anschluss erst die Affinitätschromatographie verwendet. Die Reinigungstabelle unter Tabelle 2 zeigt einen Aufreinigungsfaktor von 12, vergleicht man den Rohextrakt mit der aktivsten Fraktion der SAH-EAH-Sepharose. Er wird dabei von 235 mg Protein auf 1,5 mg Protein eingengt. Die Aktivität sinkt von 1860 pkat auf 150 pkat, wodurch die Methyltransferaseaktivität schwerer nachweisbar ist. Durch die Aufreinigung der POMT steigt aber die spezifische Aktivität von 7,9  $\mu$ kat/kg auf 100  $\mu$ kat/kg, was der schon erwähnten 12-fachen Aufreinigung entspricht.

	Aktivität [pkat]	Protein [mg]	Spez. Aktivität [μkat/kg]	Gehalt [%]	Aufreinigung (-fach)
Rohextrakt	1860,00	235,0	7,9	100	1,0
Fällung mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40-80%- Sättigung)	506,24	70,6	7,2	27	0,9
Q-Sepharose FF	392,75	27,4	14,3	21	1,8
Fällung mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (80%-Sättigung)	308,66	14,9	20,7	17	2,6
SAH-EAH- Sepharose	149,83	1,5	99,9	8	12,6

Tab. 2: Reinigungstabelle für die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase

### 3.2.3. Kontrolle der Reinigung über ein SDS-Polyacrylamidgel

Die einzelnen Enzymproben wurden nach entsprechender Vorbereitung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Das in Abbildung 41 gezeigte Gel wurde mit der Silberfärbung nach Blum gefärbt (siehe Kapitel 2.2.3.4.). Es zeigt den Verlauf einer Proteinaufreinigung nach dem in der Reinigungstabelle beschriebenen Schema. Deutlich erkennt man die Abnahme der Anzahl der Proteinbanden nach der Ammoniumsulfatfällung des Rohextraktes, dargestellt in den Spuren 1 und 2. Nach der Anionenaustauschchromatographie erkennt man nur noch sieben Proteinbanden auf dem Gel. Nach dem letzten und spezifischsten Reinigungsschritt, der SAH-EAH-Sepharose, sind nur noch wenige Proteinbanden bei ca. 30, 35, 41, 50 und 68 kDa auf dem Gel zu erkennen. Die durchgehende dunkle Bande am unteren Ende des Gels wird hervorgerufen durch den Farbstoff Bromphenolblau und darf nicht mit einer Proteinbande verwechselt werden.

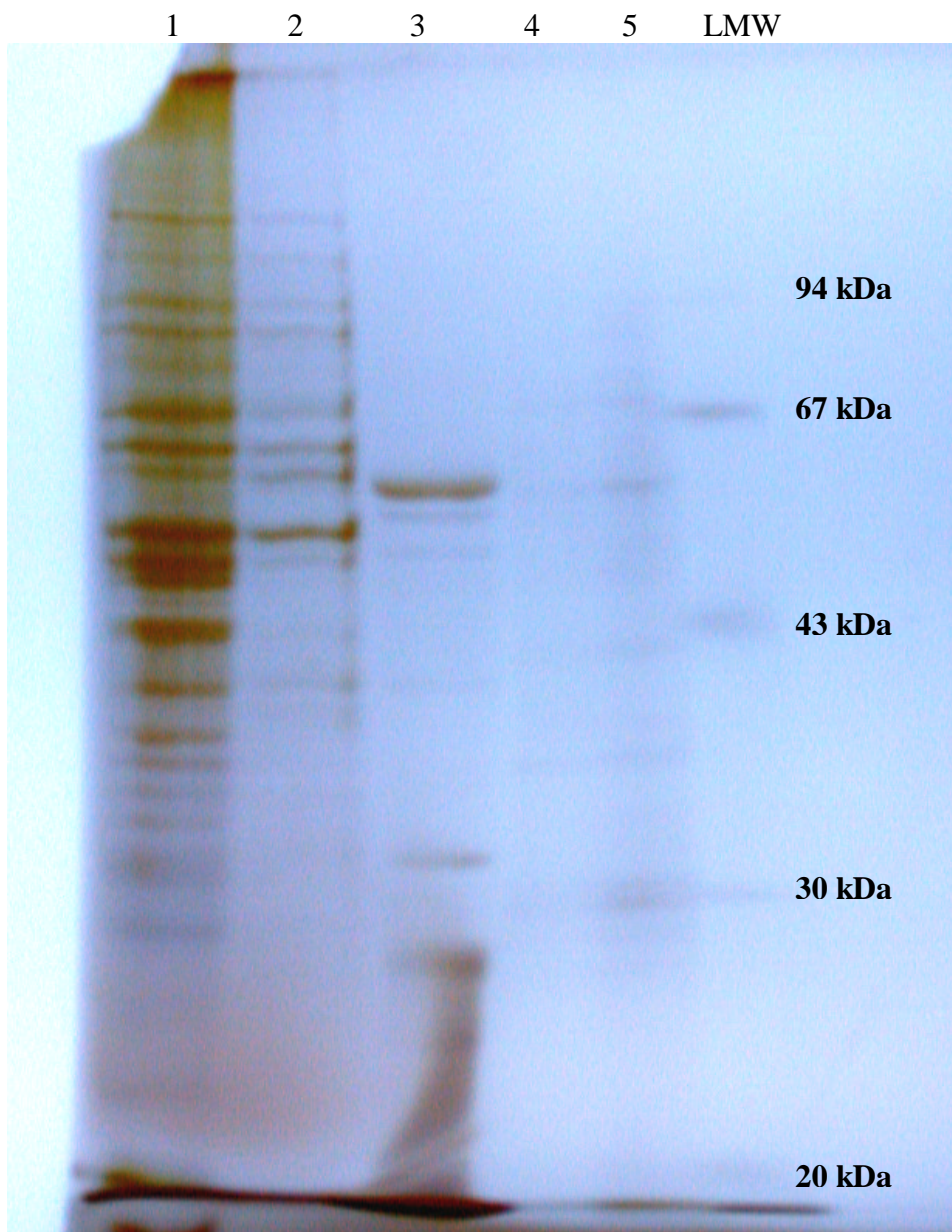


Abb. 41: SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli, gefärbt mit der Silberfärbung nach Blum.

Auf Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Enzymextrakt nach der Ammoniumsulfatfällung, Spur 3: Enzymextrakt nach der Q-Sepharose FF, Spur 4: Enzymextrakt nach der SAH-EAH-Sepharose, komplette Fraktion 28 (2 ml) mit 0,5 M Kaliumchlorid, Spur 5: Enzymextrakt nach der SAH-EAH-Sepharose, komplette Fraktion 29 (2 ml) mit 0,6 M Kaliumchlorid. Außer bei den Proben der SAH-EAH-Sepharose wurden immer 100 µg Protein aufgetragen.  
 LMW: Low molecular weight Proteinmarker.

### 3.3. Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Linum nodiflorum*

Die Auswertung der zwei durchgeführten Charakterisierungen wird weitestgehend parallel betrieben, da die Ergebnisse ähnlich sind. Es wurde dieselbe Linie von *Linum nodiflorum* untersucht, wobei einige Wochen Kulturperiode zwischen den Versuchen lagen. Wie man an den meisten Daten erkennen kann, verändern sich Zellen in Suspensionskultur relativ schnell. Die hauptsächlichen Aussagen bleiben aber auch nach der Zeit noch gültig.

#### 3.3.1. Mediumsparameter

##### 3.3.1.1. Volumenänderung über den Kulturverlauf

Ausgehend von einem Volumen von 47 ml pro Kolben verringert sich das Mediumsvolumen im Laufe der Kulturtage. Die Abbildung 42 zeigt, dass das niedrigste Volumen am 10. Tag mit 26 ml in der ersten Versuchsreihe ermittelt werden kann, bei der zweiten Reihe pendelt sich ab dem 7. Tag ein Medienvolumen von 33 ml ein. Das Volumen des Mediums steigt nach dem 10. Tag der Suspensionskultur ein wenig an, da die Zellyse einsetzt und somit wieder Flüssigkeit freigesetzt wird.

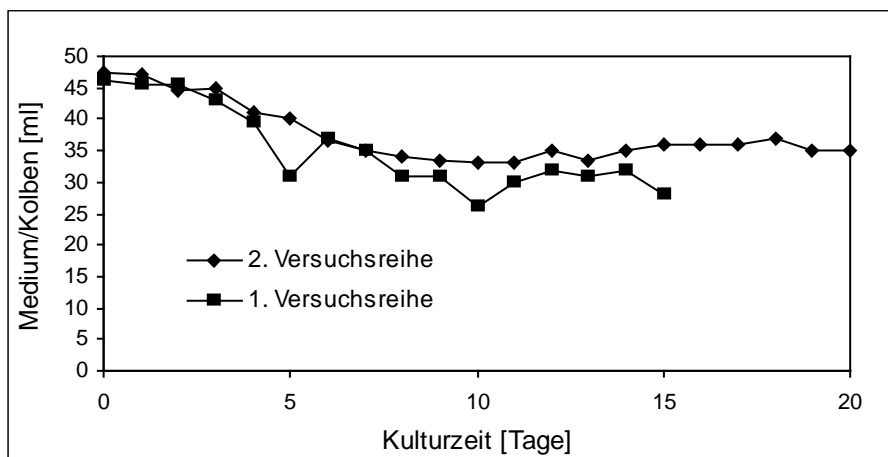


Abb. 42: Volumen des abgesaugten Mediums über den Kulturverlauf von 15 und 20 Tagen.

##### 3.3.1.2. Änderung des pH-Wertes im Kulturverlauf

Der pH-Wert wurde bei der Herstellung des Mediums auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren und dem Überimpfen der ersten Zellen in das Medium ergibt sich in der ersten Versuchsreihe ein pH-Wert von 4,78 (Abbildung 43a). Von diesem ersten Wert steigt der pH-Wert im Laufe der Kulturtage langsam aber stetig an, bis er an Tag 12 einen Wert von 7,56 erreicht. Hiernach sinkt er wieder etwas und pendelt sich schließlich bei 7,2 ein. In der Abbildung 43b sind die Daten für die zweite Versuchsreihe aufgeführt. Der Verlauf dieser Messung entspricht dem der ersten, wobei der pH-Wert mit 5,5 von einem höheren Wert startet und sich mit pH 6,6 auch auf einen niedrigeren Wert einpendelt.

### 3.3.1.3. Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit gilt als Maß für die im Medium befindlichen Ionen. Zu Beginn der ersten Messreihe entsprechen diese einer Leitfähigkeit von 5,36 mS. Da die Zellen aber schnell Ionen aus dem Medium aufnehmen, sinkt der Wert bis auf 1,24 mS am 9. Kulturtag. Anschließend steigt die Leitfähigkeit im Medium wieder an, auf einen Wert von 2,968 mS am Ende des Messzeitraumes (Abbildung 43a). In der zweiten Messreihe wurde hier ab dem 15. Kulturtag eine stabile Phase von 3,3 mS erreicht, die sich kaum weiter verändert hat (Abbildung 43b). Die resultierende Kurve entsteht durch die Aufnahme der Ionen in die Zellen, die sie als Nährstoffe verwerten. Nach dem Absterben der Zellen werden die in den Zellen befindlichen Ionen an das Medium abgegeben und sind wieder messbar.

### 3.3.1.4. Gesamtzuckergehalt

Zucker ist als Energiequelle für das Überleben der Zellen wichtig. Herrscht hier ein Mangel, gehen die Zellen nach kurzer Zeit zugrunde. Bei dieser Charakterisierung konnte herausgefunden werden, dass der im Medium vorhandene Zucker nach 7 Tagen verbraucht ist. Der Zuckergehalt startet bei 3,4 % in der ersten Versuchsreihe. Wie in Abbildung 43a gezeigt, beginnt er am dritten Tag, sich merklich zu verändern. Der Zucker wird von den Zellen verbraucht und zeigt zwischen dem 7. und 9. Tag einen Minimalwert von 0,3 %. Danach steigt der „Zuckergehalt“ im weiteren Kulturverlauf wieder bis zum 15. Tag auf einen Wert von 0,9 % an. Die zweite Versuchsreihe zeigt in Abbildung 43b, dass der Zuckergehalt ab dem 15. Tag nicht weiter steigt sondern diesen Wert noch weitere fünf Tage hält.

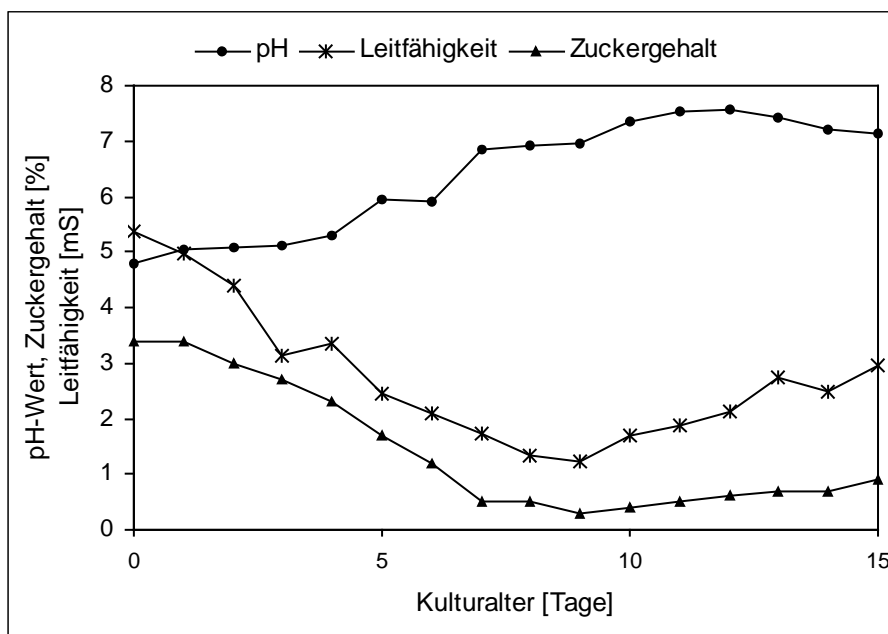


Abb. 43a: Leitfähigkeit, pH-Wert und Zuckergehalt des Mediums über einen Kulturverlauf von 15 Tagen, erste Messreihe.

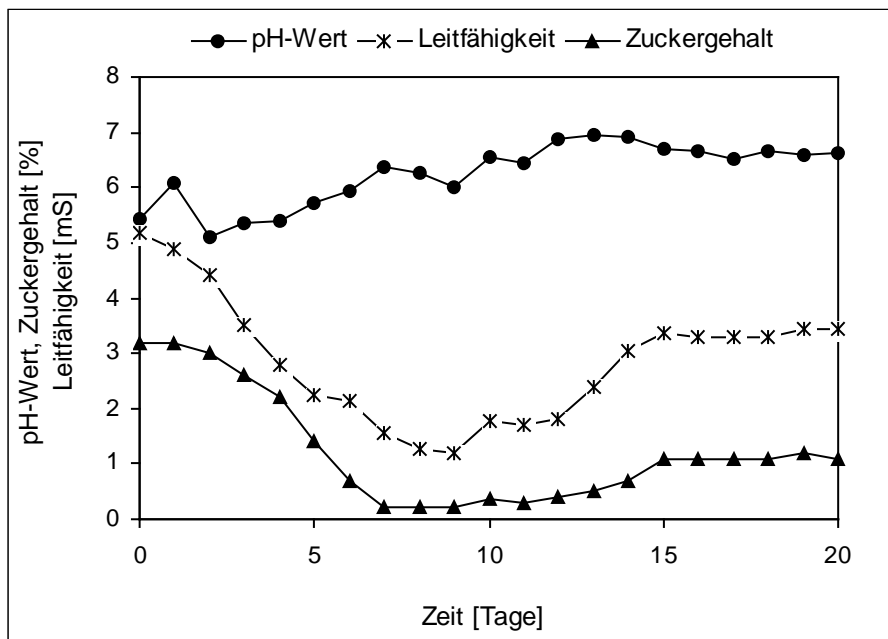


Abb. 43b: Leitfähigkeit, pH-Wert und Zuckergehalt des Mediums über einen Kulturverlauf von 20 Tagen, zweite Messreihe.

### 3.3.1.5. Ammoniumgehalt im Medium über den Kulturverlauf

Dem Medium wurden 20 mM Ammoniumsulfat vor dem Autoklavieren zugesetzt. Am 0. Kulturtag lassen sich davon noch 2,64 mM messen. Der Verlust des ursprünglich enthaltenen Ammoniums kann mit dem Entweichen von Ammoniak beim Autoklavieren erklärt werden, da hiernach nur noch 3,8 mM Ammonium im Medium enthalten sind. Bis zum 5. Kulturtag ist dann nahezu alles Ammonium in die Zellen aufgenommen, und man kann keines mehr im Medium nachweisen (Abbildung 44). Auch gegen Ende der Kulturzeit, wenn viele Zellen lysieren und ihren Inhalt wieder an das Medium abgeben, ändert sich die Ammoniumkonzentration nicht mehr. Das ist ein deutliches Zeichen dafür, daß das aufgenommene Ammonium als externe Stickstoffquelle in der Zelle schnell in Metabolite überführt wird und nicht mehr frei vorliegt. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde keine Bestimmung des Ammoniumgehalts durchgeführt.

### 3.3.1.6. Nitratgehalt im Medium über den Kulturverlauf

Vor dem Autoklavieren enthält das Medium 40 mM Nitrat. Am Überimpftag lassen sich hiervon noch 31,5 mM wiederfinden. Auch hier sinkt der Gehalt annähernd linear bis auf 2,2 mM am 8. Kulturtag. Ab dem 10. Tag steigt der Wert wieder an, bis er sich ab dem 16. Tag auf einen Gehalt von ca. 20 mM einstellt (Abbildung 44). Auch Nitrat kann von den Zellen als Stickstoffquelle genutzt werden. Aber hier dauert die Aufnahme länger als bei Ammonium, der Gehalt erreicht erst nach 8 Tagen seinen niedrigsten Stand. Während nach Abgabe des Zellinhaltes an das Medium kein Ammonium mehr nachgewiesen werden konnte, steigt der Nitratgehalt beim Absterben der Zellen wieder an. Lediglich ein kleiner Teil wurde von den Zellen verstoffwechselt.

### 3.3.1.7. Phosphatgehalt im Medium über den Kulturverlauf

Phosphat kann von den Zellen sehr schnell aufgenommen werden. Dem Medium werden vor dem Autoklavieren 1,25 mM Phosphat in Form von Kaliumdihydrogenphosphat zugegeben. Über 20 Tage wird der Verlauf in einer Versuchsreihe beobachtet. Der Phosphatgehalt liegt zu Beginn der Charakterisierung im Medium bei 0,93 mM (Abbildung 44). Schon am ersten Tag fällt er auf eine nicht mehr messbare Größe. Am 13. Tag steigt das erfassbare Phosphat wieder gleichmäßig an, bis es ab dem 17. Tag einen Gehalt von 2,16 mM hält. Dies ist annähernd doppelt so viel Phosphat wie dem Medium zugesetzt wurde. Es muss demzufolge auch Phosphat in Verbindungen in den Zellen enthalten sein, welches nach dem Zugrundegehen der Zellen ab dem 9. Kulturtag mit erfasst wird. Dieser Phosphatspeicher der Zellen entsteht durch an den Zuckeralkohol Inosit gebundene Phosphorsäure und ist ein in Pflanzen weit verbreitetes System der Phosphatspeicherung. Die so entstehende Verbindung ist ein Hexaphosphorsäureester des meso-Inosits, man nennt sie Phytinsäure.

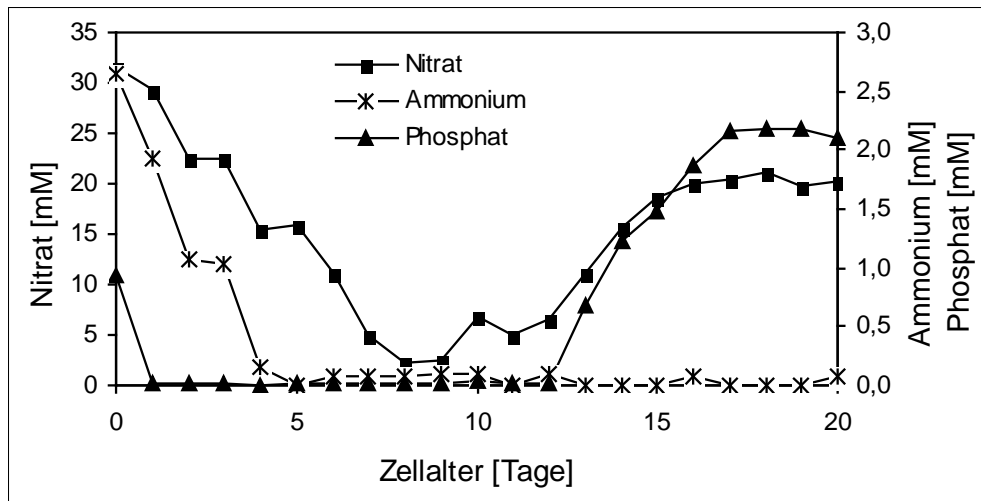


Abb. 44: Nitrat-, Ammonium- und Phosphatgehalt des Mediums über einen Kulturverlauf von 20 Tage

### 3.3.2. Wachstumsparameter

#### 3.3.2.1. Frischgewicht und Trockengewicht

Beide Versuchsreihen zeigen einen ähnlichen Verlauf der Kurven, die sich aus dem Frisch- und Trockengewicht ergeben. Zuerst nimmt das Trockengewicht zu, das Frischgewicht zeigt die jeweilige Entwicklung immer mit einem Tag Verzögerung. Mit zunehmendem Alter der Kulturen stellt sich erst eine kurze Phase der Stagnation ein, bevor das Gewicht der Zellen später wieder absinkt. Deutlicher kann man dieses Absinken der Biomasse in der zweiten Versuchsreihe beobachten, da hier die Kulturen über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden. Die erste Reihe startet bei 3,5 g Frischgewicht und 0,27 g Trockengewicht pro Kolben. Nach 7 Kulturtagen ist bei dem Trockengewicht der höchste Wert erreicht, was bei dem Frischgewicht erst nach 10 Tagen der Fall ist. Das Trockengewicht fällt nach dem Erreichen dieses höchsten Wertes von 0,94 g bis zum Ende der 15 Tage auf einen Wert von

0,52 g pro Kolben zurück. Das Frischgewicht nimmt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums langsamer ab. Die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe sind in Abbildung 45a dargestellt. Ausgehend von 2,9 g Zellen am 0. Kulturtag direkt nach dem Überimpfen steigt das Frischgewicht der zweiten Versuchsreihe (Abbildung 45b) bis zum 7. Tag stetig auf 14 g Zellen pro Kolben. Hier hält es sich für vier Tage, bis es dann schließlich bis zum 16. Kulturtag abnimmt auf den Wert von 8,3 g, der bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 20 Tagen konstant bleibt. Das Trockengewicht pro Kolben startet bei 0,2 g an Tag 0. Parallel zum Frischgewicht steigt auch hier die Masse an bis 0,9 g am 6. Tag. Ab diesem Tag sinkt es kontinuierlich bis zum 13. Kulturtag. Hier erreichen die getrockneten Zellen ein Gewicht von 0,36 g pro Kolben. Bei diesem Gewicht bleibt das Trockengewicht bis zum Ende des Messzeitraumes.

Bei beiden Messreihen sieht man den gleichen Verlauf, der sich aus dem Zellwachstum ergibt. Zunächst werden neue Zellen gebildet, die Biomasse und damit das Trockengewicht steigt. Die neuen Zellen werden größer und nehmen Wasser auf, sie bilden mehr Frischgewicht, das Trockengewicht nimmt nicht zu. Wenn die meisten Nährstoffe, vor allem Zucker als Kohlenstoffquelle zur Neige gehen, hören die Zellen auf sich zu teilen, das Trockengewicht sinkt aufgrund von ersten Absterbevorgängen. Das Frischgewicht kann noch weiter ansteigen, da noch Zellen wachsen und Wasser aufnehmen können. Nach einigen Tagen geht das nicht mehr, da die Nährstoffe auch für die Unterhaltung der Zellen nicht mehr ausreichen, die Zellen sterben vermehrt ab. Dies ist der Moment, an dem auch das Frischgewicht absinkt.

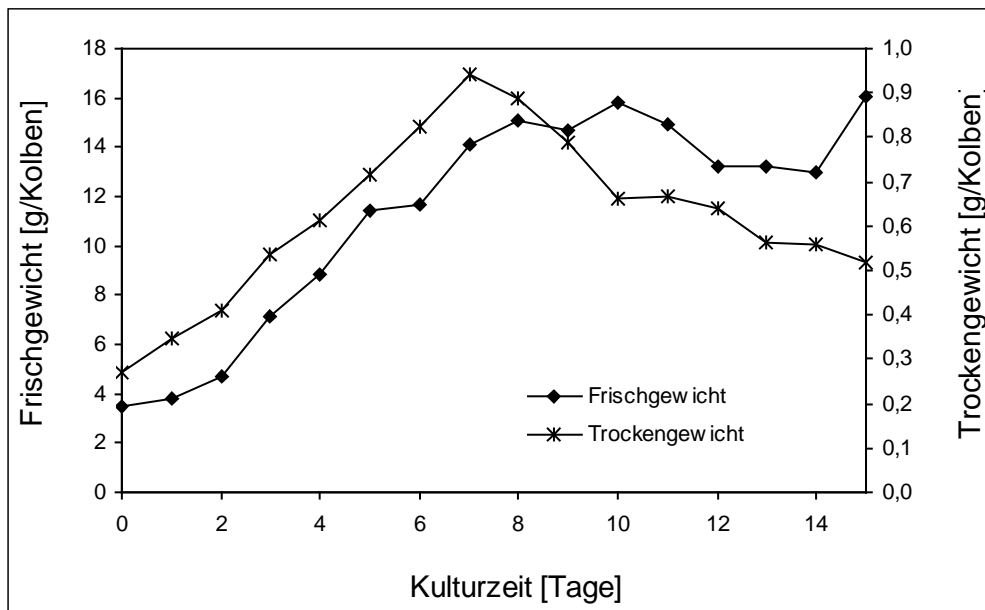


Abb. 45a: Frisch- und Trockengewicht der Suspensionskultur über 15 Tage beobachtet.



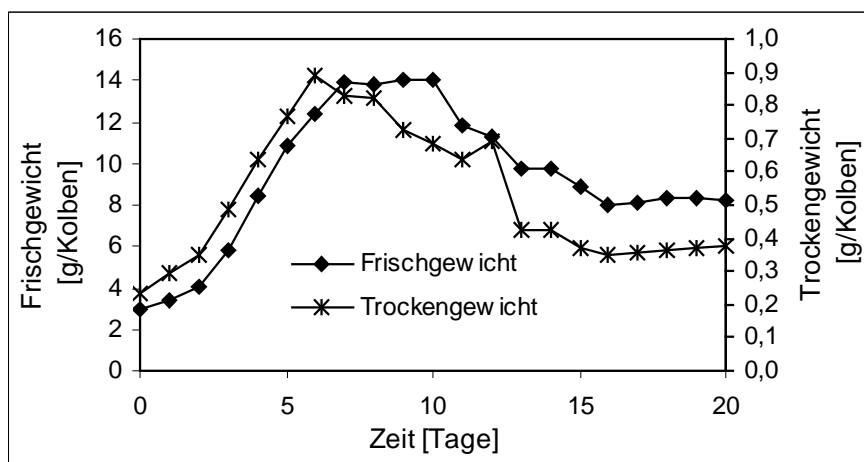


Abb. 45b: Frisch- und Trockengewicht der Suspensionskultur über einen Kulturverlauf von 20 Tagen.

### 3.3.2.2. Enzymaktivität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase über den Kulturverlauf

Beide Versuchsreihen zeigen einen ähnlichen Verlauf, auch wenn die Zellen der 2. Reihe eine deutlich höhere spezifische Aktivität aufweisen. Beide Reihen starten mit einer hohen spezifischen Enzymaktivität. Die erste Reihe hat den hohen Wert schon am Überimpftag, bei der zweiten Versuchsreihe ist er am ersten Kulturtag zu sehen. Danach fällt die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferaseaktivität wieder ab, da die Zellen wachsen und weniger Sekundärstoffe bilden. Ab dem 6. Tag der ersten Reihe und dem 5. Tag der zweiten Reihe steigt die Enzymaktivität wieder an. Ihren höchsten Wert erreicht sie mit  $4,5 \mu\text{kat/kg}$  am 7. Tag für die erste Reihe und am selben Tag mit  $15 \mu\text{kat/kg}$  in der zweiten Versuchsreihe. Normalerweise werden die Suspensionskulturen an diesem Tag in frisches Medium überführt oder geerntet. Die Werte dieses Tages sollten daher eine Ähnlichkeiten mit den Werten des Animpftages der Kultur haben. Nach dem 7. Tag sinkt die spezifische Enzymaktivität innerhalb von vier weiteren Tagen auf einen kaum noch nachweisbaren Wert von  $0,2 \mu\text{kat/kg}$  in Reihe eins und ist schon ab Tag 13 in der zweiten Reihe nicht mehr nachzuweisen. Die Ergebnisse sind mit der Proteinkonzentration der ersten Reihe zusammengefasst in Abbildung 46. Der Proteingehalt im Enzymextrakt zeigt eine abwärts gerichtete Kurve. Nach einer langen relativ konstanten Phase der Proteinkonzentration in den verschiedenen Extrakten von ca.  $2,5 \text{ mg/ml}$  sinkt der Proteingehalt nach dem 6. Kulturtag drastisch ab und pendelt sich ab dem 9. Tag auf einen Wert um  $0,8$  bis  $0,5 \text{ mg/ml}$  ein. Diese Kurve gibt annähernd die Werte der zweiten Versuchsreihe wieder, weswegen sie nicht gesondert dargestellt ist.

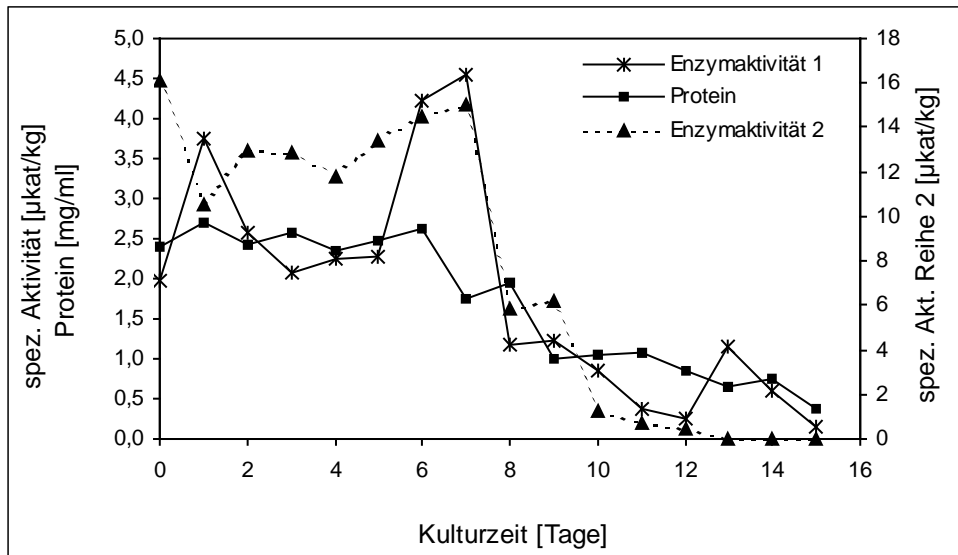


Abb. 46: Enzymaktivität und Proteingehalt des Rohextraktes über einen Kulturverlauf von 15 Tagen.

### 3.3.3. Lignangehalt

#### 3.3.3.1. Lignane in den Zellen

Zunächst wurden die Lignane in der ersten Versuchsreihe für 15 Tage untersucht. Da die Lignanextraktion der Suspensionskultur interessante Ergebnisse ergeben hat, wurde die zweite Versuchsreihe durchgeführt, für die auch das Medium untersucht und auf mehr unterschiedliche Lignane getestet wurde. Leider sind bei dieser zweiten Versuchsreihe nicht mehr so hohe Lignangehalte messbar. Da es sich bei den Suspensionskulturen um ein natürliches System handelt, unterliegen sie natürlichen Schwankungen, auch den Naturstoffgehalt betreffend. Trotzdem können Aussagen auch aus diesen Werten gezogen werden.

In der ersten Versuchsreihe konnten die Lignane Desoxypodophyllotoxin (DOP),  $\beta$ -Peltatin ( $\beta$ -PEL) und 6-Methoxypodophyllotoxin (6-MPTOX) nachgewiesen werden. Sie liegen schon vom ersten Kulturtag an in den Zellkulturen vor (siehe Abbildung 47). Podophyllotoxin (PTOX) und  $\beta$ -Peltatin-A Methylether (PAM) können hingegen nicht in den Zellen gefunden werden. DOP ist in Konzentrationen von 0,9 bis 0,16 % vom Trockengewicht in den Zellen vorhanden. Seinen mengenmäßigen Höhepunkt hat es am 7. Tag, an dem 1,2 mg pro Kolben gefunden werden konnten. Als Vorstufe zu  $\beta$ -Peltatin ist das Vorhandensein von Desoxypodophyllotoxin wichtig für die Lignanbiosynthese.  $\beta$ -Peltatin selbst wird nur in der zweiten Kulturhälfte in hohen Konzentrationen gefunden. Ab dem siebten Kulturtag akkumuliert es in den Zellen und erreicht Werte von 0,34 % vom Trockengewicht. Am 14. Tag finden sich 2 mg  $\beta$ -Peltatin pro Kolben. Der Gehalt an 6-MPTOX und seinem Glukosid in den Zellen ist mit maximal 0,17 % bezogen auf das Trockengewicht nicht so hoch, wie man es für ein Stoffwechselendprodukt erwarten würde. Es kann verstärkt nach dem 6. Kulturtag nachgewiesen werden. Der 7. Kulturtag bildet mit einer Ausbeute von 1,5 mg 6-MPTOX pro Kolben den Höhepunkt dieser Kurve. Nach dieser Zeit sinkt der Gehalt an dem

Lignan in der Kultur langsam wieder ab, was an einem Zugrundegehen der Zellen liegen kann. In der zweiten Versuchsreihe wurde zu diesem Zeitpunkt versucht, Lignane auch im Medium nachzuweisen.

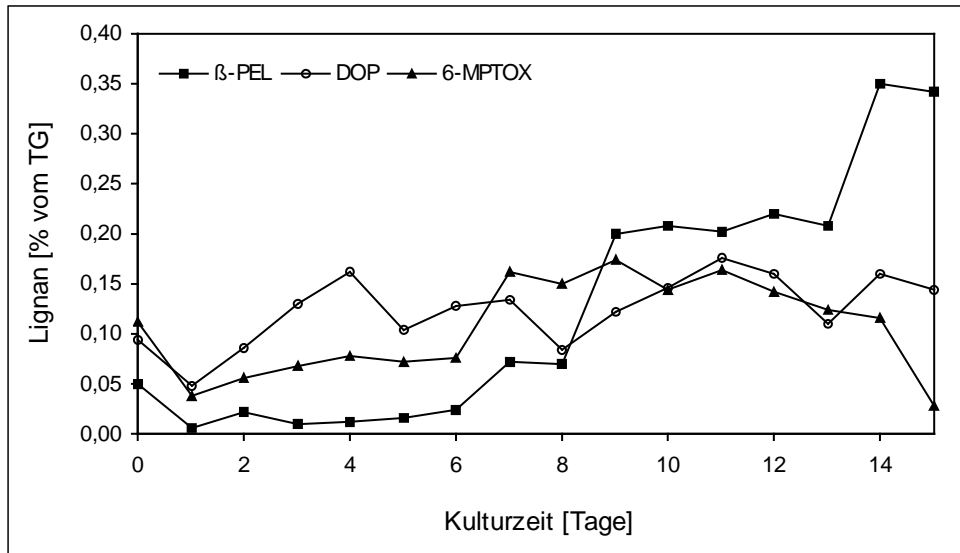


Abb. 47a: Auswertung der ersten Messreihe über einen Zeitraum von 15 Tagen. Lignane, die in den Zellen zu finden waren, berechnet als % vom Trockengewicht der Zellen.

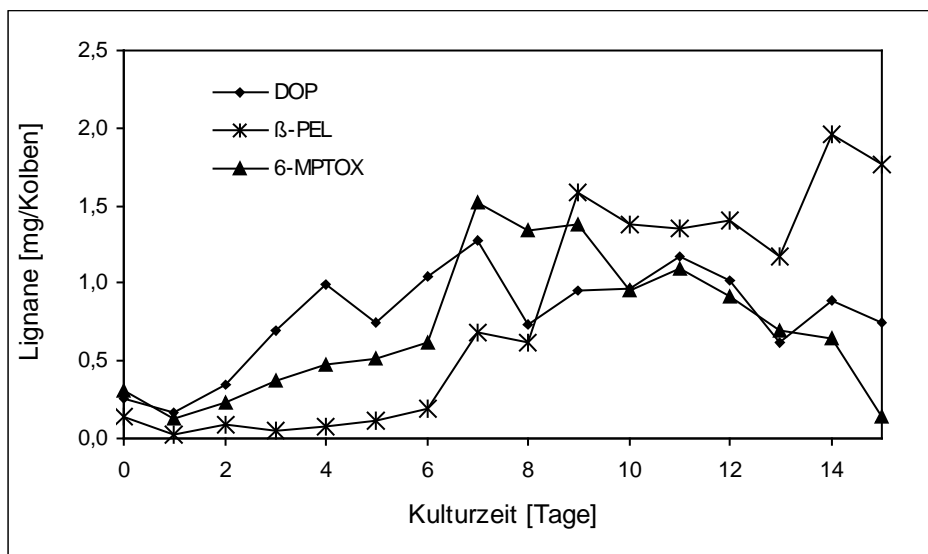


Abb. 47b: Lignane in den Zellen über einen Kulturzeitraum von 15 Tagen, berechnet als mg pro Kolben.

Die zweite Messreihe bestätigt im Grunde die Ergebnisse der ersten, auch wenn die Lignane nicht in so hohen Mengen vorliegen. Hier wurde allerdings auch ein Lignan nachgewiesen, das im Stoffwechselweg noch vor DOP steht. Bei Pinoresinol (Pino) als einer Vorstufe des Stoffwechselweges ist, wie man erwarten kann, die höchste Lignanmenge schon früher als bei den späten Stoffwechselprodukten, nämlich nach acht Tagen, erreicht. In den Abbildungen 48a und 48b sieht man außerdem, dass der Gehalt an Pinoresinol in den Zellen wesentlich höher liegt als bei den anderen Lignanen. Nach dem Höhepunkt am achten Kulturtag mit

einem Gehalt von 2 % vom Trockengewicht oder 17 mg Lignan pro Kolben sinkt der Gehalt an Pinoresinol zunehmend, da es von den Zellen weiter verarbeitet wird. Es sollte sich im Medium auch kein oder nur wenig Pinoresinol finden lassen, da es zur Synthese der „späteren Lignane“ benutzt wird. Desoxypodophyllotoxin als eines von ihnen erreicht den höchsten Gehalt von 0,02 % vom Trockengewicht nach einer stetig steigenden Kurve nach 14 Tagen und fällt dann rapide ab. Es sind maximal 0,1 mg DOP pro Kolben am 11. und 14. Tag zu finden. Hier muss getestet werden, ob die Vorstufe für  $\beta$ -Peltatin und Podophyllotoxin weiterreagiert und daher nicht mehr gefunden werden kann, oder durch das Absterben der Zellen im Medium zu finden ist.

Nach einem anfangs niedrigen Gehalt von 0,02 %  $\beta$ -Peltatin vom Trockengewicht steigt er ab dem fünften Kulturtag auf Werte bis maximal 0,13 % vom Trockengewicht am 9. Kulturtag. Das entspricht einer Masse von 0,9 mg pro Kolben. Danach kann immer weniger  $\beta$ -Peltatin in den Zellen gefunden werden. Ob das an der Lyse oder an einer Weiterverarbeitung der Vorstufe  $\beta$ -Peltatin liegt, muss eine Überprüfung der Lignane im Medium zeigen. Das Stoffwechselendprodukt 6-Methoxypodophyllotoxin entsteht nur in geringen Mengen und hat den höchsten Gehalt von 0,008 % vom Trockengewicht oder 0,1 mg pro Kolben nach 7 Tagen erreicht. Es hält diesen Wert mit einem kleinen Einknicken der Kurve bis zum 11. Kulturtag. Danach nimmt sein Gehalt immer weiter ab. Da *Linum*-Zellen häufig entweder 6-MPTOX oder PTOX (als Glykoside) akkumulieren, ist es nicht verwunderlich, dass die andere mögliche Endstufe der Lignanbiosynthese, das Podophyllotoxin, nicht in den Zellen oder dem Medium gefunden werden kann. Außerdem werden nicht oder nur in Spuren in den Zellen die folgenden Lignane gefunden: Matairesinol, 7-Hydroxymatairesinol und  $\beta$ -Peltatin-A Methylether.

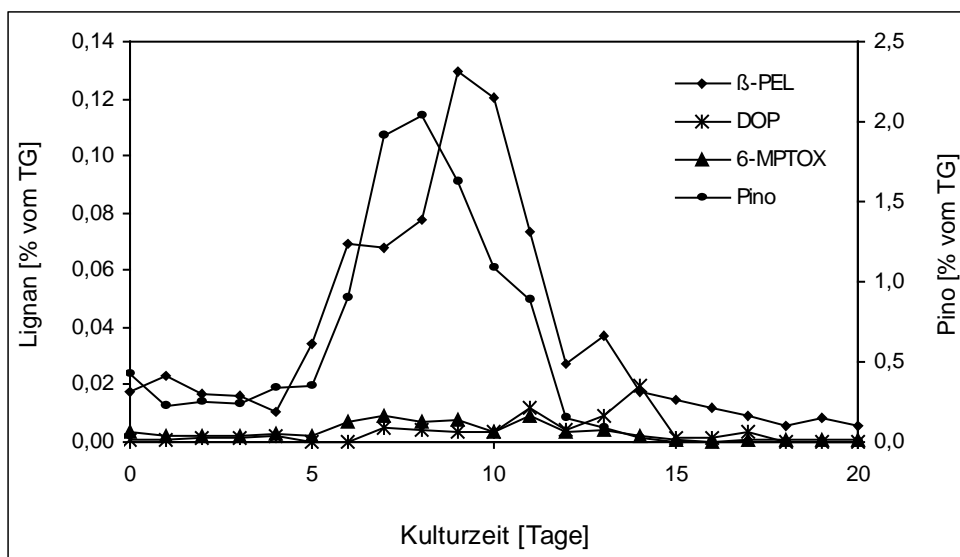


Abb. 48a: Lignane in den Suspensionszellen über einen Verlauf von 20 Kulturtagen.

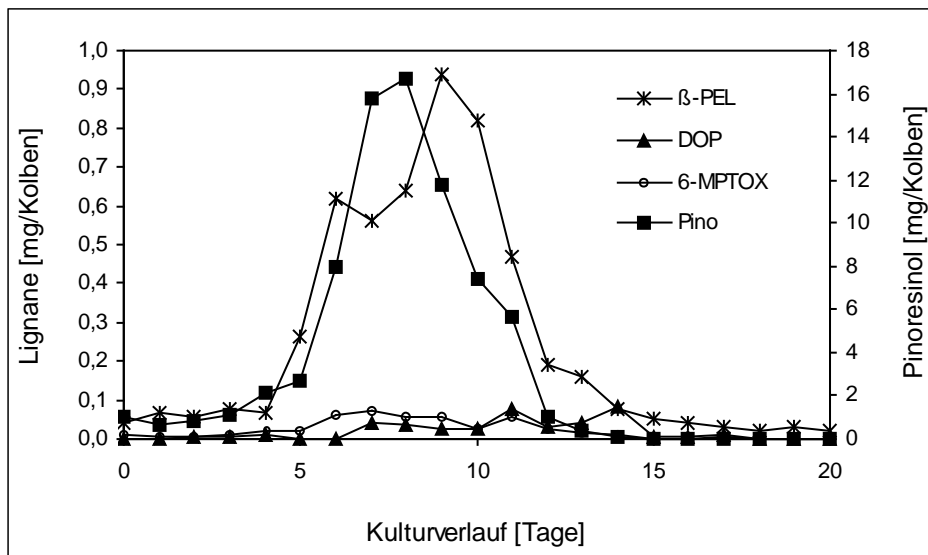


Abb. 48b: Lignane in den Zellen, berechnet auf mg Lignan pro Kulturkolben.

### 3.3.3.2. Lignane im Medium

Die beiden Lignane, die in den größten Mengen im Medium zu finden sind, sind Pinoresinol und  $\beta$ -Peltatin (siehe Abbildung 49). Bei Pinoresinol sieht man den Anstieg nach 12 Tagen, der deutlich mit dem Abfall des Pinoresinolgehaltes der Zellen korreliert. Der höchste Wert von 10 mg pro Kolben kann am 17. Kulturtag gemessen werden. An diesem Tag ist keine Stoffwechselaktivität der Zellen mehr vorhanden, die Zellen lysieren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Pinoresinol in den Zellen nicht so schnell umgesetzt wird, sondern bei der Zellyse mit in das Medium gelangt.  $\beta$ -Peltatin ist erst nach 16 Tagen in Mengen von ca. 1 mg pro Kolben im Medium zu finden und kommt daher wohl auch aus zugrunde gegangenen Zellen.

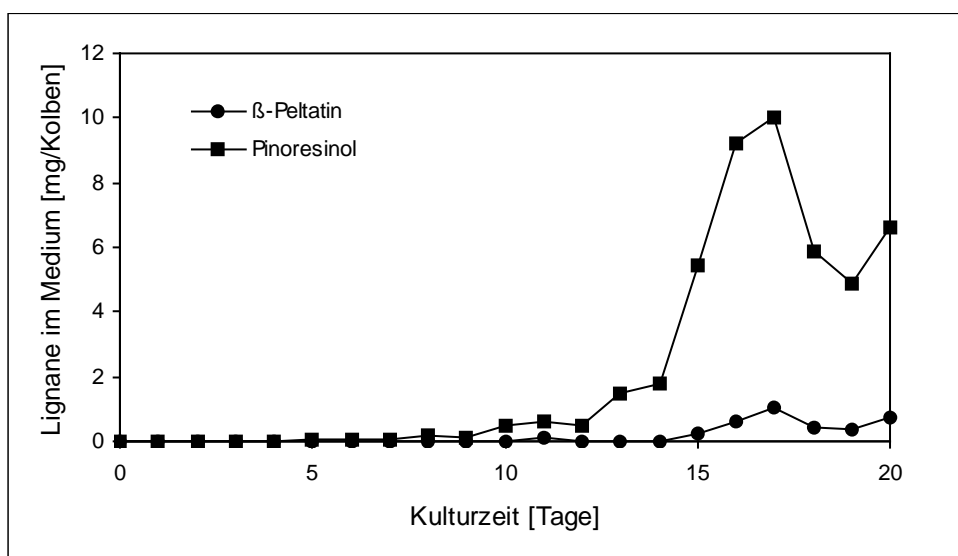


Abb. 49: Lignane im Medium: Pinoresinol und  $\beta$ -Peltatin als die Lignane mit dem höchsten Gehalt.

Desoxypodophyllotoxin kann man nur wenig im Medium finden, wie die Abbildung 50 zeigt. Nach einer Spitze nach 11 Tagen, die aber vielleicht auch auf einen Messfehler zurückzuführen ist, sind erst nach 17 Tagen Mengen von 0,16 mg pro Kulturkolben zu finden. Das korreliert nicht mit den Ergebnissen der Zelluntersuchung, bei der DOP schon nach 15 Tagen kaum noch nachweisbar war. Es stellt sich also die Frage, ob DOP schnell zu  $\beta$ -Peltatin umgebaut wurde. Eine hohe Aktivität der DOP 6-Hydroxylase würde auch in geringen Konzentrationen der Vorstufe in den Zellen und dem Medium resultieren, da sich das Lignan nicht ansammeln kann. Matairesinol kann nur im Medium nachgewiesen werden, nicht in den Zellen. Der Gehalt steigt sehr langsam bis zum 15. Tag, danach ist kein Matairesinol mehr zu finden. Es stellt sich die Frage, ob die Zellen Matairesinol an das Medium abgeben anstatt es in die anderen Lignane umzusetzen. Es ist denkbar, dass Matairesinol so schnell umgesetzt wird, dass es in den Zellen nicht zu finden ist.

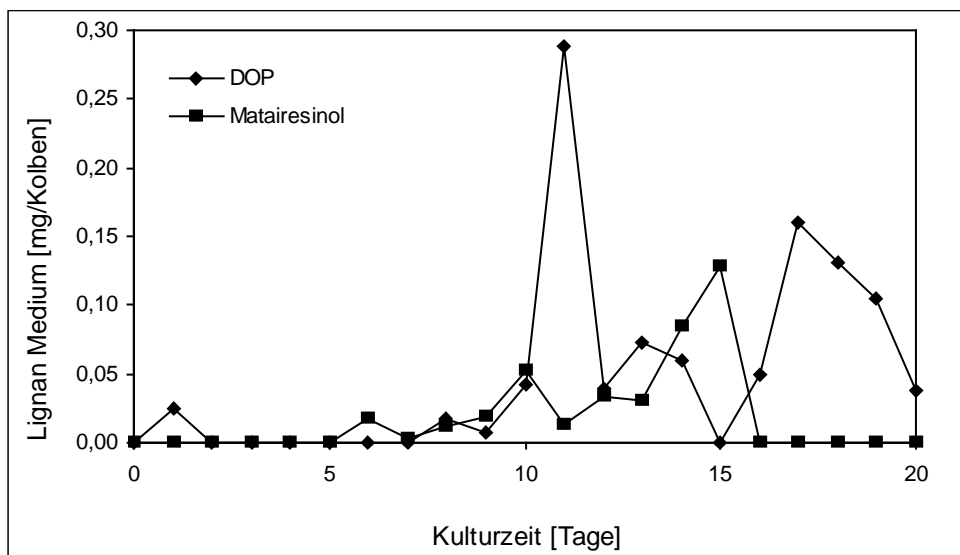


Abb. 50: Lignane, die im Medium über die Kulturzeit keinen so hohen Gehalt erreichen.

Nicht im Medium gefunden werden konnten 7-Hydroxymatairesinol,  $\beta$ -Peltatin-A Methylether und 6-Methoxypodophyllotoxin. Da auch wenig 6-MPTOX in den Zellen gefunden werden konnte, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Bisher sind keine Abbauprodukt von 6-MPTOX oder 6-MPTOX abbauende Enzyme bekannt.

### 3.4. Fütterungsversuch mit markierter [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure

#### 3.4.1. Identität und Reinheit der [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure

[2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure (Abbildung 51) wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.4.1. synthetisiert und anschließend zwei Tests auf Reinheit unterzogen. Ein Schmelzpunkt von 242 °C konnte in der in 2.4.2. beschriebenen Schmelzpunktbestimmungsapparatur ermittelt werden. Für unmarkierte MDCA ist ein Schmelzpunkt von 247 °C bekannt (Pearl und Beyer, 1951). Bei der mit <sup>13</sup>C-markierten Substanz verschiebt sich dieser um 5–8 °C auf 239–242 °C (Seidel et al., 2002). Demzufolge fällt dieser erste Test auf Identität positiv aus.

Außerdem wurden für die Reinheits- und Identitätsprüfung ein <sup>1</sup>H-NMR- und ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum aufgenommen. Sie werden in den Abbildungen 52 und 53 gezeigt. Zusammen mit dieser Messung wurde eine COSY-Korrelation der C-Atome auf zwei Achsen durchgeführt, die eindeutig die Identität beweist. Bei dieser Methode werden die Spektren miteinander verglichen und Kluster von H-Atomen als Punkte dargestellt. Das sich daraus ergebende Muster muss für eine erfolgreiche Auswertung symmetrisch sein, wie man es in Abbildung 54 sehen kann. Nach diesem Muster können die H-Atome einzelnen C-Atomen zugeordnet werden. Alle hier gezeigten Abbildungen wurden zur Auswertung mit einem institutsinternen Standard verglichen. Die Spektren sahen hier gleich aus, so dass es sich bei der synthetisierten Substanz zweifelsfrei um [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure handelt. Die so identifizierte Substanz konnte nun für Einbauversuche an Zellkulturen von *Linum nodiflorum* gefüttert werden.

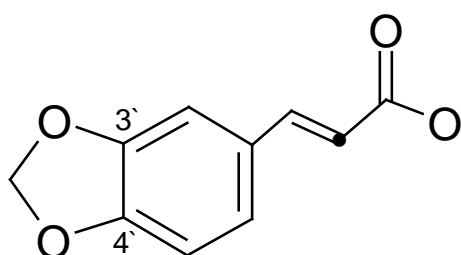


Abb. 51: [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure

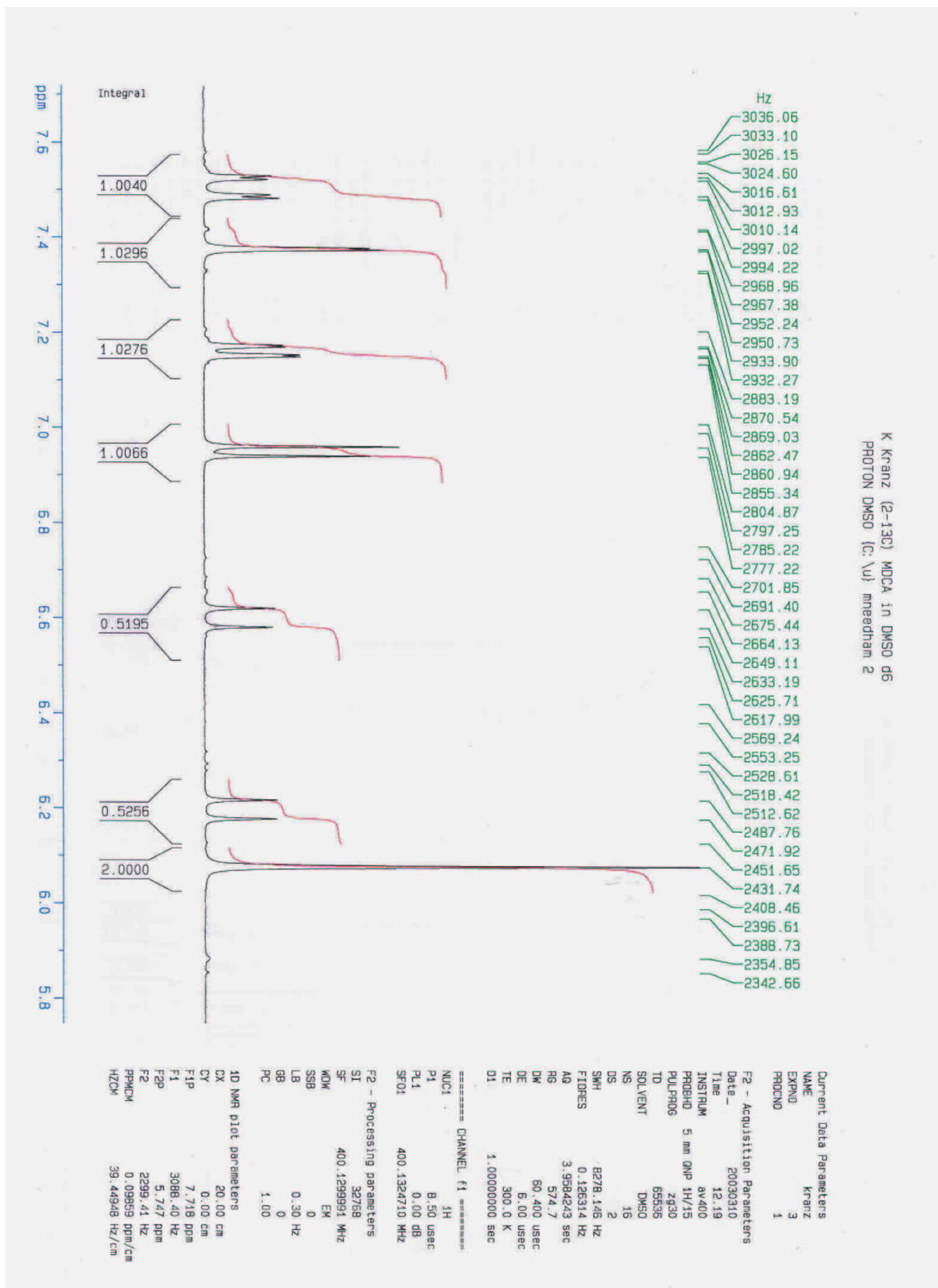
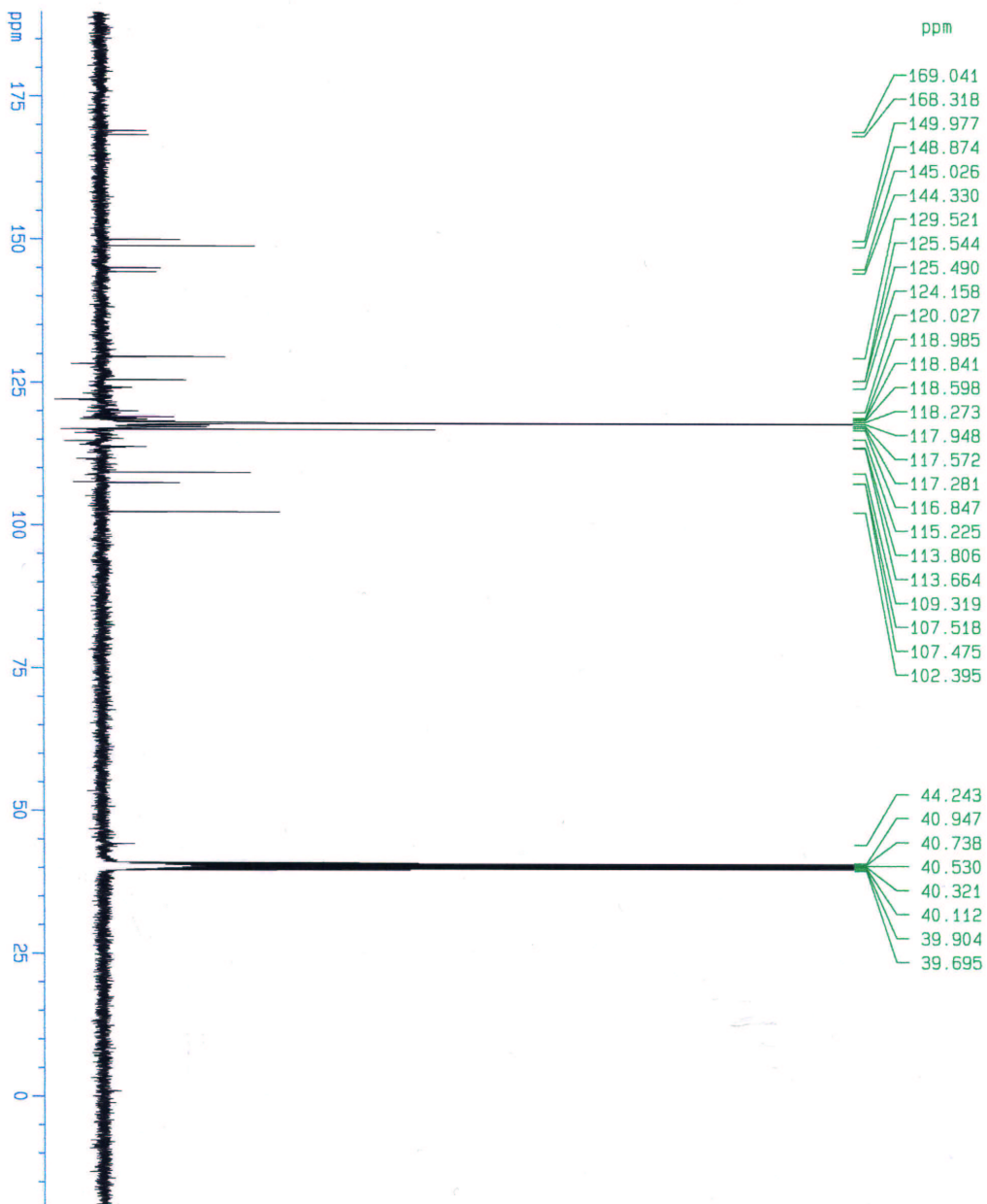


Abb. 52:  $^1\text{H-NMR}$  von  $[2\text{-}^{13}\text{C}]3',4'\text{-Methylenedioxyzimtsäure}$



K Kranz 2-13C MOCA in DMSO d6



```

Current Data Parameters
NAME          Kranz
EXPNO         5
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20030310
Time          14.47
INSTRUM      5 mm QNP 1H/13
PROBHD       zgpg30
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      CDCl3
SOLVENT      512
NS           4
DS           4
SWH          23980.614 Hz
FIDRES      0.386943 Hz
AQ          1.3864795 sec
RG          11585.2
DE          20.850 usec
TE          300.0 K
D1          2.00000000 sec
d11         0.03000000 sec
d12         0.00020000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1         13C
P1           6.00 usec
PL1          0.00 dB
SFO1        100.6273898 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPOPRG2     waltz15
NUC2         1H
PCPD2       90.00 usec
PL2          0.00 dB
PL12        12.00 dB
PL13        23.00 dB
SFO2        400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI          32768
SF          100.6127250 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.40

1D NMR plot parameters
CX          20.00 cm
CY          0.00 cm
F1P        189.741 ppm
F1         13090.32 Hz
F2P        -19.130 ppm
F2         -1924.67 Hz
PFGM       10.44350 ppm/cm
HZGM       1030.74859 Hz/cm
  
```

Abb. 53:  $^{13}\text{C}$ -NMR von  $[2\text{-}^{13}\text{C}]3',4'$ -Methylenedioxyzimtsäure



### 3.4.2. Ergebnis der Fütterung von [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure an Zellen von *Linum nodiflorum*

Um den Einbau der [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure (MDCA) in *Linum nodiflorum* Zellen zu messen, wurden 2,5 mg der Substanz pro Kolben gefüttert. Dies geschah auf zwei unterschiedliche Weisen. Zum einen wurde MDCA mit Cyclodextrin (567,5 mg / 1 Medium) komplexiert, zum anderen wurde ein lösliches Natriumsalz der Verbindung durch Zugabe von verdünnter Natronlauge gebildet. Zu beiden Ansätzen kamen 25 ml Medium und 2,5 g Zellen aus der Suspensionskultur. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und die Lignane extrahiert, wie es in Kapitel 2.4.3. beschrieben wurde. Mit der LC-MS-Methode können mit Hilfe von Standardsubstanzen verschiedene Lignane aus diesem Extrakt aufgetrennt, identifiziert und auf den Einbau von <sup>13</sup>C-MDCA überprüft werden. Da zu jeder Retentionszeit auch gleich ein Massenspektrum vorliegt, kann man den Einbau eines schweren Isotops in das jeweilige Lignan feststellen. Für diese Auswertung wurde ein LC-Lauf durchgeführt. Anhand von Standardsubstanzen konnten die Retentionszeiten bestimmt werden. Zu den jeweiligen Retentionszeiten wurde ein Massenspektrum ausgedruckt, das die unterschiedlichen Molekulargewichte der Substanzen zeigt, die zu dieser Zeit die Säule verlassen. Dazu wurden die Substanzen nach der Säulenchromatographie direkt verdampft und in ein elektrisches Feld gesprüht. Die positiven Ionen im dabei entstehenden Sprühnebel werden auf eine Kathode hin beschleunigt und vom Detektor erfasst. Diese Methode heißt ESI, was für electrospray ionisation steht. Diese Methode kann auch für negative Ionen benutzt werden. Für die resultierende Masse der Substanz bedeutet das, dass im +C-ESI ein Proton mehr gemessen wird, im -C-ESI eines zu wenig. Neben dem +C-ESI-Chromatogramm ist außerdem das Fragmentierungsmuster der Substanz gezeigt. Neben dem jeweiligen Massenspektrum für einen kleinen Zeitraum der Elution kann das Fragmentierungsmuster für einen eng vorgegebenen Molekulargewichtsbereich angezeigt werden. Der Ionenstrom kann die Moleküle zerstören, so dass sie in kleinere Bruchstücke fragmentieren. Das hierbei entstehende Muster kann zum Identitätsvergleich herangezogen werden. Der Standard muss hierbei die gleiche Verteilung aufweisen wie die zu untersuchende Substanz.

In Abbildung 55 sind alle diese Ergebnisse zu sehen für den Standard von 6-Methoxypodophyllotoxin. Anhand der Retentionszeit kann es auch in der in Abbildung 56 gezeigten mit MDCA gefütterten Probe wiedergefunden und zugeordnet werden. Der Peak in dem LC-Chromatogramm ist hierbei sehr klein. Die Auftragung in diesem Chromatogramm berechnet alle auftretenden Peaks auf den größten Peak des Chromatogramms, der mit einem Ausschlag von 100 Absorptionseinheiten auf der Y-Achse aufgetragen wird. Ungeachtet seiner geringen Größe ist dieser Peak aber gut auswertbar und liefert sichere Ergebnisse. Das ist umso wichtiger, als dass 6-MPTOX das einzige aller getesteten Lignane ist, das in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Der Einbau der Vorstufe [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure kann also nur an diesem Lignan überprüft werden.

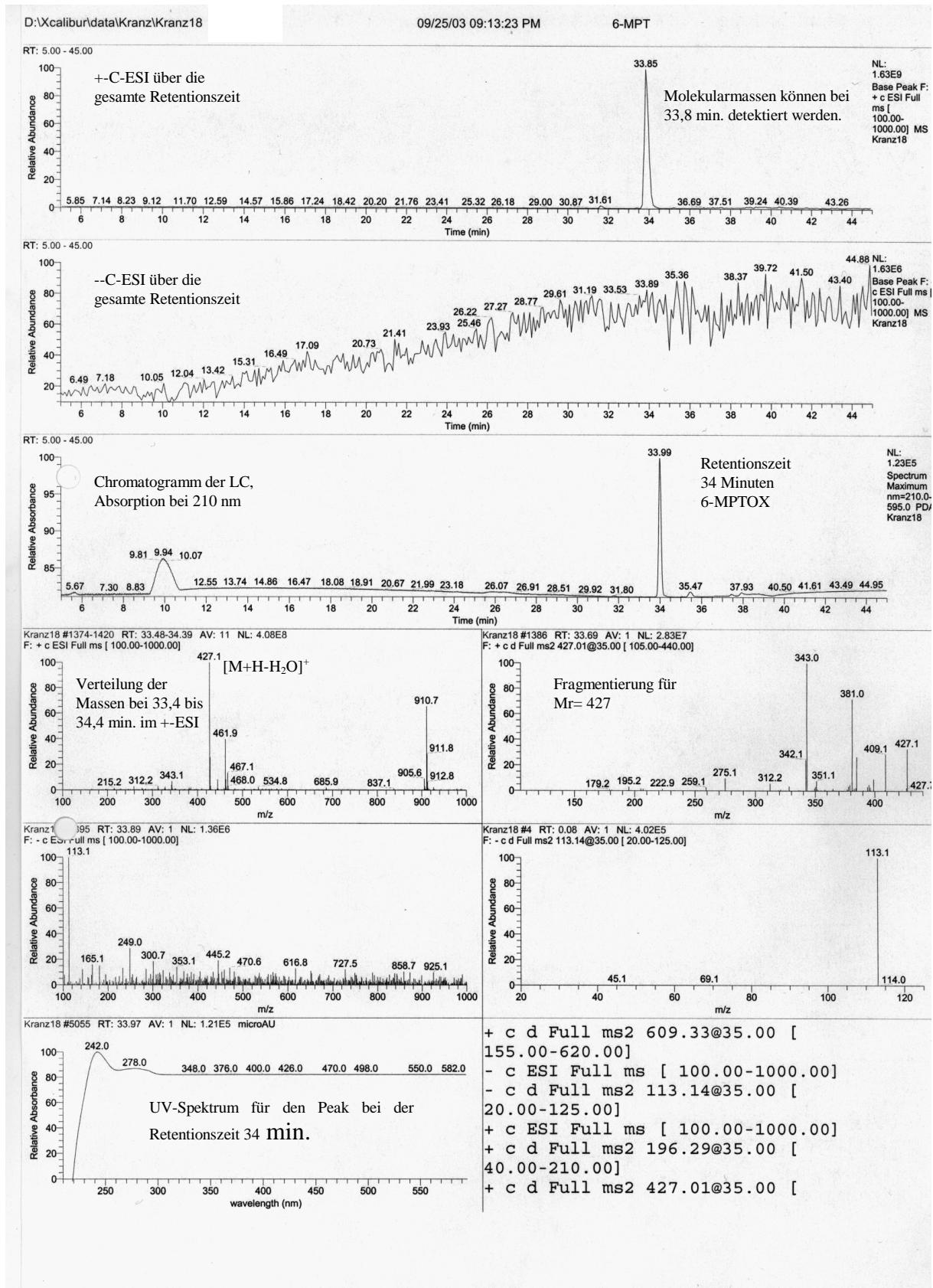


Abb. 55: Absorption, Massenverteilung, +C-ESI und -C-ESI über die gesamte Messzeit von 45 Minuten. Molekulare Massen für den Zeitraum von 33,46 bis 34,39 Minuten mit dem dazugehörigen Fragmentierungsmuster.

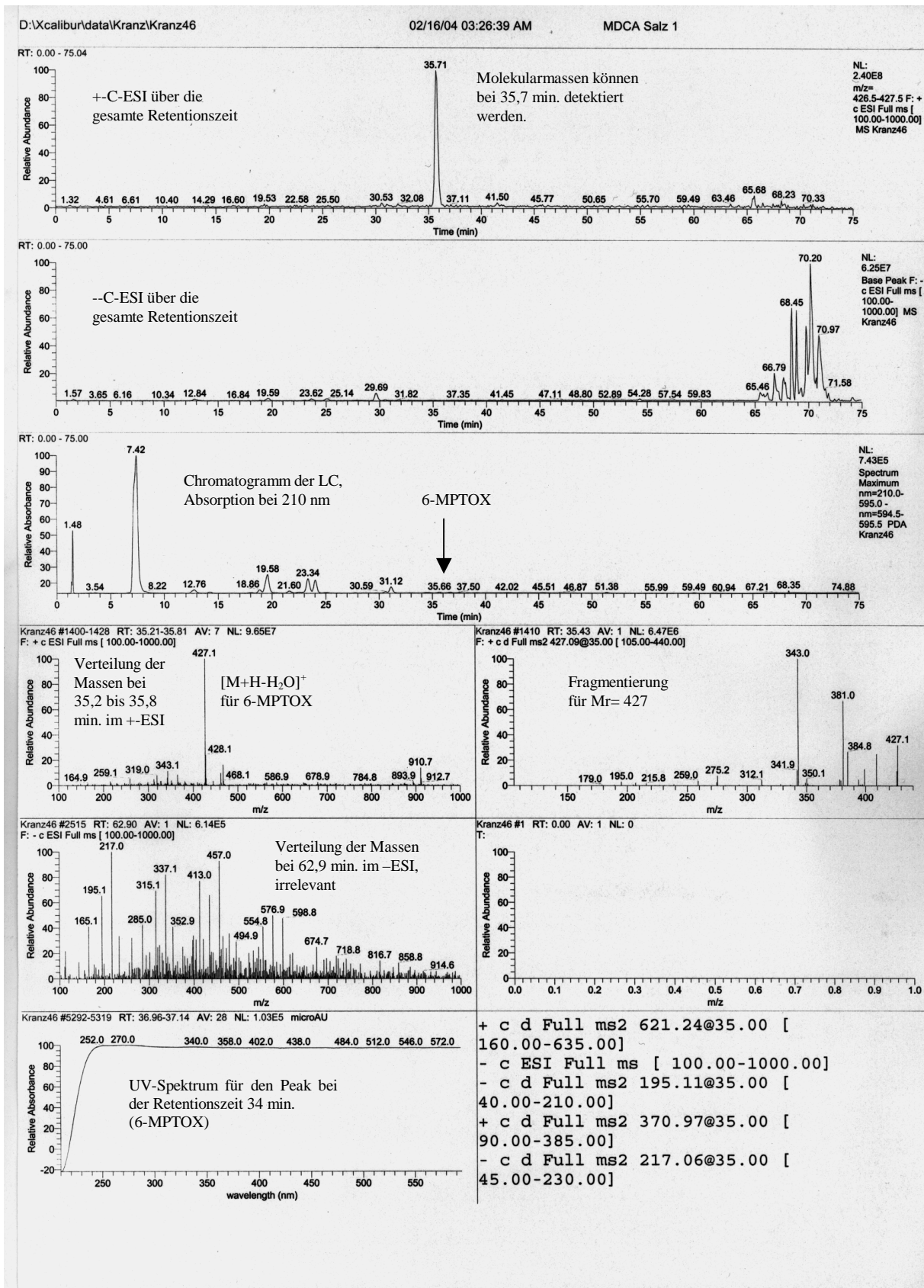


Abb. 56: Probe 1: MDCA gefüttert als Natriumsalz, Massenausdruck für die Substanz mit einer Retentionszeit von 35,2 bis 35,5 Minuten, die anhand der Masse und der Fragmentierung als 6-MPTOX identifiziert wurde.

Von all den überprüften Lignanene konnten nur die folgenden in den Zellen von *Linum nodiflorum* gefunden werden: Spuren von Lariciresinol,  $\beta$ -Peltatin am Detektionslimit des Gerätes und 6-Methoxy podophyllotoxin. Da von den beiden erstgenannten Lignanene zu geringe Mengen für ein sicheres Ergebnis zu finden waren, konnte nur eine Auswertung von 6-Methoxy podophyllotoxin erfolgen.

Abbildung 57 zeigt die Aufteilung des gefundenen 6-MPTOX auf die verschiedenen Molekulargewichte. Dabei ist zu sehen, dass sowohl in den Kontrollen als auch in den gefütterten Zellproben die Substanz mit einem Molekulargewicht (M) von 427 als auch die Substanzen mit einer zusätzlichen Masseneinheit (M+1) und mit zwei Masseneinheiten (M+2) zu finden sind. Unabhängig davon, ob eine schwere Vorstufe gefüttert wurde oder nicht, sind die Verhältnisse mit 100 zu 22 zu 4,5 von M, M+1 und M+2 relativ gleich. Ein Einbau der markierten MDCA in die späteren Lignane würde zu einer Verschiebung dieser Verhältnisse führen. Es sollte neben der Substanz mit M, deutlich mehr M+1 und wenig M+2 gefunden werden. Die hier gefundenen Daten sprechen gegen einen Einbau des  $^{13}\text{C}$ -MDCA.

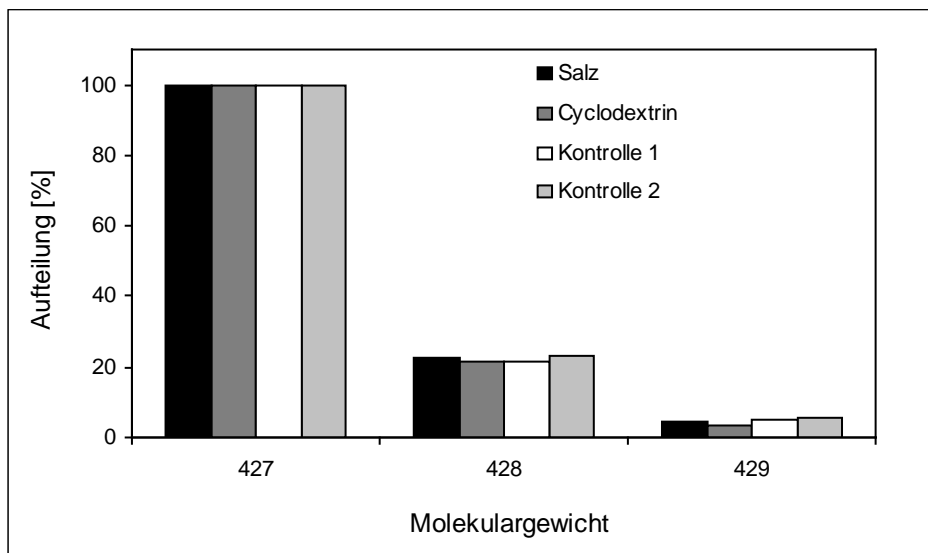


Abb. 57: Aufteilung der verschiedenen Molekulargewichte von 6-MPTOX in den über MDCA-Cyclodextrin und den mit MDCA-Natriumsalz gefütterten Zellen, Kontrolle 1 enthält Cyclodextrin ohne MDCA, Kontrolle 2 enthält stark verdünnte Natronlauge ohne MDCA.

Die Frage, ob die markierte MDCA überhaupt in die Zellen aufgenommen werden kann, lässt sich mit der Suche nach dieser Substanz in den Chromatogrammen beantworten. Es kann die schwere MDCA in den gefütterten Zellen gefunden werden. Es liegt also nicht an der Aufnahme der Methylendioxyzimtsäure in die Zellen, dass hier kein Einbau stattgefunden hat. Die Frage, ob die MDCA auch komplett und nicht nur in Spuren von den Zellen aufgenommen wurde, lässt sich mit Hilfe einer Lignanextraktion des Mediums, wie in Kapitel 2.3.3. beschrieben, klären. Dabei konnten im Medium keine Reste von MDCA mehr nachgewiesen werden. Es wurde also tatsächlich entweder alle MDCA in die Zellen aufgenommen, dort aber nicht in die späteren Lignane eingebaut, oder die MDCA wurde im Medium abgebaut.



## 3.5. Versuche zur cDNA-Klonierung von Methyltransferasen

### 3.5.1. Entwurf von Primern für eine Methyltransferase

Der Vergleich der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz vieler Methyltransferasen ergab, dass sich verschiedene konservierte Regionen bei fast allen Vertretern finden lassen. Aus dem ersten dieser Motive, das von Ibrahim et al. (1998) als SAM-Bindestelle beschrieben wurde, konnte ein Primer (OMT1) abgeleitet werden. Ein ähnlicher Primer wurde bereits von Dumas et al. (1992) beschrieben. Der zweite methyltransferasenspezifische Primer (OMT2) wurde aus einer Arbeit von Frick et al. (1999) entnommen, in der diese Stelle als weiteres konserviertes Motiv beschrieben wurde. Auch in dieser Arbeit wird auf die Arbeit von Dumas et al. verwiesen.

### 3.5.2. Polymerase Kettenreaktion mit Primern gegen die konservierten Regionen

Nach der PCR mit den zwei degenerierten Primern OMT1 und OMT2, die in Kapitel 2.6.3. aufgeführt sind, konnten auf dem Agarosegel (1% Agarose in TE-Puffer) unterschiedlich große DNA-Banden gesehen werden. Die PCR-Ansätze wurden aufgetrennt und einzelne Sequenzfragmente von 200 bis 500 Basen Länge in Bakterien kloniert. Das unter Abbildung 58 gezeigte Foto eines Agarosegels zeigt Banden, die diesen Größen entsprechen.

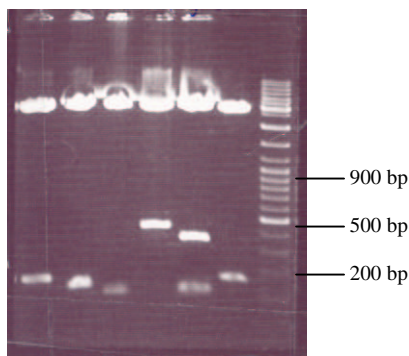


Abb. 58: Agarosegel mit 1% Agarose in TE-Puffer, gefärbt mit Ethidiumbromid, unterschiedliche PCR-Fragmente in dem pGEMT-Vektor in *E. coli* DH5 $\alpha$ , ausgeschnitten mit *BcuI* und *Cfr 42I*, bp: Basenpaare.

Nach dem Vermehren dieser DNA-Stücke in *E. coli* Bakterien der Linie DH5 $\alpha$  konnten zwei Fragmente mit Längen von 447 und 301 Basen sequenziert werden, die nach dem Datenbankvergleich Ähnlichkeit mit pflanzlichen Methyltransferasen haben. Sie werden als MT1 und MT2 bezeichnet. Anfangs- und Endprimer sind unterstrichen und kursiv dargestellt. Das erste Fragment enthält 447 Basen mit folgender Abfolge:

MT1:

5`TGTGGATGTGGGGGGGGGACGGGGGCTGTA<sup>\*</sup>CTCAGCATGATCCTGTCTCGAAGCATCCTTCGATTAAGGGGATT  
AATTTTCGATCTCCCTCATGTTATCGCCGATGCCCCGCCTCTCCCTGGCGTCAAGCACGTTGGCGGCACATGTTTC  
GCCTCCGTCCCTTCCGGCGACGCCATTTTCATGAAGGTAGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCCATTGCTAAGTTACAT  
CAGAAAGGTCTAGA<sup>\*</sup>ACTATTATGATTGAACCCAACTTTAAAGTTGAGACTTTTCTTCCACCATCGCACTTTGCAC  
ACCTCAGCTGGTCAGTGGTCGTTATCTTACCTACCACACTCGACCCTTTTTAGTGTTCATTAGCAAATTATGTA  
TATGGAGATTGGAAGTTAATGGGTTTGTGGGTTTGGCGCAGTGGATATGTCACGACTGGCGCGACGACCATTG  
3`

Das zweite Fragment besteht aus 301 Nucleotiden und hat folgende Sequenz:

MT2:

5`TGTGGATGTGGGGGGGGGACGGGGGCACTAATGGCAGCCGTGGCTGAAGCGTTTCCTGATATGA  
AGTGCGCGGTTTTGGATCTCCCGCAAGTCGTCCAAGGGGGGGCTCATCGTAGTGGTGTGAGTTCA  
TTGCAGGGGATATGTTTCAAAGATTCCCTCAGCAGACGCCATCTTACTCAAGGTTAATTAATTTC  
ACTCTCCTTAATTATAATTCTAATTCTAATTTTTCCCTAATTAATTAATTAATTAATTCAATTACATACATT  
CAGTGGATCATCATGACTGGCCCGACGACCACTG 3`

Zur Überprüfung der Ähnlichkeit der beiden Fragmente werden sie mit Hilfe der Software ClustalW übereinandergelegt. Gleiche Nukleotide werden mit einem „\*“ gekennzeichnet. Dabei fällt auf, dass Anfangs- und Endsequenz gut übereinander passen. Da dieselben Primer benutzt wurden, ist eine hohe Ähnlichkeit in diesem Bereich nachvollziehbar. Die Primer sind aber degeneriert und es wäre zu erwarten gewesen, dass eine größere Varianz der Primer in den cDNA-Stücken zu finden ist. In dem unten gezeigten Vergleich sind die Primer grau unterlegt. Hier sieht man, dass der Primer am 5`-Ende bei beiden Fragmenten gleich ist. Die 3`-Primer unterscheiden sich in drei Nucleotiden voneinander. Trotz großer Ähnlichkeit beider Fragmente, unterscheiden sich die Sequenzen durchaus voneinander, nicht nur aufgrund ihrer Länge. Die Sequenz von MT1 ist um 146 Basen länger als MT2. In der Darstellung wird das durch das Symbol „-“, deutlich.



```

MT1      TGTGGATGTGGGGGGGGGACGGGGGCTGTACTCAGCATGATCCTGTC-GAAGCAT--CC
MT2      TGTGGATGTGGGGGGGGGACGGGGGCACTAATG-GCAGC--CGTGGCTGAAGCGTTTCC
          ***** ** * *** * ** * ** * ** *
          *

MT1      TTCGATTAAGGGGATTAATTTTCGATCTCCCTCATGTTATCGCCGATGCCCCGCCTCTCCC
MT2      TGATATGAAGTGC GCGGTTTTGGATCTCCCGCAAGTCGTCCAAGGGGGGGCTCATCGTAG
          * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

MT1      TGGCGTCAAGCACGTTGGCGGCGACATGTTGCGCTCCGTCCCTTCCGGCGACGCCATTTT
MT2      TGGTGTGAGTTCATTGCAGGGGATATGTTTCAAAGATTCCCTCAGCAGACGCCATCTT
          *** ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

MT1      CATGAAGGTAGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCCATTGCTAAGTTACATCAGAAAGGTCTAGA
MT2      ACTCAAGGT--TAATTAATTTTC-CACTCTCC-TT-----A--A-----
          * ** ** * * ** * ** * ** * ** * ** *

MT1      ACTATTATGATTGAACCCAACCTTTAAAGTTGAGACTTTTCTTCCACCATCGCACTTTGCA
MT2      ---TTATAATT---CT-AATCTAA-----TT-TTTCC-----
          *** ** * ** * ** * ** * ** *

MT1      CACCTCAGCTGGTCAGTGGTCGTTATCTTACCTACCACACTCGACCCTTTTTAGTGTTC
MT2      -----CTA-----
          * *

MT1      ATTAGCAAATTATGTATATGGAGATTGGAAGTTAATGGGTTTGTGGGTTTGGCGCAGTG
MT2      ATTAATTAATTA-----A--TTC-AATTACATACATT-----CAGTG
          **** ** * ** * ** * ** * ** *

MT1      GATATGTCACGACTGGCGCGACGACCATTG
MT2      GATCATCCATGACTGGCCCGACGACCCTG
          *** ** ***** ***** **

```

Mit beiden Sequenzstücken wurde eine EMBL-Datenbanksuche mit dem Programm FASTA nach ähnlichen cDNAs durchgeführt. Für die erste Sequenz ergeben sich folgende Sequenzidentitäten auf Basis der Nukleotidsequenzen zu anderen cDNAs:

75,4 % Identität mit der Kaffeesäure 3-O-Methyltransferase aus *Eucalyptus gunnii* (Myrtaceae) (Poeydomenge et al. 1994), bei einem Überlappen von 183 Nukleotiden,

73,8 % Identität mit der Kaffeesäure O-Methyltransferase aus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) (Schröder et al. 2002), mit 183 überlappenden Nukleotiden,

73,3 % Identität mit der Catechol O-Methyltransferase aus *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (Jaeck et al. 1996), mit 184 gemeinsamen Nukleotiden,

72,7 % Identität mit der Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferase aus *Populus tomentosa* (Salicaceae) (Jianhua et al. 2001), bei 183 überlappenden Nukleotiden.

Die zunächst hohe Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Methyltransferasen erklärt sich aus den verwendeten Primern, die gegen sehr konservierte Regionen aller Methyltransferasen gerichtet sind. Daher sollten auch alle gefundenen Methyltransferasen in diesen Bereichen sehr ähnlich sein. Außerdem überlappen nur 183 der 437 Nukleotide von MT1. Dadurch ist die tatsächliche Ähnlichkeit nicht so hoch, wie es die hier angegebenen Zahlen erscheinen lassen. Trotzdem ist die hohe Anzahl an Kaffeesäure-Methyltransferasen auffällig. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dieser cDNA-Sequenz auch um eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase und nicht um die gesuchte  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase. Trotzdem wird versucht, die DNA-Sequenz zu verlängern und das komplette offene Leseraster zu bestimmen.

Für die zweite Sequenz mit 301 Nukleotiden ergeben sich folgende Ähnlichkeiten:

65,4 und 62 % Identität mit Flavonoid *O*-Methyltransferasen aus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) (Cacace et al. 2003), deren Aufgabe 3`-und 5`-Methylierung am B-Ring von Flavonolen und Dihydroflavonolen ist, mit einem Überlappen von 286 beziehungsweise 250 Nukleotiden,

62,7 % Identität mit Flavonoid 7-*O*-Methyltransferase aus *Hordeum vulgare* (Poaceae) (Gregersen et al. 1994), mit einer Ähnlichkeit zu einer Kaffeesäure-OMT aus Mais bei 185 verglichenen Nukleotiden,

62,5 % Identität mit 3`-Hydroxy-*N*-methylcocloraurin 4`-*O*-Methyltransferase aus *Coptis japonica* (Ranunculaceae) (Morishige et al. 2000), deren Aufgabe der Umsatz von 3`-Hydroxy-*N*-methylcocloraurin zu Reticulin (Isochinolinalkaloide) ist, mit einem Überlappen von 195 Nukleotiden.

Die Ähnlichkeiten dieser Sequenz sind vergleichbar hoch wie bei der ersten. Auch hier ähneln sich nur kleinere Teile von bis zu 250 Nukleotiden. Bei diesem cDNA-Fragment der MT2 ist auffällig, dass es sich nicht in allen Fällen um eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase handelt, sondern auch Alkaloide und Flavonole als Substrate akzeptiert werden. Bei dieser Sequenz ist also die Chance größer, tatsächlich die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase gefunden zu haben. Um das herauszufinden, muss erst das gesamte offene Leseraster, also die in Protein umgesetzte Sequenz des Gens, gefunden werden.

### 3.5.3. Verlängerung zur vollen cDNA-Länge mit GeneRacer™ Kit

Für die Verlängerung der bekannten cDNA-Sequenz wurde die RACE-Methode (rapid amplification of cDNA-ends) mit einem Kit von Invitrogen benutzt. Die dazu generierten Primer liegen auf den bekannten Stücken der cDNA in Bereichen, die nicht allzu ähnlich sind zwischen MT1 und MT2. Die Lage der verwendeten Primer (kursiv und grau unterlegt) ist unten dargestellt. Die Bezeichnung „rc“ bedeutet revers komplementär, also von 3´ nach 5´ gelesen und in die komplementären Basen übersetzt. Diese Primer werden für die Verlängerung in die 5´-Richtung, also für den Anfang der Sequenz, benutzt. Neben jedem Primer zeigt ein Pfeil die Verlängerungsrichtung an. Die so gefundenen Primer wurden auf Bindemöglichkeiten auf sich selbst und auf die jeweils zu benutzenden Primern des RACE-Kits überprüft und konnten so eingesetzt werden.



Nach den in Kapitel 2.6.16. beschriebenen PCR-Reaktionen wurden die Ansätze auf einem Agarosegel mit 1 % Agarose in TE-Puffer elektrophoretisch überprüft. Dabei wurde für MT1 ein DNA-Stück für den vorderen Teil der cDNA mit einer Größe von ca. 950 Basenpaaren gefunden. Das dazugehörige Gel ist in Abbildung 59 gezeigt. Für das 3`-Ende der DNA konnte ein 702 Basenpaare großes DNA-Stück ermittelt werden, wie das Gel in der Abbildung 61 zeigt. Für das zweite Methyltransferasefragment (MT2) konnte keine Abfolge der Anfangs- beziehungsweise Endsequenz bestimmt werden, da die PCR-Produkte nicht erfolgreich in einen Vektor eingebracht und in *E. coli* vermehrt werden konnten.

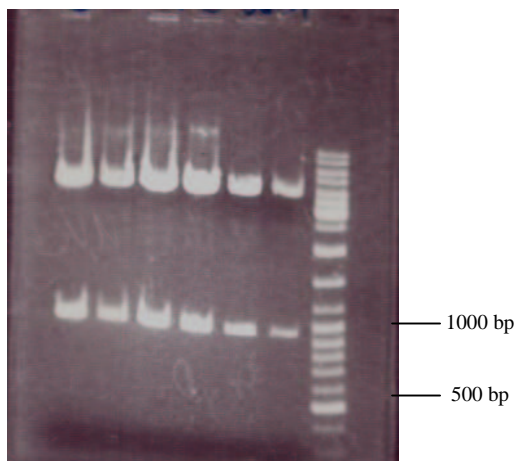


Abb. 59: Agarosegel für das 5`-Ende der Sequenz von MT1 nach Ligation in TOPO<sup>®</sup>-TA, Vermehrung in *E. coli* Bakterien, Plasmidpräparation und Restriktionsverdau mit *BcuI* und *Cfr 42I*, bp: Basenpaare.

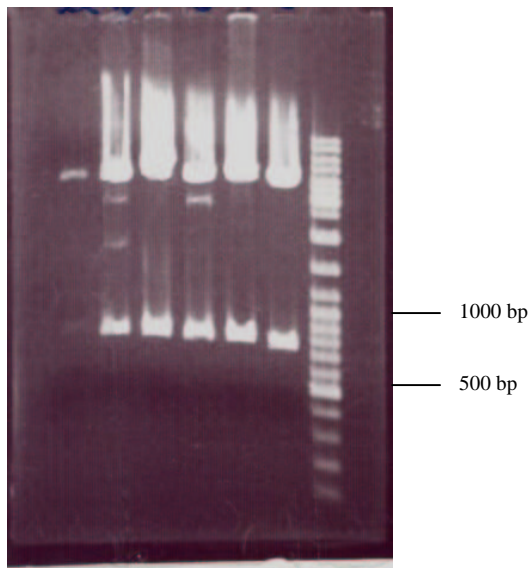


Abb. 60: Agarosegel für das 3`-Ende der Sequenz von MT1 nach Ligation in TOPO<sup>®</sup>-TA, Vermehrung in *E. coli* Bakterien, Plasmidpräparation und Restriktionsverdau mit *BcUI* und *Cfr 42I*, bp: Basenpaare.



außerdem das Problem, dass alle im Vektor befindlichen Schnittstellen außer *EcoRI* und *KpnI* auch die insertierte DNA zerschneiden würden (siehe Abbildung 61). Also müssen diese Schnittstellen über die jeweiligen Primer eingefügt werden, um die DNA wieder herauszuschneiden zu können. Für eine Aufreinigung ist ein Anhang von 6 Histidinresten von Vorteil. Durch diesen Anhang kann später das exprimierte Protein über eine Nickelmatrix von bakteriellem Protein gereinigt werden. Es wird in einem getrennten Ansatz getestet, ob man auch diesen Anhang über den Primer am 3'-Ende mit einbringen kann. So ergeben sich ein Anfangsprimer und zwei unterschiedliche Endprimer.

pTrc1:	<Ü>< <i>EcoRI</i> ><RBS><F ><Start (ATG), genspez. Teil>	Ü =	Überhang
5`-ATGAATTCAGGACATATGGGCTCAGCACCGG-3`		<i>EcoRI</i> =	Schnittstelle
		RBS =	Ribosomenbindestelle
		F =	Füllstück
		Start =	ATG
pTrc 2rc:	<Ü>< <i>KpnI</i> ><2xStopp>< genspez. Teil >	<i>KpnI</i> =	Schnittstelle
5`-ATAGGTACCCTATCAGGCGGCAGTTTTGAGG-3`		Stopp =	CTA TCA
pTrc 3rc:	<Ü >< <i>KpnI</i> ><2xStopp>< 6x His >< genspez. Teil >		
5`-ATAGTACCCTATCAGTGATGATGATGATGATGGGCGGCAGTTTTGAG-3`			

Das PCR-Produkt dieser Primer von ca. 1200 Basen Länge wurde in den Vektor pTrc99a ligiert und in *E. coli* Bakterien vom Stamm JM109 gebracht. Nach der Vermehrung der Bakterien und Plasmidpräparation konnte ein Verdau mit *EcoRI* und *KpnI* durchgeführt werden. Diese zwei Restriktionsschnittstellen waren über die Primer in die Sequenz eingeführt worden. Die Abbildung 62 zeigt das resultierende Agarosegel (1% Agarose in TE-Puffer, mit Ethidiumbromid gefärbt). Nicht alle Bakterien enthalten tatsächlich DNA in der Größe der gewünschten Sequenz. Plasmid-DNA aus zwei Bakterienlinien mit der inklonierten MT1-Sequenz wurde sequenziert.

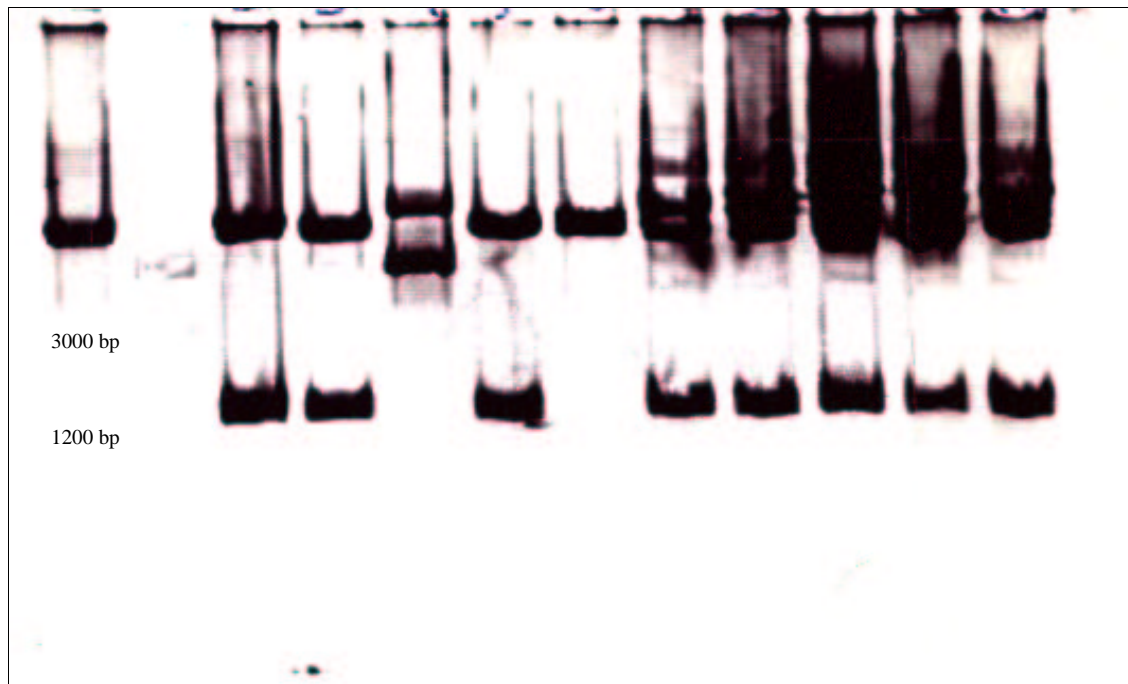


Abb. 62: Agarosegel (1%) mit Plasmidpräparationen der Vollängensequenz von MT1 in 11 parallelen Ansätzen in *E. coli* Bakterien, herausgeschnitten mit *EcoRI*.

### 3.5.7. Sequenz der MT1-Vollängensequenz

Für die Bestimmung der kompletten cDNA-Sequenz wurden zwei unterschiedliche Proben sequenziert. Bei der unten dargestellten Basenabfolge handelt es sich um eine Sequenz, in die der Histidinanhang gebracht wurde. Die Abbildung 63 zeigt die erhaltene translatierbare Sequenz in der Länge von 1095 Basen und darunter ihre Übersetzung in die daraus resultierende Aminosäuresequenz. Nach den zwei Alanin-Aminosäuren, mit denen der offene Leserahmen endet, folgen die sechs eingebrachten Histidin-Reste und im Abschluß zwei Stopp-Codons, die zu einem Abbruch der Proteinbildung führen und nicht mehr gezeigt sind.



```

Atgggctcagcaccggaaccagatgacccaaccgtggtctccgacgaggaagccaac 60
M G S A P E T Q M T P T V V S D E E A N
Ctattcgcgtatgcagctagccagcgcctccgtcctacccatggtcctcaaaccgcctc 120
L F A M Q L A S A S V L P M V L K S A L
Gagctcgacctcctcgaaatcatctccaaggcggcccccggcgcttacctttccccttc 180
E L D L L E I I S K A G P G A Y L S P S
Gacatcgccgcccactccacaccaagaaccagaagccccgacatgctcgaccgcatc 240
D I A A Q L H T K N P E A P D M L D R I
Tgccgcctcctcgcttctactccgtcctcacctgctccgtccaaaccctcccaaaccgc 300
C R L L A S Y S V L T C S V Q T L P N G
Gccgtccagcggctctacgcgcccctgtctgcaagtcctcaccaagaacgaggacgc 360
A V Q R L Y A P P L S A S P H Q E R G R
Gtctccatcgccgccctcgctctcatgaaccaggacaaggctcctcatggagagctggtat 420
V S I A A L A L M N Q D K V L M E S W Y
Catttgaaagatgcggtggttgatggagggatcccgttcaacaaggcgatgggatgacg 480
H L K D A V L D G G I P F N K A Y G M T
Gcgttcgagtaccacggcaccgatccgagattcaacaagggtgttcaacaaggggatgtct 540
A F E Y H G T D P R F N K V F N K G M S
Gatcactccaccattacgatgaagaagctcttgagagctacacgggattcgacggcctg 600
D H S T I T M K K L L E S Y T G F D G L
Gaatcgctggtggatgtcggcggcgggactggtgctgtactcagcatgatcctgtcgaag 660
E S L V D V G G G T G A V L S M I L S K
Cctccttcgattaaggggattaatttcgatctccctcatggttatcgccgatgccccgcct 720
H P S I K G I N F D L P H V I A D A P P
Ctccctggcgtcaagcacgttggcggcgacatgttcgcctccgtcccttccggcgacgcc 780
L P G V K H V G G D M F A S V P S G D A
Attttcatgaagtggatgatgtcacgattggagcgcagcagcactgcctgaagttcctgaag 840
I F M K W I C H D W S D E H C L K F L K
Aactgctacgagggcgtgcccggcgaaggggaaagtgatagtgtgagtgatgcatactgccg 900
N C Y E A L P A K G K V I V C E C I L P
Gtggcggcggacgcgagcctggcgacgaagaacgtggtacacatagactgcatcatgttg 960
V A P D A S L A T K N V V H I D C I M L
Gcgcacaaccaggaggaaagagaggacgcagtcggagttcgagtcgctggcaaagggc 1020
A H N P G G K E R T Q S E F E S L A K G
Gccggcttcaagggcttcaaggttctctgctctgctytmaacacctatgtcatggagttc 1080
A G F K G F K V L C S A X N T Y V M E F
Ctcaaaactgcccgc 1095
L K T A A

```

Abb. 63: Offenes Leseraster der vollen Länge der Sequenz MT1 und ihre Übersetzung in die Aminosäuresequenz.

Es findet sich nur ein offenes Leseraster, das unten nochmals dargestellt ist.

Zwischen Start und den über den Primer eingebrachten Histidin-Aminosäuren befinden sich 365 Aminosäuren, was einer Information von 1095 Basenpaaren entspricht. Innerhalb dieser Grenzen lassen sich auch alle fünf in pflanzlichen Methyltransferasen konservierten Regionen (Ibrahim et al. 1998) finden, die durch Kursivschrift hervorgehoben wurden und grau unterlegt sind.

**M** G S A P E T Q M T P T V V S D E E A N L F A M Q L A S A S V 31  
 L P M V L K S A L E L D L L E I I S K A G P G A Y L S P S D I 62  
 A A Q L H T K N P E A P D M L D R I C R L L A S Y S V L T C S 93  
 V Q T L P N G A V Q R L Y A P P L S A S P H Q E R G R V S I A 124  
 A L A L M N Q D K V L M E S W Y H L K D A V L D G G I P F N K 155  
 A Y G M T A F E Y H G T D P R F N K V F N K G M S D H S T I T 186  
 M K K L L E S Y T G F D G L E S **L V D V G G G T G** A V L S M I 217  
 L S K H P S I K **G I N F D L P H V** I A D A P P L P G V **K H V G** 248  
**G D M F** A S V P S G D A I F M K W I C H D W S D E H C L K F L 279  
 K N C Y E A L P A K **G K V I** V C E C I L P V A P D A S L A T K 310  
 N V V H I D C I M L A H N P **G G K E R T** Q S E F E S L A K G A 341  
 G F K G F K V L C S A X N T Y V M E F L K T A A H H H H H H 372  
**Stop Stop**

Mit dieser Aminosäureabfolge können nun mit Hilfe von Computerprogrammen Daten zum kodierten Protein berechnet werden. So gibt die Software Peptide Mass oder auch Compute pI/Mw (<http://au.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) Aufschluss über das zu erwartende Molekulargewicht und den Isoelektrischen Punkt des Proteins. Für die oben gezeigte Sequenz zwischen dem Start und dem eingebrachten Histidin-Anhang vor den zwei Stopp-Signalen ergibt sich ein berechneter Isoelektrischer Punkt von 5,94. Das Molekulargewicht wird mit 39318 Da berechnet.

### 3.5.8. Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Methyltransferasen

Gibt man die Aminosäuren zwischen dem Start und dem Histidin-Anhang der oben gezeigten Sequenz in die FASTA-Datenbank ein, ergeben sich Homologien zu vielen anderen Methyltransferasen. Wieder finden sich sehr viele Kaffeesäure-Methyltransferasen. Die höchsten Homologien zeigen sich hierbei für :

80,11 % Identität mit der Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferase aus Eucalyptus (Poeydonge et al. 2004) mit 366 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 39914 Da,

79,12 % Identität mit der 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon *O*-Methyltransferase aus *Fragaria x ananassa* (Kaldenhoff et al. 2000) mit 365 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 39817 Da,

79,95 % Identität mit einer Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferase aus Alfalfa (Gowri et al. 1991) mit 365 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 39946 Da,

79,06 % Identität mit einer Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferase aus Rosenblüten (Cock et al. 2003) mit insgesamt 365 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 39727 Da,

79,34 % Identität mit einer Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferase aus *Rosa chinensis* Petalen (Wu et al. 2003), die 365 Aminosäuren enthält. Das Molekulargewicht dieser Methyltransferase ist mit 39669 Da angegeben.

79,40 % Identität mit der Kaffeesäure *O*-Methyltransferase aus Mandeln (Garcia-Mas et al. 1995) mit 365 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 39762 Da.

Legt man die Aminosäuresequenzen der fünf Methyltransferasen mit hoher Homologie und die Sequenz der MT1 übereinander, kann man wieder die konservierten Regionen finden. Wieder zeigen die Sterne die Übereinstimmungen zwischen allen Sequenzen.



### 3.5.9. Aufreinigung des exprimierten Proteins

Bakterien, die das MT1-haltige Expressionsplasmid pTrc99a enthalten, können durch Zugabe von IPTG zur Expression des kodierten Fremdproteins gebracht werden. Nach der Zerstörung der Bakterien des jeweiligen Kulturansatzes liegt ein Überstand mit verschiedenen Proteinen vor. Da hierin sowohl bakterielle als auch das exprimierte pflanzliche Protein zu finden sind, muss eine Aufreinigung erfolgen. Zu diesem Zweck wurde über den Primer eine Markierung mit sechs Histidinresten am Ende der Sequenz vorgenommen. Diese Histidinreste können an eine Nickelmatrix gebunden und damit die pflanzliche Methyltransferase von den restlichen Proteinen abgetrennt werden. Der Aufreinigungseffekt kann über ein SDS-Polyacrylamidgel gezeigt werden. Hierfür wird von allen Fraktionen der Säulenchromatographie ein Aliquot auf das Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben. Die Abbildung 64 zeigt das Ergebnis einer solchen Aufreinigung. Man kann bei der ersten Waschfraktion noch ungebundene Proteine erkennen, die von der Säule gespült werden. Nach dem Waschen sind keine Proteine mehr detektierbar. Erst die Elution durch Imidazol mit dem dafür vorgesehenen Puffer löst die gebundenen Proteine von der Säule und lässt sie auf dem Gel erscheinen. Man kann gut erkennen, dass diese eluierten Proteine sehr sauber sind. Außerdem kann man im Gel den Unterschied zwischen induzierter und nicht induzierter Probe sehen. Als Kontrolle wurde ein Ansatz von Bakterien mit dem MT1-haltigen Expressionsplasmid pTrc99a herangezogen, der nicht zur Bildung von dem Fremdprotein durch IPTG induziert wurde. Trotzdem sind auch in diesen nicht induzierten Proben viele Proteinbanden zu sehen, unter anderem auch über Nickelmatrix reinigbare Proteine. Eigentlich sollten ohne IPTG-Induktion keine Fremdproteine gebildet werden. Dass trotzdem die pflanzliche Methyltransferase exprimiert wird, liegt an dem pTrc99a Vektor, der auch ohne IPTG abgelesen wird. Dieses Phänomen nennt man „leaky“. Zunächst hat die nicht induzierte Probe sogar mehr und stärkere Proteinbanden, die aufgereinigte Bande von ca. 40 kDa ist jedoch verhältnismäßig kleiner als bei der induzierten Probe. Dort ist eine geringere Menge an Protein aufgetragen worden, die gereinigte Bande ist aber relativ stark zu sehen. Die Bakterien haben also die Methyltransferase verstärkt gebildet.

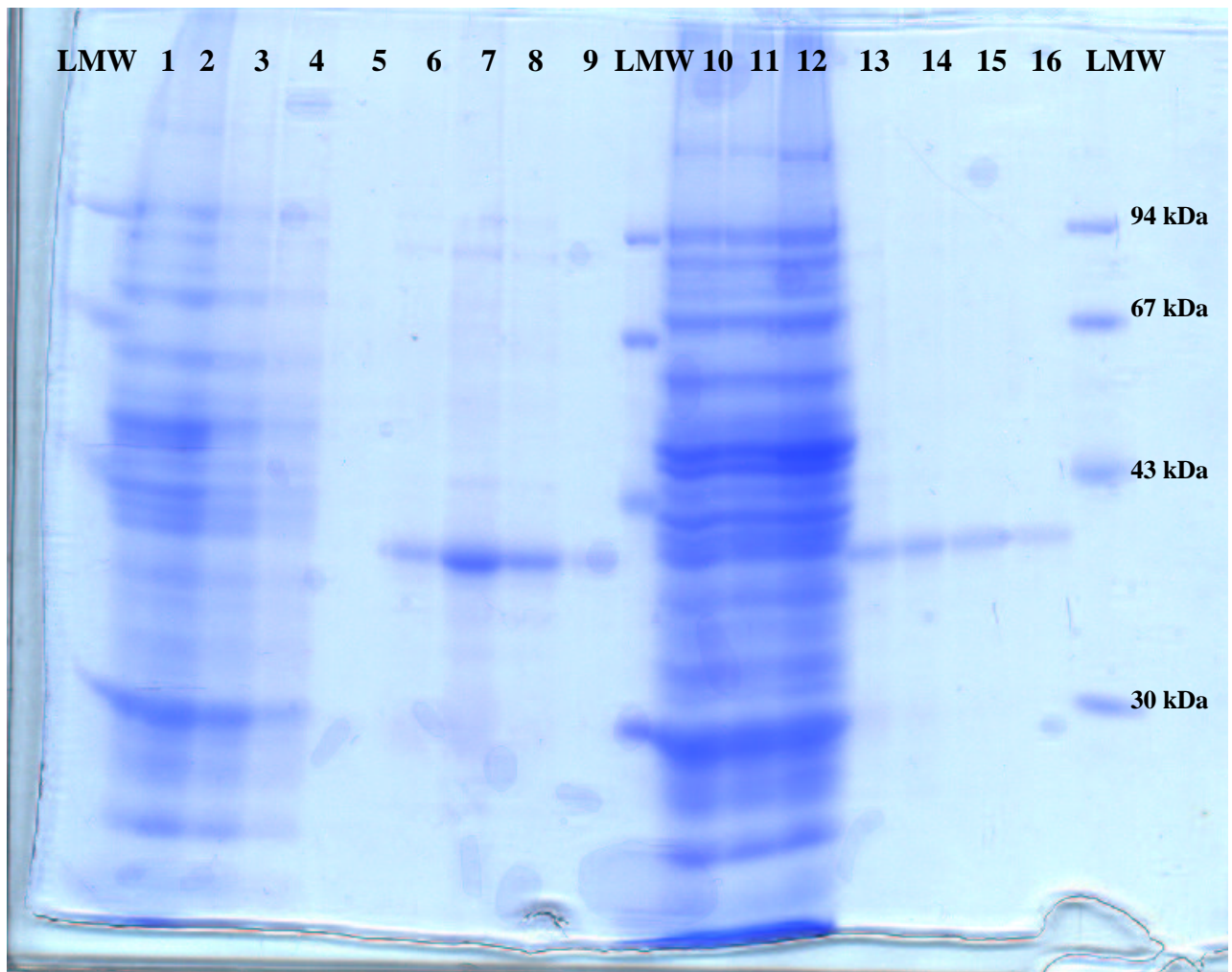


Abb. 64: SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinproben der Aufreinigung mittels Nickelmatrix, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue. LMW: Low molecular weight marker, Bahn 1: mit IPTG induziertes Protein vor der Aufreinigung, Bahnen 2-4: Durchlauf und Waschfraktionen 1 und 5 des induzierten Proteins, Bahn 5: leere Bahn, Bahnen 6-9: Elutionsproben 1-4 mit IPTG induziertem Protein, Bahnen 10-12: Durchlauf der nicht induzierten Probe, Waschfraktionen 1 und 5, Bahnen 13-16: Elutionsproben 1 bis 4 der Proteine, die nicht induziert wurden.

### 3.5.10. Substrattests mit dem exprimierten Protein

In Abbildung 64 ist zu sehen, dass die Fraktionen mit der größten Menge heterolog exprimierter MT1 die Elutionsfraktionen 2 und 3 sind. Mit diesen Proben wurden nun radioaktive Tests mit verschiedenen Substraten durchgeführt, um eine Aussage zur Aktivität der klonierten Methyltransferase zu treffen. Aufgrund der hohen Homologien zu Kaffeesäure-Methyltransferasen könnte ein Umsatz von Kaffeesäure und ihrer Derivate vermutet werden. Von all den getesteten Substraten, werden tatsächlich die Kaffeesäurederivate deutlich umgesetzt. Viel stärker ist jedoch der Umsatz mit Daphnetin, einem Cumarin.  $\beta$ -Peltatin oder andere eingesetzte Lignane wurden nicht als Substrat akzeptiert. Damit kann man leider sagen, dass hier nicht die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase kloniert wurde. Die Abbildung 65 gibt einen Überblick über die akzeptierten Substrate und ihre Umsetzung.

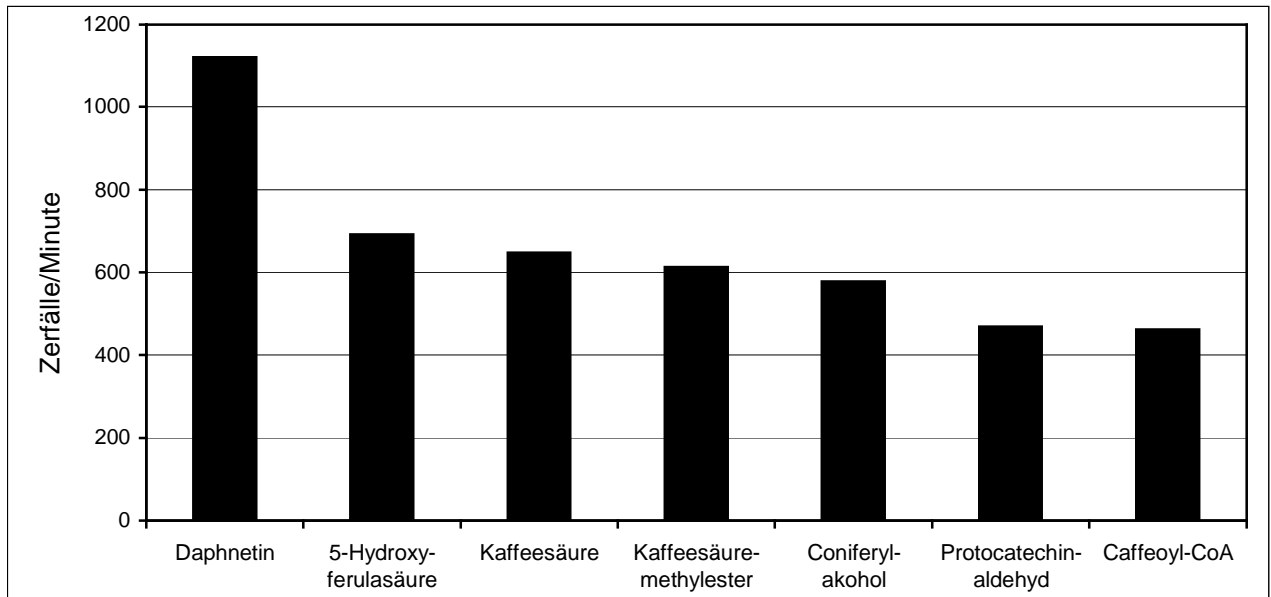


Abb. 65: Radioaktiver Enzymtest mit heterolog exprimierter MT1 (mit His-Tag) und verschiedenen Substraten.

Um sich eine bessere Vorstellung der vom Enzym benötigten Struktur zu machen, werden die akzeptierten Substrate in Abbildung 66 dargestellt. Dabei fallen als gemeinsames Element die zwei OH-Gruppen am Aromaten auf. Außerdem herrscht an einer dieser OH-Gruppen relativer Elektronenmangel durch elektronenziehende Substituenten an dem restlichen Molekülteil.

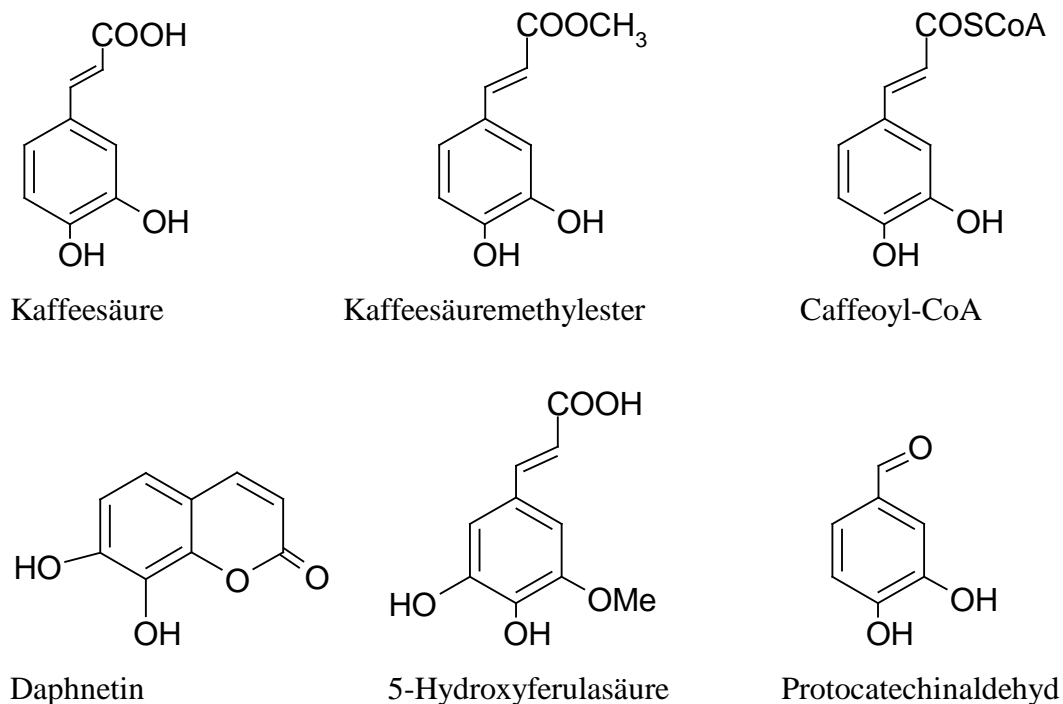


Abb. 66: Strukturformeln der von MT1 akzeptierten Substrate.

Die nicht umgesetzten Substrate waren: 4'-Demethylpodophyllotoxin, Desoxypodophyllotoxin, Hydroxymatairesinol, Matairesinol, Pinoresinol,  $\beta$ -Peltatin, Yatein, 2,3-Dimethoxyphenol, 2,4-Dihydroxybenzaldehyd, 3,4-Dimethoxyphenol, 3,5-Dihydroxyanisol, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxyphenol, 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol, Brenzcatechin, Carvacrol, Guaiacol, Iodophenol, Isovanillinsäure, m-Cresol, o-Cresol, Orcinol, Phenol, Phloroglucin, Protocatechualdehyd, Protocatechusäure, Resorcinol, Salicylsäure, Syringinsäure, Syringylaldehyd, Thymol, Vanillin, Vanillinsäure, Aescin, Ginsenosid, g-Strophantin, Lanatosid C, 4-Cumarsäure, 3-Hydroxyzimtsäure, 4-Cumaroyl-CoA, Eugenol, Ferulasäure, Ferulasäuresuccinat, Hydrokaffeesäure, Isoferulasäure, Sinapinsäure, Zimtsäure, Epicatechin, 5-Hydroxyflavanon, 7-Hydroxy-5-methoxyflavanon, 7-Hydroxyflavanon, Apigenin, Catechin, Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin, Dihydromyricetin, Eriodictyol, Genistein, Hesperidin, Homoeriodictyol, Isorhamnetin, Kämpferol, Luteolin, Naringenin, Pentahydroxyflavanon, Pinocembrin, Quercetin, Rutin, Tricetin, Vitexin-4'-rhamnosid, 2,4-Dihydroxychinolin, Aloin, Atropin, Chlorogensäure, Manaiferin, Menthol, Nerolidiol, Phenylalanylamin, Phloretin, Resveratrol, Shikimisäure, Tannin, 5-Methoxyumbelliferon, Bergapton und Scopoletin.



## 4. Diskussion

### 4.1. Aktivität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase in verschiedenen Zellkulturen

Die NMR-Analyse hat gezeigt, dass das Umsetzungsprodukt der in Proteinextrakten aus *Linum nodiflorum*-Zellen enthaltenen Methyltransferase aus  $\beta$ -Peltatin und SAM  $\beta$ -Peltatin-A Methylether ist. Die Peaks konnten der Struktur eindeutig zugeordnet werden, auch der Vergleich mit NMR-Analysen von Podophyllotoxin zeigte Übereinstimmungen in den Atomen des Aryltetralin-Grundgerüsts. Nachdem damit das Enzym als  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase (POMT) identifiziert war und ein geeignetes Testsystem für die POMT zur Verfügung stand, konnten verschiedene Suspensionskulturen auf Enzymaktivität untersucht werden. Neben Kulturen mit guter spezifischer Enzymaktivität wie zum Beispiel *Linum nodiflorum*, *Linum album* und *Linum flavum*, hatten viele der anderen getesteten *Linum*-Kulturen wenig oder keine Aktivität der POMT. Bei den Kulturen ohne POMT-Aktivität kommen auch keine großen Mengen an Lignanene vor. Wenn man die Unterteilung innerhalb der Gattung *Linum* betrachtet, sollte man erwarten, dass in *Linum nodiflorum* und in *Linum flavum* hohe Aktivitäten der POMT messbar sind, da in diesen Pflanzen 6-MPTOX-Glucosid als Endprodukt der Lignanbiosynthese nachgewiesen werden kann. Die verwendete Linie von *Linum album* akkumuliert eigentlich PTOX und sein Glucosid, 6-MPTOX-Glucosid kann nicht gefunden werden. Es sollte daher wenig POMT-Aktivität in den Zellen zu finden sein. Das ist aber nicht der Fall. Es könnte sein, dass sich die Zellkulturen so stark verändert haben, dass sie jetzt auch in der Lage sind, andere Lignane zu bilden. Es ist bekannt, dass sich Zellen in Suspensionskultur schneller verändern können als *in vivo*. Die zweite und wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass die Kultur eigentlich auch 6-MPTOX bilden könnte, aber ein Enzymdefekt auf der Stufe der DOP 6-Hydroxylase die Bildung von  $\beta$ -Peltatin oder eine defekte PAM 6-Hydroxylase die Bildung von 6-MPTOX verhindert. In dem Fall könnten die übrigen nötigen Enzyme wie die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase zwar vorhanden sein, in den Pflanzen aber trotzdem kein 6-MPTOX gefunden werden. Um diese These zu verifizieren wurden Fütterungsversuche mit der Zelllinie von *Linum album* unternommen. Sowohl die Fütterung von  $\beta$ -Peltatin als auch die Zugabe von PAM zum Medium führten zu einer verstärkten Akkumulation „später“ Lignane. Nach Lignanextraktion wurden  $\beta$ -PEL, PAM und 6-MPTOX (Fütterung von  $\beta$ -PEL) oder PAM und 6-MPTOX (Fütterung von PAM) gefunden, außerdem waren kleine Mengen an PTOX nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, dass in der verwendeten Zelllinie von *Linum album* die Enzyme zur Bildung der Lignane von  $\beta$ -Peltatin bis 6-MPTOX vorhanden sind (Dr. Stephan Kuhlmann, persönliche Mitteilung und eigene Versuche). Es müsste demnach ein Defekt der DOP 6-Hydroxylase vorliegen. Damit besteht kein Widerspruch mehr zwischen der gefundenen Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase und der Aussage von Weiss et al. (1975), die nur PTOX in *Linum album*

nachweisen konnten. Darüber hinaus wurden mittlerweile durch Selektion verschiedene Zelllinien etabliert, die vorwiegend PTOX, 6-MPTOX oder keines dieser Lignane akkumulieren (Fuss 2004).

#### **4.2. Substratspezifität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase**

Neben der Methylierung von  $\beta$ -Peltatin ergab die Bestimmung der Substratspezifität einen Umsatz von Kaffeesäure und ihren Derivaten wie Kaffeesäuremethylester und Caffeoyle-CoA. Auch Protocatechinaldehyd, Pinoresinol, Coniferylalkohol und Daphnetin wurden als Substrate akzeptiert. Da der Enzymtest mit Proteinextrakten durchgeführt wurde, kann nicht davon ausgegangen werden, dass all diese Substrate von der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase umgesetzt werden können. Vielmehr handelt es sich um ein Gemisch aus Enzymen im Rohextrakt der Zellen, die eine Vielzahl an Substraten methylieren. Offensichtlich erfasst der Test der POMT abhängig vom eingesetzten Substrat auch andere Methyltransferaseaktivitäten. Da Kaffeesäure und ihre Derivate in pflanzlichen Zellen eine wichtige Rolle in der Synthese unterschiedlicher Sekundärstoffe spielen, überrascht es wenig, dass in dem Rohextrakt der *Linum*-Kultur viele Methyltransferasen enthalten sind, die diese Substrate akzeptieren. Der Zusatz von Magnesiumionen spielt keine große Rolle bei der Methylierung der angebotenen Substrate. Joshi und Chiang (1998) unterteilten die Methyltransferasen in eine große Gruppe magnesiumunabhängiger Methyltransferasen und in die Caffeoyle-CoA Methyltransferasen, die magnesiumabhängig sind. Es ist daher erstaunlich, dass auch in Puffer ohne Magnesiumzusatz eine Methylierung von Caffeoyle-CoA gemessen werden kann. Der Umsatz dieser Vorstufe ist allerdings gering, so dass die Ergebnisse bei einer Optimierung für Caffeoyle-CoA auch deutlicher ausfallen könnten. Es kann bei dem verwendeten radioaktiven Testsystem auch nicht ausgeschlossen werden, dass der CoA-Ester durch eine „Esterase“ gespalten und dann die freie Kaffeesäure methyliert wird. Für eine solche Umsetzung spricht auch das Vorkommen von radioaktiv markiertem Produkt, das sich eigentlich nicht mit Ethylacetat ausschütteln lassen dürfte.

Für die Bestimmung der von der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase akzeptierten Substrate ist der Test nicht geeignet, da auch andere Methyltransferaseaktivitäten mit erfasst werden. Das Enzym müsste aufgereinigt werden, um den Test mit unterschiedlichen Substraten zu wiederholen. Dann könnte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Substrate die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase akzeptiert und welche nicht.

#### **4.3. Beschreibung der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase**

Bei der  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase handelt es sich um ein Enzym, dessen pH-Optimum in Tris-HCl-Puffer bei 7,8 liegt. Bei pH 6,2 und pH 8,5 kann eine halbmaximale Enzymaktivität gemessen werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich um ein cytosolisches Enzym, da die Herstellung einer Mikrosomenpräparation für membrangebundene Enzyme für einen positiven POMT-Test nicht nötig war. Im Cytosol

herrscht ein pH-Wert von 7,4-7,5. Da das pH-Optimum *in vitro* und nicht *in vivo* gemessen wurde, könnte eine Verschiebung der Werte in der lebenden Pflanze denkbar sein. Es gibt aber auch Enzyme, die in suboptimalen Bedingungen in der Pflanze arbeiten, das scheint aber für die Methyltransferasen nicht der Fall zu sein. Bei einem Vergleich mit anderen *O*-Methyltransferasen (Tabelle 3) fällt auf, dass oft ein neutraler oder leicht basischer pH-Wert für die Enzyme optimal ist. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die optimale Inkubationstemperatur, pH-Werte, apparente  $K_m$ -Werte für Substrat und SAM, die Hemmkonstante für SAH und das Molekulargewicht anderer Methyltransferasen.

Pflanze	Substrat der OMT	Temperatur-Optimum	pH-Optimum	$K_m$ Substrat	$K_m$ SAM	Ki SAH	Mr [kDa]	Literatur
<i>Linum nodiflorum</i>	$\beta$ -Peltatin	40 °C	7,8	40 $\mu$ M	15 $\mu$ M	n. b.	ca. 64	Diese Arbeit
<i>Brassica oleracea</i>	5-Hydroxyferulasäure	n. b.	7,6 in 50 mM Tris-HCl-Puffer	20 $\mu$ M	55 $\mu$ M	15 $\mu$ M	42 (M)	De Carolis und Ibrahim 1989
<i>Ocimum basilicum</i>	Eugenol Chavicol	n. b.	7-8 7-8	3 $\mu$ M 6 $\mu$ M	5 $\mu$ M 5 $\mu$ M	n. b.	40 (M) 39,9 (M)	Gang et al. 2002
<i>Berberis koetaneana</i>	3'-Hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurin	35 – 40 °C	8,3 – 8,5	4,5 $\mu$ M	30 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	40 (M)	Frenzel und Zenk 1990
<i>Pinus sylvestris</i>	Pinosylvin	n. b.	7,7	49 $\mu$ M	12 $\mu$ M	n. b.	37 – 40 (M)	Chiron et al. 2000
<i>Fragaria <math>\times</math> ananassa</i>	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon	37 °C	8,5	5 $\mu$ M	15 $\mu$ M	n. b.	80 (D)	Wein et al. 2002
<i>Lupinus luteus</i>	2,3-Dehydrokieviton	n. b.	7,0	1 $\mu$ M	150 $\mu$ M	15 $\mu$ M	55 (M)	Khouri et al. 1988
<i>Ammi majus</i>	Bergaptol	42 °C	8,0	2,8 $\mu$ M	6,5 $\mu$ M	n.b.	38,7 (M)	Hehmann et al. 2004
<i>Coptis japonica</i>	(R,S)-6-O-methylnorlaudanolin	n. b.	8,0	42 $\mu$ M	68 $\mu$ M	27 $\mu$ M	80 (D) / 41 (M)	Morishige et al. 2000
<i>Chrysosplenium americanum</i>	Quercetin	n. b.	7,8	12 $\mu$ M	114 $\mu$ M	4,5 $\mu$ M	57 (n. b.)	Ibrahim et al. 1986

Tabelle 3: Vergleich unterschiedlicher *O*-Methyltransferasen in Bezug auf Substrate, Temperatur-Optimum, pH-Optimum,  $K_m$ -Werte, Hemmwert für SAH und molekulare Massen der Monomere oder Dimere, n.b.: nicht bestimmt, M: Monomer, D: Dimer.

Die optimale Inkubationstemperatur erscheint mit 40 °C sehr hoch. Bereits bei 42 °C beginnen einige Proteine zu denaturieren, ab 45 °C ist auch kaum noch Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase zu finden. Auch hier fällt beim Vergleich mit anderen Methyltransferasen auf, dass das Temperaturoptimum, wenn es bestimmt wurde, sehr hoch liegt. Die Bergaptol *O*-Methyltransferase hat sogar ein Temperaturoptimum von 42 °C. Alle Methyltransferasen arbeiten aber auch gut bei 30 °C, eine Temperatur, die eher den *in vivo*-Bedingungen entspricht.

Eine Linearität der Inkubationszeit konnte im Standardenzymtest mit 30-60 Minuten bestimmt werden. Das Enzym arbeitet also eher langsam, was verwunderlich ist für ein Enzym, das an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sein könnte. Da jedoch nur *in vitro*-Tests durchgeführt wurden, die sich erheblich von den Reaktionsbedingungen in der Pflanze unterscheiden und die Lignane als Frassschutz in der Vakuole gespeichert und damit schnell verfügbar sind, ist die Aufgabe der Lignane als Pathogenabwehrstoffe zu funktionieren möglich. Die Tatsache, dass sich die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase nicht durch Methyljasmonat induzieren lässt (siehe 3.1.4.11.), zeigt, dass Lignane keine sofort gebildeten, induzierten Abwehrstoffe für den akuten Befall sein können. Man kann sie unabhängig von Verletzung oder mikrobiellem Befall in der Pflanze finden, so dass ihre Synthese kontinuierlich geschehen muss. Da die Lignane meist als Glucoside in der Vakuole gelagert werden, ist im Fall einer Pathogenattacke auch eine Freisetzung nach Deglucosidierung denkbar. Eine spezifische Glucosidase aus *Podophyllum peltatum* wurde kürzlich beschrieben (Dayan et al. 2003). In der Literatur sind selten Testreihen zur optimalen Inkubationszeit zu finden. Eine vergleichbare Inkubationszeit, während der die Methylierung des Substrates linear verläuft, hat die Isoflavon 5-*O*-Methyltransferase aus *Lupinus luteus* mit 90 Minuten (Khouri et al. 1988). Auch hier werden die methylierten Substanzen in der Wurzel zum Schutz der Pflanze gelagert. Bei der Isoflavon 5-*O*-Methyltransferase wie auch bei der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase liegt die optimale Proteinmenge bei 50  $\mu$ g Protein im Test. Diese Aussage ist aber nur bedingt vergleichbar, da es sich hierbei um Gesamtprotein in einem Proteinrohextrakt aus Zellen handelt, der eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine enthält. Wie hoch der Anteil der gesuchten Methyltransferase an diesem Gesamtprotein ist, kann weder in dieser Arbeit noch von Khouri et al. (1988) bestimmt werden. Der Wert dient damit eher der Orientierung.

Die  $K_m$ -Werte für SAM der verglichenen Methyltransferasen reichen von 5  $\mu$ M bis 114  $\mu$ M und sind damit nicht einheitlich. Sogar Werte von 160  $\mu$ M konnten bei der Isoflavon 4'-*O*-Methyltransferase aus *Cicer arietinum* bestimmt werden (Wengenmayer et al. 1974). Die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase liegt mit einem apparentem  $K_m$ -Wert von 15  $\mu$ M für SAM im unteren Bereich. Das bedeutet, dass die Methyltransferase eine hohe Affinität zu SAM hat. Bei den  $K_m$ -Werten der akzeptierten Substrate reicht der bei verschiedenen Methyltransferasen apparente  $K_m$ -Wert von 1  $\mu$ M bis 49  $\mu$ M. Mit einem apparentem  $K_m$ -Wert von 40  $\mu$ M liegt der Wert für  $\beta$ -Peltatin recht hoch. Das bedeutet, dass die Methyltransferase keine so hohe Affinität zu dem Substrat hat wie zu SAM, es muss eine hohe Substratkonzentration

vorliegen, damit das Enzym maximal arbeiten kann. Das kann daran liegen, dass  $\beta$ -Peltatin größer ist und daher etwas schwerer in die Bindetasche kommt als das kleine SAM. Auf jeden Fall muss auch bedacht werden, dass die Messung nicht *in vivo* sondern nur *in vitro* stattgefunden hat. Falls in der Pflanze Strukturen oder Proteine vorkommen, die die Methylierung von  $\beta$ -Peltatin begünstigen, was den  $K_m$ -Wert verringern würde, sind diese möglicherweise bei der Zellpräparation zerstört oder abgetrennt worden. Daher kann nur der apparente, nicht der tatsächliche  $K_m$ -Wert angegeben werden. Es kann letzten Endes auch nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* noch bessere Substrate für das beschriebene Enzym existieren.

Wie man in Tabelle 3 ebenfalls sehen kann, ist die Hemmung durch SAH ein häufiger Effekt bei SAM-abhängigen Methyltransferasen. Es ist auch logisch, dass das Produkt der Methylierung und das demethylierte SAH die Enzymaktivität blockieren können. Für die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase konnte gezeigt werden, dass eine höhere Konzentration an SAM die Hemmung durch SAH aufhebt. Es liegt also eine kompetitive Hemmung vor, bei der beide Substrate um einen Platz an der Bindestelle des Enzyms konkurrieren. Dieser Hemmtyp ist auch für die anderen in der Tabelle gezeigten Methyltransferasen nachgewiesen worden. Erstaunlich ist, dass in allen Fällen, in denen inhibitorische Konstanten bestimmt wurden, diese niedriger sind, als die jeweiligen  $K_m$ -Werte für SAM. Daraus kann man zwar noch nicht schließen, dass die Methyltransferasen eine höhere Affinität zu SAH als zu SAM haben, da  $K_m$ - und  $K_i$ -Wert unterschiedlich berechnet werden, aber sie haben trotzdem eine recht hohe Affinität. Ein Grund dafür könnte eine Regulierung der Methyltransferaseaktivität durch Enzyme aus früheren Syntheseschritten sein, die über die Hemmung der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase steuernd in die Synthese von 6-MPTOX eingreifen können (De Luca und Ibrahim 1985). Es ist allerdings fraglich, inwieweit eine Regulation auf dieser Stufe Sinn für die Pflanze macht. Das unmethylierte  $\beta$ -Peltatin kann wie 6-MPTOX als Glucosid in Vakuolen gespeichert werden (Berlin et al. 1988). Bei Lignanextraktionen konnten  $\beta$ -Peltatin und 6-MPTOX, aber kein PAM in den *Linum*-Zellen nachgewiesen werden. Die 7-Hydroxylierung des PAM muss also deutlich schneller geschehen als die Methylierung, so dass hier wohl nicht mehr regulierend eingegriffen wird.

Mit Hilfe von Gelfiltration kann eine ungefähre Proteingröße von 64 kDa ermittelt werden. Im Vergleich mit den anderen in Tabelle 3 gezeigten Methyltransferasen fällt auf, dass diese entweder deutlich kleiner sind oder deutlich größer. Wenn sie als Monomer bestimmt wurden, haben sie ein Molekulargewicht zwischen 37 und 42 kDa, wenn über eine Größenausschluss säule die Größe als Dimer bestimmt wurde, kann man ca. 80 kDa messen. Diese Größenordnung wurde auch schon von Ibrahim et al. (1998) beschrieben, der einen Bereich von 37,6 bis 42,3 kDa für Monomere der Gruppe der magnesiumunabhängigen Methyltransferasen nennt (siehe Kapitel 1.2.3.). Die zweite Gruppe der magnesiumabhängigen Caffeoyl-CoA-Methyltransferasen hat eine Größe zwischen 24,7 und 27,1 kDa (Ibrahim et al. 1998, Joshi und Chiang 1998). Eine Ausnahme bilden hier die Isoflavon 5-*O*-Methyltransferase aus *Lupinus luteus* mit 55 kDa und die Quercetin 3-*O*-

Methyltransferase aus *Chrysosplenium americanum* mit 57 kDa. Beide Enzymmassen wurden wie die der POMT mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie bestimmt. Dabei spielen aber neben der tatsächlichen Molekülgröße auch Ladung und Faltung der Proteine eine Rolle und können das Ergebnis verfälschen. Am genauesten ist die Berechnung des Molekulargewichts über die Aminosäuresequenz. Das ist aber leider bei der POMT nicht möglich. Man könnte dann noch eine Ultrafiltration durch Filter mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen durchführen. Vergleicht man die für die POMT ermittelten 64 kDa mit den Molekulargewichten der unterschiedlichen Klassen von Methyltransferasen, so kann man feststellen, dass es sich wohl wie bei allen anderen bisher beschriebenen Methyltransferasen um ein Homodimer handelt. Jedes Monomer hätte demzufolge ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa (oder etwas größer). Damit lässt sich die POMT vom Molekulargewicht her in keine der beiden Gruppen einordnen. Die Einteilung in eine der beiden von Joshi und Chiang vorgeschlagenen Gruppen von Methyltransferasen lässt sich trotzdem vornehmen, da die erste Gruppe nicht von Magnesiumionen abhängig ist, die zweite schon. Da die  $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase nicht von Magnesiumionen abhängig ist und in der zweiten Gruppe von Methyltransferasen nur Caffeoyl-CoA methylierende Enzyme zugeordnet werden können, liegt das erwartete Molekulargewicht für die erste Gruppe zwischen 37 bis 42 kDa. Die Bestimmung des Molekulargewichts über Auftrennung über eine Gelfiltrationssäule hat also ein zu niedriges Molekulargewicht ergeben.

Vergleicht man die Lagerfähigkeit der POMT mit der anderer Methyltransferasen, sieht man, dass sie zu den stabileren der Gruppe gehört. Bei niedrigen Temperaturen (-70 °C) ist kein Zusatz von Glycerin nötig. Allgemein erhöht der Zusatz von 10 – 20 % Glycerin und von SH-Gruppen-schützenden Substanzen wie DTT oder Mercaptoethanol die Lagerfähigkeit, was auch bei der POMT gesehen werden kann. Einen Vergleich der Lagerfähigkeiten verschiedener Methyltransferasen ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Pflanze	Methyltransferase	Lagerfähigkeit ohne Zusätze	Lagerfähigkeit mit Zusätzen	Literatur
<i>Linum nodiflorum</i>	$\beta$ -Peltatin 6-O-MT	-18 °C: nach 25 Wochen Verlust von 80 % der Akt. -70 °C: nach 25 Wochen Verlust von 20 % Akt. Ab dem ersten Auftauvorgang Verlust von 75 % Akt.	Mit 10 % Glycerin stabil über 25 Wochen bei -18 °C und -70 °C	Diese Arbeit
<i>Berberis koetianeana</i>	3'-Hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurin-4'-O-MT	RT: nach 3 Tagen Verlust von 50 % Akt. 6 °C: nach 15 Tagen Verlust von 50 % Akt. Kein Einfluss durch vermehrtes Auftauen	Stabil über ein Jahr bei -20 °C mit 20 % Glycerin	Frenzel und Zenk 1990
<i>Pinus sylvestris</i>	Pinosylvin O-MT	n. b.	Mit 10 % Glycerin stabil bei -20 °C für sieben Tage	Chiron et al. 2000
<i>Lupinus luteus</i>	2,3-Dehydrokiewitone 5-O-MT	n. b.	Mit 10 % Glycerin und 1 mM DTT bei -20 °C stabil über zwei Monate Verlust von 50 % Akt. nach zwei Wochen mit 14 mM Mercaptoethanol	Khouri et al. 1988
<i>Brassica oleracea</i>	5-Hydroxyferulasäure O-MT	0-4 °C : stabil für 72 Stunden	Mit 10 % Glycerin und 1 mM DTT bei -20 °C stabil über zwei Monate	De Carolis und Ibrahim 1989

Tabelle 4: Lagerfähigkeit unterschiedlicher Methyltransferasen im Vergleich, RT: Raumtemperatur, n.b.: nicht bestimmt.

Gemeinsam mit der Suche nach möglichen Cofaktoren wie Magnesiumionen wurden auch Hemmstoffe der Methyltransferase gefunden. In der Tabelle 5 werden die Hemmstoffe und die getesteten Verbindungen ohne Effekt mehrerer Methyltransferasen verglichen. Es konnten dabei keine fördernden Substanzen gefunden werden, was auch bei den anderen Methyltransferasen aus dieser Gruppe nicht gelang.

Pflanze	Methyltransferase	Substrate mit Hemmwirkung	Substrate ohne Hemmwirkung	Literatur
<i>Linum nodiflorum</i>	$\beta$ -Peltatin 6- <i>O</i> -MT	DTT, MnSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> , ZnSO <sub>4</sub>	EDTA, DTT (in kleineren Konzentrationen), CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , Methanol, Ethanol, Mercaptoethanol,	Diese Arbeit und Kranz und Petersen 2003
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Flavonoid 4'- <i>O</i> -MT (Kämpferol)	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Iodacetamid, Phenylquecksilberacetat	n. b.	Curir et al. 2003
<i>Fragaria × ananassa</i>	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon MT	CoCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , FeSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub>	n. b.	Wein et al. 2002
<i>Lupinus luteus</i>	Isoflavon 5- <i>O</i> -MT (Genistein)	Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , N-Ethylmaleimid, Iodacetat, Iodacetamid	EDTA, Mg <sup>2+</sup>	Khouri et al. 1988
<i>Coptis japonica</i>	3'-Hydroxy- <i>N</i> -methylcoclaurin 4'- <i>O</i> -MT	Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> ,	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , EDTA, Iodacetamid	Morishige et al. 2000
<i>Brassica oleracea</i>	5-Hydroxyferulasäure <i>O</i> -MT	Iodacetat	Iodacetamid, N-Ethylmaleimid	De Carolis und Ibrahim 1989
<i>Ammi majus</i>	Bergaptol <i>O</i> -MT	Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Hehmann et al. 2004
<i>Coptis japonica</i>	Scoulerin 9- <i>O</i> -MT	Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Chloroquecksilberbenzoat	EDTA, N-Methylmaleimid, Iodacetamid, Co <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Sato et al. 1993

Tabelle 5: Vergleich der getesteten möglichen Hemmstoffe verschiedener Methyltransferasen, n. b.: nicht bestimmt.

Die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase wird nicht durch EDTA gehemmt. Wäre die Methyltransferase magnesiumabhängig wie die Caffeyl-CoA-Methyltransferasen, müsste eine Hemmung zu finden sein. Das EDTA würde die zweiwertigen Magnesiumkationen komplexieren und damit aus dem Test entfernen. Auch die Zugabe von Magnesiumchlorid führt zu keiner Aktivitätssteigerung. Das zeigt eindeutig, dass es sich nicht um eine Methyltransferase aus der Gruppe der Magnesium-abhängigen Methyltransferasen handelt.



Das wäre auch kaum logisch gewesen, da  $\beta$ -Peltatin als Substrat akzeptiert wird, kein Caffeoyl-CoA.

Die größte Ähnlichkeit mit der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase hat die 3'-Hydroxy-*N*-methylcoclaurin 4'-*O*-Methyltransferase aus *Coptis japonica*, da sie ebenfalls durch Eisenchlorid, Zink- und Kupferionen gehemmt wird und kein Effekt bei EDTA- oder Magnesiumionen-Zugabe zu sehen ist. Auch die anderen Methyltransferasen in der Tabelle 5 zeigen auffallend viele zweiwertige Kationen als Hemmstoffe, wobei die Metallionen nicht immer dieselbe Wirkung bei verschiedenen Methyltransferasen haben.

#### **4.4. Reinigung der $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase**

Viele der getesteten Reinigungsverfahren führten zu keiner oder wenig Aktivität der POMT nach der Reinigung. Das kann eine Folge von Stabilitätsproblemen während der Reinigung sein, da das Enzym für längere Zeit ungekühlt den Reinigungsprozess durchläuft. Eine andere Möglichkeit ist die Trennung der POMT von anderen im Rohextrakt vorhandenen Substanzen wie anderen Proteinen, die eine stabilisierende Wirkung ausüben können. Ein Entfernen dieser Substanzen bei der Aufreinigung hätte dann eine geringere Stabilität und nach einer kurzen Zeit auch eine niedrigere spezifische Enzymaktivität zur Folge. Bei allen säulenchromatographischen Trennungsmethoden kann die POMT entweder denaturiert werden durch die für den jeweiligen Lauf gewählten Bedingungen oder nicht an das Säulenmaterial binden. Das hätte zur Folge, dass die Aktivität im Durchlauf gefunden werden kann. Es sind aber auch beide Effekte gleichzeitig denkbar, dass also die POMT beim Durchlaufen der Säule deaktiviert wird. Außerdem könnte die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase so gut an ein Säulenmaterial binden, dass sie nicht mehr abgelöst werden kann. Solche Effekte sind bekannt, wobei es denaturierende Reagenzien gibt, mit denen man die irreversibel gebundenen Proteine doch von dem Säulenmaterial spülen kann, auch wenn die Aktivität dann verloren ist.

Für die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase konnte keine gute Aufreinigung erzielt werden. Bei der Erstellung eines Reinigungsprotokolls konnte gezeigt werden, dass von den eingesetzten 1860 pkat nur noch eine Aktivität von 150 pkat wiedergefunden werden konnte. Das entspricht nur 8 % der Anfangsaktivität. Demgegenüber steht eine Aufreinigung um den Faktor 12,6 von einer spezifischen Aktivität von 7,9  $\mu$ kat/kg vor Beginn der Reinigung bis zu 99,9  $\mu$ kat/kg im letzten Reinigungsschritt, wobei hier noch Verbesserungen erzielt werden könnten, wenn man nur die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität der Methyltransferase vereinigt, was bei der Anionenaustauschchromatographie noch Verbesserungen erwarten lässt. Der Vergleich mit anderen Methyltransferasen in Tabelle 6 zeigt, dass hier weitaus höhere Reinigungsfaktoren von bis zu 5660 und 18615 erzielt werden können. Allerdings gibt es auch Methyltransferasen mit einem niedrigeren Reinigungsfaktor als die beiden oben gezeigten wie die 16-Hydroxytabersonin OMT, die allerdings auch 39-fach aufgereinigt werden kann. Alle verwendeten Säulenmaterialien, die gute

Reinigungsergebnisse erzielt, sind getestet worden und zeigten für die POMT keine so gute Reinigung wie in den jeweiligen Publikationen.

Reinigungsmethoden	Gehalt [%] des letzten Reinigungsschrittes	Maximale Aufreinigung (-fach)	Methyltransferase	Pflanze	Literatur
Ammoniumsulfatfällung (40-80 % Sätt.) Q-Sepharose FF Ammoniumsulfatfällung (80 % Sätt.) SAH-EAH-Sepharose	8	12,6	$\beta$ -Peltatin 6-OMT	<i>Linum nodiflorum</i>	Diese Arbeit
DEAE-Sepharose Phenyl-Sepharose TSK Fraktogel SAH-AH-Sepharose Mono Q	5	383	3'-Hydroxy-N-methyl-(S)-cocclaurin-4'-OMT	<i>Berberis koetianeana</i>	Frenzel und Zenk 1990
Ammoniumsulfatfällung Dialyse DEAE-Sepharcel SAH-Sepharose 4B	40	47	(R,S)-Norcocclaurin OMT	<i>Thalictrum tuberosum</i>	Frick und Kutchan 1999
Ammoniumsulfatfällung Phenyl-Agarose Affinitätschromatographie (Daidzein-Sepharose 6B)	11,2	1695	Isoflavon OMT	<i>Medicago sativa</i>	He und Dixon 1996
Ammoniumsulfatfällung (85 % Sätt.) Gelfiltration (G-100) Adenosin-Agarose Anionenaustausch (PP-Q) Gelfiltration Superdex 75	0,3	1025	KI/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S-MT	<i>Brassica oleracea</i>	Attieh et al. 1995
Ammoniumsulfatfällung (30 – 75 % Sätt.) Sephadex G-25 SP-Toyopearl 1650 C Q-Sepharose FF BioGel HTP Phenylsepharose Superdex 220 pg Mono P Superose 12	5,7	354	Scoulerin-9-OMT	<i>Coptis japonica</i>	Sato et al. 1993

Reinigungsmethoden	Gehalt [%] des letzten Reinigungsschrittes	Maximale Aufreinigung (-fach)	Methyltransferase	Pflanze	Literatur
Dowex Sephadex G-100 DEAE-Sephacel Mono Q Adenosin-Agarose	unter 5	5660	5-Hydroxyferulasäure-OMT	<i>Brassica oleraceae</i>	De Carolis und Ibrahim 1989
Ammoniumsulfatfällung (35 – 70 % Sätt.) DEAE-Toyopearl SAH-Sepharose Shim-pack DEAE	1,9	332	Norcochlorin 6-OMT	<i>Thalictrum minus</i>	Hara et al. 1995
Ammoniumsulfatfällung (20 – 80 % Sätt.) DEAE-Cellulose SAH-EAH-Sepharose Sephacryl S-200 Mono P	0,2	433	Flavonoid 3`-OMT	<i>Trillium apetalon</i>	Nakamura et al. 1999
Ammoniumsulfatfällung (60 – 85 % Sätt.) Sephadex G-100 Adenosin-Agarose Protein Pak Q I Superdex-75 Protein Pak II	0,55 – 4,8 (je nach Isoform)	2854 – 18615 (je nach Isoform)	Thiol MT	<i>Brassica oleracea</i>	Attieh et al. 2000
Ammoniumsulfatfällung (30 – 60 % Sätt.) (60 – 80 % Sätt.) DEAE Sepharose Adenosin-Agarose	1,2	39,5	16-Hydroxytabersonin OMT	<i>Catharanthus roseus</i>	Cacace et al. 2002

Tabelle 6: Reinigungsprotokolle verschiedener Methyltransferasen im Vergleich, Sätt.: Sättigung , MT: Methyltransferase, OMT: *O*-Methyltransferase

Aus den gezeigten Reinigungsprotokollen kann ein gemeinsames Prinzip abgeleitet werden. Als erster Reinigungsschritt wird meist eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Danach folgt eine Anionenaustauschchromatographie (DEAE, Q-Sepharose oder Protein Pak) oder eine Gelfiltration (Sephadex G-100 / G-25). Anschließend wird in fast allen Protokollen eine Affinitätssäule zur weiteren Aufreinigung verwendet (SAH-EAH-Sepharose oder Adenosin-Agarose). Wenn hier noch kein ausreichender Reinigungseffekt zu sehen ist und die Gesamtaktivität noch weitere Reinigungsschritte erlaubt, können nun noch weitere Anionenaustauschsäulen und Gelfiltrationsschritte folgen. Insofern wurde die POMT nach einem allgemeinüblichen Protokoll aufgereinigt, es wurde jedoch ein

unterdurchschnittlicher Reinigungsfaktor erhalten. Die Auftrennung der aufgereinigten Fraktionen nach der SAH-EAH-Sepharose auf einem SDS-Polyacrylamidgel zeigt noch einige Proteinbanden. Es konnte also noch keine Reinigung zur Homogenität erreicht werden.

## **4.5. Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Linum nodiflorum***

### **4.5.1. Mediumsparameter**

Volumen des Mediums, dessen pH-Wert, die Leitfähigkeit und der Zuckergehalt zeigen für Suspensionskulturen übliche Verläufe (Kim 2002, Schmitt 2000). Die Leitfähigkeit sinkt ab, bis die Zellen vermehrt absterben, nimmt dann aber wieder zu, da Zellinneres freigegeben wird.

Der Zuckergehalt im Medium zeigt eine vollständige Aufnahme nach 7 Tagen an, hier ist der Zucker als Kohlenstoffquelle für die Zellen verbraucht. Vergleicht man diesen Zeitraum mit dem Wachstum und Frischgewicht der Zellen, so fällt auf, dass auch die Zellmasse nach 7 Tagen ihren Maximalwert erreicht hat und anschließend abnimmt. Es lässt sich also nachvollziehen, dass der Zuckergehalt und das Überleben der Zellen direkt miteinander zusammen hängen. Um so verwunderlicher ist auf den ersten Blick die erneute Zunahme des Brechungsindex, der den Zuckergehalt, aber auch andere lichtbrechende Substanzen erfasst. Waren diese lichtbrechenden Substanzen bei hohem Zuckergehalt noch mengenmäßig vernachlässigbar, bestimmen sie in der Phase der Zellyse den Wert maßgeblich mit.

Vergleicht man die im Medium befindlichen Ionen über den Kulturverlauf, so fällt auf, dass Phosphat schon nach einem Tag aus dem Medium aufgenommen wurde. Ammonium als Stickstoffquelle ist nach einem Tag bereits zur Hälfte aus dem Medium in die Zellen aufgenommen worden. Nach dem vierten Kulturtag kann man kein Ammonium mehr im Medium finden. Am langsamsten nehmen die Zellen Nitrat aus dem Medium auf, hier bleibt über den gesamten Kulturverlauf etwas im Medium messbar. Ab dem zwölften Kulturtag können wieder Phosphat- und Nitrationen im Medium gefunden werden. Sie werden beim Absterben der Zellen wieder freigesetzt. Erstaunlicherweise findet man mehr Phosphat als mit dem Medium zugefüttert wurde. Die Zellen besitzen also gute Phosphatspeicher, die nach dem Lysieren mit erfasst werden können. Für die Phosphatspeicherung wird Phosphat an den Zuckeralkohol Inosit gebunden und bildet die Phytinsäure. Nitrat kann als Stickstoffquelle nicht gut von den Zellen umgesetzt werden. Im Vergleich zum vorher eingesetzten Nitrat können 63 % (20 von 32 mM) wieder im Medium gefunden werden, wenn die Zellen abgestorben sind. Anders ist es bei Ammonium, das sehr schnell aufgenommen und umgesetzt werden kann. Nach der Zellyse findet sich kein Ammonium mehr im Medium. Der Vorteil der schnellen Aufnahme von Ammoniumionen als Stickstoffquelle ist auch für viele Mycorrhiza-Typen bekannt. Bei diesen Symbiosen zwischen Mycorrhiza-Pilz und Pflanze

stellt der Pilz der Pflanze Ammoniumionen als Stickstoffquelle zur Verfügung und wird dafür mit Nährstoffen von der Pflanze versorgt (Madigan et al. 2001).

#### **4.5.2. Enzymaktivität der $\beta$ -Peltatin 6-O-Methyltransferase**

Die Enzymaktivität der POMT startet relativ hoch, sinkt dann aber erst einmal ab, bis sie am sechsten Kulturtag wieder steigt, während der Proteingehalt über die ersten sechs Tage mit ca. 2,5 mg/ml gleich bleibt und danach langsam absinkt. Ab dem 9. Kulturtag pendelt sich der Proteingehalt bei 0,5 mg/ml ein, die Enzymaktivität sinkt nach dem siebten Tag bis sie ab dem 13. Kulturtag nicht mehr nachweisbar ist. Das ist nachvollziehbar, da die Zellen in der Zeit des Wachstums und der Produktion vieler Primär- und Sekundärstoffe viele Proteine benötigen, deren Synthese aber in einer Phase der Nährstoffknappheit keinen Sinn mehr für die Zelle macht. So werden zunächst viele Proteine für den Primärstoffwechsel benötigt und von den Zellen synthetisiert, nach einigen Tagen werden dann auch die Enzyme und sonstigen Proteine für den Sekundärstoffwechsel gebildet, zu denen die POMT gehört. Da auch Sterbeprozesse von Proteinen geleitet werden und nicht alle Zellen der Kultur gleichzeitig absterben, sinkt der Proteingehalt nicht auf null zurück, sondern stagniert bei einem niedrigen Gehalt von 0,5 mg Gesamtprotein pro ml Enzymextrakt.

#### **4.5.3. Vergleich der Lignane in den Zellen und im Medium**

Die in den Zellen und im Medium gefundenen Lignane wurden schon in den Kapiteln 3.3.3.1. (Lignane in den Zellen) und 3.3.3.2. (Lignane im Medium) beschrieben. Um den Verlauf des Lignangehaltes richtig beurteilen zu können, sollten beide Auswertungen berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck wurden für ausgewählte Lignane der Gehalt im Medium und in den Zellen nebeneinander gestellt und verglichen.

Betrachtet man den Gehalt an Pinoresinol in Abbildung 67 so fällt auf, dass das Lignan zu Anfang nur in den Zellen, später nur noch im Medium vorkommt. Trotzdem kann man das Minimum zwischen beiden Kurven nur teilweise durch Freiwerden des Lignans bei der Zellyse erklären.

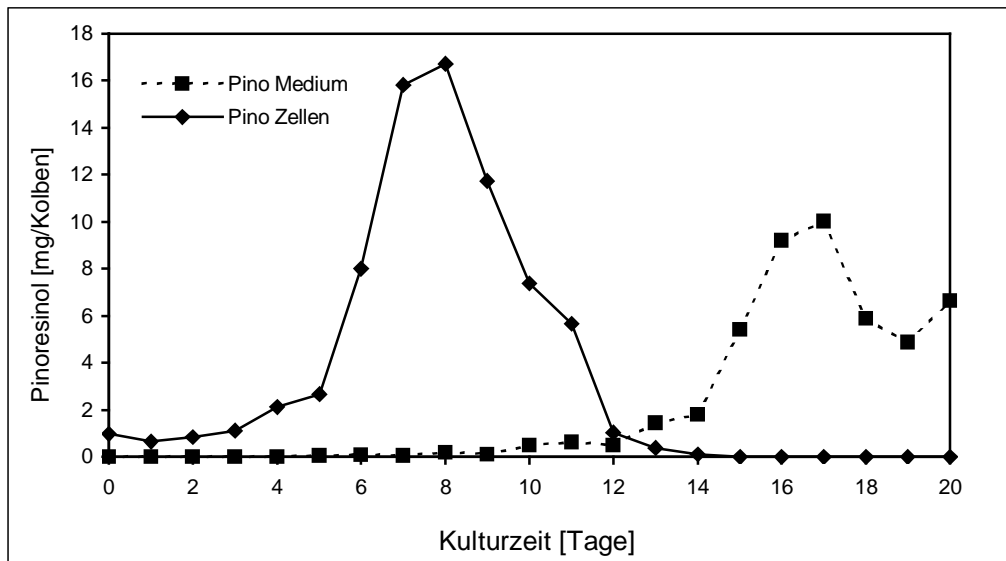


Abb. 67: Vergleich des Pinoresinolgehaltes aus Zellen und Medium.

Auch Desoxypodophyllotoxin als Vorstufe für Podophyllotoxin und  $\beta$ -Peltatin zeigt in Abbildung 68 zunächst einen Anstieg im Gehalt des Lignans in den Zellen und erst danach im Medium. Das freiwerdende DOP kann also im Medium wiedergefunden werden. Der unverhältnismäßig hohe Datenpunkt am 11. Kulturtag ist wahrscheinlich eher ein Messfehler als ein tatsächlicher Anstieg des Lignans im Medium zu diesem Zeitpunkt des Kulturverlaufs.

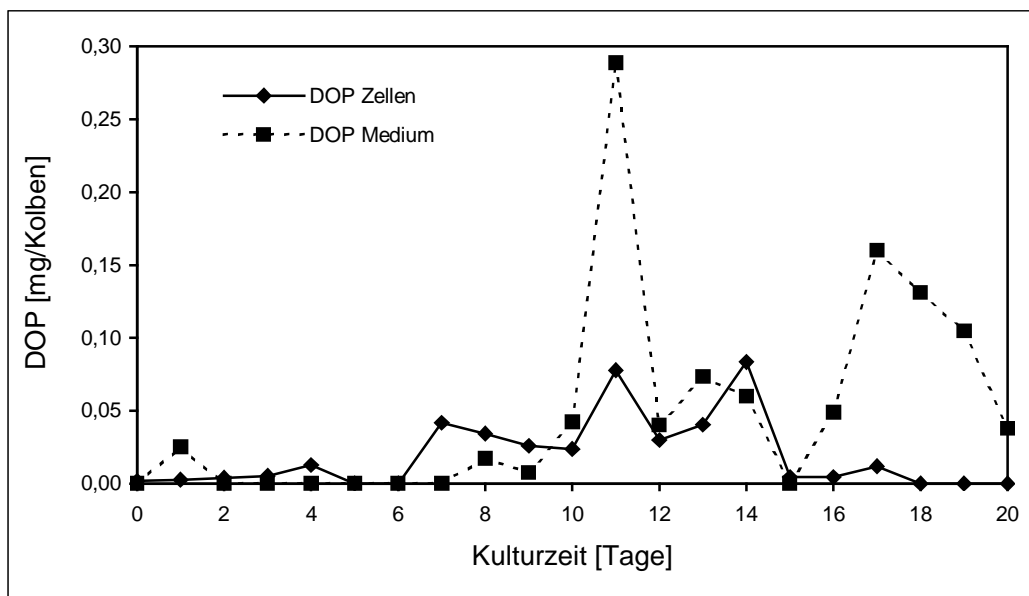


Abb. 68: Verlauf des Lignans DOP in den Zellen und dem Medium über einen Zeitraum von 20 Tagen.

$\beta$ -Peltatin kann nach der Abnahme in den Zellen im Medium in ähnlich hoher Menge wiedergefunden werden (Abbildung 69). Weder in den Zellen noch im Medium konnten nennenswerte Mengen an den beiden Reaktionsprodukten PAM und 6-MPTOX gefunden werden. Es liegt also nahe, dass  $\beta$ -Peltatin nicht weiterreagiert hat und so in den Zellen bzw.

nach deren Lyse im Medium zu finden ist. Diese Tatsache spricht für eine sehr langsam und schlecht arbeitende POMT während dieser Charakterisierung.

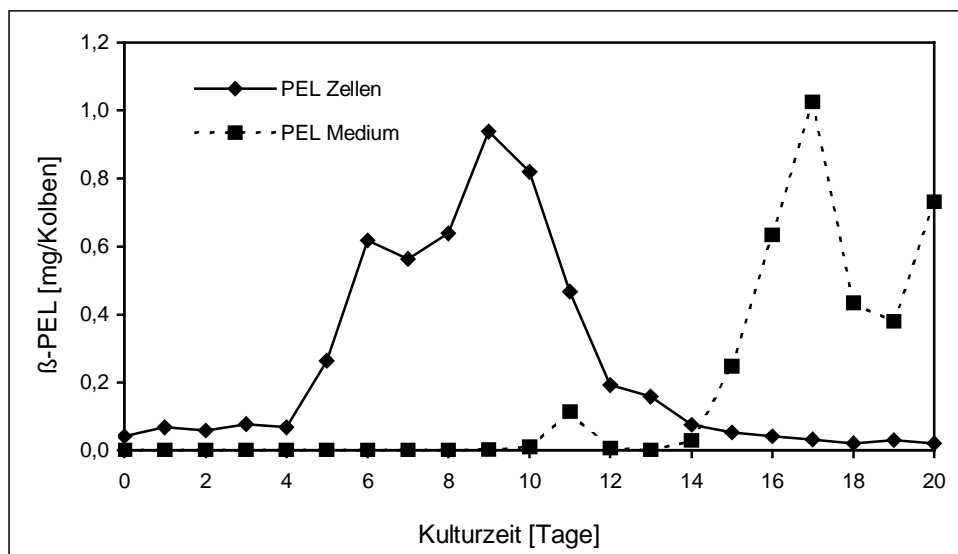


Abb. 69: β-Peltatin im Vergleich von Zellen und Medium über einen Zeitraum von 20 Tagen.

#### 4.6. Fütterungsversuch mit [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure

Wie in Kapitel 3.4.2. gezeigt werden konnte, findet kein Einbau von [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure in Lignane aus *Linum nodiflorum* statt. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Zellen die markierte Vorstufe nicht aus dem Medium aufnehmen können. HPLC-Untersuchungen des Mediums haben aber gezeigt, dass hier keine [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure mehr nachgewiesen werden kann. Außerdem kann markierte MDCA nach der Lignanextraktion in den Zellen wiedergefunden werden. Das schließt auch eine Zerstörung des Moleküls im Medium oder bei der Aufnahme aus dem Medium in die Zellen aus.

Eine zweite Möglichkeit für den fehlenden Einbau könnte sein, dass MDCA generell nicht in die untersuchten Lignane eingebaut werden kann. Bei der Methylenedioxyzimtsäure handelt es sich nicht um eine aus dem Lignanbiosyntheseweg bekannte Vorstufe der Lignane, sondern um eine Substanz, die eventuell von den Enzymen umgesetzt werden könnte. Radeke (2002) und Seidel et al. (2002) konnten allerdings für *Linum album* einen Einbau von MDCA in Podophyllotoxin messen. Da in *Linum nodiflorum* aber kein Einbau in 6-Methoxypodophyllotoxin gefunden werden kann, sollte der Versuch noch einmal mit einer markierten Substanz wiederholt werden, von der ein Einbau in 6-MPTOX gezeigt werden konnte. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, auch einen möglichen Einbau in unterschiedliche Lignane beobachten zu können und damit dann gültige Aussagen über Zwischenstufen des Syntheseweges zu treffen. Für diesen erneuten Fütterungsversuch würde sich markierter Coniferylalkohol anbieten. Hier sollten auch die Lignane mit doppeltem Einbau [M+2] zu finden sein, da Lignane aus zwei Einheiten Coniferylalkohol bestehen.

Seidel et al. (2002) konnten einen Einbau von [2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Ferulasäure in Podophyllotoxin, aber auch in Desoxypodophyllotoxin feststellen, das die Vorstufe zu Podophyllotoxin, aber auch zu β-Peltatin und damit am Syntheseweg zu 6-MPTOX beteiligt ist. Diese Fütterungsversuche wurden an Suspensionskulturen von *Linum album* unternommen. Allerdings kann hier ebenfalls ein Einbau von [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure in Podophyllotoxin gezeigt werden, wobei auch hier nur ein einfacher Einbau stattfand und [M+1] gefunden werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass hier sowohl Ferulasäure als auch Methyldioxy-Zimtsäure als Substrat akzeptiert werden. Für die markierte Ferulasäure konnte auch ein Einbau von zwei Einheiten markierter Ferulasäure gefunden werden.

Fütterungsversuche von [8-<sup>14</sup>C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure mit *Podophyllum hexandrum* zeigten einen Einbau von 1,3 % der Substanz in Podophyllotoxin (Jackson und Dewick 1984). Ebenfalls in *Linum album* Suspensionskulturzellen wurde ein Einbau von [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure in Podophyllotoxin erneut festgestellt, wobei auch hier nur der einfache Einbau (M+1), nicht aber der mögliche doppelte Einbau der markierten Vorstufe festgestellt wurde (Radeke 2002). Die Markierung befindet sich bei beiden Publikationen (Seidel et al. 2002, Radeke 2002) im oberen Teil des Podophyllotoxins, die Vorstufe wird daher wahrscheinlich komplett eingebaut und nicht vor dem Einbau verändert oder gespalten. Der genaue Syntheseweg ist noch immer ungeklärt, weitere Fütterungsversuche sind also zur Aufklärung nötig.

## **4.7. Klonierung und Expression einer Methyltransferase aus *Linum nodiflorum***

### **4.7.1. Herstellung der degenerierten Primer**

Mit den Methyltransferase-spezifischen Sequenzmotiven, die Ibrahim et al. (1998) zeigen konnten, standen die nötigen Informationen für die Herstellung spezifischer Methyltransferase-Primer zur Verfügung. Dumas et al. (1992) entwickelten Primer gegen die SAM-Bindestelle (Motiv I) und eine konservierte Region, die an der Deprotonierung des Substrates beteiligt ist. Diese Primer wurden von Frick und Kutchan (1999) weiter verbessert und in dieser Arbeit verwendet. Der Umstand, dass die Primer gegen hochkonservierte Bereiche der Methyltransferasen gerichtet sind, hat den Vorteil, dass Methyltransferase-Sequenzen gefunden werden können, die noch nicht bekannt sind. Für die Herstellung spezifischer Primer bräuchte man Informationen über die Aminosäuren- oder noch besser die cDNA-Sequenz der Methyltransferase. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass in den pflanzlichen Zellen sehr viele Methyltransferasen vorkommen und nur bedingt gesteuert werden kann, welche davon über PCR vermehrt werden. Eine Möglichkeit der Steuerung ist bei Methyltransferasen, die elicitiert werden können, die Behandlung der Zellen mit dem Elicitor vor der Isolierung der RNA. Nach Elicitierung sollte ein größerer Teil der isolierten mRNA aus induzierter Methyltransferase-RNA bestehen. Dieses Vorgehen garantiert nicht



die Amplifizierung einer bestimmten Methyltransferase, erleichtert aber die Suche nach wenig transkribierten Methyltransferasen, wie sie für Sekundärstoffe häufig vorkommen. Leider standen für die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase keine Elicitoren zur Verfügung, so dass auf diese Steuerungsmöglichkeit verzichtet werden musste. Da keine Informationen zur Aminosäuresequenz der POMT vorlagen, musste mit der unsicheren Methode mit den degenerierten Primern gegen die konservierten Regionen gearbeitet werden.

Die zweite Möglichkeit, die Aussicht auf Erfolg für eine bestimmte Methyltransferase zu erhöhen, besteht im Zeitpunkt der RNA-Isolierung. Wird hier ein Zeitpunkt abgepasst, an dem die Synthese der gewünschten Sekundärstoffe anzusteigen beginnt, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Enzyme ihrer Biosynthese in der Pflanzenzelle vermehrt gebildet werden und damit besonders viel messenger RNA in den Zellen vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden Zellen von *Linum nodiflorum* am sechsten Kulturtag, einen Tag vor dem Erreichen der höchsten spezifischen Aktivität der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase, geerntet. Auch dieser Eingriff steuert nur ein wenig die Menge der isolierten POMT-mRNA an der Gesamt-RNA. Die Wahrscheinlichkeit, dass viele Methyltransferasen gefunden werden, die nicht  $\beta$ -Peltatin methylieren, ist nach wie vor groß.

#### **4.7.2. Datenbankvergleich der beiden gefundenen Methyltransferase-sequenzen**

Nach dem Datenbankvergleich mit den beiden cDNA-Fragmenten der gefundenen Methyltransferasen war die Wahrscheinlichkeit hoch, mit MT1 eine Kaffeesäure-Methyltransferase und eine Methyltransferase mit unbestimmtem Substrat (MT2) gefunden zu haben. Allerdings konnte bei Versuchen zum Austausch einzelner Aminosäuren in exprimierten Methyltransferasen gezeigt werden, dass schon sehr kleine Änderungen am Protein eine andere Substratspezifität der Methyltransferase zur Folge haben können. So konnten Gang et al. (2002) in Basilikum an Kristallstrukturen zeigen, dass schon ein Unterschied von einer Aminosäure in der Substratbindetasche (Phe-260 in der Chavicol *O*-Methyltransferase und das entsprechende Ser-261 in der Eugenol *O*-Methyltransferase) unterschiedliche Substratspezifität und damit unterschiedliche Methyltransferasen hervorrufen kann. Dieses Ergebnis unterstreichen die Versuche von Wang und Pichersky (1999), nach denen durch den Austausch von Asn-134 durch Alanin aus der Isoeugenol *O*-Methyltransferase eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase in *Clarkia breweri* generiert werden konnte. Auch Kota et al. (2004) und Zubieta et al. (2001) zeigten, wie der Austausch einzelner Aminosäuren in der Substratbindetasche die Substratspezifität verändern kann.

Demzufolge können aus einer hohen Ähnlichkeit zwischen einzelnen Methyltransferasen noch nicht automatisch Rückschlüsse auf das akzeptierte Substrat gezogen werden. Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass erst die Expression der Vollängensequenz einen

Aufschluss über die akzeptierten Substrate geben könnte und mit der MT1 nicht zwangsläufig eine Kaffeesäure-Methyltransferase gefunden wurde.

### 4.7.3. Verlängerung der cDNA zu einer Vollängensequenz von MT1

Der Versuch, die bekannten Teilsequenzen zu verlängern, hat nur bei MT1 zu einem Vollängenklon geführt, für die zweite Methyltransferase konnte kein Klon erzeugt werden. Das könnte an der kurzen Sequenz liegen, die bekannt war. Für die RACE-Methode müssen vier Primer generiert werden, die möglichst spezifisch sein sollen, aber nicht zu dicht nebeneinander liegen dürfen. Bei einer bekannten Sequenz von nur 300 Basenpaaren von MT2 hat diese Vorgabe zu einigen Problemen geführt. Viele der möglichen Primer waren nicht spezifisch genug und hätten, da die Ähnlichkeiten der beiden gefundenen Methyltransferase-cDNAs untereinander sehr groß war, an beide Fragmente binden können. Für die Verlängerung der bekannten cDNA-Sequenz sollte der verwendete Primer aber möglichst spezifisch sein.

Für MT1 konnte eine Sequenz über die volle Länge von 1095 Basen (entspricht 365 Aminosäuren) gefunden werden. Die Aminosäuresequenz ist in Abbildung 70 gezeigt.

M G S A P	E T Q M T P T V V S D E E A N L F A M Q L A S A S V	31
L P M V L K S A L E L D L L E I I S K A G P G A Y L S P S D I		62
A A Q L H T K N P E A P D M L D R I C R L L A S Y S V L T C S		93
V Q T L P N G A V Q R L Y A P P L S A S P H Q E R G R V S I A		124
A L A L M N Q D K V L M E S W Y H L K D A V L D G G I P F N K		155
A Y G M T A F E Y H G T D P R F N K V F N K G M S D H S T I T		186
M K K L L E S Y T G F D G L E S	L V D V G G G T G	217
L S K H P S I K	G I N F D L P H V	248
G D M F	A S V P S G D A I F M K W	279
K N C Y E	A L P A K G K V I V	310
N V V H I D C I M L A H N P	G G K E R T	341
G F K G F K V L C S A X N T Y V M E F	L K T A A	365

Abb. 70: Aminosäuresequenz der MT1, gelb unterlegt sind die konservierten Motive nach Ibrahim et al. (1989), in roter Fettschrift sind die konservierten Regionen nach Joshi und Chiang (1989) dargestellt, blau unterlegt sind die Aminosäuren, die von den Primern für die Vollängen-PCR codiert werden..

Wie man es für eine pflanzliche Methyltransferase erwartet, finden sich die konservierten Regionen nach Joshi und Chiang (1989) und Ibrahim et al. (1989) wieder, von denen ein Primer abgeleitet wurde. Sie befinden sich im hinteren Teil der kompletten Sequenz. Nach Joshi und Chiang (1998) liegen zwischen den Motiv A und B (in Abbildung 70 rot dargestellt) in der zweiten magnesiumunabhängigen Gruppe von Methyltransferasen 50 Aminosäuren. In der Sequenz von MT1 sind dies 43 zwischen dem Ende des Motivs A bis zum Anfang des Motivs B. Ferner sollte der Abstand zwischen den Motiven B und C 30 Aminosäuren betragen. Mit 30 Aminosäuren liegt die MT1 genau im erwarteten Bereich.

Auch die Länge der gefundenen Methyltransferase ist mit anderen Methyltransferasen vergleichbar. Die Methyltransferasen, die kein Magnesium als Cofaktor benötigen, haben zwischen 344 und 383 Aminosäuren. Die Tabelle 7 enthält eine Aufstellung der Methyltransferasen mit hoher Ähnlichkeit (ca. 80 %) zu MT1 und deren Molekulargewicht. Dabei fällt auf, dass alle Methyltransferasen eine sehr ähnliche Größe bezüglich des offenen Leserasters haben. Die Gensequenz kann nicht bestimmt werden, da ja nur die mRNA aus den Zellen isoliert wurde und nicht das Gen mit seinen nicht codierenden Bereichen. Außerdem akzeptieren die Methyltransferasen mit einer Ähnlichkeit von annähernd 80 % im offenen Leseraster alle Kaffeesäure als Substrat. Wie oben bereits gezeigt wurde, ist das aber noch keine Sicherheit dafür, dass auch die MT1 Kaffeesäure umsetzt. Um diese Aussage treffen zu können, mussten erst Tests mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt werden.

Methyltransferase	Pflanze	Substrat	Aminosäuren	Molekulargewicht [Da]	Literatur
OMT 1	<i>Linum nodiflorum</i>	unbekannt	365	39318	Diese Arbeit
3-OMT	<i>Eucalyptus globulus</i>	Kaffeesäure	366	39914,4	Poeydonge et al. 2004
OMT	<i>Fragaria x ananassa</i>	Kaffeesäure	365	39817	Kaldenhoff et al. 2000
3-OMT	<i>Medicago sativa</i>	Kaffeesäure	365	39946	Gowri et al. 1991
3-OMT	<i>Rosa chinensis</i>	Kaffeesäure	365	39727	Cock et al. 2003
3-OMT	<i>Rosa chinensis</i>	Kaffeesäure	365	39669	Wu et al. 2003
OMT	<i>Prunus</i>	Kaffeesäure	365	39762	Garcia-Mas et al. 1995

Tabelle 7: Molekulargewichte und Zahl der Aminosäuren verschiedener Methyltransferasen mit hoher Ähnlichkeit zu MT1.

Die Eingabe der Aminosäuresequenz von MT1 in verschiedene Suchmaschinen aus Expsy ergibt neben dem oben gezeigten Molekulargewicht auch eine Aussage über den Isoelektrischen Punkt, der bei pH 5,4 liegt und eine mögliche Kompartimentierung der Methyltransferase. So kann gezeigt werden, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein cytosolisches Enzym handelt (PSORT), da keine Transmembran-Helices zu finden sind (HMMTOP). Ebenso fehlen Sequenzen, die einen Import in Mitochondrien (MITOPROT) und Chloroplasten (ChloroP) möglich machen. Viele der Enzyme des Sekundärstoffwechsels liegen im Cytosol vor. Nach der Produktion der Produkte können diese dann in Kompartimente zur Lagerung transportiert werden. Bei den Lignanen konnte gezeigt werden, dass sie nach Glucosidierung in der Vakuole gelagert werden (Henges 1999).

#### **4.8. Aufreinigung der heterolog exprimierten Methyltransferase**

Über den Primer wurde in die Sequenz eine Markierung mit sechs Histidin-Resten am 3'-Ende eingefügt. Diese Reste erlauben eine Aufreinigung des exprimierten Proteins über eine Nickelmatrix. Die Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel zeigt, dass in den bakteriellen Proteinextrakten viele Proteine unterschiedlicher Größe vorhanden sind, und die Reinigung damit nötig wird. Theoretisch sollten Bakterien mit Expressionsvektor nur das einklonierte Protein bilden, wenn sie durch IPTG-Zugabe induziert wurden. Auch die nicht-induzierten Proben, in denen eigentlich kein einkloniertes Protein zu finden sein sollte, enthalten jedoch diese Methyltransferase (auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu sehen bei ca. 40 kDa). Dies ist für den pTrc99a-Vektor bekannt. Da natürlich Substrattests mit einem Gemisch vieler Proteine nicht aussagekräftig sind, müssen die bakteriellen Proteine vor der Bestimmung der Aktivität und der akzeptierten Substrate abgetrennt werden. Der Erfolg der Reinigung kann eindrucksvoll auf dem SDS-Polyacrylamidgel in Kapitel 3.5.9. gezeigt werden. Trotzdem ist der Unterschied in der Enzymaktivität zwischen gereinigtem und ungereinigtem Enzym nicht so hoch, wie man es erwarten würde. Auch dieser Umstand ist für Methyltransferasen bereits beschrieben worden, da sie oft während der Aufreinigung denaturieren (M. Hehmann, persönliche Mitteilung). Der Verlust durch die Reinigung entspricht hier ungefähr dem Faktor der Aufreinigung, da vor und nach der Aufreinigung vergleichbare Konzentrationen an methyliertem Produkt gemessen werden konnten. Trotzdem kann nach der Aufreinigung eine Aussage darüber getroffen werden, welche Substrate von der MT1 umgesetzt werden und welche nicht, ohne Einflüsse möglicher störender bakterieller Proteine berücksichtigen zu müssen.

#### **4.9. Suche nach einem geeigneten Substrat für MT1**

Von all den 93 getesteten Substraten wurden nur sieben deutlich durch die MT1 Methyltransferase umgesetzt.  $\beta$ -Peltatin wurde nicht akzeptiert, so dass die MT1 nicht die gesuchte Methyltransferase ist. Das war auch nicht wahrscheinlich, da mit degenerierten Primern eine Vielzahl von Methyltransferasen erfasst wurden. Da nicht für alle Substrate Standardsubstanzen der methylierten Produkte zur Verfügung standen, wurden die Enzymtests mit radioaktivem SAM durchgeführt. Das hat wie auch der Standardenzymtest den Nachteil, dass nur diejenigen methylierten Produkte in der Auswertung erfasst werden, die mit Ethylacetat ausgeschüttelt werden können.

Wie nach den hohen Ähnlichkeiten mit diversen Kaffeesäure-Methyltransferasen nicht anders zu erwarten, wird Kaffeesäure als Substrat von der MT1 akzeptiert. Das Substrat mit dem höchsten Umsatz ist allerdings Daphnetin. Bei Daphnetin handelt es sich um ein Cumarin, das als Substrat einer Methyltransferase aus Roggen beschrieben werden konnte (NDong et al, 2003). Trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass Daphnetin das richtige Substrat für die *O*-Methyltransferase MT1 ist, da in *Linum nodiflorum* keine Cumarine vorkommen (Westcott

und Muir 2003). Die relativ geringen Umsatzraten (nur etwa 30 % im Vergleich zum Umsatz des  $\beta$ -Peltatin in Proben mit Protein aus dem Rohextrakt) legen die Vermutung nahe, dass das richtige Substrat für die Methyltransferase noch nicht gefunden wurde. Man kann nun die akzeptierten Substrate vergleichen und hoffen, dass in *Linum nodiflorum* eine methylierbare Substanz zugeordnet werden kann, die ähnliche Strukturmerkmale besitzt wie die akzeptierten Substrate. Kann eine solche Verbindung ermittelt werden, sollte sie auf Umsatz durch die MT1 getestet werden.

Alle Substrate, die durch die exprimierte MT1 methyliert werden konnten, zeigen strukturelle Ähnlichkeiten. So enthalten alle akzeptierten Substrate einen doppelt hydroxylierten Aromaten und einen größeren Rest in ortho-Stellung (siehe Kapitel 3.5.10.). Die Bindetasche der exprimierten Methyltransferase muss also groß sein.

Bei der Suche nach Strukturen, die eine Ähnlichkeit mit dem am besten umgesetzten Substrat Daphnetin aufweisen und im Lignanbiosyntheseweg vorkommen, konnte Thujaplicatin als mögliches Substrat ermittelt werden. In der Abbildung 71 ist die Formel von Thujaplicatin im Vergleich mit Daphnetin und 5-Hydroxyferulasäure gezeigt. Alle akzeptierten Substrate zeigen die oben genannten deutlichen Gemeinsamkeiten. Die Beteiligung von Thujaplicatin an der Synthese der Aryltetralinlignane in *Anthriscus sylvestris* wird von Sakakibara et al. postuliert, die die Umsetzung von Matairesinol über Thujaplicatin zu Yatein durch Fütterungsversuche mit markierten Vorstufen nachweisen (Sakakibara et al. 2003). Von Xia et al. (2000) wird im Gegensatz dazu ein Syntheseweg über 7-Hydroxymatairesinol postuliert, nach dem Thujaplicatin nicht vorkommen kann, da Matairesinol demnach erst an Position 7 hydroxyliert und erst anschließend am hängenden Ring die Hydroxylierung und Methylierung stattfindet. Xia et al. (2000) haben neben Matairesinol auch 7-Hydroxymatairesinol in *Linum album* und *Podophyllum peltatum* nachgewiesen. Eine Übersicht über den vorgeschlagenen Syntheseweg findet sich auch bei Koulman (2003). Einen Hinweis, dass dieser Syntheseweg aber für *Linum nodiflorum* nicht gültig sein kann, ist die Beschreibung und Charakterisierung der DOP 6-Hydroxylase von Molog et al. (2001). Dieses Enzym dürfte in einem über 7-Hydroxymatairesinol verlaufenden Biosyntheseweg nicht vorkommen. Leider stand Thujaplicatin nicht zur Verfügung, um eine Methylgruppenübertragung durch die MT1 nachzuweisen. Weitere Untersuchungen sollten hier noch durchgeführt werden.

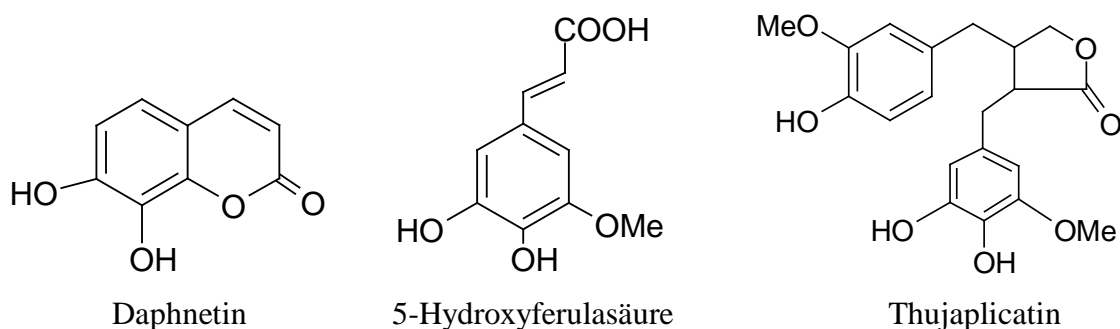


Abb. 71: Substratähnlichkeiten zweier von MT1 akzeptierter Substrate (Daphnetin und 5-Hydroxyferulasäure) und einem möglichen Substrat aus dem Lignansyntheseweg von *Linum nodiflorum* (Thujaplicatin).

#### 4.10. Vergleich der berechneten dreidimensionalen Struktur von MT1 mit anderen Methyltransferasen

Nach der Eingabe der Aminosäuresequenz von MT1 in SWISS MODEL (Peitsch 1995, Guex und Peitsch 1997 und Schwede et al. 2003) kann anhand von Vergleichen mit bekannten Methyltransferasen eine Kristallstruktur berechnet werden. Die in der Einleitung bereits gezeigte Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase, die 2002 von Zubieta et al. publiziert wurde, hat 79 % Ähnlichkeit mit der Aminosäuresequenz von MT1 und eignet sich daher zum Vergleich.

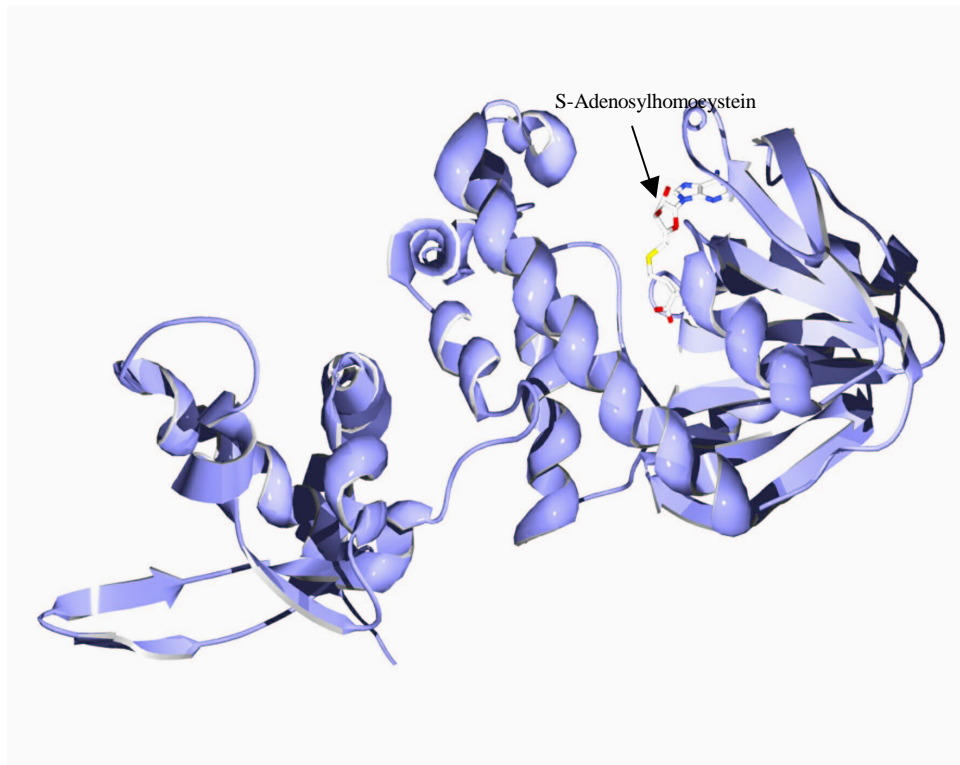


Abb. 72: Berechnete Kristallstruktur von MT1, dargestellt als Monomer, nach einem Vergleich mit der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase (Zubieta et al. 2002), eingezeichnet ist S-Adenosylhomocystein zur Orientierung.

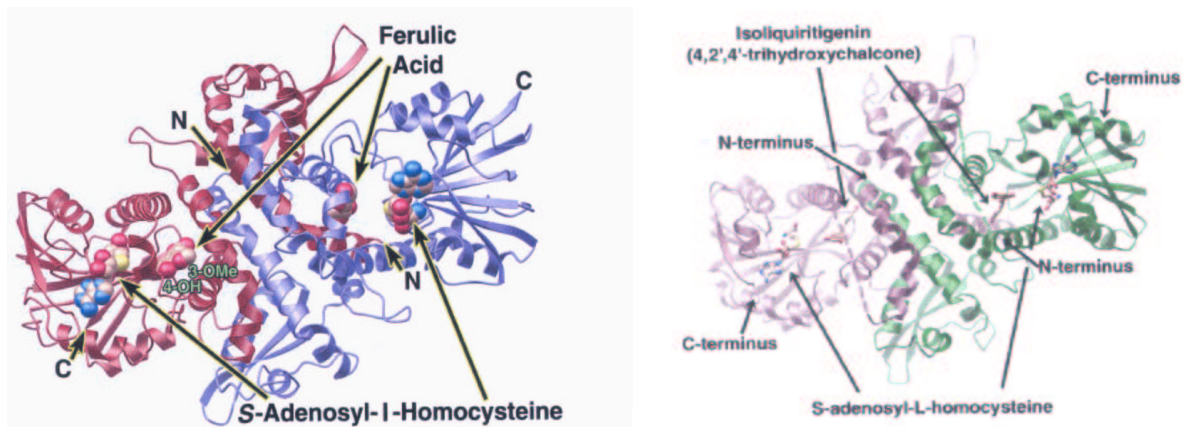


Abb. 73: Gemessene Kristallstrukturen, dargestellt als Homodimere, der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase (Zubieta et al. 2002) links und der Chalcon *O*-Methyltransferase (Zubieta et al. 2001) rechts.

Es wird von der oben gezeigten Methyltransferase MT1 aus *Linum nodiflorum* auch 5-Hydroxyferulasäure methyliert, was schon eine Ähnlichkeit zu der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase anzeigt. Trotzdem ist anzumerken, dass es sich bei der in Abbildung 72 gezeigten Struktur nur um ein berechnetes Modell handelt, das fehlerbehaftet sein kann.

Zwischen den gezeigten Methyltransferasen können deutliche Gemeinsamkeiten gefunden werden. Zur besseren Orientierung wurde ein Molekül S-Adenosylhomocystein in die Bindetasche von MT1 eingefügt, wie es auch in der Struktur der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-*O*-Methyltransferase liegt (Abbildung 73). Obwohl die MT1 nur als Monomer dargestellt wurde, die beiden anderen Methyltransferasen aber als Homodimere, erkennt man die große C-terminale Domäne, die an der SAM-Bindung und der Methylgruppenübertragung beteiligt ist. Dabei fallen besonders die  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf, die die Bindetasche bilden, in die das Substrat gelagert wird. In diese Bindetasche ragt das zweite Monomer des Proteins, das die Bindetasche verengt. Durch Wechselwirkung der  $\alpha$ -Helices beider Monomere bildet sich ein stabiles Rückgrat, das die Rückseite der Bindetasche bildet. Der kleinere N-terminale Teil der Methyltransferase ist für die Bildung der gezeigten Homodimere nötig. Obwohl für die MT1 aus *Linum nodiflorum* nicht bekannt ist, ob sie als Monomer oder Dimer arbeitet, legt der Vergleich mit anderen Methyltransferasen auch hier ein Vorkommen als Dimer aus zwei gleichen Einheiten nahe. Die katalytische Domäne wird aus einer charakteristischen  $\alpha/\beta$ -Faltung gebildet, die eine Ähnlichkeit mit dem Nukleotidmotiv der Alkoholdehydrogenase, der Rossmann-Faltung, besitzt (Vidgren et al. 1994).

Schubert et al. (2003) teilen die Methyltransferasen nach den strukturellen Ähnlichkeiten in neue Klassen ein. Dabei werden fünf unterschiedliche Strukturen gefunden, von denen die erste am häufigsten vorkommt. Sogar innerhalb einer strukturellen Klasse können die Sequenzen eine Ähnlichkeit von nur 10 % besitzen, so dass man anhand der Sequenz nur wenig Aussagen zur Strukturklasse treffen kann. Die oben gezeigten Methyltransferasen gehören alle zur ersten Klasse. Eine Berechnung der Proteinstruktur anhand von Vergleichen mit Methyltransferasen aus anderen Klassen hat keine mögliche Ansage zur räumlichen Anordnung der Tertiärstruktur ergeben, daher gehört die MT1 wohl zur Klasse I. Für die Bindung und Orientierung der Substrate ist in dieser Klasse ein  $Mg^{2+}$ - Ion nötig, wie es in den Methyltransferasen der zweiten Gruppe nach Joshi und Chiang (1998) beschrieben wurde. In den vielen Methyltransferasen, die nicht von Magnesiumionen abhängig sind, übernimmt eine Histidin-Aminosäure der Sequenz die Aufgabe, das Substrat zu positionieren und zu binden (Schubert et al. 2003). Das Vorhandensein unterschiedlicher Strukturen der Methyltransferasen wird von Schubert et al. (2003) durch eigenständige Evolution jeder einzelnen Gruppe erklärt. Anhand der großen strukturellen Ähnlichkeiten mit den Methyltransferasen dieser ersten Gruppe kann also gezeigt werden, dass die exprimierte Methyltransferase in dieselbe Gruppe von Methyltransferasen eingeordnet werden kann. Da



erst wenige Kristallstrukturen von Methyltransferasen bestimmt werden konnten, könnte diese Gruppe später noch weiter aufgeteilt werden.

## 5. Ausblick

Mit der Entdeckung und Charakterisierung der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase wurde ein weiterer Schritt des Lignansyntheseweges geklärt. Der nächste wichtige Schritt wäre nun die Ermittlung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieses Proteins. Mit diesem Wissen kann versucht werden, Kulturen von *Linum nodiflorum* gezielt zu verändern. Durch das Ausschalten der POMT in der Suspensionskultur könnte so die direkte Vorstufe  $\beta$ -Peltatin und durch Einstellen eines Gleichgewichtes auch das Desoxypodophyllotoxin in den Zellen angereichert werden. So veränderte Kulturen sollten einen deutlich höheren Gehalt an Podophyllotoxin aufweisen, welches zur Synthese der Krebstherapeutika Etoposid, Teniposid und Etopophos<sup>®</sup> verwendet wird. Wenn es gelingt, die so gesteuerten Suspensionskulturen im großen Maßstab in Bioreaktoren zu kultivieren, kann eine wirtschaftliche Quelle für Podophyllotoxin angeboten werden. Damit stünde eine praktikable Alternative zu der Wildsammlung von *Podophyllum*-Pflanzen zur Verfügung, was der Arterhaltung zugute käme. Neueste Untersuchungen (Moraes et al. 2004) konnten zwar einen zweifach erhöhten Gehalt an Lignan in *Podophyllum peltatum*-Pflanzen nach Mycorrhiza-Bildung beobachten, diese Untersuchungen wurden aber an intakten Pflanzen durchgeführt. Die Übertragung auf Zellkulturen hat in einem erneuten Absinken des Lignangehaltes resultiert. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass Mycorrhiza-Bildung zu höheren Überlebensraten der Pflanzen führt. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte auch eine Kultivierung der ganzen Pflanzen von *Podophyllum peltatum* und *Podophyllum hexandrum*, sollten sich diese Ergebnisse hierauf übertragen lassen, zur wirtschaftlichen Isolierung von Podophyllotoxin möglich sein.

Eine weitere Voraussetzung, größere Mengen an Podophyllotoxin aus *Linum nodiflorum* zu gewinnen, ist, neben der Kenntnis über die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase, die Charakterisierung der Desoxypodophyllotoxin 7-Hydroxylase, dem Enzym, das Podophyllotoxin bildet, die möglichst hoch reguliert werden sollte. Auch die  $\beta$ -Peltatin-A Methylether 7-Hydroxylase als 6-Methoxypodophyllotoxin bildendes Enzym konnte noch nicht entdeckt und beschrieben werden. Vielleicht ist es irgendwann auch nötig, alternative Grundkörper für die Krebstherapeutika (wie z.B. 6-MPTOX) zu suchen. Dafür wäre eine Anreicherung anderer Lignane in Suspensionskulturen eine gute Voraussetzung. Die Arbeit an den Lignan aus *Linum nodiflorum* bleibt also auch in Zukunft ein interessantes Beschäftigungsfeld.

## 6. Zusammenfassung

Lignane sind im Pflanzenreich weit verbreitete phenolische Sekundärstoffe, von denen Vertreter mit cytotoxischer, antimykotischer und antimikrobieller Wirkung bekannt sind. Das Aryltetralinlignan Podophyllotoxin, das aus *Podophyllum peltatum* oder *Podophyllum hexandrum* gewonnen wird, dient als Ausgangsstoff der semisynthetischen Krebsmedikamente Etoposid, Teniposid und Etopophos<sup>®</sup>. Aber auch in Linaceae ist das Vorkommen von Aryltetralinlignanen, darunter auch Podophyllotoxin, bekannt. An Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Linaceae), in denen 6-Methoxypodophyllotoxin anstatt Podophyllotoxin als Endprodukt der Lignanbiosynthese vorkommt, soll der Syntheseweg der Aryltetralinlignane aufgeklärt werden. Ausgehend von  $\beta$ -Peltatin soll die Methylierung zu  $\beta$ -Peltatin-A Methylether gezeigt werden.

In dieser Arbeit kann die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase (POMT) in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Linaceae) erstmals nachgewiesen und beschrieben werden. Neben einem Enzymtest wird eine HPLC-Methode zur Auswertung etabliert. Die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin (SAM) auf  $\beta$ -Peltatin, wodurch der  $\beta$ -Peltatin-A Methylether gebildet wird. Die Identität des Produkts wird über <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR bestätigt. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum von 40 °C und arbeitet optimal bei einem pH-Wert von 7,5 in 0,1 M Tris-HCl-Puffer. Für  $\beta$ -Peltatin wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von 40  $\mu$ M und für SAM von 15  $\mu$ M bestimmt. Bei Konzentrationen über 250  $\mu$ M  $\beta$ -Peltatin kann eine Substrathemmung beobachtet werden. Als weiteres Produkt der Methylierungsreaktion entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), das auch eine Hemmung der POMT-Aktivität bewirkt. Diese Hemmung ist kompetitiv, kann also durch eine höhere Zugabe von SAM wieder aufgehoben werden.

Die  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase ist nicht abhängig von Magnesiumionen, wie es Caffeoyl-CoA Methyltransferasen sind. Es können keine Cofaktoren, aber Hemmstoffe der POMT-Aktivität gefunden werden. So hemmt Zinksulfat schon in einer Konzentration von 5 mM die POMT-Aktivität komplett. Auch Eisensulfat und Eisenchlorid hemmen in Konzentrationen von 5 mM die Aktivität bis auf 10 % der Ausgangsaktivität. Für Mangansulfat kann eine Hemmung bis auf 35 % bei Konzentrationen von 10 mM ermittelt werden.

Bezüglich der Lagerung ist die POMT bei -70 °C über 25 Wochen stabil, unabhängig von einer Zugabe von 10 % Glycerin.

Über eine Größenausschlusschromatographie kann eine Größe von ca. 64 kDa ermittelt werden. Wie bei den meisten anderen pflanzlichen Methyltransferasen handelt es sich bei der POMT wahrscheinlich um ein Homodimer.

Für die Reinigung der  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-Methyltransferase kann ein Protokoll ermittelt werden, bei dem eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung in einem Bereich von 40–80 % Ammoniumsulfatsättigung, eine Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose, eine zweite Ammoniumsulfatfällung bis 80 % Ammoniumsulfatsättigung und eine Affinitätschromatographie über SAH-EAH-Sepharose aufeinanderfolgen. Damit kann ein Reinigungsfaktor von 12,6-fach erreicht werden, der Verlust der Aktivität liegt allerdings bei 92 %. Auf einem SDS-Polyacrylamidgel können nur noch wenige Proteinbanden nach der Affinitätschromatographie und damit ein deutlicher Reinigungseffekt gezeigt werden.

Die Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* wird über einen Zeitraum von 15 und 20 Tagen in Bezug auf Medienparameter wie Volumen, pH-Wert, Leitfähigkeit, Zuckergehalt und Konzentration an Ammonium, Phosphat und Nitrat beobachtet. Auch die Suspensionszellen können auf Proteingehalt, Enzymaktivität und Entwicklung des Frisch- und Trockengewichts untersucht werden. Aus den Zellen und dem Medium werden Lignane extrahiert und nach Art und Menge bestimmt.

Ein Fütterungsversuch mit [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methyldioxyzimtsäure mit anschließender Auswertung über eine HPLC-MS-Messung soll über einen Einbau der markierten Substanz einen Einblick in den Biosyntheseweg der Lignane geben. Es kann allerdings kein Einbau in die getesteten Lignane festgestellt werden.

Mit degenerierten Primern gegen hochkonservierte Regionen von Methyltransferasen wie der SAM-Bindestelle werden über PCR methyltransferasenspezifische Amplifikate von cDNAs aus 6-Tage alten Zellen von *Linum nodiflorum* isoliert. Die cDNA-Stücke werden in *E. coli* inkloniert und nach Datenbankvergleich mittels der RACE-Methode bis zur kompletten Länge verlängert. Dabei wird die Methyltransferase MT 1 gefunden, die ein offenes Leseraster von 1095 Basen, codierend für ein Protein mit 365 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 39,8 kDa, besitzt. Sie hat bis ca. 80 % Identität mit Kaffeesäure 3-*O*-Methyltransferasen aus verschiedenen Pflanzenarten. Das vollständige offene Leseraster der MT1-cDNA wird in den Expressionsvektor pTrc99a ligiert, und das Protein in *E. coli* JM 109 exprimiert. Das entstehende Protein wird auf Substratspezifität getestet. Dabei wird kein Umsatz von  $\beta$ -Peltatin gemessen. Das exprimierte Enzym setzt Kaffeesäure und seine Derivate um. Der größte Umsatz kann jedoch mit dem Cumarin Daphnetin gemessen werden. Bei den umgesetzten Substraten kann eine gemeinsame Struktur entdeckt werden, die einen doppelt hydroxylierten Aromaten und einen größeren Rest enthält. Eine Substanz aus dem Lignanbiosyntheseweg kann bisher noch nicht sicher zugeordnet werden, da die entsprechenden Substrate nicht verfügbar sind.

## 7. Anhang

### 7.1. Geräteliste

#### Proteinreinigung

Waters 650 Advanced Protein Purification System  
Waters 600 Multisolvent Delivery System  
Waters 484 Tunable Absorbance Detector  
Model 2150 Peak Separator  
Linseis L6512-Schreiber

Waters, Eschborn, D.

ISCO  
Linseis

#### HPLC

HyPURITY Elite C18-Säule, 250 x 4,6 mm, 5 µ  
Hypersil ODS C18-Säule 250 x 8,0 mm, 5 µ  
HPLC-Pump 422  
Detector 430 A  
M490 PC-Integration Peak/2

Hypersil  
Hypersil  
Kontron Instruments, Neufahrn, D

#### Zentrifugen

Sorvall<sup>®</sup> RC 50 plus  
Biofuge 17 RS  
SIGMA 3K30  
Eppendorf Centrifuge 5415D

DuPont, Newton, USA  
Heraeus Sepatech, Osterode, D  
B. Braun Biotech., Melsungen, D  
Eppendorf, Hamburg, D

#### UV-Photometer

UVIKON 930 Spektralphotometer  
Gene Quant Photometer

Kontron Instruments, Neufahrn, D  
Pharmacia, Freiburg, D

#### PCR

RoboCycler Gradient 96

Stratagene, Heidelberg, D

#### Szintillationszähler

1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter

Pharmacia LKB Wallac

#### Konduktometer, pH-Meter, Refraktometer

Accumet Basic pH-Meter  
Conmet Conductivity Meter with ATC  
Handrefraktometer

Fisher Scientific, Nidderau, D  
Hanna Instruments, Kehl a. R., D  
A. Krüss Optic, Hamburg, D

#### LC-MS

Finnigan LCQ/Deca  
Agilent 1100 HPLC-System

ThermoFinnigan  
Agilent

#### NMR

Bruker 400 Ultra Shield™

Bruker BioSpin GmbH

#### Ultraschallprozessor

UV 200 S

Dr. Hielscher GmbH

## **Sonstige**

Vortex-Genie 2

Sonorex Super RK 255 Ultraschallbad

Christ L1 Gefriertrockner

Vakuumpumpe Typ CVC 24

Autoklav

Rotovapor RE 120 Rotationsverdampfer

Bioimager und Software Diana II

Geldokumentationssystem

Joey™ Gel Casting System

Ultra Turrax® T25 basic

Magnetrührer MR 3001

Scientific Instruments,

New Orleans, USA

Bandelin, Berlin, D

B. Braun Biotech., Melsungen, D

Vacuubrand, Wertheim, D

Astell Scientific, Kent, UK

Büchi

Raytest, Straubenhardt, D

RS-Laborgeräte

OWI Scientific

IKA Labortechnik

Heidolph Instr., Schwabach, D

## **7.2. Chemikalien**

### **Reagenzien**

Rotizint® eco plus für hydrophobe Proben

[Methyl-<sup>14</sup>C]-SAM

S-Adenosyl-L-methionin

S-Adenosyl-L-homocystein

Agarose NEEO-Qualität

Ampicillin

Coomassie® Brilliant Blue G 250

Coomassie® Brilliant Blue R 250

Dithiothreitol (DTT)

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)

1-Naphthyllessigsäure (NAA)

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Trichloressigsäure (TCA)

X-Gal

Hefeextrakt

Roth, Karlsruhe, D

Hartmann Analytic

Fluka, Deisenhofen, D

Sigma, Deisenhofen, D

Roth, Karlsruhe, D

Roth, Karlsruhe, D

Fluka, Deisenhofen, D

Fluka, Deisenhofen, D

Biomol, Hamburg, D

Appli Chem, Darmstadt, D

Duchefa, Haarlem, N

Biomol, Hamburg, D

Roth, Karlsruhe, D

Roth, Karlsruhe, D

Duchefa, Haarlem, N

### **Proteine**

Bovines Serumalbumin (BSA)

LMW-Proteine für die Elektrophorese

Molecular Weight Marker Kit für die Gelfiltration

Serva, Heidelberg, D

Amersham Pharmacia Biotech,

Freiburg, D

Sigma, St. Louis, USA

## **Säulenmaterialien**

Affinity Media (Farbsäulen)  
Q-Sepharose Fast Flow

DEAE-Sepharcel

Adenosin-Agarose  
Superdex 200 HR 10/30

Hydroxylapatit  
Fractogel TSK Butyl 650-M  
EAH-Sepharose

Phenylsepharose

His Slurry

## **Enzyme**

*BcuI* (*SpeI*)  
*Cfr42I* (*SacII*)  
*EcoRI*  
*KpnI*

## **Vektoren**

pGem<sup>®</sup>-T Vektor  
pTrc99a

TOPO<sup>®</sup> TA

## **Molekularbiologische Reagenzien**

Revert Aid<sup>™</sup> First strand cDNA Synthesis Kit  
Nucleo Trap<sup>®</sup> Gel Extraction Kit  
Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System  
Roti<sup>®</sup>-Transform  
Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit  
GeneRacer<sup>™</sup> Kit  
dNTP-Mix  
Expand High Fidelity PCR System  
TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit  
Qiaquick<sup>®</sup> spin Säule  
T4-DNA Ligase  
Gene Ruler<sup>™</sup> DNA Ladder Mix

Sigma, St. Louis, USA  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Sigma, Deisenhofen, D  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Merck Darmstadt, D  
Merck, Darmstadt, D  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Novagen, Darmstadt, D

MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D  
Roche Diagnostics, Mannheim, D  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D

Promega, Mannheim, D  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg, D  
Invitrogen, Carlsbad, USA

MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D  
Clontech, Heidelberg, D  
Promega, Mannheim, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Qiagen, Hilden, D  
Invitrogen, Carlsbad, USA  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D  
Roche Diagnostics, Mannheim, D  
Invitrogen, Carlsbad, USA  
Qiagen, Hilden, D  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D

Alle sonstigen Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern (Fluka, Sigma, Merck, Roth) in den Qualitäten p.A. oder reinst bezogen. Die Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße oder Petrischalen wurden von der Firma Greiner verwendet.

Die Reagenzien für die Substrattests wurden aus der Laborsammlung verwendet.

### 7.3. Internetadressen

Nummerierung der Lignane:	<a href="http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/lignan">http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/lignan</a>
Schmelzpunktberechnung Primer	<a href="http://www.mwg-biotech.com">http://www.mwg-biotech.com</a>
FASTA-Datenbank zum Sequenzvergleich	<a href="http://www.ebi.ac.uk/fasta33">http://www.ebi.ac.uk/fasta33</a>
Aufspüren von Schnittstellen	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.pHp">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.pHp</a>
Übereinanderlegen ähnlicher Sequenzen	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html">http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html</a>
Übersetzung DNA in Aminosäuren	<a href="http://us.expasy.org/tools/dna.html">http://us.expasy.org/tools/dna.html</a>
Massenbestimmung/Isoelektr. Punkt	<a href="http://au.expasy.org/tools/peptide-mass.html">http://au.expasy.org/tools/peptide-mass.html</a>
Überprüfung Lokalisationsort Cytosol	<a href="http://www.psort.org">http://www.psort.org</a>
Transmembrane Bereiche	<a href="http://enzim.hu/hmmtop">http://enzim.hu/hmmtop</a>
Eindringmöglichkeit in Mitochondrien	<a href="http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/prog/medgen/mitofilter">http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/prog/medgen/mitofilter</a>
Eindringmöglichkeit in Chloroplasten	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP</a>
Erstellung 3D-Struktur	<a href="http://www.expasy.org/swissmod/SWISSMODEL.html">http://www.expasy.org/swissmod/SWISSMODEL.html</a>

### 7.4. Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
6-MPTOX	6-Methoxypodophyllotoxin
A	Absorption
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAD	Cinnamylalkohol Dehydrogenase
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA <i>O</i> -Methyltransferase
CCR	Cinnamoyl-CoA Reduktase
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CITES	Convention for International Trades in Endangered Species
CMT	<i>C</i> -Methyltransferase
CoA	Coenzym A
COMT	Catechol <i>O</i> -Methyltransferase

COMT	Kaffeensäure <i>O</i> -Methyltransferase
CPGN	Commission of Plant Gene Nomenclature
Da	Dalton
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOP	Desoxypodophyllotoxin
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Electrospray Ionisation
FG	Frischgewicht
g	Gramm
GSP	Genspezifischer Primer
h	Stunden (hours)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kat	Katal
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LC-MS	Liquid Chromatography gekoppelt mit Massenspektroskopie
LMW	Low Molecular Weight-Marker (Marker niedriger Molekularmassen)
M	molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MDCA	[2- $^{13}$ C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure
Metol	4-(Methylamino)-phenolsulfat
min	Minute
MJ	Methyljasmonat
$M_r$	relative Molekularmasse
mRNA	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
MS-Li	Medium für <i>Linum</i> -Kulturen
NAA	$\alpha$ -Naphthylessigsäure
NADH	Nicotinamid Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie



NMT	<i>N</i> -Methyltransferase
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
PAM	β-Peltatin-A Methylether
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PEL	β-Peltatin
Pino	Pinoresinol
POMT	β-Peltatin 6- <i>O</i> -Methyltransferase
PTOX	Podophyllotoxin
RACE	Rapid amplification of cDNA ends (Verlängerung von cDNA-Enden)
RBS	Ribosomenbindestelle
rc	revers komplementär
RE	Proteinrohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SAH	<i>S</i> -Adenosyl- <i>L</i> -homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl- <i>L</i> -methionin
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SMT	<i>S</i> -Methyltransferase
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

## **7.5. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide**

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

### **Abkürzungen der Nukleotide**

Adenin	A
Cytidin	C
Guanin	G
Thymidin	T
Uracil	U

## 7.6. Literaturverzeichnis

- Adlercreutz H. (1999): Phytoestrogens. State of the art. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7, 201-207
- Akashi T., Sawada Y., Shimada N., Sakurai N., Aoki T., Ayabe S. (2003): cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the leguminose isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol.* 44, 103-112
- Akil M., Kolachana B. S., Rothmond D. A., Hyde T. M., Weinberger D. R., Kleinmann J. E. (2003): Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *J. Neurosci.* 23 (6), 2008-2013
- Alfermann A. W., Dombrowski K., Petersen M. (1994): Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. In: *Methoden der Biotechnologie*, S. 239-260, G. Fischer, Jena, Stuttgart
- Atanassova R., Favet N., Martz F., Chabbert B., Tollier M.-T., Monties B., Frittig B., Legrand M. (1995): Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequence in sense and antisense orientation. *Plant J.* 8, 465-477
- Attieh J. M., Hanson A. D., Saini H. S. (1995): Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *J. Biol. Chem.* 270 (16), 9250-9257
- Attieh J., Sparace S. A., Saini H. S. (2000): Purification and properties of multiple isoforms of a novel thiol methyltransferase involved in the production of volatile sulfur compounds from *Brassica oleracea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 380 (2), 257-266
- Barthlen U. (1983): 12  $\beta$ -Hydroxylierung von  $\beta$ -Methyldigitoxin in Fermenter- und Suspensionskulturen von *Digitalis lanata* – Untersuchungen zur Nährmediumsoptimierung. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Berlin J., Bedorf N., Mollenschott C., Wray V., Sasse F., Höfle G. (1988): On the podophyllotoxins of root cultures of *Linum flavum*. *Planta Medica*, 204-206
- Berlin J., Wray V., Mollenschott C., Sasse F. (1986): Formation of beta-peltatin-A methylether and coniferin by root cultures of *Linum flavum*. *J. Nat. Prod.* 49, 435-439
- Blum H., Beler H., Gross H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
- Bohlin L., Rosén B. (1996): Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. *Drug Discovery Today* 1, 343-351
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Broomhead A. J., Dewick P. M. (1990): Aryltetralin lignans from *Linum flavum* and *Linum capitatum*. *Phytochemistry* 29, 3839-3844

- Broomhead A. J., Rahman M. M. A., Dewick P. M., Jackson D. E., Lucas J. A. (1991): Matairesinol as a precursor of *Podophyllum* lignans. *Phytochemistry* 30, 14 89-1492
- Bugos R. C., Chiang V. L. C., Campbell W. H. (1991): cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.* 17 (6), 1203-1215
- Cacace S., Schröder G., Wehinger E., Strack D., Schmidt J., Schröder J. (2003): A flavonol *O*-methyltransferase from *Catharanthus roseus* performing two sequential methylations. *Phytochemistry* 62 (2), 127-137
- Canel C., Moraes R. M., Dayan F. E., Ferreira D. (2000): Molecules of interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry* 54, 115-120
- Chattopadhyay S., Bisaria V. S., Srivastava A. K. (2003): Enhanced production of podophyllotoxin by *Podophyllum hexandrum* using *in situ* cell retention bioreactor. *Biotechnology Progress* 19, 1026-1028
- Cheng X., Kumar S., Posfai J., Pflugrath J. W., Roberts R. J. (1993): Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74, 299-307
- Chiron H., Drouet A., Claudot A.-C., Eckerskorn C., Trost M., Heller W., Ernst D., Sandermann H. (2000): Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional *O*-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Mol. Biol.* 44, 733-745
- Cho J. Y., Kim A.R., Yoo E. S., Baik K. U., Park M. H. (1999): Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide production, and lymphocyte proliferation. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 1267-1273
- Chu A., Dinkova A., Davin L.B., Bedgar D. L., Lewis N. G. (1993): Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.* 268, 27026-27033
- Cock J. M., Scalliet G., Huguency P. (2002): Characterization of a novel *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene, two major scent components of rose flowers. Unpublished.
- Curir P., Lanzotti V., Dolci M., Dolci P., Pasini C., Tollin G. (2003): Purification and properties of a new S-adenosyl-L-methionine:flavonoid 4'-*O*-methyltransferase from carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Eur. J. Biochem.* 270, 3422-3431
- Dahlqvist S. R., Nordenson I. (1996): Chromosomal changes in rheumatoid arthritis patients treated with CPH82. *Clinical Rheumatology* 15, 584-589
- Dakora F. D., Phillips D. A. (1996): Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Path.* 49, 1-20

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 Physiol.* 123, 453-462

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

Davis P. H. (1970): *Linum*. In: Davis P. H. (ed), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol. 2, Edinburgh University Press, Edinburgh

Dayan F. E., Kuhajek J. M., Canel C., Watson S. B., Moraes R. M. (2003): *Podophyllum peltatum* possesses a  $\beta$ -glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1646, 157-163

De Carolis E., Ibrahim R. K. (1989): Purification and kinetics of phenylpropanoid *O*-methyltransferase activities from *Brassica oleracea*. *Biochem. Cell Biol.* 67, 763-769

De Luca V., Ibrahim R. K. (1985): Enzymatic synthesis of polymethylated flavonols in *Chrysosplenium americanum*. II. Substrate interaction and product inhibition studies of flavonol 3-, 6- and 4'-*O*-methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 238 (2), 606-618

Dinkova-Kostova A. T., Gang D. R., Davin L. B., Bedgar D. L., Chu A., Lewis N. G. (1996): (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 29473-29482

Dumas B., van Doorselaere J., Gielen J., Legrand M., Fritig B., van Montagu M., Inze D. (1992): Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding *O*-methyltransferase from poplar. *Plant Physiol.* 98, 796-797

Empt U., Alfermann A. W., Pras N., Petersen M. (2000): The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans. *J. Appl. Bot.* 74, 145-150

Engler A. (1931): *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. Aufl., Band 19a, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig

Franke R., Humphreys J. M., Hemm M. R., Denault J. W., Ruegger M. O., Cusumano J. C., Chapple C. (2002): The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3'-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* 30, 33-45

Frenzel T., Zenk M. H. (1990): S-Adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine-4'-*O*-methyltransferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. *Phytochemistry* 29 (11), 3505-3511

Frick S., Kutchan T. M. (1999): Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* 17 (4), 329-339

Fuss E. (2004): Lignans in plant cell cultures. *Phytochemistry Reviews*, im Druck

- Gang D. R., Lavid N., Zubieta C., Chen F., Beuerle T., Lewinsohn E., Noel J. P., Pichersky E. (2002): Characterization of phenylpropene *O*-methyltransferases from sweet basil: Facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant *O*-methyltransferase family. *Plant Cell* 14, 505-519
- Garcia-Mas J., Messeguer R., Arus P., Puidomenech P. (1995): The caffeic acid *O*-methyltransferase from *Prunus amygdalus*. *Plant Physiol.* 108, 1341-1341
- Giuliano G., Bartley G. E., Scolnik P. A. (1993): Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5, 379-387
- Gomorri G. (1942): A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 27, 955
- Gowri G., Bugos R. C., Campbell W. H., Maxwell C. A., Dixon R. A. (1991): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). X. Molecular cloning and expression of S-adenosylmethionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. *Plant. Physiol.* 97, 7-14
- Gregersen P. L., Christensen A. B., Sommer-Knudsen J., Collinge D. B. (1994): A putative *O*-methyltransferase from barley is induced by fungal pathogens and UV-light. *Plant Mol. Biol.* 26 (6), 1797-1806
- Guex N., Peitsch M. C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723
- Hänsel P., Sticher O. (2004): *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Springer Verlag, Berlin
- Hara M., Yazaki K., Tanaka S., Tabata M. (1995): S-Adenosyl-L-methionine:norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase from *Thalictrum minus* cell cultures. *Phytochemistry* 38 (5), 1131-1135
- He X.-Z., Dixon R. A. (1996): Affinity chromatography, substrate/product specificity and amino acid sequence analysis of an isoflavone *O*-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 121-129
- Hermann M., Lukačič R., Ekiert H., Matern U. (2004): Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L.. *Eur. J. Biochem.* 271, 932-940
- Henges A. (1999): *Biosynthese und Kompartimentierung von Lignan in Zellkulturen von Linum album*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Ibrahim R. K., Bruneau A., Bantignies B. (1998): Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.* 36, 1-10
- Ibrahim R. K., De Luca V., Khouri H., Latchinian L., Brisson L., Charest P. M. (1987): Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* 26 (5), 1237-1245
- Imbert T. F. (1998): Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 80, 207-222

- Jackson D. E., Dewick P. M. (1984): Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 23, 1147-1152
- Jackson D. E., Dewick P. M. (1984): Biosynthesis of *Podophyllum* lignan-I. Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* 23, 1029-1035
- Jaeck E., Martz F., Stiefel V., Fritig B., Legrand M. (1996): Expression of tobacco class I *O*-methyltransferase in healthy and TMV-infected tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (8), 681-688
- Jianhua W., Huayan Z., Shanfa L., Tai W., Qinghu M., Yanru S. (2001): Cloning of cDNA encoding COMT from Chinese poplar (*Populus tomentosa*), sequence analysis and specific expression. *Acta Botanica Sinica* 43 (3), 326-328
- Johnson B. S., Singh N. K., Cherry J. H., Locy R. D. (1997): Purification and characterisation of glutamate decarboxylase from cowpea. *Phytochemistry* 46 (1), 39-44
- Jordan J., Lipp A., Tank J., Schröder C., Stoofels M., Franke G., Diedrich A., Arnold G., Goldstein D. S., Sharma A. M., Luft F. C. (2002): Catechol-*O*-methyltransferase and blood pressure in humans. *Circulation*, 460-465
- Joshi C. P., Chiang V. L. (1998): Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 37, 663-674
- Judd A. (1995): Flax- Some historical considerations. In: Cunnane S. C., Thompson L. U. (eds), *Flaxseed in Human Nutrition*, S. 1-10, AOCS Press, Champaign
- Kagan R. M., Clarke S. (1994): Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 417-427
- Kamil W. M., Dewick P. M. (1986): Biosynthesis of *Podophyllum* lignans. 3. Biosynthesis of the lignans alpha-peltatin and beta-peltatin. *Phytochemistry* 25, 2089-2092
- Khouri H. E., Tahara S., Ibrahim R. K. (1988): Partial purification, characterization, and kinetic analysis of isoflavone 5-*O*-methyltransferase from Yellow Lupin roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 262, 592-598
- Kim K. H. (2002): Hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) and hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) from suspension cultures of *Coleus blumei*: purification-cloning-expression. Görlich und Weiershäuser Verlag, Marburg
- Kneusel R. E., Matern U., Nikolay K. (1989): Formation of *trans*-caffeoyl-CoA from *trans*-4-coumaroyl-CoA by Zn<sup>2+</sup>-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 455-462
- Konuklugil B. (1996): Aryltetralin lignans from the genus *Linum*. *Fitoterapia* 67 (4), 379-381
- Kota P., Guo D., Zubieta C., Noel J., Dixon R. A. (2004): *O*-Methylation of benzaldehyde derivatives by "lignin specific" caffeic acid 3-*O*-methyltransferase. *Phytochemistry* 65, 837-846

Koulman A. (2003): Podophyllotoxin. Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande

Kranz K., Petersen M. (2003):  $\beta$ -Peltatin 6-*O*-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry* 64, 453-458

Kuhlmann (2003): Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom P450-Enzymen in der Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen in Zellkulturen von *Linum spec.*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

Kuhlmann S., Molog G., Empt U., Van Uden W., Pras N., Alfermann A. W., Petersen M. (2001): Characterisation of deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase (DOP6H), a cytochrome P450-dependent enzyme in lignan biosynthesis of *Linum* species. Traits, tracks and traces. International congress and 49<sup>th</sup> annual meeting of the Society for medical plant research, Kreis W. (ed), Erlangen, Germany, S. 224

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

Lavid N., Wang J., Shalit M., Guterman I., Bar E., Beuerle T., Menda N., Shafir S., Zamir D., Adam Z., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E., Lewinsohn E. (2002): *O*-Methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol.* 129, 1899-1907

Lewis N. G., Davin L. B. (1999): Lignans: biosynthesis and function. *Compr. Nat. Prod. Chem.*, 639-712

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. *J. Biol. Chem.* 275, 6537-6545

Lloyd J. U. (1910): The eclectic alkaloids, resins, resinoids, oleo-resins and concentrated principles. Bulletin of the Lloyd Library of Botany, Pharmacy and Materia Medica, Pharmacy series No.2. Cincinnati, Ohio, USA

Maxwell C. A., Edwards R., Dixon R. A. (1992): Identification, purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-*O*-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 156-166

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2001): Brock Mikrobiologie. Goebel W. (Ed.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg

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 structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases. *J. Biol. Chem.* 278 (50), 50714-50723

Mohagheghzadeh A. (2003): Evaluation of lignans in *Linum persicum*. *Phytochemistry Reviews*, in press



- 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.-, Andrade Z. D., Bedir E., Dayan F. E., Lata H., Khan I., Pereira A. M. S. (2004): Arbuscular mycorrhiza improves acclimatization and increases lignan content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.). *Plant Science* 166, 23-29
- Morishige T., Tsujita T., Yamada Y., Sato F. (2000): Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcochlorine 4' O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* 275 (30), 23398-23405
- Muir A. D., Westcott N. D. (Eds.) (2003): *Flax: The genus Linum*. Taylor and Francis, London
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Nakamura Y., Teramoto S., Yoshitama K. (1999): Purification and characterization of an S-adenosyl-L-methionine:flavonoid 3'-O-methyltransferase from leaves of *Trillium apetalon* Makino. *Z. Naturforsch.* 54c, 501-507
- NDong C., Anzellotti D., Ibrahim R. K., Huner N. P. A., Sarhan F. (2003): Daphnetin methylation by a novel O-methyltransferase is associated with cold acclimation and photosystem II excitation pressure in Rye. *J. Biol. Chem.* 278 (9), 6854-6801
- Ockendon D. J., Walters S. M. (1968): *Linum*. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moorre D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (eds), *Flora Europaea*, Vol. 2, S. 206-211, Cambridge University Press, Cambridge
- Parvathi K., Chen F., Guo D., Blount J. W., Dixon R. A. (2001): Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant J.* 25, 193-202
- Pearl I. A., Beyer D. L. (1951): Reactions of vanillin and its derived compounds. XI. Cinnamic acids derived from vanillin and its related compounds. *J. Org. Chem.* 16, 216-220
- Pearson W. R., Lipman D. J. (1988), *PNAS* 85: 2444-2448
- Peitsch M. C. (1995): Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13, 658-660
- Petersen M., Alfermann A. W. (2001): The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 135-142
- Poeydomenge O., Boudet A. M., Grima-Pettenati J. (1994): A cDNA encoding S-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-O-methyltransferase from Eucalyptus. *Plant Physiol.* 105 (2), 749-750

- Pueppke G., Bolanos-Vásquez M. C., Werner D., Bec-Ferté M.-P., Promé J.-C., Krishnan H. B. (1998): Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol.* 117, 599-606
- Rabasseda X. (1999): Perspectives in the treatment of Parkinson's disease: COMT inhibitors open up new treatment strategies. *Drugs Today* 35 (9), 701-717
- Radeke A. (2002): The role of the precursor substitution pattern in the biosynthetic pathway of podophyllotoxin in *Linum album*. Diploma thesis, Halle
- Sakakibara N., Suzuki S., Umezawa T., Shimada M. (2003): Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*. *Org. Biomol. Chem.* 1 (14), 2474-2485
- Sato F., Takeshita N., Fitchen J. H., Fujiwara H., Yamada Y. (1993): S-Adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* 32 (3), 659-664
- Sawicki C. R., Scarinelli F. P. (1971): Colorimetric determination of nitrate after hydrazine reduction to nitrite. *Mikrochem. J.* 16, 657
- Scalliet G., Journot N., Jullien F., Baudino S., Magnard J. L., Channeliere S., Vergne P., Dumas C., Bendahmane M., Cock J. M., Hugueney P. (2002): Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases. *FEBS Letters* 523, 113-118
- Schacter L. (1996): Etoposide phosphate: what, why, where and how?. *Seminars in Oncology* 23, 1-7
- Schmitt J. (2000): Bildung von Pinoresinol und Matairesinol in einer Zellkultur von *Forsythia x intermedia* „Spectabilis“. Görlich und Weiershäuser Verlag, Marburg
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P., Werck-Reichhart D. (2001): CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36566-36574
- Schröder G., Wehinger E., Schröder J. (2002): Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases. *Phytochemistry* 59 (1), 1-8
- Schubert H. L., Blumenthal R. M., Cheng X. (2003): Many paths to methyl transfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences* 28 (6), 329-335
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. (2003): SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31, 3381-3385
- Seidel V., Windhövel J., Eaton G., Alfermann A. W., Arroo R. R. J., Medarde M., Petersen M., Woolley J. (2002): Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta* 215, 1031-1039
- Seitz H. U., Seitz U., Alfermann A. W. (1985): Pflanzliche Gewebekultur- Ein Praktikum.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Sharma S. K., Brown S. A. (1978): Affinity chromatography on immobilized S-adenosyl-L-homocysteine: Purification of a furanocoumarin O-methyltransferase from cell cultures of *Ruta graveolens* L.. J. Chromatography 157, 427-431

Shifman S., Bronstein M., Sternfeld M., Pisanté-Shalom A., Lev-Lehman E., Weizman A., Reznik I., Spivak B., Grisaru N., Karp L., Schiffer R., Kotler M., Strous R. D., Swartz-Vanetik M., Knobler H. Y., Shinar E., Beckmann J. S., Yakir B., Risch N., Zak N. B., Darvase A. (2002): A highly significant association between a COMT halotype and schizophrenia. Am. J. Hum. Genet. 71, 1296-1302

Smollny T., Wichers H., Kalenberg S., Shahsavari A., Petersen M., Alfermann A. W. (1998): Accumulation of Podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. Phytochemistry 48, 975-979

Stähelin H. F., von Wartburg A. (1991): The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide. Cancer Research 51, 5-15

Svensson B., Pettersson H. (2003): Rheumacon (CPH82) showed similar x-ray progression and clinical effects as methotrexate in a two year comparative study on patients with early rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheumatol. 32, 83-88

Trease G. E., Evans W. C. (1978): Pharmacognosy 11<sup>th</sup> Edition Bailliére-Tindall

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

Van Doorselaere J., Baucher M., Chognot E., Chabbert B., Tollier M., Petit-Conil M., Leplé J., Pilate G., Cornu D., Monties B. (1995): A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. Plant J. 8, 855-864

Van Uden M., Bos J. A., Boeke G. M., Woerdenbag H. J., Pras N. (1997): The large-scale isolation of deoxypodophyllotoxin from rhizomes of *Anthriscus silvestris* followed by its bioconversion into 5-methoxypodophyllotoxin beta-D-glucoside by cell-cultures of *Linum flavum*. J. Nat. Prod. 60, 401-403

Van Uden W., Bouma A. S., Waker J. F. B., Middel O., Wichers H. J., Dewaard P., Woerdenbag H. J., Kellogg R. M., Pras N. (1995): The production of Podophyllotoxin and its 5-methoxy derivate through bioconversion of cyclodextrin-complexed deoxypodophyllotoxin by plant cell-cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 42, 73-79

Van Uden W., Homann B., Woerdenbag H. J., Pras N., Malingre T. M., Wichers H. J., Harkes M. (1992): Isolation, purification and cytotoxicity of 5-methoxypodophyllotoxin, a lignan from a root culture of *Linum flavum*. J. Nat. Prod. 55, 102-110

Van Uden W., Pras N., Woerdenbag H. J. (1994): *Linum* species (Flax): In vivo and in vitro accumulation of lignans and other metabolites. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 26, Medicinal and Aromatic plants VI, Y. P. S. Bajaj (ed), S. 219-244, Springer Verlag, Berlin

- Velasco L., Goffman F. D. (2000): Tocopherol, plastochromanol and fatty acid patterns in the genus *Linum*. *Plant Syst. Evol.* 221, 77-88
- Vidgren J., Svensson L. A., Liijas A. (1994): Crystal structure of catechol *O*-methyltransferase. *Nature* 368, 354-358
- Wang J., Pichersky E. (1999): Identification of specific residues involved in substrate discrimination in two plant *O*-methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 172-180
- Ward R. S. (1993): Lignans, Neolignans and related compounds. *Natural Product Reports* 10, 1-28
- Ward R. S. (1995): Lignans, Neolignans and related compounds. *Natural Product Reports* 12, 183-205
- Ward R. S. (1997): Lignans, Neolignans and related compounds. *Natural Product Reports* 14, 43-74
- Ward R. S. (1999): Lignans, Neolignans and related compounds. *Natural Product Reports* 16, 75-96
- Wein M., Lavid N., Lunkenbein S., Lewinsohn E., Schwab W., Kaldenhoff R. (2002): Isolation, cloning and expression of a multifunctional *O*-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key compounds in strawberry fruits. *Plant J.* 31 (6), 755-765
- Weiss S. G., Tin-Wa M., Perdue R. E., Farnsworth N. R. (1975): Potential anticancer agents II: antitumor and cytotoxic lignans from *Linum album* (Linaceae). *J. Pharm. Sci.* 64, 95-98
- Wengenmayr H., Ebel J., Grisebach H. (1974): Purification and properties of a S-adenosylmethionine: isoflavone 4'-*O*-methyltransferase from cell suspension cultures of *Cicer arietinum* L.. *Eur. J. Biochem.* 50, 135-143
- Westcott N. D., Muir A. D. (2003): Chemical studies on the constituents of *Linum* spp.. *Flax The genus Linum*, Muir A. D., Westcott N. D. (Edit.), Routledge Taylor und Francis, London
- Wu S., Watanabe N., Mita S., Ueda Y., Shibuya M., Ebizuha Y. (2003): Two *O*-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 96 (2), 119-128
- Xia Z. Q., Costa M. A., Pelissier H. C., Davin L. B., Lewis N. G. (2001): Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning and functional expression. Implications for human health protection. *J. Biol. Chem.* 276, 12614-12623

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

Ye Z.-H., Kneusel R. E., Matern U., Varner J. E. (1994): An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* 6, 1427-1439

Ye Z.-H., Varner J. E. (1995): Differential expression of two *O*-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 108, 459-467

Ye Z.-H., Zhong R., Morrison III, Himmelsbach D. S. (2001): Caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 57, 1177-1185

Ylstra B., Touraev A., Moreno B., Stoger E., van Thunen A. J., Vincente O., Mol J. N. M., Heberic-Brors E. (1992): Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.* 100, 902-907

Zubieta C., He X.-Z., Dixon R.A., Noel J. P. (2001): Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. *Nature Struct. Biol.* 8, 271-279

Zubieta C., Kota P., Ferrer J.-L., Dixon R. A., Noel J. P. (2002): Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase. *Plant Cell* 14, 1265-1277

## Danksagung

*„Die Wissenschaft braucht Zusammenarbeit, in der sich das Wissen des einen durch die Entdeckungen des anderen bereichert.“*

-José Ortega Y Gasset-

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben :

Bei Frau Professor Dr. Maike Petersen für die Überlassung des Themas, für unermüdliche und wertvolle Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für ihre außerordentlich freundliche und angenehme Betreuung.

Bei Herrn Professor W. A. Alfermann (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für viele nützliche Anregungen, für die Überlassung einiger Lignanstandards und für die Übernahme der Zweitkorrektur, sowie bei seinem Arbeitskreis, insbesondere bei Frau Dr. Elisabeth Fuss für Unterstützung in Rat und Tat.

Bei allen im Kapitel „Material und Methoden“ genannten Spendern der Lignanstandards, ohne deren Hilfe ein Großteil dieser dieser Arbeit nicht hätte angefertigt werden können.

Bei Professor Dr. Jack Woolley (De Montford University, Leicester, UK) für die freundliche Hilfe bei der Synthese der [2-<sup>13</sup>C]3',4'-Methylenedioxyzimtsäure und bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern seines Arbeitskreises, vor allem Frau Beverly Farrand für die freundliche Aufnahme und die geduldige Hilfsbereitschaft.

Bei Dr. Mike Needham (De Montford University, Leicester, UK) für die NMR-Messung.

Bei Herrn Edgar Specker (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie) für die geduldige Hilfe bei der Auswertung der NMR-Messungen.

Bei Herrn Dr. Rainer Ebel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für die LC-MS-Analyse und seine große Hilfe bei der Auswertung derselben.

Bei Frau Verena Janiak für das kritische und engagierte Korrekturlesen dieser Arbeit und für ausgesprochen gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, ebenso wie bei Frau Anna Berim.

Bei Herrn Dr. Stephan Schreiner für die Hilfe bei der Darstellung der MT1 als Kristallstruktur.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes und der Arbeitskreise Petersen und Matern für eine wundervolle gemeinsame Zeit, viele Anregungen und fruchtbare Diskussionen und für die angenehme Laboratmosphäre.

Bei Frau Kisser-Nonn für ihre Unterstützung mit Rat und Tat.

Bei meinen Freunden für ihre Geduld und ihre Fürsorge.

Bei meinem Freund Stefan Görke für seine ständige Unterstützung, seine Geduld und Ermutigung während aller Phasen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Gerd und Helga Kranz und meinem Bruder Thomas danken, die mich immer unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit sehr viel beigetragen haben.

# Lebenslauf

<b>Persönliche Daten:</b>	Name:	Kerstin Kranz
	geboren am:	29.08.1975 in Kassel
	Familienstand:	ledig
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
	Eltern:	Gerd Kranz, Diplomingenieur Helga Kranz, Versicherungskauffrau
	Geschwister:	Bruder Thomas Kranz
<b>Ausbildungsdaten:</b>	1982 – 1988	Hermann-Schafft-Schule Fuldabrück
	1988 – 1992	Integrierte Gesamtschule Guxhagen
	1992 – 1995	Oberstufengymnasium Oberzwehren, Abschluß: Abitur
	1995 – 2000	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg, Abschluß: 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
	2000 - 2004	Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Philipps-Universität Marburg
<b>Berufspraxis:</b>	03 – 04/1996:	Apotheke Alte Schule in Körle als Famulatur
	08 – 09/1996:	Städtische Kliniken Kassel als Famulatur
	11/1999 - 04/2000:	Hayn-Apotheke in Guxhagen
	05 – 10/2000:	Städtisches Krankenhaus Friedrichshafen
	12/2000 – 03/2003:	Nebentätigkeit in der Hayn-Apotheke, Guxhagen
<b>Interessen:</b>	1990 – 1997	Mitarbeiterin beim Kindergottesdienst Dörnhagen
	1995 – 2004	Organistin der Kirchengemeinde Dörnhagen
	Sport (aktiv)	Aerobic, Schwimmen, Ski



## ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Biosynthese cytotoxischer Lignane aus *Linum nodiflorum* (Linaceae):  
β-Peltatin 6-*O*-Methyltransferase“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 16.4.2004