

**Untersuchungen zur Rolle von
Cytochrom P450-Enzymen in der
Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen in
Zellkulturen von *Linum spec.***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Stephan Kuhlmann
aus Wuppertal**

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Maike Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. A.W. Alfermann

Tag der mündliche Prüfung am 14.01.2004

Die Natur liebt es, sich zu verbergen.

Heraklit von Ephesos

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Lignane – Vorkommen und Einteilung	1
1.2	Lignane in der Gattung <i>Linum</i>	2
1.3	Podophyllotoxin und seine Derivate	3
1.4	Ansätze zur biotechnologischen Produktion von Podophyllotoxin	6
1.5	Frühe Biosynthese – Phenylpropanstoffwechsel	8
1.6	Frühe Lignan-Biosynthese – Von Coniferyl-Alkohol zu Matairesinol	10
1.7	Späte Lignan-Biosynthese – verschiedene Modelle und Hypothesen	11
1.8	Cytochrom P450 Systeme in Pflanzen	14
1.9	Aufgabenstellung	16

2 Material und Methoden

2.1	Pflanzliche Zellkulturen	17
2.2	Zellkulturmedien	17
2.2.1	Zusammensetzung des Kulturmediums MS-Li	17
2.2.2	Zusammensetzung des Kulturmediums MS-Lf	18
2.3	Elicitierungs- und Biotransformationsversuche	19
2.4	Lignan-Extraktion aus Zellkulturen	20
2.5	Lignan-Extraktion aus frischem Pflanzenmaterial	20
2.6	Chemische Umwandlung von 4'-Demethyl-PTOX zu 4'-Demethyl-DOP	22
2.7	Kopplungsversuch von 4'-Demethyl-DOP an Sepharose 6B	22
2.8	Mikrosomenpräparation	23
2.9	Enzymtest für die DOP 6-Hydroxylase (DOP6H)	24
2.10	Weitere Enzymtests	25
2.11	HPLC	26
2.12	Fraktionierung des Mikrosomenextraktes durch doppelte Phasentrennung mit Triton X-114	26
2.13	Proteinfällung mit Methanol und Chloroform	27
2.14	SDS-PAGE	28
2.15	LDS-PAGE	29
2.16	Silberfärbung von Proteingelen	29
2.17	Luminol-Färbung von Proteingelen	30
2.18	RNA-Isolierung	31
2.19	RT-PCR	33

2.19.1	Reverse Transkription	
33		
2.19.2	PCR	33
2.19.3	RACE-PCR	34
2.20	Agarosegele	35
2.21	Aufreinigung der PCR-Produkte	35
2.22	Ligation	36
2.23	Transformation	36
2.24	Plasmidpräparation	38
2.25	Sequenzierungen	38
2.26	Durchsuchen einer cDNA-Bank von <i>Linum album</i>	38
2.26.1	Ausplattieren der Zellen	39
2.26.2	Plaque-lifting	39
2.26.3	Hybridisierung der Sonde	40
2.26.4	<i>in-vivo</i> -Excision	41
	Geräteliste	42
	Chemikalien	42
	Lignanstandards	42
3	Ergebnisse	
3.1	Mikrosomenpräparation – Elektrophoretische Untersuchungen	44
3.2	Lignanextraktion aus Zellkulturen	46
3.3	Biotransformationsversuche mit Linum-Zellkulturen	
46		
3.4	Elicitierungsversuche	48
3.5	Enzymtests mit verschiedenen potenziellen Substraten	50
3.6	Nachweis und Charakterisierung der DOP6H aus <i>Linum nodiflorum</i>	52
3.6.1	K_m -Werte für DOP und NADPH	54
3.6.2	Vergleich der Cosubstrate NADPH und NADH	58
3.6.3	Inhibitoren der DOP6H	59
3.7	Isolierung und Synthese von DOP	62
3.7.1	Katalytische Hydrierung von PTOX und 4'-Demethyl-PTOX	62
3.7.2	Lignanextraktion aus Wurzeln von <i>Anthriscus sylvestris</i>	64
3.8	Versuch zur Affinitätschromatographie mit 4'-Demethyl-DOP	65
3.9	Versuch zur biotechnologischen Anwendung von Mikrosomen	68
3.10	Klonierung von cDNAs der NADPH:Cytochrom P450-Reduktase aus <i>Linum spec.</i>	69
3.10.1	Auswahl spezifischer Primer	70

3.10.2	RT-PCR und Klonierung	70
3.10.3	RACE-PCR und cDNA-Bank screening	75
4	Diskussion	
4.1	Yatein wurde in zellfreien Mikrosomenpräparationen aus <i>Linum</i> -Zellkulturen nicht enzymatisch umgesetzt – mögliche Gründe	77
4.1.1	Yatein ist kein Intermediat im Stoffwechselweg zu DOP in <i>Linum spec.</i>	77
4.1.2	Die Umsetzung von Yatein ist nicht Cytochrom P450-abhängig	79
4.1.3	Ein spezifisches Cytochrom P450-Enzym ist im verwendeten Testverfahren nicht nachweisbar	80
4.1.4	Ein spezifisches Enzym ist zu gering exprimiert, um nachweisbar zu sein	82
4.1.5	Schlussfolgerung und Hypothese	83
4.2	Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H)	84
4.2.1	Charakterisierung des Enzyms	84
4.2.2	Bedeutung der Cosubstrate NADH und NADPH	86
4.2.3	Bedeutung der Inhibitoren der DOP6H	87
4.2.4	Die Bedeutung von DOP in der Lignan-Biosynthese	88
4.2.5	Biotechnologische Verwendbarkeit der DOP6H – Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

4'-Demethyl-PTOX	4'-Demethylpodophyllotoxin
4'-Demethyl-YAT	4'-Demethyl-Yatein
7-Hydroxy-MAT	7-Hydroxymatairesinol
AHP	Anhydropodorhizol
Anc	Ancymidol
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Benzylaminopurin
CA	Zimtsäure
cDNA	komplimentäre DNA
Cyt. c	Cytochrom c
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbaminat
DMFA	dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DOP	Desoxypodophyllotoxin
DOP6H	DOP 6-Hydroxalase
DOP7H	DOP 7-Hydroxylase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	fast protein liquid chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IES	Indolyl-3-Essigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
K_m -Wert	Michaelis-Menten Konstante
LB	Luria-Bertani-Vollmedium für <i>Bacillus</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molar (mol/l)
MAT	Matairesinol
MAT7H	MAT 7-Hydroxylase
Met	Metyrapon
Mic	Miconazol
MPTOX	6-Methoxypodophyllotoxin
MS-Lf	Murashige & Skoog-Medium für <i>Linum flavum</i>
MS-Li	Murashige & Skoog-Medium für <i>Linum spec.</i>

NAA	Naphthylessigsäure
NADH	Nicotinamid Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nt	Nukleotide
NZY	Bakterienmedium mit NZ-Aminen und Hefeextrakt
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	β -Peltatin-A Methylether
PAM7H	PAM 7-Hydroxylase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHD	Prohexadion-Calcium
PMG	steriles getrocknetes Zellwandmaterial des Pilzes <i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>glycineae</i>
POD	Podorhizol
PTOX	Podophyllotoxin
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Natrium-Magnesium-Puffer
SSC	Natrium-Natriumcitrat-Puffer
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetcyclacis
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalactosid
YAT	Yatein
β -PELT	β -Peltatin

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Vorträge und Poster:

S. Kuhlmann, M. Petersen: Screening for cytochrome P450 enzymes in late lignan biosynthesis (Vortrag). 2. EU-Symposium LIGNOCANCER, 13.-16.1.2000, Groningen (Niederlande).

S. Kuhlmann, M. Petersen: News about DOP5H.(Vortrag) 3. EU-Symposium LIGNOCANCER, 6.-7.10.2000, Salamanca (Spanien).

J. Schmitt, K. Kranz, S. Kuhlmann, M. Petersen: Studies on lignan production and lignan biosynthesis in plant cell cultures (Vortrag). 4. EU-Symposium LIGNOCANCER, 26.-29.4.2001, 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“, 11.-13.6.2001, Helsinki (Finnland).

S. Kuhlmann, G. Molog, U. Empt, W. Van Uden, N. Pras, A.W. Alfermann, M. Petersen: Biosynthese von Lignan des Aryltetrahydronaphthalentyps in Suspensionskulturen von *Linum spec.*: Charakterisierung der Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (Vortrag). 3. Tagung der Sektion "Pflanzliche Naturstoffe" der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 6.-8.7.2001, Lutherstadt Wittenberg.

S. Kuhlmann, K. Kranz, M. Petersen: Enzymes of the biosynthesis of cytotoxic lignans in *Linum* species - deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase; (Vortrag) Phytochemistry and Biology of Lignans; 6. bis 9. April 2003, Walberberg,

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

Characterisation of Deoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H), a Cytochrome P450-dependent Enzyme in Lignan Biosynthesis of *Linum* species (Poster) Tagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, 2001, Erlangen; Posterpräsentation

S. Kuhlmann, G. Molog, U. Empt, M. Petersen, W. van Uden, N. Pras, A.W. Alfermann Lignan-Biosynthesis in *Linum* Species: Deoxypodophyllotoxin 5-Hydroxylase is important for determining the end product (Poster) 5th International Symposium on P450 Biodiversity, 2000, Ellsinore, Denmark;

Publikationen:

Molog GA, Empt U, Kuhlmann S, van Uden W, Pras N, Alfermann AW, Petersen M
Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell
cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans.
Planta. 2001 Dec;214(2):288-94.

Kuhlmann S, Kranz K, Lücking B, Alfermann AW, Petersen M
Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*
Phytochemistry Reviews 2002; 1; 37-43

1 Einleitung

1.1 Lignane – Vorkommen und Einteilung

Lignane sind eine im Pflanzenreich weit verbreitete Gruppe sekundärer Inhaltsstoffe. Sie gehören zur Gruppe der phenolischen Substanzen und leiten sich von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin ab. Lignane kommen sowohl bei Gymnospermen und Angiospermen, als auch bei Moosen und Farnen vor. Es wurde spekuliert, dass die Fähigkeit zur Synthese dieser Stoffklasse zusammen mit der Landbesiedlung entstand (Lewis & Davin 1999).

Die physiologischen Bedeutungen von Lignanenen für die jeweiligen Pflanzen können recht unterschiedlich sein. Am häufigsten ist eine Rolle als fakultativer Fraßschutz, aber auch antioxidative, antimikrobielle und fungizide Effekte werden diskutiert (zur Übersicht: Lewis & Davin 1999). Bei Gymnospermen können sehr hohe Lignan-Konzentrationen in der Bildungsregion neuer Äste, den sog. Knoten gefunden werden (Willfor et al., 2003). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Lignane die Samenkeimung und das Wurzelwachstum benachbarter Pflanzen hemmen können (Oliva et al., 2002; Cutillo et al., 2003).

Auch in der menschlichen Nahrung sind Lignane enthalten, die zu den sogenannten Phytoöstrogenen gezählt werden. Sie kommen z.B. in Sesam (Sesamin) und Leinsamen (Matairesinol, Secoisolariciresinol) vor. Insbesondere letztgenannte können von der Darmflora in Enterolacton und Enterodiol umgewandelt werden. In klinischen Studien konnte eine krebisprotektive Wirkung der Lignane in Leinsamen bestätigt werden (Adlercreutz, 1999; Cho et al., 1999).

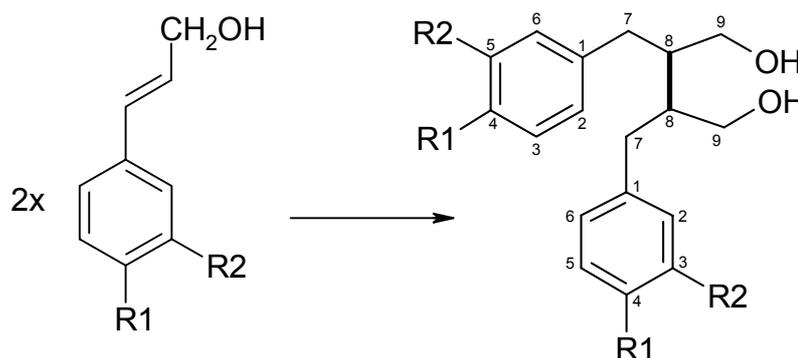


Abbildung 1: Lignan-Grundgerüst mit 8-8' Verknüpfung zweier Monolignoleinheiten

Was genau Lignane sind, bzw. welche Verbindungen unter diesem Begriff subsummiert werden können, wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich gesehen. Einigkeit besteht darüber, dass Dimere von Zimtsäurederivaten, die über ihre β -C Atome miteinander verknüpft sind, als Lignane bezeichnet werden. Damit leiten

sie sich vom Phenylpropanstoffwechsel und letztlich von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin ab.

Im engeren Sinne steht tatsächlich nur Dimeren der genannten häufigsten Verknüpfungsart, die auch 8-8' genannt wird, der Begriff Lignane zu (siehe Abbildung 1). Sind die Monolignoleinheiten auf eine andere Art verknüpft, so werden sie als Neolignane bezeichnet. Norlignane fehlt dagegen das C9 bzw. das C9' Atom oder eine Methoxygruppe am aromatischen Ring. Sind Norlignane anders als 8-8' verknüpft handelt es sich um Norneolignane (zur Übersicht über die Strukturvielfalt siehe: Ward, 1993; Ward, 1995; Ward, 1997; Ward, 1999).

Diese Begriffswahl hat historischen Ursprung. In neueren Publikationen z.B. von Lewis & Davin 1999 wird gefordert, alle Oligomere aus Zimtsäure-Derivaten als Lignane zu bezeichnen. Allerdings hat sich diese Vereinfachung bisher nicht allgemein durchgesetzt. Die in dieser Arbeit besprochenen Lignane gehören zum „klassischen“ häufigsten Typ, weshalb sie auch im engeren Sinn als Lignane zu bezeichnen sind. Zur bisher ebenfalls unterschiedlich gehandhabten Nummerierung der Atome in Lignanmolekülen hat die IUPAC eine Empfehlung herausgebracht, die für diese Arbeit übernommen wurde (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/lignan/>).

1.2 Lignane in der Gattung *Linum*

Innerhalb der Familie die Linaceae bildet die Gattung *Linum* die größte Gruppe mit geschätzten 230 Spezies. Verschiedene *Linum*-Arten kommen überall auf der Welt vor, wobei die größte wirtschaftliche und kulturelle Bedeutung sicherlich *Linum usitatissimum* zufällt. Lein ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Menschen, wobei verschiedene Varianten zur Faser- oder Ölgewinnung verwendet werden (Muir & Westcott, 2003).

Aufgrund von morphologischen und phytochemischen Daten kann die Gattung in verschiedene Sektionen unterteilt werden, wobei die genaue Einteilung allerdings umstritten ist. Die für diese Arbeit übernommene Nomenklatur unterscheidet die Sektionen *Linum*, *Syllinum*, *Dasyllinum*, *Linastrum* und *Cathartolinum*.

Lignane können in jeder dieser Sektionen gefunden werden, weshalb ihnen chemotaxonomisch keine große Bedeutung zugestanden wird. Es fällt jedoch auf, dass Lignane vom Podophyllotoxin-Typ insbesondere (allerdings nicht ausschließlich) in der Sektion *Syllinum* gefunden werden. Mohagheghzadeh et al. (2003) versuchen aufgrund von eigenen und Literaturdaten diese Sektion weiter zu unterteilen. Dabei kommen sie zu



Abbildung 2: *Linum nodiflorum*

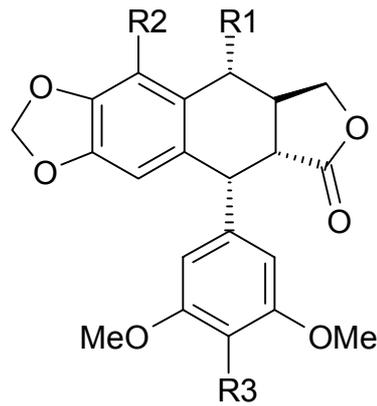
dem Ergebnis, dass ausdauernde Arten mit weißen, heterostylen Blüten eher Podophyllotoxin akkumulieren, während in ausdauernden Arten mit gelben, heterostylen Blüten eher 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) zu finden ist. Einen besonderen Platz nimmt in dieser Einteilung *Linum nodiflorum* (Abbildung 2) ein, da es sich um eine nicht ausdauernde Art mit homostylen, gelben Blüten handelt. Auch die phytochemischen Untersuchungen von Velasco & Goffman 2000, die sich auf Tocopherol, Plastochromatol und Fettsäuren konzentrierten, um zu einer Einteilung der Gattung zu kommen, weisen *L. nodiflorum* einen besonderen Platz innerhalb der Sektion Syllinum zu.

Das Vorkommen von 6-Methoxypodophyllotoxin in *L. nodiflorum* wurde von Konuklugil (1996) beschrieben. Ein Vertreter der weiß blühenden Gruppe ist *Linum album*, in dem von Weiss et al., 1975 Podophyllotoxin nachgewiesen wurde. Als gelbblühende Art ist u.a. *Linum flavum* zu nennen, in dem BROOMHEAD & Dewick 1990 MPTOX nachgewiesen haben.

Außerhalb der Sektion Syllinum wurden Lignane vom Podophyllotoxin-Typ bisher nur sehr vereinzelt gefunden, so z.B. in *Linum austriacum* (Konuklugil, 1996), das der Sektion Linum zugerechnet wird. Lignane abweichenden Bautyps sind jedoch in der Gattung *Linum*, wie erwähnt, weit verbreitet. Bekannt ist das Vorkommen der Lignane Secoisolariciresinol (SEC) und Matairesinol (MAT) in den Samen von *L. usitatissimum* (Sektion Linum), den Leinsamen (siehe auch Abbildung 7). In *L. austriacum* konnten außerdem Justicidin B und Isojusticidin B nachgewiesen werden (Mohagheghzadeh et al., 2002).

1.3 Podophyllotoxin und seine Derivate

Podophyllotoxin (PTOX) ist ein Lignan vom Aryltetrahydronaphthalen-Typ (Abbildung 3). Es ist stark cytotoxisch und wurde zuerst aus Wurzeln und Rhizomen von Pflanzen der Gattung *Podophyllum* isoliert, deren Vertreter in Nord-Amerika (*P. peltatum*) und der Himalaja-Region (*P. hexandrum*, Synonym *P. emodi*) vorkommen. Beide Arten sind als traditionelle Heil- bzw. Giftpflanzen bekannt und wurden vielfältigen Verwendungen zugeführt. So benutzten die Ureinwohner Nord-Amerikas wässrige Extrakte aus *P. peltatum* (Abbildung 4) als Laxans, Kathartikum, Anthelminthikum und wahrscheinlich sogar zur Tumorbehandlung, aber auch als Antidot bei Schlangenbissen sowie zur rituellen Selbsttötung. Unter den europäischen Einwanderern wurden *Podophyllum*-Extrakte als Emetikum, Kathartikum und Cholagogum verwendet (Imbert, 1998, Lloyd 1910).



	R1	R2	R3
PTOX	OH	H	OCH ₃
MPTOX	OH	OCH ₃	OCH ₃
DOP	H	H	OCH ₃
α-PELT	H	OH	OH
β-PELT	H	OH	OCH ₃
PAM	H	OCH ₃	OCH ₃
4'-Demethyl-Serie	--	--	OH

Abbildung 3: C2-C7' Cyclolignane; Podophyllotoxin (PTOX), 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX), Desoxypodophyllotoxin (DOP), α-Peltatin (α-Pelt), β-Peltatin (β-Pelt), β-Peltatin-A Methylether (PAM)

In Europa wurden Extrakte aus *Juniperus spec.*, die ebenfalls Podophyllotoxin enthalten, und aus *Anthriscus sylvestris*, dem Wiesenkerbel, der reich an Desoxypodophyllotoxin und Yatein ist, verwendet (siehe auch Abbildung 8). Entsprechende Berichte von Dioscorides und Plinius dem Älteren, reichen zurück bis ins erste Jahrhundert (Imbert, 1998).

Ein harziger Extrakt aus *Podophyllum*-Wurzeln wird Podophyllin genannt. Dieses Podophyllin, das in Amerika seit 1850 kommerziell erhältlich ist (Lloyd 1910), wurde und wird zur äußerlichen Anwendung gegen Feigwarzen (*Condyloma acuminata*) eingesetzt. In den 40er und 50er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte Podophyllotoxin als wirksames Prinzip in Podophyllin erkannt und isoliert werden. Im Deutschen Arzneimittelkodex (DAC) ist Podophyllin seit 1973 monographiert. Damit ist in Deutschland, aber auch in anderen Ländern wie Österreich, Schweiz oder den USA die von *Podophyllum peltatum* stammende Droge gemeint, wogegen in Großbritannien seit 1902 das von *P. hexandrum* stammende

Podophyllin verwendet wird. Die beiden Drogen unterscheiden sich sowohl in der Zusammensetzung als auch in der absoluten Menge der darin enthaltenen Lignane (Albert, 1999, sowie darin genannte Zitate). Einen Überblick über die Chronologie der Verwendung von Extrakten aus *Podophyllum* gibt Abbildung 5.

Als Alternative zu Podophyllin sind inzwischen Cremes (Wartec[®]) oder Gele (Condylox[®]) mit reinem Podophyllotoxin als Wirkstoff erhältlich. Da sie deutlich weniger Nebenwirkungen zeigen als Podophyllin, gilt dieses heute als obsolet.

Podophyllotoxin ist ein Spindelgift. Es bindet an Tubulin-Dimere an derselben Stelle und in derselben Stärke wie das bekanntere Colchicin und verhindert somit den Aufbau, aber nicht den Abbau der Mikrotubuli. Da auf diese Weise eine mitotische Teilung verhindert wird, lag es nahe, Podophyllotoxin als Cytostatikum einzusetzen. Aufgrund schwerer Nebenwirkungen (z.B. Hepatotoxizität) konnte sich

diese Anwendung aber nicht durchsetzen. Allerdings wurden zahlreiche Derivatisierungen durchgeführt, wobei u.a. die halbsynthetischen Glykoside Etoposid und Teniposid entwickelt wurden, die heute Bedeutung in der Krebstherapie haben.

Interessanterweise haben Etoposid, Teniposid und auch Etopophos[®] (Etoposid-Phosphat) einen gänzlichen anderen Wirkmechanismus als Podophyllotoxin. Sie sind Inhibitoren der Topoisomerase II und verhindern damit die DNA-Replikation. Der Vorteil von Etopophos[®], einem „Pro-drug“ zu Etoposid, liegt in der höheren Wasserlöslichkeit. Zusätzlich zu den bereits eingesetzten Glykosiden werden weitere Derivate von Podophyllotoxin auf ihre medizinische Anwendbarkeit getestet. Dazu gehören z.B. die Verbindungen TOP 53, GL-331 und NK-611.

Ein anderes halbsynthetisches Glykosid von Podophyllotoxin trägt die Bezeichnung CPH 82, oder Rheumacon[®]. Es wird gegen rheumatoide Arthritis eingesetzt und hat den Wirkmechanismus der Ausgangssubstanz Podophyllotoxin, d.h. es hemmt die Bildung von Mikrotubuli. Zwar zeigten klinische Studien vielversprechende Ergebnisse (Svensson & Pettersson 2003), aber auch erbgutschädigende Nebenwirkungen werden diskutiert (Dahlqvist & Nordenson 1996).

Des Weiteren werden auch antivirale Wirkungen für Podophyllotoxinderivate diskutiert (Gordaliza et al., 2000; Übersicht: Charlton, 1998).

Die Hauptbedeutung von Podophyllotoxin liegt heute in der Verwendung als Ausgangssubstanz für die Synthese von Etoposid und ähnlichen Derivaten. Da die chemische *de-novo* Synthese von Podophyllotoxin verhältnismäßig aufwändig ist, liefern nach wie vor Wildsammlungen von *Podophyllum*-Pflanzen die Hauptquelle für seine Gewinnung. Im Falle des im Himalaja heimischen *P. hexandrum* hat dies zu einer Bedrohung der Art geführt. (Appendix II der *convention for international trades in endangered species* CITES; World Conservation Monitoring Centre 2001).

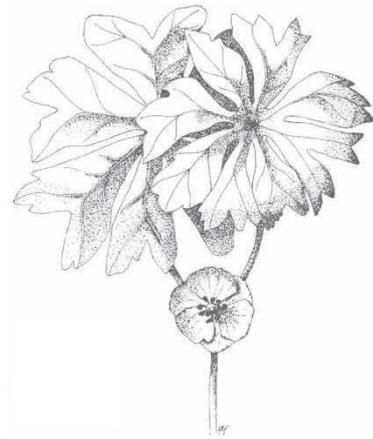


Abbildung 4: *Podophyllum peltatum*

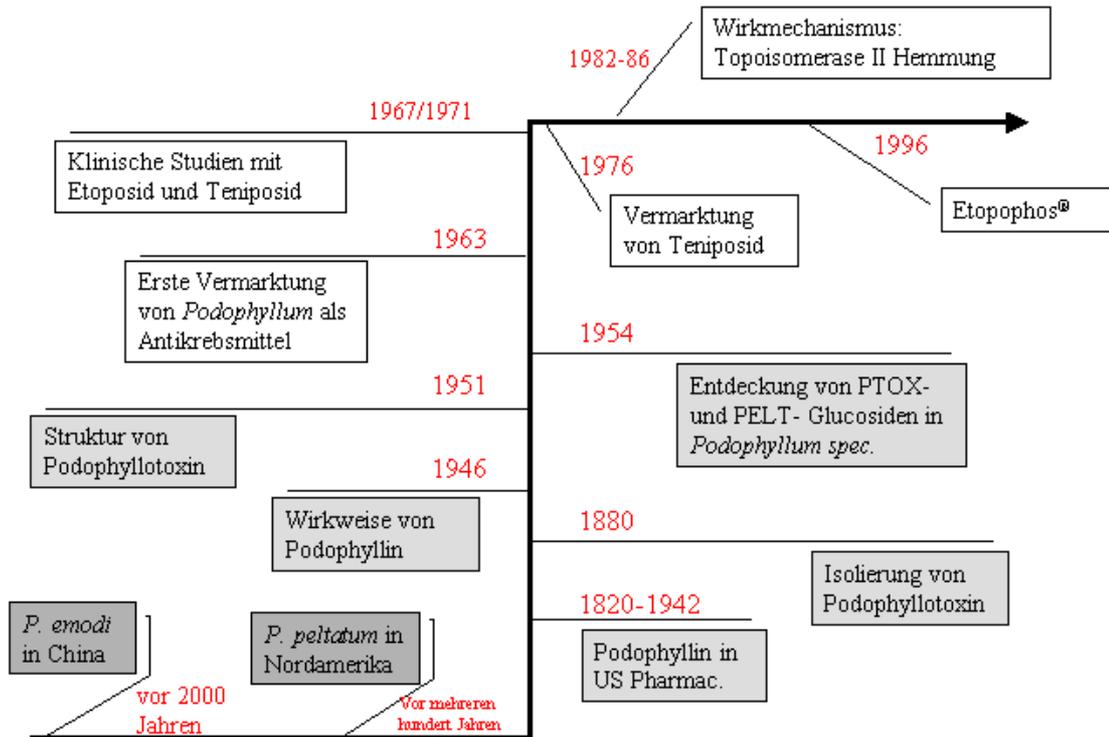


Abbildung 5: Zeitlinie über die Verwendung von Extrakten und Inhaltsstoffen aus *Podophyllum* Spezies. Daten entnommen aus Imbert, 1998 und Bohlin & Rosen 1996.

1.4 Ansätze zur biotechnologischen Produktion von Podophyllotoxin

Zwar ist eine chemische *de-novo* Synthese von Podophyllotoxin über verschiedene Strategien möglich, doch erweist sich diese insbesondere aufgrund der Stereochemie des Endproduktes als recht aufwändig und daher nicht wirtschaftlich im Vergleich zur Isolierung des Naturstoffes aus Pflanzen.

Um von den Wildsammlungen unabhängig einen konstanten Nachschub von Podophyllotoxin zu gewährleisten, wurden deshalb in den vergangenen Jahren verschiedene biotechnologische Verfahren getestet. So wird z.B. die in Amerika heimische Art *Podophyllum peltatum* als Alternative zu *P. hexandrum* untersucht. (Moraes et al., 2002) konnten zeigen, dass Podophyllotoxin in den Blättern von *P. peltatum* akkumuliert wird. Darüber hinaus konnte eine spezifische β -Glucosidase nachgewiesen werden (Dayan et al., 2003).

Zwar ist der Gesamtgehalt an Lignan in *P. peltatum* geringer als in *P. hexandrum* (Chatterjee, 1952), aber *P. peltatum* hat den Vorteil, in Amerika östlich der Rocky Mountains ubiquitär vorzukommen. Beim Ernten der Blätter würden außerdem die Pflanzen nicht vernichtet, wie es bei der Isolierung aus den Rhizomen bzw. Wurzeln

der Fall ist. Ob sich der Anbau von *P. peltatum* zur Podophyllotoxin-Produktion rentiert, muss sich in den nächsten Jahren erweisen.

Einen anderen biotechnologischen Ansatz stellen pflanzliche Zellkulturen dar. Sie bieten den Vorteil, von jahreszeitlichen und witterungsbedingten Schwankungen unabhängig zu sein. Auch für biochemische Untersuchungen sind Zellkulturen ein günstiges System, da sie in kurzen Zeiträumen größere Mengen an Biomasse produzieren als intakte Pflanzen, wodurch Testverfahren eher standardisiert werden können. Allerdings ist in den meisten Kultursystemen der Gehalt insbesondere an sekundären Inhaltsstoffen für eine kommerzielle Nutzung zu gering. Große Bedeutung haben pflanzlicher Zellkulturen jedoch für die Vermehrung von Pflanzen durch die sogenannte Mikropropagation (Alfermann et al. 1994), bei der aus pathogenfreiem Pflanzenmaterial über Kalli eine Vielzahl von Pflanzen gewonnen werden kann.

Eine Reihe unterschiedlicher Spezies wurde für die Produktion von Podophyllotoxin und ähnlichen cytotoxischen Lignan in Zellkulturen herangezogen (zur Übersicht: Petersen & Alfermann 2001). In *Linum spec.* konnte die größte Menge an Podophyllotoxin (28 mg pro Liter nach 11 Tagen) in einer Suspensionskultur von *Linum album* gefunden werden (Smolny et al., 1998, Empt et al., 2000). MPTOX wurde in der bisher größten Menge (121 mg pro Liter) in Suspensionskulturen von *Linum flavum* (Berlin et al., 1986) nachgewiesen. Insbesondere *Linum spec.* scheinen also für die Lignan-Produktion in sogenannten Bioreaktoren geeignet zu sein. Allerdings werden auch Produktionsansätze mit Suspensionskulturen von *P. hexandrum* verfolgt. Die Optimierung der Kulturbedingungen führte dabei zu einer maximalen Podophyllotoxin-Menge von 48,8 mg / l nach einer Kulturperiode von 60 Tagen (Chattopadhyay et al., 2003).

Eine neue interessante Variante ist die Co-Kultivierung von *Linum flavum* hairy root Kulturen mit Zellsuspensionen von *P. hexandrum* (Lin et al., 2003). Dabei produzieren die Wurzelkulturen Coniferin, das von den undifferenzierten *Podophyllum*-Zellen aufgenommen und zu Podophyllotoxin umgesetzt wird.

1.5 Frühe Biosynthese – Phenylpropanstoffwechsel

Als Phenylpropanoidweg bezeichnet man die biochemischen Reaktionen, die von Phenylalanin ausgehend zur Bildung der sogenannten Monolignoleinheiten, 4-Cumaryl-Alkohol, Coniferyl-Alkohol und Sinapyl-Alkohol führen. Diese Alkohole wiederum sind die Bausteine der Zellwandsubstanz Lignin, nach Cellulose das zweithäufigste organische Polymer in der Natur. Lignane dagegen sind oligomere, meist dimere, Verbindungen von Monolignoleinheiten und anders als Lignin zumeist optisch aktiv.

Die Vorstellung von diesem Stoffwechselweg hat sich in den vergangenen Jahren mehrfach verändert, zuletzt insbesondere durch Ergebnisse der Genomanalyse von

Arabidopsis thaliana. Einen Überblick über das zur Zeit diskutierte Modell gibt Abbildung 6.

Phenylalanin wird zunächst von der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) desaminiert und die so entstandene Zimtsäure von der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) zur 4-Cumarsäure umgesetzt. Diese ersten Schritte sind seit langem bekannt, und PAL sowie C4H gehören zu den best untersuchten Enzymen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels.

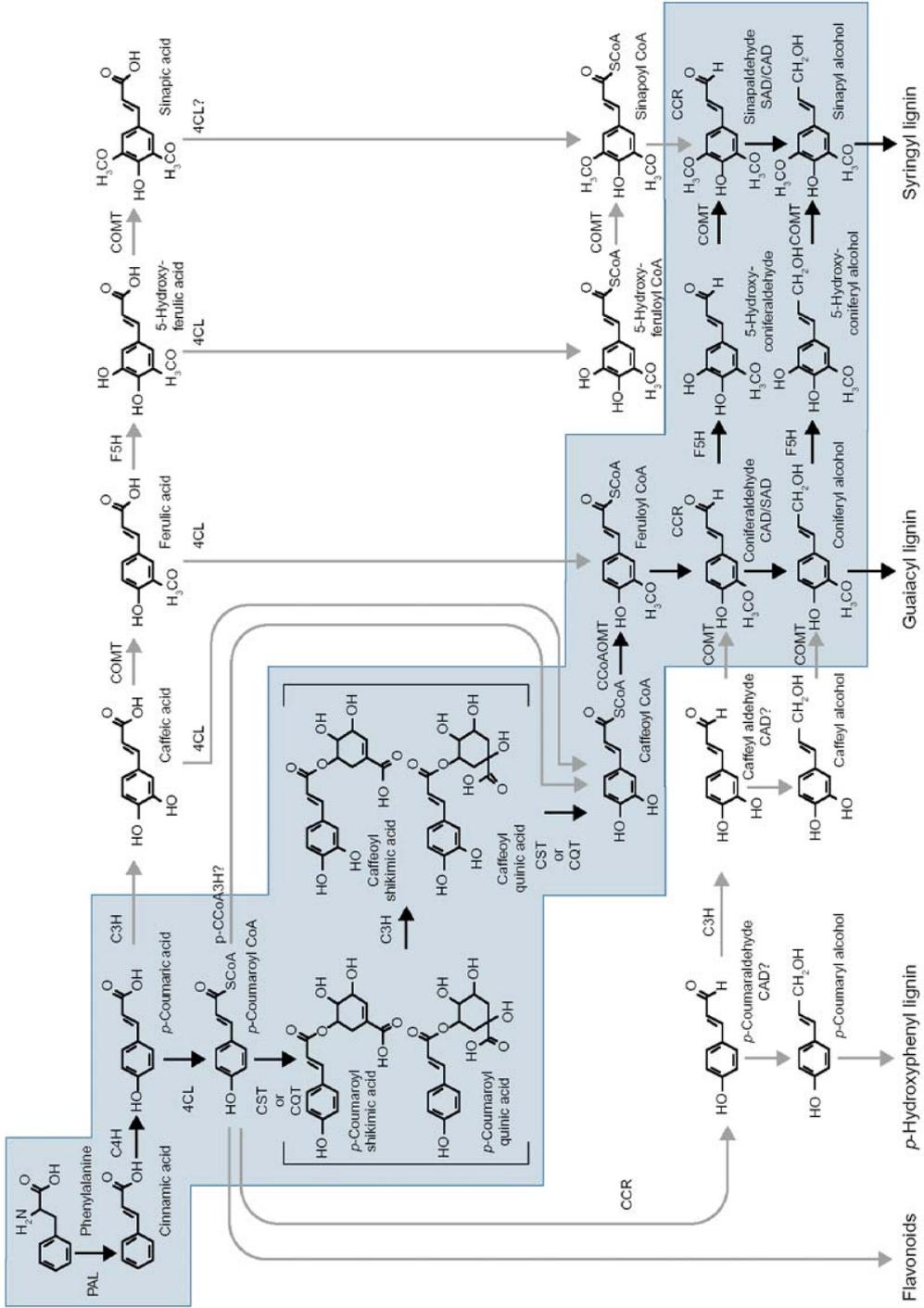


Abbildung 6: Überblick über den Phenylpropanstoffwechsel, entnommen aus Humphreys & Chapple 2002

Lange Zeit war unklar, auf welcher Stufe eine Hydroxylierung des 4-Cumaroyl-Restes an Position C3 zum entsprechenden Kaffeesäure-Derivat erfolgt. Sowohl die Säuren, als auch ihre CoA-Ester sowie die abgeleiteten Aldehyde, wurden diskutiert.

Neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass über die Zwischenstufe 4-Cumaroyl-CoA zunächst Cumaroyl-Shikimat bzw. -Chinat Ester gebildet werden (Van Doorselaere et al. 1995), die dann als Substrate für die 3-Hydroxylierung des 4-Cumaroylrestes genutzt werden (Schoch et al. 2001, Franke et al. 2002). Nach erneuter Bildung eines CoA Esters und der Übertragung einer Methylgruppe durch die Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase (CCoAOMT) entsteht Feruloyl-CoA (Kneusel et al. 1989), das von der Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) zu Coniferyl-Aldehyd und von der Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD) schließlich zu Coniferyl-Alkohol umgesetzt wird.

Die Biosynthese der Lignane vom Podophyllotoxin-Typ startet meist mit zwei Molekülen Coniferyl-Alkohol (Lewis & Davin 1999). Für die Bildung von Lignin spielen auch 4-Cumaryl-Alkohol und Sinapyl-Alkohol, sowie das Verhältnis der drei Einheiten zueinander eine Rolle (Humphreys & Chapple 2002).

Alle Hydroxylasen, die in diesem Stoffwechselweg vorkommen sind Cytochrom P450 abhängige Enzyme, wobei die C4H das häufigste und am leichtesten zu detektierende Enzym darstellt.

1.6 Frühe Lignan-Biosynthese – Von Coniferyl-Alkohol zu Matairesinol

Genau wie für Lignin sind auch für die Biosynthese der Lignane Monolignoleinheiten wie Coniferyl-Alkohol die Ausgangsverbindungen (Abbildung 7). Im ersten Schritt der Biosynthese werden zwei Einheiten stereospezifisch miteinander verknüpft. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass dies über radikalische Zwischenstufen geschieht, so dass der Mechanismus der Pinoresinol-Synthese dem einer Laccase ähnelt. Die Stereospezifität wird dabei durch ein sogenanntes Dirigierendes Protein gewährleistet, das selbst keine enzymatische Aktivität aufweist, aber die Stereochemie des Produktes festlegt (Davin et al., 1997, Davin & Lewis 2000). Da in *Forsythia spec.* (+)-Pinoresinol gefunden wird, in *Linum usitatissimum* dagegen (-)-Pinoresinol, geht man von verschiedenen Dirigierenden Proteinen in den unterschiedlichen Pflanzen aus.

In Zellkulturen von *Linum album* konnte ein Einbau der ¹³C-markierten Ferulasäure in DOP und Podophyllotoxin gezeigt werden (Seidel et al., 2002). Auch in *Podophyllum hexandrum* wurde der Einbau von Ferulasäure, sowie von Zimtsäure und Phenylalanin in Podophyllotoxin gezeigt (Jackson & Dewick 1984b). Demnach weisen die Monolignoleinheiten für die Lignan Biosynthese ein 4-Hydroxy-3-methoxy Muster auf, während die weiteren Hydroxylierungen und Methylierungen erst im späteren Verlauf eingefügt werden.

Die Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase (PLR) katalysiert die Umwandlung von Pinoresinol über Lariciresinol in Secoisolariciresinol in Abhängigkeit von NADPH. Auch diese Reaktionen laufen stereospezifisch ab und auch für dieses Enzym wurden verschiedene Isoformen in unterschiedlichen Pflanzen gefunden, die jeweils zu (+)- oder (-)-Secoisolariciresinol führen. Die Klonierung und kürzlich erfolgte Kristallisation der PLR zeigte eine Verwandtschaft zu Isoflavon-Reduktasen (Chu et al., 1993, Dinkova-Kostova et al., 1996, Min et al., 2003, J. Biol. Chem., in press). Die Secoisolariciresinol Dehydrogenase schließt den Lactonring zwischen C9 und C9' zum Matairesinol. Das etwa 32 kDa große, NAD-abhängige Enzym konnte aus *Forsythia intermedia* und *Podophyllum peltatum* aufgereinigt und heterolog exprimiert (Xia et al., 2001), nachdem seine Aktivität bereits zuvor in zellfreien Extrakten von *F. intermedia* nachgewiesen worden war (Umezawa et al., 1991)

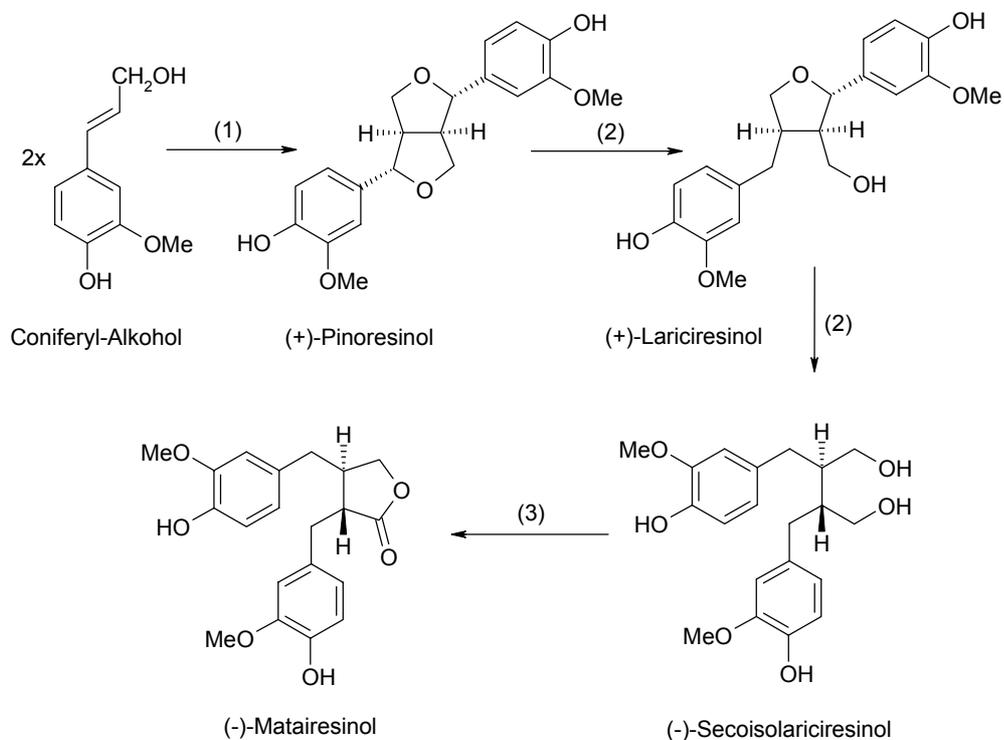


Abbildung 7: Lignan-Biosynthese – von Coniferyl-Alkohol zu Matairesinol (1) Pinoresinol Synthase; (2) Pinoresinol/Lariciresinol Reduktase, (3) Secoisolariciresinol Dehydrogenase

1.7 Späte Lignan-Biosynthese – verschiedene Modelle und Hypothesen

Im Gegensatz zur Bildung von Matairesinol ist die weitere Biosynthese von Podophyllotoxin und Derivaten wie MPTOX nicht vollständig geklärt. Um die Reaktionsfolge zu klären wurden verschiedene Modellsysteme herangezogen (Abbildung 8):

Podophyllum spec.: Durch Fütterungsversuche mit radioaktiven Vorstufen konnte gezeigt werden, dass Matairesinol der gemeinsame Vorläufer sowohl für die 4'-O-Methyl Serie (DOP, β -Peltatin, Podophyllotoxin), als auch für die 4'-Demethylserie (4'-Demethyl-DOP, α -Peltatin, 4'-Demethyl-Podophyllotoxin) ist (Broomhead et al., 1991, Phytochem. 30, 1489-92). Auf der Stufe der C2-C7'-Cyclolignane wie DOP wurden diese beiden Serien nicht mehr ineinander überführt (Jackson and Dewick, 1984, Phytochem., 23, 1037-42). Außerdem wurde nachgewiesen, dass in *P. hexandrum* Pflanzen radioaktiv markiertes Yatein in Podophyllotoxin eingebaut wird, nicht aber Podorhizol (POD) oder Anhydropodorhizol (AHP), obwohl auch diese Lignane in *P. hexandrum* vorkommen (Kamil and Dewick, 1986b, Phytochem. 25, 2093-102). Als direkte Vorstufe von α - und β -Peltatin konnten 4'-Demethyl-DOP bzw. DOP in *P. peltatum* und *P. hexandrum* bestätigt werden (Kamil and Dewick, 1986a, Phytochem. 25, 2089-92). Daraus lässt sich folgender Syntheseweg ableiten: Auf der Stufe von Matairesinol trennen sich die Biosynthesen der 4'-Demethyl und der 4'-O-Methyl Serie. Weitere Zwischenstufen sind Yatein und DOP, das die Vorstufe sowohl von β -Peltatin, als auch von Podophyllotoxin ist (entsprechendes gilt für die 4'-Demethyl Analoga). Für die Bildung von POD und AHP wird ein Chinon-Intermediat von Yatein vorgeschlagen, das gleichzeitig die reaktive Zwischenstufe bei der Umwandlung zu DOP sein könnte.

Anthriscus sylvestris: Vor kurzem wurde von Sakakibara et al. die Biosynthese von Yatein ausgehend von Matairesinol in *Anthriscus sylvestris* aufgeklärt (Sakakibara et al., 2003).. Für diese Untersuchungen wurde *A. sylvestris* Pflanzen [¹³C]-markiertes Phenylalanin gefüttert. Demnach erfolgen am hängenden, aromatischen Ring nacheinander zunächst die Hydroxylierung und anschließende Methylierung am C5'-Atom, danach die Methylierung der OH-Gruppe an C4' und abschließend die Knüpfung der Methylenedioxybrücke am zweiten Benzylring zwischen C4 und C5. Biotransformationsversuche mit Suspensionskulturen zeigten, dass DOP in Podophyllotoxin überführt wurde, nicht aber Yatein, das für die Zellen toxisch war, oder AHP (Koulman et al., 2003a). *In-planta* akkumulieren vor allem DOP und Yatein, Podophyllotoxin dagegen nur in geringen Mengen. Durch eine verfeinerte GC-MS-Methode (Koulman et al., 2001) konnten sowohl in Wurzeln, als auch in den oberirdischen Teilen weitere Lignane detektiert werden, von denen manche, wie z.B. 7-Hydroxymatairesinol nicht mit den von Sakakibara et al. gefundenen Zwischenstufen übereinstimmen. Allerdings wurden diese Lignane nur in sehr geringen Mengen gefunden.

Linum spec.: Für Wurzeln von *Linum flavum* beschreiben Xia et al., 2000 die Bildung von 7-Hydroxymatairesinol aus radioaktiven Vorstufen und dessen Einbau in das Endprodukt MPTOX.

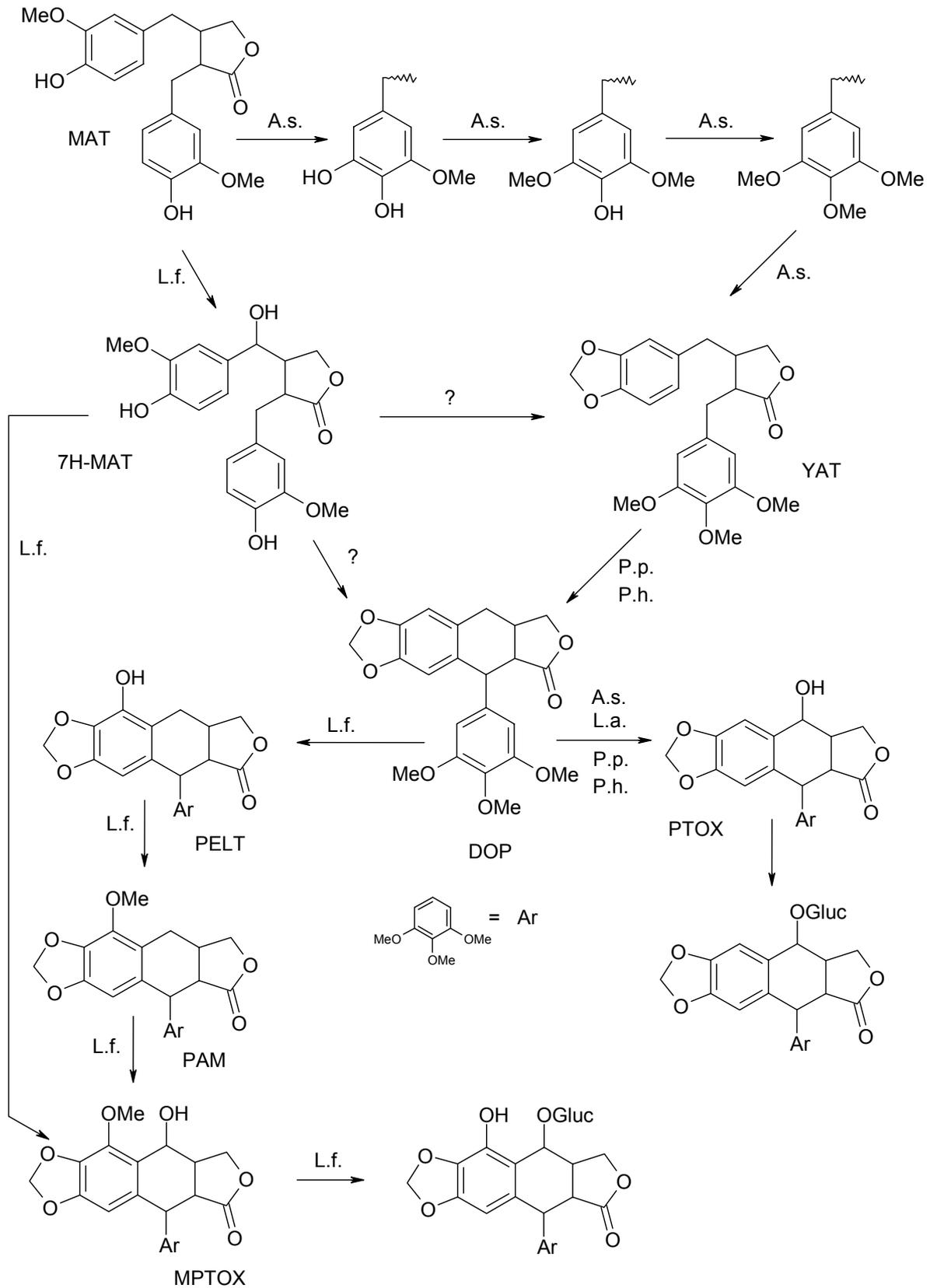


Abbildung 8: Metabolisierung von Matairesinol in verschiedenen Untersuchungssystemen; A.s. *Anthriscus sylvestris*, P.p. *Podophyllum peltatum*, P.h. *Podophyllum hexandrum*, L.f. *Linum flavum*, L.a. *Linum album*

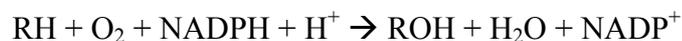
Umfangreiche Biotransformationsversuche in Suspensionskulturen von *Linum flavum* zeigten jedoch eine Umwandlung von Desoxypodophyllotoxin, sowie β -Peltatin in MPTOX und MPTOX-Glukosid (Van Uden et al., 1995a Van Uden et al., 1997, Van Uden 1997b). In denselben Kulturen war Podophyllotoxin nicht in MPTOX-Glukosid überführbar, obwohl dies das hauptsächlich gebildete Lignan ist. Stattdessen akkumulierte Podophyllotoxin- β -D-Glukosid (van Uden et al., 1992, van Uden 1993). Entsprechende Versuche mit Suspensionskulturen von *Podophyllum hexandrum* zeigten eine Biotransformation von Desoxypodophyllotoxin zu Podophyllotoxin und seinem Glukosid.

Diese Versuche sprechen dafür, dass Desoxypodophyllotoxin (DOP) in *Linum flavum* ein Intermediat im Biosyntheseweg zu MPTOX ist. Wird allerdings, wie von Xia et al., 2000 beschrieben bereits auf der Stufe von Matairesinol eine OH-Gruppe am C7-Atom eingeführt, ist eine Beteiligung von Desoxypodophyllotoxin nur schwer vorstellbar, da dies die Entfernung eben dieser OH-Gruppe voraussetzen würde.

In Zellkulturen von *Linum album* konnte die Umwandlung von DOP zu Podophyllotoxin gezeigt werden (Seidel et al., 2002, Empt et al., 2000), wobei dieser Schritt als geschwindigkeitsbestimmend diskutiert wird.

1.8 Cytochrom P450 Systeme in Pflanzen

Cytochrom P450-abhängige Enzyme werden sowohl als Mono-Oxygenasen, als auch als mischfunktionale Oxygenasen (mixed-function) bezeichnet. Beide Begriffe beschreiben den prinzipiellen Reaktionsablauf, bei dem molekularer Sauerstoff O_2 von der Häm-Gruppe des Cytochroms gebunden wird und üblicherweise ein Sauerstoff-Atom auf das jeweilige Substrat (Mono-Oxygenase) übertragen und das zweite zu Wasser reduziert wird, wobei die beiden Protonen vom Co-Faktor NADPH zur Verfügung gestellt werden. Ein vereinfachtes Reaktionsschema könnte also folgendermaßen formuliert werden:



Es werden demnach zwei unterschiedliche Moleküle oxidiert (gemischt-funktional). Im Gegensatz dazu übertragen Di-Oxygenasen beide Sauerstoffatome des molekularen Sauerstoffs auf dasselbe Substrat.

P450 Systeme stellen eine Elektronentransportkette dar, bei der die für die Reduktion des Sauerstoffes notwendigen Elektronen von der NADPH:Cytochrom P450-Reduktase auf das Cytochrom-tragende Protein übertragen werden. In mindestens einem Fall ist in Pflanzen außerdem Cytochrom b_5 als Elektronendonator für die maximale katalytische Aktivität notwendig (de Vetten et al., 1999). Bei *in-vitro* Tests kann die Zugabe von H_2O_2 die Aktivität der Reduktase ersetzen.

Cytochrom P450 Enzyme sind membranständig und in den meisten Fällen im Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert. In Zellaufschlüssen ist ihre Aktivität daher in der mikrosomalen Fraktion nachweisbar.

Die Bezeichnung P450 beschreibt ein Pigment, das nach Bindung von Kohlenstoffmonoxid CO eine deutliche Absorptionsbande bei 450 nm aufweist. Dieses CO-bindende Pigment wurde zuerst 1958 in den Mikrosomen von Rattenlebern und Schweinelebern nachgewiesen (Klingenberg, 1958, Garfinkel, 1958). Welche große physiologische Bedeutung diese Enzymklasse in allen höheren Lebewesen hat, wurde erst nach und nach entdeckt (Übersicht: Omura, 1999, 1999).

Der ersten Belege für die Existenz von Cytochrom P450 Enzymen in Pflanzen stammen aus den Jahren 1967 (Russell & Conn 1967) und 1969 (Frear et al., 1969). Letztere Veröffentlichung beschreibt die N-Demethylierung von Monuron, einem Herbizid auf Phenylharnstoffbasis, durch Mikrosomen von Baumwolle, erstere die Aktivität einer Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) in Erbsen-Keimlingen.

Es zeigte sich, dass neben den „klassischen“ Hydroxylierungen eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen katalysiert werden kann, wie Isomerisierungen, Dimersierungen, Epoxidierungen, Dealkylierungen und Decarboxylierungen, Oxidierungen von Stickstoff und Schwefel, Dehalogenierungen und Desaminierungen (zur Übersicht siehe u.a. Schuler, 1996; Schuler & Werck-Reichhart 2003; Halkier, 1996).

Cytochrom P450 Enzyme sind an vielen pflanzlichen Biosynthesewegen beteiligt wie dem Phenylpropanstoffwechsel, der Biosynthese von Alkaloiden, Terpenoiden, Glucosinolaten, Fettsäuren, Flavonoiden, Isoflavonoiden (Humphreys & Chapple 2000) und Cumarinen und der Detoxifizierung von Fremdstoffen wie Herbiziden (Übersichtsartikel: Bolwell et al., 1994, Durst 1988). Eine umfassende Behandlung von Cytochrom P450 Enzymen in Pflanzen würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen.

Die große Vielfalt der beschriebenen P450-katalysierten Reaktionen macht deutlich, dass viele oxidative Schritte der Lignan-Biosynthese P450-abhängig sein könnten. Dazu gehören die verschiedenen Hydroxylierungen, aber auch die Knüpfung der Methyldioxybrücke zwischen C4 und C5, sowie die Ringschlussreaktion zwischen C2 und C7'.

Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die C6 und C7 Hydroxylierungen von DOP zu β -Peltatin bzw. Podophyllotoxin in Zellkulturen von *Linum album* und *Linum flavum* Cytochrom P450 abhängig sind (Molog, 1997). Desweiteren sprachen Untersuchungen mit einer Suspensionskultur von *Linum album* für die Beteiligung einer Cytochrom P450-Oxygenase an der Bildung von Podophyllotoxin aus DOP (DOP7H) (Henges, 1999).

1.9 Aufgabenstellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über späte Biosyntheseschritte zu Lignanem vom Podophyllotoxin-Typ in *Linum spec.* zu gewinnen. Dazu standen neben Suspensionskulturen von *Linum album* und *Linum flavum* auch mehrere Linien einer Kultur von *Linum nodiflorum* zur Verfügung.

Von Interesse war insbesondere die Rolle von Desoxypodophyllotoxin (DOP), das als direkte Vorstufe sowohl von Podophyllotoxin (PTOX), als auch β -Peltatin angesehen wird. Zum einen sollte untersucht werden, ob sich Yatein in den Zellkulturen enzymatisch zu DOP umsetzen lässt, d.h. ob es eine Zwischenstufe in der Lignan-Biosynthese darstellt.

Zum anderen wurde die Metabolisierung von DOP insbesondere in *Linum nodiflorum* untersucht. Ziel dabei war es, die beteiligten Enzyme näher zu charakterisieren und Strategien für ihre weitere Konzentrierung zu entwickeln, sowie ihre biotechnologische Verwendbarkeit zu beurteilen.

Da die DOP6H als Cytochrom P450-Enzym nachgewiesen war, wurden außerdem Versuche unternommen, die für die Etablierung eines Reaktionssystems vorteilhaften homologen NADPH: Cytochrom P450-Reduktasen aus den beschriebenen *Linum spec.* molekularbiologisch zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzliche Zellkulturen

Suspensionskulturen undifferenzierter Zellen verschiedener *Linum* Spezies (*L. album*, *L. nodiflorum*) wurden in 50 ml MS-Li Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Alle sieben Tage wurden 5 g Zellen (Frischgewicht) unter sterilen Bedingungen in neues Medium überführt. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um eine Abwandlung des Mediums nach Murashige & Skoog 1962. In Einzelfällen wurde CB2-Medium verwendet (Petersen & Alfermann 1988)

Kalluskulturen wurden auf 100 ml MS-Li Agar in Glasgefäßen gehalten und alle 4-5 Wochen auf frisches Medium überführt.

2.2 Zellkulturmedien

2.2.1 Zusammensetzung des Kulturmediums MS-Li:

<u>Makroelemente (40fach):</u>		<u>Mikroelemente (100fach)</u>	
KNO ₃	47,5 g/l	H ₃ BO ₃	620 mg/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	9,25 g/l	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	860 mg/l
KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4,25 g/l	MnSO ₄ x H ₂ O	1,69 g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	11 g/l	KJ	83 mg/l
NH ₄ NO ₃	41,25 g/l	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	25 mg/l
		CuSO ₄ x 5H ₂ O	2,5 mg/l
		CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5 mg/l
		FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,78 g/l
		Na ₂ x EDTA	3,73 g/l

Vitaminlösung:

Thiamindichlorid 100 mg/100 ml; Pyridoxin x HCl und Nicotinsäure je 500 mg/100 ml

Naphthylessigsäure-Stammlösung (NAA):

20 mg NAA wurden in einem Eppendorf-Gefäß in 1 ml reinem Ethanol gelöst und unter Rühren zu ca. 80 ml Wasser gegeben. Anschließend wurde die Lösung in einem Messkolben auf genau 100 ml aufgefüllt. Die Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

Die Lösungen der Makro- und Mikroelemente wurden autoklaviert und ein Liter des Mediums wie folgt zusammengesetzt:

1l MS-Li

Lösung der Makroelemente 40 ml

Lösung der Mikroelemente 10 ml

100 mg myo-Inosit

30 g Saccharose

2 ml NAA-Lösung

1 ml Vitamin-Lösung

1 ml Glycin-Lösung (200 mg/100 ml)

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,5 N KOH auf 5,8 eingestellt.

Für die Herstellung eines festen Nährmediums wurde jeweils 1 g Agar auf 100 ml MS-Li Medium in ein Glasgefäß eingewogen und anschließend autoklaviert.

2.2.2 Zusammensetzung des Kulturmediums MS-Lf:

Für Zellkulturen von *Linum flavum* wurde ein anderes abgewandeltes MS-Medium verwendet. Die Kulturbedingungen waren wie oben beschrieben. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,5 M KOH auf 5,9 eingestellt.

Indolyl-3-essigsäure Lösung (IES):

50 mg IES wurden zunächst in 1 ml reinem Ethanol vorgelöst, zu ca. 80 ml Wasser zugegeben und anschließend auf 100 ml aufgefüllt. Die Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

Benzylaminopurin-Lösung (BAP):

20 mg BAP wurden in einem Eppendorf-Gefäß in 1 ml 0,5 M warmer HCl gelöst und anschließend unter Rühren zu ca. 80 ml Wasser gegeben. Anschließend wurde in einem Messkolben auf 100 ml aufgefüllt. Die Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

1l MS-Lf

Lösung der Makroelemente 40ml

Lösung der Mikroelemente 10 ml

40 g Saccharose, 100 mg myo-Inosit

1 ml Glycin-Lösung (200 mg / 100 ml)

1 ml Vitamin-Lösung

2 ml IES-Lösung, 5 ml BAP-Lösung

2.3 Elicitierungs- und Biotransformationsversuche:

Die Zeitpunkte, zu denen den jeweiligen Kulturen Substrate, Hemmstoffe oder Elicitoren zugesetzt wurden, variierten mit den Zellkulturen.

Die PTOX bildende Kultur von *L. nodiflorum* wies nach dem 10. Kulturtag noch einen deutlichen Anstieg ihres PTOX-Gehaltes auf. In diesem Fall wurden das Substrat DOP, die Hemmstoffe Tetcyclacis und Prohexadion-Calcium und die Lösungsmittel Aceton und Methanol als Negativ-Kontrolle am 6. Kulturtag zugegeben, und die Ernte erfolgte am 14. Tag. Tetcyclacis ist ein spezifischer Hemmstoff für Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen, während Prohexadion-Calcium 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen hemmt. Falls einer der Hemmstoffe eine Reduktion des PTOX Gehaltes bewirkt, so wäre dies ein Hinweis auf die Natur des gesuchten Enzyms, in diesem Fall also der DOP7H, die DOP direkt zu PTOX umsetzt.

Tetcyclacis wurde in Form einer 100 mM Stammlösung in Aceton gelöst und in 1000facher Verdünnung den Kulturen zugegeben (25 µl auf 25 ml Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben).

Prohexadion-Calcium (PHD) wurde als 10 mM Stammlösung in Wasser gelöst und in 100facher Verdünnung zugegeben (250 µl auf 25 ml Medium). Die Endkonzentration beider Hemmstoffe betrug also 100 µM.

Von DOP wurde eine 25 mM Lösung in Methanol hergestellt. Den Kulturen wurden je 50 µM DOP zugegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen nur die Lösungsmittel Methanol bzw. Aceton zugegeben wurden, um deren Effekte auf die PTOX Bildung ausklammern zu können.

Im Falle von Mediumsvariationen, wie dem NAA-Gehalt oder unterschiedlichen Konzentrationen von Metallionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} wurden die entsprechend veränderten Medien hergestellt. Es wurden Medien mit dem 2, 4, 10 und 20fache des üblichen Gehaltes an MnSO_4 , MgSO_4 und CaCl_2 verwendet. Außerdem wurden Medien mit dem doppelten, einem Viertel oder der Hälfte der üblichen Menge NAA von 0,4 mg / l angesetzt. Die Zellen wurden direkt in diese Medien überführt und nach sieben bis neun Tagen geerntet.

Elicitoren wie Methyljasmonat oder Salicylsäure wurden in Ethanol p.a. bzw. in Wasser gelöst, über einen Spritzenfilter sterilfiltriert und am dritten oder vierten Tag den Kulturen zugegeben. Methyljasmonat kam in Endkonzentrationen von 20, 50, 100 und 200 µM zum Einsatz. Das Lösungsmittel Ethanol wurde auch alleine zu den Zellen gegeben, um dessen Effekt, von dem des Methyljasmonat zu trennen. Dabei wurden maximal 100 µl Ethanol p.a. pro 25 ml Kulturansatz verwendet. Salicylsäure wurde in Endkonzentrationen von 0,1, 0,5 und 1 mM zugegeben.

Der pilzliche Elicitor PMG wurde in *aqua dest.* aufgekocht, kurz gerührt und am dritten bis fünften Tag den Kulturen zugegeben. Die Endkonzentrationen betragen 0,1, 0,2 und 0,5 mg PMG pro ml Kulturansatz, bei 25 ml also insgesamt 2,5, 5 und 12,5 mg. Zur

genaueren Charakterisierung eines PMG-Effektes wurden Kulturen am dritten Tag zusätzlich auf 10 μM Tetcyclacis eingestellt, oder es wurde das entsprechende Volumen (25 μl) des Lösungsmittels Aceton zugegeben.

Von dem Glucan Nigeran aus *Aspergillus japonicus* wurden 5 mg gelöst in 1 ml Ethanol p.a. zu einem Kulturansatz gegeben. Da es sich als schwer löslich erwies, wurde von weiteren Experimenten abgesehen.

Die Mediumsvariationen und Versuche mit verschiedenen Elicitoren wurden hauptsächlich mit *Linum album* Zellen durchgeführt, die Hemmstoffversuche mit *Linum album* und *Linum nodiflorum* Zellen.

2.4 Lignan-Extraktion aus Zellkulturen

Die zu extrahierenden Zellen wurden über einem Büchner-Trichter mit Rundfilter vom Medium befreit, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und danach für mindestens 24 Stunden gefriergetrocknet. Die trockenen Zellen wurden im Mörser zerrieben und jeweils 0,2 g für die Extraktion in ein Reagenzglas eingewogen. Anschließend wurden 2 ml Methanol p.a. zugegeben und die Zellen 2 x 30 Sekunden im Ultraschallbad weiter aufgeschlossen, wobei dazwischen eine 30 sekündige Kühlung auf Eis erfolgte, um eine Überhitzung zu vermeiden.

Danach wurden 8 ml H_2O zugegeben (mit H_3PO_4 auf pH 5 eingestellt), sowie 1 mg β -Glucosidase aus Mandeln ($\geq 1000\text{ U / mg}$; Roth). Während einer 3,5 stündigen Inkubation bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die glycosidierten Lignane in ihre Aglyka überführt. Anschließend wurden 10 ml Dichlormethan zugegeben, 20 min gerührt, weitere 20 min bei 900 g zur Phasentrennung zentrifugiert und die Dichlormethanphasen (unteren Phasen) gesammelt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 3 x 500 μl Methanol p.a. gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Sedimentierung von Schwebeteilchen 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die so gewonnenen Extrakte wurden nach Bedarf mit Methanol p.a. oder 90% Methanol verdünnt und mittels HPLC und externer Standards auf ihren Lignangehalt überprüft.

2.5 Lignan-Extraktion aus frischem Pflanzenmaterial

Die Sammlung von *Anthriscus sylvestris* Rhizomen und Wurzeln erfolgte am 10.6.2002. Zu diesem Zeitpunkt trugen die Pflanzen nur noch wenige Blüten, aber z.T. schon reife Früchte. Es wurden Pflanzen aus dem Garten des Instituts für Pharmazeutische Biologie in Marburg (917 g Frischgewicht), sowie von Grünflächen aus Gießen (700 g Frischgewicht) verwendet..

Die Rhizome wurden von Erde befreit, ca. 2 Stunden bei 50 °C in einem Inkubator vorgetrocknet und anschließend kleingeschnitten. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Um das Auftreten von DOP in den unterirdischen Teilen zu verifizieren, wurde zunächst eine Lignanextraktion (siehe vorhergehendes Kapitel) sowie anschließende HPLC-Analyse mit getrocknetem Material durchgeführt.

Für die HPLC-Analyse wurde 35% Acetonitril als Laufmittel und eine HyPURITY Elite C-18-Säule verwendet, die Flussrate betrug 1,8 ml / min, die Detektionswellenlänge 280 nm.

Mit Hilfe eines externen Standards wurde der DOP Gehalt in den Rhizomen bestimmt. Bei der Charge aus Marburg betrug er ca. 7 mg DOP / g Trockengewicht (also etwa 0,7%), beim Material aus Gießen dagegen ca. 4,5 mg / g Trockengewicht.

Für die eigentliche Extraktion wurde etwa die Hälfte der kleingeschnittenen Rhizome zunächst gefriergetrocknet, in einem Mörser homogenisiert und in einen 6 l Rundkolben überführt. Das Homogenat wurde in jeweils 1,5 l Methanol drei mal acht Stunden unter Rückfluss gekocht. Die gefilterten methanolischen Auszüge wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer bis auf einen zähflüssigen braunen Rückstand eingengt. Dieser Rückstand wurde mit dreimal 200 ml Petrolether ausgeschüttelt. Der Petroletherphase wurden wenige Gramm Kieselgel 60 (mesh 70-230) zugegeben und anschließend zur Trockne eingengt.

Das mit dem Extrakt überzogene Kieselgel wurde auf eine voräquilibrierte Säule (45 cm x 4,5 cm i.D.) desselben Materials aufgetragen. Als Laufmittel wurde n-Hexan/Aceton 2:1 (v/v) verwendet. Es wurden Fraktionen von ca. 15 ml gesammelt, deren DOP Gehalt mittels HPLC und externem Standard überprüft wurde. Die DOP-enthaltenden Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung vereinigt.

Nach Literaturangaben (Vanuden et al., 1997) sollte ein weiterer Reinigungseffekt durch Chromatographie an einer Amberlite-XAD2-Säule (35 cm x 2,5 cm i.D.) mit Methanol als Fließmittel erzielt werden können, weshalb dieses Verfahren als nächster Schritt gewählt wurde. Allerdings war die Fokussierung von DOP nicht gut genug, um eine signifikante Abtrennung der restlichen Substanzen zu erreichen. Auch eine zweite Chromatographie an Kieselgel 60 (Säule: 35 cm x 2,5 cm i.D., Laufmittel analog zur ersten Chromatographie an Kieselgel 60) brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Die Trennung der Einzelsubstanzen erfolgte schließlich über eine semipräparative Hypersil-ODS-Säule (250 x 8,0 mm, 5 µ) mittels HPLC, wobei als Laufmittel 60 % Methanol in Wasser verwendet wurde. Dabei wurden die beiden Hauptpeaks manuell aufgefangen. Das Volumen der gesammelten Fraktionen wurde am Rotationsverdampfer reduziert, wobei ein erster Teil der gelösten Substanzen ausfiel.

Nach Einengung zur Trockene wurden die Rückstände in dreimal 500 µl Ethylacetat resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und über Nacht im Exsikkator erneut getrocknet. Resuspension in 200 µl Methanol p.a. mit Hilfe eines Ultraschallbades führte zu einem flockig weißem Niederschlag.

DOP wurde in der HPLC-Analyse mit Hilfe eines authentischen Standards nachgewiesen.

2.6 Chemische Umwandlung von 4'-Demethyl-PTOX zu 4'-Demethyl-DOP

4'-Demethylpodophyllotoxin wurde freundlicherweise von T.F. Imbert zur Verfügung gestellt. Die katalytische Hydrierung zum entsprechenden Desoxypodophyllotoxin-Derivat erfolgte wie von Jackson & Dewick 1984a beschrieben.

Dazu wurden 50 mg 4'-Demethyl-PTOX mit zusammen mit derselben Menge eines Pd-C Katalysators (10 %) in 10 ml Essigsäure gelöst. Das Gemisch wurde in einem Ölbad auf 95 °C erhitzt und eine Stunde unter ständigem Rühren und mit Hilfe einer Pasteur-Pipette leicht mit Wasserstoff durchspült. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von 50 ml Ethanol / Wasser (1:1, v/v) verdünnt und über einen Filter gegeben, wobei der Pd-C Katalysator im Filter verblieb. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, in einer kleinen Menge Methanol resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Nach erneuter Trocknung ließ sich das zurückgewonnene Gewicht bestimmen. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels HPLC überprüft, wobei Acetonitril / Wasser (40:60, v/v) als Laufmittel verwendet wurde. Trennung erfolgte über eine HyPURITY Elite C18-Säule, die Flussrate betrug 1,8 ml / min, Detektionswellenlängen waren 330 nm und 280 nm.

2.7 Kopplungsversuch von 4'-Demethyl-DOP an Sepharose 6B

4'-Demethyl-DOP sollte als spezifischer Ligand der DOP6H für eine Affinitätschromatographie verwendet werden, da das eigentliche Substrat DOP keine funktionellen Gruppen aufweist, über die es sich an eine Säulenmatrix koppeln ließe. Als passendes Säulenmaterial wurde epoxy-aktivierte Sepharose 6B von Amersham/Pharmacia gewählt, die eine Kopplung über Hydroxylgruppen erlaubt. Gleichzeitig erfolgt die Bindung an dieses Material über sogenannte Spacer-Moleküle, die gewährleisten, dass auch niedermolekulare Liganden an der Säule sterisch zugänglich bleiben.

Die Kopplung wurde im Wesentlichen durchgeführt wie vom Hersteller empfohlen. Zunächst wurde die Sepharose in destilliertes Wasser gegeben, wobei durch Quellung das eigentliche Gel entsteht, das anschließend über eine Glasfritte mit 100 ml H₂O / g Sepharose gewaschen wurde. Es wurden 3 g Sepharose eingesetzt.

Die Kopplungsreaktion wurde in einem Natriumcarbonat-Puffer durchgeführt, der auf pH 9 eingestellt wurde. 20 mg 4'-Demethyl-DOP wurden in 1 ml Dimethylformamid (DMFA) gelöst und der Kopplungspuffer auf 15 % DMFA eingestellt, um den Liganden in Lösung zu halten. Da DMFA die pH-Elektrode schädigen könnte, wurde der pH-

Wert mit Hilfe von Universal-pH-Papier überprüft. Nach Zugabe der Sepharose wurde der Ansatz bei 40 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das Säulenmaterial über einen Büchner-Trichter mit Filter zunächst mit Kopplungspuffer und destilliertem Wasser gewaschen und anschließend abwechselnd mit einem 0,1 M Boratpuffer (pH 8,0, 0,5 M NaCl) und einem Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 4,0, 0,5 M NaCl). Die erste Waschfraktion wurde aufgefangen, um eventuell darin enthaltenen Liganden wieder extrahieren zu können.

Auf eine Behandlung mit Ethanolamin zur Sättigung der verbliebenen reaktiven Gruppen am Säulenmaterial wurde verzichtet, da dieses stark basisch wirkt und dadurch den Liganden hätte schädigen können.

Die gekoppelte und gespülte Sepharose wurde dann mit Hilfe eines Glasstabes luftblasenfrei in eine FPLC-Säule (10 cm x 1 cm i.D.) gefüllt.

2.8 Mikrosomenpräparation

Sieben bis neun Tage alte Zellen wurden über einen Büchner-Trichter mit Rundfilter vom Medium getrennt, das Frischgewicht bestimmt und ca. 20% dieses Gewichtes an Polyclar 10 zugegeben. Das Gemisch wurde in einem auf Eis vorgekühlten Mörser zusammen mit 1 ml Mikrosomenpuffer pro Gramm Frischgewicht gemörsert.

Mikrosomenpuffer:

Tris / HCl	0,1 M pH 7,4
DTT	1 mM
DIECA	1 mM

DTT und DIECA wurden direkt vor der Präparation aus 1 M Stammlösungen zugegeben.

Anschließend wurden die zerkleinerten Zellen 20 min bei 4 °C und 8000 x g in einem SS34 Rotor zentrifugiert. Das Volumen des Überstandes wurde bestimmt, durch langsames Zutropfen auf 50 mM MgCl₂ eingestellt und 20 min auf Eis gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 37500 x g im SS34 Rotor wurde der Überstand dekantiert und verworfen, das Sediment in 1 ml Mikrosomenpuffer resuspendiert und in einem 5 ml Glashomogenisator homogenisiert. In einigen Fällen wurde diese Präparation anschließend auf eine PD10 Größenausschlußsäule gegeben, um den Hintergrund an endogenen niedermolekularen Substanzen für die HPLC Analyse herabzusetzen. Die PD10-Säule wurde zuvor mit mindestens 20 ml Mikrosomenpuffer äquilibriert und anschließend mit demselben Volumen gespült. Das Auftragsvolumen betrug 3 ml.

Die so gewonnenen Mikrosomenpräparation wurde in ein graduiertes Reagenzglas überführt, mit Mikrosomenpuffer auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und die Gesamtproteinkonzentration mit der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

2.9 Enzymtest für die DOP 6-Hydroxylase (DOP6H)

Der Standard-Enzymtest für die DOP6H hatte ein Volumen von 500 μ l. Die Inkubationszeit betrug sieben bis zehn Minuten bei der Bestimmung der K_m -Werte, war aber innerhalb einer Testreihe stets einheitlich. Für den Nachweis der DOP6H Aktivität bzw. weitere Charakterisierungen wurde eine Reaktionszeit von 20 min gewählt. Bei Nachweisreaktionen für andere Enzymaktivitäten als die der DOP6H wurde bis zu 24 Stunden inkubiert. Die Tests wurden in einem Wasserbad bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen (50 μ l) 6 N HCl abgestoppt. Anschließend wurde jeder Ansatz dreimal mit 1 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden gesammelt und in einem Exsikkator bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Die so behandelten Proben wurden in 100 μ l 90 %igem Methanol resuspendiert und zur Sedimentierung von Schwebeteilchen 5 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Standard-Test:

DOP (10 mM in Methanol p.a.)	5 μ l
NADPH (50 mM)	5 μ l
Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,4)	40 μ l
Mikrosomenpräparation (Proteinkonz.: 0,6-1 mg/ml)	450 μ l

Um die Rolle von NADH als Cofaktor zu testen, wurde es anstelle von NADPH im Enzymtest verwendet (10 μ l einer 50 mM Stammlösung, da eine geringere Aktivität zu erwarten war). Die beiden Cofaktoren wurden außerdem in verschiedenen Konzentrationen miteinander kombiniert, um einen möglichen synergistischen Effekt detektieren zu können (siehe Abschnitt 3.6.2). Für die Bestimmung der K_m -Werte von NADPH und DOP mussten diese in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben werden. Dazu wurden verschiedene Stammlösungen erstellt (50, 5, 0,5 mM NADPH und 10, 1, 0,1 mM DOP). Unterschiedliche Volumina bei der Zugabe des in Methanol gelösten DOP wurden durch zusätzliches Methanol p.a. ausgeglichen, um einen störenden Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen.

2.10 Weitere Enzymtests

Zusätzlich zu Tests auf die Beteiligung von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen wurden auch Tests für 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen und Peroxidasen durchgeführt. Enzyme dieser beiden Klassen befinden sich im Cytosol, weshalb nicht die Mikrosomenpräparation für die Enzymtests eingesetzt wurde, sondern der Rohextrakt genannte erste Zellaufschluss nach dem Sedimentieren der schwereren Zellbestandteile. Die Proteinkonzentration des Rohextraktes wurde nach Bradford (1976) bestimmt und der Extrakt zumeist ohne weitere Verdünnung im Enzymtest eingesetzt, wodurch sich Konzentrationen von 2 – 3,5 mg / ml Gesamtprotein im eingesetzten Rohextrakt ergaben. Neben 2-Oxoglutarat wurden Na-Ascorbat und Fe(II)-sulfat als Cofaktoren zugegeben. Die Testansätze wurden bei 30 °C zwischen 15 und 90 min inkubiert. In Einzelfällen wurde den Ansätzen Katalase zugegeben (10 µl einer Stammlösung 0,2 mg / ml; 65000 U / mg). Die Tests wurden gestoppt und weiterverarbeitet, wie für den DOP6H-Test beschrieben.

Dioxygenase-Test

5 µl 2-Oxoglutarat (25 mM)

5 µl Fe(II)-sulfat (10 mM)

5 µl Na-Ascorbat (0,5 M)

10 µl Substrat (z.B. Yatein oder MAT, 10 mM)

25 µl Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,4)

450 µl Rohextrakt

Bei Tests auf Peroxidase-Aktivität wurde neben dem zu testenden Substrat nur H₂O₂ als Cofaktor zugegeben (5 µl einer 10 mM Stammlösung pro 500 µl Testvolumen). Inkubation erfolgte analog zu den Dioxygenase-Tests.

Außerdem wurde der Standardtest auf Cytochrom P450-Aktivität abgewandelt, um den möglichen Umsatz von anderen Substraten als DOP detektieren zu können. Als Zeitpunkt der Mikrosomenpräparation wurden die Kulturstage 5-13 getestet, die Menge des im Mikrosomenpuffer enthaltenen DTT wurde variiert (1 mM, 0,1 mM, ohne DTT), ebenso wie die Inkubationstemperatur (23, 25, 30, 35 °C), das Ansatzvolumen (1, 5, 10 ml) und die Menge des eingesetzten Substrats (bei Yatein: 50 µM, 100 µM, 500 µM Endkonzentration im Test). Es wurden Testansätze mit geöffneten Deckeln inkubiert um den Austausch von Sauerstoff, der für Oxygenase-Reaktionen essentiell ist, zu fördern. In einigen Fällen wurde zur Kontrolle die Aktivität der Zimtsäure 4-Hydroxylase in den Mikrosomenpräparationen getestet, da diese das häufigste Cytochrom P450-Enzym in pflanzlichen Zellen ist. Der Test wurde entsprechend dem für die DOP6H durchgeführt, mit Zimtsäure (Stammlösung: 10 mM in 50 % Methanol) anstelle von DOP als Substrat und verlief stets positiv, d.h. es konnte die Bildung von p-

Cumarsäure in der HPLC-Analyse nachgewiesen werden. Dadurch konnte ein systemischer Fehler bei der Präparation der Mikrosomen ausgeschlossen werden.

2.11 HPLC

Es wurden HPLC-Systeme der Firmen Kontron (Kontron Instruments, HPLC-Pump 422, Detektor 430A) und Merck (Merck-Hitachi L-6000 Pump, D2500 Chromato-Integrator, Spectro Monitor[®] 3200 von LDC-Analytical) verwendet. Bei analytischen Trennungen handelte es sich um eine Chromatographie an einer RP-C18-Säule (HyPURITY Elite C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ + Vorsäule 2 cm), d.h. es wurden polare Laufmittel (mobile Phase) verwendet, und die Retentionszeiten der zu trennenden Substanzen an der unpolaren Säule waren um so länger, je unpolarer die jeweilige Substanz war. Um zu verhindern, dass Schwebeteilchen sich auf der Säule absetzen wurden die Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Außerdem waren der Trennsäule jeweils Vorsäulen vorgeschaltet, die bei Bedarf in Methanol p.a. durch kurze Behandlung im Ultraschallbad gereinigt wurden.

Für semipräparative Trennungen wurde eine Hypersil ODS Säule (250 x 8,0 mm, 5 μ + Vorsäule 2 cm) verwendet

Die ursprüngliche Aufgabe bestand darin, ein einfaches, isokratisches Protokoll für die Trennung von Yatein und DOP zu etablieren. Mit Methanol-Wasser-Gemischen als Laufmittel ließ sich allerdings keine zufriedenstellende Trennung der beiden Lignane erreichen, weshalb auf Acetonitril-Wasser-Gemische umgestellt wurde. In den meisten Fällen wurde 40 % Acetonitril (v/v) verwendet. Das Laufmittel wurde in einem Standzylinder angesetzt und 10 min im Ultraschallbad entgast. Für analytische Zwecke wurde das Laufmittel im geschlossenen Kreislauf zurückgeführt und wiederverwendet, nicht jedoch bei präparativen Fragestellungen. Je nach Bedarf (Analyse von Lignanextrakten, Enzymtests, semipräparative Trennung) wurde das verwendete Laufmittel von 30 % bis 50 % Acetonitril variiert.

Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm, Flussraten variierten bei analytischen Messungen zwischen 1,5 und 1,9 ml / min, bei präparativen Anwendungen zwischen 4 und 6 ml / min.

2.12 Fraktionierung des Mikrosomenextraktes durch doppelte Phasentrennung mit Triton X-114

Das Prinzip der doppelten Phasentrennung mit Triton X-114 wurde von Andersen & Moller (1998) beschrieben. Durch diese Methode sollen insbesondere Proteine der Cytochrom P450 Familie angereichert werden, da sie sich nach der

temperaturinduzierten Phasentrennung je nach Zusammensetzung des Puffers in der Triton-armen oder der Triton-reichen Phase ansammeln.

Zunächst wurde eine Mikrosomenpräparation durchgeführt. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das Mikrosomensediment in ca. 3 ml des ersten Phasentrennungspuffers aufgenommen. Die Lösung wurde auf 1 % Triton X-114 eingestellt und 30 min in einem Eisbad gerührt. Um die Phasentrennung herbeizuführen, wurde anschließend für 25 min bei 24500 x g in einem auf 22 °C temperierten Rotor zentrifugiert. Unter den eingestellten Bedingungen sollen sich die Cytochrom P450 Proteine in der oberen, Triton-armen Phase befinden.

Als nächstes mußte ein Puffer-Austausch in den 2. Phasentrennungspuffer erfolgen. Dies geschah entweder, wie bei Andersen & Moller (1998) beschreiben, durch Dialyse (3 x 20 min) oder mit Hilfe einer PD10-Säule (Amersham), also einer Größenausschluß Chromatographie. Zur Dialyse wurde ein Schlauch aus dem ZelluTrans[®]-System von Roth verwendet (nominales MWCO 12000-14000, Wanddicke 20 µm, Volumen / cm 1,98 ml).

Die zweite Phasentrennung erfolgte entsprechend der ersten, allerdings sollte sich die Cytochrom P450 Fraktion diesmal in der oberen, Triton-reichen Phase befinden. Bei einem Glycerinanteil zwischen 20 und 30 % im Puffer stellt sich keine Phasentrennung ein, daher wurde besonders auf eine ausreichende Glycerinmenge geachtet.

Da die hochviskosen Triton-reichen Phasen nur schwer zu pipettieren sind, wurde in jedem Fall die Triton-arme Phase abgenommen.

1. Phasentrennungspuffer

30 mM Borsäure / KOH

1 mM DTT

15 % Glycerin

pH 8,6

2. Phasentrennungspuffer

120 mM Phosphat Puffer

30 % Glycerin

pH 7,9

Dialysepuffer

50 mM Kalium-Phosphat Puffer

2 mM DTT

10 % Glycerin

pH 7,9

2.13 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform

Um die Proteine für die elektrophoretische Auftrennung zu konzentrieren, wurde versucht, sie mit Hilfe von Methanol und Chloroform auszufällen. Dazu wurde ein definiertes Volumen einer Proteinlösung (Rohextrakt oder Mikrosomen) mit dem

vierfachen Volumen Methanol p.a. versetzt und gemischt. Anschließend wurde das doppelte Volumen der Proteinlösung an Chloroform zugegeben und wiederum gemischt. Nach Zugabe des dreifachen Ursprungsvolumens an Wasser und erneuter Mischung, sowie einminütiger Zentrifugation bei 9000 g stellt sich eine Phasentrennung ein, wobei sich die ausgefällten Proteine in der Interphase befinden. Die obere Phase wurde verworfen, die Interphase im Reaktionsgefäß belassen. Nach erneuter Zugabe von Methanol p.a. (dreifaches Volumen der ursprünglichen Proteinlösung) und Zentrifugation bei 9000 g für zwei Minuten befanden sich die Proteine im Sediment. Diese Fällung wurde je nach Ausgangsvolumen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen oder in 50 ml Greiner-Röhrchen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass sich die gefällten Proteine, insbesondere der mikrosomalen Fraktion, nach der Fällung nur sehr schlecht wieder lösen ließen. Auch in SDS-Auftragspuffer und nach Erhitzung auf 95 °C für 5 Minuten verblieb ein unlöslicher Rückstand. Im weiteren wurden daher die ungefällten Extrakte für die Elektrophorese verwendet. Dies beschränkte die Auftragsmenge pro Spur auf maximal 200 µg.

2.14 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, wie bei Lämmli (1970) beschrieben. Es wurden 20 x 20 cm große Glasplatten und 1,5 mm tiefe Spacer verwendet. Zwischen die vertikal angeordneten Platten wurde zunächst das 10 %ige Trenngel gegossen und während der Polymerisation mit ca. 2 ml wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach ca. 1 h konnte das n-Butanol abgegossen, das Trenngel mit etwas Wasser gespült und das 4,5 %ige Sammelgel aufpolymerisiert werden.

Trenngel

1,5 M Tris/HCl pH 8,8	15 ml
30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid	20 ml
20 % SDS	0,3 ml
H ₂ O demin.	23,8 ml
5 % TEMED	0,3 ml
3 % APS	0,6 ml

Sammelgel

0,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml
30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid	3,35 ml
20 % SDS	0,1 ml
H ₂ O demin.	13,35 ml
5 % TEMED	0,1 ml
3 % APS	0,6 ml

Da APS die radikalische Polymerisation startet, wurde es als letztes zugegeben. Die Elektrophorese wurde entweder über Nacht bei 60 V oder innerhalb von 3-4 h bei 250 V durchgeführt.

2.15 LDS-PAGE

Für die Luminol-Färbung Häm-tragender Proteine wurde eine Lithium-Dodecylsulfat (LDS)-PAGE durchgeführt. Es ist in der Literatur (Bonfils et al., 1995, und Zitate darin) beschrieben, dass bei Verwendung von LDS anstelle von SDS, die prosthetischen Häm-Gruppen während der Elektrophorese eher an den Proteinen verbleiben. Die Abwandlungen zur SDS-PAGE sind bei Bonfils et al., 1995.

<u>LDS-Elektrophoresepuffer 1 l</u>	<u>LDS-Auftragspuffer</u>
3 g Tris	50 mM Tris/HCl pH 8,9
14,4 g Glycin	10 % Glycerin
1 g LDS	1 % LDS
0,37 g EDTA	0,1 % Bromphenolblau

Beim Gießen von Trenn- und Sammelgel wurde auf LDS verzichtet. Stattdessen wurde das Detergenz während einer Vorelektrophorese von einer Stunde bei 200 V eingeführt.

2.16 Silberfärbung von Proteingelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können in einer Polyacrylamidmatrix mit Silbernitrat angefärbt werden. Das Prinzip dieser Färbung ist bei Blum et al. (1987) beschrieben. Allerdings konnten die dort angegebenen Inkubationszeiten reduziert werden:

Fixierung	a) 50 % Ethanol, 12 % Essigsäure	20 min
	b) 30 % Ethanol	10 min
Verstärkung	0,2 g / l Na-thiosulfat	1 min
Waschen	H ₂ O demin.	3 x 10s
Färbung	2 g / l Silbernitrat, 0,75 ml / l Formaldehyd	20 min
Waschen	H ₂ O demin.	3 x 10s
Entwicklung	60 g / l Na-carbonat, 0,5 ml / l Formaldehyd	
	200 ml / l Na-thiosulfatlösung	var.
Fixierung	25 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 5 % Glycerin	var.

Die Fixier-, sowie die Entwicklerlösung wurden jeweils frisch hergestellt (ca. 200 ml pro Gel) und einmalig verwendet. Die Silbernitratlösung konnte dagegen mehrmals verwendet werden, falls nach zwei bis drei Färbungen Formaldehyd wieder frisch zugefügt wurde.

Die Entwicklung erfolgte bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, die abschließende Fixierung bis keine Bläschenbildung mehr zu beobachten war.

Die Gele wurden entweder durch Photographien dokumentiert (Nikon Coolpix 995), oder zwischen zwei Lagen Zellophan in einem Kunststoffrahmen getrocknet.

2.17 Luminol-Färbung von Proteingelen

Proteine, die eine Häm-Gruppe enthalten, können durch Luminol mittels Chemolumineszenz detektiert werden, wie von Bonfils et al. (1995) beschrieben. Die Detektionslösung bestand dabei aus:

<u>Luminol-Lösung</u>		<u>PBS pH 7,4</u>
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	100 ml	137 mM NaCl
0,1 M Luminol in DMSO	2 ml	2,7 mM KCl
0,02 M Iodophenol in DMSO	2 ml	10 mM Na ₂ HPO ₄
30 % H ₂ O ₂	40 µl	2 mM KH ₂ PO ₄

Da die in der Literatur beschriebene Detektionsapparatur nicht zur Verfügung stand, wurden verschiedene Alternativen getestet. Dabei war darauf zu achten, dass die gesamte Gelfläche gleichmäßig mit der Luminol-Lösung in Kontakt kommt, sich das Gel während des Detektionszeitraums nicht verschiebt und die Luminol-Lösung nicht in Berührung mit dem Röntgenfilm kommt, sofern ein solcher verwendet wurde.

Zunächst wurde versucht, das Gel zusammen mit der Luminol-Lösung in Plastikfolie einzuschweißen und die Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette zu detektieren. Allerdings kam es dabei zu einem Austritt der Luminol-Lösung. Daher wurde das Gel stattdessen mit der Luminol-Lösung in einem durchsichtigen Plexiglasrahmen deponiert, wie er für das Gießen horizontaler Agarosegele verwendet wird, und dieser direkt auf einen lichtempfindliche Röntgenfilm gestellt. Der Aufbau wurde durch Kartonagen im Dunkelraum vor Lichteinwirkung geschützt und der Film nach zwei bis drei Stunden entwickelt.

Die dritte Variante war die Verwendung eines Bioimagers (raytest, Detektionssoftware Diana II, Messung mit Chemolumineszenzfilter). Hierbei wurden Gel und Luminol-Lösung wiederum im Plexiglasrahmen in Kontakt gebracht, und die Chemolumineszenz wurde in einem abgedunkelten Behältnis von einer CCD-Kamera aufgenommen. Der Detektionszeitraum lag zwischen fünf Minuten und einer Stunde.

Als Positivkontrolle der Elektrophorese wurde ein Häm-Standard hergestellt, bestehend aus einer Catalase-Lösung (aus *Micrococcus lysodeikticus* 192000 U / ml; Fluka) und einer 10 mM Cytochrom c-Lösung, die im Verhältnis 1 : 1 gemischt wurden. Von diesem Standard wurden jeweils 10 µl auf eine Gelspur aufgetragen.

Die mit DMSO hergestellten Stammlösungen von Luminol und Iodophenol wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.18 RNA Isolierung

Es wurden zwei verschiedene Methoden der RNA-Isolierung aus Zellmaterial getestet. Im ersten Verfahren wurden 10 bis 20 g Zellen in flüssigem Stickstoff gemörsert und zu einem Gemisch aus 20 ml TE-gesättigtem Phenol und 25 ml Extraktionspuffer (1) gegeben, das zuvor auf 50 °C temperiert wurde. Nach kurzem Mischen mit Hilfe eines Magnetrührers wurden 15 ml Chloroform zugegeben und das Gemisch für 20 min gerührt. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 12000 g in einem SS34-Rotor in zuvor autoklavierten Zentrifugenröhrchen. Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und erneut mit Phenol und Chloroform extrahiert und zentrifugiert wie beschrieben. Die zweimal extrahierte wässrige Phase wurde mit einem Zehntel Volumen 3 M Na-Acetat und einem Volumen Isopropanol verestert und für ein bis zwei Stunden bei -20 °C inkubiert. Um die Nukleinsäure auszufällen reicht auch weniger Isopropanol, wenn das Volumen der Reaktionsgefäße beschränkt ist, aber es sollte sich nicht um weniger als ein Sechstel des Volumens der wässrigen Phase handeln.

Extraktionspuffer (1)

50 mM Tris/HCl pH 8,0
200 mM NaCl
10 mM EDTA
2 % SDS (w/v)

TE-gesättigtes Phenol

250 g Phenol
+ 75 ml TE-Puffer
bei 50 °C lösen

Die gefällte Nukleinsäure wird anschließend bei 4 °C und 10000 g für 20 min sedimentiert, das Sediment kurz an der Luft getrocknet und in TBE-Puffer resuspendiert. Zu dieser Nukleinsäure-Lösung wird ein Drittel Volumen 8 M LiCl gegeben, wodurch die RNA gefällt wird, die DNA aber im Überstand verbleibt, und der Ansatz über Nacht auf Eis gelagert. Die gefällte RNA wird dann in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 15 min bei 0 °C und 16000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert, anschließend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in autoklaviertem Wasser oder -Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

TBE-Puffer 10fach

890 mM Tris

890 mM Borsäure

25 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0

1 mM EDTA

Die so gewonnene RNA-Fraktion wies eine hohe Viskosität auf, was darauf hindeutet, dass ein verhältnismäßig hoher Anteil an Polysacchariden in der Fraktion verblieben ist. Da diese die weiteren Schritte stören können, wurden sie entfernt, indem die RNA-Lösung auf 50 mM NaCl und 25 % Ethanol eingestellt wurde. Dabei wurde nach der Zugabe des Salzes das Ethanol unter ständigem Schütteln langsam zugetropft um eine lokale Präzipitation der RNA zu verhindern. Die Mischung wurde anschließend für 5 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4 °C und 9500 g zentrifugiert, wobei die ausgefallenen Polysaccharide sedimentiert werden. Der Überstand mit der gelösten RNA wurde in ein neues Gefäß überführt und die RNA mit einem zehntel Volumen Na-Acetat und zweieinhalb Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Intaktheit der gewonnenen RNA wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (Abschnitt 2.20) überprüft.

Gesamt RNA aus frischen Zellen wurde außerdem nach der von Giuliano beschriebenen Methode isoliert (Giuliano et al., 1993). Die über einen Büchner-Trichter vom Medium getrennten Zellen wurden dabei zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend fein gemörsert. In ein eisgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl RNA-Extraktionspuffer (2) und 400 µl mit Citrat-Puffer gesättigtes Phenol (SIGMA P-4682) gegeben und auf 0,7 % Mercaptoethanol eingestellt (entsp. 3,5 µl). Die Reaktionsgefäße wurden dann mit den aufgeschlossenen Zellen aufgefüllt (die Masse wurde dabei nicht bestimmt, um das Auftauen der Zellen zu verhindern) und die Ansätze kräftig gemischt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform und erneutem Mischen wurden die nun milchig trüben Ansätze für 20 min auf Eis inkubiert, worauf eine 20 minütige Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C folgte.

Extraktionspuffer (2)

0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,2

4 M Guanidiniumthiocyanat

1 % Sarcosyl

0,7 % 2-Mercaptoethanol

Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol während einer Inkubation von 40 min auf Eis gefällt und anschließend sedimentiert (15000 x g; 30 min; 4 °C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Um eventuell vorhandene Polysaccharide auszufällen, wurden 100 µl

Ethanol (p.a.) zugegeben und die Ansätze 20 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation (10000 x g; 10 min; 4 °C). Bei der Verwendung von Material aus Zellkulturen im Gegensatz zu frischem Pflanzenmaterial schien dieser Schritt nicht notwendig zu sein.

Der Überstand mit den von Polysacchariden befreiten Nukleinsäuren wurde in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Lithiumchlorid und einer mindestens 1-stündigen Inkubation auf Eis wurde die RNA von der DNA getrennt und durch Zentrifugieren bei 15000 x g für 20 min selektiv sedimentiert. Das RNA-Sediment wurde zweimal mit 0,5 ml Ethanol (80 %) gewaschen und nach vollständiger Entfernung des Ethanols in 50 µl H₂O (demin., autoklaviert) resuspendiert.

Die Qualität der aufgereinigten RNA wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese getestet, die Quantifizierung erfolgte durch UV-Spektrometrie (GeneQuant Photometer).

Die nach Giuliano et al. (1993) gewonnene RNA enthielt deutlich weniger Polysaccharide und lieferte in weiteren Experimenten bessere Ergebnisse. Sie wurde daher als Standardmethode beibehalten.

2.19 RT-PCR

Von der isolierten RNA wird bei dieser Methode zunächst mit einer Reversen Transkriptase (RT) cDNA hergestellt, von der die gewünschten Moleküle dann mit spezifischen Primern in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden.

2.19.1 Reverse Transkription

Es wurde das RevertAid[®] first strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas verwendet. Hierbei wird eine MMLV-Reverse-Transkriptase eingesetzt. Zumeist wurde die Reaktion von oligo-(dT)₁₈-Primern aus gestartet, in einigen Fällen wurden *random-hexamer*-Primer verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Für nachfolgende PCR-Ansätze wurden 10-20 % eines cDNA-Synthese Ansatzes eingesetzt.

2.19.2 PCR

Für die PCR wurde entweder das *hot star Taq*-System von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet, oder eine rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase von MBI Fermentas. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt 2 µl MgCl₂ (25 mM), jeweils 1 µl von zwei Primern (100 mM), 1 µl eines dNTP-Mixes (10 mM), 0,5 µl einer *Taq*-Polymerase, 2-4 µl eines cDNA-Synthese-Ansatzes und 5 µl eines Polymerase-spezifischen 10fach Puffers in einem Gesamtvolumen von 50 µl (mit *aqua demin* aufgefüllt). Die PCR wurde im *hot-start*-Verfahren durchgeführt, d.h. es erfolgte eine

initiale Inkubation bei 95 °C für 5 min. Ein Reaktionszyklus bestand aus einer Inkubation bei 95 °C für 1 min, *primer-annealing* bei 45-50 °C für 1 min und Elongation bei 72 °C für 1 min, wobei die letzte Elongation auf 10 min verlängert wurde. Es wurden 40 Reaktionszyklen durchlaufen. Da der verwendete Robocycler über einen beheizbaren Deckel verfügte, konnte auf die Verwendung von Mineralöl verzichtet werden.

2.19.3 RACE-PCR

Das Akronym RACE steht für *rapid amplification of cDNA ends*. Die Methode soll es ermöglichen, ausgehend von einer bekannten Sequenz, wie sie z.B. durch RT-PCR ermittelt werden konnte, die unbekanntes 3'- und 5'-Enden des jeweiligen Transkriptes zu amplifizieren. Dazu werden zunächst *in vitro* zwei Populationen von cDNA Molekülen gebildet, so dass es sich bei der RACE-PCR um eine spezielle Form der RT-PCR handelt.

Es wurden RACE-PCR Systeme von zwei Herstellern verwendet, deren Funktionsprinzip identisch ist, die sich aber im Ablauf voneinander unterscheiden.

Beim *Smart-RACE*-System von Clontech wird für die 3'-cDNA-Synthese ein spezieller oligo (dT)-Primer verwendet, der eine Hersteller-spezifische kurze Sequenz am 3'-Ende der cDNA einfügt. Bei der nachfolgenden PCR richtet sich ein vom Hersteller mitgelieferter Primer gegen eben diese Sequenz, der zweite Primer wird durch die bekannte Sequenz des bekannten Fragments bestimmt.

Für die 5'-cDNA-Synthese wird ebenfalls ein spezieller oligo (dT)-Primer eingesetzt, der dafür sorgt, dass die cDNA-Synthese genau am Anfang des poly-(A)-Schwanzes beginnt. Entscheidend für den Erfolg ist, dass eine Reverse Transkriptase verwendet wird, die eine Terminale-Transferase-Aktivität besitzt, d.h. sie fügt am Ende eines Transkriptes drei bis fünf zusätzliche Nukleotide ein, wobei es sich zumeist um (dC)-Nukleotide handelt. Geeignet ist hierfür z.B. die MMLV-Reverse-Transkriptase SuperscriptTM II von Gibco. Außerdem wird dem Ansatz ein sogenanntes *Smart-Oligo* zugegeben, das über (dG)-Nukleotide verfügt, die an die überzähligen, von der Transkriptase eingefügten (dC)-Nukleotide binden. Die Transkriptase verwendet dieses *Smart-oligo* mit bekannter Sequenz als weiteres *template* und verlängert das naszierende Transkript entsprechend. Dadurch wird eine bekannte Sequenz am 5'-Ende eingefügt, gegen die sich nun wiederum ein Primer bei der nachfolgenden PCR richten kann, während der zweite Primer genspezifisch ist.

Das RACE-System von Invitrogen basiert auf demselben Prinzip, wie das System von Clontech. Allerdings wird hier bei der Synthese der 5'-cDNA eine eigenständige Terminale Transferase zugegeben, so dass keine entsprechende Aktivität der Reversen Transkriptase notwendig ist. Die 5'-cDNA-Synthese startet von einem genspezifischen Primer (GSP1), der sich von der bekannten Sequenz ableitet. Anschließend wird durch

einen Mix aus RNase H und RNase T1 die *template*-RNA abgebaut. Es folgt eine Reinigung der cDNA über Mini-Säulen mit einer Silica-Membran und die Zugabe einer Terminalen Transferase. Bei der anschließenden PCR wird ein vom Hersteller mitgelieferter Primer verwendet, der sich gegen die von der Transferase eingefügten Nukleotide richtet, und ein weiterer genspezifischer Primer (GSP2), dessen Sequenz gegenüber GSP1 Richtung 5'-Ende verschoben ist (*nested*).

Die 3'-cDNA-Synthese verläuft analog zum Smart-System von Clontech, allerdings wird auch hier das RNA-*template* durch einen RNase-Mix degradiert.

Das Design der genspezifischen Primer folgte den Empfehlungen der Hersteller, ebenso die Zusammenstellung der PCR-Ansätze. Alle PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 50 µl und enthielten 5 µl 10fach PCR-Puffer (vom Hersteller), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP-Lösung (10 mM), 0,5 µl *Taq*-Polymerase (MMLV, Fermentas), genspezifische und universelle Primer (entsprechend 3'- oder 5'-Ansatz) jeweils 1 µl (10 µM) und *aqua demin.* ad 50 µl. Die PCR wurde in einem Robocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt, weshalb die Ansätze nicht mit Mineralöl überschichtet werden mussten. Die Ansätze wurden zunächst drei Minuten bei 95 °C inkubiert, das *primer-annealing* erfolgte bei 56-60 °C für 30 sec., Elongation bei 72 °C für eine Minute. Es wurden 35 Reaktionszyklen durchlaufen.

2.20 Agarosegele

Zum Nachweis von Nukleinsäuren z.B. nach PCR, Plasmid-Präparation oder RNA-Isolierung wurde eine horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde TBE-Puffer mit 0,7 % Agarose (w/v) versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Zu je 100 ml Agaroselösung wurden 10 µl Ethidiumbromid-Lösung gegeben (Fluka, 1 % Ethidiumbromid in Wasser). Die flüssige Agaroselösung wurde in den mit Tesafilm abgedichteten Gelschlitten gefüllt. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Elektrophorese bei 120 Volt in 1 x TBE-Puffer durchgeführt.

Die mit Ethidiumbromid markierten Nukleinsäuren wurden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht (312 nm, Geldokumentationssystem von RS-Laborgeräte). Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ Ladder-Mix von MBI Fermentas verwendet.

2.21 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der Amplifikate der RT-PCR aus Agarosegelen wurden das NucleoTrap-System von Clontech sowie das Wizard® SV System von Promega verwendet. In beiden Fällen wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Beim NucleoTrap-System bindet die DNA nach Auflösung des Gelfragmentes an eine sogenannte Glasmilch, eine Silica-Matrix. Nachdem alle anderen Bestandteile abgewaschen wurden, wird die DNA mit Wasser oder TE-Puffer von dieser Matrix

eluiert, der Ansatz wird zentrifugiert (10000 x g für 30 sec in einer Eppendorf-Zentrifuge) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass ein Teil der Silica-Matrix recht leicht in die nächsten Arbeitsschritte „verschleppt“ werden kann.

Beim Wizard[®]-System von Promega erfolgt die Bindung der DNA an eine Silica-Membran in einer Mini-Säule, so dass das Problem mit der „Glasmilch“ entfällt. Das grundlegende Prinzip der Aufreinigung ist bei beiden Methoden dasselbe, das minimale Volumen zum Rücklösen der gereinigten DNA vergleichbar. Sofern möglich wurde das Wizard[®]-System vorgezogen.

2.22 Ligation

Es wurde das pGEM[®]-T Vektor-System von Promega verwendet. Dieses System macht sich die Tatsache zu Nutze, dass die DNA-Polymerase, die bei der PCR verwendet wird, am Ende der Amplifikate ein einzelsträngiges Adenin-Nukleotid einfügt. Der linearisierte Vektor verfügt dagegen über einzelsträngige Thymin-Nukleotide, so dass es zu einer Basenpaarung kommen kann. Mit Hilfe einer T4-Ligase wird das Amplifikat aus der PCR dann als *insert* in den Vektor kovalent gebunden. Hierzu ist ATP als Cofaktor notwendig, das im Ligase-Puffer enthalten ist.

Ligationsansatz

7,5 µl 2 x Ligase-Puffer (Promega)

0,5 µl pGEM[®]-T Vektor (Promega)

1 µl T4-Ligase

1 µl Nuklease-freies Wasser

5 µl geleluirtes PCR-Produkt

Ligationsansätze wurden über Nacht in einem Eisbad inkubiert. Als Variante zum beschriebenen Verfahren wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit Isopropanol gefällt, das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und die Ligation direkt in diesem Reaktionsgefäß angesetzt. Hierbei wurden 5 µl 2 x Puffer, 0,5 µl Vektor, 1 µl Ligase und 3,5 µl Wasser zugegeben. Auch diese Ansätze wurden über Nacht auf Eis inkubiert. Diese Variante wurde insbesondere dann verwendet, wenn nur geringe Mengen PCR-Produkt verfügbar waren.

2.23 Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde das Roti[®]-Transform System von Roth verwendet. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen der Linie DH5α inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 220 rpm in einem Reagenzglas mit Deckel inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Aliquot von 300 µl dieser Kultur in

einen Erlenmeyerkolben mit 30 ml LB-Medium überführt und erneut inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} zwischen 0,4 und 0,7 erreicht hatte (gemessen am Spektrophotometer). Sodann wurden Aliquots von etwa 1,9 ml in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei 3000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Sediment mit 100 μ l kaltem LB-Medium resuspendiert. Pro Ansatz wurden danach 90 μ l Roti[®]-Transform 1-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Dann wurden 10 μ l Roti[®]-Transform 2-Lösung zugegeben, es wurde erneut vorsichtig gemischt und die kompetenten Bakterien wurden mindestens 5 min auf Eis inkubiert, bevor der ligierte Vektor zugegeben wurde. Die Transformationsansätze mit der DNA wurden wiederum 60-90 min auf Eis inkubiert und dann auf LB-Agar Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert.

LB-Medium

Trypton	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	10 g / l

Das Medium wurde mit 10 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt und anschließend autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agar wurden außerdem 15 g / l Agar-Agar zugegeben.

IPTG-Stammlösung 0,1 M

500 μ l pro 100 ml LB-Agar
oder 100 μ l pro LB-Platte

X-Gal-Stammlösung 50 mg / ml DMFA

175 μ l pro 100 ml LB-Agar
oder 20 μ l pro LB-Platte

IPTG-Lösung wurde in *aqua demin.* angesetzt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert; X-Gal Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

Da der verwendete Vektor pGEM[®]-T ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, stellt die Zugabe dieses Antibiotikums sicher, dass nur tatsächlich transformierte Bakterien auf der Agar-Platte wachsen können. Das IPTG/X-Gal-System erlaubt ein blau/weiß-*screening* der Transformanten. IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) induziert das *lac*-Operon auf dem Vektor, wodurch eine β -Galactosidase exprimiert wird, die X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid) zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Konnte ein *insert* in den Vektor ligiert werden, so ist das β -Galactosidase-Gen unterbrochen und die blaue Farbe kann nicht entstehen. Demnach enthalten alle Bakterien-Kolonien, die auf den präparierten Agar-Platten wachsen, den Vektor pGEM[®]-T, aber nur in den weißen Kolonien kann auch ein *insert* erwartet werden. Erfahrungsgemäß ist dieses

blau/weiß-*screening* aber nicht vollständig zuverlässig, insbesondere bei kürzeren *inserts*, da auch bei erfolgreicher Ligation manchmal noch β -Galactosidase gebildet werden kann, oder dieses Enzym aus anderen Gründen ausfallen kann, auch wenn kein *insert* in den Vektor ligiert werden konnte. Daher wurden, insbesondere wenn nur wenige Kolonien zu finden waren, z.T. auch blaue Kolonien weiter untersucht.

Bei der Klonierung von Amplifikaten aus der RACE-PCR wurde auf das blau/weiß-*screening* mit IPTG und X-Gal verzichtet.

Da bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte kompetente Bakterien schlechtere Transformationsraten erzielten, wurden für Transformationen stets frisch hergestellte kompetente Bakterien verwendet, wobei die erste über-Nacht-Inkubation zum Teil weggelassen wurde.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

2.24 Plasmidpräparation

Bakterien-Kolonien, die weiter untersucht werden sollten wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration $100\text{ }\mu\text{g / ml}$) in einem sterilen Reagenzglas überführt und unter ständigem Schütteln (220 rpm bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien wurden bei $3000 \times g$ für 5 min Sedimentiert.

Plasmide wurden im Mini-Maßstab nach Herstellerangaben mit dem System von Qiagen aufgereinigt. Die verwendeten Säulen wurden nach abschließender Elution zwei bis dreimal wiederverwendet, die benötigten Puffer und Lösungen nach Herstellerangaben hergestellt, sofern die Originallösungen aufgebraucht waren.

2.25 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von Dr. S. Zauner am Institut für Zellbiologie und Angewandte Botanik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Für die automatische Sequenzierung mit IRD700/IRD800 markierten M13-20 Standardprimern oder fluoreszenz-markierten Primern (Amersham/Pharmacia) wurde ein LI-COR 4200 Sequenzierautomat (MWG-Biotech) verwendet.

Für eine Sequenzierung wurde jeweils mindestens $1\text{ }\mu\text{g}$ DNA verwendet.

2.26 Durchsuchen einer cDNA-Bank von *Linum album*

Eine *Linum album* cDNA-Bank wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Alfermann zur Verfügung gestellt. Ziel des Screening war, einen Vollängen-Klon der NADPH:Cytochrom P450-Reduktase zu erhalten, wozu das durch RT-PCR gewonnene Fragment aus *Linum nodiflorum* als heterologe Sonde verwendet wurde. Die Sonde

wurde nach Herstellerangaben mit Digoxigenin markiert. Hierzu wurde das DIG High Prime System von Roche verwendet.

2.26.1 Ausplattieren der Zellen

Es wurde im Wesentlichen nach den Angaben des ZAP ExpressTM cDNA Gigapack[®] III Gold Cloning Kit von Stratagene verfahren. 5 ml LB-Medium, das auf 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose eingestellt war, wurden mit *E.coli*-Zellen der Linie XL1-Blue MRF' inokuliert. Die Zellen wurden unter ständigem Schütteln bei 37 °C für ca. 6 Stunden, höchstens aber bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Nachdem die Bakterien für 10 min bei 500 x g abzentrifugiert worden waren, wurden sie in der Hälfte des ursprünglichen Volumens in steriler 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und anschließend mit dieser Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 10 µl der 1 : 1000 verdünnten cDNA-Bank bei 37 °C inkubiert, anschließend mit etwa 4 ml NZY-Top-Agarose bei 45 °C gemischt und sofort auf NZY-Agar-Platten ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass die Phagen-*plaques* sichtbar wurden.

NZY-Agar pro Liter

5 g NaCl

2 g MgSO₄ * 7 H₂O

5 g Hefeextrakt

10 g NZ-Amine

15 g Agar-Agar

Für die Herstellug von Top-Agarose wurde auf Agar-Agar verzichtet und die übrige Lösung stattdessen auf 0,7 % Agarose eingestellt. Beide Medien wurden autoklaviert.

2.26.2 Plaque-lifting

Für das *plaque-lifting* wurden positiv geladene Nylonmembranen von Roche verwendet, die unter der sterilen Werkbank zurechtgeschnitten wurden. Diese Membranen wurden für zweieinhalb bis drei Minuten auf den Bakterienrasen mit den *plaques* gelegt und währenddessen mit Bleistift markiert. Diese Markierungen wurden auch auf die Petrischalen übertragen, um positiv identifizierte *plaques* wiederfinden zu können.

Die Membranen wurden anschließend auf puffergetränktes Whatman-Papier überführt, und zwar mit der Seite nach oben, die zuvor mit der DNA aus den *plaques* in Kontakt war. Auf diese Weise wurde die DNA zunächst denaturiert (7 min, Denaturierungspuffer), danach neutralisiert (2 mal 4 min, Neutralisierungspuffer) und anschließend für 5 min mit 2 x SSC-Puffer inkubiert. Nach der Trocknung der

Membranen an der Luft wurde die gebundene DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht fest mit der Membran verknüpft (*crosslinking*). Dies geschah mit der auto-link Funktion eines Stratalinkers.

Maleinsäure-Puffer

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
0,3 % (v/v) Tween 20
pH 7,5 mit NaOH

Denaturierungspuffer

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer

0,1 M Tris
1,5 M NaCl
pH 7,5 mit HCl

20 x SSC-Puffer

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
pH 7,0 mit NaOH

2.26.3 Hybridisierung der Sonde

Die Hybridisierung mit der markierten Sonde und die anschließende Detektion der Chemolumineszenz wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie in der Anleitung zum DIG High Prime System beschrieben. Nach einer Prähybridisierung für 1-2 Stunden und 50 °C in Hybridisierungspuffer, wurde die zuvor denaturierte markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C über Nacht bei leichtem Schütteln. Danach wurden die Membranen ebenfalls bei 50 °C zunächst mit 2 x SSC und 0,1 % SDS und anschließend mit 0,5xSSC und 0,1 % SDS für jeweils 2 x 5 min gewaschen. Für die Detektion, die bei Raumtemperatur erfolgte wurden die Membranen kurz (1 min) mit Maleinsäurepuffer gespült und dann für 30 min in Blocking-Puffer überführt. Nach Zugabe der Digoxigenin-Antikörper im Verhältnis 1:10000 (1 µl pro 10 ml Puffer) und einer einstündigen Inkubation wurden die Membranen wiederum in Maleinsäurepuffer gewaschen (2 x 15 min) und dann für 2 x 5 min in Detektionspuffer gegeben. Danach erfolgte eine kurze (ca. 2 min) Inkubation in 0,25 mM CSPD-Lösung. Die noch feuchten Membranen wurden in Klarsichtfolie (Saran Wrap) eingeschlagen und für 1-3 Stunden auf einem lichtempfindlichen Film (Lumifilm, Roche) exponiert. Nach Entwicklung des Films sind erfolgreiche Hybridisierungen als dunkle Punkte zu erkennen. Allerdings können SDS-Präzipitate zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der Hybridisierungspuffer mit der markierten Sonde kann bei -20 °C aufbewahrt und wiederverwendet werden, wobei es entscheidend ist, die Sonde vor einer erneuten Hybridisierung zu denaturieren.

Vielversprechende *plaques* wurden durch Vergleich von Membranen und Petrischalen identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 300 µl SM-Puffer mit 20 µl

Chloroform überführt. Anschließend wurden sie einem zweiten *screening*-Prozess unterzogen, der analog zum ersten durchgeführt wurde, um die positiven Signale zu bestätigen und um positive Phagen besser vereinzeln zu können.

SM-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5

0,1 M NaCl

8 mM MgSO₄

0,01 % Gelatine

2.26.4 In vivo-Excision

Vielversprechende Phagen wurden einem *in vivo* Excisions-Protokoll unterzogen, gemäß den Angaben des ZAP ExpressTM cDNA Gigapack[®] III Gold Cloning Kit von Stratagene. Es handelt sich hierbei um eine Umklonierung des gewünschten pBK-CMV Phagemid-Vektors in den Stamm XL0LR mit Hilfe eines speziellen Helfer-Phagen (ExAssist), der sich in dieser Zelllinie nicht replizieren kann. Bei erfolgreicher Transformation kann die gesuchte cDNA daher durch eine Plasmid-Präparation aus positiven XL0LR-Bakterienkolonien gewonnen und anschließend sequenziert werden.

2.27 Geräteliste

Proteinreinigung

Waters 650 Advanced Protein Purification System Waters, Eschborn, D

Waters 600 Multisolvent Delivery System

Model 2150 Peak Separator

HPLC

HyPURITY Elite C18-Säule, 250 x 4,6 mm, 5 μ Hypersil

ODS C18-Säule 250 x 8,0 mm, 5 μ Hypersil

D2500 Chromato-Integrator Merck-Hitachi

L-6000 Pump

Spectro-Monitor[®] 3200 LDC Analytical

HPLC-Pump 422

Kontron Instruments, Neufahrn, D

Detector 430 A

M490 PC-Integration peak/2

Zentrifugen

Sorvall[®] RC 50 plus

DuPont

Biofuge 17 RS

Heraeus sepatech, Düsseldorf, D

SIGMA 3K30

B. Braun Biotech

Eppendorf Centrifuge 5415D

Eppendorf, Hamburg, D

PCR, Crosslinker, GeneQuant

RoboCycler Gradient 96

Stratagene, Heidelberg, D

UV-Stratalinker 1800

Stratagene

Gene Quant Photometer

Pharmacia, Freiburg, D

Power-supply E143

MAGV

Power-supply E835

Consort

Weitere Geräte

Accumet Basic pH-meter

Fisher Scientific, Wohlen, CH

Sonorex Super RK 255 Ultraschallbad

Bandelin, Berlin, D

UVIKON 930 Spectrophotometer

Kontron Instruments

Christ L1 Gefriertrockner

B. Braun Biotech.

Vakuumpumpe Typ CVC 24

Vacuubrand, Wertheim, D

Autoklav

Astell Scientific, Kent, UK

Rotovapor RE 120 Rotationsverdampfer	Büchi
Bioimager und software Diana II	Raytest, Straubenhardt, D
Geldokumentationssystem	RS-Laborgeräte

2.28 Chemikalien

Gängige Labor-Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern bezogen (Roth, Karlsruhe bzw. Fluka, Schweiz) und wurden in den Qualitäten reinst oder p.a. verwendet. Verbrauchsmaterial wie Reaktionsgefäße, Petrischalen usw. wurde von der Firma Greiner, Frickenhausen bezogen. NAD(P)H kamen von der Firma Biomol, Hamburg, Polyclar 10 von GAF Deutschland.

Weitere Chemikalien sind mit ihren jeweiligen Bezugsquellen im Text aufgeführt.

2.29 Lignanstandards

Matairesinol	MAT	Medarde, Univ. Salamanca, S
7-Hydroxymatairesinol	7-Hydroxy-MAT	Sjöholm, Univ. Turku, FIN
Yatein	YAT	Medarde, Univ. Salamanca, S
4'-Demethyl-Yatein	4'-Demethyl-YAT	Medarde, Univ. Salamanca, S
Podorhizol	POD	Medarde, Univ. Salamanca, S
Anhydropodorhizol	AHP	Medarde, Univ. Salamanca, S
Desoxypodophyllotoxin	DOP	Pras, Univ. Groningen, NL
β -Peltatin	β -PELT	Medarde, Univ. Salamanca, S
β -Peltatin-A-Methylether	PAM	Medarde, Univ. Salamanca, S
6-Methoxypodophyllotoxin	MPTOX	Pras, Univ. Groningen, NL
Podophyllotoxin	PTOX	ROTH, Karlsruhe, D
4'-Demethylpodophyllotoxin	4'-Demethyl-PTOX	Imbert, Pierre Fabre, Castes

3 Ergebnisse

3.1 Mikrosomenpräparation – Elektrophoretische Untersuchungen

3.1.1 SDS-PAGE

Da Cytochrom P450-abhängige Enzyme in Eukaryonten in der Regel im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind, lässt sich ihre Aktivität in zellfreien Extrakten hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion nachweisen. Damit ist eine Präparation von Membranvesikeln gemeint, die sich hauptsächlich aus den Teilen des ER zusammensetzt. Nach dem Aufschluss der Zellen werden in einer ersten Zentrifugation vor allem die schweren Bestandteile, wie Fragmente der Zellwand, Kerne, sowie intakte Plastiden und Mitochondrien abgetrennt. In einem zweiten Schritt werden die im sogenannten Rohextrakt verbliebenen Membransysteme mit Hilfe von $MgCl_2$ ausgefällt.

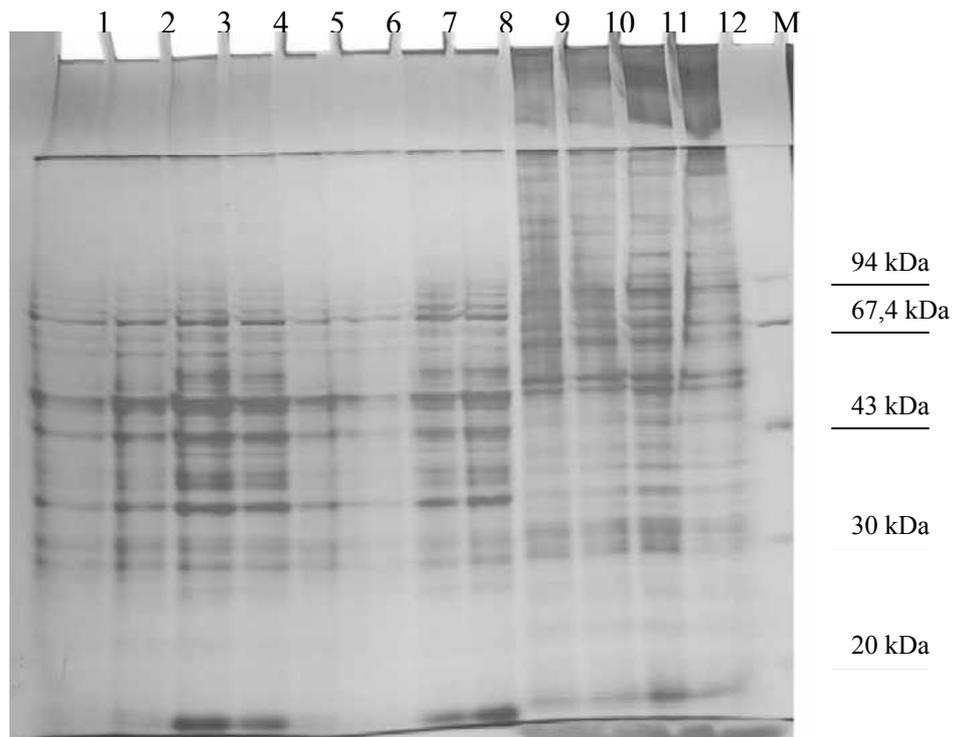


Abbildung 9: SDS-PAGE nach Laemmli. Die Spuren 1-4 zeigen den Rohextrakt der Mikrosomenaufreinigung, die Spuren 5-8 den löslichen Überstand nach der $MgCl_2$ -Fällung, die Spuren 9-12 die resuspendierten Mikrosomen. Es sind jeweils 100 μg Protein aufgetragen, das Trenngel enthält 10 %, das Sammelgel 4,5 % Acrylamid. Die Elektrophorese wurde bei 60 V über Nacht durchgeführt, das Gel anschließend nach Blum et al., 1987 mit Silber gefärbt.

Außer Membranen des ER können in dieser Präparation also auch Vesikel des Golgi-Systems, Lysosomen, Fragmente von zerstörten Mitochondrien oder Plastiden, der Plasmamembran oder des Tonoplasten und andere Membranen enthalten sein. Da das

ER allerdings den Hauptteil der zellulären Membransysteme ausmacht, sind seine Bestandteile auch die Hauptkomponente dieser Präparation, die deshalb vereinfacht als Mikrosomensuspension, -präparation oder Mikrosomenextrakt bezeichnet wird. Gleichzeitig mit der Abtrennung löslicher Zellbestandteile stellt die Präparation der Mikrosomen eine Aufkonzentrierung der membrangebundenen Proteine dar, was insbesondere bei gering exprimierten Enzymen vorteilhaft ist. Die unterschiedliche Zusammensetzung des ersten Zellaufschlusses (Rohextrakt) und der mit Mg^{2+} ausgefallten Mikrosomen lässt sich mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigen.

Cytochrom P450-Enzyme sind üblicherweise zwischen 40 und 60 kDa groß. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass in diesem Bereich einige Proteinbanden im Vergleich zum Rohextrakt stärker erscheinen, während im Bereich von 20 bis 30 kDa einige Banden schwächer werden. Wie zu erwarten, lassen sich auch in der Mikrosomenpräparation zahlreiche Proteinbanden erkennen. Es handelt sich bei dem beschriebenen Verfahren nicht um eine Enzymaufreinigung, sondern um eine Fraktionierung eines zellfreien Extraktes.

Die schmale Linie am unteren Rand des Gels ist auf den Farbstoff Bromphenolblau zurückzuführen, die Verschiebung bei den vier rechten Spuren wahrscheinlich auf den höheren Lipidanteil im Mikrosomenextrakt im Vergleich zum Rohextrakt.

3.1.2 Luminolfärbung

Das Verfahren, Cytochrom P450-Enzyme in einer Gelmatrix mit Luminol zu markieren, ist bei Bonfils et al. (1995) beschrieben. Luminol (5-Aminophthalazin-1,4(2H,3H)-dion) kann in basischer Lösung und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalsäure umgesetzt werden, die von einem angeregten Zustand Energie in Form von Chemolumineszenz abgibt (Abbildung 10). Diese Reaktion wird entweder durch Metallionen katalysiert oder durch Enzyme wie z.B. Peroxidasen oder eben Cytochrom P450-Enzyme.

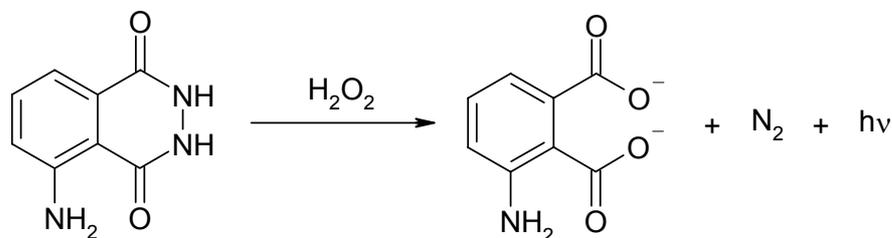


Abbildung 10: Luminolreaktion. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid wird Luminol zu 3-Aminophthalsäure umgesetzt, wobei Chemolumineszenz entsteht (h =Planck'sches Wirkungsquantum, ν =Frequenz).

Im Rohextrakt sowie in den Mikrosomen konnten in der Lithium-Dodecylsulfat-PAGE keine Banden mit Luminol angefärbt werden. Eine Lösung aus Cytochrom c und Katalase zeigte jedoch deutliche Banden. Wie in der Literatur beschrieben ist die Verwendung von Lithium-Dodecylsulfat (LDS) gegenüber der von SDS vorzuziehen, da im LDS-System die prosthetischen Häm-Gruppen nicht von den Proteinen abgelöst werden. Bei einem Cytochrom c / Katalase-Marker zeigt sich dies an der roten Lauffront, die in der SDS-PAGE unterhalb oder an der Front des Bromphenolblau zu finden ist. In der LDS-PAGE teilte sich das rote Häm jedoch nach Größe der Häm-tragenden Proteine im Gel auf.

3.2 Lignanextraktion aus Zellkulturen

Um Lignane aus den verschiedenen Zellkulturen zu isolieren wurde die von Wichers et al. (1990) und Schmitt & Petersen (2002) etablierte Methode verwendet, die sich in Vergleichen als die effektivste erwiesen hatte.

Es ließ sich zeigen, dass verschiedene Linien derselben Kultur einen unterschiedlichen Lignangehalt aufwiesen. Im Falle von *Linum nodiflorum* schienen Linien, die weiterhin Chlorophyll synthetisieren konnten, eher weniger Lignane zu enthalten, als solche, die diese Fähigkeit verloren hatten. Auch eine Umstellung des Mediums von Ms-Li auf CB2-Medium bewirkte einen deutlichen Rückgang der Lignan-Produktion.

Zusätzlich zum Gehalt kann sich aber auch die Zusammensetzung der enthaltenden Lignane unterscheiden, so dass bestimmte Linien von *L. nodiflorum* detektierbare Mengen von Podophyllotoxin akkumulierten, obwohl sonst MPTOX das Hauptprodukt des Lignanstoffwechsels in dieser Art ist.

DOP6H-Aktivität ließ sich vor allem in solchen Linien beobachten, die im Verhältnis die größte Menge an MPTOX produzierten. Interessant ist die Beobachtung, dass die DOP6H in MPTOX-produzierenden Linien detektierbar war, nicht aber in solchen, die hauptsächlich Podophyllotoxin akkumulierten. Die Methylierung von β -Peltatin, dem Produkt der DOP6H, zu β -Peltatin-A Methylether war dagegen in beiden Fällen möglich (Kranz, pers. Mitteilung). Dies spricht für eine regulatorische Bedeutung des Metabolismus von DOP für die Lignan-Biosynthese.

Der höchste gemessene MPTOX-Gehalt in *Linum nodiflorum* betrug 14 mg pro g Trockengewicht (1,4 %) am achten Tag der Kulturperiode. Podophyllotoxin akkumulierte bis zu ca. 6 mg / g Trockengewicht (0,6 %, siehe auch Abbildung). Es ist davon auszugehen, dass diese Mengen für eine wirtschaftliche Produktion von Lignanen nicht ausreichen.

3.3 Biotransformationsversuche mit *Linum*-Zellkulturen

Wird eine zugegebene Verbindung von einer Zellkultur *in vivo* in eine andere Verbindung überführt, wird dieser Vorgang als Biotransformation bezeichnet. Auf diese

Weise können unter Umständen Rückschlüsse über Biosynthesewege gewonnen werden.

In einer Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* sollte durch Biotransformation und durch die gleichzeitige Zugabe von spezifischen Inhibitoren untersucht werden, ob die Umwandlung von DOP zu Podophyllotoxin (PTOX) durch eine Dioxygenase oder ein Cytochrom P450-Enzym katalysiert wird. Dafür wurden Tetracyclacin (Tet) als Cytochrom P450-Hemmstoff und Prohexadion-Calcium (PHD) als Inhibitor für Dioxygenasen gewählt. Die für diesen Versuch verwendete Kultur zeichnete sich dadurch aus, dass sie PTOX in höherem Maße akkumulierte als andere *L. nodiflorum* Kulturen. Der PTOX-Gehalt stieg dabei insbesondere vom siebten bis zum 17. Tag deutlich an (Abbildung 11), wobei die Zellen nach dem 14. Tag begannen abzusterben. Der DOP-Gehalt fiel dagegen vom siebten zum 14. Tag ab und unterlag insgesamt keinen so großen Schwankungen, wie der Gehalt an PTOX.

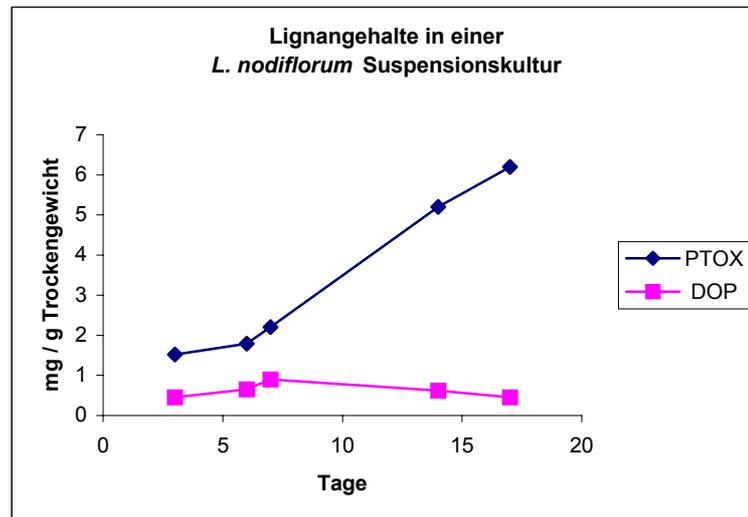


Abbildung 11: Gehalt an DOP und PTOX in einer Suspensionskultur von *L. nodiflorum*. Der PTOX-Gehalt steigt bis zum 17. Tag der Kulturperiode an, allerdings beginnen die Zellen bereits nach dem 14. Tag abzusterben (nicht gezeigt). Es handelt sich nicht um eine Charakterisierung der Kultur, sondern um Vorversuche zu den folgenden Biotransformationen.

Die Inhibitoren wurden am sechsten Tag der Kulturperiode in Endkonzentrationen von jeweils 100 μM zugegeben, zusammen mit DOP (Endkonzentration 50 μM pro Kolben). Die Anteile von Aceton und Methanol, den Lösungsmitteln für Tetracyclacin bzw. DOP, betragen ein bzw. zwei Promille bezogen auf das Kulturmedium. Die Zellen wurden am 14. Tag der Kulturperiode geerntet.

Wie Abbildung 12 zeigt, ließ sich insgesamt keine Steigerung des PTOX-Gehaltes durch die Zugabe von DOP zeigen. Da Tet in Aceton und DOP in Methanol vorgelöst wurden, mussten zur Kontrolle auch diese Lösungsmittel auf ihren Effekt untersucht werden, wobei sich zeigte, dass sie die Bildung von PTOX leicht negativ beeinflussten.

Die Zugabe von DOP führte verglichen mit der von Methanol, zu einer leichten Steigerung des PTOX-Gehaltes, aber nicht bis zum Wert der unbehandelten Kontrolle. Tet hemmte die Bildung von PTOX mit und ohne Zugabe von DOP um ca. 50 %, PHD hatte keinen signifikanten Effekt.

Dies bestätigt erste Hinweise (Henges, 1999), nach denen die DOP 7-Hydroxylase (DOP7H), die den Umsatz von DOP zu PTOX katalysiert, ein Cytochrom P450 abhängiges Enzym sein könnte.

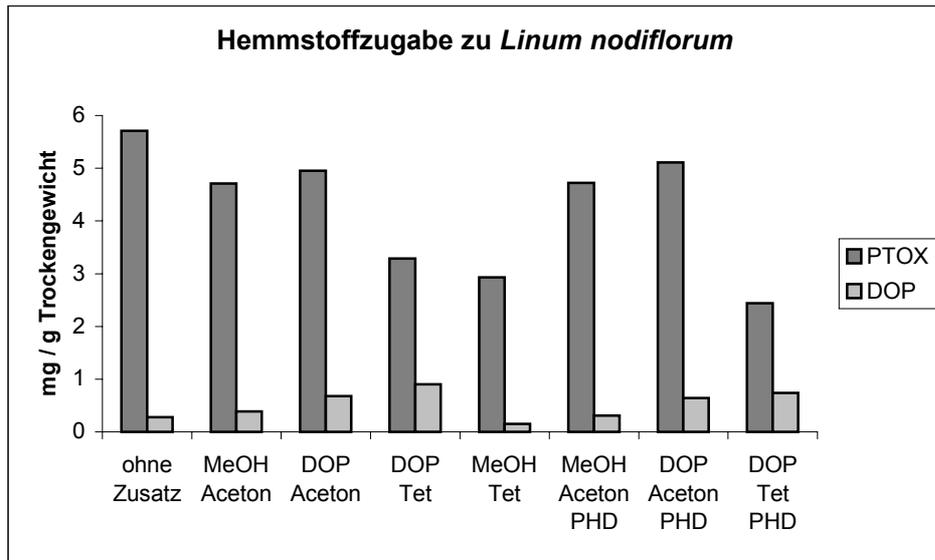


Abbildung 12: Biotransformationsversuch mit einer Suspensionskultur von *Linum nodiflorum*. Die Lösungsmittel Aceton und Methanol führen zu einer leichten Senkung des PTOX-Gehaltes. Die gleichzeitige Zugabe von DOP erhöht den PTOX-Gehalt, allerdings nicht bis zum Wert der unbehandelten Kultur. Tet hemmt die PTOX-Bildung, PHD hat keinen signifikanten Effekt im Vergleich mit den verwendeten Lösungsmitteln.

Entsprechende Versuche wurden auch mit Yatein durchgeführt, um Hinweise darauf zu bekommen, welche Enzymklasse einen eventuellen Umsatz zu DOP katalysiert. Da Yatein aber im Kulturmedium auch unter Zuhilfenahme von β -Cyclodextrin nur schwer löslich war und außerdem auf die Zellen toxisch wirkte, konnten aus diesen Versuchen keine Rückschlüsse gezogen werden.

3.4 Elicitierungsversuche

Eine Elicitierung der Lignanproduktion in Suspensionskulturen würde interessante molekularbiologische Ansätze, z.B. das *differential display*, zur Identifizierung an der Biosynthese beteiligter Gene ermöglichen. Aus diesem Grund wurden an Zellkulturen von *Linum album* und *L. nodiflorum* entsprechende Versuche durchgeführt.

Da Lignane vor allem als Abwehrstoffe der Pflanzen diskutiert werden, wurde auf bekannte Auslöser pflanzlicher Abwehrreaktionen als Elicitoren zurückgegriffen. Zum einen wurden die als Botenstoffe bekannten Verbindungen Jasmonat (die Zugabe

erfolgt in Form von Methyljasmonat) und Salicylsäure verwendet, zum anderen getrocknetes steriles Zellwandmaterial des Pilzes *Phytophthora megasperma* var. *glycineae* (PMG), sowie das Glucan Nigeran (Ni) aus *Aspergillus japonicus*.

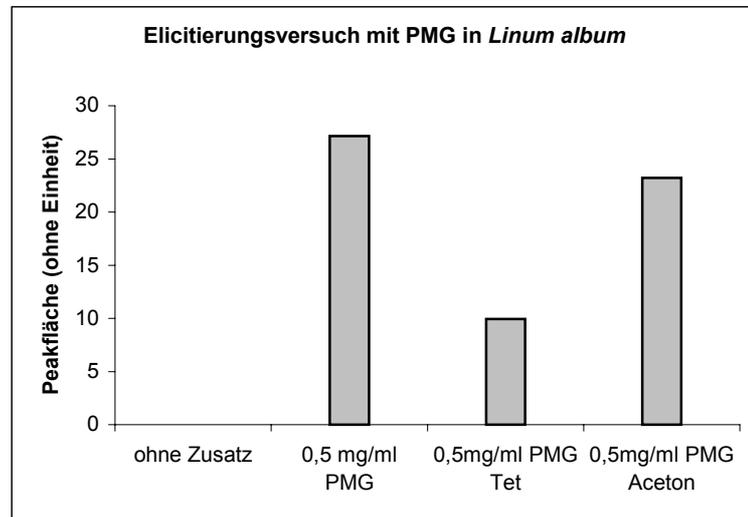


Abbildung 13: Die Zugabe von PMG-Elicitor führt in Suspensionszellen von *Linum album* zur Akkumulation einer nicht identifizierten Substanz, deren Bildung durch Tetcyclacis gehemmt wird. Tet wurde am 4. Kulturtag in einer Endkonzentration von 10 μM zugegeben, PMG am 5. Tag in einer Konzentration von 0,5 mg pro ml Kulturmedium, die Zellen wurden am 6. Tag geerntet.

Außerdem wurden Mediumsvariationen auf ihre Effekte untersucht, wie unterschiedliche Konzentrationen von zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) und α -Naphthyllessigsäure (NAA).

In den HPLC-Chromatogrammen der Lignanextrakte, die von den behandelten Zellen angefertigt wurden, konnten zum Teil Veränderungen gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden. Exemplarisch ist dies in Abbildung 13 gezeigt. Auf die Zugabe von PMG-Elicitor reagierte eine Suspensionskultur von *Linum album* mit der Akkumulation einer Substanz, die in unbehandelten Zellen nicht nachweisbar war und die bei 35 % Acetonitril als Laufmittel eine Retentionszeit von etwa 5,3 min aufwies. Die Biosynthese dieser Substanz konnte durch Tetcyclacis gehemmt werden, was für die Beteiligung zumindest eines Cytochrom P450-Enzyms spricht, wie sie z.B. im allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel vorkommen (siehe Abschnitt 1.5). Allerdings zeigt die HPLC-Analyse, dass es sich nicht um eines der Lignane handelte, die als externe Standards zur Verfügung standen. Offenbar ist durch PMG auf diese Weise keine Induktion oder Elicitierung der Biosynthese der gewünschten Lignane zu erreichen, weshalb die Experimente nicht weiter verfolgt wurden.

Entsprechende unspezifische Effekte bei *L. nodiflorum* wurden z.B. bei der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration um das 2-10fache, oder bei Veränderungen der NAA-Konzentration im Medium beobachtet.

Eine Erhöhung des Gehaltes an PTOX oder ähnlichen Lignanene konnte in keinem Fall gezeigt werden.

3.5 Enzymtests mit verschiedenen potenziellen Substraten

Eine Reihe unterschiedlicher Lignane, die als Zwischenstufen in der Biosynthese von Podophyllotoxin oder 6-Methoxypodophyllotoxin infrage kommen, wurden als Substrate für eine enzymatische Umsetzung in Mikrosomenpräparationen getestet. Matairesinol, 7-Hydroxymatairesinol, Yatein, 4'-Demethylyatein, Podorhizol, Anhydropodorhizol, Podophyllotoxin, β -Peltatin-A-Methylether und 4'-Demethyldesoxy-podophyllotoxin wurden durch Mikrosomenpräparationen von *Linum nodiflorum* bzw. *Linum album* nicht umgesetzt.

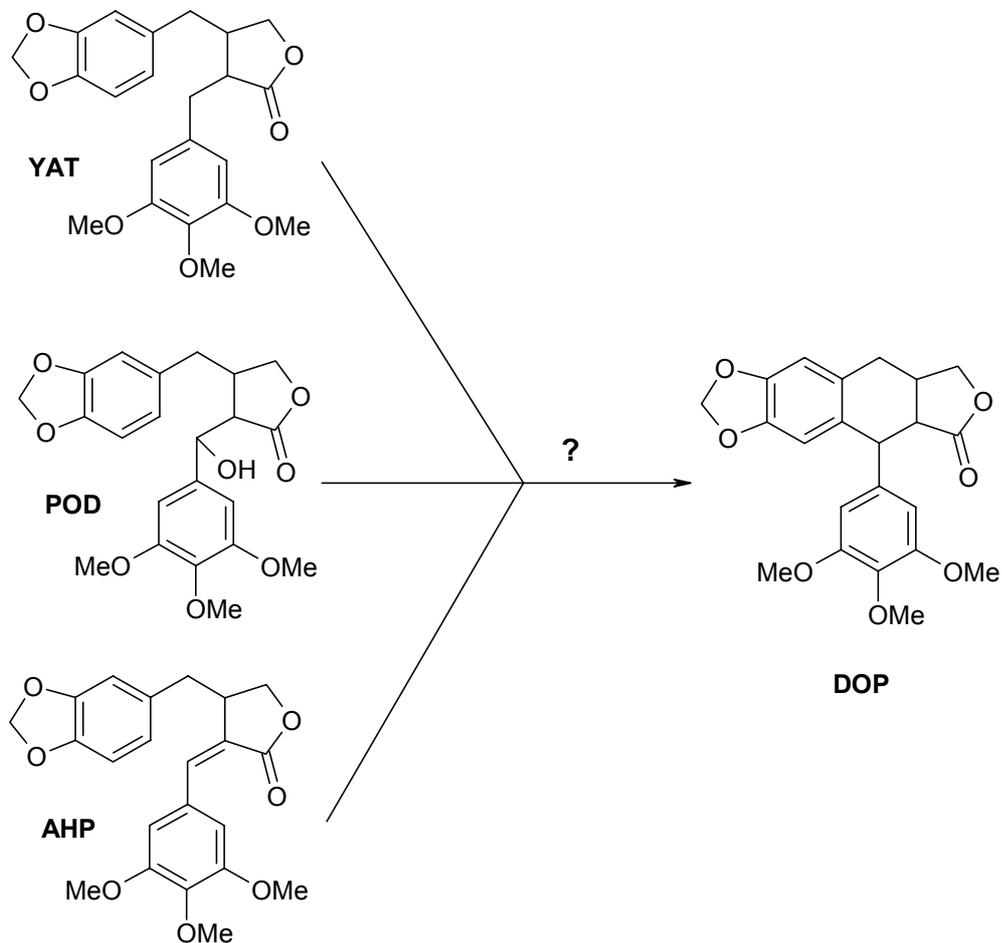


Abbildung 14: Versuche zur enzymatischen Bildung von DOP in Mikrosomenpräparationen aus möglichen direkten Vorstufen. Getestet wurden Yatein (YAT), Podorhizol (POD) und Anhydropodorhizol (AHP)

In einigen Fällen war nicht klar, ob die angebotenen Substrate tatsächlich Intermediate der Lignan-Biosynthese in *Linum spec.* waren. So konnte z.B. nicht mit Sicherheit angegeben werden, welches die direkte Vorstufe zu DOP ist, wobei allerdings keiner

der möglichen Kandidaten erfolgreich getestet werden konnte (Abbildung 14). Es war daher schwer zu entscheiden, ob die optimalen Bedingungen für die Detektion des jeweiligen Enzyms nicht gefunden waren oder ob der entsprechende Schritt prinzipiell nicht katalysiert werden kann.

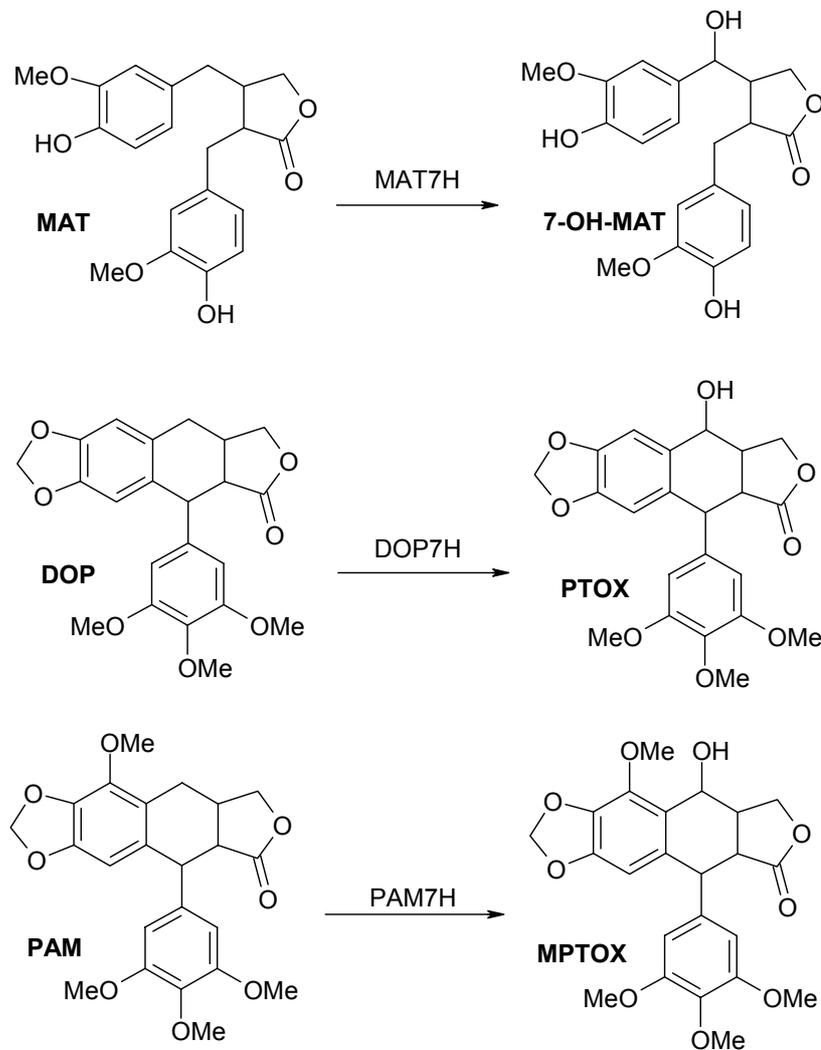


Abbildung 15: Substrate und vermutete Produkte von möglichen oder wahrscheinlichen Enzymen in der Lignanbiosynthese in *Linum spec.* Matairesinol (MAT), 7-Hydroxymatairesinol (7-OH-MAT), Desoxypodophyllotoxin (DOP), Podophyllotoxin (PTOX), β-Peltatin-A-Methylether (PAM), 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX). Die erwarteten, aber nicht gefundenen Enzymaktivitäten wurden als MAT/DOP/PAM 7-Hydroxylase (x7H) bezeichnet.

In anderen Fällen war ein Umsatz durch Biotransformationsversuche gezeigt worden, so dass die entsprechende Aktivität zumindest *in vivo* vorhanden sein musste, wenn auch nicht notwendigerweise in Form einer Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase (Van Uden et al., 1995b; Koulman et al., 2003a, Kamil & Dewick 1986a; Kamil & Dewick 1986a). Dies trifft z.B. auf die Umwandlung von DOP zu PTOX oder von PAM zu MPTOX zu (Abbildung 15). Die Bildung von 7-Hydroxymatairesinol wurde in

Linum flavum gezeigt (Xia et al., 2000). Auch in diesen Fällen konnte kein enzymatischer Umsatz in zellfreien Extrakten beobachtet werden.

Insbesondere Yatein wurde als mögliches Substrat intensiv getestet, ohne dass ein Umsatz zu DOP gezeigt werden konnte. Es wurde das für die DOP6H etablierte Testverfahren für Cytochrom P450-Enzyme verwendet (Mikrosomenpräparation, NADPH als Cofaktor), aber es wurden auch Tests für 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen und Peroxidasen durchgeführt. Für letztere wurde der sogenannte Rohextrakt verwendet, der alle Enzyme des zellfreien Aufschlusses enthielt. Für Tests auf die Beteiligung von Dioxygenasen wurden Fe(II)-sulfat, Na₂-Oxoglutarat und Na-Ascorbat als Cofaktoren eingesetzt, Peroxidase-Tests wurde Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Proteinkonzentrationen in den Extrakten wurden variiert, die Inkubationszeiten wurden bis auf 24 Stunden ausgedehnt, das Ansatzvolumen bis auf 10 ml erweitert. Ein hemmender Effekt des in den Ansätzen enthaltenden DTT wurde ausgeschlossen, die Substratkonzentrationen wurden variiert, ebenso die Inkubationstemperatur. Es wurden Suspensionskulturen verschiedener *Linum* Spezies (*L. album*, *L. flavum*, *L. nodiflorum*) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kulturperiode untersucht. Die möglichen Bedeutungen dieser Ergebnisse werden in Abschnitt 4.1 ausführlich diskutiert.

3.6 Nachweis und Charakterisierung der DOP6H aus *Linum nodiflorum*

Die Aktivität der Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H) wurde in den Mikrosomen einer *Linum nodiflorum* Suspensionskultur nachgewiesen. Mit Hilfe des beschriebenen Enzymtests konnten ihre Eigenschaften und charakteristischen Parameter ermittelt werden.

Bei der Verwendung unterschiedlich konzentrierter Mikrosomenpräparationen wurde bis zu 1 mg / ml Gesamtprotein im Extrakt eine lineare Steigerung der DOP6H-Aktivität beobachtet. Dies entspricht einer Proteinmenge von 0,45 mg im Enzymtest. Bei höheren Konzentrationen verlief die Steigerung der Produktbildung flacher (Abbildung 16). Für die weitere Charakterisierung, insbesondere die Bestimmung der K_m-Werte wurde standardmäßig eine Konzentration von 0,7 mg / ml verwendet, was einer Menge von 0,32 mg Gesamtprotein pro Testansatz entspricht. Für Tests mit anderen Substraten als DOP wurden zum Teil deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt.

In dem für die Enzymtests verwendeten Tris/HCl-Puffer konnte für die DOP6H ein pH-Optimum von etwa 7,4 ermittelt werden (Abbildung 17). Von der Verwendung eines alternativen Phosphatpuffers wurde abgesehen, da während des Ausfällens der Mikrosomen durch MgCl₂ schwer lösliches MgPO₄ entsteht, wodurch Mg²⁺ dem Fällungsansatz entzogen wird und sich außerdem die Pufferbedingungen verändern. Die halbmaximale Aktivität der DOP6H stellt sich bei etwa pH 6,2 ein. Allerdings muss

angemerkt werden, das etwa bei pH 6 die Kapazität des verwendeten Tris/HCl-Puffers erschöpft ist, weshalb keine Messungen bei tieferen pH-Werten durchgeführt wurden. Es wurden die tatsächlichen pH-Bedingungen in den Testansätzen mit Hilfe einer dünnen pH-Elektrode gemessen.

Insgesamt weist diese Kurve kein scharfes Optimum auf, sondern einen Bereich zwischen pH 6,9 und pH 7,6 in dem die Aktivität der DOP6H zwischen 90% und ihrem Maximalwert liegt. Das Enzym scheint unter leicht basischen Bedingungen stabiler zu sein, als bei niedrigeren pH-Werten.

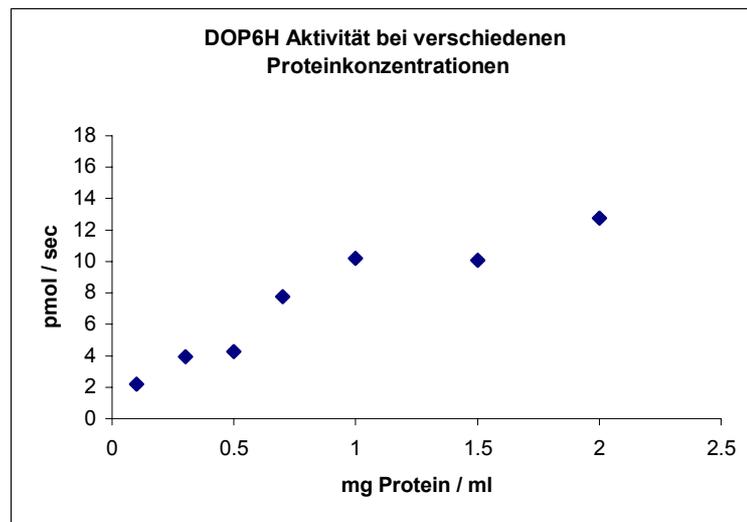


Abbildung 16: Aktivität der DOP6H bei verschiedenen Gesamtprotein-Konzentrationen der eingesetzten Mikrosomenpräparationen. Bis ca. 1 mg / ml ist ein linearer Anstieg der spezifischen Aktivität zu sehen.

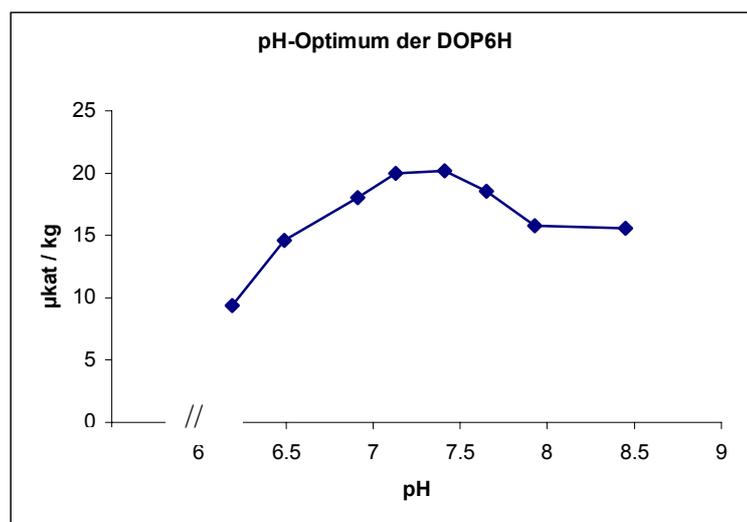


Abbildung 17: pH-Abhängigkeit der DOP6H. Das pH-Optimum der DOP6H in Tris/HCl-Puffer liegt bei 7,2 bis 7,4. Für die Präparation von Mikrosomen und für Enzymtests wurde ein Puffer mit pH 7,4 verwendet.

Das Temperaturoptimum der DOP6H in Tris/HCl-Puffer liegt zwischen 30 und 35 °C (Abbildung 18). Es ist zu beobachten, dass die Aktivität der DOP6H von 0 °C bis etwa 33 °C kontinuierlich ansteigt, und bei Temperaturen oberhalb von 38 °C rasch abfällt. Letzteres ist vermutlich auf thermische Denaturierung des Proteins zurückzuführen. Auch bei 0 °C (in Eiswasser) konnte noch eine geringe Aktivität nachgewiesen werden. Ein scharf begrenztes Temperaturoptimum lässt sich nicht angeben, vielmehr zeigt sich ein optimaler Temperaturbereich, der etwa zwischen 33 °C und 38 °C liegt. Um ein tatsächliches Temperaturoptimum des Enzyms (also eine reversible Verringerung der Aktivität oberhalb einer bestimmten Temperatur) von Denaturierungseffekten abzugrenzen, wäre es notwendig, bei verschiedenen Temperaturen die DOP6H-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu messen. Dadurch ließen sich mechanistische Effekte auf den Ablauf der Reaktion von solchen trennen, die nur die thermische Stabilität betreffen (Daniel et al., 2001). Da solche Angaben eher im Falle einer biotechnologischen Anwendung von Interesse sind, wurde hier mit Blick auf die begrenzten DOP-Ressourcen zunächst darauf verzichtet.

Um den Effekt der möglichen thermischen Denaturierung zu minimieren, wurde 30 °C als Inkubationstemperatur für alle weiteren Enzymtests verwendet.

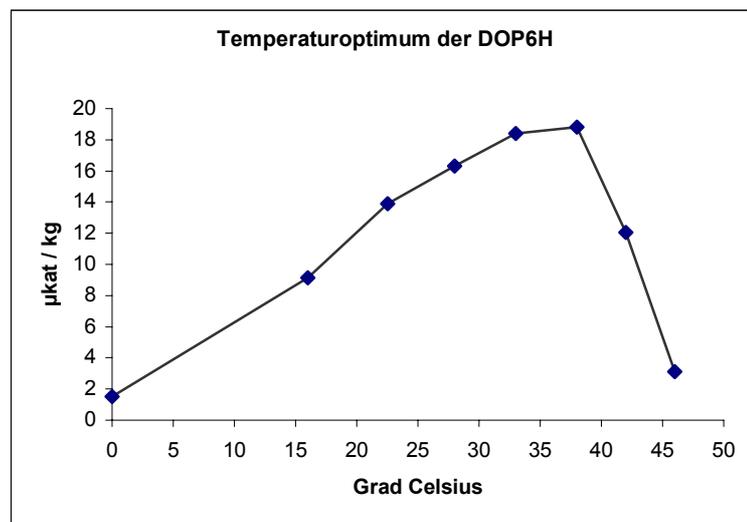


Abbildung 18: Temperaturabhängigkeit der DOP6H. Das Temperaturoptimum der DOP6H liegt bei 20 min Reaktionszeit zwischen 33 und 38 °C. Um den Einfluss thermischer Denaturierung zu minimieren, wurden Enzymtests standardmäßig bei 30 °C durchgeführt.

3.6.1 K_m -Werte für DOP und NADPH

Der apparente K_m -Wert für DOP beträgt ca. 8,3 µM (8,9 µM nach Lineweaver-Burk und 7,6 µM nach Hanes; Abbildung 19), der entsprechende Wert für NADPH ca. 47 µM (55 µM nach Lineweaver-Burk und 39 µM nach Hanes; Abbildung 20). Damit unterscheiden sie sich leicht von den apparenten K_m -Werten des äquivalenten Enzyms

aus *Linum flavum*. Dies weist für NADPH einen apparenten K_m -Wert von 36 μM und für einen DOP von 20 μM auf (Molog, 1997).

Die Ermittlung gesicherter K_m -Werte gestaltete sich schwierig, da die Daten eine gewisse Inkonsistenz aufwiesen und verschiedene Methoden der Auswertung (Auftragung nach Lineweaver-Burk oder nach Hanes) zu unterschiedlichen Ergebnissen führten, die ungefähr um den Faktor 2 variierten. Insbesondere Messpunkte mit kleinen Substratkonzentrationen können bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk problematisch sein, da es sich um eine doppelt reziproke Auftragung handelt, bei der diese Messpunkte einen großen Einfluss auf die Ausgleichsgerade haben, obwohl sie gleichzeitig aufgrund von unvermeidlichen Schwankungen mit dem größten relativen Fehler belastet sind. Häufiges Wiederholen, insbesondere der Bestimmung der apparenten K_m -Werte für NADPH, konnte diese Probleme nur teilweise lösen. Aus diesem Grund wurden die Daten verschiedener Experimente übereinandergelegt, wodurch sich die Schwankungen gegenseitig nivellieren und die relativen Fehler minimieren sollten.

Für NADH, das anstelle von NADPH als Co-Faktor eingesetzt werden kann, konnte kein eindeutiger K_m -Wert ermittelt werden, da die Aktivität der DOP6H mit NADH zu gering war. Dieses Problem ist aus Untersuchungen der DOP6H aus *L. flavum* bekannt (Molog, 1997).

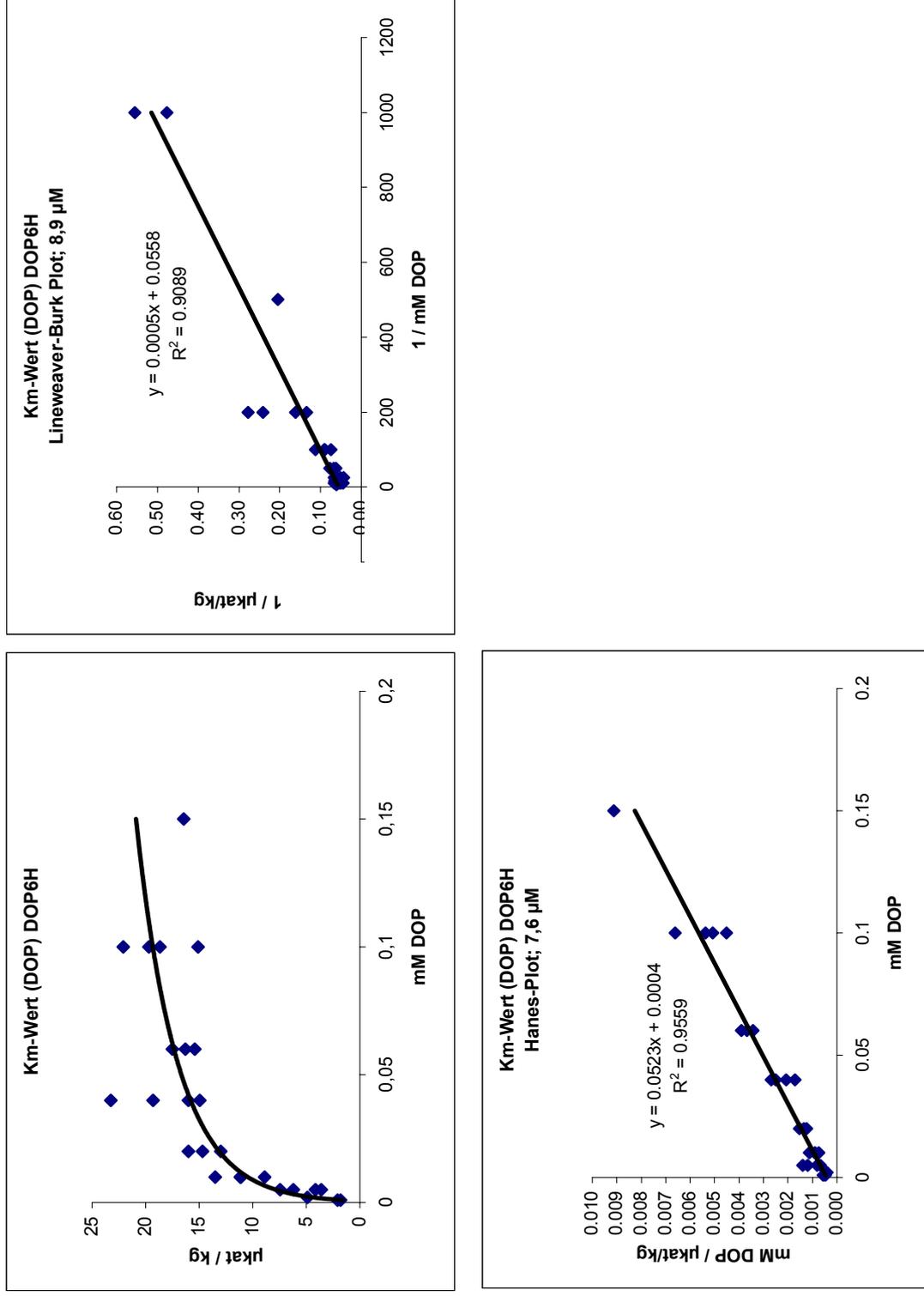


Abbildung 19: Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für DOP, verschiedene Auftragungen. Im Mittel ergibt sich ein apparenter K_m -Wert (DOP) von etwa 8,3 µM

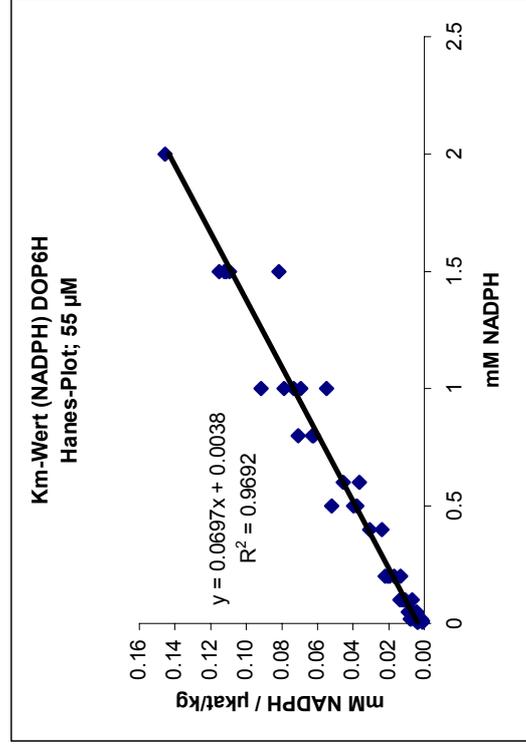
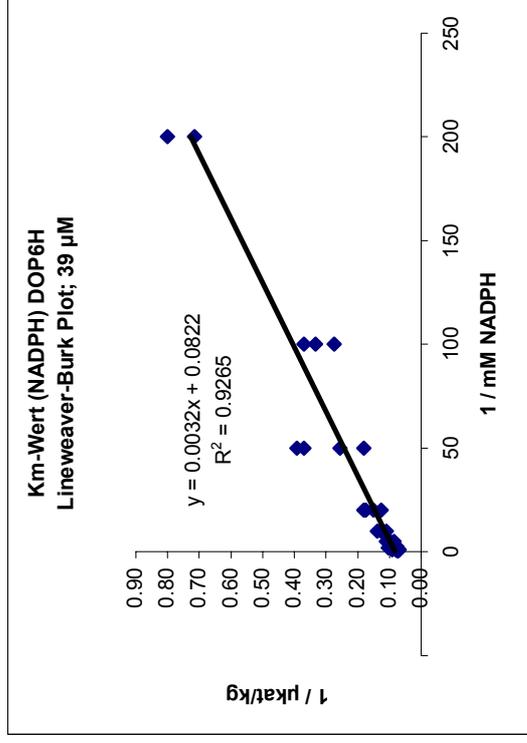
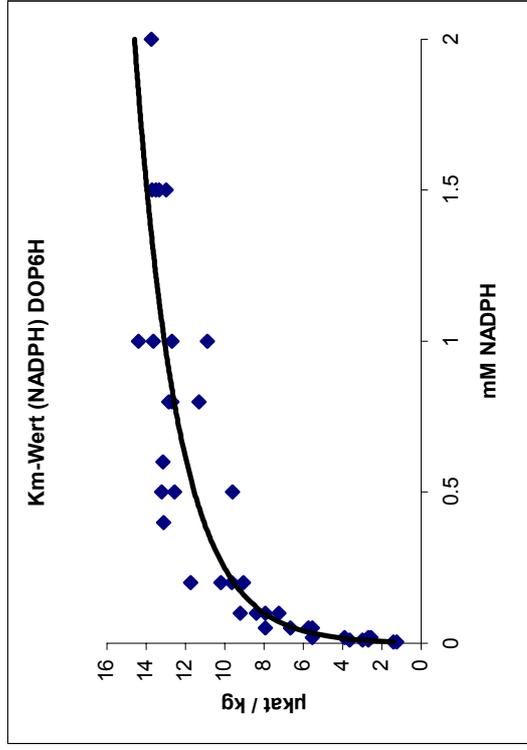


Abbildung 20: Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für NADPH, verschiedene Auftrugungen. Es ergibt sich ein gemittelter Wert von etwa 47 µM

3.6.2 Vergleich der Cosubstrate NADPH und NADH

Sowohl NADPH als auch NADH können als Elektronen-Donatoren für die DOP6H eingesetzt werden. Allerdings bleibt die Wahl des Cosubstrats nicht ohne Auswirkungen auf die Enzym-Aktivität (Abbildung 21). Wird NADPH im Enzymtest eingesetzt, so ist die spezifische DOP6H Aktivität 5 bis 10 mal höher als bei Einsatz von NADH.

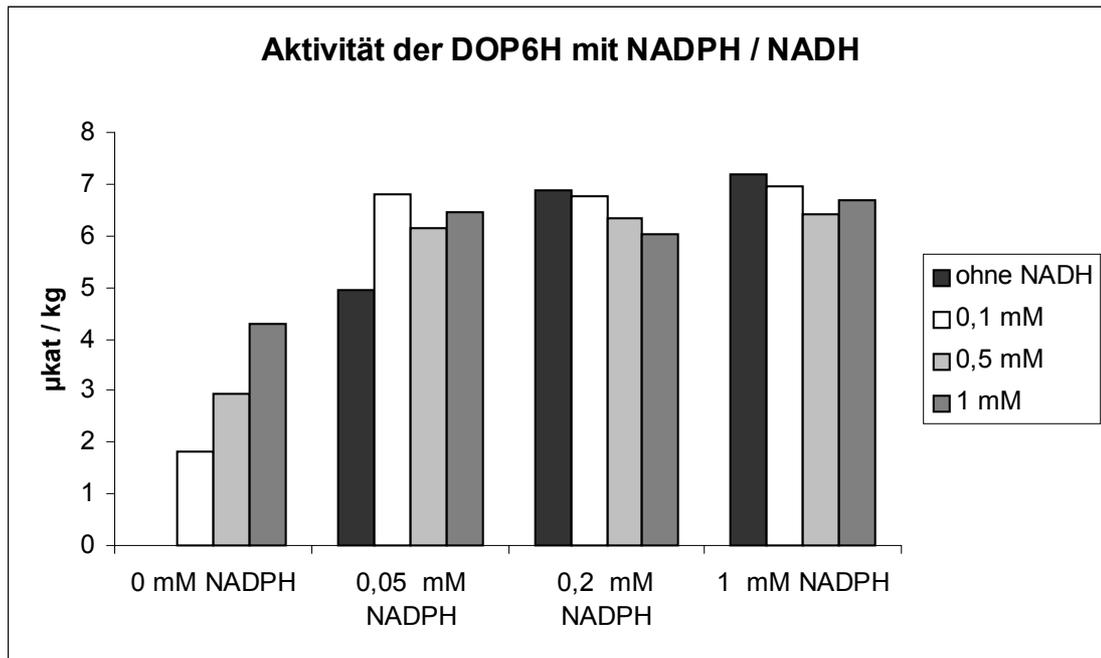


Abbildung 21: Die Zugabe von NADH zum Enzymtest bewirkt bei geringen NADPH-Konzentrationen eine additive Steigerung der DOP6H-Aktivität. Bei höheren NADPH-Konzentrationen ist eher eine leichte Hemmung zu beobachten. In keinem Fall kommt es zu einem synergistischen Effekt.

Bei niedrigen Konzentrationen (0,05 oder 0,1 mM) führt die Kombination beider Cofaktoren zu einer Addition der Einzelaktivitäten. Bei höheren Konzentrationen (0,5 und 1 mM) dagegen scheint die DOP6H Aktivität, die sich durch Zugabe von NADPH ergibt, durch NADH leicht gesenkt zu werden.

In keinem Fall konnte ein überadditiver (synergistischer) Effekt beobachtet werden. Als solchen würde man eine Erhöhung der Aktivität mit NADH und NADPH als Cofaktoren bezeichnen, der deutlich über die addierte Aktivität mit den einzelnen Cofaktoren hinausgeht. Ein solcher Effekt würde für eine Beteiligung von Cytochrom b_5 an der Elektronentransportkette sprechen, das typischerweise NADH als Elektronendonator verwendet.

Die Bedeutung von Cytochrom b_5 an Cytochrom P450-abhängigen Reaktionen ist nicht einheitlich. In Pflanzen ist die Notwendigkeit einer Beteiligung von Cytochrom b_5 für die volle Aktivität einer Cytochrom P450 vermittelten Reaktion bisher nur einmal

gezeigt worden (De Vetten et al., 1999). Die Ergebnisse mit der DOP6H sprechen nicht für eine essenzielle Bedeutung von Cytochrom b_5 für diese Reaktion.

3.6.3 Inhibitoren der DOP6H

In der Literatur sind einige spezifische Inhibitoren für Cytochrom P450-Enzyme beschrieben. Gleichzeitig ist bekannt, dass nicht alle diese Inhibitoren jedes Cytochrom P450 hemmen. Miconazol (Mic), Ancymidol (Anc), Metyrapon (Met) und Tetcyclacis (Tet) wurden als Inhibitoren der DOP6H getestet (Abbildung 22).

Mic und Anc wurden vor ihrer Zugabe zum Enzymtest in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, Tet wurde in Aceton gelöst. Um einen Einfluss dieser Lösungsmittel auf die Enzymaktivität auszuschließen, wurden sie auch alleine dem Enzymtest zugegeben. Met konnte in Wasser gelöst werden.

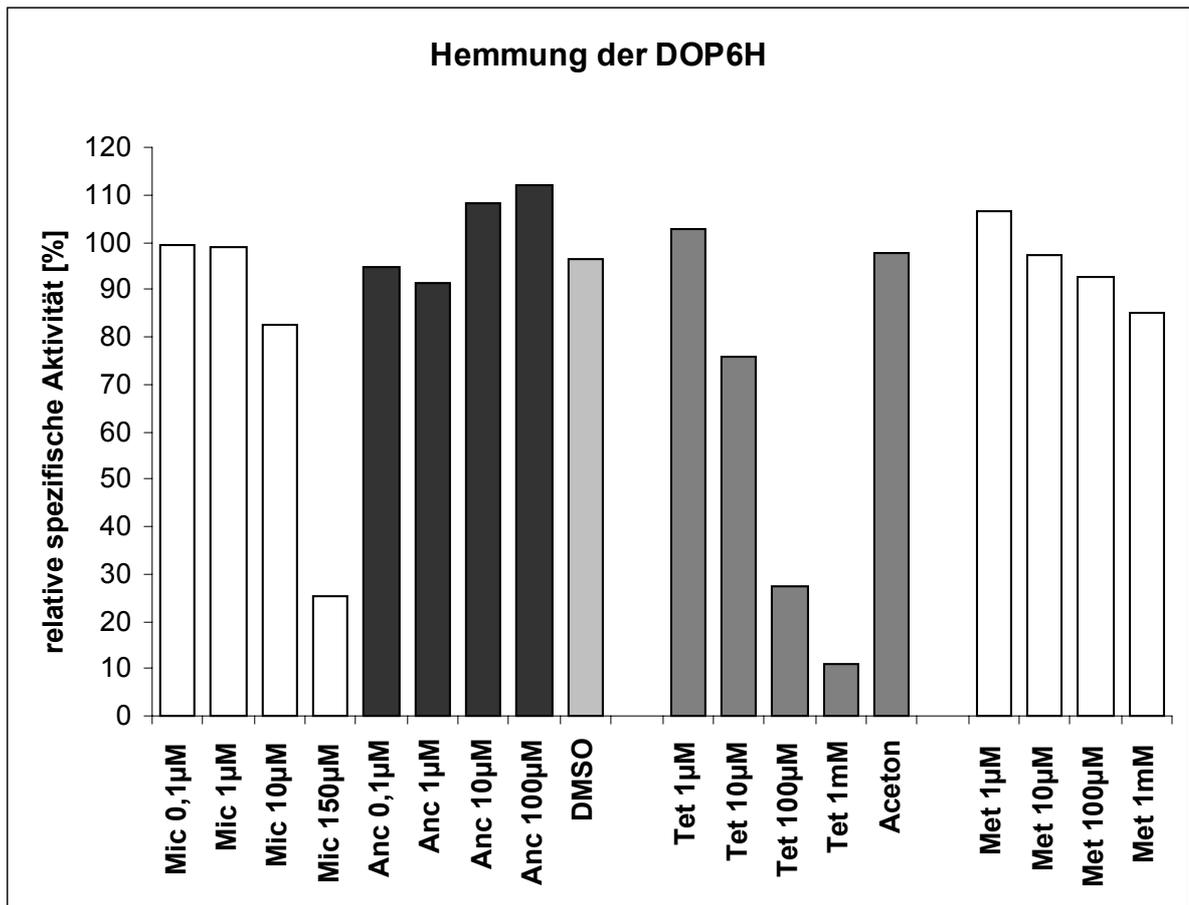


Abbildung 22: Hemmung der DOP6H mit verschiedenen Cytochrom P450 spezifischen Inhibitoren, Miconazol (Mic), Ancymidol (Anc), Tetcyclacis (Tet) und Metyrapon (Met). Mic und Anc waren in DMSO gelöst, Tet in Aceton, Met in Wasser. Ein hemmender Effekt der verwendeten Lösungsmittel konnte ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich, dass Tet der effektivste Inhibitor der DOP6H ist. Eine Konzentration von 10 μM bewirkte eine 25 %ige Hemmung der Aktivität, eine Konzentration von 1 mM eine 90 %ige Hemmung. Mic zeigte eine ähnlich starke Hemmung wie Tet, Met dagegen, das bei einer Konzentration von 1 mM im Enzymtest noch 85 % der DOP6H Aktivität zuließ, kann als schwacher Inhibitor bezeichnet werden kann. Anc zeigte keine inhibierende Wirkung. Ebenso konnte ein Effekt der Lösungsmittel DMSO und Aceton ausgeschlossen werden. Eine solch unterschiedliche Effektivität der beschriebenen Inhibitoren stimmt mit Literaturdaten überein (Yu et al., 2002, Yamamoto et al., 2003, Peters et al., 1998, Maenpaa et al., 1993).

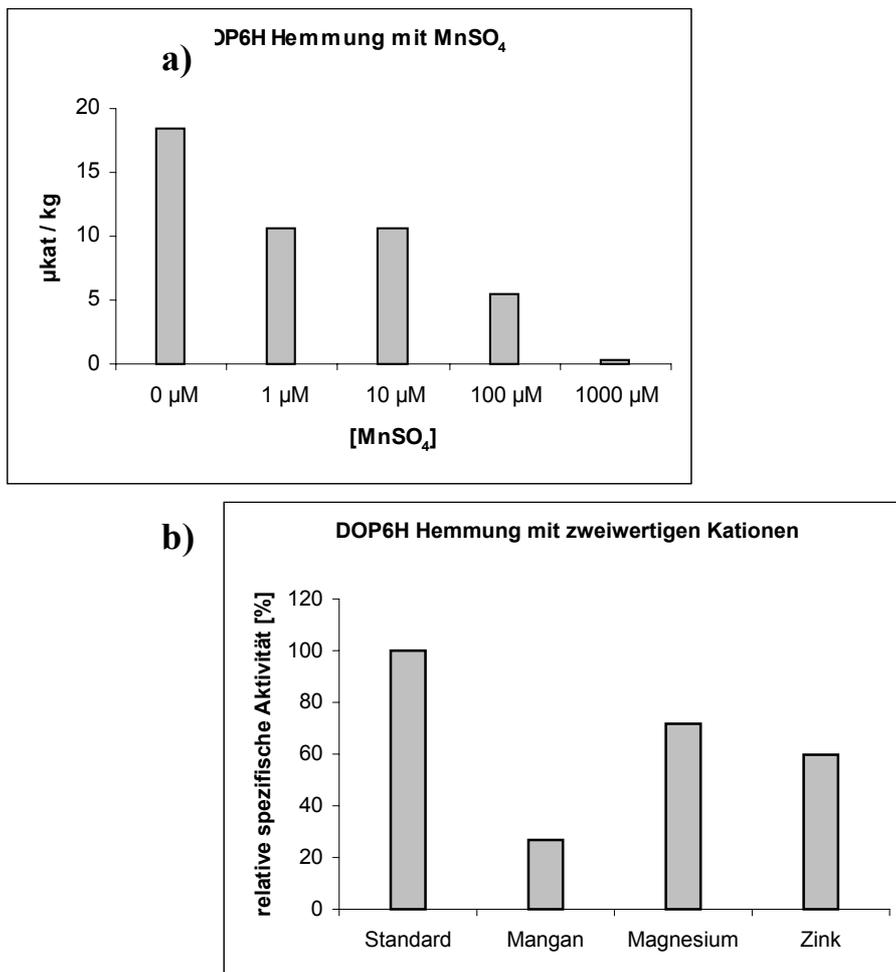


Abbildung 23: a) Hemmung der DOP6H durch Zugabe von Mangansulfat. Eine Endkonzentration von 1 mM bewirkt eine ca. 90 %ige Hemmung. Die eingesetzte Mikrosomenpräparation hatte eine Proteinkonzentration von 1 mg / ml, die Ansätze wurden bei 30 °C für 20 min inkubiert. b) Verschiedene zweiwertige Kationen im Vergleich. Die Testansätze wurden jeweils auf 1 mM Endkonzentration eingestellt. Die sonstigen Reaktionsbedingungen entsprachen denen aus a). Mit Mg^{2+} und Zn^{2+} ist eine Hemmung von 30 % bzw. 40 % zu beobachten, mit Mn^{2+} jedoch um 75 %.

Zusätzlich zu den bekannten spezifischen Inhibitoren wurden zweiwertige Ionen als unspezifische Hemmstoffe getestet. Dabei zeigte sich, dass Mn^{2+} Ionen die Aktivität der DOP6H deutlich hemmen (Abbildung 23). Bereits bei einer zugesetzten Konzentration

von 1 μM im Enzymtest ging die DOP6H-Aktivität um über 40 % zurück. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zugabe von Mn^{2+} die Aktivität der Zimtsäure 4-Hydroxylase steigern kann (Gabriac et al., 1991), eine inhibierende Wirkung von Mangan ist für ein pflanzliches Cytochrom P450 bisher noch nicht beschrieben worden. Ein Vergleich verschiedener zweiwertiger Kationen (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , jeweils als Sulfate eingesetzt) zeigte, dass alle drei eine hemmende Wirkung auf die DOP6H-Aktivität hatten, wobei Mn^{2+} jedoch am stärksten inhibierend wirkte. Der Mechanismus dieser Hemmung ist unklar. Es muss angemerkt werden, dass die Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Ionen in der Mikrosomenpräparation nicht bekannt sind.

Cytochrom P450-abhängige Enzymaktivitäten lassen sich im Allgemeinen durch Cytochrom c (Cyt. c) hemmen, so dass dieser Effekt als wichtiger Hinweis auf die Beteiligung eines Cytochrom P450 gewertet wird. Typischerweise reichen bereits geringe Cyt. c-Konzentrationen für eine deutliche Hemmung. Dies konnte auch für die DOP6H gezeigt werden. Eine Konzentration von ca. 0,5 μM Cyt. c im Enzymtest führte zu einer Reduzierung der DOP6H-Aktivität um 50 %, bei 2 μM Cyt. c sank die Aktivität um 90 % (Abbildung 24).

Cyt. c konkurriert mit Cytochrom P450-Enzymen um die Elektronen, die von der NADPH: Cytochrom P450-Reduktase übertragen werden, weshalb letztere auch als NADPH: Cytochrom c-Reduktase bezeichnet wird. Der starke hemmende Effekt zeigt, das Cyt. c effektiv an die Reduktase bindet. Dadurch werden keine Elektronen mehr auf die DOP6H übertragen und die Hydroxylierung kann nicht stattfinden.

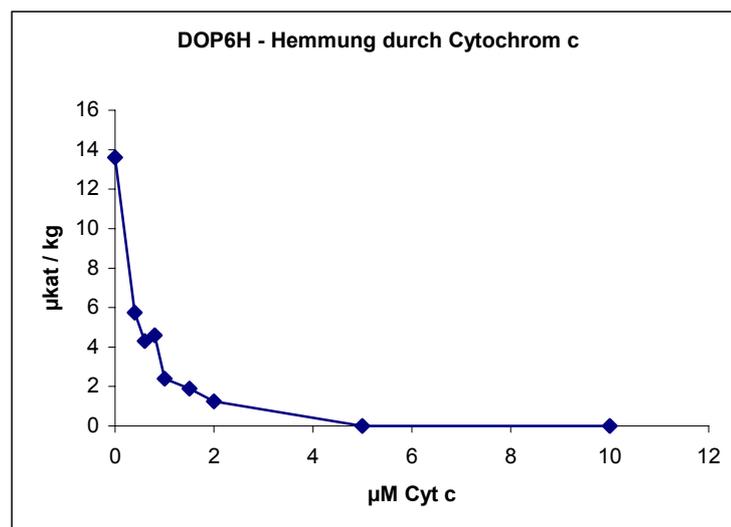


Abbildung 24: Die Hemmung der Aktivität durch Cytochrom c ist ein typisches Merkmal für Cytochrom P450 abhängige Enzyme. Eine 50 %ige Hemmung ließ sich schon bei $< 1 \mu\text{M}$ Cytochrom c im Reaktionsansatz beobachten.

Auch das Substratanalogon 4'-Demethyl-DOP wirkte leicht hemmend auf die DOP6H-Aktivität (Abbildung 25). Bei einer Endkonzentration von 50 μM 4'-Demethyl-DOP im Enzymtest sank die DOP6H-Aktivität um 10 %, bei einer Konzentration von 100 μM um etwa 40 %. Das tatsächliche Substrat DOP lag in den Testansätzen ebenfalls in einer Konzentration von 100 μM vor. Eine Hemmung von 40 % bei einem Verhältnis von 1:1 zwischen Substrat und Analogon spricht dafür, dass 4'-Demethyl-DOP ähnlich effektiv an die DOP6H bindet wie DOP. Es schien deshalb möglich, 4'-Demethyl-DOP als Liganden für die Etablierung einer Affinitäts-Chromatographie zu verwenden (siehe folgenden Abschnitt).

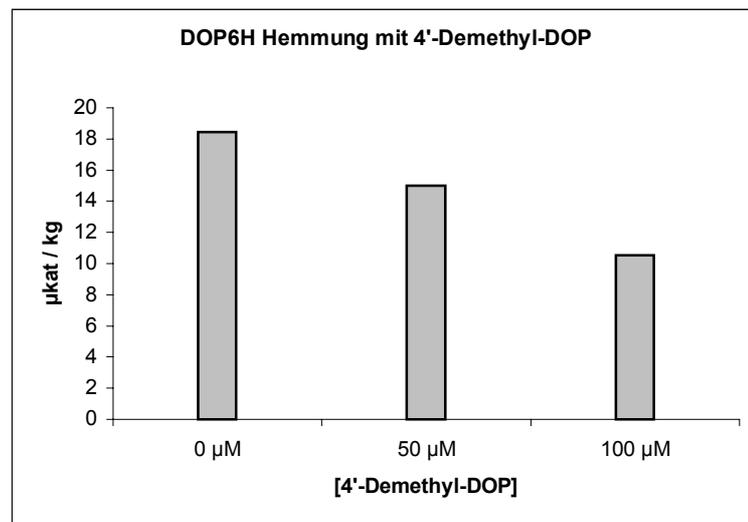


Abbildung 25: Durch Zugabe des Substratanalogons 4'-Demethyl-DOP konnte die DOP6H Aktivität leicht gehemmt werden.

3.7 Isolierung und Synthese von DOP

Um die DOP6H untersuchen und charakterisieren zu können, mussten hinreichende Mengen des Lignans Desoxypodophyllotoxin (DOP) zur Verfügung stehen, das nicht kommerziell erhältlich ist. Das Material, das für den größten Teil der beschriebenen Experimente eingesetzt wurde, stammt aus *Anthriscus sylvestris* und wurde freundlicherweise von Dr. Pras (Universität Groningen) zur Verfügung gestellt. Um DOP auch weiterhin als Substrat einsetzen zu können, wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Gewinnung dieses Lignans getestet.

3.7.1 Katalytische Hydrierung von PTOX und 4'-Demethyl-PTOX

Durch katalytische Hydrierung, wie bei Jackson und Dewick (1984) beschrieben, konnte sowohl PTOX zu DOP umgesetzt werden, wie auch 4'-Demethyl-PTOX zu 4'-Demethyl-DOP. Letzteres sollte als Ligand für eine Affinitätschromatographie

verwendet werden. Podophyllotoxin ist kommerziell erhältlich, 4'-Demethyl-PTOX wurde von Prof. Dr. Imbert zur Verfügung gestellt.

Bei dieser Reaktion wird die Hydroxylgruppe am C7-Atom in Form von H₂O abgespalten. Es handelt sich demnach um eine Hydrogenolyse, bei der die C7 OH-Gruppe gegenüber der C4' OH-Gruppe bevorzugt ist, weil letztere durch einen Mesomeren-Effekt (+M-Effekt) stabilisiert wird. Dies gilt für 4'-Demethyl-PTOX, da im Falle von PTOX ohnehin nur eine Hydroxylgruppe vorhanden ist (Abbildung 26).

Die Umsetzung mittels eines Pd-C Katalysators und H₂-Gas verlief nahezu vollständig, die eingesetzte Substanzmenge konnte zu 98 % als Produkt wiedergewonnen werden.

Die Versuche wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Imming (Marburg) durchgeführt.

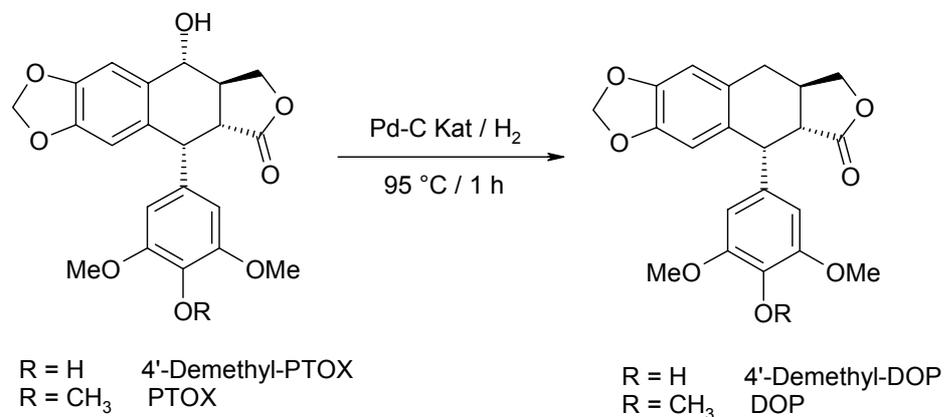


Abbildung 26: Reaktionsgleichung der Hydrogenolyse von PTOX bzw. 4'-Demethyl-PTOX. Die Reaktion wurde durchgeführt, wie bei Jackson und Dewick (1984) beschrieben, weitere Erläuterungen siehe Text.

3.7.2 Lignanextraktion aus Wurzeln von *Anthriscus sylvestris*

Das Vorkommen von Desoxypodophyllotoxin in *Anthriscus sylvestris* (Wiesenkerbel), Apiaceae, wurde zuerst von Nogouchi und Kawanami beschrieben (1940). Es finden sich vor allem Yatein und DOP in größeren Mengen in allen Pflanzenteilen, insbesondere aber in den Wurzeln (Abbildung 27). Da *A. sylvestris* in unseren Breitengraden ubiquitär vorkommt, lag es nahe, diese Pflanze zur Isolierung von DOP zu benutzen.



Abbildung 27: Wurzeln von *Anthriscus sylvestris* aus der Rasenfläche vor dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg.

Dazu wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Extraktionsverfahren in Teilen kombiniert (Kim et al., 2002b; Masuda et al., 2002, Van Uden et al., 1997), mit dem Ziel, ein möglichst einfaches und schnelles Verfahren zu etablieren. Nachdem die unterirdischen Teile kleingeschnitten, gefriergetrocknet, im Mörser zerkleinert und in MeOH unter Rückfluss extrahiert worden waren, wurde der Extrakt eingeeengt und mit Petrolether ausgeschüttelt. Es folgte eine chromatographische Trennung über eine Kieselgelsäule, nach der ein Extrakt erhalten wurde, der relativ wenige prominente *peaks* in der HPLC-Analyse aufwies. Eine weitere Auftrennung sollte dann durch Chromatographie an XAD2 erreicht werden.

Es stellte sich jedoch heraus, dass die Verwendung von XAD-Säulenmaterial keinen nennenswerten Reinigungseffekt bewirkte. Daher wurde schließlich die semipräparative HPLC zur Isolierung der gewünschten Substanzen aus dem Extrakt gewählt.

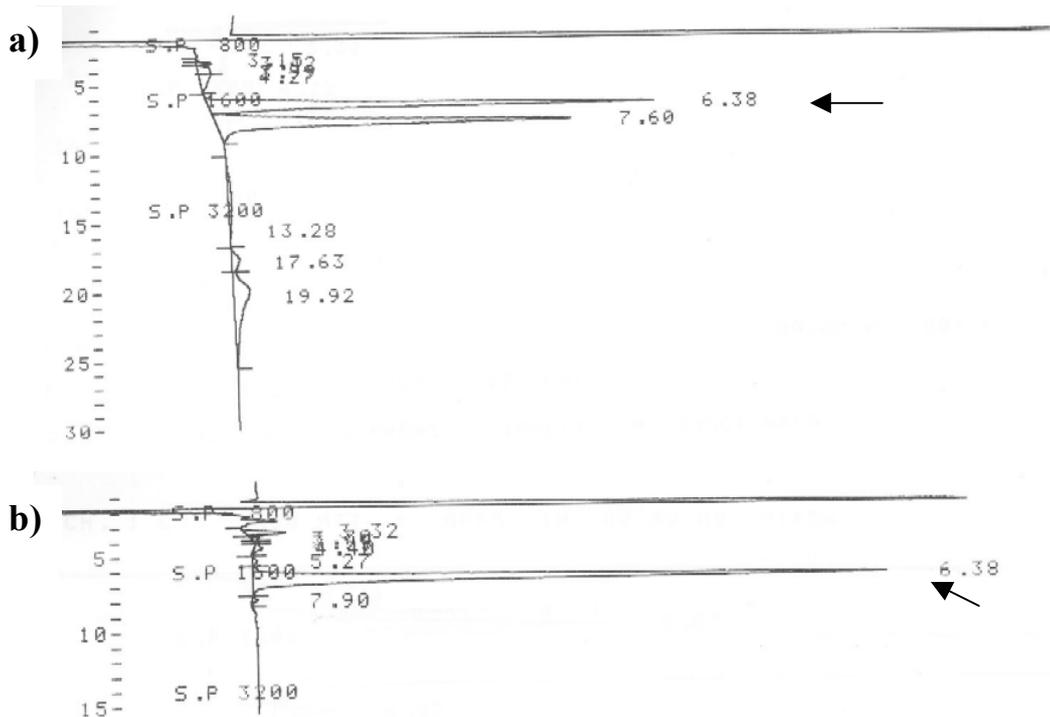


Abbildung 28: Vergleich von DOP-Präparationen aus *Anthriscus sylvestris* (a) und aus PTOX durch katalytische Hydrierung (b). Die HPLC-Analyse wurde mit 50 % Acetonitril als Laufmittel bei 1,8 ml / min Flussrate an einer *reversed phase* C18-Säule durchgeführt. DOP ist durch Pfeile markiert. Durch katalytische Hydrierung entsteht ein hochreines Produkt, das sich als Substrat für enzymatische Untersuchungen eignet. Die Präparation aus *A. sylvestris* weist zumindest eine deutliche, nicht identifizierte Verunreinigung bei einer Retentionszeit von 7,6 min auf.

Allerdings war das auf diese Weise isolierte DOP nicht rein und daher als Substrat für Enzymtests nicht geeignet. Es wäre demnach eine weitere Reinigung des DOP notwendig gewesen, um es für Enzymtests einsetzen zu können. Da jedoch mit der katalytischen Hydrierung von PTOX eine Alternative zur Verfügung stand wurde darauf verzichtet (Abbildung 28). Insgesamt war es durch die beschriebene Methode möglich, DOP aus *Anthriscus sylvestris* mit relativ geringem Materialaufwand zu isolieren. Sofern möglich, ist die katalytische Hydrierung von Podophyllotoxin zu DOP jedoch der Isolierung aus *Anthriscus sylvestris* vorzuziehen, da sie schneller ist und ein hochreines Produkt liefert, das sofort in Enzymtests eingesetzt werden kann.

3.8 Versuch zur Affinitätschromatographie mit 4'-Demethyl-DOP

Um aus der Vielzahl von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen in einer Mikrosomenpräparation ein einzelnes Enzym zu konzentrieren, ist die Affinitätschromatographie mit einem spezifischen Liganden ein möglicher Ansatz. Die erste Wahl als Ligand wäre das natürliche Substrat DOP, das aber über keine funktionelle Gruppe verfügt, die eine Kopplung an ein Säulenmaterial erlauben würde. Deshalb wurden Versuche mit dem Analogon aus der 4'-Demethyl-Serie, 4'-Demethyl-DOP unternommen, das eine

phenolische OH-Gruppe aufweist, die im Molekül relativ weit von der Hydroxylierungsstelle durch die DOP6H entfernt ist. Als Säulenmaterial wurde Epoxy-aktivierte Sepharose 6B gewählt, das die Kopplung von OH-Gruppen erlaubt. Allerdings ist für die Kopplungsreaktion ein basisches Milieu notwendig.

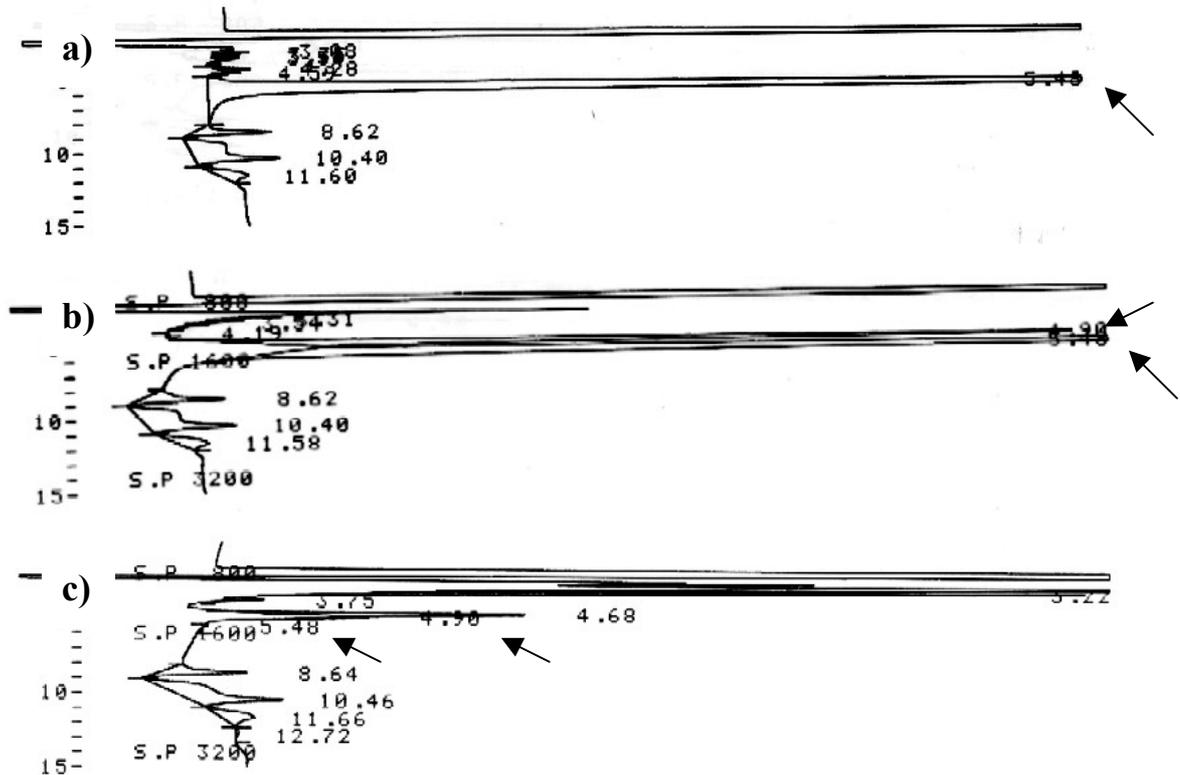


Abbildung 29: Stabilität von 4'-Demethyl-DOP unter basischen Bedingungen. Es wurde ein 0,1 M Phosphatpuffer verwendet, die Ansätze waren auf 15 % Dimethylformamid eingestellt, die Inkubation erfolgte jeweils für 20 Stunden bei 37 °C. HPLC-Analyse erfolgte an einer HyPURITY-Elite-Säule mit 50 % Acetonitril als Laufmittel bei einer Flussrate von 1,5 ml / min. Die besprochenen *peaks* sind mit Pfeilen markiert. **a)** Inkubation in destilliertem Wasser (ca. pH 7); 4'-Demethyl-DOP erscheint als *peak* nach einer Retentionszeit von etwa 5,4 min. **b)** Inkubation bei pH 9,1; der *peak* nach 5,4 min ist um etwa 35 % verringert, es ist ein neuer *peak* bei 4,9 min Retentionszeit entstanden. **c)** Inkubation bei pH 10,9; 4'-Demethyl-DOP ist kaum noch detektierbar, das primäre Zersetzungsprodukt bei 4,9 min Retentionszeit ist deutlich verringert, es treten neue prominente *peaks* bei kürzeren Retentionszeiten auf.

Es zeigte sich, dass 4'-Demethyl-DOP unter basischen Bedingungen nicht stabil ist (Abbildung 29). Dazu wurden Versuche in einem 0,1 M Phosphatpuffer durchgeführt, die jeweiligen Ansätze wurden mit der Zugabe des 4'-Demethyl-DOP auf 15 % Dimethylformamid eingestellt, um das wasserunlösliche Lignan in Lösung zu halten. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C in destilliertem Wasser war kein Abbau zu sehen. Bei Verwendung eines Puffers von pH 9,1 war jedoch ein primäres Abbauprodukt zu beobachten, die Menge des detektierbaren 4'-Demethyl-DOP hatte sich um etwa 35 % reduziert. Nach einer Inkubation bei pH 10,9 unter ansonsten

identischen Bedingungen, war 4'-Demethyl-DOP nur noch in Spuren zu finden und auch das primäre Zersetzungsprodukt war deutlich reduziert. Anscheinend war unter diesen Bedingungen der Abbauprozess weiter fortgeschritten. Die Verwendung eines Carbonat- statt eines Phosphatpuffers zeigte keinen Unterschied. Das primär auftretende Zersetzungsprodukt könnte durch eine Spaltung des Laktonringes des 4'-Demethyl-DOP entstehen.

Für die Kopplung von 4'-Demethyl-DOP an Epoxy-aktivierte Sepharose 6B wurde ein auf pH 9 eingestellter Phosphatpuffer verwendet. Dies entspricht der unteren pH-Grenze bei der laut Hersteller eine Kopplung noch möglich ist. Zwar konnte erwartet werden, dass nicht das gesamte 4'-Demethyl-DOP während der Reaktion erhalten bleibt, sofern aber zumindest ein Teil des intakten Liganden an das Säulenmaterial gekoppelt würde, könnte dies für die Affinitätschromatographie ausreichen. Zudem waren die Eigenschaften des primären Zersetzungsprodukts nicht bekannt. Ob es an das Säulenmaterial binden würde, war ebenso unklar wie seine möglichen Wechselwirkungen mit der DOP6H und seine tatsächliche chemische Struktur.

Nach Ablauf der Kopplungsreaktion wurde das Säulenmaterial mit Kopplungspuffer gewaschen und die Waschfraktionen aufgefangen. Nach einer Lignanextraktion der Waschfraktion mit Dichlormethan und anschließender HPLC-Analyse ließen sich hohe Mengen an 4'-Demethyl-DOP und seinem Zersetzungsprodukt nachweisen, was auf eine ineffektive Kopplung schließen lässt. Da für das Zersetzungsprodukt kein quantifizierbarer Standard vorlag, konnte keine Mengenabschätzung bezüglich des eventuell an das Säulenmaterial gekoppelten 4'-Demethyl-DOP vorgenommen werden. Die beiden Substanzen (4'-Demethyl-DOP und sein Zersetzungsprodukt) wurden über eine semipräparative HPLC-Säule voneinander getrennt. Versuche bei denen das Zersetzungsprodukt in verschiedenen Mengen DOP6H-Tests zugegeben wurde, blieben ohne klares Ergebnis, da es nicht gelang, die unbekannt Substanz chromatographisch von β -Peltatin zu trennen, so dass die DOP6H-Aktivität nicht bestimmt werden konnte. Um die möglichen Wechselwirkungen mit der DOP6H zu klären, wären weitere Untersuchungen sowie eine Strukturaufklärung notwendig.

Das gekoppelte Säulenmaterial wurde für den Versuch einer Proteinaufreinigung verwendet. Es ließen sich allerdings keine Proteine nachweisen, die von der Säule gebunden worden wären. Dies kann zum einen an der zu geringen Konzentration der DOP6H in der Mikrosomenpräparation liegen. Auch eine fehlgeschlagene oder zu ineffektive Kopplung des Liganden ist vorstellbar, ebenso wie dessen zu geringe Stabilität oder seine zu schwache Wechselwirkung mit dem gesuchten Protein. Außerdem war die hohe Viskosität der Mikrosomenpräparation im Proteinreinigungssystem problematisch. Die Verwendung von Triton X100 oder Tween 20 zur Solubilisierung der Membranproteine in den Mikrosomenpräparationen oder einfache

bzw. doppelte Phasentrennung mit Triton X114 zur Konzentrierung und damit leichter Detektierbarkeit der Cytochrom P450-Enzyme brachte keine Verbesserung.

3.9 Versuch zur biotechnologischen Anwendung von Mikrosomen

Es sollte die Frage untersucht werden, ob sich die Mikrosomen aus *Linum spec.* Suspensionskulturen zur Umwandlung von DOP im technologischen Maßstab nutzen lassen, d.h. ob ein kosteneffizienter Reaktionsansatz der DOP6H ohne weitere Enzymaufreinigung etabliert werden könnte. Da DOP beispielsweise aus *Anthriscus sylvestris* gewonnen werden kann, wurde NADPH als teuerster Bestandteil des Testsystems angesehen. Ausgehend von einer Arbeit von Schwaneberg et al. (2000), wurde daher versucht, NADPH als Elektronendonator durch ein System aus Zn und Co(III)-Sepulchrat zu ersetzen. Hierbei würde das Cobalt-Salz als Katalysator dienen und könnte aus dem Reaktionsansatz zurückgewonnen werden.

Bei dieser Reaktion steht der eingesetzte Zinkstaub im Gleichgewicht mit dem Zn^{2+} Ion. Durch die Anwesenheit von Chloridionen entsteht der Komplex $ZnCl_4^{2-}$. Auf diese Weise wird Zn^{2+} dem Gleichgewicht entzogen und genügend Zn kann gelöst werden, um Co(III)-Sepulchrat zu Co(II)-Sepulchrat zu reduzieren. Der Cobalt-Komplex überträgt Elektronen auf das Cytochrom P450, wodurch die gewünschte Reaktion ablaufen kann (Abbildung 30). Als Nebenreaktion kann Wasserstoffperoxid entstehen, wenn molekularer Sauerstoff von Co(II)-Sepulchrat reduziert wird, weshalb in der Arbeit von Schwaneberg et al. (2000) der zusätzliche Einsatz von Katalase empfohlen wird. In einer früheren Arbeit von Estabrook et al. (1996) wird nicht Zn als Elektronendonator genutzt, sondern statt dessen durch eine Pt-Elektrode-vermittelte Elektrolyse. In beiden Fällen wurde mit heterolog exprimiertem und aufgereinigtem Cytochrom P450 BM3 aus *Bacillus megaterius* gearbeitet. Der Unterschied zu pflanzlichen Mikrosomen bestand also nicht nur in dem wesentlich höheren Reinheitsgrad des untersuchten Enzyms, sondern auch in der Tatsache, dass es sich bei dem bakteriellen Cytochrom P450 um ein lösliches, also nicht membrangebundenes Protein handelt. Trotzdem schien es möglich, dass bei dieser Methode eine, wenn auch verringerte DOP6H-Aktivität messbar sein könnte, da in den Vesikeln, die bei der Mikrosomenpräparation entstehen, gebundene Proteine entweder nach „innen“ oder „außen“ zeigen. Die Möglichkeit des Kontaktes zwischen Co(II)-Sepulchrat und DOP6H war demnach gegeben.

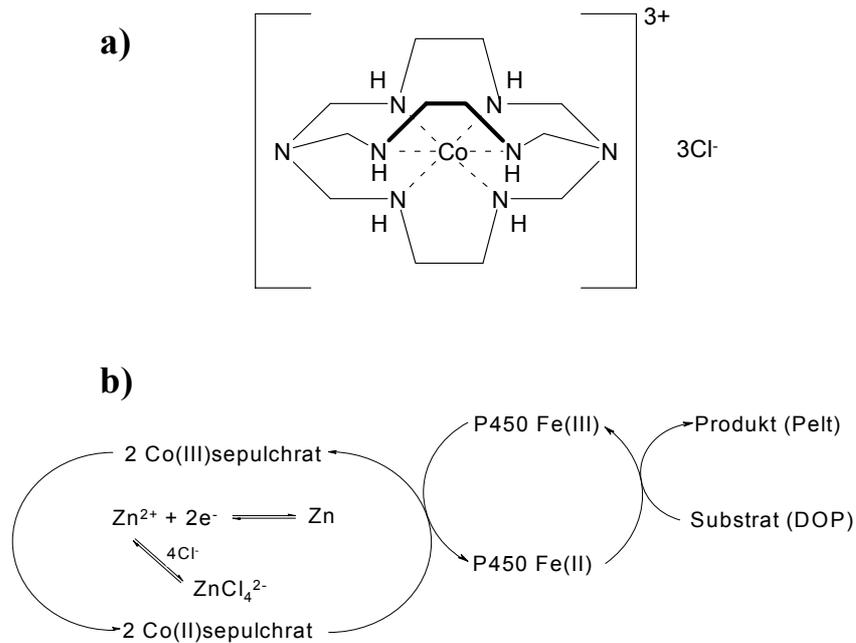


Abbildung 30: Zn und Co(III)-sephalrat als alternatives System der Elektronenübertragung auf DOP6H
a) Co(III)-Sephulchrat 3-Chlorid **b)** mögliches Reaktionsschema, Erläuterungen siehe Text (verändert aus Schwaneberg et al., 2000)

Allerdings konnte auch nach mehrstündiger Inkubation kein Umsatz von DOP zu β -Peltatin nachgewiesen werden. Auch ständiges Schütteln oder wiederholtes gründliches Mischen während der Inkubation brachte keinen Erfolg, ebenso wenig die Zugabe von Katalase. Da zu erwarten war, dass das Zn/Co-System ineffektiver sein würde als die „natürliche“ Elektronentransportkette, die von NADPH ausgeht, ist davon auszugehen, dass eine mögliche DOP6H-Aktivität unter der Nachweisgrenze liegt. Demnach wäre für eine biotechnologische Anwendung zumindest eine teilweise Aufreinigung der DOP6H wünschenswert, besser noch eine heterologe Expression.

Außerdem scheinen Zn^{2+} Ionen einen leicht hemmenden Effekt auf die Aktivität der DOP6H zu haben (Abbildung 23), was der Anwendung dieses Systems widersprechen würde. Die Effekte zweiwertiger Kationen auf Cytochrom P450-Systeme sind im einzelnen nicht aufgeklärt.

3.10 Klonierung von cDNAs der NADPH: Cytochrom P450-Reduktase aus *Linum spec.*

Eine Cytochrom P450 vermittelte Reaktion basiert auf einer Elektronentransportkette, bei der im einfachen Fall Elektronen von NADPH über die NADPH: Cytochrom P450-Reduktase auf das Cytochrom P450 übertragen werden, das die Umsetzung des Substrates katalysiert. Ein aufgereinigtes Cytochrom P450 wäre demnach nicht katalytisch aktiv, da ihm die Reaktionspartner, insbesondere die Reduktase fehlten.

Die NADPH:Cytochrom P450-Reduktase bildet nicht wie die Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme eine große Genfamilie, sondern liegt in den bisher untersuchten Pflanzen in wenigen Isoformen vor (Ro et al., 2002, Koopmann & Hahlbrock 1997). Außerdem verfügt sie über eine Reihe hochkonservierter Regionen (siehe nächsten Abschnitt). Um bei einer erfolgreichen Aufreinigung der DOP6H ein homologes System etablieren zu können, wurden daher Versuche zur Klonierung der NADPH:Cytochrom P450-Reduktase unternommen

3.10.1 Auswahl spezifischer Primer für die NADPH:Cytochrom P450-Reduktase

Aufgrund von Sequenzvergleichen lassen sich in NADPH:Cytochrom P450-Reduktasen verschiedene konservierte Regionen identifizieren, die für die Auswahl genspezifischer Primer geeignet sind. Dabei handelt es sich um die Bindungsstellen der Co-Faktoren FMN (Flavin-Mononukleotid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), sowie für den Elektronendonator NADPH und für das Cytochrom P450.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden folgende Primer gewählt:

FMNfor: 5' - CARTAYGARCATTTYAAYAAG - 3'
FAD3rev: 5' - CTTCATCCANGTNGAACA - 3'

Hierbei steht „R“ für den Einbau der Nukleotide Adenin (A) oder Guanin (G) und „Y“ für den Einbau der Nukleotide Thymin (T) oder Cytosin (C). „N“ bezeichnet die zufällige Verwendung eines der vier Nukleotide. Der in sense-Richtung gewählte Primer FMNfor bezieht sich auf die konservierte FMN-Bindungsstelle, der rückwärtskomplementär erstellte Primer FAD3rev auf das dritte Motiv der dreigeteilten Bindungsstelle für FAD.

Aufgrund der Vergleiche mit bekannten Reduktase-Sequenzen konnte ein Amplifikat von 800-1000 Basenpaaren erwartet werden.

3.10.2 RT-PCR und Klonierung

Über Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) konnten aus der isolierten RNA von *Linum album*, *L. nodiflorum* und *L. flavum* Amplifikate gewonnen werden. Nach Klonierung in *Escherichia coli* (Linie DH5 α) und anschließender Sequenzierung wurde per Datenbankabgleich bestätigt, dass es sich um Fragmente von NADPH:Cytochrom P450-Reduktasen handelt.

Um Fehler aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Sequenzierung zu minimieren, wurden alle Fragmente sowohl in *sense*-, als auch in *antisense*-Richtung sequenziert und die Ergebnisse gegeneinander abgeglichen. Die so gewonnenen Amplifikate sind im folgenden in Form eines *alignments* aufgeführt, das mit Hilfe des Programms

ClustalW erzeugt wurde. Das „*“-Symbol kennzeichnet Nukleotide, die in allen Sequenzen identisch sind.

```
nodiflorum CAGTATGAGCATTTTTAAACAAGACTGCAGTTGTCCTTGATGATGAACCTTTGTAAACAAGGT
album      CAGTATGAGCATTTTTAAACAAGACTGCAGTTGTCCTTGATGATGAACCTTTGTAAACAAGGT
flavum     CAGTATGAGCATTTTTAAATAAGATTGCAGTTGTCCTTGATGAAGAACCTTTGTAAACAAGGT
*****

nodifl     GGCAAGCGTCTCGTACCAGTTGGTCTAGGTGATGATGATCAATGCATTGAGGATGATTTT
album      GGCAAGCGTCTCGTACCAGTTGGTCTAGGTGATGACGATCAATGCATTGAGGATGATTTT
flavum     GGCAAGCGTCTCGTACCAGTTGGTCTAGGTGATGATGATCAATGCATTGAAGATGATTTT
*****

nodifl     ACTGCGTGGAAAGAATTACTATGGTCAGAGTTGGATCAAGGRCTCAGAGATGAAGATGAT
album      ACTGCATGGAAAGAATTACTATGGTSAGAGGTGGAKCAWGGACTCAGAGATGAAGATGAT
flavum     ACTGCATGGAAAGAATTACTATGGCCAGAGTTGGATCAATTACTCAGAGATGAAGATGAT
*****

nodifl     TTGAATGCTGCATCCACACCTTACACGGCAGCTATAACAAGAATACCGTTTAGTTATTCAT
album      TTGAATGCTGCATCCACACCTTACACGGCAGCTATAACAAGAATACCGTTTAGTTATTCAT
flavum     TTGAATACTGCATCCACACCGTATACGGCAGCTATAACAAGAATACCGTTTAGTTATTCAT
*****

nodifl     GATCCTTCTGTAACGTCTTATGAGGATAAAGTTGGGAACTTGGCAAATGGCAATACTTCT
album      GATCCTTCTGTAACGTCTTATGAGGATAAAGTTGGGAACTTGGCAAATGGCAATACTTCT
flavum     GATCCTTCTGTAACGTCTTATGAGGACAAGTTGGGAACTTGGCAAATGGCAATACTTCT
*****

nodifl     TTTGACATTCACCATCCTTGCAGAGTCAATGTTGATGTCCAAAG-AGAGCTCCACTTAGC
album      TTTGACATTCACCATCCTTGCAGAGTCAATGTTGATGTCCAAAGGAGAGCTCCACTTAGC
flavum     TTTGACATTCACCATCCTTGCAGAGTCAATGTTGCTGTCCAAAG-AGAGCTCCACTTGGC
*****

nodifl     AGAGTCCGACAGGTCTTGCATGCATCTGGAGTTTGACATTTTGGGCGCTCCTATTGTATA
album      AGAGTCCGACAG-TCTTGCATGCATCTGGAGTTTGACATTTTGGGCGCTCCTATTGTATA
flavum     AGAGTCCGACAGGTCTTGCATGCATCTGGAGTTTGACATTTTGGGCGCTCCTATTGTATA
*****

nodifl     TGAAACTGGAGATCATGTGGGTGTTTATGCTGAGAATTGCGAGGACGTTGTTGAAGAAGC
album      TGAAACTGGAGATTATGTTGGTGTGTTTATGCTGAGAATTGCGAGGACGTTGTTGAAGAAGC
flavum     TGAAACTGGAGATCATGTGGGTGTTTATGCTGAGAATTGCGAGGACACTGTTGAAGAAGC
*****

nodifl     AGGGAAGTTATTGGACCAACCCTTAGATTTGTTGTTCTCTATTTCATTCAAACAAAGAAGA
album      AGGGAAGTTATTGGACCAACCCTTAGATTTGTTGTTCTCTATTTCATTCAAACAAAGAAGA
flavum     AGGGAAGTTATTGGATCAACCCTTAGATTTGTTGTTCTCTATTTCATTGACAAAGAAGA
*****

nodifl     TGGGACACCCCTAGGAGGTTTATTGGCACCTCCGTTCCCAGGTCCCTTGCACTCTTCGATT
album      TGGGACACCCCTAGGAGGTTTATTGGCACCTCCGTTCCCAGGTCCCTTGCACTCTTCGATT
flavum     TGGGACACCCCTAGGAGGTTTATTGGCACCTCCGTTCCCAGGTCCCTTGCACTCTTCGATT
*****

nodifl     GGCACCTTTCATGTTTATGCTGACCTCTTGAACCTCTCCACGGAAGTCTGCTTTGGTTGCCTT
album      GGCACCTTTCATGTTTATGCTGACCTCTTGAACCTCTCCACGGAAGTCTGCTTTGGTTGCCTT
flavum     GGCACCTTTCATGTTTATGCTGACCTCTTGAACCTCTCCACGGAAGTCTGCTTTGGTTGCCTT
*****
```

```

nodifl      GGCTGCTCATGCAAGTGAACCAAGGGAGGCAGAGAGGCTTAGAGTCTTGTCTTCACCACA
album       GGCTGCTCATGCAAGTGAACCAAGGGAGGCAGAGAGGCTTAGAGTCTTGTCTTCACCACA
flavum      GGCTGCTCATGCAAGTGAACCAAGTGAGGCAGAGAGGCTTAGAGTCTTATCTTCACCAGA
*****

nodifl      GGGGAAGGACGAATACTCACAATGGGTTGTTGCTAGTCAAAGAAGTCTCCTTGAG-----
album       GGGGAAGGACGAATACTCACAATGGGTTCCCSCTAGTCAAAGAAGTCTCCTTGAG-----
flavum      GGGAAAGGACGAATACTCACAATGGGTTGTTGCTAGTCAAAGAAGTCTCCTTGAGGTAAT
***

nodifl      -----
album       -----
flavum      GGCCGAGTTCATCTGCAAAACCTCCTCTTGGTGTATTTTTTGCAGCAGTGGCTCCTCG

nodifl      -----AATTTGCTCCTGATAAAAGTTCA
album       -----AATTTGCTCCTGATAAAAGTTCA
flavum      ACTGCAACCTCGTTACTATTCAATCTCATCTTCTCCAAGATTTGCTCCCATAAAAGTTCA
*****

nodifl      TGTTACCTGTGCTTTAGTGCATGAGCGAACACCAACTGGTAGAATCCATAAGGGAGTGTG
album       TGTTACCTGTGCTTTAGTGCATGAGCGAACACCAACTGGTAGAATCCATAAGGGAGTGTG
flavum      TGTTACCTGTGCTTTAGTGCATGAGCGAACACCAACTGGTAGAATCCATAAGGGAGTGTG
*****

nodifl      TTCAACCTGGRTGGAG
album       TTCAACCTGGATGAAG
flavum      TTCAACCTGGATGAAG
***** **

```

Die Sequenzen der eingesetzten *primer* sind kursiv und unterstrichen dargestellt. Wie zu erwarten, weisen die Fragmente eine sehr hohe Homologie auf. Auffällig ist, dass das Fragment aus *L. flavum* mit 975 nt 104 nt länger ist als die Fragmente aus *L. album* und *L. nodiflorum* (871 nt). Bei dem entsprechenden Abschnitt könnte es sich z.B. um eine Insertion handeln.

Sequenz-Identität der Reduktase-Fragmente:

```

L. nodiflorum : L. flavum      86,4 %
L. album : L. flavum         85,5 %
L. album : L. nodiflorum     98,1 %

```

Die Übersetzung in putative Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms Emboss und erneutes *alignment* mit ClustalW ergeben folgendes:

```

nodiflorumQYEHFNKTAVVLDDELCKQGGKRLVPVGLGDDDDQCIEDDFTAWKELLWSELQGLRDEDD
album      QYEHFNKTAVVLDDELCKQGGKRLVPVGLGDDDDQCIEDDFTAWKELLWXEYVXXGLRDEDD
flavum     QYEHFNKIAVVLDDELCKQGGKRLVPVGLGDDDDQCIEDDFTAWKELLWPELDQLLRDEDD
*****
*****:*****:*****

nodifl     LNAASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRVNVQRELHLA
album      LNAASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRVNVQRRAPLS
flavum     LNTASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRVNVAVQRELHLA
**.*:*****:*****

```

```

nodifl      ESDRSCMHLEFDILGAPIVYETGDHVGVAENCEDVVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
album       RVRQSCMHLEFDILGAPIVYETGDYVGVAENCEDVVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
flavum      ESDRSCMHLEFDILGAPIVYETGDHVGVAENCEDTVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
             . :*****:*****.*****:***

nodifl      GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSCYADLLNSPRKSALVALAAHASEPREAERLRLVSSPQ
album       GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSCYADLLNSPRKSALVALAAHASEPREAERLRLVSSPQ
flavum      GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSLYADLLNSPRKSALVALAAHASEPSEAERLRLVSSPE
             ***** *****

nodifl      GKDEYSQWVVASQRSLEICSSS-----CYLCFSAANTNWNP-----GSVFNLXGX-
album       GKDEYSQWVPXSQRSLEICSSS-----CYLCFSAANTNWNP-----GSVFNLDEX-
flavum      GKDEYSQWVVASQRSLEVMAEFPSAKPPLGVFFAAVAPRLQPRYYSISSSPRFAPDKVH
             ***** *****: :. : *:. .. :* .. *

nodifl      -----
album       -----
flavum      VTCALVHERTPTGRIHKGVCSTWMK
    
```

Es fällt auf, dass die Sequenzen im vorderen Bereich sehr hohe Homologien aufweisen, von einer bestimmten Position an, die hier fett und unterstrichen markiert ist, gibt es jedoch fast keine Übereinstimmungen mehr. Das *alignment* lässt sich jedoch verbessern, wenn in den Nukleinsäuresequenzen von *L. nodiflorum* und *L. album* ein Adenin-Nukleotid deletiert wird (in den cDNA-Sequenzen ebenfalls fett und unterstrichen markiert), wodurch sich für die gesamte nachfolgende Sequenz das Leseraster verschiebt. Auf der Peptidebene wirkt sich dies folgendermaßen aus:

```

nodiflorum  QYEHFNKTAVVLDDELCKQGGKRLVPVGLGDDDQCIEDDFTAWKELLWSELDDQGLRDEDD
album       QYEHFNKTAVVLDDELCKQGGKRLVPVGLGDDDQCIEDDFTAWKELLWXEVXXGLRDEDD
flavum      QYEHFNKIAVVLDEELCKQGGKRLVPVGLGDDDQCIEDDFTAWKELLWPELDQLLRDEDD
             ***** *****:*****:***** * : *****

nodifl      LNAASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRNVNDVQRELHLA
album       LNAASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRNVNDVQRRAPLS
flavum      LNTASTPYTAAIQEYRLVIHDPSVTSYEDNFGNLANGNTSFDIHHPCRNVNAVQRELHLA
             **:*****:***** * * :

nodifl      ESDRSCMHLEFDILGAPIVYETGDHVGVAENCEDVVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
album       RVRQSCMHLEFDILGAPIVYETGDYVGVAENCEDVVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
flavum      ESDRSCMHLEFDILGAPIVYETGDHVGVAENCEDTVEEAGKLLDQPLDLLFSIHSNKED
             . :*****:*****.*****:***

nodifl      GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSCYADLLNSPRKSALVALAAHASEPREAERLRLVSSPQ
album       GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSCYADLLNSPRKSALVALAAHASEPREAERLRLVSSPQ
flavum      GTPLGGSLAPFPGPCTLRALSLYADLLNSPRKSALVALAAHASEPSEAERLRLVSSPE
             ***** *****

nodifl      GKDEYSQWVVASQRSLE-----FAPDKVH
album       GKDEYSQWVPXSQRSLE-----FAPDKVH
flavum      GKDEYSQWVVASQRSLEVMAEFPSAKPPLGVFFAAVAPRLQPRYYSISSSPRFAPDKVH
             ***** *****

nodifl      VTCALVHERTPTGRIHKGVCSTWXE
album       VTCALVHERTPTGRIHKGVCSTWMK
flavum      VTCALVHERTPTGRIHKGVCSTWMK
             ***** :
    
```

Dieser Sequenzvergleich ist aus zwei Gründen überzeugender als der erste. Zum einen ist das zusätzliche Element in der Sequenz von *L. flavum* hier genauso isoliert, wie im Vergleich der cDNA-Sequenzen, zum anderen weisen auch die N-terminalen Bereiche dieser Peptidsequenzen die erwarteten hohen Homologien auf. Es ist jedoch anzumerken, dass das fragliche, deletierte Adenin in den Sequenzen von *L. nodiflorum* und *L. album* an derselben Position auftrat und bei der Sequenzierung auch eindeutig identifiziert wurde. Es ist daher unklar, wie diese anscheinende Verschiebung des Leserasters zustande gekommen ist.

Ein Datenbankabgleich mit der Aminosäuresequenz aus *L. flavum* zeigt hohe Homologien zu bekannten pflanzlichen NADPH-Cytochrom P450 Reduktasen und deutliche Homologien zu NADPH:Cytochrom P450 Reduktasen aus anderen Organismengruppen, wie Insekten, Chordata oder Pilzen (angegeben ist jeweils die ermittelte Sequenzidentität zwischen dem Fragment aus *L. flavum* und den bekannten Sequenzen in Prozent, der Vergleich wurde durchgeführt mit dem Programm Fasta33 unter <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>).

NADPH-cytochrome P450 oxydoreductase isoform 1 aus <i>Populus trichocarpa</i> X <i>P. deltoides</i>	81 %
NADPH-ferrihemoprotein reductase aus <i>Vicia sativa</i>	80 %
NADPH-cytochrome P450 reductase aus <i>Vigna radiata</i>	79 %
NADPH:P450 reductase aus <i>Glycine max</i>	79 %
NADPH-cytochrome P-450 reductase aus <i>Ophiorhiza pumila</i>	77 %
NADPH-cytochrome P450 reductase aus <i>Pseudotsuga menziesii</i>	75 %
NADPH:ferrihemoprotein oxidoreductase aus <i>Papaver somniferum</i>	74 %
NADPH-ferrihemoprotein reductase ATR1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	74 %
NADPH-cytochrome P450 reductase aus <i>Triticum aestivum</i>	72 %
NADPH:ferrihemoprotein oxidoreductase aus <i>Eschscholzia californica</i>	70 %
NADPH cytochrome P450 reductase aus <i>Bombyx mori</i>	38,2 %
NADPH cytochrome P450 reductase aus <i>Anopheles gambiae</i>	39,1 %
NADPH-cytochrome P450 reductase aus <i>Cavia porcellus</i>	38,6 %
NADPH-cytochrome P450 reductase aus <i>Homo sapiens</i>	37,8 %
NADPH cytochrome P450 oxidoreductase isoenzyme 1 aus <i>Rhizopus stolonifer</i>	34,1 %

Für diese Sequenzvergleiche wurde die Sequenz des Fragmentes aus *L. flavum* gewählt, da diese die längste ist und sich von den Sequenzen aus *L. album* und *L. nodiflorum* im Wesentlichen nur durch ein zusätzliches Stück von 104 Nukleotiden bzw. 35 Aminosäuren unterscheidet. Wird nur dieses zusätzliche Stück mit der Datenbank

verglichen, so zeigen sich vergleichbare Homologien mit pflanzlichen NADPH:Cytochrom P450 Reduktasen. Daraus könnte geschlossen werden, dass es sich um eine Deletion in *L. album* und *L. nodiflorum* handelt. Für genauere Schlussfolgerungen müssten weitere Klone aus den letztgenannten Spezies untersucht werden.

Eine weitergehende Einordnung der Sequenzen scheint zunächst nicht sinnvoll, da es sich nicht um die kompletten Transkripte handelt und insbesondere die variablen untranslatierten Bereiche am 5'- und am 3'-Ende fehlen. Um Vollängklone inklusive der 3'- und 5'-untranslatierten Bereiche zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Strategien getestet, die sogenannte RACE-PCR und das *screening* einer *Linum album* cDNA-Bank.

3.10.3 RACE-PCR und cDNA-Bank screening

Die Abkürzung RACE steht für *rapid amplification of cDNA ends*. Mit dieser Methode sollen ausgehend von einer bekannten Sequenz die fehlenden Enden sowohl auf der 5'-, wie auf der 3'-Seite ermittelt werden. Es wurden die Systeme zweier Anbieter verwendet, die sich im Ablauf der Reaktion leicht unterscheiden.

Beim SMART-RACE-System von Clontech wird die cDNA-Synthese von oligo(dT)-Primern gestartet. Für 3'- und 5'-RACE-PCR werden unterschiedliche Ansätze verwendet. Es ist notwendig, eine Reverse Transkriptase zu verwenden, die eine Terminale-Transferase-Aktivität besitzt. Benötigt werden zwei genspezifische Primer für die PCR, wobei der Primer für die 5'-RACE-PCR rückwärts-komplementär zur mRNA-Sequenz sein muss.

Ausgehend von dem Reduktase-Fragment aus *L. nodiflorum* wurden folgende Primer für die RACE-PCR gewählt:

3'-RACE: 5'-GCTGCATCCACACCTTACACGGCAGC-3'

5'-RACE: 5'-GCAAGGACCTGGGAACGGAGGTGCC-3'

Das RACE-PCR-System von Invitrogen geht ebenfalls von zwei unterschiedlichen Ansätzen für 5'- und 3'-RACE-PCR aus. Allerdings wird empfohlen, für die cDNA-Synthese für die 5'-RACE einen genspezifischen Primer (GSP1) zu verwenden, der ebenfalls rückwärts-komplementär sein muss. Nach Aufreinigung der cDNA wird in diesem System eine zusätzliche Terminale Transferase verwendet. Für die eigentliche PCR werden wiederum zwei genspezifische Primer benötigt.

Folgende Sequenzen wurden als genspezifische Primer verwendet:

GSP1rc: 5' -GGTGTGGATGCAGCATTC-3'
GSP2rc: 5' -CCTAGACCAACTGGTACGAGACG-3'
GSP3: 5' -CACACAGGGGAAGGAGGAATACTC-3'

Erwartungsgemäß lieferte das 3'-RACE-Verfahren eher Ergebnisse als das entsprechende 5'-Verfahren, allerdings ließen sich die PCR-Amplifikate entweder nicht klonieren, es traten Probleme beim Sequenzieren auf oder es handelte sich nicht um Sequenzen einer NADPH:Cytochrom P450 Reduktase. Ein spezifisches Produkt konnte somit nicht ermittelt werden. Bei der 5'-RACE-PCR konnten in den meisten Fällen keine Amplifikate detektiert werden oder die Produkte ließen sich nicht klonieren bzw. in einem *nested*-PCR-Verfahren nicht weiter vervielfältigen. Dies spricht dafür, dass es sich um Artefakte handelte. Insgesamt führte die RACE-Methode in diesen Versuchen leider nicht zum Erfolg.

Das *screening* einer cDNA-Bank aus *Linum album*, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Alfermann aus Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte wie im Methodenteil (Abschnitt 2.26) beschrieben, und wurde zweimal wiederholt. Das Fragment aus *L. nodiflorum* (Abschnitt 3.10.2) wurde als heterologe Sonde benutzt, die sich allerdings von der homologen Sequenz aus *L. album* nur unwesentlich unterscheidet. Trotz einiger vielversprechender Signale konnte auf diese Weise kein Vollängen-Klon der CPR gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Yatein wurde in zellfreien Mikrosomenpräparationen aus *Linum* Zellkulturen nicht enzymatisch umgesetzt – mögliche Gründe

4.1.1 Yatein ist kein Intermediat im Stoffwechselweg zu DOP in *Linum spec.*

Yatein (Abbildung 31) wurde zuerst 1972 von McDoniel & Cole 1972 beschrieben, die es aus *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae) isolierten, einer in Mexiko heimischen Pflanze. Allerdings wurde die Verbindung in dieser Veröffentlichung noch als „Compound I“ bezeichnet. Erdtman & Harmatha 1979 beschreiben die Isolierung von Yatein aus *Libocedrus yateensis* (Cupressaceae) zwar 1979, geben aber an, sie bereits 10 Jahre zuvor durchgeführt zu haben. Der Speziesname „yateensis“ verweist auf das Herkunftsgebiet dieses Baumes, der im Süden der Pazifikinsel Neukaledonien in der Umgebung der Stadt Yate endemisch ist.

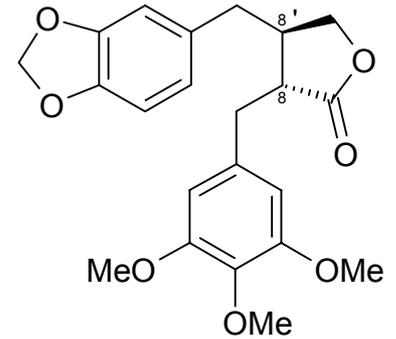


Abbildung 31: (-) Yatein

Die beiden angegebenen Strukturformeln für Yatein unterscheiden sich allerdings in der Konfiguration der H-Atome an C8 und C8' (in den Artikeln nach alter Nomenklatur als C2 und C3 bezeichnet).

In der Gattung *Bursera* konnte Yatein in *B. fagaroides* var. *elongata* nachgewiesen werden (Koulman, 2003). Aus der Gattung *Libocedrus* ist das Vorkommen von β -Peltatin-A Methylether in *L. bidwillii* beschrieben (Russell et al., 1976), sowie das Vorkommen von DOP in *Libocedrus decurrens* (Kupchan et al., 1967). Insgesamt ist die Familie der Cupressaceae für reiches Vorkommen an Lignanen bekannt. So wurde das Vorkommen von Yatein beschrieben in *Juniperus chinensis* (Miyata et al., 1998) und in geringeren Konzentrationen in den Gattungen *Thuja* und *Chamaecyparis* (Lim et al., 2002).

Yatein wurde außerdem gefunden in der Lamiaceae *Hyptis verticillata* (Novelo et al., 1993), *Hernandia nymphaeifolia* (Chen et al., 1996) und den Hernandiaceen *Hernandia ovigera* (Gu et al., 2002), sowie insbesondere in *Anthriscus sylvestris*, einer in Europa weit verbreiteten Apiacee (Koulman et al., 2003b, Ikeda et al., 1998). In *Podophyllum hexandrum* konnte Yatein zwar als Vorstufe von Podophyllotoxin identifiziert werden, aber ein Nachweis von Yatein selbst gelang nicht. Dies könnte mit einer schnellen Umsetzung und damit einem geringen Yatein-Pool in der Pflanze erklärt werden (Kamil & Dewick 1986b).

Die Biosynthese von Yatein in *A. sylvestris* wurde vor kurzem von Sakakibara et al. (Sakakibara et al., 2003) über Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Phenylalanin und

^2H -markierten Lignanene aufgeklärt. Ausgehend von Matairesinol wird demnach zunächst das C5'-Atom im A-Ring hydroxyliert und methyliert, anschließend erfolgt die Methylierung der OH-Gruppe an C4', und der letzte Schritt ist die Bildung der Methylendioxybrücke am B-Ring. Wird diese Brücke dagegen als erstes geschlossen, so erfolgt keine Substitution an C5' mehr und die Biosynthese endet mit Burshehmin, das sich von Yatein eben durch die fehlende Methoxygruppe an C5' unterscheidet (Abbildung 32). Die Bildung von DOP aus Yatein durch eine C2-C7' Ringschlussreaktion wurde in diesem Artikel nicht gezeigt, wenngleich DOP in *A. sylvestris* in größerer Menge akkumuliert (Nogouchi & Kawanami 1940). Auch wenn der direkte Umsatz von Yatein zu DOP nahe liegt, können getrennte Biosynthesewege der beiden Lignane nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist die Reaktionsabfolge in *A. sylvestris* nicht notwendigerweise mit der in anderen Spezies identisch.

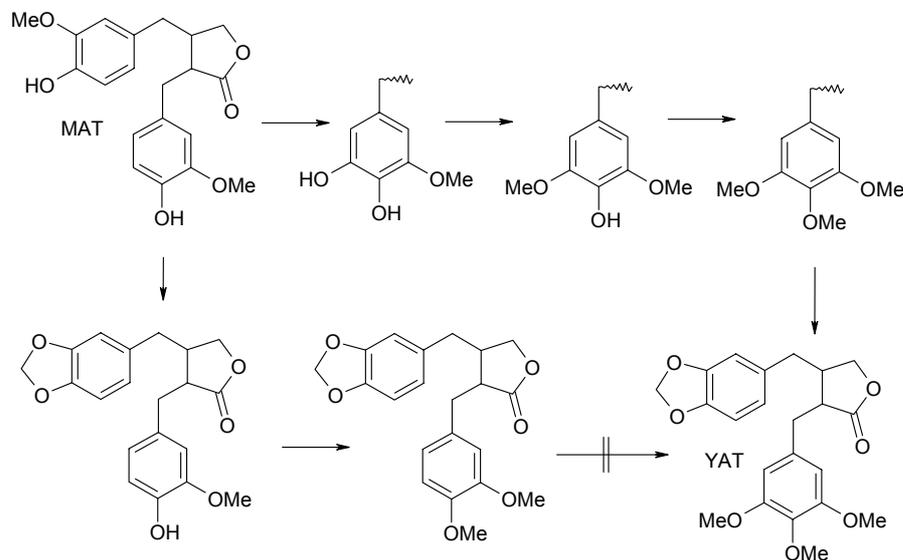


Abbildung 32: Yatein-Biosynthese in *Anthriscus sylvestris*. Wird die Methylendioxybrücke bereits auf der Stufe von Matairesinol geschlossen, kann kein Yatein mehr gebildet werden (Sakakibara et al. 2003)

So wurde von Xia et al., 2000 gezeigt, dass bei Biotransformationsversuchen mit radioaktiv markierten Vorstufen in *Linum flavum* Wurzeln 7-Hydroxymatairesinol gebildet wurde. Die Einführung der C7-OH Gruppe in diesem Stadium scheint gegen eine Bedeutung von Yatein oder DOP als Intermediate für das in *L. flavum* gebildete PTOX zu sprechen.

Dagegen zeigten Fütterungsversuche von Kamil und Dewick in *Podophyllum spec.* (Kamil & Dewick 1986b) einen Umsatz von Yatein zu Podophyllotoxin. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sprechen für abweichende Biosynthesewege in *Podophyllum spec.*, *Linum spec.* und evtl. *A. sylvestris*. Kamil und Dewick gehen dabei von einer chinonartigen Zwischenstufe aus, und folgern, dass die Lignane Podorhizol (POD) und Anhydropodorhizol (AHP), die ebenfalls in *P. peltatum* vorkommen, als Nebenprodukte beim Umsatz von Yatein zu DOP entstehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar Yatein in *Podophyllum spec.* zu DOP umgesetzt wird, dass aber nicht geklärt ist, ob in *Linum spec.* oder *A. sylvestris* derselbe Biosyntheseweg beschriftet wird, da in diesen Pflanzen bisher die notwendige Ringschlussreaktion nicht nachgewiesen werden konnte. Da Yatein selbst cytotoxisch ist (Medarde et al., 1995) und Fraßinsekten abwehrende Eigenschaften aufweist (Harmatha & Nawrot 2002) könnte es das Endprodukt eines Biosynthesewegs darstellen, der z.B. in *A. sylvestris* parallel zur Biosynthese von DOP abläuft. Die Ergebnisse von Sakakibara et al. (2003) belegen, dass solche parallelen Wege möglich sind, und phytochemische Untersuchungen (Koulman et al., 2003b) könnten dahingehend interpretiert werden, dass Yatein und DOP nicht ineinander überführbar sind, da sie beide in den Pflanzen akkumulieren. Dass Yatein beim Abbau von DOP entsteht kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber zunächst unwahrscheinlich, da die Öffnung des aliphatischen Ringes ungünstiger ist, als beispielsweise die des Lactonringes.

Dass es in *Linum album*, *L. flavum* und *L. nodiflorum* nicht möglich war, einen enzymatischen Umsatz von Yatein zu DOP nachzuweisen, könnte also als Hinweis darauf gewertet werden, dass in der Gattung *Linum* Yatein kein Intermediat in der Biosynthese von Lignan des Podophyllotoxin-Typs ist.

Ungeklärt bleibt dabei die Frage, wie eine alternative Biosynthese von DOP in *Linum spec.* aussehen könnte, da auch mit POD und AHP kein Umsatz nachgewiesen werden konnte. Auf diese Frage soll am Ende des Kapitels genauer eingegangen werden.

4.1.2 Die Umsetzung von Yatein ist nicht Cytochrom P450 abhängig

Die postulierte C2-C7' Ringschlussreaktion von Yatein zu DOP könnte von einem Cytochrom P450-abhängigen Enzym katalysiert werden, wobei der exakte Mechanismus einer solchen Reaktion diskutiert werden kann. Außerdem käme ein Enzym aus der Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen oder eine Peroxidase infrage. Ein Enzymtest oder enzymatisch aktiver Zellaufschluss, in dem Yatein zu DOP umgesetzt wird, ist in der Literatur allerdings nicht beschrieben.

Ein Beispiel für eine Cytochrom P450-katalysierte intramolekulare C-C Kopplung ist die Reaktion der Salutaridin-Synthase aus *Papaver somniferum* (Gerardy & Zenk 1993). Das Enzym bewirkt den Ringschluss zwischen C12 und C13 in (R)-Reticulin in der Biosynthese von Morphin (Abbildung 33). Die optimalen Bedingungen für die Salutaridin-Synthase (pH 7,5 25 °C, Abhängigkeit von O₂ und NADPH) ähneln denen, die in dieser Arbeit für Cytochrom P450-Tests verwendet wurden. Eine putative DOP-Synthase mit entsprechenden Charakteristika hätte demnach unter den verwendeten Bedingungen nachgewiesen werden können.

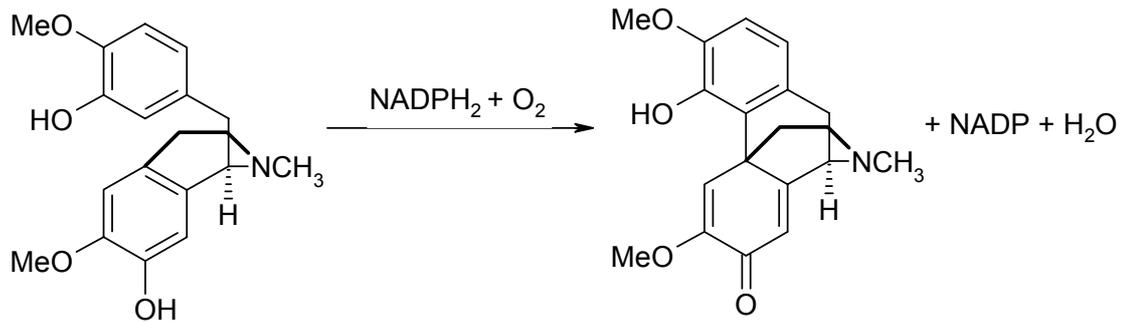


Abbildung 33: Reaktion der Satutaridin-Synthese aus *Papaver somniferum*. Beispiel einer Cytochrom P450-katalysierten, intramolekularen C-C-Kopplung bei einer Ringschlussreaktion.

Ein weiteres Beispiel für eine möglicherweise Cytochrom P450-abhängige C-C Kopplung findet sich in der Biosynthese des Alkaloids Lunarin (Sagner et al., 1998). In diesem Fall handelt es sich um eine intermolekulare Kopplung. Allerdings ist die P450-Abhängigkeit dieser Reaktion nicht eindeutig nachgewiesen.

Aus der Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ist in Pflanzen bisher kein Fall einer C-C Kopplung beschrieben (De Carolis & De Luca 1994). Die Beteiligung eines solchen Enzyms an der Bildung von DOP aus Yatein erscheint auch wegen des üblichen Reaktionsmechanismus, bei dem zwei Sauerstoffatome in das jeweilige Substrat eingefügt werden, wenig wahrscheinlich.

Peroxidasen bilden in Pflanzen eine große Genfamilie und sind an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt (Hiraga et al., 2001). Dazu gehören Lignin-Bildung, Auxin-Katabolismus und Wundheilung. Auch die oxidative Phenol-Kopplung von Monolignol-Einheiten zu Beginn der Lignan-Biosynthese wird vom einem solchen Enzym katalysiert. Durch die Beteiligung eines dirigierenden Proteins verläuft diese Kopplung stereospezifisch (Davin et al., 1997). Ein ähnliches System ist auch für den Umsatz von Yatein zu DOP vorstellbar. Zwar brachten erste Versuche zur Beteiligung einer Peroxidase am Umsatz von Yatein kein Ergebnis, aber zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um eine Peroxidase-abhängige DOP-Synthese ausschließen zu können.

Zusammenfassend scheint ein Cytochrom P450-katalysierter Umsatz am wahrscheinlichsten, da zumindest eine ähnliche Reaktion beschrieben ist, und Reaktionen mit Cytochrom P450-Beteiligung zumeist stereospezifisch verlaufen, was bei vielen Peroxidase-Reaktionen nicht der Fall ist. Allerdings kann die Beteiligung einer Peroxidase nicht ausgeschlossen werden.

4.1.3 Ein spezifisches Cytochrom P450-Enzym ist im verwendeten Testverfahren nicht nachweisbar

Die häufigsten Reaktionen, die durch Cytochrom P450 abhängige Enzyme katalysiert werden, sind Hydroxylierungen. Allerdings kommen auch Epoxidierungen, C-C-

Verknüpfungen (Gerardy & Zenk 1993) und C-O-Bindungen (Kraus & Kutchan 1995, Nezbedova et al., 2000, Peters et al., 1998, Friederich et al., 1999), sowie das Schließen einer Methyldioxybrücke vor (Bauer & Zenk 1991, Rueffer & Zenk 1994, Ikezawa et al., 2003). Im allgemeinen geht man bei Cytochrom P450-katalysierten Reaktionen von einem radikalischen Mechanismus aus (Mansuy, 1998, Porter & Coon 1991). In allen Fällen bedarf es einer aktivierten Sauerstoffspezies als reaktiver Zwischenstufe. Für die Bindung des molekularen Sauerstoffes ist die Häm-Gruppe des Cytochroms zuständig, die Aktivierung erfolgt durch Elektronenübertragung von der NADPH: Cytochrom P450-Reduktase und evtl. von Cytochrom b_5 .

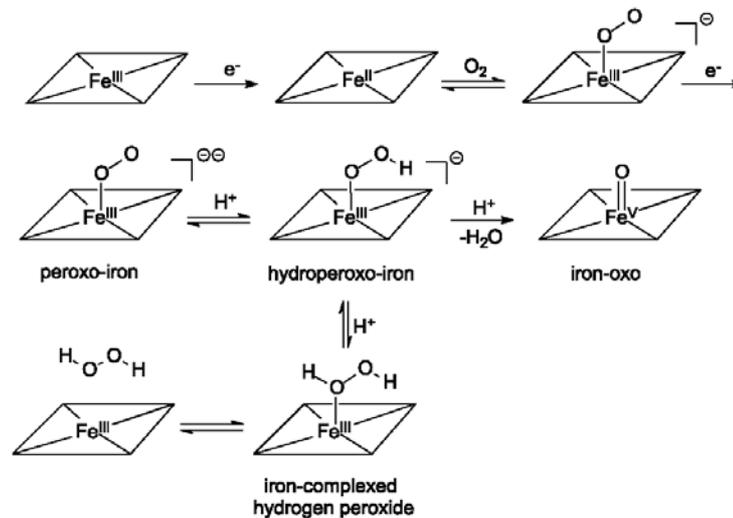


Abbildung 34: Zwischenstufen während P450 katalysierter Reaktionen. Das Parallelgramm steht für die Häm-Gruppe. Entnommen aus: Newcomb et al., 2003

Welches die reaktive Zwischenstufe ist, die mit dem Substrat reagiert, ist nicht in allen Fällen abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass unterschiedliche Zwischenstufen für verschiedene Reaktionstypen bedeutsam sein könnten (Abbildung 34). Für die „klassischen“ Hydroxylierungen geht man meist von einer Eisen-Oxo-Spezies aus. Diese würde vom Substrat ein Proton abstrahieren, wobei eine radikalische Zwischenstufe entsteht, die umgehend mit der aktivierten OH-Gruppe zum hydroxylierten Endprodukt reagiert.

Im Falle einer C-C-Verknüpfung, wie sie z.B. bei einer Umsetzung von Yatein zu DOP passieren müsste, ist allerdings auch eine Eisen-Peroxo-Spezies bzw. aktiviertes Wasserstoffperoxid als reaktive Zwischenstufe denkbar (Newcomb et al., 2003, Veeger, 2002). Der Reaktionsmechanismus würde dann die Übertragung einer OH-Gruppe auf das Substrat und die anschließende Eliminierung von H_2O bedingen. Das entstehende Carbanion würde anschließend inter- oder intramolekular abreagieren.

Dieser alternative Reaktionsmechanismus ist nicht belegt, d.h. die notwendige reaktive Sauerstoffverbindung konnte nicht experimentell gezeigt werden. Allerdings ergaben auch die mechanistischen Untersuchungen zum ersten Modell kein einheitliches Bild.

Trotz intensiver Bemühungen in den letzten Jahren, bleiben also einige Fragen zum genauen Reaktionsmechanismus der Cytochrom P450 abhängigen Enzyme offen, insbesondere, wenn es sich nicht um „klassische“ Hydroxylierungsreaktionen handelt.

Es scheint einsichtig, dass die C2-C7' Verknüpfung von Yatein zu DOP ein anderer Reaktionstyp ist als die Hydroxylierung von DOP zu β -Peltatin oder Podophyllotoxin. Auch wenn für beide Biosyntheseschritte eine Cytochrom P450 abhängiges Enzym verantwortlich ist, könnte es sein, dass für das mögliche Substrat Yatein deutlich andere Reaktionsbedingungen (bzw. weitere Cofaktoren) nötig sind als etwa für die DOP 6-Hydroxylase. Für die beschriebene Cytochrom P450-abhängige Salutaridin-Synthase aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel, die eine oxidative C-C-Kopplung katalysiert, scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein.

Dennoch könnte auch dies eine Erklärung dafür sein, warum mit den Testverfahren, die die DOP 6-Hydroxylase nachweisen, einschließlich gängiger Abwandlungen, kein Umsatz von Yatein gezeigt werden konnte.

4.1.4 Ein spezifisches Enzym ist zu gering exprimiert, um nachweisbar zu sein

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durchaus einen direkten Umsatz von Yatein zu DOP gibt, der möglicherweise auch Cytochrom P450-katalysiert ist, dessen Umsatzraten in Mikrosomenpräparationen aber unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Zwar wurde auf unterschiedliche Weise versucht, auch ein eventuell schwach exprimiertes Enzym nachzuweisen (z.B. durch Verlängerung der Inkubationszeit oder Vergrößerung des Testvolumens), aber eine Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze bleibt möglich. Ebenfalls denkbar ist ein Abbau, oder eine teilweise Degradation des gesuchten Enzyms während der Aufreinigung. Geht man von einem Cytochrom P450-Enzym aus, so erscheint dies allerdings eher unwahrscheinlich, da in den verwendeten Präparationen sowohl die DOP6H als auch die C4H nachgewiesen werden konnten. Es kann daher erwartet werden, dass auch eine putative DOP-Synthase unter diesen Bedingungen funktionsfähig bleibt, da ein spezifischer Abbau eben dieses Enzyms wiederum unwahrscheinlich ist.

Bei der Bestimmung der K_m -Werte der DOP6H konnten spezifische Aktivitäten von 1,5 bis 2 $\mu\text{kat} / \text{kg}$ Gesamtprotein gerade noch nachgewiesen werden. Da in den Testansätzen mit Yatein von einer Substratsättigung ausgegangen werden kann (Endkonzentration im Test 100 μM), müsste die maximale spezifische Aktivität des gesuchten Enzyms $< 1 \mu\text{kat} / \text{kg}$ liegen. Es stellt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz eines solchen putativen Enzyms. Anders als etwa in *A. sylvestris* lassen sich in den Zellkulturen von *Linum spec.* keine größeren Mengen von Yatein nachweisen, während DOP, PTOX oder MPTOX durchaus gefunden werden.

Unter der Voraussetzung, dass eine spezifische DOP-Synthase, die Yatein als Substrat verwendet, eine so geringe spezifische Aktivität und damit Reaktionsgeschwindigkeit aufweist wie beschrieben, könnte eine gewisse Akkumulation von Yatein erwartet werden. Entsprechendes gilt auch für die alternativen Substrate Podorhizol und Anhydropodorhizol.

4.1.5 Schlussfolgerung und Hypothese

Eine Reihe unterschiedlicher Gründe könnten dafür verantwortlich sein, dass kein Umsatz von Yatein zu DOP gezeigt werden konnte. Zur Erklärung können im wesentlichen zwei Ansätze verwendet werden. Entweder ein enzymatischer Umsatz ist prinzipiell möglich, weil Yatein die direkte Vorstufe zu DOP darstellt, dann muss davon ausgegangen werden, dass die notwendigen Reaktionsbedingungen für dieses Enzym nicht gefunden wurden, oder dass die Aufarbeitungsmethoden nicht optimal sind, oder dass dieses Enzym nur eine sehr geringe Aktivität aufweist.

Andererseits könnte der fehlende Umsatz darauf zurückzuführen sein, dass Yatein zumindest in *Linum spec.* kein Intermediat in der Biosynthese der Aryltetralin-Lignane ist. Solange nicht gezeigt ist, auf welcher Stufe der Biosynthese der C2-C7'-Ringschluss stattfindet, lässt sich diese Annahme weder ausschließen noch belegen. Für eine Beteiligung von Yatein sprechen die Biotransformationsversuche in *Podophyllum peltatum*, die einen Einbau von markiertem Yatein in DOP und PTOX zeigen konnten (Kamil & Dewick 1986b).

Gegen eine Beteiligung sprechen die negativen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bzgl. Yatein, die alle mit Zellkulturen von *Linum spec.* erzielt wurden (Koulman, 2003; Seidel et al., 2002, diese Arbeit). Wenn Yatein jedoch in *Linum spec.* nicht die Vorstufe zu DOP ist und auch nicht die Alternativen POD und AHP, muss der C2-C7'-Ringschluss bereits früher in der Biosynthese stattfinden. Ein mögliches Modell könnte über Zwischenstufen verlaufen, bei denen die Methylendioxybrücke noch nicht geschlossen ist. Für *Anthriscus sylvestris* wurde gezeigt, dass die Zwischenstufe, bei der diese Brücke geschlossen wird, für das Endprodukt des jeweiligen Biosyntheseweges mitbestimmend sein kann (Sakakibara et al., 2003; Abbildung 32). Ähnliche alternative Wege wie für *A. sylvestris* (wo der direkte Umsatz von Yatein zu DOP ebenfalls nicht belegt ist) könnten auch bei *Linum spec.* vorkommen. Da die entsprechenden Lignane als Substrate nicht zur Verfügung standen, konnte dieser hypothetische Biosyntheseweg nicht getestet werden.

Ein anderer Ansatz wäre, die mit *Podophyllum peltatum* durchgeführten *in vivo* Experimente (Kamil & Dewick 1986a, Kamil & Dewick 1986b) mit *Linum* Pflanzen zu wiederholen, um Yatein als Intermediat zu bestätigen oder zu widerlegen. Dazu fehlten im Rahmen dieser Arbeit allerdings sowohl die entsprechenden Pflanzen, als auch das radioaktiv markierte Substrat.

Eine eindeutige Aufklärung der Biosynthese von DOP in *Linum spec.* wäre wünschenswert, bleibt aber abzuwarten.

4.2 Desoxypodophyllotoxin-6 Hydroxylase (DOP6H)

4.2.1 Charakterisierung des Enzyms

Die DOP6H ist eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase, die zuerst in Zellkulturen von *Linum flavum* nachgewiesen werden konnte (Molog et al., 2001) und die Desoxypodophyllotoxin (DOP) zu β -Peltatin umsetzt (Abbildung 35). Dass diese Reaktion Cytochrom P450-katalysiert ist, wurde durch ihre Abhängigkeit von NADPH als Cosubstrat, ihre Hemmung durch Cytochrom c und ihre Lokalisierung in der mikrosomalen Fraktion eines Zellaufschlusses gezeigt.

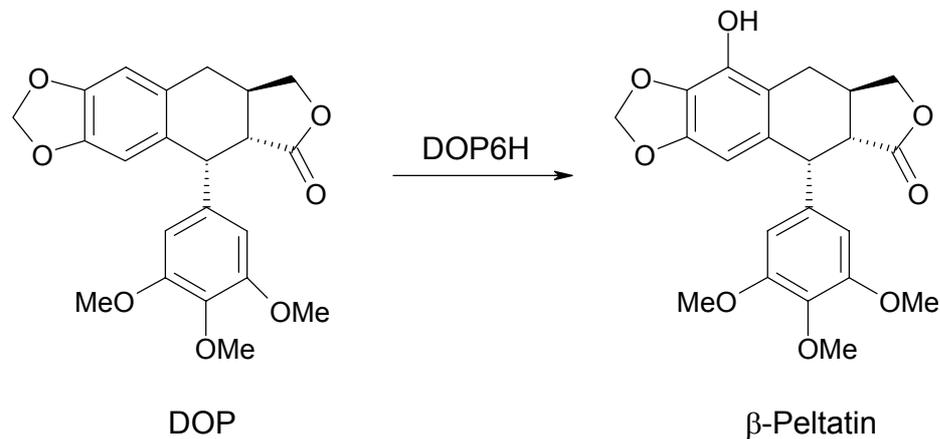


Abbildung 35: Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H) katalysiert die enzymatische Umwandlung von DOP zu β -Peltatin. Es handelt sich um die Einführung einer Hydroxylgruppe am aromatischen Ring.

Die allgemeinen Eigenschaften der DOP6H, wie das pH-Optimum im neutralen Bereich um pH 7,5 und ein Temperaturoptimum um die 30 °C entsprechen denen der meisten beschriebenen Cytochrom P450-Monooxygenasen.

Für das Substrat DOP und das Cosubstrat NADPH konnten für die DOP6H aus *Linum nodiflorum* apparente K_m -Werte von 8,3 bzw. 47 μ M ermittelt werden. Der relativ niedrige K_m -Wert für DOP lässt darauf schließen, dass es sich um ein physiologisch relevantes Substrat handelt. Der Vergleich mit dem bereits beschriebenen äquivalenten Enzym aus *L. flavum* zeigt, dass hier K_m (DOP) etwa um den Faktor zwei größer ist (20 μ M) und K_m (NADPH) etwa 25 % kleiner (36 μ M).

Enzym	K_m (Substrat)	Referenz
-------	------------------	----------

Canadin-Synthase aus <i>Thalictrum tuberosum</i>	11 μM	Rueffer & Zenk 1994
CYP 719 ((S)-Canadin-Synthase) aus <i>Coptis japonica</i>	0,269 μM	Ikezawa et al., 2003
Salidroside-Monooxygenase aus <i>Abeliophyllum distichum</i>	44 μM	Yamamoto et al., 2003
7-Deoxyloganin 7-Hydroxylase aus <i>Lonicera japonica</i>	170 μM	Katano et al., 2001
Taxoid 14beta-Hydroxylase aus <i>Taxus spec.</i>	55 μM	Jennewein et al., 2003
Tryptophan zu Indole-3-acetaldoxime aus <i>Sinapis alba</i>	29 μM	Naur et al., 2003
Deoxysarpagin-Hydroxylase aus <i>Rauvolfia serpentina</i>	7,4 μM	Yu et al., 2002

Tabelle 1: K_m -Werte für die Substrate verschiedener Cytochrom P450-Enzyme aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel. Wegen der großen Zahl der beschriebenen P450-Reaktionen ist dies bei weitem keine erschöpfende Darstellung, sondern stellt nur eine Stichprobe mit verschiedenen großen K_m -Werten dar.

Im Vergleich mit verschiedenen anderen Cytochrom P450-katalysierten Reaktionen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel zeigt sich, dass ein K_m -Wert von 8,3 μM für das Substrat als eher niedrig zu bewerten ist, wengleich auch noch geringere Werte beschrieben wurden (Tabelle 1).

Die Katalytische Konstante K_{cat} oder *turnover number* kann in einem zellfreien Extrakt nicht ermittelt werden, da die Konzentration des gesuchten Enzyms nicht bekannt ist. Geht man davon aus, dass sich K_{cat} für die DOP6H in der selben Größenordnung befindet, wie für vergleichbare Enzyme, die bereits in der Literatur beschrieben sind, lässt sich allerdings eine Abschätzung bzgl. der DOP6H-Konzentration vornehmen. Für K_{cat} und die tatsächliche Enzymkonzentration $[E]_T$ gilt:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} \quad [E]_T = \frac{V_{max}}{K_{cat}}$$

Dabei ist V_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, deren reziproker Wert als Schnittpunkt mit der Y-Achse im Lineweaver-Burk-Diagramm abzulesen ist. Für diese Abschätzung gehe ich von einer V_{max} der DOP6H von etwa 18 pmol / sec aus, entsprechend etwa 1 nmol / min.

Vergleichswerte für K_{cat} bezogen auf pflanzliche Cytochrom P450-Enzyme des Sekundärstoffwechsels sind in der Literatur nicht häufig beschrieben. Der Grund hierfür

ist vielfach derselbe, wie in der vorliegenden Arbeit, dass nämlich $[E]_T$ nicht bekannt ist.

Für die Berbamunin-Synthese aus *Berberis stolonifera* (Kraus & Kutchan 1995) werden für verschiedene Substratkombinationen K_{cat} -Werte um die 50 nmol / nmol Enzym pro Minute angegeben. Ausgehend von diesem Wert ergäbe sich für die DOP6H eine Menge von 20 pmol in einem Enzymtest mit ca. 0,3 mg Gesamtprotein. Nimmt man für ein Cytochrom P450-Enzym ein durchschnittliches molekulares Gewicht von 50 kDa an, so ergäbe sich eine Masse von etwa 3 µg DOP6H-Protein pro mg Gesamtprotein in der Mikrosomenpräparation.

Es muss angemerkt werden, dass eine solche Abschätzung insbesondere wegen der wenigen K_{cat} -Vergleichswerte recht grob bleiben muss und nur eine Vorstellung von der Größenordnung der DOP6H-Konzentration liefern kann. Eine solche Vorstellung kann aber für die Planung weiterer Experimente oder von Aufreinigungstrategien hilfreich sein.

4.2.2 Bedeutung der Cosubstrate NADH und NADPH

Für tierische und menschliche Cytochrom P450-Systeme ist in vielen Fällen gezeigt worden, dass Cytochrom b_5 die Enzymaktivität erhöht (Hildebrandt & Estabrook 1971). Trotz zahlreicher Untersuchungen ist allerdings der genaue Mechanismus dieses Effektes nicht vollständig verstanden (Porter, 2002).

Im einfachen Modell Cytochrom P450-katalysierter Reaktionen werden zwei Elektronen von NADPH über die NADPH: Cytochrom P450-Reduktase (CPR) auf des Cytochrom P450 übertragen. Vielfach wird angenommen, dass Cytochrom b_5 einen alternativen Weg zur Übertragung des zweiten Elektrons darstellt. Da dieser Teilschritt als geschwindigkeitsbestimmend angesehen wird, führt eine schnellere Übertragung des Elektrons zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit.

Von einigen Autoren wird dagegen diskutiert, dass eine Bindung der Cytochrome P450 und b_5 zu einer Konformationsänderung des Cytochrom P450 führen, wodurch die CPR effektiver gebunden werden kann und die Elektronenübertragung erleichtert wird. Ein solcher allosterischer Mechanismus wird durch Experimente gestützt, in denen auch katalytisch inaktive Analoga von Cytochrom b_5 zu einer Aktivitätssteigerung einer Cytochrom P450-katalysierten Reaktion führten (Porter 2002 und Zitate darin).

Auch eine Kombination der beiden Modelle wird in neueren Veröffentlichungen diskutiert (Reed & Hollenberg 2003, Perret & Pompon 1998). Insgesamt scheinen die genauen Wechselwirkungen zwischen Cytochrom b_5 und Cytochrom P450 komplizierter zu sein als zunächst angenommen und darüber hinaus nicht in allen Fällen einheitlich (Guengerich & Johnson 1997).

In Pflanzen ist bislang nur in einem Fall nachgewiesen worden, dass ein Cytochrom P450-Enzym auf Cytochrom b_5 für seine volle Aktivität angewiesen ist (de Vetten et al., 1999).

Da NADH Elektronen auf eine NADH: Cytochrom b_5 -Reduktase überträgt, die wiederum Cytochrom b_5 reduziert, kann die Aktivität mit NADH als Hinweis auf die mögliche Beteiligung von Cytochrom b_5 an einer Cytochrom P450-Reaktion angesehen werden. Allerdings kann Cytochrom b_5 anscheinend auch von der NADPH: Cytochrom P450-Reduktase reduziert werden (Fukuchi-Mizutani et al., 1999).

Im Falle der DOP6H konnte durch Zugabe von NADH die maximale Enzymaktivität, die mit NADPH erreicht wurde, nicht gesteigert werden. Dies spricht dafür, dass die DOP6H-Aktivität *in vivo* nicht von Cytochrom b_5 abhängig ist.

Allerdings konnte NADPH teilweise durch NADH ersetzt werden. Demnach könnte Cytochrom b_5 ein alternativer, wenn auch weniger effizienter Weg der Elektronenübertragung sein. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um einen reinen *in vitro* Effekt handelt.

Cytochrom b_5 ist Teil einer Elektronentransportkette im Endoplasmatischen Retikulum, wo es eine Rolle bei der Desaturierung von Fettsäuren spielt. Da es sich um ein membrangebundenes Protein handelt, kann davon ausgegangen werden, dass es in den verwendeten Mikrosomenpräparationen enthalten ist.

Über einen möglichen allosterischen Effekt von Cytochrom b_5 auf die DOP6H kann nichts ausgesagt werden, da NADH und nicht Cytochrom b_5 selbst getestet wurde.

4.2.3 Bedeutung der Inhibitoren der DOP6H

Eine Reihe unterschiedlicher Inhibitoren von Cytochrom P450-Enzymen sind in der Literatur beschrieben. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Hemmung durch CO in einer Atmosphäre mit hohem CO-Partialdruck. Diese Hemmung kann durch Bestrahlung mit Blaulicht bei etwa 450 nm mindestens teilweise rückgängig gemacht werden. Ein solches Experiment ist geeignet, den Cytochrom P450-Charakter eines Enzyms zu beweisen (West, 1980).

Dieser Beweis wurde mit der DOP6H aus *Linum flavum* durchgeführt und aufgrund der ansonsten übereinstimmenden Charakteristika des analogen Enzyms aus *L. nodiflorum* nicht wiederholt. Zu diesen übereinstimmenden Charakteristika zählen die Abhängigkeit von NADPH und die Hemmbarkeit mit Cytochrom c. Letzteres hat eine hemmende Wirkung, weil es um die Elektronen der NADPH: Cytochrom P450-Reduktase konkuriert. Cytochrom c-Hemmung bereits bei niedrigen Konzentrationen, wie für die DOP6H gezeigt, ist daher ebenfalls sehr charakteristisch für Cytochrom P450-Enzyme.

Interessant ist der hemmende Effekt divalenter Kationen, insbesondere von Mn^{2+} auf die DOP6H. Über die Bedeutung von Kationen auf die Aktivität von Cytochrom P450-

Enzymen gibt es bisher relativ wenige Untersuchungen. Bei Cytochrom P450 3A4 wurde ein positiver Effekt von Mg^{2+} und Ca^{2+} auf die Aktivität festgestellt (Yamazaki et al., 1995). Länger bekannt ist, dass sich mikrosomale P450-Reaktionen aus der Leber durch Cu^{2+} -Ionen inhibieren lassen (Richter et al., 1977, Kim et al., 2002a). In beiden Fällen – Förderung und Inhibierung – wird ein Effekt auf die Elektronenübertragung von der Reduktase diskutiert.

Da die Charakterisierung der DOP6H in einem zellfreien Extrakt stattfand, könnte der Effekt von Mn^{2+} durchaus indirekter Natur sein. Für eine genauere Untersuchung wäre daher ein heterolog exprimiertes System von Vorteil.

4.2.4 Die Rolle von DOP in der Lignan-Biosynthese

In Zellkulturen von *Linum spec.* können unterschiedliche Aryltetralin-Lignane gefunden werden, die Hauptprodukte dieses Stoffwechselweges scheinen aber PTOX und MPTOX zu sein. DOP stellt eine Vorstufe für beide Endprodukte dar. In Zellkulturen von *Linum album* wird DOP in PTOX überführt und verschiedene Hinweise sprechen dafür, dass dieses Enzym ebenfalls Cytochrom P450-abhängig ist (Henges, 1999; diese Arbeit). Dennoch kann für diese Hydroxylierung weder die Beteiligung einer 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase, noch die einer Peroxidase ausgeschlossen werden. Der Effekt des Cytochrom P450-spezifischen Inhibitors Tetcyclacis in Biotransformationsversuchen deutet jedoch auf eine P450-katalysierte Reaktion hin.

Die in dieser Arbeit und bei Molog et al. (2001) beschriebene DOP6H katalysiert den Umsatz von DOP zu β -Peltatin. Letzteres wird anschließend zu β -Peltatin-A Methylether (PAM) methyliert, das die direkte Vorstufe von MPTOX ist. Die β -Peltatin-O-Methyltransferase (β -PELT-OMT) konnte ebenfalls in Zellkulturen von *Linum nodiflorum* nachgewiesen werden (Kranz & Petersen 2003).

Interessanterweise ließ sich die *in-vitro* Aktivität der β -PELT-OMT auch in Zellkulturen von *Linum album* nachweisen, die kein MPTOX akkumulieren und auch keine DOP6H-Aktivität aufwiesen (Kranz, pers. Mitteilung). Dies spricht gegen eine regulatorische Bedeutung der β -PELT-OMT.

Demnach kann DOP als eine Verzweigungsstelle in der Biosynthese der Aryltetralin-Lignane betrachtet werden. Je nachdem, ob eine Hydroxylierung hauptsächlich an C6 oder an C7 erfolgt, werden MPTOX oder PTOX als Hauptprodukte akkumuliert. Dies entspricht den Charakteristika der untersuchten Zellkulturen, bei denen DOP6H-Aktivität nur in solchen Linien nachweisbar war, die MPTOX als Hauptlignan bildeten. Dabei muss angemerkt werden, dass verschiedene Linien einer *Linum album* Kultur entweder hauptsächlich MPTOX oder PTOX bildeten (Alfermann, pers. Mitteilung). Gleiches gilt auch für eine Kultur von *Linum nodiflorum* (vorliegende Arbeit). Demnach sind in *in planta* die genetischen Voraussetzungen für beide Biosynthesewege

vorhanden und unterschiedliche Regulation oder somatische Mutationen in den Kulturen sorgen dafür, dass nur eines der beiden Lignane hauptsächlich gebildet wird. Die Hydroxylierung von DOP scheint eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Lignan-Biosynthese zu spielen und die DOP6H, zusammen mit der putativen DOP7H, eines der beiden Schlüsselenzyme zu sein, die im letzten Teil dieses Biosynthesewegs das Endprodukt bestimmen.

4.2.5 Biotechnologische Verwendbarkeit der DOP6H - Ausblick

PTOX ist als Ausgangssubstanz für Etoposid und Teniposid und wegen seiner antiviralen Wirkung wirtschaftlich interessanter als MPTOX. Die DOP7H, deren Produkt PTOX ist, scheint allerdings deutlich schwerer nachzuweisen zu sein als die DOP6H. Könnte man die DOP6H jedoch isolieren und ihre Gensequenz identifizieren, so böte sich in MPTOX-bildenden Pflanzen oder Zellkulturen eine Negativ-Regulierung dieses Enzyms an (z.B. durch RNAi-Techniken, oder *knock-out* Mutanten). Auf diese Weise könnte der Stoffwechsel in Richtung der Bildung von PTOX beeinflusst werden. Der Versuch, die DOP6H-Aktivität direkt in den Präparationen biotechnologisch zu nutzen und das teure NADPH durch ein artifizielles Elektronen-Übertragungssystem aus Zink und Co(III)-Sepulchrat zu ersetzen, schlug fehl. Daher bleibt die weitere Aufreinigung der DOP6H ein Ziel zukünftiger Experimente.

Der Versuch einer Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der DOP6H scheiterte wegen der chemischen Instabilität des verwendeten Liganden. Trotzdem erscheint diese Methode weiterhin vielversprechend. Eine alternative Strategie könnte z.B. in der Biotinylierung des Liganden 4'-Demethyl-DOP und der anschließenden Kopplung an eine Avidin-Säule bestehen, wie es zur Aufreinigung eines Fusicoccin-bindenden Proteins erfolgreich durchgeführt wurde (Korthout et al., 1994). Auch eine genauere Untersuchung des primären Zersetzungsproduktes von 4'-Demethyl-DOP hinsichtlich seiner chemischen Struktur und seiner möglichen Wechselwirkungen mit der DOP6H könnte von Interesse sein, da die Frage, ob sich dieser Stoff als alternativer Ligand für eine Affinitätssäule eignet, nicht beantwortet ist. Auch andere chromatographische Reinigungsmethoden wie Größenausschluss-, Ionenaustausch- oder Hydroxylapatit-Chromatographie sind möglich (Roos, 1996), sofern ein Rekonstitutionssystem für die Aktivität der DOP6H zur Verfügung steht.

Für eine heterologe Expression der DOP6H wäre aller Voraussicht nach keine homologe NADPH:Cytochrom P450-Reduktase erforderlich, da auch die Reduktase des Expressionssystems (z.B. Hefezellen) genutzt werden kann (Schuler, 1996, Schuler & Werck-Reichhart 2003 und Zitate darin). Allerdings könnte sie die Rekonstitution erleichtern. Mit der Klonierung von Fragmenten von CPR-Enzymen aus *Linum album*, *L. flavum* und *L. nodiflorum* ist ein erster wichtiger Schritt getan, ein solches homologes System zu etablieren. Die mögliche regulatorische Bedeutung der NADPH:Cytochrom

P450-Reduktasen für P450-katalysierte Reaktionen ist im einzelnen nicht bekannt. In einigen Pflanzen kommen verschiedene Reduktase-Isoformen vor (Ro et al., 2002, Koopmann & Hahlbrock 1997, Mizutani & Ohta 1998) von denen manche durch externe Faktoren, wie UV-Licht oder Pathogen-Befall induzierbar sind. Mit Hilfe der gefundenen Fragmente der Reduktase-Gene aus *Linum spec.* (und zu ermittelnder Vollängenklone) können entsprechende Experimente (Southern-Blot, Northern-Blot, Expressions- und Lokalisationsstudien) auch in Lignan-produzierenden Pflanzen und Zellkulturen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Lignane sind phenolische Verbindungen des pflanzliche Sekundärstoffwechsels, die sich von der Aminosäure Phenylalanin ableiten, über das Pflanzenreich weit verbreitet sind und die vielfältige pharmazeutisch-medizinische Bedeutungen haben können.

Podophyllotoxin (PTOX), ein Aryltetralin-Lignan, ist stark cytotoxisch und dient u.a. als Ausgangssubstanz der halbsynthetischen Glycoside Etoposid und Teniposid, die als Chemotherapeutika eingesetzt werden. Wildsammlungen von *Podophyllum spec.* stellen momentan die hauptsächliche Bezugsquelle für Podophyllotoxin dar. Außerdem konnten Aryltetralin-Lignane auch in einigen Leinarten (*Linum spec.*) nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Biosynthese von Lignanen wie PTOX oder 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) in Suspensionskulturen von *Linum album*, *L. flavum* und *L. nodiflorum* beschrieben.

Ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Rolle beschriebener oder vermuteter Cytochrom P450-abhängiger Oxygenasen, einer Enzymklasse, die viele oxidative Reaktionen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel katalysiert.

Biotransformationsversuche in *L. nodiflorum* deuten darauf hin, dass der Umsatz von Desoxypodophyllotoxin (DOP) zu PTOX durch eine DOP7H Cytochrom P450-abhängig sein könnte, da er durch den spezifischen Inhibitor Tetcyclacis gehemmt wird. In Mikrosomenpräparationen aus *Linum nodiflorum* war keine DOP7H-Aktivität nachweisbar.

Die kürzlich in *L. flavum* beschriebene Desoxypodophyllotoxin 6-Hydroxylase (DOP6H), die den Umsatz von DOP zu β -Peltatin katalysiert, konnte in Zellkulturen von *L. nodiflorum* nachgewiesen und in zellfreien Extrakten charakterisiert werden. Ihre höchste Aktivität weist die DOP6H aus *L. nodiflorum* bei pH 7,4 und etwa 35 °C auf. Die hemmende Wirkung verschiedener Cytochrom P450-spezifischer Inhibitoren, wie Cytochrom c oder Tetcyclacis wurde gezeigt. Außerdem konnten hemmende Effekte des Substratanalogons 4'-Demethyl-DOP, sowie divalenter Kationen, insbesondere Mn^{2+} festgestellt werden. Als K_m -Werte für das Substrat Desoxypodophyllotoxin (DOP) und das Cosubstrat NADPH wurden 8,3 μM und 47 μM ermittelt. Die Bedeutung des alternativen Cosubstrats NADH wurde untersucht, wobei kein synergistischer (überadditiver) Effekt festgestellt werden konnte, wie er von vielen tierischen und humanen Cytochrom P450-Systemen bekannt ist. Die geringe Enzymaktivität mit NADH verweist auf eine mögliche Beteiligung von Cytochrom b_5 an der Elektronentransportkette zur DOP6H *in vitro*.

Außerdem werden Ansätze zur biotechnologischen Verwendbarkeit der DOP6H, wie die Verwendung von Zn/Co(III)-Sepulchrat als alternative Elektronendonatoren anstelle

von NADPH und eine Aufreinigungsstrategie über eine Affinitätschromatographie mit Hilfe des Substratanalogons 4'-Demethyl-DOP diskutiert.

Yatein gilt als mögliche direkte Vorstufe von DOP in der Lignan-Biosynthese. Ein Umsatz von Yatein zu DOP, wie in *Podophyllum spec.* beschrieben, konnte in den untersuchten Zellkulturen nicht nachgewiesen werden. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Biosynthesewege in den Gattungen *Linum* und *Podophyllum* unterschiedlich verlaufen könnten. Die mögliche Bedeutung von Yatein wird diskutiert. Zusätzlich wurde damit begonnen NADPH:Cytochrom P450-Reduktasen (CPR) aus den genannten Zellkulturen zu klonieren. Für den Ablauf Cytochrom P450-abhängiger Reaktionen sind diese Reduktasen als Elektronendonatoren notwendig. Durch RT-PCR konnten mit Hilfe genspezifischer Primer Teilkclone für CPRs aus *L. album*, *L. flavum* und *L. nodiflorum* isoliert werden.

DOP scheint ein Verzweigungspunkt in der Lignan-Biosynthese zu sein, da es eine Vorstufe sowohl von PTOX als auch MPTOX ist. Das genauere Verständnis der enzymatischen Umsetzung von DOP ermöglicht eine Abschätzung des biotechnologischen Potentials der Lignan-Biosynthese in Zellkulturen von *Linum spec.*

6 Literaturverzeichnis

- Adlercreutz, H.(1999). Phytoestrogens. State of the art. *Environmental Toxicology & Pharmacology* **7**, 201-207.
- Albert, K. (1999). Pharmazeutische Zeitung 20, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn (Germany)
- Alfermann, A.W., Dombrowski, K., Petersen, M.(1994). Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. In: Schmauder, *Methoden der Biotechnologie*, 239-60. Jena, Stuttgart: G. Fischer
- Andersen, M.D. and Moller, B.L.(1998). Double Triton X-114 Phase Partitioning for the Purification of Plant Cytochromes P450 and removal of green pigments. *Protein Expression & Purification* **13**, 366-372.
- Bauer, W. and Zenk, M.H.(1991). 2 Methylenedioxy bridge forming Cytochrome-P-450 dependent enzymes are involved in (S)-Stylopine biosynthesis. *Phytochemistry* **30**, 2953-2961.
- Berlin, J., Wray, V., Mollenschott, C., & Sasse, F.(1986). Formation of beta-peltatin-A methyl ether and coniferin by root cultures of *Linum flavum*. *Journal of Natural Products* **49**, 435-439.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H.J.(1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in Polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bohlin, L. and Rosen, B.(1996). Podophyllotoxin Derivatives - Drug Discovery and Development [Review]. *Drug Discovery Today* **1**, 343-351.
- Bolwell, G.P., Bozak, K., & Zimmerlin, A.(1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37**, 1491-1506.

- Bonfils, C., Charasse, S., Bonfils, J.P., & Larroque, C.(1995). Luminescent visualization of low amounts of cytochrome P450 and hemoproteins by luminol in acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **226**, 302-306.
- Bradford, M.M.(1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Broomhead, A.J. and Dewick, P.M.(1990). Aryltetralin lignans from *Linum-flavum* and *Linum-capitatum*. *Phytochemistry* **29**, 3839-3844.
- Charlton, J.L.(1998). Antiviral activity of lignans. *Journal of Natural Products* **61**, 1447-1451.
- Chatterjee, R.(1952). Indian Podophyllum. *Economic Botany* **6**, 342
- 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.
- Chen, J.J., Ishikawa, T., Duh, C.Y., Tsai, I.L., & Chen, I.S.(1996). New dimeric aporphine alkaloids and cytotoxic constituents of *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta Medica* **62**, 528-533.
- 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. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* **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*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27026-27033.
- Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., & Zarrelli, A.(2003). Lignans and neolignans from *Brassica fruticulosa*: effects on seed germination and plant growth. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **51**, 6165-6172.

- Dahlqvist, S.R. and Nordenson, I.(1996). Chromosomal changes in rheumatoid arthritis patients treated with CPH82. *Clinical Rheumatology* **15**, 584-589.
- Daniel, R.M., Danson, M.J., & Eisenthal, R.(2001). The temperature optima of enzymes: a new perspective on an old phenomenon. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 223-225.
- Davin, L.B. and Lewis, N.G.(2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* **123**, 453-462.
- 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.
- 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 Vetten, N., ter Horst, J., van Schaik, H.P., de Boer, A., Mol, J., & Koes, R.(1999). A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 778-783.
- De Carolis, E. and DE Luca, V.(1994). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes- Biochemical-characterization. *Phytochemistry* **36**, 1093-1107.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29473-29482.

- Durst, F.(1988). Biochemistry and physiology of Plant Cytochrome P-450. 192-210
In: *Frontiers of Biotransformation 4*, Microbial and Plant Cytochrome P450:
Biochemical Characteristics, Genetic Engineering and Practical Purification.
Academic Verlag, Berlin
- Empt, U., Alfermann, A.W., Pras, N., & Petersen, M.(2000). The use of plant cell
cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans. *Journal
of Applied Botany-Angewandte Botanik 74*, 145-150.
- Erdtman, H. and Harmatha, J.(1979). Chemistry of the order Cupressales .58.
Phenolic and terpenoid heartwood constituents of *Libocedrus-yateensis*.
Phytochemistry 18, 1495-1500.
- Estabrook, R.W., Shet, M.S., Faulkner, K., & Fisher, C.W.(1996). The use of
electrochemistry for the synthesis of 17 alpha-hydroxyprogesterone by a
fusion protein containing P450c17. *Endocrine Research 22*, 665-671.
- 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 Journal 30*, 33-
45
- Frear, D.S., Swanson, H.R., & Tanaka, F.S.(1969). N-Demethylation of substituted
3-(phenyl)-1-methylureas – Isolation and characterization of a microsomal
mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry 8*, 2157-&.
- Friederich, S., Rueffer, M., Asakawa, Y., & Zenk, M.H.(1999). Cytochromes P-450
catalyze the formation of marchantins A and C in *Marchantia polymorpha*.
Phytochemistry 52, 1195-1202.
- Fukuchi-Mizutani, M., Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., & Ohta, D.(1999).
Microsomal electron transfer in higher plants: cloning and heterologous
expression of NADH-cytochrome b5 reductase from Arabidopsis. *Plant
Physiology 119*, 353-362.

- Gabriac, B., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H., & Durst, F.(1991). Purification and immunocharacterization of a plant cytochrome P450: the cinnamic acid 4-hydroxylase. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **288**, 302-309.
- Garfinkel, D.(1958).Studies on pig liver microsomes.1. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **77**, 493-509.
- Gerardy, R. and Zenk, M.H.(1993). Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound Cytochrome-P-450enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **32**, 79-86.
- Giuliano, G., Bartley, G.E., & Scolnik, P.A.(1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* **5**, 379-387.
- Gordaliza, M., Castro, M.A., del Corral, J.M.M., & San Feliciano, A.(2000). Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Current Pharmaceutical Design* **6**, 1811-1839.
- Gu, J.Q., Park, E.J., Totura, S., Riswan, S., Fong, H.H., Pezzuto, J.M., & Kinghorn, A.D.(2002). Constituents of the twigs of *Hernandia ovigera* that inhibit the transformation of JB6 murine epidermal cells. *Journal of Natural Products* **65**, 1065-1068.
- Guengerich, F.P. and Johnson, W.W.(1997). Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: Rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* **36**, 14741-14750.
- Halkier, B.A.(1996). Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* **43**, 1-21.
- Harmatha, J. and Nawrot, J.(2002). Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *ENTOMOLOGIA EXPERIMENTALIS ET APPLICATA* **104**, 51-60.

- Henges, A. (1999). Biosynthese und Kompartimentierung von Lignanen in Zellkulturen von *Linum album*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hildebrandt, A. and Estabrook, R.W. (1971). Evidence for participation of Cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **143**, 66-74.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 462-468.
- Humphreys, J.M. and Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 224-229.
- Humphreys, J.M. and Chapple, C. (2000). Molecular 'pharming' with plant P450s. *Trends in Plant Science* **5**, 271-272.
- Ikeda, R., Nagao, T., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., & Mori, M. (1998). Antiproliferative constituents in Umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **46**, 871-874.
- Ikezawa, N., Tanaka, M., Nagayoshi, M., Shinkyo, R., Sakaki, T., Inouye, K., & Sato, F. (2003). Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 38557-38565.
- Imbert, T.F. (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* **80**, 207-222.
- Jackson, D.E. and Dewick, P.M. (1984a). Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* **23**, 1147-1152.
- Jackson, D.E. and Dewick, P.M. (1984b). Biosynthesis of *Podophyllum* lignans. 1. Cinnamic acid precursors of Podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* **23**, 1029-1035.

- Jennewein, S., Rithner, C.D., Williams, R.M., & Croteau, R.(2003). Taxoid metabolism: Taxoid 14beta-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **413**, 262-270.
- Kamil, W.M. and Dewick, P.M.(1986a). Biosynthesis of Podophyllum lignans.3. biosynthesis of the lignans alpha-peltatin and beta-peltatin. *Phytochemistry* **25**, 2089-2092.
- Kamil, W.M. and Dewick, P.M.(1986b). Biosynthesis of Podophyllum lignans.4. biosynthetic relationship of aryltetralin-lactone lignans todibenzylbutyrolactone lignans. *Phytochemistry* **25**, 2093-2102.
- Katano, N., Yamamoto, H., Iio, R., & Inoue, K.(2001). 7-deoxyloganin 7-hydroxylase in Lonicera japonica cell cultures. *Phytochemistry* **58**, 53-58.
- Kim, J.S., Ahn, T., Yim, S.K., & Yun, C.H.(2002a). Differential effect of copper (II) on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase: Inhibition of cytochrome P450-catalyzed reactions by copper (II) ion. *Biochemistry* **41**, 9438-9447.
- Kim, Y., Kim, S.B., You, Y.J., & Ahn, B.Z.(2002b). Deoxypodophyllotoxin: The cytotoxic and antiangiogenic component from Pulsatilla koreana. *Planta Medica* **68**, 271-274.
- Klingenberg, M.(1958).Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **75**, 376-386.
- Kneusel, R.E., Matern, U., Nikolay, K.(1989). Formation of *trans*-caffeoyl-CoA from *trans*-4-coumaroyl-CoA by Zn²⁺-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **269**, 455-462
- Konuklugil, B.(1996). Aryltetralin lignans from the genus linum. *Fitoterapia* **67** (4), 379-381

- Konuklugil, B., Schmidt, T.J., & Alfermann, A.W.(1999). Accumulation of aryltetralin lactone lignans in cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Planta Medica* **65**, 587-588.
- Koopmann, E. and Hahlbrock, K.(1997). Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14954-14959.
- Korthout, H.A.A.J., Van der Hoeven, P.C.J., Wagner, J., Van Hunnik, E., & De Boer, A.H.(1994). Purification of the fusicoccin-binding protein from oat-root plasma-membrane by affinity-chromatography with biotylated fusicoccin. *Plant Physiology* **105**, 1281-1288.
- Koulman, A. (2003). Podophyllotoxin. Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen, Nederlande.
- Koulman, A., Beekman, A.C., Pras, N., & Quax, W.J.(2003a). The bioconversion process of deoxypodophyllotoxin with *Linum flavum* cell cultures. *Planta Medica* **69**, 739-744.
- Koulman, A., Bos, R., Medarde, M., Pras, N., & Quax, W.J.(2001). A fast and simple GC MS method for lignan profiling in *Anthriscus sylvestris* and biosynthetically related plant species. *Planta Medica* **67**, 858-862.
- Koulman, A., Kubbinga, M.E., Batterman, S., Woerdenbag, H.J., Pras, N., Woolley, J.G., & Quax, W.J.(2003b). A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of *Anthriscus sylvestris*. *Planta Medica* **69**, 733-738.
- Kranz, K. and Petersen, M.(2003). beta-Peltatin 6-O-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry* **64**, 453-458.

- Kraus, P.F. and Kutchan, T.M.(1995). Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C--O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 2071-2075.
- Kupchan, S.M., Hemingway.R.J., & Hemingway.J.C.(1967).Tumor inhibitors.19. Desoxypodophyllotoxin cytotoxic principle of *Libocedrus decurrens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **56**, 408-&.
- Laemmli, U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-&.
- Lewis, N. G. and Davin, L. B., (1999).Lignans: biosynthesis and function.In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, S. 639-712.
- Lim, H.M., Kim, Y., Kim, Y.H., Ahn, B.Z., & Kang, J.S.(2002). Stereoselective determination of (-)-yatein in the plants of the Cupressaceae family by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **25**, 1070-1072.
- Lin, H.W., Kwok, K.H., & Doran, P.M.(2003). Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions. *Biotechnology Progress* **19**, 1417-1426.
- 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
- Maenpaa, J., Sigusch, H., Raunio, H., Syngelma, T., Vuorela, P., Vuorela, H., & Pelkonen, O.(1993). Differential inhibition of coumarin 7-hydroxylaseactivity in mouse and human liver-microsomes. *Biochemical Pharmacology* **45**, 1035-1042.

- Mansuy, D.(1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **121**, 5-14.
- Masuda, T., Oyama, Y., Yonemori, S., Takeda, Y., Yamazaki, Y., Mizuguchi, S., Nakata, M., Tanaka, T., Chikahisa, L., Inaba, Y., & Okada, Y.(2002). Flow cytometric estimation on cytotoxic activity of leaf extracts from seashore plants in subtropical Japan: Isolation, quantification and cytotoxic action of (-)-deoxypodophyllotoxin. *Phytotherapy Research* **16**, 353-358.
- McDoniel, P.B. and Cole, J.R.(1972). Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (burseraceae): isolation and structure determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**, 1992-1994.
- Medarde, M., Pelaez-Lamamie, d.C., Lopez, J.L., Gravalos, D.G., & San Feliciano, S.(1995). Synthesis, antitumoral and antiviral evaluation of halo- and demethyl-yatein derivatives. *Archiv der Pharmazie* **328**, 640-644.
- Miyata, L., Itoh, K., & Tachibana, S.(1998). Extractives of *Juniperus chinensis* L. - I: Isolation of podophyllotoxin and yatein from the leaves of J-chinensis. *Journal of Wood Science* **44**, 397-400.
- Mizutani, M. and Ohta, D.(1998). Two isoforms of NADPH : cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana* - Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. *Plant Physiology* **116**, 357-367.
- Mohagheghzadeh, A., Schmidt, T.J., & Alfermann, A.W.(2002). Arylnaphthalene lignans from in vitro cultures of *Linum austriacum*. *Journal of Natural Products* **65**, 69-71.
- Mohagheghzadeh, A.(2003). Evaluation of lignans in *Linum persicum*. *Phytochemical reviews*, in press

- Molog, G. A. (1997). Characterization of deoxypodophyllotoxin hydroxylase, an enzyme in the biosynthesis of the cytotoxic lignan 5-methoxyxpodophyllotoxin in cell cultures of *Linum flavum*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande.
- 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., Bedir, E., Barrett, H., Burandt, C., Canel, C., & Khan, I.A.(2002). Evaluation of *Podophyllum peltatum* accessions for podophyllotoxin production. *Planta Medica* **68**, 341-344.
- Muir, A.D., Westcott, N.D., Eds.(2003). *Flax: The genus linum*. Taylor and Francis group, London
- Murashige, T. and Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473.
- Naur, P., Hansen, C.H., Bak, S., Hansen, B.G., Jensen, N.B., Nielsen, H.L., & Halkier, B.A.(2003). CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **409**, 235-241.
- Newcomb, M., Hollenberg, P.F., & Coon, M.J.(2003). Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **409**, 72-79.
- Nezbedova, L., Hesse, M., Drandarov, K., & Werner, C.(2000). Dihydroxyverbacine is the terminal precursor in the biosynthesis of aphelandrine and orantine. *Tetrahedron Letters* **41** , 7859-7862.

- Nogouchi, K. and Kawanami, M.(1940). Study of the active components of the *Umbelliferae*, X Study of the components of *Anthriscus sylvestris* (Hoffm.). *Journal of the pharmaceutical Society of Japan* **60**, 629-.
- Novelo, M., Cruz, J.G., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H., Mar, W., & Pezzuto, J.M.(1993). Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products* **56**, 1728-1736.
- Oliva, A., Moraes, R.M., Watson, S.B., Duke, S.O., & Dayan, F.E.(2002). Aryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers. *Pesticide Biochemistry & Physiology* **72**, 45-54.
- Omura, T.(1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**, 690-698.
- Perret, A. and Pompon, D.(1998). Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b(5) rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry* **37**, 11412-11424.
- Peters, S., Schmidt, W., & Beerhues, L.(1998). Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. *Planta* **204**, 64-69.
- Petersen, M. and Alfermann, A.W.(1988). 2 new enzymes of rosmarinic-acid biosynthesis from cell-cultures of *Coleus blumei* - Hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **43**, 501-504.
- Petersen, M. and Alfermann, A.W.(2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Applied Microbiology & Biotechnology* **55**, 135-142.
- Porter, T.D.(2002). The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical & Molecular Toxicology* **16**, 311-316.

- Porter, T.D. and Coon, M.J.(1991). Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13469-13472.
- Reed, J.R. and Hollenberg, P.F.(2003). Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b(5): the effect of cytochrome b(5) on the interaction between cytochrome P450_{2B4} and P450 reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 265-275.
- Richter, C., Azzi, A., Weser, U., & Wendel, A.(1977). Hepatic microsomal dealkylations – Inhibition of a tyrosine:copper(II) complex provided with superoxid-dismutase activity. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 5061-5066.
- Ro, D.K., Ehltng, J., & Douglas, C.J.(2002). Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant Physiology* **130**, 1837-1851.
- Roos, P.H.(1996). Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b(5). *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **684**, 107-131.
- Rueffer, M. and Zenk, M.H.(1994). Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell-cultures catalyses the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthesis. *Phytochemistry* **36**, 1219-1223.
- Russell, D.W. and Conn, E.E.(1967). Cinnamic-acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **122**, 257-&.
- Russell, G.B., Singh, P., & Fenemore, P.G.(1976). Insect-control chemicals from plants. III. Toxic lignans from *Libocedrus bidwillii*. *Australian Journal of Biological Sciences* **29**, 99-103.
- Sagner, S., Shen, Z.W., Deus-Neumann, B., & Zenk, M.H.(1998). The biosynthesis of lunarine in seeds of *Lunaria annua*. *Phytochemistry* **47**, 375-387.

- Sakakibara, N., Suzuki, S., Umezawa, T., & Shimada, M.(2003). Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **1**, 2474-2485.
- Schmitt, J. and Petersen, M.(2002). Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* cell suspension culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* **68**, 91-98.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36566-36574
- Schuler, M.A.(1996). Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**, 235-284.
- Schuler, M.A. and Werck-Reichhart, D.(2003). Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 629-667.
- Schwaneberg, U., Appel, D., Schmitt, J., & Schmid, R.D.(2000). P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450BM-3 F87A as a catalyst. *Journal of Biotechnology* **84**, 249-257.
- Seidel, V., Windhovel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroo, R.R., Medarde, M., Petersen, M., & Woolley, J.G.(2002). Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta* **215**, 1031-1039.
- 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.

- Svensson, B. and Pettersson, H.(2003). Reumacon (CPH82) showed similar x-ray progression and clinical effects as methotrexate in a two year comparative study on patients with early rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* **32**, 83-88.
- Umezawa, T., Davin, L.B., & Lewis, N.G.(1991). Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *Journal of Biological Chemistry* **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 areduced caffeic-acid/5-hydroxyferulic-acid O-methyltransferase activity. *Plant Journal* **8**, 855-864
- Van Uden, W., Homan, 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*. *Journal of Natural Products* **55**, 102-110.
- Van Uden, W., Bos, J.A., Boeke, G.M., Woerdenbag, H.J., & Pras, N.(1997). The large-scale isolation of deoxypodophyllotoxin from rhizomes of *Anthriscus sylvestris* followed by its bioconversion into 5-Methoxypodophyllotoxin beta-D-glucoside by cell-cultures of *Linum flavum*. *Journal of Natural Products* **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.(1995a). The production of Podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bioconversion of cyclodextrin-complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell-cultures. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* **42**, 73-79.
- Veeger, C.(2002). Does P450-type catalysis proceed through a peroxo-iron intermediate? A review of studies with microperoxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **91**, 35-45.

- Velasco, L. and Goffman, F.D.(2000). Tocopherol, plastochromanol and fatty acid patterns in the genus *Linum*. *Plant Systematics & Evolution* **221**, 77-88.
- 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.
- 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). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **64**, 95-98.
- West, C. A., (1980).Hydroxylases, Monooxygenases, and Cytochrome P450.In: *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, 317-367.
- Wichers, H.J., Harkes, M.P., & Arroo, R.R.J.(1990). Occurrence of 5-Methoxypodophyllotoxin in plants, cell-cultures and regenerated plants of *Linum flavum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **23**, 93-100.
- Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., & Holmbom, B.(2003). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung* **57**, 27-36.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **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.
- Yamamoto, H., Hori, M., Kuwajima, H., & Inoue, K.(2003). Formation of benzoquinol moiety in cornoside by salidroside mono-oxygenase, a cytochrome P450 enzyme, from *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures. *Planta* **216**, 432-436.
- Yamazaki, H., Ueng, Y.F., Shimada, T., & Guengerich, F.P.(1995). Roles of divalent metal-ions in oxidations catalysed by recombinant Cytochrome-P450 3A4 and replacement of NADPH-Cytochrome P450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates. *Biochemistry* **34**, 8380-8389.
- Yu, B.W., Ruppert, M., & Stockigt, J.(2002). Deoxysarpagine hydroxylase - A novel enzyme closing a short side pathway of alkaloid biosynthesis in *Rauvolfia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 2479-2483.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom P450-Enzymen in der Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen in Zellkulturen von *Linum spec.*“

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 5.12.2003

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Marburg ist eine schöne Stadt, so heißt es. Nach der Zeit, die ich dort verbracht habe, kann ich das bestätigen. Allerdings liegt das nicht nur an der Landschaft oder den Gebäuden, sondern auch und besonders an den Menschen, die ich dort kennenlernen durfte und das, obwohl die allermeisten von ihnen gar nicht aus Marburg stammen.

An erster Stelle möchte ich Frau Professor Dr. Petersen danken, für das interessante Thema, das ich in ihrer Gruppe bearbeiten konnte, für ihre Anleitung (dezent), die Diskussionen (zahllos und hilfreich) und die Unterstützung (fortwährend).

Herrn Professor Dr. Alfermann danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur und die Zeit, die ich in seinem Labor arbeiten durfte. Für die Unterstützung in dieser Zeit außerdem ein herzlicher Dank an Frau Dr. Fuss.

Ein besonderer Dank geht an alle lieben Kollegen, die Marburg zu einem besonderen Erlebnis gemacht haben: Dr. Anja Berger (für Moli-tipps), Dr. Elisabeth Szabo (für den kritischen Blick), Dr. Johanna Schmitt (als liebe Lignan-Kollegin), Dr. Kyung-Hee Kim (für den aufbauenden Humor), Dr. Marc Leuschner (für das rheinische Element), Dr. Ina Vogelsang (für die Pflanzenbegeisterung), Kerstin Kranz (für die helfende Hand innerhalb und außerhalb des Labors) und Verena Janiak (für dasselbe außerhalb und innerhalb).

Herzlich möchte ich mich auch bei denjenigen bedanken, die diese Arbeit durch Bereitstellung von Material, Chemikalien oder Informationen unterstützt haben: Prof. Dr. Medarde, Prof. Dr. Pras und Dr. Imbert für verschiedene Lignane sowie Prof. Dr. Imming für die Unterstützung bei der katalytischen Hydrierung möchte ich dabei besonders erwähnen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der EU für die finanzielle Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Frau Katja Jansen bedanken, ohne die alles unendlich viel schwerer wäre und bei meinem Sohn Florian, dafür, dass er mit seiner Ankunft fast so lange gewartet hat, bis dieser Text fertig war.