

**Untersuchungen zur Bildung von Hydroxyzimtsäureestern in
Ocimum basilicum, *Cichorium intybus* und *Actaea racemosa***

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

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Victoria Ingeburg Maria Werner
aus Saalfeld/Saale

Marburg/Lahn 2018

Dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

eingereicht am: 06.11.2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Maike Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Heine

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Hochschulkennziffer: 1180

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Das erste, das der Mensch im Leben vorfindet, das letzte, wonach er die Hand ausstreckt, das kostbarste, was er im Leben besitzt, ist die Familie.

Adolph Kolping

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Wegwarte - <i>Cichorium intybus</i> L.....	5
1.1.1 Botanik	5
1.1.2 Pharmazeutische und allgemeine Bedeutung.....	5
1.1.3 Inhaltsstoffe	6
1.2 Basilikum - <i>Ocimum basilicum</i> L.....	7
1.2.1 Botanik	7
1.2.2 Pharmazeutische und allgemeine Bedeutung.....	7
1.2.3 Inhaltsstoffe	8
1.3 Zichoriensäure	9
1.4 Traubensilberkerze - <i>Actaea racemosa</i> L.....	10
1.4.1 Botanik	10
1.4.2 Pharmazeutische Bedeutung	10
1.4.3 Inhaltsstoffe	11
1.5 Cimicifugasäuren	13
1.5.1 Allgemeines	13
1.5.2 Biosynthese	15
1.5.3 Vorkommen	15
1.5.4 Piscidin- und Fukinsäure	17
1.6 Acyltransferasen	19
1.6.1 Serin Carboxypeptidase-artige Acyltransferasen (SCPL)	19
1.6.2 BAHD-Acyltransferasen	19
1.7 Ziele der Arbeit	24
1.7.1 Aufklärung der Biosynthese der Zichoriensäure	24
1.7.2 Aufklärung der Biosynthese der Cimicifugasäuren	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Geräte	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Verwendete Kits	28
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien und Enzyme.....	28
2.1.4 Antikörper für Westernblot-Analyse.....	28
2.1.5 Größenmarker	29
2.1.6 Samen und Pflanzen, Extrakte	29
2.1.7 Bakterienstämme	29
2.1.8 Vektoren	30
2.1.9 Analytische Materialien	30
2.1.10 Primer	30
2.1.11 Geräte	31
2.1.12 Verwendete Software	32

2.2 Puffer, Lösungen und Medien	33
2.2.1 Allgemeine Puffer	33
2.2.2 Nährmedien für Bakterienkulturen.....	33
2.2.3 Medien für die Pflanzenzellkultur	34
2.2.4 Puffer für die DNA-Extraktion	36
2.2.5 Puffer für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese	36
2.2.6 Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung und -konzentrationsbestimmung....	37
2.2.7 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	38
2.2.8 Puffer und Lösungen für den Westernblot.....	39
2.3 Allgemeine Methoden	40
2.3.1 Herstellung steriler Kalluskulturen	40
2.3.2 Überimpfen von Zellkulturen	41
2.3.3 Elicitierung von Suspensionskulturen.....	41
2.3.4 Zugabe von Substraten zu den Zellkulturen.....	42
2.3.5 Proteinstruktur-Modelling	42
2.3.6 Phylogenetische Untersuchungen.....	42
2.4 Analytisch-chemische Methoden	43
2.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	43
2.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	43
2.4.3 Massenspektrometrie	44
2.4.4 Herstellung von CoA-Estern	45
2.4.5 Isolierung von Piscidinsäure.....	49
2.4.6 Isolierung von Fukinsäure	49
2.4.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	51
2.4.8 Isolierung von phenolischen Inhaltsstoffen	51
2.4.9 Gehaltsbestimmung mittels HPLC	51
2.4.10 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes.....	52
2.5 Molekularbiologische Methoden	53
2.5.1 RNA-Extraktion.....	53
2.5.2 DNase-Verdau.....	53
2.5.3 cDNA-Synthese	54
2.5.4 DNA-Extraktion.....	54
2.5.5 PCR.....	55
2.5.6 Semiquantitative PCR	56
2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese	57
2.5.8 Gelextraktion	57
2.5.9 Herstellung kompetenter Zellen	58
2.5.10 Ligation.....	58
2.5.11 Transformation	59
2.5.12 Übernachtkulturen	60
2.5.13 Anlegen einer Glycerol-Dauerkultur	60
2.5.14 Plasmidisolation	61

2.5.15 Restriktionsverdau	61
2.6 Biochemische Methoden	62
2.6.1 Herstellung von Enzymrohextrakten aus Pflanzen.....	62
2.6.2 Proteinexpression.....	62
2.6.3 Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA-Säule	64
2.6.4 Umpufferung und Entsalzung über PD-10 Säulen	64
2.6.5 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	64
2.6.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	65
2.6.7 Westernblot-Analyse in der Semi-Dry-Kammer	65
2.6.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	67
2.6.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten	68
2.6.10 Ermittlung des Einflusses von DTT auf den Enzymtest	73
3 Ergebnisse und Diskussion.....	74
3.1 Untersuchungen der Zichoriensäure-Biosynthese in <i>Ocimum basilicum</i> und <i>Cichorium intybus</i>	74
3.1.1 Etablierung von Suspensionskulturen von <i>Ocimum basilicum</i>	74
3.1.2 Inhaltsstoffbestimmung von Suspensionskulturen von <i>Ocimum basilicum</i>	74
3.1.3 Elicitierung einer Basilikum-Suspensionskultur	75
3.1.4 Enzymtest mit Proteinrohextrakten aus Basilikumzellen.....	77
3.1.5 Untersuchung von Basilikum-Frischpflanzenextrakten	77
3.1.6 Zugabe von Weinsäure zu Basilikum-Zellkulturen	78
3.1.7 Untersuchung von Zichorien-Frischpflanzen	78
3.1.8 Herstellung und Untersuchung von Kalluskulturen von <i>Cichorium intybus</i>	79
3.1.9 Zusammenfassung der Untersuchung der Zichoriensäure-Biosynthese	80
3.2 Untersuchungen an <i>Actaea racemosa</i>	82
3.2.1 Etablierung von Kalluskulturen von <i>Actaea racemosa</i>	82
3.2.2 Synthese von Hydroxycinnamoyl-CoA Estern.....	83
3.2.3 Isolierung von Piscidinsäure.....	83
3.2.4 Isolierung von Fukinsäure	84
3.2.5 Klonierung einer Hydroxycinnamoyltransferase aus <i>Actaea racemosa</i>	84
3.2.6 Proteinstruktur-Modell	88
3.2.7 Expression der ArCAS	90
3.2.8 Bestimmung der Enzymaktivität der ArCAS	92
3.2.9 Testung der Substratspezifität der ArCAS	95
3.2.10 Ermittlung des Einflusses von Ascorbat und DTT auf den Enzymtest	97
3.2.11 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen der ArCAS	99
3.2.12 Reverser Enzymtest mit Fukinolsäure.....	100
3.2.13 Enzymkinetische Untersuchungen	103
3.2.14 Phylogenetische Untersuchung der ArCAS	106
3.2.15 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes in <i>Actaea racemosa</i>	111
3.2.16 Untersuchung der Verteilung der Cimicifugasäuren in <i>Actaea racemosa</i>	112
3.2.17 Untersuchung der Expression der ArCAS in <i>Actaea racemosa</i>	114
3.2.18 Zusammenfassung der Untersuchung von <i>Actaea racemosa</i>	115

4 Zusammenfassung	117
5 Summary	119
6 Anhang	121
6.1 Verwendete Sequenzen für den Stammbaum.....	121
6.2 Sequenzen zur Ableitung der Actin-Primer	124
6.3 Abkürzungen	125
6.4 Aminosäurecodes	127
7 Literaturverzeichnis	128

1 Einleitung

1.1 Wegwarte - *Cichorium intybus* L.

1.1.1 Botanik

Die Zichorie, *Cichorium intybus* L., auch Wegwarte genannt, ist eine krautige ausdauernde Pflanze aus der Familie der Asteraceae. Mit einer Wuchshöhe bis zu 2 m und den blauen, nur aus Zungenblüten bestehenden Blütenkörbchen ist die Wegwarte beinahe weltweit zu finden. Die Laubblätter sind bis zu 30 cm lang, länglich und teils behaart. Die Blütenkörbchen sind 5 cm breit und mit einem borstigen Hüllkelch versehen (Abbildung 1). Aus den Blüten entwickeln sich 3 mm lange Achänen mit einem kurzem unscheinbaren Pappus (Blaschek et al. 2007).



Abbildung 1

Cichorium intybus A: Blütenstände mit Stängel und Blättern, B: Blütenkörbchen
(<https://commons.wikimedia.org> by Tony Hisgett)

1.1.2 Pharmazeutische und allgemeine Bedeutung

Bedeutung erlangte die Zichorie, aber vor allem ihre Wurzel, als Kaffeeersatz. Die Zichorienwurzel wurde geerntet, getrocknet und ähnlich dem Kaffee geröstet. Durch den Röstprozess kommt es zu Röstprodukten, welche denen des Kaffees ähneln (Seel und Hils 1917). Der charakteristische Geruch und Geschmack des Bohnen- aber auch des Zichorienkaffees entsteht durch die Pyrolyse der enthaltenen Kohlenhydrate, dabei entstehen neben Derivaten des Furfurals, auch Furane, aber auch verschiedene Aldehyde (Sannai et al. 1982; Lee et al. 2017).

Pharmazeutisch fand die Zichorie auf Grund ihres teils bitteren Geschmacks Anwendung bei Appetitlosigkeit und dyspeptischen Beschwerden, wird heute aber auf Grund anderer Alternativen nicht weiter angewendet (Blaschek et al. 2007).

1.1.3 Inhaltsstoffe

Zu den Inhaltsstoffen der Zichorie zählen Cumarin-Derivate wie Umbelliferon und Esculetin, weiterhin Kaffeesäurederivate wie Kaftarsäure, Zichoriensäure und Chlorogensäure (Abbildung 2). Der bittere Geschmack, welcher für die appetitanregende Wirkung verantwortlich ist, kommt von den enthaltenen Sesquiterpenlaktonen Lactucin und Lactucopikrin (auch Intybin), diese sind in Abbildung 3 dargestellt. Zusätzlich enthält vor allem die Wurzel Inulin, ein Fructan, welches als Präbiotikum gilt (Blaschek et al. 2007)

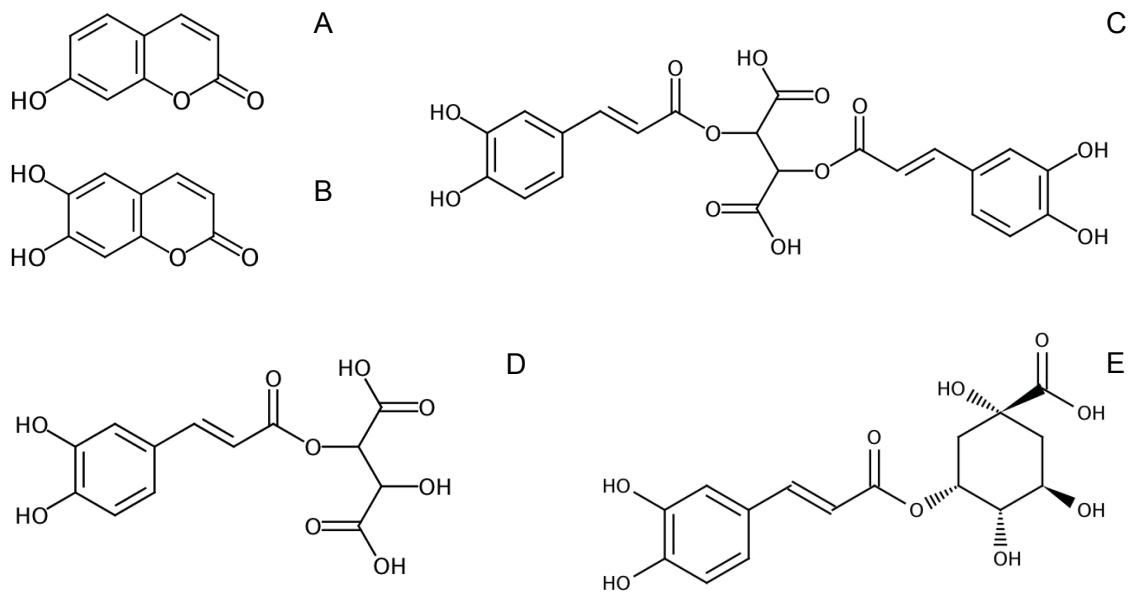


Abbildung 2

Inhaltsstoffe der Zichorie: A: Umbelliferon, B: Esculetin, C: Zichoriensäure, D: Kaftarsäure, E: Chlorogensäure

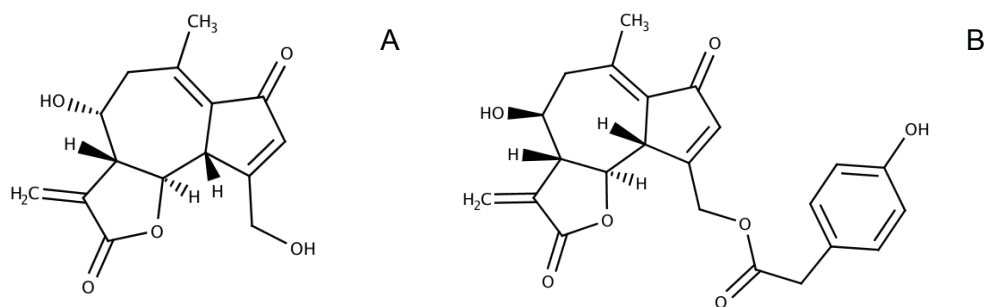


Abbildung 3

Bitterstoffe der Zichorie: A: Lactucin, B: Lactucopikrin

1.2 Basilikum - *Ocimum basilicum* L.

1.2.1 Botanik

Der Basilikum, *Ocimum basilicum* L., ist eine zumeist einjährige Pflanze aus der Familie der Lippenblütler (Lamiaceae). Die bis zu 60 cm hohe Pflanze hat eiförmige bis längliche Blätter, welche eine Länge von bis zu 5 cm erreichen. Die zygomorphen Lippenblüten sind in ährigen Scheinquirlen angeordnet. Die Blüten sind rötlich oder gelblich weiß, wobei die Unterlippe länger ist als die vierzipflige Oberlippe. Die vier Staubblätter liegen frei auf der Unterlippe (Blaschek et al. 2007).



Abbildung 4

Ocimum basilicum

A: Übersicht über die Pflanze

B: Blütenstand mit Lippenblüten

(<https://commons.wikimedia.org> by I. Wildfeuer)

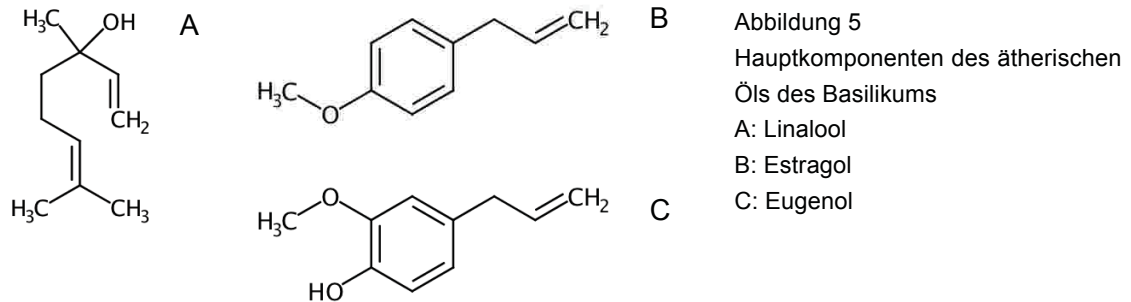
1.2.2 Pharmazeutische und allgemeine Bedeutung

Die Hauptverwendung des Basilikums ist der Einsatz als Küchengewürz. Vor allem in der mediterranen Küche wird Basilikum häufig verwendet, vorzugsweise die frischen Blätter, da eine Trocknung häufig zu einem Verlust des Aromas führt.

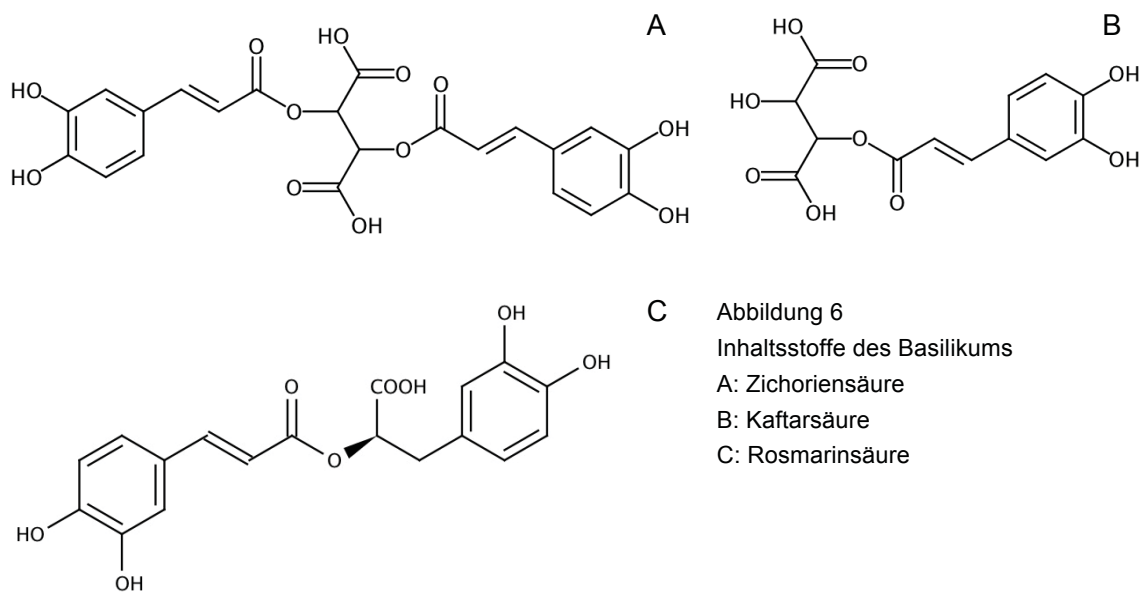
Volkstheoretisch findet Basilikum Anwendung als Stomachikum bei Appetitlosigkeit, aber auch bei Blähungen und Völlegefühl. Da das ätherische Öl einen hohen Gehalt an Estragol aufweist, welches in Tierversuchen kanzerogene Wirkungen gezeigt hat, ist die therapeutische Anwendung von Basilikum mittlerweile obsolet (Wichtl 2008).

1.2.3 Inhaltsstoffe

Die Hauptbestandteile des Basilikums sind ätherische Öle mit den Hauptkomponenten Linalool, Methylchavicol (Estragol) und Eugenol (Abbildung 5).



Weiterhin enthält die Pflanze phenolische Verbindungen wie Rosmarinsäure, Kaffarsäure und Zichoriensäure (Abbildung 6) (Wichtl 2008; Lee und Scigel 2009).



1.3 Zichoriensäure

Dicaffeoylweinsäure wurde 1958 von Scarpati und Oriente aus *Cichorium intybus* isoliert und erhielt aus diesem Grunde den Namen Zichoriensäure (Scarpati und Oriente 1958). Außer in der Zichorie wird Zichoriensäure auch in anderen Arten der Asteraceae wie *Echinacea*-Arten, Löwenzahn und Gartensalat gefunden. Weiterhin ist sie in Equisetaceae, Lamiaceae, aber auch Farnen zu finden (Lee und Scagel 2013). Zichoriensäure ist weit im Pflanzenreich verbreitet, dennoch ist die Biosynthese bisher nicht vollends aufgeklärt. Es ist davon auszugehen, dass eine Acyltransferase an der Biosynthese beteiligt ist, welche den Kaffeesäurerest auf die Weinsäure überträgt. Ein Zwischenprodukt dieser Reaktion ist Monocaffeoylweinsäure, auch Kaftarsäure genannt. Diese Reaktion ist in Abbildung 7 dargestellt. Da es sich um die Übertragung eines Hydroxycimtsäurerests handelt, ist die Beteiligung einer Hydroxycinnamoyltransferase vom BAHD-Typ nicht ausgeschlossen (Sullivan 2014).

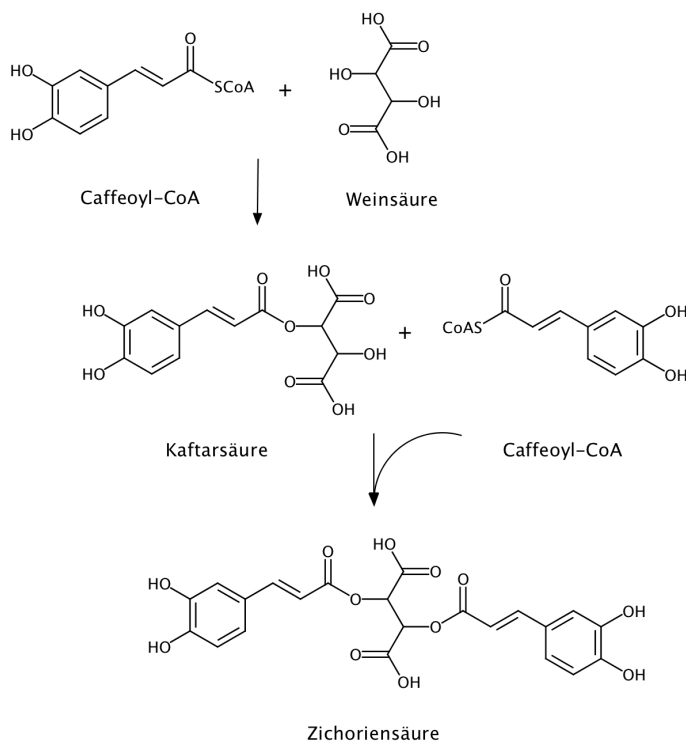


Abbildung 7
Biosynthese der Zichoriensäure (Dicaffeoylweinsäure), katalysiert durch eine Hydroxycinnamoyltransferase vom BAHD-Typ, jeweils unter Abspaltung von Coenzym A

Zichoriensäure zeigt antioxidative und anti-entzündliche Eigenschaften. Auch ein positiver Einfluss auf die Insulinsensitivität konnte gezeigt werden (Lee und Scagel 2013; Tsai et al. 2017; Ferrare et al. 2018).

1.4 Traubensilberkerze - *Actaea racemosa* L.

1.4.1 Botanik

Actaea racemosa L. (syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.) ist eine ausdauernde krautige Pflanze aus der Familie der Ranunculaceae (Abbildung 8). Ursprünglich heimisch in Nordamerika, ist sie mittlerweile auch in Europa vor allem als Zierpflanze in Gärten zu finden. Auf Grund des traubenförmigen Blütenstandes wird die Pflanze im Deutschen auch Traubensilberkerze genannt. Die Pflanze kann bis zu 2 m Höhe erreichen, der Blütenstand kann dabei bis zu 60 cm groß werden. Die Blätter sind dreifach gefiedert und an den Blatträndern gesägt. Durch das Abfallen der Kronblätter zeitnah nach dem Aufblühen, besteht die Blüte hauptsächlich aus den Staubblättern. Der Geruch der Blüten wird bisweilen als unangenehm empfunden, lockt aber Bienen und andere Insekten an. Aus den Blüten entwickeln sich eiförmige Kapseln, welche die Samen enthalten. Als Überdauerungsorgan dient ein ausgeprägtes Rhizom (Blaschek et al. 2007).

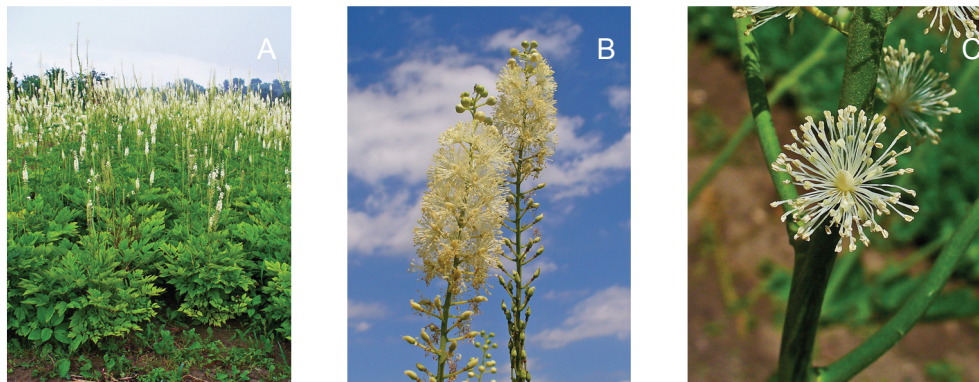


Abbildung 8

Actaea racemosa A: Übersicht über die Gesamtpflanze, B: Ansicht des Blütenstandes, C: Ansicht der Blüte

(<https://commons.wikimedia.org> by H. Zell)

1.4.2 Pharmazeutische Bedeutung

Das Rhizom wurde bereits von amerikanischen Ureinwohnern zur Heilung verschiedener Erkrankungen wie Nierenbeschwerden, Rheumatismus und gynäkologischen Beschwerden eingesetzt (Qiu et al. 2014).

Auch heutzutage finden Extrakte aus Traubensilberkerze Anwendung bei peri- und postmenopausalen Frauen. Obwohl sich seit Mitte der 1950er Jahre Fertigpräparate auf dem Markt befinden, fehlen aussagekräftige Studien zum Wirkmechanismus. Oft als selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator bezeichnet, zeigen neuere Studien, dass die Wirkung, welche zur Minderung der Hauptsymptome (Hitzewallungen, Nachtschweiß) beiträgt, am ehesten durch eine Wirkung auf das Serotonin-Dopamin-System zurückzuführen ist (Henneicke-von Zepelin 2017).

Auf Grund einiger berichteter Fälle von Leberveränderungen bedarf die Einnahme von Traubensilberkerzenzubereitungen der ärztlichen Überwachung, um Leberschäden zu vermeiden. Klinisch relevante Interaktionen mit anderen Arzneistoffen konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Extrakte zeigen lediglich eine schwache Inhibition des CYP2D6 Enzymkomplexes (Products 2010).

1.4.3 Inhaltsstoffe

Inhaltsstoffe der Traubensilberkerze, vor allem des Rhizoms, sind Triterpene vom Cycloartantyp. In Abbildung 9 ist eine Übersicht der bisher nachgewiesenen Verbindungen zu sehen. Diese bestehen aus dem eigentlichen Cycloartan-Skelett, an welches an C17-Position diverse Seitenketten geknüpft sind. An die Hydroxylgruppe am C3-Atom kann ein Zuckerrest, Arabinose oder Xylose, gebunden sein.

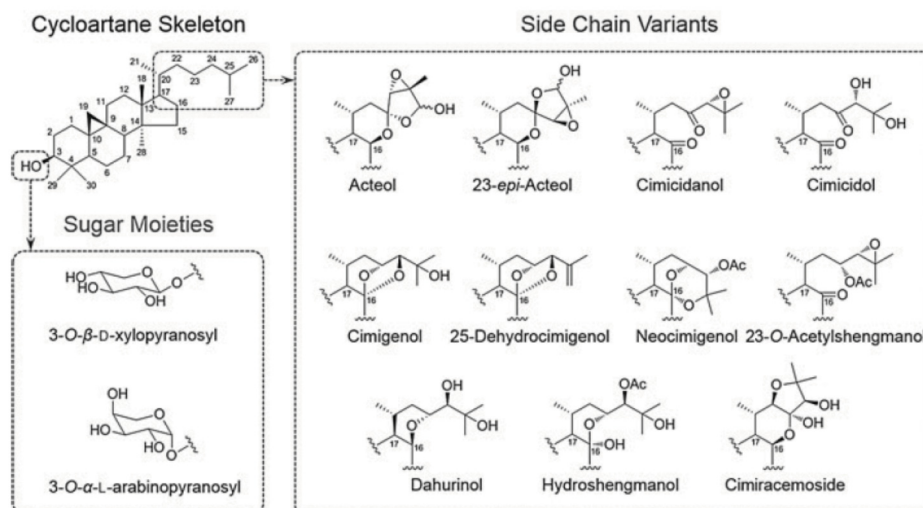


Abbildung 9
Übersicht der verschiedenen Cycloartan-Triterpene aus *Actaea racemosa* aus Qiu et al. (2014)

Eine weitere große Inhaltsstoffgruppe sind Polyphenole. Hierzu zählen Hydroxyzimtsäuren wie Kaffeesäure, Ferulasäure und Isoferulasäure (Abbildung 10) (Jiang et al. 2011), aber auch die sogenannten Cimiracemate. Einen Überblick über die chemische Struktur ist in Abbildung 11 zu sehen (Chen et al. 2002).

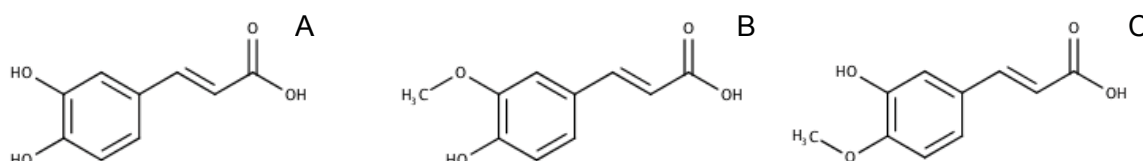


Abbildung 10
A: Kaffeesäure, B: Ferulasäure, C: Isoferulasäure

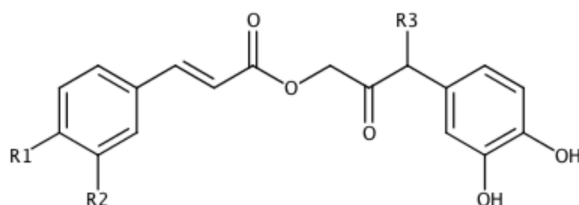


Abbildung 11
Chemische Struktur der Cimiracemate
nach Chen et al. (2002)

Cimiracemat A: R1: OCH₃ R2: H R3: H
 Cimiracemat B: R1: OH R2: OCH₃ R3: H
 Cimiracemat C: R1: OCH₃ R2: OH R3: OCH₃
 Cimiracemat D: R1: OH R2: OCH₃ R3: OCH₃

Verbindungen aus Hydroxyzimtsäuren mit Piscidin- oder Fukinsäure werden Cimicifugasäuren genannt, diese werden in Kapitel 1.5 weiter beschrieben.

Weitere Inhaltsstoffe der Traubensilberkerze sind unter anderem Flavonoide, wobei ein bisher angenommenes Vorkommen von Formononetin im Rhizom nicht bestätigt werden konnte (Struck et al. 1997).

Die Familie der Ranunculaceae steht auf Platz drei der Pflanzenfamilien, welche die meisten Alkaloide produzieren; über 1500 Alkaloide wurden bisher nachgewiesen (Cordell et al. 2001). Es verwundert folglich nicht, dass auch in *Actaea racemosa* Alkaloide gefunden werden konnten. Das erste nachgewiesene Alkaloid war Cimipronidin (Abbildung 12A), welches zum Guanidin-Typ gehört (Fabricant et al. 2005). Weitere Alkaloide dieses Typs sind der Methylester des Cimipronidin und Cyclopronidin (Abbildung 12B) (Gödecke et al. 2009a).

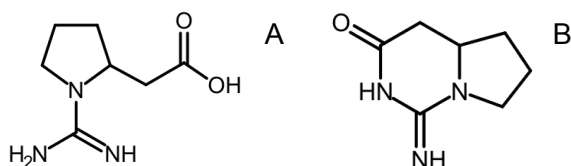


Abbildung 12
Alkaloide von Guanidintyp aus *Actaea racemosa*
A: Cimipronidin
B: Cyclopronidin

Auch Isochinolinalkaloide wie Norsalsolinol (Abbildung 13A) und das Indolalkaloid *N*-Methylserotonin (Abbildung 13B) konnten in *Actaea racemosa* gefunden werden (Nikolic et al. 2015; Powell et al. 2008).

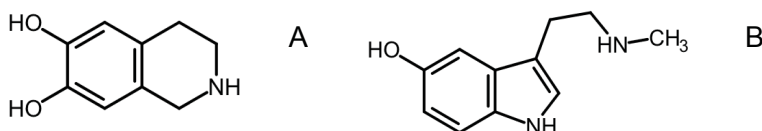


Abbildung 13
A: Norsalsolinol
B: *N*-Methylserotonin

Weitere Stickstoffhaltige Verbindungen, darunter Betaine, Choline und Verbindungen von Zimtsäuren mit Putrescin oder Aminosäuren wurden nachgewiesen (Qiu et al. 2014; Nikolic et al. 2015).

1.5 Cimicifugasäuren

1.5.1 Allgemeines

Cimicifugasäuren sind phenolische Verbindungen, welche ihren Namen der Gattung *Cimicifuga* verdanken. Als Erstes wurde die sogenannte Fukinolsäure, ein Ester aus Kaffeesäure und Fukinsäure, in *Petasites japonicus* entdeckt (Sakamura et al. 1973). Verbindungen mit Strukturähnlichkeit zur Fukinolsäure, welche in der Gattung *Cimicifuga* (heute *Actaea*) gefunden wurden, wurden als Cimicifugasäuren alphabetisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt.

Da die Benennung in chronologischer Reihenfolge keinerlei Information über die chemische Struktur der Verbindungen gibt, wurde eine neue Nomenklatur, basierend auf den Hauptbestandteilen etabliert (Gödecke et al. 2009b). Unterschieden wird in die Gruppen mit K (Fukinsäure) und P (Piscidinsäure). Das Kürzel des Hydroxyzimtsäureanteils ergibt sich aus dessen Namen (P: *p*-Cumarsäure, K: Kaffeesäure, I: Isoferulasäure, F: Ferulasäure, S: Sinapinsäure, D: Dimethoxyzimtsäure). Somit ergibt sich beispielhaft für Fukinolsäure der neue Name CA KK, wobei CA die Abkürzung für cimicifugic acid, also Cimicifugasäure, ist. Eine Übersicht über die chemische Struktur, den vorigen Namen sowie die neue Nomenklatur gibt Tabelle 1.

Die pharmakologische Wirkung der Cimicifugasäuren ist bisher nur wenig untersucht. Da es sich um phenolische Verbindungen handelt, besitzen sie radikalfangende Aktivität (Nuntanakorn et al. 2007). Weiterhin zeigte sich, dass CA KK die makrophageneigene NO-Produktion inhibiert (Watanabe et al. 2007). CA KK und andere Cimicifugasäuren zeigten außerdem *in vitro* Effekte auf die Aktivitäten von Kollagenase sowie auf Hyaluronidase (Kusano et al. 2001; Iwanaga et al. 2010a). Untersuchungen an Hep-G2 Zellen mit CA KK, CA KF und CA KI wiesen keine zytotoxischen Einflüsse der Säuren auf die Zellen auf, auch der Einfluss auf CYP-Enzyme war gering und nicht signifikant (Huang et al. 2010). Bisher konnte ein geringer Einfluss von CA KK auf die Estrogen-abhängige Proliferation von MCF-7 Zellen nachgewiesen werden (Kruse et al. 1999), doch weitere Untersuchungen zur Wirkung und Einfluss der Cimicifugasäuren sind nötig. Bislang konnte außerdem nicht gezeigt werden, welchen Anteil die Cimicifugasäuren an der Wirkung von *Actaea racemosa* Extrakten und somit auch an den auf dem Markt befindlichen Handelsprodukten haben.

Tabelle 1

Übersicht der Cimicifugasäuren sowie der Nomenklatur nach Gödecke et al. (2009b)

R1	R2	R3	R4	R5	Name	Neuer Name
OH	OH	OH	OH	H	Fukinolsäure	CA KK
OH	OH	OCH ₃	OH	H	Cimicifugasäure A	CA KF
OH	OH	OH	OCH ₃	H	Cimicifugasäure B	CA KI
OH	OH	H	OH	H	Cimicifugasäure C	CA KP
H	OH	OH	OH	H	Cimicifugasäure D	CA PK
H	OH	OCH ₃	OH	H	Cimicifugasäure E	CA PF
H	OH	OH	OCH ₃	H	Cimicifugasäure F	CA PI
OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	Cimicifugasäure G	CA KD
OH	OH	3,4-Dihydroxybenzoesäure			Cimicifugasäure H	-
OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Cimicifugasäure I	CA KS
H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Cimicifugasäure J	CA PS
H	OH	H	OH	H	Cimicifugasäure K	CA PP
H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	Cimicifugasäure L	CA PD
H	H	OH	OH	H	Cimicifugasäure M	-
OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	Cimicifugasäure N	-
<i>cis</i> -konfiguriert						

1.5.2 Biosynthese

Die Biosynthese der Fukinol- und Cimicifugasäuren ist bisher nicht aufgeklärt. Diese verläuft wahrscheinlich ähnlich zu jener der Rosmarinsäure. Hierbei entsteht der Hydroxymzimtsäureanteil der Rosmarinsäure aus L-Phenylalanin durch Desaminierung, Hydroxylierung und anschließende Aktivierung als CoA-Ester; der zweite Teil der Rosmarinsäure entsteht aus L-Tyrosin, das über *p*-Hydroxyphenylpyruvat zu *p*-Hydroxyphenylmilchsäure umgewandelt wird. Die Verknüpfung zur Rosmarinsäure geschieht dann durch die Rosmarinsäuresynthase (Petersen und Alfermann 1988). Es wird angenommen, dass während der Biosynthese der Cimicifugasäuren L-Tyrosin ebenfalls zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat reagiert. Durch Konjugation mit Acetat soll Piscidinsäure, durch weitere Hydroxylierung Fukinsäure (Abbildung 14) entstehen (Hasa und Tazaki 2004).

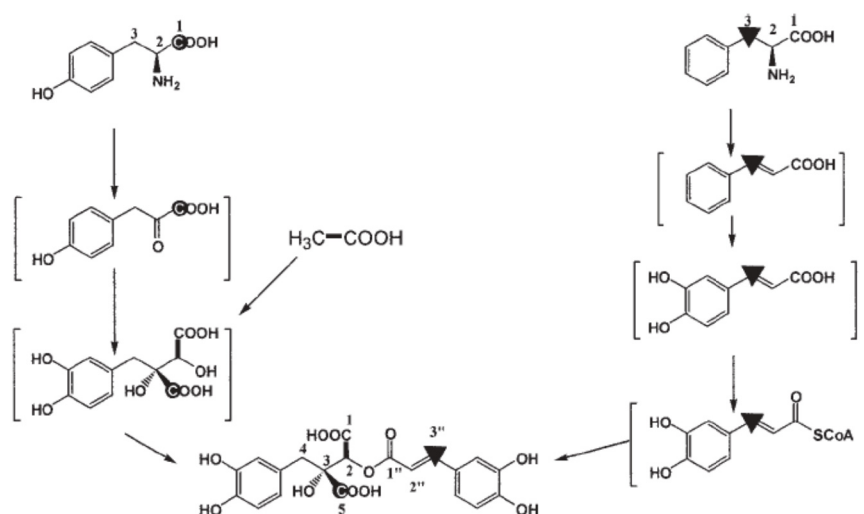


Abbildung 14

Hypothetischer Biosyntheseweg der Fukinolsäure aus Hasa und Tazaki (2004)

1.5.3 Vorkommen

Die bisher 15 gefundenen Cimicifugasäuren kommen nicht in allen Arten der Gattung *Actaea* gleich verteilt vor. So findet man in *Actaea racemosa* CA KK, CA KF, CA KI, CA PK, CA PI, CA PF und CA KD (Kruse et al. 1999; Nuntanakorn et al. 2006; Li et al. 2003). Eine Übersicht über die Vorkommen der Cimicifugasäuren gibt Tabelle 2. Die Untersuchung des Vorhandenseins der Cimicifugasäuren erfolgte bisher nur mit den unterirdischen Teilen der Pflanze, also Wurzel und Rhizom. Bisher fehlen Untersuchungen zum Vorkommen und der Verteilung in anderen Pflanzenteilen.

Doch nicht nur in Pflanzen der Gattung *Actaea* konnten Cimicifugasäuren nachgewiesen werden. So findet sich Fukinolsäure auch in der Japanischen Pestwurz (*Petasites japonicus*, Asteraceae) (Sakamura et al. 1969).

Ein weiteres Vorkommen von Cimicifugasäure D (CA PK) wird in *Platycodon grandiflorum* (Campanulaceae), der Ballonblume, berichtet (Wang et al. 2017).

Tabelle 2

Vorkommen der verschiedenen Cimicifugasäuren in den verschiedenen Arten der Gattung *Actaea* in alter und neuer Nomenklatur, FA: Fukinolsäure, CA: Cimicifugasäure, m: methoxylierte Verbindung

Art	F	CA														
	A	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
	K K	K F	K I	K P	P K	P F	P I	K D		K S	P S	P P	P D			
<i>A. racemosa</i>																Kruse et al. (1999)
																Löser et al. (2000)
																Li et al. (2003)
																Nuntanakorn et al. (2006)
																Nuntanakorn et al. (2007)
																Gödecke et al. (2009b)
<i>A. simplex</i>																Takahira et al. (1998b)
		m	m													Takahira et al. (1998a)
																Kusano (2001)
																Iwanaga et al. (2010b)
<i>A. japonica</i>																Kusano (2001)
																Iwanaga et al. (2010b)
<i>A. rubra</i>																Nuntanakorn et al. (2007)
<i>A. pachypoda</i>																
<i>A. podopcarpa</i>																
<i>A. dahurica</i> + <i>A. heracleifolia</i>																Iwanaga et al. (2010a)
<i>A. heracleifolia</i>																Yim et al. (2012)
<i>A. dahurica</i>																Kusano (2001)
<i>A. acerina</i>																
<i>A. foetida</i>																

1.5.4 Piscidin- und Fukinsäure

Piscidin- bzw. Fukinsäure gelten als Vorstufen der Biosynthese der Cimicifugasäuren, wobei deren biosynthetische Herkunft ebenfalls nicht geklärt ist.

In Abbildung 15 sind Piscidin- und Fukinsäure dargestellt. Wie zu sehen, unterscheiden sich diese lediglich in der Hydroxygruppe in *meta*-Position.

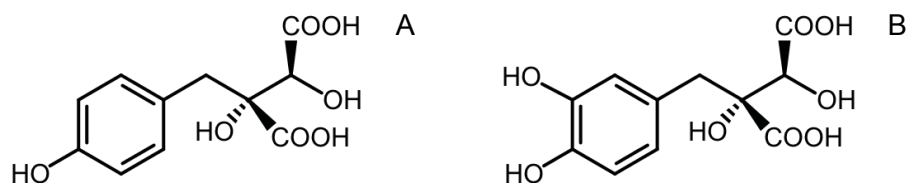


Abbildung 15

A: Piscidinsäure, B: Fukinsäure

Vom Vorkommen von Piscidinsäure wurde bereits 1901 berichtet (Freer und Clover 1901). Der Name stammt von *Piscidia erythrina*, der Pflanze der ersten Entdeckung. Piscidinsäure wurde auch in anderen Pflanzen nachgewiesen, am häufigsten jedoch in der Familie der Fabaceae. Über das Vorkommen der Fukinsäure wurde bisher weit weniger berichtet. Der Name der Fukinsäure leitet sich von der japanischen Bezeichnung „fuki“ für *Petasites japonicus* ab (Hänsel und Sticher 2010). Einen Überblick über die bisher berichteten Vorkommen der Piscidin- und Fukinsäure gibt Tabelle 3.

Tabelle 3
Vorkommen von Piscidin- und Fukinsäure

	Gattung und Familie	Literatur
Piscidinsäure	<i>Piscidia erythrina</i> (Fabaceae)	Freer und Clover (1901) Bridge et al. (1948) Moore und Eng (1956) Nordal et al. (1966b) Heller und Tamm (1975)
	<i>Narcissus poeticus</i> (Amaryllidaceae)	Okumura et al. (1955)
	<i>Agave americana</i> (Asparagaceae)	Nordal und Ogner (1964) Krogh (1967)
	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Cactaceae)	Nordal et al. (1966a) Teles et al. (1994)
	<i>Euphorbium resinifera</i> (Euphorbiaceae)	Krogh (1967)
	<i>Aloe zebrina</i> (Xanthorrhoeaceae)	Krogh (1969)
	<i>Galanthus nivalis</i> (Amaryllidaceae)	Krogh (1969)
	<i>Dioscorea nipponica</i> (Dioscoreaceae)	He et al. (1980) Ho et al. (1980)
	<i>Cajanus cajan</i> (Fabaceae)	Ae et al. (1990) Otani et al. (1996) Ishikawa et al. (2002)
	<i>Sophora tonkinensis</i> (Fabaceae)	Ding und Chen (2008)
	<i>Sophora alopecuroides</i> (Fabaceae)	Wang und Ma (2009)
	<i>Sophora flavescens</i> (Fabaceae)	Zhang et al. (2013)
	<i>Quillaja saponaria</i> (Quillajaceae)	Maier et al. (2015)
	<i>Hippeastrum solandriflorum</i> (Amaryllidaceae)	Carvalho et al. (2015)
	<i>Retama sphaerocarpa</i> (Fabaceae)	Touati et al. (2017)
	<i>Aspalathus linearis</i> (Fabaceae)	Stander et al. (2017)
<i>Vicia faba</i> (Fabaceae)	Valente et al. (2018)	
Fukinsäure	<i>Vicia faba</i> (Fabaceae)	Abu-Reidah et al. (2017)
	<i>Petasites japonicus</i> (Asteraceae)	Sakamura et al. (1969) Sakamura et al. (1973)
	<i>Piscidia erythrina</i> (Fabaceae)	Heller und Tamm (1975)
	<i>Myrtus communis</i> (Myrtaceae)	Díaz de Cerio et al. (2018)

1.6 Acyltransferasen

Das Spektrum an pflanzlichen Naturstoffen ist groß, wobei viele dieser Verbindungen auf ähnliche Ausgangssubstanzen zurückzuführen sind, welche auf verschiedene Wege weiter reagieren. Im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel spielen Acylierungen bei der Modifizierung eine außerordentliche Rolle. Aus chemischer Sicht handelt es sich um die Übertragung eines Acylrestes auf ein Akzeptormolekül. In Pflanzen laufen diese Reaktionen enzymatisch katalysiert ab. Die Enzyme werden Acyltransferasen genannt. Diese unterscheiden sich nicht nur in der Vielfalt ihrer möglichen Substrate, sondern auch in der Form der Aktivierung des Acylrestes. Man unterscheidet Glucose- und CoA-aktivierte Acyldonatoren. Zu den wichtigsten Enzymklassen zählen Serin Carboxypeptidase-artige Acyltransferasen und BAHD-Acyltransferasen (Bontpart et al. 2015; Petersen 2016).

1.6.1 Serin Carboxypeptidase-artige Acyltransferasen (SCPL)

Der Name SCPL beruht auf der Homologie zu den Serin Carboxypeptidasen, doch haben die SCP-artigen Acyltransferasen die Peptidaseaktivität verloren. Serin Carboxypeptidasen gehören zu den α/β -Hydrolasen, welche sich durch eine katalytische Triade aus Serin, Asparaginsäure und Histidin auszeichnen (Fraser et al. 2005). Ein N-terminales Signalpeptid führt dazu, dass das Protein über den sekretorischen Weg in die Vakuole gelangt (Mugford et al. 2009). Serin Carboxypeptidase-artige Acyltransferasen nutzen Glucose-aktivierte Acylreste. Als Acyldonatoren dienen neben Cinnamoyl-Glucose, auch der entsprechende Kaffee- und Sinapinsäureester (Milkowski et al. 2004). Die erste beschriebene Reaktion dieser Art stellt die Bildung von Chlorogensäure durch β -1-Cinnamoyl-D-glucose in der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) dar (Kojima und Uritani 1972). Das Substratspektrum der SCPLs reicht von Chinasäure über Anthocyane bis Cholin. Dennoch sind bisher nur wenige dieser Enzyme charakterisiert (Bontpart et al. 2015; Petersen 2016).

1.6.2 BAHD-Acyltransferasen

BAHD-Acyltransferasen sind weit verbreitet im Pflanzenreich und nutzen CoA-aktivierte Säuren als Donorsubstrat. Untersuchungen zeigten, dass *Populus trichocarpa* 94 und *Arabidopsis thaliana* 62 mögliche BAHD-Acyltransferase-Sequenzen enthalten (Yu et al. 2009).

Der Name BAHD leitet sich aus den Anfangsbuchstaben der vier zuerst gefunden Enzyme dieser Enzymfamilie ab. Es handelt sich dabei um eine Benzylalkohol O-Acyltransferase (BEAT) aus *Clarkia breweri* (Dudareva et al. 1998), einer Anthocyan O-Hydroxycinnamoyltransferase (AHCT) aus *Gentiana triflora* (Fujiwara et al. 1998), sowie einer Anthranilat N-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase (HCBT) aus *Dianthus caryophyllus* (Yang et al. 1997) und der Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (DAT) aus *Catharanthus roseus* (St-Pierre et al. 1998). Das Produktspektrum innerhalb der Superfamilie ist weit gestreut.

Es reicht von der einfachen Übertragung eines Acylrestes auf einen Benzylalkohol bis zur Beteiligung an der Alkaloid-Biosynthese. Die Übertragung des Acylrestes ist sowohl auf Sauerstoff als auch auf Stickstoff möglich. BAHD Acyltransferasen eint, dass sie alle als Monomere vorkommen mit einem Molekularmasse zwischen 48 und 55 kDa. Sie bestehen aus zwei nahezu gleich großen Domänen, welche sich aus Faltblättern und Helices zusammensetzen. Diese zwei Domänen sind durch einen Loop miteinander verbunden (Ma et al. 2005; Walker et al. 2013). Charakteristisch ist, trotz der geringen Sequenzähnlichkeiten von maximal 25-34 %, dass meist zwei konservierte Sequenzmotive auftreten. Zum einen HXXXDG im Zentrum des Enzyms sowie das DFGWG Motiv am C-terminalen Ende.

Es zeigte sich, dass der Histidinrest im HXXXDG-Motiv eine wichtige Rolle für die Aktivität des Enzyms darstellt. In Abbildung 16A ist Kristallstruktur der Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase aus *Sorghum bicolor* abgebildet. Die Substrate nähern sich von beiden Seiten des Enzyms auf die Höhe des Histidins. Dies ist im Modell der Bindetasche in Abbildung 16B dargestellt. Das Akzeptorsubstrat nähert sich dem Histidin, was zunächst zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen führt. Im Falle der Shikimisäure ist vor allem die Hydroxygruppe in Position 5 entscheidend. An dieser Hydroxygruppe kommt es anschließend zu einer Deprotonierung. Durch die umgebenden Aminosäuren wird dieses Zwischenprodukt stabilisiert, so dass es nachfolgend zu einem nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Donorsubstrats, in diesem Fall *p*-Cumaroyl-CoA, kommt. Stabilisiert wird das daraus entstandene Intermediat durch das benachbarte Tryptophan. Im letzten Schritt wird Coenzym A aus der Bindung entlassen (Walker et al. 2013; Levsh et al. 2016). Die Reaktion von Shikimisäure mit *p*-Cumaroyl-CoA, dem Intermediat, sowie den Interaktionen mit den in der Bindungstasche befindlichen Aminosäuren ist in Abbildung 17 dargestellt.

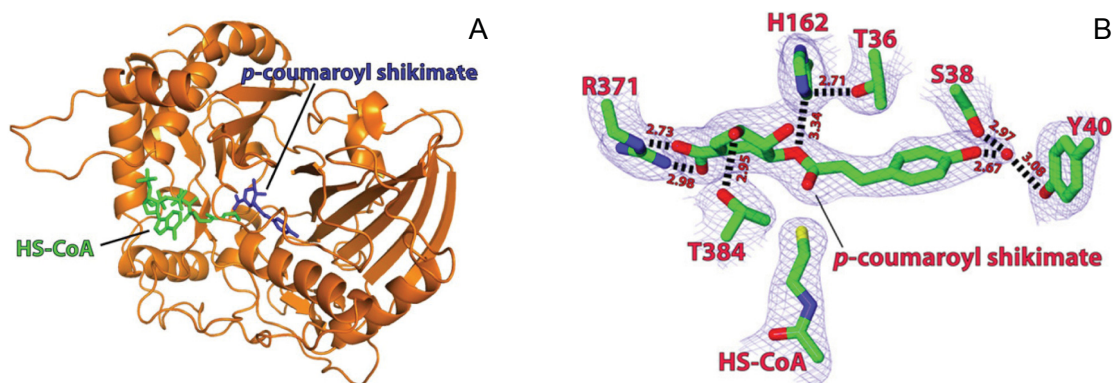


Abbildung 16

A: Proteinkristallstruktur einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase (HST) aus *Sorghum bicolor* (pdb 4KE4) mit modelliertem Produkt (*p*-Cumaroyl-Shikimisäure), B: Modell der Bindetasche des Proteins mit *p*-Cumaroyl-Shikimisäure und der Interaktion mit Histidin; übernommen aus Walker et al. (2013)

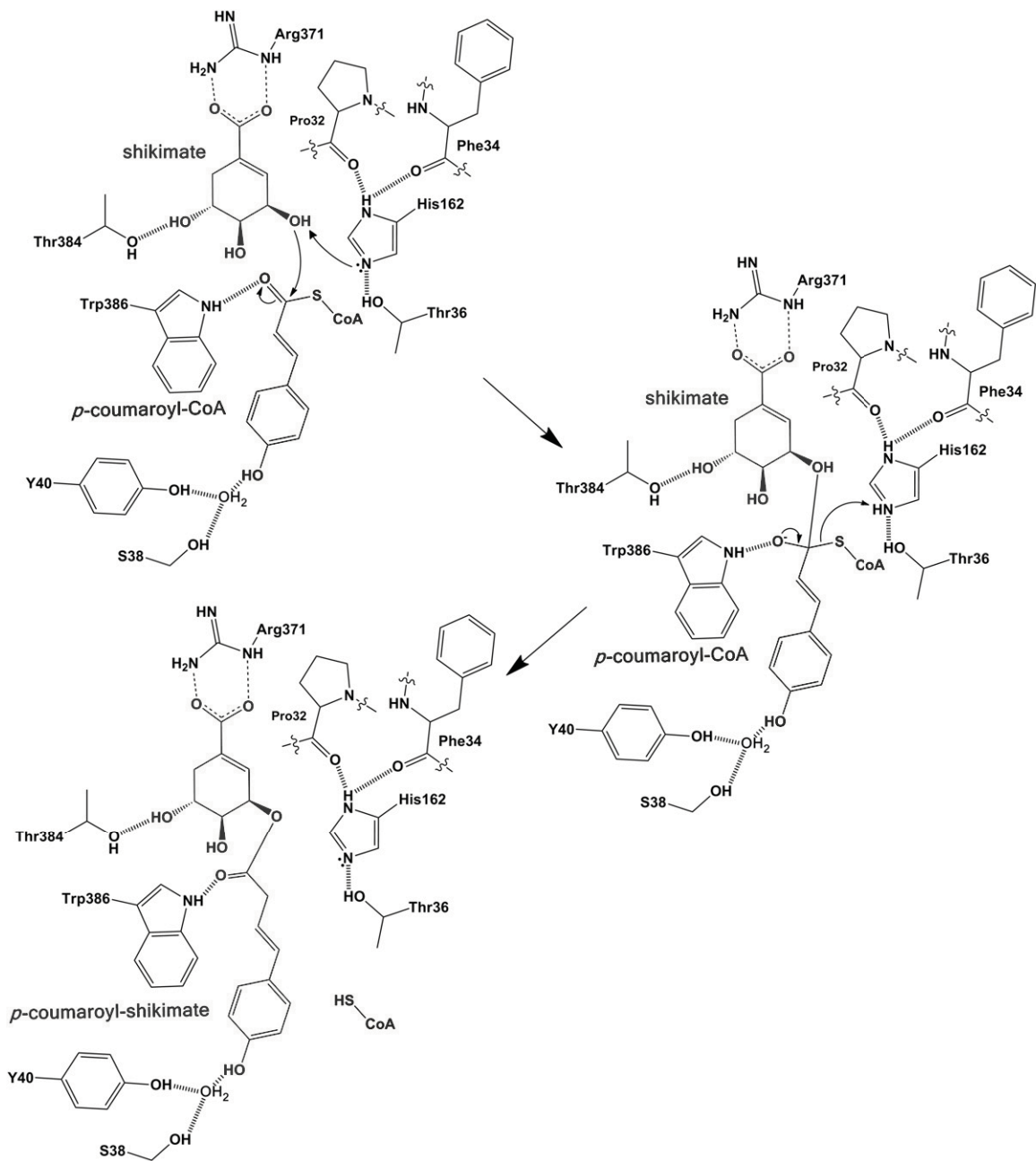


Abbildung 17

Vermutlicher Reaktionsweg der BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen am Beispiel der Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase (HST) aus *Sorghum bicolor* (pdb 4KE4) mit den Substraten *p*-Cumaroyl-CoA und Shikimisäure; entnommen aus Walker et al. (2013)

Zwar sind die Aminosäuren des DFGWG-Motivs nicht direkt an der Reaktion beteiligt, da diese sich in einem Loop außerhalb der Bindungstasche befinden, jedoch ist dieses Motiv dennoch wichtig für die Reaktion. Mutagenese-Experimente an einer Malonyl-CoA:Anthocyan 5-O-Glucosid-6"-O-Malonyltransferase aus *Salvia splendens* im Bereich des DFGWG-Motives führten zu einem Funktionsverlust des Enzyms (Suzuki et al. 2003). *In silico* Mutageneseversuche an einer Alkohol-Acyltransferase aus *Vasconcellea pubescens* liefern Hinweise darauf, dass die Aminosäuren im Bereich des DFGWG-Motives eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Enzyms und des Lösungsmittelkanals spielen (Morales-Quintana et al. 2015).

Je nach Quelle wird die Familie der BAHD-Acyltransferasen in 4-6 Kladen eingeteilt (D'Auria 2006; Yu et al. 2009). Nach D'Auria (2006) enthält Klade I Enzyme, welche Phenolglykoside, vor allem Anthocyane, acylieren. In diese Klade gehört auch die Anthocyan O-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Gentiana triflora* (AHCT) (Fujiwara et al. 1998). Viele der Enzyme dieser Klade besitzen, neben den bereits genannten Sequenzmotiven, noch ein weiteres konserviertes Motiv (YFGNC) (D'Auria 2006). Zu den Transferasen der Klade II gehören bisher lediglich zwei Vertreter, welche an der Synthese von Cuticula-Wachsen beteiligt sind (Xia et al. 1996; Tacke et al. 1995). Die Reaktion von alkoholischen Substraten mit Acetyl-CoA katalysieren die Acyltransferasen der Klade III, wobei diese Klade in zwei Subgruppen unterteilt wird. Die erste Untergruppe beinhaltet Enzyme, welche an der Alkaloid-Biosynthese bzw. -modifikation beteiligt sind: eine Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina* (Bayer et al. 2004) sowie die Deacetylvindolin 4-O-acetyltransferase aus *Catharanthus roseus* (DAT) (St-Pierre et al. 1998). Die zweite Subgruppe beinhaltet Enzyme, die an der Bildung der flüchtigen Bestandteile in Blüten und auch in reifen Früchten, beteiligt sind. Unter anderem eine Alkohol Acyltransferase aus *Fragaria ssp.* (SAAT) (Aharoni et al. 2000) oder auch eine Alkohol Acyltransferase aus *Rosa hybrida* (RhAAT), welche an der Bildung von Geraniol beteiligt ist (Shalit et al. 2003).

In Klade IV befindet sich nach D'Auria (2006) lediglich die Agmatin Cumaroyltransferase (ACT) aus *Hordeum vulgare*, welche unter Ausbildung einer Amidgruppe Agmatin mit *p*-Cumarsäure aus *p*-Cumaroyl-CoA verknüpft. Dieses *p*-Cumaroylagmatin reagiert durch Oxidation weiter zu Hordatol (Burhenne et al. 2003).

Klade V unterteilt sich weiter in Untergruppen. Eine dieser Subgruppen enthält Enzyme aus verschiedenen *Taxus*-Arten, welche an verschiedenen Schritten der Taxol-Biosynthese beteiligt sind (Walker et al. 2002a; Walker et al. 2002b; Walker und Croteau 2000a; Walker et al. 2000; Walker und Croteau 2000b). Eine weitere Subgruppe ist beteiligt an der Bildung flüchtiger Substanzen. So werden die für den Geruch von *Petunia hybrida* verantwortlichen Phenylpropanoide (wie Methylbenzoat, Benzaldehyd oder Eugenol) unter Beteiligung einer Benzoyl-CoA:Benzylalkohol/Phenylethanol Benzoyltransferase (BPBT) gebildet (Boatright et al. 2004). Ebenso wird Methylantranilat in *Vitis labrusca* aus Methanol und Anthraniloyl-CoA durch eine Anthraniloyl-CoA:Methanol Acyltransferase synthetisiert (Wang und De Luca 2005).

Eine letzte Gruppe dieser Klade enthält Hydroxycinnamoyltransferasen, welche eine Zimtsäure übertragen (D'Auria 2006).

Dazu gehören das Hauptenzym der Rosmarinsäure-Biosynthese Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenylmilchsäure Hydroxycinnamoyltransferase, auch Rosmarinsäuresynthase (RAS), sowie die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinasäure Hydroxycinnamoyltransferase (HQT), welche die Biosynthese der Chlorogensäure katalysiert. Aber auch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase (HST), welche ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Monolignolen darstellt, gehört in diese Klade (Petersen 2016; D'Auria 2006; Hoffmann et al. 2004). Ebenso gehören die Spermin/Spermidin Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Malus domestica* und *Solanum melongena*, sowie die Äpfelsäure Hydroxycinnamoyltransferase aus *Trifolium pratense* in diese Klade (Sullivan 2009; Elejalde-Palmett et al. 2015; Peng et al. 2016).

1.7 Ziele der Arbeit

1.7.1 Aufklärung der Biosynthese der Zichoriensäure

Zichoriensäure ist im Pflanzenreich eine weit verbreitete Verbindung. Die Biosynthese ist hingegen noch nicht aufgeklärt. Zwar gibt es erste Untersuchungen dazu, doch konnte bisher kein Enzym isoliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Zellkulturen von Zichoriensäure enthaltenden Pflanzen anzulegen, um diese für weitere Untersuchungen zu verwenden. An Hand von Proteinrohextrakten sollte die Biosynthese der Zichoriensäure untersucht werden. Da es sich bei Zichoriensäure um eine Dicafeoylweinsäure handelt, kann sowohl *m*-, *D*- als auch *L*-Weinsäure ein Substrat sein. Dies sollte durch Enzymtests auch mit verschiedenen CoA-Estern untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Isolierung der codierenden Nukleotidsequenzen, um die an der Zichoriensäure-Biosynthese beteiligte(n) Hydroxycinnamoyltransferase(n) phylogenetisch einzuordnen und zu charakterisieren.

1.7.2 Aufklärung der Biosynthese der Cimicifugasäuren

Die Traubensilberkerze ist eine seit Jahrhunderten pharmazeutisch angewendete Pflanze. Seit einigen Jahren ist auch das Vorkommen der Cimicifugasäuren in Pflanzen der Gattung *Cimicifuga* bzw. *Actaea* bekannt. Die Biosynthese dieser Verbindungen konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Bei einem genetischen Screening konnte eine Sequenz gefunden werden (GenBank GU254280), welche große Ähnlichkeit zu Acyltransferasen der BAHD Superfamilie aufwies, jedoch wurde diese bisher nicht weiter untersucht (Spiering et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, dieses Gen zu isolieren und anschließend zu exprimieren, um die katalytische Aktivität des codierten Proteins untersuchen zu können. Es sollten alle in Frage kommenden Substrate getestet und kinetische Parameter bestimmt werden. Hierfür mussten diese Substrate teilweise zunächst synthetisiert oder isoliert werden.

Die Suche nach geeigneten pflanzlichen Lieferanten für die Isolierung der Ausgangsstoffe war eine weitere Herausforderung. Zur weiteren Untersuchung der Expression des Enzymes in der Pflanze ist das Anlegen einer Zellkultur von Nutzen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

1-Naphthylessigsäure, NAA	Duchefa
1-Phenylethanol	Sigma-Aldrich
2-(4-Hydroxyphenyl)-1-ethanol	Fluka
2-Phenylethanol	Sigma-Aldrich
2-Phenylethylamin	Biosynth
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 2,4-D	Duchefa
3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	Sigma-Aldrich
3-Hydroxyanthranilsäure	Sigma-Aldrich
3-Phenyl-1-propanol	Acros Organics
3,4-Dihydroxybenzoesäure, Protocatechusäure	Roth
3,4-Dimethoxyzimtsäure	Roth
4-Phenyl-1-butanol	Alfa Aesar
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, BCIP	Biosolve
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktosid, X-Gal	Roth
Aceton	Roth
Agar	Cero
Agarose	Roth
Amidoschwarz	Alfa-Aesar
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Anthranilsäure	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	Roth
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB	Roth
Chinasäure	Roth
Chloroform	Roth
Cobalt(II)chlorid	Merck
Coenzym A-Trilithiumsalz Dihydrat, CoA	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka
D-Äpfelsäure	Roth
D-Phenylalanin	Sigma-Aldrich

D-Threonsäure	Sigma-Aldrich
D-Tryptophan	Sigma-Aldrich
D-Weinsäure	Alfa Aesar
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dimethylformamid, DMF	Merck
Diphenylboroxyethylamin, Naturstoffreagenz A	Roth
Dithionitrobenzoesäure, DTNB, Ellmans Reagenz	Carbolution
Dithiothreitol, DTT	Serva
DL-Äpfelsäure	Merck
DL-Dopa	Alfa Aesar
DL-Tyrosin	Schuchardt
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas
Dopamin	Merck
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Fluka
Essigsäure	Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylacetat	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck
Ferulasäure	Roth
Flüssiger Stickstoff	Linde
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck
Galactarsäure	TCI Chemicals
Glucarsäure	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Merck
Guanidin Hydrochlorid	Roth
Guanidinthiocyanat	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Indol-3-essigsäure, IES	Duchefa
Isoferulasäure	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, IPTG	Roth
Kaffeesäure	Alfa Aesar
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumjodid	Merck
Kaliumnitrat	Roth
Kinetin	Duchefa
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	Fluka
L-Äpfelsäure	Roth
L-Dopa	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin	Roth

L-Threonsäure	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan	Roth
L-Tyrosin	Merck
L-Weinsäure	Roth
Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich
Lysozym	Fluka
<i>m</i> -Weinsäure	Aldrich
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Mangan(II)sulfat Pentahydrat	Duchefa
Methanol	Fisher Scientific
Milchpulver	Roth
<i>myo</i> -Inosit	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin, TEMED	Roth
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid, DCC	Sigma-Aldrich
Natrium-Ethylendiamintetraacetat, Titriplex II	Roth
Natriumcarbonat	Fluka
Natriumchlorid	Roth
Natriumdichlorisocyanurat, Dimanin C	Bayer
Natriumdiethyldithiocarbamat, DIECA	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriummolybdat Dihydrat	Fluka
Nickel(II)sulfat Hexahydrat	Roth
Nicotinsäure	Duchefa
Nitrotetrazoliumblau, NBT	Merck
NZ-Amine, Caseinhydrolysat	Sigma-Aldrich
<i>o</i> -Phosphorsäure	Riedel-de Haën
Polyclar 10	Ashland Inc.
Polyethylenglykol 400, PEG 400	Roth
Polyvinylpyrrolidon, PVP	Sigma-Aldrich
Putrescin	Sigma-Aldrich
Pyridoxin Hydrochlorid	Duchefa
Rhozyme HP-150	Pollock and Pool Ltd.
Rinderserumalbum, Fraktion V, BSA	Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	
(30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Saccharose	Haushaltszucker
Salzsäure	Roth
Serotonin	Roth
Shikimisäure	Roth

Spermidin	Roth
Spermin	Roth
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Thiamin Hydrochlorid	Roth
Trichloressigsäure, TCA	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure, TFA	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris	Roth
Tryptamin	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tyramin	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Fluka
Zink(II)sulfat Heptahydrat	Merck
β -Mercaptoethanol	Serva

2.1.2 Verwendete Kits

NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel
PCR Cloning Kit	Qiagen
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
qScript™ cDNA SuperMix	Quanta
RNeasy Plant Kit	Qiagen

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien und Enzyme

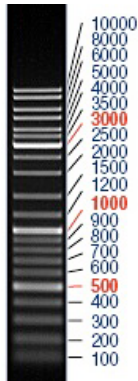
DNase	Fermentas
GoTaq® Polymerase	Promega
RNase A	Fermentas
NdeI	Fermentas
XhoI	Fermentas

2.1.4 Antikörper für Westernblot-Analyse

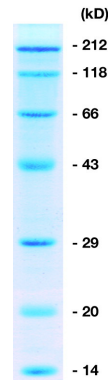
6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8)	Invitrogen
Goat anti-Mouse IgG Fc Secondary Antibody	Novex
Alkaline Phosphatase (AP)	

2.1.5 Größenmarker

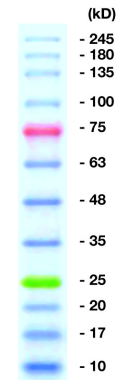
Gene Ruler DNA Ladder Mix
Thermo Fisher Scientific



Roti[®]-Mark Standard
Roth



Roti[®]-Mark TRICOLOR
Roth



2.1.6 Samen und Pflanzen, Extrakte

Actaea racemosa Samen

Actaea racemosa Frischpflanzen

Petasites japonicus 'Giganteus'

Cichorium intybus Samen

Cichorium intybus Frischpflanzen

Quillaja saponaria Extrakt

Rühlemann's Kräuter &
Duftpflanzen

Rühlemann's Kräuter &
Duftpflanzen

StaudenOnline.de
(KwaliteitsPlanten.nl)

N.L. Chrestensen - Erfurter
Samen- und Pflanzenzucht
GmbH

Sammlung im Stadtgebiet
Marburg und Hamburg

Pera Ingredients, Springe-
Eldagsen zur Verfügung gestellt
von Christiane Maier und Prof.
Dr. Ralf Schweiggert (Universität
Hohenheim)

2.1.7 Bakterienstämme

E. coli EZ:

[F':::Tn10(Tc^r) *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ M15] *recA1 end A1 hsdR17* (*r*_{K12}⁻ *m*_{K12}⁺) *lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1*

SoluBL21[™]:

F- *ompT hsdSB* (*rB*- *mB*-) *gal dcm* (DE3)

2.1.11 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	VX-95	Systec GmbH Labor-Systemtechnik
	AL02-02-100	Advantage-Lab
Bakterienschüttler		Gallenkamp
Blotting Kammer	Semi Dry Blotter PROfessional	Roth
Bunsenbrenner	Flammy-S	Schütt
Dispergierwerkzeug	Ultra-Turrax T25 Basic	IKA
Gefriertrockner mit Vakuumpumpe	Christ L1	B.Braun Biotech
	Drehschieberpumpe P4Z	Ilmvac GmbH
Geldokumentationssystem	FAS-Digi	Nippon Genetics
Horizontalelektrophorese- kammer	Agagel Mini Biometra	Biomed. Analytik GmbH
HPLC	Spectra System P 400	Thermo Scientific
	Spectra System SN 4000	
	Spectra System SCM 1000	
	Spectra System UV	
LC-MS	Agilent 1260 series	Agilent
	micrOTOF-Q III with ESI- Source	Bruker Daltonics
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments
PCR-Cycler	MyCycler	Bio-Rad
pH-Elektrode	Accumed Basic	Fisher Scientific
Photometer	Specord 200 plus	Analytik Jena
	Eppendorf	BioPhotometer
Pipetten	P10ml, P1000, P200, P20, P10N, P2N	Gilson
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments
Reinstwasseranlage	OmniaPure	Stakpure
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 120	Büchi

Proteinelektrophoresekammer	Mini Protean® 3 Cell	Bio-Rad
Spannungsgeber	E 835 EV 2310 EV 3020	Consort
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Trockenofen	U40	Memmert
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin
Ultraschallprozessor	UP 200 s	Dr. Hielscher
Vakuum-Rotationsverdampfer mit Vakuumpumpe	RVC2-18 CDPlus MZ 2C NT	Christ vacuubrand
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad und Einhängethermostat	Julabo E	JULABO GmbH
Zellkulturschüttler		Infors
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D 3-30 KS	Eppendorf Sigma

2.1.12 Verwendete Software

Bruker Data Analysis	Bruker Corporation
GraphPadPrism 5	GraphPad Software
MarvinSketch 17.2	ChemAxon
MEGA7	MEGA, Pennsylvania State University
Microsoft® Office Mac 2011	Microsoft Corporation
Phyre2	Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

2.2.1 Allgemeine Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer (KPi)	$\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$	0,1 M
Britton-Robinson-Puffer pH 2-12	Borsäure	0,04 M
	Essigsäure	0,04 M
	Phosphorsäure	0,04 M
Einstellen des pH-Wertes mit 0,2 M NaOH.		

2.2.2 Nährmedien für Bakterienkulturen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
LB Medium (Lysogeny Broth) (Bertani 1951)	Trypton	10,0 g/l
	Hefeextrakt	5,0 g/l
	Natriumchlorid	10,0 g/l
Mit Wasser auf 1 l auffüllen und den pH mit NaOH auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren. Für Festmedium wird 1 % Agar hinzugefügt.		
TB Medium (Terrific Broth) (Tartoff und Hobbs 1987)	Trypton	12,0 g/l
	Hefeextrakt	24,0 g/l
	Glycerol	4,0 ml/l
Mit Wasser ad 900 ml auffüllen und autoklavieren, anschließend mit 100 ml Puffer versetzen.		
Puffer für TB	KH_2PO_4	0,17 M
	K_2HPO_4	0,72 M
Mit Wasser auf 100 ml auffüllen, autoklavieren.		
SOC-Medium (Super Optimal Broth + Glucose) (Hanahan 1983)	Trypton	20,0 g/l
	Hefeextrakt	5,0 g/l
	NaCl	10,0 mM
	KCl	2,5 mM
	MgSO_4	10,0 mM
	Glucose	20,0 mM
Nach Lösen wird der pH-Wert auf pH 7 eingestellt und die Lösung autoklaviert, anschließend werden sterile MgSO_4 und Glucose-Lösung hinzugefügt.		

2.2.3 Medien für die Pflanzenzellkultur

CB2-Medium

(Petersen und Alfermann 1988)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Makroelemente	KNO ₃	2500,00 mg/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250,00 mg/l
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	172,00 mg/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	150,00 mg/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00 mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25,60 mg/l
	Na ₂ -EDTA	34,30 mg/l
Mikroelemente	H ₃ BO ₃	3,00 mg/l
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3,00 mg/l
	MnSO ₄ x 5 H ₂ O	1,00 mg/l
	KI	0,75 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mg/l
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25 mg/l
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,25 mg/l
Hormone	Kinetin	0,20 mg/l
	IES	0,50 mg/l
	2,4-D	2,00 mg/l
	NAA	0,50 mg/l
Vitamine	Thiamin-HCl	10,00 mg/l
	Pyridoxin-HCl	1,00 mg/l
	Nicotinsäure	1,00 mg/l
Sonstiges	NZ-Amine	2000,00 mg/l
	myo-Inosit	100,00 mg/l
	Saccharose	20000,00 mg/l
<p>Nach dem Lösen den pH-Wert auf pH 5,5 einstellen und autoklavieren. Für Festmedium werden zusätzlich 0,9 % Agar eingewogen.</p>		

B5-Medium

(Gamborg et al. 1968)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Makroelemente	KNO ₃	2500,00 mg/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250,00 mg/l
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	172,00 mg/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	150,00 mg/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00 mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25,60 mg/l
	Na ₂ -EDTA	34,30 mg/l
Mikroelemente	H ₃ BO ₃	3,00 mg/l
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3,00 mg/l
	MnSO ₄ x 5 H ₂ O	1,00 mg/l
	KI	0,75 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mg/l
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25 mg/l
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,25 mg/l
Hormone	Kinetin	0,10 mg/l
	2,4-D	1,00 mg/l
Vitamine	Thiamin-HCl	10,00 mg/l
	Pyridoxin-HCl	1,00 mg/l
	Nicotinsäure	1,00 mg/l
Sonstiges	myo-Inosit	100,00 mg/l
	Saccharose	20000,00 mg/l
<p>Nach dem Lösen pH-Wert auf 5,8 einstellen, autoklavieren.</p> <p>Für Festmedium werden zusätzlich 0,9 % Agar eingewogen.</p>		

2.2.4 Puffer für die DNA-Extraktion

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
2x CTAB-Puffer	CTAB	2 %
	Tris-HCl pH 8	100 mM
	EDTA	20 mM
	NaCl	1,4 M
	PVP	1 %
10x CTAB	CTAB	10 %
	NaCl	0,7 M
CTAB-Präzipitationspuffer	CTAB	1 %
	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA	10 mM
High Salt TE Puffer	Tris-HCl pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	1 M
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM

2.2.5 Puffer für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
6x Ladepuffer	Bromphenolblau	0,03 %
	Xylencyanol	0,03 %
	Glycerol	60 %
	EDTA	60 mM

2.2.6 Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung und -konzentrationsbestimmung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Bindepuffer	KPi pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Waschpuffer 1	KPi pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Waschpuffer 2	KPi pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	50 mM
Elutionspuffer	KPi pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Zunächst wird der KPi-Puffer pH 8,0 hergestellt, nach Zugabe von NaCl und Imidazol wird der pH-Wert nicht erneut eingestellt.		
Bradford-Lösung (Bradford 1976)	Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg/l
	96 % Ethanol	50 ml/l
	85 % o-Phosphorsäure	100 ml/l
	Wasser	850 ml/l
	Die Lösung wird zweimal filtriert und im Kühlschrank gelagert.	

2.2.7 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Sammelgel	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl/Gel
	Aqua dest.	1,40 ml/Gel
	Rotiphorese® Gel 30	375 µl/Gel
	10 % SDS	100 µl/Gel
	TEMED	5 µl/Gel
	10 % APS	20 µl/Gel
Trenngel	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml/Gel
	Aqua dest.	1,45 ml/Gel
	Rotiphorese® Gel 30	2,05 ml/Gel
	10 % SDS	200 µl/Gel
	TEMED	8 µl/Gel
	10 % APS	35 µl/Gel
Ladepuffer (Laemmli-Puffer) (Laemmli 1970)	1 M Tris-HCl pH 6,8	2,4 ml/10 ml
	SDS	0,8 g/10 ml
	Glycerol	4 ml/10 ml
	Bromphenolblau	0,01 %
	Wasser	2,5 ml/10 ml
	β-Mercaptoethanol	1 ml/10 ml
Laufpuffer	SDS	0,1 %
	Glycin	192 mM
	Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	1,25 g/l
	Eisessig	100 ml/l
	Wasser	450 ml/l
	Methanol	450 ml/l
Entfärbelösung	Eisessig	100 ml/l
	Wasser	450 ml/l
	Methanol	450 ml/l

2.2.8 Puffer und Lösungen für den Westernblot

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Transferpuffer (Towbin et al. 1979)	Tris (pH nicht einstellen)	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
	optional SDS	0,1-0,01 %
TBS (Tris-buffered saline)	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	NaCl	0,9 %
TBS-T (Tris-buffered saline with Tween)	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	NaCl	0,9 %
	Tween 20	0,05 %
Blocking-Lösung	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	NaCl	0,9 %
	Tween 20	0,05 %
	Magermilchpulver	5 %
Substratpuffer	Tris HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
Färbelösung zur Immunodetektion	Tris HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	5-Brom-4-chlor-3- indoxylphosphat (BCIP)	80 µl/10 ml
	Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	60 µl/10 ml
	BCIP-Stammlösung 20 mg/ml in 100 % DMF	
	NBT-Stammlösung 50 mg/ml in 70 % DMF	
Amidoschwarz- Färbelösung	Amidoschwarz	0,1 %
	Methanol	400 ml/l
	Eisessig	100 ml/l
	Wasser	500 ml/l
Entfärbelösung	Eisessig	100 ml/l
	Wasser	450 ml/l
	Methanol	450 ml/l

2.3 Allgemeine Methoden

2.3.1 Herstellung steriler Kalluskulturen

Für weitergehende Untersuchungen von Pflanzen und deren Stoffwechsel ist es von Vorteil, Zellkulturen anzulegen, da diese jahreszeitenunabhängigen Zugang zu Pflanzenmaterial gewährleisten. Hierfür werden zunächst Kalluskulturen benötigt, welche dann in eine Suspensionskultur überführt werden können. Zur Erstellung der Kalluskulturen gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen das Anziehen von sterilen Keimlingen aus Samen, welche dann weiter verwendet werden können, zum anderen die Verwendung von Frischpflanzen.

Werden Samen verwendet, so müssen diese zunächst entfettet werden. Hierfür werden die Samen 5 Minuten mit reinem Ethanol gewaschen. Anschließend folgt die eigentliche Desinfektion in 10-prozentiger Dimanin C Lösung für 5 bis 30 Minuten. Daraufhin werden die Samen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und auf das Keimungsmedium in Petrischalen überführt. Verwendung findet hier sowohl CB2-, CBOH- (CB2-Medium ohne Hormone), aber auch B5-Festmedium. Die so vorbereiteten Platten werden unter geeigneten Licht- und Temperaturbedingungen bis zur Keimung inkubiert. Für die Keimung der Zichorie (*Cichorium intybus*) ist eine Temperatur von 20 °C bei natürlichen Lichtverhältnissen ausreichend (Kew - Seed Information Database). Die Samen der Traubensilberkerze (*Actaea racemosa*) hingegen benötigen eine Stratifikation. In Keimungsdatenbanken wird vorgeschlagen, die Samen zunächst für 3 Monate bei 20 °C und anschließend für 3 Monate bei 4 °C zu belassen, um eine Keimung zu induzieren (Germination Guide).

Die daraus entstehenden Keimlinge können daraufhin für die Kallusinduktion verwendet werden.

Zur Kallusinduktion mit Frischmaterial können alle Pflanzenteile verwendet werden. Dies verläuft äquivalent zu den Samen. Nach der Desinfektion werden Blätter mit einem sterilen Skalpell in etwa 0,5 x 0,5 cm große Teilstücke zerschnitten, Sprosse und Wurzel in etwa 0,5 cm lange Teilstücke und mit einer abgeflamten Pinzette auf ein Nährmedium (CB2 oder B5) überführt. Aus intakten teilungsfähigen Zellen entsteht daraufhin ein Kallus, welcher weiterkultiviert oder in eine Suspensionskultur überführt werden kann. Hierfür werden bis zu 5 g der Kalluszellen mit einer sterilen Pinzette oder einem Spatel in das entsprechende Flüssigmedium überführt.

2.3.2 Überimpfen von Zellkulturen

Die aus den Kalluskulturen gewonnenen Suspensionskulturen müssen wöchentlich überimpft, also in frisches Medium überführt werden, da sie während des Wachstums die im Medium enthaltenen Nährstoffe aufbrauchen.

Hierfür werden 5 g der Suspensionszellen mittels eines abgeflamnten perforierten Löffels in frisches steriles Medium (50 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben) überführt. Die Kulturen werden auf dem Rundschüttler bei 25 °C und 100 UpM inkubiert und alle 7 Tage weiter überimpft.

Kalluskulturen werden alle 3 Wochen auf festes Medium überimpft. Hierfür werden die Zellen mit einer abgeflamnten Pinzette auf das neue Medium überführt und bei 25 °C entweder im Licht- oder im Dunkelkulturraum gelagert.

Als Medien werden sowohl CB2 (Petersen und Alfermann 1988) als auch B5 verwendet (Gamborg et al. 1968), für festes Medium wird zusätzlich 0,9 % Agar hinzugefügt.

2.3.3 Elicitierung von Suspensionskulturen

Eine Elicitierung stellt eine Stimulation der Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen Krankheitsauslöser dar. Mit Hilfe eines Elicitors, welcher ein endogenes Signalmolekül oder eine exogene Substanz sein kann, werden diese Abwehrmechanismen, insbesondere die verstärkte Bildung von Naturstoffen, in einer Zellkultur induziert.

Für die Elicitierung wird zunächst eine Zellsuspensionskultur angelegt und vermehrt. Zu 50 ml einer 3 Tage alten Zellkultur wird 50 µl 100 mM Methyljasmonat (Endkonzentration 100 µM) als Elicitor gegeben. Da das Methyljasmonat in Ethanol gelöst wurde, werden Kontrollkolben mit 50 µl Ethanol versetzt, um den Einfluss des Lösungsmittels zu untersuchen. Beide zugesetzte Lösungen wurden zuvor steril filtriert.

Die erste Ernte der Zellen erfolgt sofort nach Zugabe, hierdurch wird der Grundgehalt der Zellen an den zu untersuchenden Substanzen bestimmt. Eine weitere Ernte der mit Methyljasmonat und Ethanol versetzten Zellen erfolgt nach 12, 24, 48 und 96 Stunden. Die Zellen werden durch Unterdruck abgesaugt, mit Stickstoff gefroren und für mindestens 24 h gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Zellen können für die Bestimmung des Gehalts an den zu untersuchenden Inhaltsstoffen verwendet werden (siehe hierzu Kapitel 2.4.8).

2.3.4 Zugabe von Substraten zu den Zellkulturen

Um die Bildung von Sekundärmetaboliten in Pflanzenzellkulturen zu steigern oder in Gang zu setzen, können Substrate zu gefüttert werden. Hierfür werden die Zellkulturen zunächst vermehrt. Haben diese ein ausreichendes Wachstum erreicht, werden diese erneut überimpft und anschließend die sterilen Substratlösungen zugegeben. Für die Untersuchung der Zichoriensäurebildung werden 100 μM D-, L-, oder *m*-Weinsäure zu den Suspensionskulturen des Basilikums gegeben. Da die Weinsäuren in Wasser gelöst vorliegen, wird eine unbehandelte Zellkultur als Kontrolle mitgeführt. Die so vorbereiteten Zellen werden sowohl im Licht- als auch im Dunkelkulturraum bei 25 °C und 110 μP M kultiviert. Nach 7 Tagen werden die Kulturen geerntet, mit Unterdruck abgesaugt, eingefroren und gefriergetrocknet. Die weitere Untersuchung verläuft wie in Kapitel 2.4.8 beschrieben.

2.3.5 Proteinstruktur-Modelling

Um die Proteinstruktur eines Proteins zu erhalten, sind aufwendige Kristallisationsversuche notwendig. Eine vorläufige Struktur des Proteins kann durch einen bioinformatischen Ansatz erstellt werden. Verwendet wurde Phyre2, eine freiverfügbare Software zur Proteinstrukturvorhersage. Phyre steht hierbei für: **P**rotein **H**omology/**A**nalog**Y** **R**ecognition **E**ngine. Auf Grundlage der Struktur homologer Proteine wird ein 3D-Modell der eingegeben Proteinsequenz erstellt (Kelley et al. 2015).

2.3.6 Phylogenetische Untersuchungen

Zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums werden zunächst entsprechende Vergleichssequenzen in einer Datenbank (The European Bioinformatics Institute) entnommen. Die verwendeten Sequenzen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Hydroxycinnamoyltransferase der BAHD-Familie, Volllänge der translatierten Proteinsequenz, vorzugsweise charakterisiertes Protein mit bekanntem Substrat. Die Erstellung des Stammbaumes erfolgte mit Hilfe der Software MEGA7 unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode nach einem Alignment der Sequenzen mit Clustal Omega (Kumar et al. 2016). Der Bootstraps-Test auf Phylogenie wurde mit 500 Wiederholungen durchgeführt (Felsenstein 1985).

2.4 Analytisch-chemische Methoden

2.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur qualitativen Bestimmung des Inhaltes von Pflanzenextrakten kann die Dünnschichtchromatographie genutzt werden. Die Dünnschichtchromatographie, DC, aber auch TLC von englisch thin layer chromatography, ist eine der ältesten chromatographischen Methoden. Für die Untersuchung von phenolischen Verbindungen werden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Platten verwendet, das Kieselgel hat eine Partikelgröße von 60 Å und enthält einen Fluoreszenzindikator der Wellenlänge 254 nm.

Die Inhaltstoffe der entsprechenden Pflanze werden zunächst nach dem entsprechenden Protokoll isoliert (Kapitel 2.4.8). Es werden je 30 µl der Proben aufgetragen, als Standard dienen Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Zichoriensäure in einer Konzentration von 20 mM, von welchen ebenfalls 30 µl aufgetragen werden.

Das Laufmittel besteht aus Ethylacetat, Chloroform und Ameisensäure im Verhältnis 5:4:1 bzw. Ethylacetat, Wasser und Ameisensäure im Verhältnis 8:1:1.

Nach der Entwicklung der Platten wird zunächst unter UV-Licht bei 254 nm detektiert. Substanzen mit Doppelbindungen führen bei dieser Wellenlänge zu einer Fluoreszenzlöschung des in der Platte enthaltenen Fluoreszenzindikators, was sie als dunklen Fleck sichtbar werden lässt. Unter UV-Licht bei 312 nm fluoreszieren Kaffeesäurederivate zumeist bläulich.

Weiterhin wird mittels Naturstoffreagenz A (0,6 % in Methanol) und PEG 400 (5 % in Methanol) detektiert. Nach Aufsprühen und Trocknen erscheinen die enthaltenen Verbindungen unter UV-Licht bei 312 nm unterschiedlich fluoreszierend. Auf Grund der Retentionsfaktoren der Standards und Proben kann eine Aussage über die enthaltenen Substanzen gemacht werden.

2.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Für die Untersuchung von phenolischen Verbindungen in Pflanzen und der Auswertung von Enzymtests kommt die Hochleistungsflüssigchromatographie, kurz HPLC, zum Einsatz.

Verwendet wurde eine Equisil ODS-Säule (250 × 4 mm) mit einer Partikelgröße von 5 µm und eine Vorsäule (20 × 4 mm). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Wellenlänge des UV-Detektors wurde dem Erwartungsbereich des Analyten angepasst. Als Laufmittel wurden verschiedene Methanol-Wasser-Gemische verwendet, welche angesäuert wurden, um eine vollständige Protonierung der Analyten zu gewährleisten. Am häufigsten wurde *o*-Phosphorsäure in einer Konzentration von 0,01 % eingesetzt. Für die Isolierung von Analyten wurde Essigsäure in einer Konzentration von 0,3 % verwendet.

2.4.3 Massenspektrometrie

Zur Verifizierung der Identität von Reaktions- und Isolierungsprodukten findet die Massenspektrometrie Verwendung. Hierfür wird die vorbereitete Probe zunächst über HPLC aufgetrennt, dies geschieht unter Verwendung einer Multospher 120 RP 18 Säule (250 x 2 mm, 5 µm) und eines Wasser-Acetonitril-Gradienten bei einer Flussrate von 0,25 ml und einer Temperatur von 20 °C. Der Gradient ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4
Wasser-Acetonitril-Gradienten der HPLC-MS-Analyse

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0.00	95.0	5.0
40.00	00.0	100.0
45.00	00.0	100.0
45.10	95.0	5.0
55.00	95.0	5.0

Die aufgetrennten Analyten werden mittels Elektronensprayionisation (ESI) ionisiert. Die Analyse der ionisierten Analyten erfolgt auf Grund des unterschiedlichen Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) im micrOTOF-Q Massenspektrometer von Bruker. Die Kalibrierung der Messung erfolgt mit Natriumformiat. Natriumformiat bildet im ESI Cluster, deren Masse bekannt ist. Diese Massen werden den entsprechenden Signalen zugeordnet. In Tabelle 5 sind die Massen der Clustersignale dargestellt.

Tabelle 5
Wichtige Signale des Natriumformiat-Clusters im ESI

	ESI positiv	ESI negativ
n	$\text{Na}(\text{NaHCOO})_n^+$	$\text{HCOO}(\text{NaHCOO})_n^-$
1	90,98	112,99
2	158,98	180,97
3	226,95	248,96
6	430,91	452,92
7	498,90	520,91

2.4.4 Herstellung von CoA-Estern

Für die Untersuchung von Hydroxycinnamoyltransferasen werden aktivierte Zimtsäurederivate, sogenannte CoA-Ester, benötigt. Coenzym A (CoA) dient hierbei zur Aktivierung der Säuren, damit diese enzymatisch umgesetzt werden können. Die chemische Synthese erfolgt aus den entsprechenden Succinimidestern (Stöckigt und Zenk 1975).

Je nach gewünschtem CoA-Ester werden 15 mmol der entsprechenden Säure (beispielsweise Kaffeesäure für Caffeoyle-CoA) und 15 mmol *N*-Hydroxysuccinimid in 100-250 ml Ethylacetat unter Erwärmen (60-70 °C) gelöst und anschließend auf 30 °C gekühlt. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wird auf 40 °C erhitzt bis es sich verflüssigt hat. 17 mmol hiervon zu der Säure-Succinimid-Lösung gegeben, wobei sich ein Niederschlag formt. Die so präparierte Lösung wird über Nacht zur weiteren Reaktion belassen. Am nächsten Tag wird diese Suspension filtriert und das Filterpapier mit 5 ml Ethylacetat gewaschen. Die Lösung wird dreimal mit 10-20 ml einer 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wird über Natriumsulfat getrocknet und gefiltert. Nach Vakuumkonzentrierung kann der so entstandene Succinimidester (im Falle der Kaffeesäure also Caffeoyle-Succinimidester) bei -18 °C gelagert werden. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 18 dargestellt.

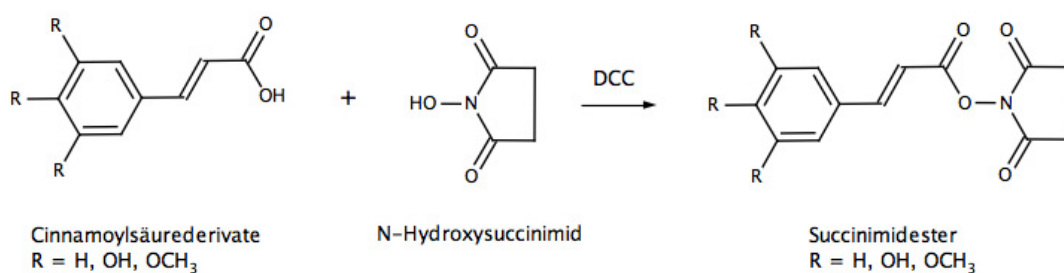


Abbildung 18
Synthese der Succinimidester

Der in den vorigen Reaktionsschritten entstandene Succinimidester kann für die weitere Synthese verwendet werden. Der grundlegende Reaktionsablauf dieser Synthese ist in Abbildung 19 dargestellt.

Zunächst werden 25,2 mg Natriumhydrogencarbonat in 6 ml Wasser gelöst und 15 min mit Stickstoff durchspült. Zu dieser Lösung werden 23 mg Coenzym A gegeben und für weitere 15 min mit Stickstoff durchspült. Das Durchspülen mit Stickstoff dient der Entfernung von Luftsauerstoff. Im nächsten Schritt werden 56 mg des Succinimidesters in 1 ml Aceton gelöst und langsam in die vorbereitete CoA-Lösung gegeben. Es bildet sich ein Niederschlag. Daraufhin wird Aceton hinzugefügt bis sich der Niederschlag gelöst hat. Diese Lösung wird verschlossen über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag wird das Aceton entweder durch Abblasen mit Stickstoff oder im Vakuumkonzentrator entfernt.

Es bildet sich ein Niederschlag. Diese Suspension wird zentrifugiert und der Überstand mittels Festphasenextraktion aufgereinigt (Beuerle und Pichersky 2002).

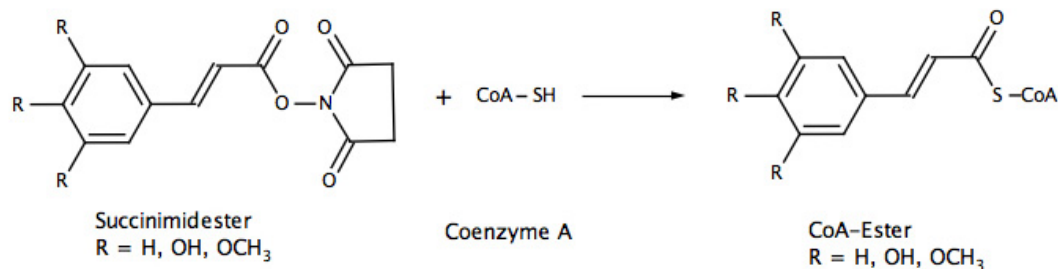


Abbildung 19:
Synthese der Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester aus Succinimidestern

Zur Aufreinigung der CoA-Ester wird eine Chromabond C18ec Säule verwendet. Diese wird mit 30 ml Methanol und 30 ml Wasser konditioniert, bevor mit 30 ml 4 % Ammoniumacetat in Wasser äquilibriert wird. Die CoA-Ester-haltige Lösung wird nach der Zentrifugation (10 min, 13000 g) mit 4 % Ammoniumacetat versetzt. Diese Lösung wird auf die Säule gegeben und mit 12 x 2 ml 4 % Ammoniumacetatlösung gewaschen. Darauf folgend wird mit 12 x 2 ml Wasser eluiert. Der Gehalt des CoA-Esters in den Elutionsfraktionen wird photometrisch bestimmt, die hierfür notwendigen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6
Wellenlänge und Extinktionskoeffizienten der synthetisierten Hydroxycinnamoyl-CoA Ester (Stöckigt und Zenk 1975; Zenk 1979)

Hydroxycinnamoyl-CoA Ester	Wellenlänge am Maximum [nm]	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\max} \times 10^6$ [cm ² /mol]
Cinnamoyl-CoA	311	22
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	333	21
Caffeoyl-CoA	346	18
Feruloyl-CoA	346	19
Isoferuloyl-CoA	351	18
3,4-Dimethoxycinnamoyl-CoA	346	24
Sinapoyl-CoA	349	18

Eine weitere Möglichkeit der Synthese von CoA-Estern ist die Reaktion über den Zwischenschritt der Anhydridbildung (Dawson 1986). Hierfür wird zunächst das Anhydrid der freien Säure hergestellt. 384 μmol der Säure (beispielsweise Kaffeesäure) werden bei 80 °C in 800 μl Essigsäure gelöst. Anschließend werden 384 μmol (37 μl) Essigsäureanhydrid zugegeben. Dies geschieht unter ständigem Rühren. Dieser erste Teil der Reaktion am Beispiel der Kaffeesäure ist in Abbildung 20 dargestellt.

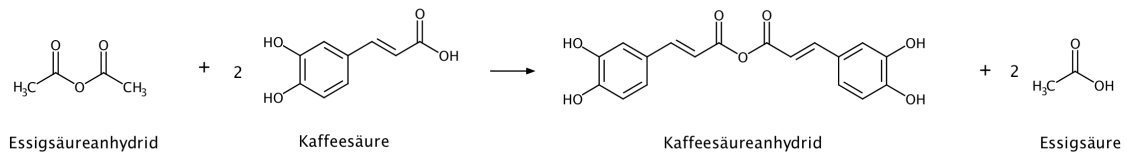


Abbildung 20
Synthese des Kaffeesäureanhydrids

Nach Erhöhung der Temperatur auf 120 °C und unter weiterem Rühren wird der Reaktionsansatz so lange inkubiert, bis die Essigsäure vollständig verdampft ist. Wichtig ist hierbei, dass der Siedepunkt des neugebildeten Anhydrids unter dem der Essigsäure liegt (118 °C). Das erhaltene Reaktionsprodukt liegt bei Raumtemperatur als Feststoff vor. Für die weitere Reaktion werden 73,1 μmol des Anhydrids in 1 ml Acetonitril gelöst, 60,9 μmol CoA werden in 2 ml 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst. Beide Lösungen werden in 7 ml destilliertem Wasser zusammengegeben und für den Ablauf der Reaktion für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Dieser Reaktionsschritt ist in Abbildung 21 dargestellt.

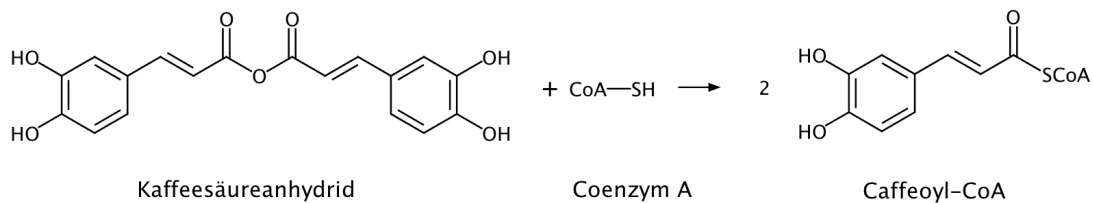


Abbildung 21
Synthese des Kaffeesäure-CoA-Esters (Caffeoyl-CoA) aus dem Kaffeesäureanhydrid

Der Erfolg der Reaktion wird mit Ellmanns Reagenz untersucht. Es werden 20 mg Ellmanns Reagenz (Dithionitrobenzoesäure, DTNB) und 30 mg Kaliumhydrogencarbonat in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. 10 μl dieser Lösung werden auf ein weißes Filterpapier pipettiert, darauf werden 10 μl des Reaktionsansatzes zur CoA-Ester-Synthese gegeben. Ist noch freies CoA enthalten, so färbt sich der Fleck auf dem Filterpapier leuchtend gelb. Dies beruht auf der Spaltung des DTNBs zu einem CoA-Ester und 2-Nitro-5-thiobenzoat, welches gelb erscheint.

Diese Reaktion ist in Abbildung 22 dargestellt und kann zum Nachweis verschiedener Thiole verwendet werden (Ellman 1958).

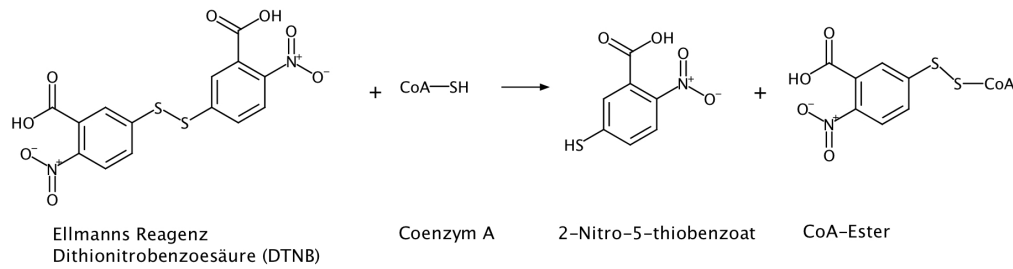


Abbildung 22
 Reaktion von Ellmans Reagenz mit CoA

Die Aufreinigung des gebildeten CoA-Esters erfolgt ebenfalls über eine Festphase. Zunächst wird der Reaktionsansatz mit 6 N HCl auf einen pH von 1,5-2 angesäuert und für 15 min mit Stickstoff durchspült. Eine Chromabond C18ec Säule wird mit 12 ml Methanol und anschließend 12 ml einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (1:1), versetzt mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), äquilibriert. Daraufhin wird die Probe auf die Säule gegeben, nach Einsickern der Probe wird die Säule mit 12 ml Wasser mit 0,1 % TFA gewaschen. Die Elution des CoA-Esters erfolgte mit 6 ml Acetonitril-Wasser (1:1) mit 0,1 % TFA. Die Elutionsfraktion wird im Rotationsvakuumverdampfer vom Lösungsmittel befreit und in Wasser rückgelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt über den Absorptionskoeffizienten, welcher aus Tabelle 6 entnommen werden kann.

2.4.5 Isolierung von Piscidinsäure

Zur Gewinnung von Piscidinsäure wurde ein wässriger Extrakt aus *Quillaja saponaria* MOLINA verwendet (Maier et al. 2015).

Der Extrakt wurde in Wasser gelöst und nach Ansäuern mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Piscidinsäure und andere phenolische Säuren gehen hierbei in die Ethylacetatphase über, die im Extrakt enthaltenen Saponine verbleiben in der Wasserphase. Nach Einengen der Ethylacetatphase im Rotationsverdampfer wird der Rückstand in Methanol zurückgelöst. Die Weiterbearbeitung geschah mittels HPLC.

Es wird ein Wasser-Methanol-Gradient von 10 % auf 50 %, angesäuert mit 0,3 % Essigsäure, verwendet. Der Gradient ist in Tabelle 7 dargestellt.

Die Piscidinsäure wurde isoliert, eingengt und die Konzentration photometrisch bestimmt, sowie die Masse durch LC-MS verifiziert. Der verwendete Extinktionskoeffizient beträgt bei einer Wellenlänge von 277 nm in Methanol $14,79 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ($\log \epsilon$ 3,17) (Yannai 2012)

Tabelle 7

Wasser-Methanol-Gradient der Isolierung der Piscidinsäure

Zeit [min]	Wasser [%]	Methanol [%]
0.00	90.0	10.0
10.00	90.0	10.0
11.00	50.0	50.0
20.00	50.0	50.0
30.00	90.0	10.0

2.4.6 Isolierung von Fukinsäure

Zur Gewinnung der Fukinsäure wird zunächst Fukinolsäure isoliert. Hierfür werden Blätter von *Petasites japonicus* (Siebold & Zucc.) Maxim. in flüssigen Stickstoff eingefroren, gemörsert und in ein Becherglas überführt. 2,75 g der so zerkleinerten Blattteile werden mit 50 ml kochendem Wasser übergossen, in ein aufgeheiztes Ultraschallbad (80 °C) verbracht und 15 min mit Ultraschall behandelt. Der so erhaltene Extrakt wird filtriert und das Filtrat nach Ansäuern mit 6 N HCl bis zu pH 1 dreimalig mit der gleichen Menge Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wird eingengt und der Rückstand mit 2 ml Methanol zurückgelöst. Mittels HPLC wird Fukinolsäure isoliert, hierbei wird ein Wasser-Methanol-Gradient von 30 % auf 50 % mit 0,3 % Essigsäure verwendet, dieser ist in Tabelle 8 dargestellt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 332 nm. Die erfolgreiche Isolierung der Fukinolsäure wurde mittels LC-MS verifiziert (siehe Kapitel 2.4.3).

Tabelle 8

Wasser-Methanol-Gradient der Isolierung der Fukinolsäure

Zeit [min]	Wasser [%]	Methanol [%]
0.00	70.0	30.0
20.00	50.0	50.0
25.00	50.0	50.0
30.00	70.0	30.0

Die Fukinolsäure muss anschließend hydrolysiert werden, wodurch Fukinsäure und Kaffeesäure entstehen. Diese Hydrolyse kann einerseits mit 2 N KOH geschehen (Sakamura et al. 1973). Hierfür wurden 200 µl der methanolischen Fukinolsäurelösung eingedampft und mit 200 µl der Kaliumhydroxidlösung zurückgelöst. Die Lösung wird für 15 min mit Stickstoff durchspült, verschlossen und zur weiteren Reaktion bei Raumtemperatur über Nacht gelagert. Daraufhin wird die Lösung mit 200 µl 2 N Salzsäure neutralisiert und die Lösung in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Nach Zugabe von 1 ml Aceton wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dies dient der Abtrennung von KCl. Nach Abdampfen des Acetons wird mit 200 µl Methanol zurückgelöst. Der Erfolg der Hydrolyse wurde mittels LC-MS untersucht.

Andererseits kann die Hydrolyse enzymatisch mit Hilfe des Enzymgemischs Rhozyme HP-150 erfolgen. 1 ml der Fukinolsäurelösung wird eingedampft und mit 10 ml eines Puffers aus 0,1 M Ammoniumacetat pH 7 und 1 mM Ascorbat zurückgelöst. Anschließend werden 200 mg Rhozyme HP-150 hinzugegeben, mit Stickstoff begast und verschlossen. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 30 °C wird die Reaktion mit 1 ml 6 N HCl abgestoppt. Nach Zugabe von 3 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung wird viermal mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt (Petersen und Alfermann 1988). Nach Eindampfen des Ethylacetats wird der Rückstand mit 1 ml Methanol aufgenommen. Zur Überprüfung der abgelaufenen Reaktion wurde die Massenspektrometrie verwendet. Eine weitere Auftrennung der Fukin- und Kaffeesäure kann mittels HPLC geschehen.

2.4.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Lösungen kann photometrisch erfolgen. Grundlage hierfür ist das Lambert-Beer'sche-Gesetz. Die Absorption einer Substanz ist abhängig von deren Konzentration, der Dicke der Messschicht und dem sogenannten Absorptionskoeffizienten.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} = Absorption (bei einer bestimmten Wellenlänge)

ε_{λ} = Extinktionskoeffizient (bei einer bestimmten Wellenlänge)

c = Konzentration [mM]

d = Schichtdicke [cm]

Bei bekannten Extinktionskoeffizienten lässt sich aus der gemessenen Absorption die Konzentration bestimmen.

Hierfür wird ein Spektrum der zu untersuchenden Lösung aufgenommen. Als Referenz dient das verwendete Lösungsmittel, welches meist durch den Extinktionskoeffizienten vorgegeben wird. Die Messung erfolgt in einer Quarzküvette, die Schichtdicke beträgt hierbei 1 cm. Aus dem Spektrum wird die Absorption an der angegebenen Wellenlänge entnommen. Über die Absorption wird dann die entsprechende Konzentration berechnet. Etwaige Verdünnungen werden dabei berücksichtigt.

2.4.8 Isolierung von phenolischen Inhaltsstoffen

Zur Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe ist es zunächst nötig das pflanzliche Material zu trocknen. Dies geschieht durch Gefriertrocknung, um ein Freisetzen von Phenoloxidasen zu verhindern, welche die phenolischen Verbindungen zerstören könnten.

Das gefriergetrocknete Material wird gemörsert und in ein Reaktionsgefäß überführt. 20 mg Pflanzenmaterial werden mit 2 ml 70 % Ethanol suspendiert und für 10 min im Ultraschallbad, erwärmt auf 80 °C, extrahiert. Dieser Vorgang wird nach nochmaligem Aufwirbeln wiederholt. Zum Sedimentieren der Pflanzenteile werden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 16000 g zentrifugiert und die Überstände anschließend bei -20 °C gelagert.

2.4.9 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Sind Referenzstandards für Verbindungen vorhanden, so kann der Gehalt in einer Probe auch unter Verwendung der HPLC bestimmt und berechnet werden. Hierfür werden 20 µl des 25 µM Standards auf die HPLC gegeben. Aus der Peakfläche des Standards und der Peakfläche der Probe kann dann der Gehalt in der Probe bestimmt werden. Da Einwaage und Verdünnungsfaktoren bekannt sind, kann ebenfalls Rückschluss auf die Gesamtmenge im Trockengewicht der extrahierten Probe gezogen werden.

2.4.10 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Phenolische Verbindungen kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Die Bestimmung des Gesamtphenolgehalts in Extrakten aus Pflanzen oder Pflanzenteilen geschieht photometrisch mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz nach Jennings (Jennings 1981).

Die Pflanzenteile werden extrahiert (siehe 2.4.8) und 25 µl dieses Extraktes mit 475 µl Wasser verdünnt. Als Referenz werden 25 µl des Lösungsmittels verwendet. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden wird Kaffeesäure in verschiedenen Mengen (0,250; 0,375; 0,500; 0,750; 1 mg/ml, im entsprechenden Lösungsmittel) verwendet; auch hiervon werden 25 µl eingesetzt, dies entspricht 6,25; 9,37; 12,5; 13,75; 25 µg Kaffeesäure. Dazu werden 250 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 2,5 ml einer Lösung aus 0,1 N Natriumhydroxid mit 2 % Natriumcarbonat in Wasser zugegeben, gemischt und weitere 15 min inkubiert. Die Messung erfolgt photometrisch bei 760 nm. Berechnet wird der Gesamtphenolgehalt in µg Kaffeesäure anhand der erstellten Kalibriergeraden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Extraktion

Zur Untersuchung von Genen und deren Expression in Pflanzen stellt die Extraktion von RNA eine wichtige Methode dar. RNA entsteht durch Transkription der DNA. Im Gegensatz zur DNA enthält prozessierte RNA keine Introns und dient in Form der mRNA als Matrix zur Translation der genetischen Information zum fertigen Protein.

Für die RNA-Extraktion ist es wichtig, dass alle Materialien frei von RNasen sind. RNasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, welche RNA abbauen.

Zur RNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Plant von Qiagen verwendet. Hierfür werden 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 450 µl des RLT Puffers mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzt und sofort gemischt. Dies dient dem Aufschluss der Zellen und der Inhibition von zelleigenen RNasen. Die Suspension wird auf die QIAshredder Säule überführt, auf ein Reaktionsgefäß gesetzt und 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird in ein neues Gefäß überführt und mit einem halben Volumen reinem Ethanol versetzt, sanft gemischt und auf die RNeasy Säule pipettiert. Die Säule wird in ein Reaktionsgefäß gesteckt und für 15 s bei mindestens 8000 g zentrifugiert, hierbei bindet die RNA an das Säulenmaterial. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend werden 750 µl des Puffers RW1 zum Waschen auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift mit 500 µl Puffer RPE und anschließender Zentrifugation folgt. Dieser Schritt wird wiederholt. Im Anschluss wird die Säule für 1 min bei 8000 g zentrifugiert, um Rückstände der Waschpuffer zu entfernen. Zur Elution werden 30 µl Wasser auf die Säulenmitte gegeben, kurz inkubiert und folgend für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt. Um die Integrität der RNA zu untersuchen, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.5.2 DNase-Verdau

Für die quantitative Untersuchung von RNA muss diese vorher von eventuell mit extrahierter DNA befreit werden. Dies geschieht durch einen DNase-Verdau. DNase baut selektiv DNA ab, RNA hingegen bleibt unberührt.

1 µg RNA wird mit 1 µl (1 U/µl) RNasefreier DNase versetzt. Es werden 1 µl des dazugehörigen Puffers und Wasser ad 10 µl dazugegeben. Diese Mischung wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird nach Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA-Lösung für 10 min auf 65 °C erwärmt. Die DNA-freie RNA kann für weitere Schritte verwendet und bei -20 °C gelagert werden.

2.5.3 cDNA-Synthese

Da eine PCR mit RNA nicht möglich ist, wird diese für weitere Arbeiten in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies geschieht mit einer Reversen Transkriptase, welche in der Lage ist, RNA in DNA umzuschreiben. Verwendung findet das Quanta qScript SuperMix Kit. Bis zu 1 µg RNA werden in ein Reaktionsgefäß überführt, hinzu kommen 4 µl des qScript cDNA SuperMix (5X), welcher Nukleotide, Puffer und Reverse Transkriptase enthält. Diese Mischung wird mit Wasser zu 20 µl aufgefüllt und 5 min bei 25 °C inkubiert. Daraufhin wird 30 min bei 42 °C inkubiert, in dieser Zeit wird die RNA zu cDNA transkribiert. Durch fünfminütige Inkubation bei 85 °C wird die Reverse Transkriptase inaktiviert. Anschließend kann die cDNA bei -20 °C gelagert werden.

2.5.4 DNA-Extraktion

Neben RNA spielt auch genomische DNA eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von Genen. Im Gegensatz zur RNA ist die DNA stabil gegenüber RNasen.

Verwendet wurde die Methode der CTAB-Fällung. CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) ist ein Tensid und bildet mit Nukleinsäuren wasserlösliche Komplexe, welche jedoch im alkoholischen Milieu unlöslich sind.

Zunächst wird das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff gemörsert und je 200 mg in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem werden 300 µl des auf 65 °C erwärmten 2x CTAB-Puffers gegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Durch mehrfaches Durchmischen wird eine komplette Lyse der Zelle angestrebt. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und ausreichender Durchmischung wird der Ansatz 5 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand, in welchem sich die DNA befindet, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand werden 30 µl 10x CTAB-Puffer (65 °C) gegeben. Weiterhin werden nochmals 300 µl Chloroform zugegeben und gemischt. Diese Mischung wird 5 min bei 13000 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden Reaktionsgefäße mit 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer vorbereitet. In diese Reaktionsgefäße wird der Überstand der Zentrifugation gegeben und gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 g befindet sich die DNA als Pellet an der Gefäßwand. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 200 µl High Salt TE resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol wird gemischt und für 15 min bei -20 °C im Tiefkühlschrank inkubiert, dies dient der Fällung der DNA. Anschließend wird für 15 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit 25 µl TE-Puffer aufgenommen (Rogers und Bendich 1985). Eine Bestimmung der DNA-Menge erfolgt photometrisch.

2.5.5 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine häufig angewandte Methode zur Vervielfältigung von DNA. Diese 1983 von Kary Mullis entwickelte Methode vermehrt vorhandene DNA in mehreren Zyklen mit Hilfe der DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches in jeder Zelle vorkommt und zur Replikation der DNA dient (Saiki et al. 1988).

Die PCR findet in einem sogenannten Thermocycler statt. Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen auf 94 °C denaturiert und so die Einzelstränge voneinander getrennt. Im zweiten Schritt, dem sogenannten primer annealing, lagern sich die Primer an die entsprechenden Stellen der DNA an. Ein Primer ist ein Oligonukleotid mit komplementärer Basenabfolge zur DNA, welches der Polymerase als Startpunkt der Replikation dient. Die Anlagerung des Oligonukleotids an die DNA geschieht mittels eines Temperaturgradienten, welcher abhängig von der jeweiligen Schmelztemperatur des Primers ist. Im dritten Schritt, der sogenannten Elongation, lagert sich die Polymerase an die DNA an und beginnt mit der Synthese des komplementären Stranges, so dass aus den beiden Einzelsträngen zwei Doppelstränge entstehen. Da die meisten Polymerasen wärmeinstabil sind, wird eine hitzestabile Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder andere hitzetolerante DNA-Polymerasen verwendet.

Gearbeitet wird mit einem 25 µl PCR-Ansatz, dieser enthält:

0,5-5,0 µl DNA
 5,0 µl GoTaq-Puffer
 0,5 µl dNTP (10 mM)
 3,0 µl 25 mM MgCl₂
 0,5 µl Primer 1 (10 oder 100 µM)
 0,5 µl Primer 2 (10 oder 100 µM)
 0,1 µl GoTaq-Polymerase
 ad 25 µl destilliertes Wasser

Folgende Zyklen werden für die Amplifikation verwendet:

1. Zyklus	94 °C 120 s	Temperaturgradient 60 s	70 °C 90 s
2.-39. Zyklus	94 °C 30 s	Temperaturgradient 60 s	70 °C 90 s
40. Zyklus	94 °C 60 s	Temperaturgradient 60 s	70 °C 10 min

2.5.6 Semiquantitative PCR

Die Untersuchung der Expression eines Gens in einer Pflanze oder in einzelnen Pflanzenteilen kann mittels PCR geschehen. Aus den Pflanzen wird zunächst RNA, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, extrahiert. Nach einem DNA-Verdau wird die Konzentration der RNA bestimmt und 0,5 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet (Kapitel 2.5.3). Für die anschließende PCR wurden 2 µl dieser cDNA verwendet. Für die semiquantitative PCR wurden spezielle kürzere Primer des Zielgens designt, sowie Primer für ein sogenanntes Haushaltsgen. Haushaltsgene, z.B. das Actin-Gen, werden unabhängig vom Zelltyp exprimiert und dienen der Kontrolle der PCR. Da eine gleiche Menge RNA für jede Probe eingesetzt wurde, sollte auch die Menge an PCR-Produkt für Actin in den Proben gleich sein.

Der Ansatz sah wie folgt aus:

2 µl cDNA
5,0 µl GoTaq-Puffer
0,5 µl dNTP (10 mM)
3,0 µl 25 mM MgCl₂
0,5 µl Primer ArHCT-f (10 µM)
0,5 µl Primer ArHCT-r (10 µM)
0,5 µl Primer Actin-f (10 µM)
0,5 µl Primer Actin-r (10 µM)
0,1 µl GoTaq-Polymerase
ad 25 µl destilliertes Wasser

Folgende Zyklen werden für die Amplifikation verwendet:

1. Zyklus	94 °C 120 s	58,4 °C 60 s	70 °C 90 s
2.-34. Zyklus	94 °C 30 s	58,4 °C 60 s	70 °C 90 s
35. Zyklus	94 °C 60 s	58,4 °C 60 s	70 °C 10 min

Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, bei welcher der gesamte Probenansatz auf das Gel gegeben wurde.

2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode der Molekularbiologie. Sie beruht einerseits auf der Ionenbewegung im elektrischen Feld, andererseits auf einer Größentrennung. Agarose ist ein natürliches Polysaccharid, welches aus Rotalgen gewonnen wird. Gele mit einem Agarosegehalt von 0,5-2 % dienen zur Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen. Die verwendete Agarosekonzentration ist abhängig von der Größe der zu trennenden Moleküle. Je höher die Agarosekonzentration, desto stärker werden die Moleküle zurückgehalten. Folglich werden kleinere Moleküle in höher konzentrierten Gelen aufgetrennt, große Moleküle jedoch in schwächer konzentrierten Gelen.

Für die Gelelektrophorese wird zunächst die Agarose im Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) durch Erwärmen gelöst. Das noch flüssige Gel wird in einen Elektrophoreseschlitten gegossen und für die spätere Detektion der Nukleinsäuren mit 1 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, welcher an Nukleinsäuren bindet, wodurch diese im UV-Licht sichtbar werden. Dem Gelschlitten wird ein passender Elektrophoresekamm hinzugefügt und bis zum Erhärten des Gels ruhen gelassen. Zum Beladen des Gels wird der Gelschlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Gel sollte mit Puffer bedeckt sein. Der Kamm wird herausgezogen und die dadurch entstandenen Taschen können beladen werden. Bevor die Proben auf das Gel gegeben werden, werden sie mit Ladepuffer (6x Loading Dye) versetzt. Dieser besteht aus zwei Farbstoffen, welche den Elektrophoresefortschritt anzeigen sowie Glycerol, welches die Proben beschwert. Als Größenmarker wird der Gene Ruler DNA Ladder Mix verwendet. Ist das Gel beladen, wird die Kammer verschlossen und Gleichstrom abhängig von der Kammergröße angelegt. Durch diesen Gleichstrom wandern die geladenen Teilchen im elektrischen Feld durch das Gel und werden auf Grund ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung des Gels geschieht im Geldokumentationssystem. Hierbei wird durch LED-Licht im Wellenlängenbereich von 480-530 nm detektiert.

2.5.8 Gelextraktion

Um die durch PCR vervielfältigte DNA weiter verwenden zu können, müssen die Banden aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt werden. Hierfür wird das NucleoSpin PCR Clean-up Kit verwendet. Die entsprechenden Banden werden aus dem Gel geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und in 200 µl NT Puffer je 100 mg Gel durch Erwärmen (50 °C) gelöst. Diese Lösung wird auf die Silicamembran der mitgelieferten Säulchen pipettiert. Durch Zentrifugation wird die Flüssigkeit abgeschieden, die DNA bindet jedoch an der Membran. Nach einem Waschgang mit 700 µl NT3 Puffer wird die DNA mittels 20 µl NE Extraktionspuffer oder Wasser von der Membran gewaschen. Die so gewonnene DNA kann weiter zur Ligation verwendet werden.

2.5.9 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen ist eine wichtige Methode in der Molekularbiologie. Kompetenz kennzeichnet hierbei die Fähigkeit der Bakterien, DNA beispielsweise in Form von Plasmiden aufzunehmen. Diese Kompetenz kann auf verschiedene Weisen erzeugt werden. Die verwendeten *E. coli* Bakterien werden durch die Behandlung mit Calciumchlorid chemokompetent.

Aus einer Glycerol-Dauerkultur der benötigten Bakterien wird eine 2 ml Kultur aus LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum hergestellt. Diese wird über Nacht bei 37 °C und 220 UpM inkubiert. Diese Kultur wird dann in 100 ml LB-Medium überführt und weiter inkubiert bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4-0,5 erreicht ist.

Um die Zellen vom Medium abzutrennen, wird die Suspension in sterile Röhrchen überführt und 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird mit 10 ml einer kalten 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach Vereinigung der Suspensionen der Röhrchen wird nochmals bei 4 °C, 2500 g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet nochmals in 10 ml der 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis wird die Suspension abermals für 12 min bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in 2 ml 100 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % Glycerol aufgenommen. Diese Suspension wird zu 150 μ l in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.5.10 Ligation

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung von DNA, im Besonderen das Einfügen von DNA in ein Plasmid. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird durch eine Ligase in das linearisierte Plasmid eingefügt. Das ligierte Plasmid kann daraufhin für eine Transformation verwendet werden.

Im Falle der Verwendung des Qiagen PCR-Cloning Kits werden bis zu 4 μ l des aufgereinigten PCR-Produktes mit 1 μ l Vector (pDrive) und 5 μ l des Mastermixes, welcher neben einem Puffer auch die Ligase enthält, zusammen pipettiert. Der gesamte Mix wird für mindestens 2 Stunden und bis zu 16 Stunden im Kühlschrank inkubiert und anschließend zum Inaktivieren der Ligase für 10 Minuten auf 70 °C erwärmt.

Für die Ligation in den pET15b Vektor wird zunächst die Konzentration des aufgereinigten Produktes und des geschnittenen Vektors bestimmt. Die eingesetzte Menge an Insert errechnet sich bei bekannter Menge an Vektor nach folgender Gleichung:

$$\text{Masse}_{\text{Insert [ng]}} = 3 \times \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor [ng]}} \times \text{Länge}_{\text{Insert [bp]}}}{\text{Länge}_{\text{Fragment [bp]}}$$

Bei der Berechnung wird berücksichtigt, dass das Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 betragen sollte (Mülhardt 2013). Hinzu kommen 1 μ l T4-Ligase und 2 μ l des 10x T4-Puffers. Nach Zugabe von Wasser auf 20 μ l wird der Ligationsansatz für mindestens 2 Stunden im Kühlschrank inkubiert und anschließend die Ligation durch Erwärmen auf 70 °C gestoppt.

2.5.11 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einführen fremder DNA, zumeist Plasmide, in kompetente Bakterien- und Hefezellen. Eine häufig verwendete Methode ist hierbei die Hitzeschock-Transformation chemokompetenter Bakterien.

Zu dem Ligationsansatz (Kapitel 2.5.10) werden 70 µl der kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s und weitere 2 min auf Eis. Durch diesen Hitzeschock werden die bakteriellen Zellmembranen durchlässiger, so dass das Plasmid in die Bakterienzelle eindringen kann.

Nach Zugabe von 140 µl SOC-Medium wird 45 min bei 37 °C inkubiert und darauffolgend die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert.

Die Agarplatten enthalten ein Antibiotikum, entsprechend dem Resistenzgen auf dem Plasmid, im Falle des pDrive Vektors 100 µg/ml Ampicillin sowie - für die Blau-Weiß-Selektion - 80 µg/ml X-Gal und 50 µM IPTG. Die so präparierten Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Bei Verwendung des pDrive-Vektors kommt die sogenannte Blau-Weiß-Selektion zum Einsatz. Der Vektor enthält neben einer Ampicillinresistenz auch ein Gen für eine β-Galactosidase. Dieses sogenannte lacZ-Gen befindet sich an der Stelle der Insertion des zu ligierenden DNA-Stückes. Wird ein Insert in das Plasmid eingebaut, so kann das Gen nicht abgelesen werden, es ist folglich inaktiv, die Zellen erscheinen weiß, da der X-Gal nicht gespalten werden kann und so kein Farbstoff entsteht. Ist das lacZ-Gen geschlossen, also keine DNA eingebaut, so kann die β-Galactosidase exprimiert werden. Die β-Galactosidase spaltet Galactose von dem in der Agarplatte enthaltenen X-Gal, es entsteht ein blauer Farbstoff, die Zellen erscheinen blau. Diese Reaktion ist in Abbildung 23 dargestellt. Das enthaltene IPTG dient als Induktor des lac-Promotors. Das dem Medium zugegebene Ampicillin dient der Selektion zwischen Zellen mit und ohne Plasmid.

Die Selektion der mit pET15b-Vektor transformierten Bakterien geschieht lediglich über die Antibiotikaresistenz für Ampicillin.

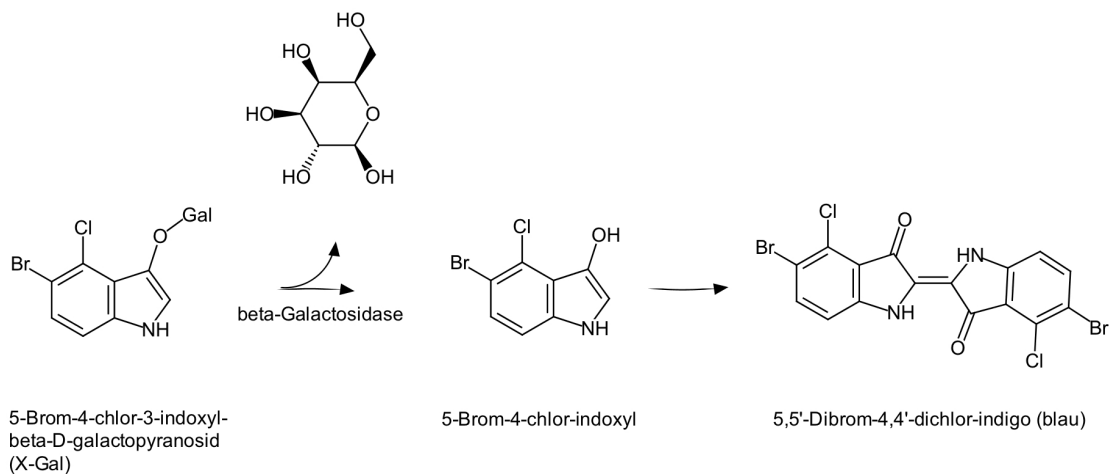


Abbildung 23

Reaktion von X-Gal zum blauen Farbstoff nach Abspaltung von Galactose durch die β -Galactosidase.

2.5.12 Übernachtskulturen

Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C werden im Falle des pDrive Vektors die weißen Kolonien, also jene mit positivem Plasmid, von der Platte isoliert. Im Falle des pET15b Vektors werden gewachsene Kolonien gewählt. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers werden Zellen aus der gewählten Kolonie gepickt und in 4 ml LB-Medium, welches mit 20 μ l Ampicillin (20 mg/ml) versetzt ist, überführt. Die Bakterienkulturen werden über Nacht bei 37 °C und 220 UpM inkubiert. Die so erhaltenen Bakterien können nun für die Plasmidisolierung oder als Vorkultur zur Proteinexpression genutzt werden.

2.5.13 Anlegen einer Glycerol-Dauerkultur

Da Bakterien keine unendliche Lebensdauer besitzen und mit der Zeit ein aufgenommenes Plasmid auch abstoßen können, werden von den transformierten Zellen Glycerol-Dauerkulturen angelegt. Glycerol dient als Gefrierschutz, wenn die Bakterien bei -80 °C gelagert werden. Hierfür werden zunächst 75 μ l steriles Glycerol in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 425 μ l der Bakteriensuspension hinzugegeben. Diese zwei Phasen werden vorsichtig gemischt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und daraufhin bei -80 °C gelagert.

2.5.14 Plasmidisolaton

Für die Plasmidisolaton wird das Qiagen Miniprep Kit verwendet. 2x1,5 ml der Bakteriensuspension (Kapitel 2.5.12) werden zum Abtrennen des Mediums 3 min bei 5000 g zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird durch Zugabe von 250 µl Puffer 1 resuspendiert und durch die Zugabe von 250 µl Puffer 2 lysiert. Zum Ausfällen enthaltener Eiweiße und anderer Zellbestandteile werden 350 µl Puffer N3 zugegeben und für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wird auf die Qiaprep Spinsäule dekantiert und zentrifugiert (1 min, 16000 g). Nach Zugabe von 500 µl PB-Puffer, Zentrifugation, Zugabe von 750 µl PE-Puffer und einer weiteren Zentrifugation wird das gereinigte Plasmid mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Das so erhaltene Plasmid kann folgend für einen Verdau oder Sequenzierung genutzt werden.

2.5.15 Restriktionsverdau

Das Schneiden eines Plasmids mit Restriktionsendonukleasen dient dem Überprüfen der Größe des Inserts, da die Tatsache, dass das Plasmid ein Insert enthält nichts über die Größe und die Sequenz des Inserts aussagt. Durch den Verdau kann an definierten Stellen mit speziellen Restriktionsendonukleasen das Plasmid geschnitten werden. Durch eine Gelelektrophorese werden das geschnittene Plasmid und das Insert sichtbar.

Das verwendete Plasmid enthält mehrere Schnittstellen, welche in der Vektorkarte ersichtlich sind.

Für den Verdau werden 4 µl des Plasmids mit 1 µl des passenden Restriktionsenzym und 5 µl des zugehörigen Puffers versetzt und für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wird durch ein Agarosegel kontrolliert.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Enzymrohextrakten aus Pflanzen

Zur Testung der Enzymaktivität in einer Pflanzenzellkultur oder in Pflanzenteilen wird zunächst ein Enzymrohextrakt hergestellt. Hierfür werden 5 g Zellen eingewogen und mit 1 g Polyclar 10, welches vorhandene Phenole bindet, versetzt. Weiterhin werden mindestens 5 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA hinzugegeben. Um den proteolytischen Abbau der Enzyme zu verhindern, geschieht die weitere Bearbeitung des Rohextraktes auf Eis. Zum Homogenisieren werden die Zellen je dreimal für 30 s mit dem Ultra-Turrax zerkleinert und in den Zwischenzeiten je 30 s auf Eis gestellt, größere Pflanzen können auch gemörsert werden. Hierfür werden die Pflanzenteile mit flüssigem Stickstoff eingefroren, kalt gemörsert und abgewogen. Auch den gemörserten Zellen werden Polyclar 10, DTT, DIECA und Puffer zugegeben und gemischt. Daraufhin wird das Gemisch unter Kühlung für 20 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Der so gewonnene Enzymrohextrakt wird aliquotiert und auf Eis gelagert.

Um Beisubstanzen und auch Chlorophyll vom Rohextrakt abzutrennen wird der Rohextrakt über eine PD-10 Säule aufgereinigt (Kapitel 2.6.4).

2.6.2 Proteinexpression

Um ein bereits in ein Plasmid ligiertes Gen zu exprimieren, wird zunächst aus der Glycerol-Dauerkultur eine Übernachtskultur vorbereitet. Für die Expression der HCT aus *Actaea racemosa* wurde das Gen in den Expressionsvektor pET15b ligiert und SoluBL21 Zellen damit transformiert. Da diese hierdurch eine Ampicillinresistenz besitzen, werden 2 ml LB-Medium mit 10 µl Ampicillin (20 mg/ml) versetzt und die Glycerol-Dauerkultur kurz mit einem sterilen Zahnstocher angeritzt. Der Zahnstocher wird in das Medium gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 UpM wird die 2 ml Zellsuspension in einen Kolben mit 100 ml LB-Medium und 500 µl Ampicillin (20 mg/ml) überführt. Es werden 750 µl des antibiotikahaltigen Mediums für den Nullwert entnommen, sowie weitere 750 µl nach Zugabe der Bakterien, um die Ausgangs-OD₆₀₀ (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm) zu bestimmen. Die Kultur wird bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 auf dem Schüttler bei 37 °C und 220 UpM belassen. Nach Erreichen des OD-Wertes wird die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und mindestens 5 h, besser über Nacht, auf dem Schüttler bei 220 UpM belassen.

Die Zellsuspension wird auf 50 ml Röhrchen aufgeteilt und 5 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 4 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M KPi, pH 7) je 1 g Zellen resuspendiert. Um den Aufschluss der Zellen zu verbessern, werden die Zellen für 2 h bei mindestens -24 °C eingefroren und auf Eis langsam aufgetaut. Zu der Suspension wird eine Spatelspitze Lysozym gegeben und für 15-30 min inkubiert.

Anschließend werden die Zellen mit einem Ultraschallstab für 1 min bei 100 % 0,3 Zyklen auf Eis aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zellfragmente wird für 10 min und 4 °C bei 6000 g zentrifugiert.

Der Überstand enthält das Protein und wird weiter bearbeitet. Ein Teil des unlöslichen Niederschlages wird für die spätere SDS-PAGE entnommen. Der proteinhaltige Überstand wird mittels Nickel-NTA-Säule (siehe Kapitel 2.6.3) aufgereinigt.

2.6.2.1 Variation der Inkubationstemperatur

Da die Expressionstemperatur einen starken Einfluss auf die Proteinmenge hat, wird neben 37 °C als Inkubationstemperatur auch 25 °C getestet. Die Vorinkubation der Zellen bis zum Erreichen der entsprechenden optischen Dichte geschieht bei 37 °C um ein gleichmäßiges Zellwachstum in beiden Testreihen zu gewährleisten.

2.6.2.2 Variation der IPTG Konzentration zur Induktion

Neben 1 mM IPTG werden ebenfalls 5 mM, wie auch 0,1 und 0,5 mM IPTG zur Induktion der Expression getestet. Alle übrigen Schritte bleiben hierbei gleich.

2.6.2.3 Variation der Kolbenform

Standardmäßig wird für die Expression der Proteine ein 250 ml Erlenmeyerkolben mit Zellulosestopfen verwendet. Um den Einfluss einer besseren Belüftung auf die Proteinkonzentration zu untersuchen, wird ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Die Schikanen führen zu einer stärkeren Aufwirbelung der Bakteriensuspension und zu einer besseren Belüftung.

2.6.2.4 Variation des Expressionsmediums

Neben LB-Medium wird auch TB-Medium verwendet. Alle weiteren Schritte verändern sich hierbei nicht. Auch das Anlegen der Übernachtskulturen findet weiterhin in LB-Medium statt.

2.6.3 Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA-Säule

Heterolog exprimierte Proteine können mit Hilfe einer Nickel-NTA-Säule, welche aus Nitrilotriessigsäure-Agarose mit Nickelionen besteht, aufgereinigt werden. Es handelt sich um eine Metallchelate-Chromatographie, eine Form der Affinitätschromatographie. Das exprimierte Protein bindet durch den angehängten Polyhistidin-Tag zu den Nickelionen der Säule. Es bildet sich ein Chelatkomplex. Da Imidazol eine höhere Affinität zu den Nickelionen besitzt, verdrängt es das Protein beim Eluieren von der Säule (Hengen 1995). Zunächst wird 1 ml des Nickel-NTA-Materials in eine Säule überführt und drei- bis viermal mit Wasser gespült. Anschließend wird mit 10 ml His-Tag-Bindepuffer äquilibriert. Der Proteinüberstand wird 1:10 mit 100 mM Imidazol und 3 M NaCl versetzt und auf die vorbereitete Säule gegeben. Die Säule wird verschlossen und für 1 h horizontal auf Eis geschüttelt. Die weiteren Arbeitsschritte werden zum Schutze des Proteins im Kühllabor durchgeführt. Da das Protein an das Nickel-NTA gebunden vorliegt, kann der Flüssigkeitsüberstand durchlaufen, von diesem wird für die spätere SDS-Untersuchung eine Probe genommen („Durchlauf“). Die Säule wird achtmal mit jeweils 2 ml Waschpuffer 1 gewaschen, von den Waschfraktionen werden Proben aufbewahrt. Folgend wird zweimal mit 2 ml Waschpuffer 2 gewaschen und ebenfalls Proben aufbewahrt. Um das gebundene Protein von der Säule zu eluieren, wird mit 3 ml Elutionspuffer eluiert.

Da das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol sich während der Lagerung negativ auf das Protein auswirkt, wird das eluierte Protein mittels PD-10 Säule umpuffert.

2.6.4 Umpufferung und Entsalzung über PD-10 Säulen

Die Aufreinigung über eine PD-10 Säule beruht auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Moleküle mit hoher Molekularmasse passieren hierbei schneller als kleine das Säulenmaterial. Aus diesem Grund eignen sich diese mit Sephadex G 25 gepackten Säulen zur Entsalzung und Umpufferung von Proteinen. Sie wird nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Säule wird mit 30 ml des Kaliumphosphat-Puffers (0,1 M pH 7) äquilibriert. 2,5 ml der Proteinlösung werden auf die Säule gegeben und in die Säule einsickern gelassen, dann wird mit 3,5 ml Puffer eluiert. Das aliquotierte Protein kann bei -24 °C gelagert werden.

2.6.5 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zum Aufkonzentrieren von proteinhaltigen Lösungen kann eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt werden. TCA unterbricht die Wasserstoffbrückenbindungen und somit die Hydrathülle um das Protein. Das Protein salzt aus und kann aus der Lösung abzentrifugiert werden (Koontz 2014).

Die Proteinlösung wird mit einer äquivalenten Menge an 40 % TCA-Lösung versetzt, gemischt und für 60 min im Kühlschrank oder auf Eis gelagert. Anschließend wird für 20 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Proteinpellet zweimal mit kaltem Aceton (80%) gewaschen. Durch diese Waschschrte wird das restliche TCA aus der Lösung entfernt.

Der Acetonüberstand wird verworfen und das Pellet im Rotationsverdampfer getrocknet. Das Pellet wird mit 20 µl 0,1 M Natriumcarbonatlösung mit 10 % Saccharose resuspendiert.

2.6.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, auch SDS-PAGE, ist eine gelelektrophoretische Methode zum Auftrennen von Proteinen. Die Trennung erfolgt auf Grund der Größenunterschiede der Moleküle, die Moleküleigenladung wird durch das im Gel befindliche SDS abgeschirmt. Das Gel entsteht durch Polymerisierung des Polyacrylamids mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid mit Hilfe von TEMED und APS. Das SDS-Gel besteht aus zwei Gelteilen, einem Sammelgel und einem Trenngel.

Im Sammelgel befinden sich die Gelkammern, in welche die Proben hinein pipettiert werden, dies dient der Konzentrierung der Proben an der Grenze zum Trenngel, damit sich eine scharfe Bande bildet. Die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe geschieht im Trenngel.

Bevor die Proben auf das Gel geladen werden, müssen diese denaturiert werden. Hierfür werden 15 µl der Proteinproben mit 4 µl Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Das fertige Gel wird in der Elektrophoreseapparatur platziert und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben werden in die Geltaschen gegeben, als Größenmarker dient der Roti®-Mark Standard Proteinmarker.

Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 bis 2 h bei 150 V und 100 mA.

Nach Ablauf der Elektrophorese wird das Gel mit der Färbelösung behandelt. Diese enthält Coomassie Brilliantblau, einen Farbstoff, welcher an Proteine bindet. Da sich auch das Gel einfärbt, wird dieses anschließend mit der Entfärbelösung entfärbt, so dass lediglich die Proteine blau gefärbt erscheinen, das Gel aber durchscheinend ist.

2.6.7 Westernblot-Analyse in der Semi-Dry-Kammer

Der Westernblot ist eine Variante des Immunblots und dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Es handelt sich hierbei um eine Übertragung (blot) von Proteinen auf eine Trägermembran.

Zunächst wird eine SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 2.6.6). Das SDS-Gel wird allerdings nicht gefärbt, sondern zunächst 10-30 min im Transferpuffer geschwenkt, um Reste des SDS-Laufpuffers zu entfernen. Zeitgleich wird die Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF), welche bereits auf Größe des Gels zugeschnitten wurde, für 15 s in Methanol eingelegt. Dadurch wird die Hydrophobie der Membran verringert. Die Membran sollte ausschließlich mit Handschuhen berührt werden, um eine Veränderung der Membranfläche und somit eine schlechtere Bindung der Proteine zu verhindern. Nach 2 min Waschen mit Reinstwasser wird die Membran mindestens 5 min mit Transferpuffer getränkt. Zusätzlich werden mindestens 12 Filterpapierstreifen (Dicke 0,4 mm) auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Die feuchten Filterpapiere garantieren, dass der Blot während der Blottingzeit feucht bleibt und auch der Ionenstrom gewährleistet wird. Anschließend wird der Blot zusammengebaut. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.



Abbildung 24
Schematische Darstellung des Aufbaus
des Westernblots

Die ersten sechs Filterpapiere werden auf der Anode (rot) platziert und nochmals mit Puffer übergossen. Darauf wird die Membran platziert. Die Membran wird mit Puffer benetzt und darauf das SDS-Gel gelegt. Dies sollte blasenfrei geschehen, eventuell entstehende Luftblasen müssen vor dem Blot entfernt werden. Das SDS-Gel wird mit Transferpuffer benetzt und die restlichen sechs Filterpapiere darauf gelegt, welche nochmals mit Transferpuffer übergossen werden. Die Kathode (schwarz) wird auf die Blot-anordnung gesetzt und die Blotkammer verschlossen. Die Laufzeit des Blots beträgt 90 min, wobei die Stromstärke sich aus Länge und Breite des Blots errechnet. Pro cm² Gel werden 2 mA benötigt. Für einen Blot der Größe 5 x 8 cm werden beispielsweise 80 mA benötigt.

Nach Ablauf der Blottingzeit wird die Membran entnommen und dreimal für je 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird die Membran über Nacht im Blocking-Puffer geschwenkt. Durch das enthaltene Magermilchpulver wird die Membran blockiert, so dass keine weiteren Proteine an der Membran haften können, welche die spätere Detektion behindern könnten.

Das SDS-Gel wird nach Ablauf des Blots, wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben, gefärbt. Dies dient der Überprüfung der Übertragung der Proteine.

Nach dem Blockieren wird die Membran zweimal für 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dieser bindet spezifisch an ein Antigen, welches das Analytenprotein besitzt. Im Falle von Proteinen mit His-Tag wird ein Anti-His-Tag Mausantikörper verwendet. Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht, der Antikörper wird 1:10000 mit 1 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Anschließend wird die Membran achtmal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, dies dient der Entfernung des ersten Antikörpers. Im Anschluss wird für mindestens 1 h mit dem zweiten Antikörper, welcher sich gegen den ersten Antikörper richtet und zusätzlich mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert ist, inkubiert. Im Falle des Anti-His-Tag wird ein Anti-Maus Antikörper verwendet, dieser wird 1:20000 in TBS-T verdünnt. Nach dem Waschen der Membran fünfmal für 5 min mit TBS-T erfolgt die Detektion. Die Membran wird zunächst für 5 min im Substratpuffer äquilibriert. Zur Membran wird die Färbelösung gegeben und für 15-30 min inkubiert. Die Färbelösung enthält neben dem Substratpuffer auch Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), welche in Anwesenheit der Alkalischen Phosphatase zu einer Färbung führen (Abbildung 25).

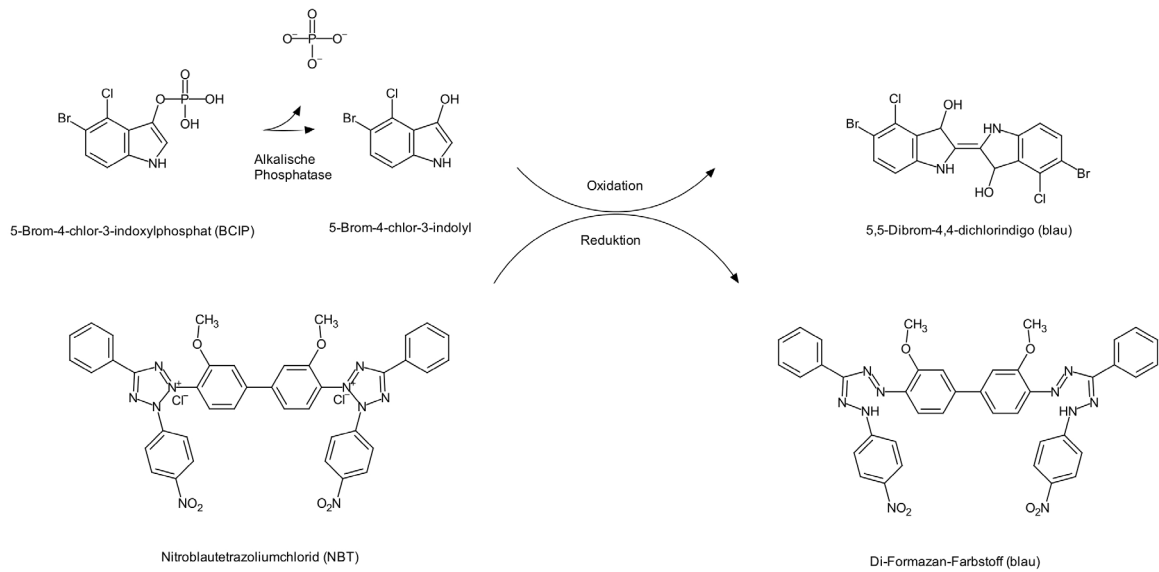


Abbildung 25
Reaktion von BCIP und NBT mit der Alkalischen Phosphatase

Die Reaktion wird durch dreimaliges Waschen mit Wasser gestoppt. Proteine, welche das entsprechende Antigen für den ersten Antikörper enthalten, erscheinen als bläuliche Bande.

Die Membran wird fotografiert und zur Färbung unspezifischer Proteine für 10 s mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Anschließend wird der restliche Farbstoff mit der Entfärbelösung entfernt und die Membran getrocknet.

2.6.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung findet häufig die photometrische Bestimmung nach Bradford Anwendung. Hierbei wird ausgenutzt, dass Coomassie Brillantblau G250 in der Lage ist, an Proteine zu binden. Während die ungebundene Form bei 470 nm absorbiert, verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 595 nm nach Komplexbildung mit Proteinen (Bradford 1976).

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung wird zunächst eine Kalibriergerade erstellt. Hierfür wird BSA, also Rinderserumalbumin, verwendet. Lösungen in Wasser mit 0,125-1 mg/ml BSA werden ebenso wie die Proben photometrisch vermessen. Auf Grund der Kalibriergeraden kann die Konzentration der Proben berechnet werden.

2 ml der Bradford-Lösung werden in eine Acryl-Küvette gegeben. Je 10 µl der Proben, des Kalibrierproteins bzw. des Referenzpuffers (Puffer, in welchem das Protein gelöst ist) werden hinzu pipettiert und gemischt. Nach 15 min Wartezeit wird die Absorption gemessen. Liegt eine Probe außerhalb der Kalibriergeraden, so muss diese vor der Bestimmung verdünnt werden.

2.6.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Testung von Enzymrohextrakten oder heterolog exprimierten Enzymen werden Enzymtests durchgeführt.

Zur Untersuchung von Hydroxycinnamoyltransferasen wird zunächst folgender Standard-enzymtest verwendet:

0,01 M DTT

0,5 mM Ascorbat

bis zu 500 μ M Akzeptorsubstrat

bis zu 500 μ M Donorsubstrat (CoA-Ester)

bis zu 50 μ l Proteinrohextrakt oder bis zu 5 μ g aufgereinigtes Protein

ad 100 μ l Kaliumphosphat-Puffer 0,1 M pH 7

Der Ansatz wird für bis zu 60 min im Wasserbad bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 20 μ l 6 N HCl abgestoppt. Zum Isolieren der Reaktionsprodukte und Abtrennen des Puffers wird zweimal mit 500 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Abdampfen der vereinigten Ethylacetatextrakte wird die Probe im Laufmittel rückgelöst.

Die Auswertung der Enzymtests erfolgt über HPLC, wobei Laufmittel und Wellenlänge des Detektors dem Analyten angepasst werden.

2.6.9.1 Enzymtests zur Bildung von Zichoriensäure

Die Tests zur Bildung von Zichoriensäure erfolgen aus Enzymrohextrakten; die Herstellung dieser wird in Kapitel 2.6.1 erläutert.

Als Substrat finden 250 μ M Caffeoyl-CoA und 500 μ M Weinsäure Verwendung. Es werden sowohl D-, L- als auch meso-Weinsäure getestet. Die HPLC-Analyse erfolgte isokratisch mit 35 % Methanol und 0,01 % *o*-Phosphorsäure bei einer Wellenlänge von 320 nm. Als Standard wurden 20 μ l 25 μ M Zichoriensäure in Wasser verwendet.

2.6.9.2 Enzymtests zur Bildung von Cimicifugasäuren

Die Testung der Enzymaktivität des heterolog exprimierten Enzyms aus der Traubensilberkerze erfolgt ebenfalls in einem Ansatz von 100 μ l mit anschließender Auswertung durch HPLC. Verwendet wird ein Laufmittel aus 50 % Methanol mit 0,01 % *o*-Phosphorsäure.

Als Akzeptorsubstrat wird Piscidinsäure in einer Konzentration von 50 μ M verwendet, als Donorsubstrat finden verschiedene CoA-Ester in einer Konzentration von bis zu 500 μ M Anwendung. Die Substrate sowie das erwartete Produkt und die Detektionswellenlänge sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9

Übersicht der verwendeten CoA-Ester sowie des erwarteten Produkts und der zur Detektion verwendeten Wellenlänge

CoA-Ester	erwartetes Produkt	Wellenlänge
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	2- <i>O</i> -(<i>p</i> -Cumaroyl)-Piscidinsäure CA PP (Cimicifugasäure K)	316 nm
Caffeoyl-CoA	2- <i>O</i> -Caffeoylpiscidinsäure CA PK (Cimicifugasäure D)	332 nm
Sinapoyl-CoA	2- <i>O</i> -Sinapoylpiscidinsäure CA PS (Cimicifugasäure J)	329 nm
Feruloyl-CoA	2- <i>O</i> -Feruloylpiscidinsäure CA PF (Cimicifugasäure E)	325 nm
Isoferuloyl-CoA	2- <i>O</i> -Isoferuloylpiscidinsäure CA PI (Cimicifugasäure F)	326 nm
3,4-Dimethoxycinnamoyl-CoA	2- <i>O</i> -(3,4-Dimethoxycinnamoyl)- Piscidinsäure CA PD (Cimicifugasäure L)	330 nm
Cinnamoyl-CoA	2- <i>O</i> -Cinnamoylpiscidinsäure CA PC	330 nm
3,4-Dihydroxybenzoyl-CoA	2- <i>O</i> -(3,4-Dihydroxybenzoyl)- Piscidinsäure	330 nm

Weiterhin wurde Caffeoyl-CoA (250 μ M) mit bis zu 500 μ M verschiedener Substrate getestet, die verwendeten Substrate sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Auswertung erfolgte bei 333 nm, isokratisch mit 50 % Methanol und 0,01 % *o*-Phosphorsäure.

Tabelle 10

Verwendete Substrate zur Testung der ArHCT

4-Hydroxyphenylmilchsäure	Chinasäure	Galactarsäure	DL-Dopa
1-Phenylethanol	Shikimisäure	Glucarsäure	L-Dopa
2-(4-Hydroxy)-1-propanol	D-Weinsäure	Putrescin	Dopamin
2-(4-Hydroxy)-ethanol	L-Weinsäure	Spermin	L-Tyrosin
2-Phenylethanol	<i>m</i> -Weinsäure	Spermidin	DL-Tyrosin
3-Phenyl-1-propanol	D-Threonsäure	L-Phenylalanin	Serotonin
4-Phenyl-1-butanol	L-Threonsäure	D-Phenylalanin	Tyramin
Anthranilsäure	D-Äpfelsäure	L-Tryptophan	Tryptamin
3-Hydroxyanthranilsäure	L-Äpfelsäure	D-Tryptophan	
2-Phenethylamin	DL-Äpfelsäure		

2.6.9.3 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen der ArHCT

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen - also Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit und Proteinkonzentration - werden zunächst verschiedene Testreihen durchgeführt.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur wird ein Enzymtest mit 250 μ M Caffeoyl-CoA, 50 μ M Piscidinsäure und 0,1 M KPi-Puffer pH 7 durchgeführt, es wurden 5 μ g Protein verwendet, die Reaktionszeit betrug 10 min. Folgende Temperaturen wurden getestet: 6; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60 °C. Die vorbereiteten Reaktionsansätze werden, ohne Enzym, bereits bei der entsprechenden Temperatur vortemperiert. Die Reaktion startet mit Zugabe des Enzyms.

Für die Ermittlung des optimalen pH-Wertes wird zunächst eine Testreihe mit 250 μ M Caffeoyl-CoA, 50 μ M Piscidinsäure, 5 μ g Protein bei 30 °C durchgeführt. Es wird der Britton-Robinson-Puffer im pH-Bereich von pH 2-12 ad 100 μ l verwendet. Nach 10 min Reaktionszeit wird mit 20 μ l 6 N HCl abgestoppt.

Eine weitere Testreihe wird mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer im Bereich von pH 6,0-8,5 durchgeführt.

Die Ermittlung der optimalen Reaktionszeit und Proteinkonzentration erfolgt simultan. Hierfür werden 250 μ M Caffeoyl-CoA, 50 μ M Piscidinsäure, 0,1 M KPi pH 7 und 2,5 bzw. 5 μ g Protein zusammengegeben. Die Reaktionszeit betrug zwischen 2 und 15 min bei einer Temperatur von 30 °C.

2.6.9.4 Reverser Enzymtest

Enzyme sind oftmals nicht nur in der Lage die eigentliche Hinreaktion zu katalysieren, sondern sind zumeist, unter geeigneten Bedingungen, auch in der Lage die Rückreaktion, also die Bildung der Edukte aus dem Produkt, zu katalysieren.

Für die Rosmarinsäuresynthese konnte gezeigt werden, dass diese auch die Rückreaktion von Rosmarinsäure zu Caffeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure katalysiert, wenn sie mit einem CoA-Überschuss inkubiert wird (Petersen 1991).

Für den Test der ArHCT werden 5,93 μM Fukinolsäure mit 1 mM CoA und 2,5 μg Protein in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 für 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach Abstoppen mit 20 μl 6 N HCl und zweifachen Ausschütteln mit Ethylacetat werden die Proben mit 50 μl Wasser zurückgelöst und mit LC-MS untersucht. Weitere Tests werden mit Weglassen von Enzym und/oder CoA durchgeführt.

2.6.9.5 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter eines Enzyms, also der Reaktionsgeschwindigkeit und der Sättigungskonzentration werden die Ergebnisse des Enzymtests bei ansteigenden Substratkonzentrationen bestimmt. Nach den Optimierungen des Enzymtestes wird die Enzymkinetik in 0,1 M KPi pH 7 (auf 100 μl), einer Reaktionszeit von 3 min, einer Temperatur von 30 °C und 2,5 μg Protein durchgeführt. Als Substrate dienen Caffeoyl-, Sinapoyl-, Feruloyl-CoA in den Konzentrationen 10; 25; 50; 100; 250 und 500 μM ; *p*-Cumaroyl-CoA wird in den Konzentrationen 1; 2,5; 5; 10; 25 und 50 μM eingesetzt, unter Verwendung von 50 μM Piscidinsäure. Für den Test der Piscidinsäure werden 500 μM *p*-Cumaroyl-CoA mit 5; 10; 25; 50; 100 und 125 μM Piscidinsäure verwendet. Weiterhin wird je ein Test präpariert, welcher 0 μM des entsprechenden Substrates enthält, sowie ein Test ohne Zugabe des Proteins.

Zunächst werden Puffer und Substrate zusammen pipettiert und zum Temperieren in das auf 30 °C vorgeheizte Wasserbad gestellt. Die Reaktion startet mit Zugabe des Proteins. Nach Ablauf der 3 min Reaktionszeit wird die Reaktion mit 20 μl 6 N HCl abgestoppt und die Probe durchmischt und auf Eis gelagert. Die Proben werden mit zweimal 500 μl Ethylacetat ausgeschüttelt und anschließend eingedampft. Pro Test werden je zwei Parallelproben vorbereitet, jeder Test wird dreimal wiederholt.

Die in 50 % Methanol zurückgelösten Proben werden mittels HPLC analysiert und die Fläche der Produktpeaks bestimmt. Aus diesen Werten können die besagten Parameter berechnet werden.

Bei einer Auftragung der eingesetzten Substrat-Konzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit, ergibt sich bei Reaktionen mit einem Endprodukt eine Hyperbel, welche sich nach einer Steigung langsam einer Geraden, also der Substratsättigung, annähert.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung kann die Maximalgeschwindigkeit v_{max} , sowie die Michaelis-Menten-Konstante K_m bestimmt werden (Michaelis und Menten 1913). In Abbildung 26 ist das Diagramm einer idealisierten enzymatischen Reaktion zu sehen. Die Bestimmung des K_m -Wertes erfolgt am Punkt der halbmaximalen Geschwindigkeit.

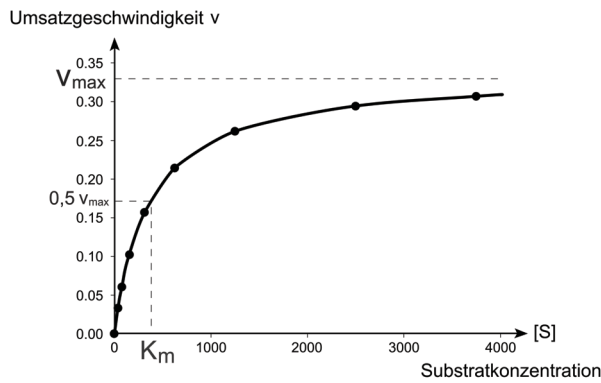


Abbildung 26

Michaelis-Menten-Diagramm (https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMichaelis-Menten_plot.svg)

Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Trägt man die Substratkonzentration sowie die Reaktionsgeschwindigkeit doppelt reziprok gegeneinander auf, so erhält man die Darstellung nach Lineweaver-Burk (Lineweaver und Burk 1934).

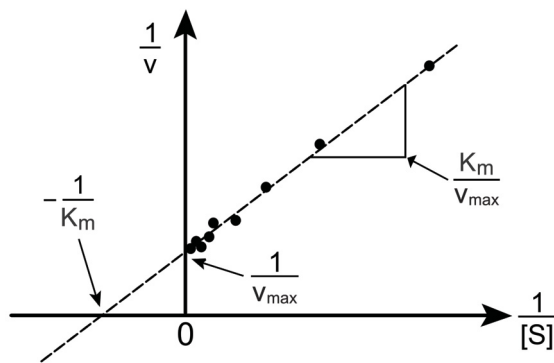


Abbildung 27

Lineweaver-Burk-Plot (https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ALineweaver-Burke_plot.svg)

Aus den Schnittpunkten mit den Achsen können, wie in Abbildung 27 dargestellt, der K_m-Wert und v_{max} bestimmt werden.

Durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + S}{v_{max} \cdot S} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}}$$

Eine weitere Methode der Auswertung stellt die Methode nach Hanes-Woolf dar (Hanes 1932). Wie in Abbildung 28 zu sehen, wird an beiden Achsen die Substratkonzentration berücksichtigt. Der K_m -Werte ergibt sich dabei aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse.

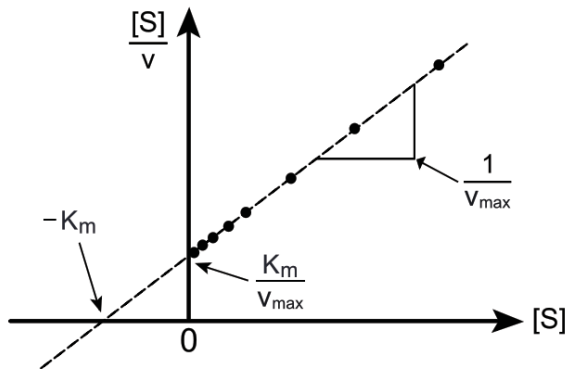


Abbildung 28:

Hanes-Woolf-Plot (https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AHanes-Woolf_plot.svg)

Es ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{v_{max}}S + \frac{K_m}{v_{max}}$$

2.6.10 Ermittlung des Einflusses von DTT auf den Enzymtest

Dithiothreitol (DTT) wird in Enzymtests zum Schutz des Enzymes eingesetzt, da es die Oxidation von freien Schwefelgruppen verhindert. Da bei einigen Enzymtests Peaks auftraten, welche nicht allein durch die Bildung des Produktes erklärbar waren, sollte der Einfluss von DTT auf die Produktbildung untersucht werden.

Hierfür wurden 500 μM Kaffeesäure, 500 μM *N*-Hydroxysuccinimid, 500 μM CoA oder 500 μM Caffeoyl-CoA mit 0,01 M DTT in 0,1 M KPi pH 7 (auf 100 μl) für 10 min bei 30 °C inkubiert. Weitere Tests wurden mit Weglassen des DTT durchgeführt. Die Tests wurden mit 20 μl 6 N HCl versetzt und anschließend mit 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Eindampfen der Ethylacetatphase wurde der Rückstand mit 50 μl 50 % Methanol rückgelöst und mit HPLC analysiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen der Zichoriensäure-Biosynthese in *Ocimum basilicum* und *Cichorium intybus*

3.1.1 Etablierung von Suspensionskulturen von *Ocimum basilicum*

Das Anlegen von Suspensionskulturen von Basilikum (*Ocimum basilicum*) erfolgte aus bereits bestehenden Kalluskulturen. Hierfür wurden 5 g der Kalluszellen in flüssiges CB2-Medium (Petersen und Alfermann 1988) überführt. Es wurden zwei Kulturen angelegt, Bas-neu und Bas-alt, da es zwei bestehende Kalluskulturen gab. Die Zellen wurden bei 25 °C auf dem Schüttler bei 110 UpM inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen über-impft, also 5 g der Zellen in frisches Medium überführt. Die Zellen zeigten nach kurzer Zeit ein stetiges Wachstum und konnten deshalb für weitere Untersuchungen verwendet werden.

3.1.2 Inhaltsstoffbestimmung von Suspensionskulturen von *Ocimum basilicum*

Zunächst wurden die Zellen der Suspensionskulturen Bas-neu und Bas-alt geerntet und mit Unterdruck vom Medium befreit. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.4.8 beschrieben. Der 70 %-ethanolische Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.

Das Ergebnis der DC-Untersuchung der Basilikumextrakte ist in Abbildung 29 dargestellt. Weder die Kultur Bas-neu noch Bas-alt enthält Zichoriensäure (Abbildung 29A). Rosmarinsäure ist lediglich in der Kultur Bas-neu erkennbar (Abbildung 29B).

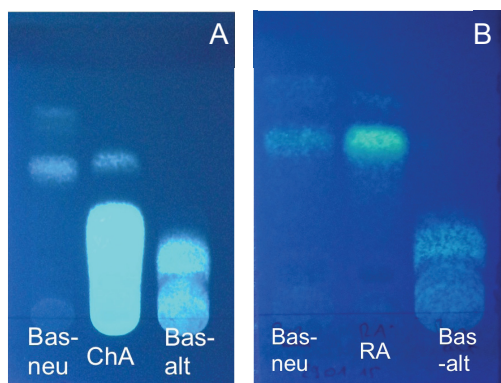


Abbildung 29

DC der Basilikum-Kulturen Bas-neu und Bas-alt, Laufmittel: Ethylacetat, Chloroform, Ameisensäure 5:4:1, Detektion mit Naturstoffreagenz A/PEG 400 und UV-Licht 312 nm

A: Zichoriensäure (ChA) als Standard

B: Rosmarinsäure (RA) als Standard

Zur Verifizierung wurde zusätzlich eine HPLC-Analyse mit 50 % Methanol mit 0,01 % o-Phosphorsäure als Laufmittel bei einer Wellenlänge von 333 nm durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein Vorhandensein von Zichoriensäure. Rosmarinsäure findet sich lediglich in der Kultur Bas-neu. Da es sich bei der Kultur Bas-alt um eine Zellkultur handelt, welche schon längere Zeit kultiviert wird, ist der Gehalt an Rosmarinsäure unter die Nachweisgrenze gesunken. Dieses Phänomen ist aus der Pflanzenzellkultur bekannt (Tabata 1977). Inhaltsstoffe wie Rosmarinsäure und Chlorogensäure wirken als UV-Schutz und Schutz vor Fraßfeinden (Cle et al. 2008). Da die Zellkulturen im sterilen Umfeld wachsen und zusätzlich im Dunkeln kultiviert werden, kann es zu einer Abnahme dieser schützenden Inhaltsstoffe kommen. Weiterhin kommt es beim Überimpfen zu einer Selektion schnellwachsender Zellen. Diese Zellen wachsen schneller unter Verminderung der Produktion von Sekundärmetaboliten.

Für weitere Untersuchungen wurde die Kultur Bas-neu verwendet, da diese Rosmarinsäure enthält.

3.1.3 Elicitierung einer Basilikum-Suspensionskultur

Da die Testung auf Zichoriensäure in den Suspensionskulturen zu keinem Ergebnis führte, wurde eine Elicitierung vorgenommen. Hierfür wurde die Zellkultur Bas-neu vermehrt. 5 g der Zellen wurden in 50 ml Medium überführt und zunächst auf den Schüttler bei 110 UpM verbracht. Am Tag 3 wurden 8 Kolben steril mit 50 µl 100 mM Methyljasmonat in Ethanol (Endkonzentration 100 µM) und ebenfalls 8 Kolben mit 50 µl Ethanol als Kontrolle versetzt. Zur Bestimmung des Nullwertes bzw. des Ausgangswertes wurden zwei Kolben ohne eine weitere Zugabe entnommen, mit Unterdruck abgesaugt und bei -80 °C eingelagert. Nach 12, 24, 48 und 96 h wurden die Zellen von je zwei Kolben ebenfalls abgesaugt und eingefroren.

Der Einfluss des Elicitors auf die Zellkultur war bereits optisch erkennbar. Die Zellen des Nullwertes waren ca. 50 mm große, runde weiß-gelbliche Zellaggregate. Die Zellaggregate der Kontrolle, welche mit Ethanol behandelt wurde, zeigten keine optischen Unterschiede, auch nicht nach 96 h. Die behandelten Kulturen zeigten nach 48 h einen Einfluss des Methyljasmonats: die Zellaggregate waren bräunlich und kleiner, nach 96 h waren die Zellen deutlich braun und weniger stark gewachsen.

Die geernteten, gefrorenen Zellen wurden gefriergetrocknet und anschließend extrahiert. Von jedem Kolben (Ethanolkontrolle + elicitiert) wurden je zwei Proben hergestellt. Die so gewonnenen Proben wurden mittels DC und HPLC untersucht.

Stellvertretend für alle untersuchten Proben ist in Abbildung 30 das Ergebnis der Ethanolkontrolle und der behandelten Zellen nach 96 h aufgetragen.

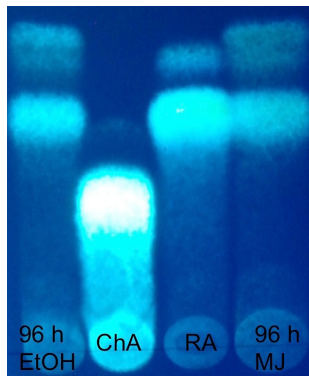


Abbildung 30

DC des Elicitierungsversuchs der Basilikumkulturen

Laufmittel: Ethylacetat, Chloroform, Ameisensäure 5:4:1,

Detektion mit Naturstoffreagenz A/PEG 400 und UV-Licht 312 nm.

96 h EtOH: Ethanolkontrolle nach 96 h

96 h MJ: eliciert mit 100 μ M Methyljasmonat nach 96 h

ChA: Zichoriensäure als Standard

RA: Rosmarinsäure (RA) als Standard

Bereits auf der DC ist zu erkennen, dass sowohl die Kontrolle (96 h EtOH) als auch die elicierte Probe (96 h MJ) Rosmarinsäure enthalten. Zichoriensäure ist in keiner der beiden Proben zu erkennen.

Die quantitative Auswertung mittels HPLC ergab, dass im Startwert bereits 2,6 % Rosmarinsäure im Trockengewicht enthalten waren. In der Ethanolkontrolle stieg die Rosmarinsäurekonzentration in 96 h auf 4 % an. In den elicierten Proben stieg der Gehalt an Rosmarinsäure auf bis zu 5,3 % an. Ein Überblick über das Ergebnis der Elicitierung liefert Abbildung 31.

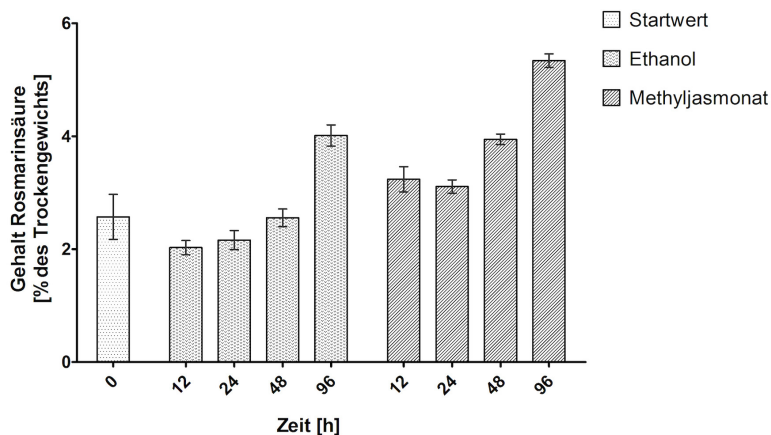


Abbildung 31

Ergebnis der Elicitierung der Basilikumkultur Bas-neu. Dargestellt ist der Rosmarinsäuregehalt aus je zwei Kolben. Mittelwert aus zwei Proben \pm SD

Die Zugabe von 100 μ M Methyljasmonat führte zu einer erhöhten Rosmarinsäureproduktion. Dies konnte bereits in Kulturen von *Coleus blumei* nachgewiesen werden (Szabo et al. 1999). In diesen Kulturen stieg der Rosmarinsäuregehalt nach 56 h auf 3,3 % im Trockengewicht im Vergleich zu 1 % in der Kontrolle. Auf den Gehalt an Zichoriensäure hatte die Elicitierung keinen Einfluss. Es ist unklar, weshalb Zichoriensäure in den Zellkulturen nicht nachweisbar ist, da bekannt ist, dass Basilikum-Frischpflanzen Zichoriensäure enthalten. Dieses Phänomen wurde bereits in Zellkulturen von Zichorie gezeigt: Während der Gehalt an Chlorogensäure durch die Elicitierung mit Methyljasmonat stieg, konnten weder Kaftar- noch Zichoriensäure nachgewiesen werden (Legrand et al. 2016).

3.1.4 Enzymtest mit Proteinrohextrakten aus Basilikumzellen

Auch wenn, wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, keine der beiden Suspensionskulturen von Basilikum Zichoriensäure enthielt, wurde ein Proteinrohextrakt für Enzymtests hergestellt (Kapitel 2.6.1).

Um die Bildung von Zichoriensäure zu untersuchen, wurde L-Weinsäure als Substrat eingesetzt. Der Test wurde wie in Kapitel 2.6.9.1 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 0 bis 60 min bei 30 °C, es wurden 20 µl des Proteinrohextraktes eingesetzt, als zweites Substrat diente Caffeoyl-CoA. Weiterhin wurden Tests mit abgekochtem Enzym und Weglassen der Substrate durchgeführt. Keiner Tests führte zu einer Bildung von Zichoriensäure. Da die Zellkulturen keine Zichoriensäure enthielten, ist es möglich, dass die Enzyme der Biosynthese nicht aktiv vorhanden sind.

3.1.5 Untersuchung von Basilikum-Frischpflanzenextrakten

Da die hergestellten Suspensionskulturen von Basilikum weder Zichoriensäure enthielten, noch eine entsprechende Enzymaktivität aufwiesen, wurden Frischpflanzen untersucht. Hierfür wurde handelsüblicher Basilikum im Lebensmittelhandel gekauft und aus den gewaschenen Blättern sowohl die Inhaltsstoffe extrahiert als auch ein Proteinrohextrakt hergestellt. Die gewonnenen Extrakte wurden mittels HPLC untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt. Beide Pflanzen enthalten sowohl Rosmarinsäure als auch Zichoriensäure.

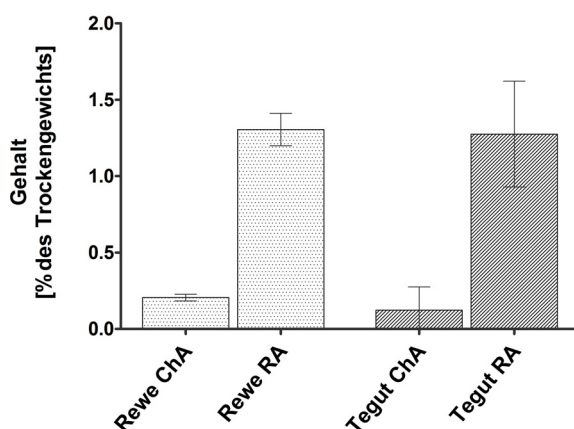


Abbildung 32
Ergebnis der Extraktion von Basilikumblättern. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Proben \pm SD.
ChA: Zichoriensäure
RA: Rosmarinsäure

Für die Enzymtestung der Proteinrohextrakte wurden 50 µl des Extraktes eingesetzt. Als Substrat dienten 500 µM D-, L- oder *m*-Weinsäure und 250 µM Caffeoyl-CoA. Der Test wurde in 0,1 M Phosphat-Puffer bei pH 7 und 30 °C für 0-60 min durchgeführt. Leider zeigte sich für keine der getesteten Weinsäuren eine Produktbildung.

Um zu sehen, ob die Rohextrakte eine Enzymaktivität der Rosmarinsäuresynthese besitzen, wurde ein zusätzlicher Test mit den entsprechenden Substraten durchgeführt. Hierfür wurden 250 µM Caffeoyl-CoA und 1 mM pHPL verwendet.

Es zeigt sich die Bildung von Caffeoyl-Hydroxyphenylmilchsäure (Caf-pHPL). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Enzyme im Rohextrakt prinzipiell intakt waren.

Eine weitere Testreihe, unter Verwendung von Puffer verschiedener pH-Werte, sollte zeigen, ob die Bildung der Zichoriensäure eventuell bei einem anderen pH-Wert abläuft. Hierfür wurde ein Britton-Robinson-Puffer im pH-Bereich zwischen 3 und 9 verwendet, als Substrate dienten 500 μM der drei Isomeren der Weinsäure und 250 μM Caffeoyl-CoA. Auch in diesen Tests konnte keine Zichoriensäurebildung mit den Proteinrohextrakten von Basilikumpflanzen, welche Zichoriensäure enthalten, gezeigt werden. In Rohextrakten aus *Arachis glabrata* und *Equisetum arvense* gelang dies bereits (Sullivan 2014; Hohlfeld et al. 1996). Ein Einfluss von Cofaktoren, wie Metallionen, kann ausgeschlossen werden, da der Test von Sullivan ähnlich dem hier durchgeführten Test aufgebaut war. Weshalb keine Zichoriensäurebildung stattfand, kann nicht geklärt werden, weitere Untersuchungen sind deshalb nötig.

3.1.6 Zugabe von Weinsäure zu Basilikum-Zellkulturen

Da die Bildung von Zichoriensäure in den Basilikum-Zellkulturen nicht durch die Elicitierung angeregt werden konnte, wurde ein Zufütterungsversuch durchgeführt. In Kulturen von Lavendel konnte die Produktion von Rosmarinsäure durch Zufütterung von Phenylalanin erhöht werden (Pavlov und Ilieva 1999). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Bildung der Zichoriensäure auf Grund des Fehlens von Reaktionsprodukten nicht stattfand, wurde dies durch die Zufütterung von Weinsäure untersucht. Hierfür wurden die Zellkulturen zunächst vermehrt. Nach dem Überimpfen wurden je zwei Kulturen mit 100 μM D-, L- oder *m*-Weinsäure versetzt. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollprobe mitgeführt. Die Kulturen wurden entweder bei 25 °C im Dunkelkulturraum oder im Hellkulturraum kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Kulturen geerntet, abgesaugt und die Inhaltsstoffe isoliert. Die Analyse der Proben geschah mittels HPLC.

Leider zeigte sich auch hier kein Vorhandensein von Zichoriensäure.

3.1.7 Untersuchung von Zichorien-Frischpflanzen

Da die Untersuchung von Basilikum-Frischpflanzen zwar zeigte, dass diese Zichoriensäure enthalten, aber keine Zichoriensäure-bildende Enzymaktivität im Rohextrakt besitzen, wurden weitere Untersuchungen mit der Zichorie (*Cichorium intybus*) durchgeführt.

Es wurden mehrere Pflanzen in Marburg und Hamburg geerntet, gewaschen und in Blüte, Blatt, Stängel und Wurzel aufgeteilt. Die Pflanzenteile wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Extraktion der Pflanzenteile mit 70 % EtOH wurden die Proben mit DC untersucht.

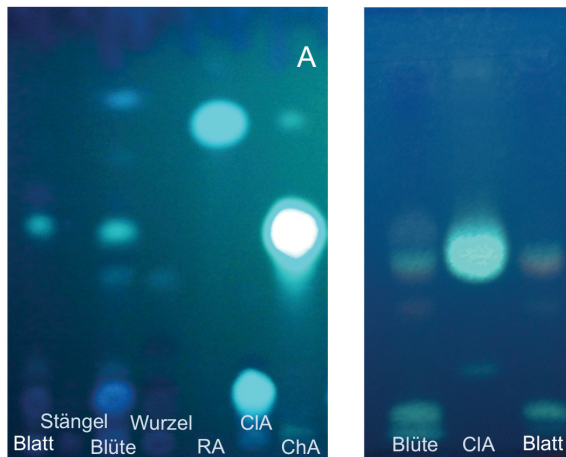


Abbildung 33
 Ergebnis der DC-Untersuchung der Extrakte aus Zichorie
 RA: Rosmarinsäure
 ClA: Chlorogensäure
 ChA: Zichoriensäure
 A: Laufmittel: Ethylacetat, Chloroform, Ameisensäure 5:4:1
 B: Laufmittel: Ethylacetat, Wasser, Ameisensäure 8:1:1
 Detektion mit Naturstoffreagenz A/PEG 400 bei UV-Licht 312 nm

Das Ergebnis der DC ist in Abbildung 33 dargestellt. Abbildung 33A zeigt das Chromatogramm mit dem Laufmittel Ethylacetat, Chloroform, Ameisensäure 5:4:1 von Extrakten aus Blatt, Stängel, Blüte und Wurzel mit den Standards für Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Zichoriensäure. Zu erkennen ist, dass kein Extrakt Rosmarinsäure enthält. Die Blüten und die Blätter enthalten Zichoriensäure. Da dieses Laufmittel nicht geeignet ist für die Auftrennung von Chlorogensäure, wurde eine zweite DC mit dem Laufmittelgemisch Ethylacetat, Wasser, Ameisensäure 8:1:1 mit den Extrakten der Blätter und Blüten durchgeführt. Auf dieser DC ist zu erkennen, dass beide Pflanzenteile Chlorogensäure enthalten.

Aus den Blättern wurde daraufhin ein Proteinrohextrakt hergestellt. Getestet wurde 50 µl des Extraktes mit D-, L- oder *m*-Weinsäure und Caffeoyl-CoA als Substrate. Die Inkubationszeit betrug bis zu 60 min bei 30 °C. Die Auswertung erfolgte bei 333 nm durch HPLC. Keiner der Tests führte zu einer Produktbildung.

Auch hier ist unklar, weshalb die Reaktion nicht stattfand. Es ist möglich, dass das entsprechende Protein zum Erntezeitpunkt nicht mehr exprimiert war, die Synthese der Zichoriensäure in der Pflanze also abgeschlossen war. Im Rohextrakt kann dann keine Aktivität nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zu den beteiligten Proteinen, den Reaktionsmechanismen und dem Speicherort sind hier nötig.

3.1.8 Herstellung und Untersuchung von Kalluskulturen von *Cichorium intybus*

Für weitere Untersuchungen der Zichoriensäure-Biosynthese wurden Kalluskulturen der Zichorie (*Cichorium intybus*) angelegt. Dies geschah aus Samen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die Samen wurde bis zur Keimung im Lichtkulturraum bei 25 °C platziert. Die sterilen Keimlinge wurden anschließend zerschnitten und auf B5- und CB2-Festmedium überführt. Es folgte eine rasche Bildung von ersten Kalluszellen. Als die Zellen ein stetiges Wachstum zeigten, wurden diese geerntet und extrahiert (Kapitel 2.4.8). Nach Untersuchung der erhaltenen Extrakte mit HPLC zeigte sich kein Vorhandensein von Zichoriensäure, ähnlich, wie dies bereits bei Basilikum der Fall war.

3.1.9 Zusammenfassung der Untersuchung der Zichoriensäure-Biosynthese

Zichoriensäure ist eine phenolische Verbindung, welche in vielen Pflanzenfamilien vorkommt. So ist sie in der Zichorie (*Cichorium intybus*, Asteraceae) zu finden, aber auch in Basilikum (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae), sowie in *Equisetum arvense* (Equisetaceae) und *Arachis glabrata* (Fabaceae) (Lee und Scagel 2013).

Die Biosynthese der Zichoriensäure ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich stammt sie aus dem Phenylpropanoidweg und wird ähnlich der Rosmarinsäure gebildet (Petersen und Simmonds 2003). Auf Grund des Auffindens von Kaftarsäure, einer Zwischenstufe der Zichoriensäure-Biosynthese, kann davon ausgegangen werden, dass die Verknüpfung in zwei Schritten abläuft (Hohlfeld et al. 1996; Sullivan 2014). Der Biosyntheseweg ist in Abbildung 34 nochmals dargestellt. Da bisherige Untersuchungen an Proteinrohextrakten durchgeführt wurden, ist noch nicht klar, ob ein Enzym beide dieser Schritte katalysiert oder ob zwei Enzyme an der Biosynthese der Zichoriensäure beteiligt sind.

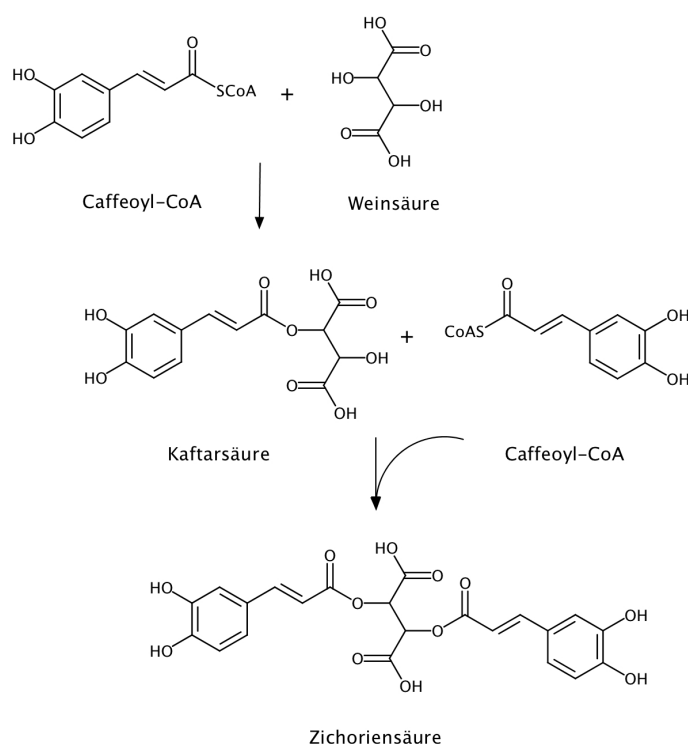


Abbildung 34

Bioynthese der Zichoriensäure (Dicaffeoylweinsäure), katalysiert durch eine Hydroxycinnamoyltransferase vom BAHD-Typ, jeweils unter Abspaltung von Coenzym A

Hohlfeld *et al.* (1996) konnten zeigen, dass es unter Verwendung eines Rohextrakts aus *Equisetum arvense* zu einer Bildung von Kaftar- und Zichoriensäure aus Caffeoyl-CoA und *m*-Weinsäure kommt. Sullivan (2014) hingegen nutzte L-Weinsäure für die Testung des Proteinrohextraktes aus *Arachis glabrata*. Für die Testung der Proteinrohextrakte aus Basilikum und Zichorie wurden aus diesem Grund sowohl *m*- als auch L- und D-Weinsäure verwendet. Keiner dieser Tests führte zu einer Bildung von Zichoriensäure. Gründe hierfür konnten bisher nicht gefunden werden, weitere Untersuchungen sind notwendig.

Weiterhin wurden Zellkulturen aus Basilikum und Zichorie etabliert. Die Untersuchung von Extrakten der Zellkulturen ergab, dass keine der Kulturen Zichoriensäure in einer nachweisbaren Menge enthielt. Auch eine Elicitierung der Basilikum-Suspensionskulturen mit Methyljasmonat führte lediglich zu einer Erhöhung des Rosmarinsäuregehaltes, nicht aber zu einer Bildung der Zichoriensäure. Dieses Phänomen, dass Zichoriensäure in der Pflanze, nicht aber in der Zellkultur enthalten ist, und sich eine Bildung auch nicht elicitorien lässt, ist bereits aus der Zichorie bekannt (Legrand et al. 2016).

Für die Aufklärung der Biosynthese der Zichoriensäure sind weitere Untersuchungen unerlässlich. Es ist nicht geklärt, wo die Biosynthese der Zichoriensäure stattfindet. Bisher wird angenommen, dass diese ähnlich der Rosmarinsäure abläuft, dass sie also im Zytosol gebildet und anschließend in der Vakuole gespeichert wird (Petersen 2013). Die Abwesenheit der Zichoriensäure in Kallus- und Suspensionskulturen liefert hingegen ein Indiz dafür, die Synthese möglicherweise anders abläuft. Die Isolierung des Hauptenzym der Biosynthese und die Proteinsequenzierung brächte die Möglichkeit, die Biosynthese zu verstehen und diese in verschiedenen Pflanzen zu untersuchen.

3.2 Untersuchungen an *Actaea racemosa*

3.2.1 Etablierung von Kalluskulturen von *Actaea racemosa*

Die Herstellung von Kalluskulturen von *Actaea racemosa* wurde sowohl mit Samen als auch mit Frischpflanzenmaterial versucht. Die Samen wurden hierfür desinfiziert und daraufhin in Petrischalen mit festem CB2-Medium ohne Hormone gelegt. Da bekannt ist, dass die Samen der Traubensilberkerze eine Stratifikation benötigen, wurde ein Teil der Samen zunächst für zwei Wochen bei Raumtemperatur, der zweite Teil direkt bei ca. 4 °C gelagert. Nach diesen zwei Wochen wurden die Samen bis zu drei Monate bei 4 °C gelagert und darauffolgend erneut bei Raumtemperatur. Da diese Behandlung zu keiner Keimung führte, wurde die Kältebehandlung mit anschließender Behandlung bei Raumtemperatur wiederholt, zuvor wurden die Samen auf frisches Medium überführt. Auch dies führte nicht zur Keimung. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich in dem allgemein schlechten Keimungsverhalten der Samen (Kaur et al. 2013) und der Tatsache, dass die Samen bis zu zwei Herbst-Winter-Wechsel benötigen, um auszukeimen (Albrecht und McCarthy 2011). Auch das Alter der Samen hat Einfluss auf die Keimfähigkeit. Je älter die Samen sind, desto schlechter ist ihre Keimfähigkeit (Albrecht und McCarthy 2007). Da die Samen über einen Samenhändler erhalten wurden, kann über das Alter der Samen keine Aussage gemacht werden.

Da das Auskeimen der Samen nicht erfolgreich war, wurde die Kallusinduktion an Frischpflanzen versucht. Die Pflanzen hierfür wurden im Alten Botanischen Garten der Universität Marburg geerntet. Nach der Desinfektion wurden die Stängel, Blätter und Rhizomstücke mit einem Skalpell zerschnitten und in Petrischalen mit B5 oder CB2 Medium verbracht. Diese wurden bei 25 °C inkubiert, um ein Wachstum von Kalluszellen zu induzieren. An einigen der Stücke bildeten sich feine Kalluszellen. Trotz des regelmäßigen Überimpfens auf frisches Medium und konstanten Kultivierungsbedingungen, stellten die Zellen nach einiger Zeit das Wachstum ein. Der Grund hierfür konnte leider nicht gefunden werden, jedoch ist dieses Phänomen bei der Kallusinduktion bereits innerhalb der Arbeitsgruppe bekannt.

Die Etablierung einer Zellkultur von *Actaea racemosa* war folglich nicht erfolgreich, weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit frischem oder gefrorenem Pflanzenmaterial durchgeführt.

3.2.2 Synthese von Hydroxycinnamoyl-CoA Estern

Die Synthese der Hydroxycinnamoyl-CoA Ester über ein Succinimid-Intermediat erfolgte nach der Methode von Stöckigt und Zenk (1975) mit anschließender Aufreinigung über eine Festphase (Kapitel 2.4.4). Folgende CoA-Ester konnten synthetisiert werden: Cinnamoyl-, *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Feruloyl-, Isoferuloyl-, Sinapoyl-, 3,4-Dimethoxycinnamoyl- und 3,4-Dihydroxybenzoyl-CoA. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und auf 2,5 mM bzw. 5 mM eingestellt.

Ein Versuch der CoA-Estersynthese über den Zwischenschritt der Anhydridbildung erfolgte wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Es konnte lediglich Caffeoyl-CoA in einer geringen Konzentration synthetisiert werden. Für die anderen CoA-Ester war diese Methode nicht geeignet.

3.2.3 Isolierung von Piscidinsäure

Die Isolierung der Piscidinsäure aus *Quillaja saponaria* Extrakten erfolgte wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Die Verifizierung des Isolationsproduktes erfolgte mittels LC-MS. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 35 zusehen. Im UV-Chromatogramm (Abbildung 35A) ist ein deutlicher Peak zu erkennen. Die Masse der Piscidinsäure beträgt 256,05, im negativen Modus gemessen entspricht dies einem m/z von 255,04. In Abbildung 35B ist das Extracted Ion Chromatogramm für m/z 255,049 (aufgerundet 255,05) zu sehen. Die Retentionszeit des Massepeaks entspricht dem des Hauptpeaks im UV-Chromatogramm. Es handelt sich bei dem Isolierungsprodukt um Piscidinsäure.

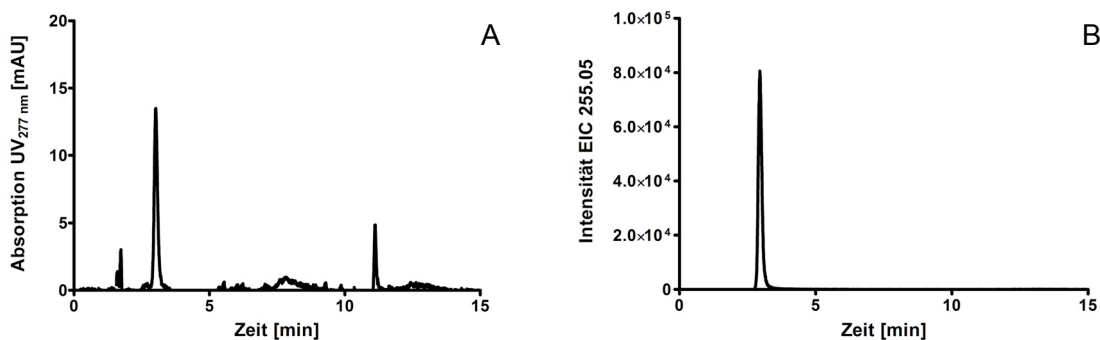


Abbildung 35

Ergebnis der LC-MS Untersuchung der isolierten Piscidinsäure

A: UV-Chromatogramm der LC-MS bei 277 nm

B: Extracted Ion Chromatogramm für eine Masse von m/z 255,05 [M-H⁺]

Da der molare Absorptionskoeffizient bekannt ist, konnte die Konzentration der isolierten Säure berechnet werden. Piscidinsäure musste hierfür in Methanol gelöst werden. Es ergab sich eine Konzentration von 2,67 mM.

3.2.4 Isolierung von Fukinsäure

Zur Isolierung der Fukinsäure wurde zunächst Fukinolsäure aus *Petasites japonicus* Blättern extrahiert (Kapitel 2.4.6). Nachdem das Isolierungsergebnis mit LC-MS kontrolliert worden war (Abbildung 36), erfolgte eine Hydrolyse. Diese kann zunächst alkalisch geschehen (Sakamura et al. 1973). Die Untersuchung mit LC-MS ergab, dass sich lediglich Fukinolsäure in der Probe befand, eine Hydrolyse zu Fukinsäure fand nicht statt. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Hydrolyseversuch mit Rhozyme HP-150 durchgeführt. Es handelt sich um ein Enzymgemisch, welches üblicherweise zur Protoplastierung verwendet wird, jedoch konnten Petersen und Alfermann (1988) zeigen, dass sich dieses Gemisch auch zur Hydrolyse der Rosmarinsäure eignet.

Die Untersuchung mit LC-MS ergab, dass weder Fukinsäure noch Fukinolsäure enthalten waren. Vermutlich führten die vielfältigen Enzyme des Gemisches zu einem vollständigen Abbau der Fukinolsäure.

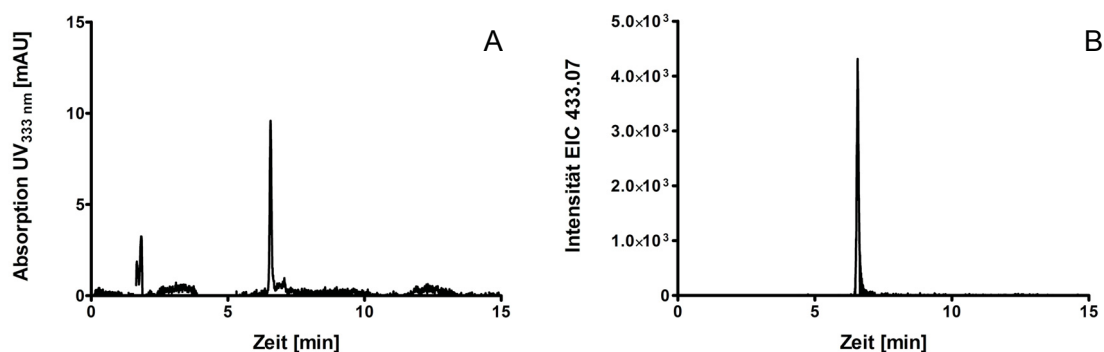


Abbildung 36

Ergebnis der LC-MS Untersuchung der isolierten Fukinolsäure

A: UV-Chromatogramm der LC-MS bei 333 nm

B: Extracted Ion Chromatogramm für eine Masse von m/z 433,07 $[M-H^+]$

Die Isolierung der Fukinsäure war nicht erfolgreich. Weitere Versuche zur Isolierung aus Pflanzen oder die chemische Synthese sind notwendig. Eine chemische Synthese wurde bereits von Queffelec *et al.* (2008) beschrieben.

3.2.5 Klonierung einer Hydroxycinnamoyltransferase aus *Actaea racemosa*

Die in der Datenbank hinterlegte Sequenz (GenBank GU254280) ist vermutlich eine BAHD-Hydroxycinnamoyltransferase (Spiering et al. 2011). Die Sequenz enthält 1347 Basenpaare, welche ein Protein von 448 Aminosäuren mit einer abgeleiteten Molekularmasse von 49,7 kDa kodieren. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 7,42.

Auf Grundlage der gefundenen Sequenz wurden Vollängenprimer entworfen, welche bereits Schnittstellen für eine spätere Ligation enthalten. Bei der Auswahl der entsprechenden Schnittstellen wurden die Gensequenz und der später verwendete Expressionsvektor (pET15b) berücksichtigt.

Zunächst wurde genomische DNA aus Blättern von *Actaea racemosa* extrahiert. Hierfür wurden die Blätter zunächst mit Wasser gewaschen und die DNA gemäß des Protokolls (Kapitel 2.5.4) isoliert. Es konnte DNA in einer Konzentration bis 300 ng/µl isoliert werden. Bis zu 1 µg der DNA wurde für die Durchführung der PCR mit den entworfenen Primern verwendet.

Für die PCR wurde ein Temperaturgradient von 52-60 °C verwendet. Wie in Abbildung 37 zu erkennen, lieferte jede dieser Annealingtemperaturen ein Produkt mit einer Größe von ca. 1300 Basenpaaren.

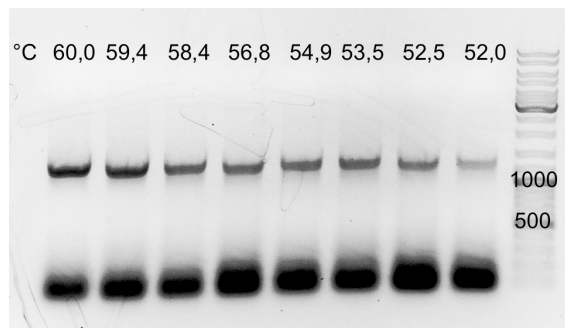


Abbildung 37

Agarose-Gelelektrophorese der PCR mit gDNA von *Actaea racemosa* mit Vollängenprimern für ArCAS. Das gewünscht Produkt hat eine Länge von ca. 1300 Basenpaaren.

Das so erhaltene PCR-Produkt wurde aus dem Gel extrahiert und in den pDrive Vektor ligiert. Nach Ligation und Transformation von *E. coli* EZ Zellen wurde ein Restriktionsverdau mit XhoI und NdeI durchgeführt. Jede der untersuchten Kolonien enthielt ein Produkt mit einer Größe von ca. 1300 bp (Abbildung 38).

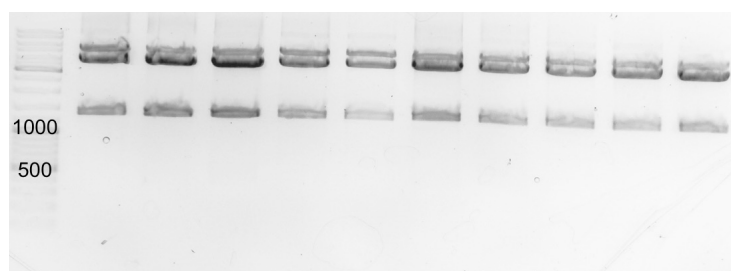


Abbildung 38

Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdau von ArCAS im pDrive-Vektor mit XhoI und NdeI.

Nach Sequenzierung ausgewählter Plasmide und einem Alignment mit der Ursprungssequenz, ist zu erkennen, dass die PCR erfolgreich war. In Abbildung 39 ist dieses Alignment abgebildet. In Grau unterlegt sind sieben Nukleotide, welche im Vergleich zur Ursprungssequenz verändert sind. Da die PCR mit der GoTaq-Polymerase durchgeführt wurde, könnten diese Veränderungen in der Sequenz dadurch zustande kommen, allerdings liegt die durchschnittliche Fehlerrate von Taq-Polymerasen bei 1 von 9000 Nukleotiden (Tindall und Kunkel 1988).

Dies lässt darauf schließen, dass die veränderten Nukleotide vermutlich durch natürlich auftretende Mutationen in der Pflanze zu Stande kommen.

Diese sieben veränderten Nukleotide resultieren in drei Aminosäure-Veränderungen. Ein Alignment der translatierten Originalsequenz mit jener der ArCAS ist in Abbildung 40 dargestellt. In Grau unterlegt sind die veränderten Aminosäuren. Durch diese Veränderungen beträgt die Molekularmasse nun 50,0 kDa mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von pH 7,68.

Da das aktive Zentrum der BAHD-Hydroxycinnamoyltransferasen das Histidin im HXXXDG-Motiv ist und keine der drei veränderten Aminosäuren sich an dieser Stelle befindet, kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Veränderung der Aktivität kommt. Da aber die Ursprungssequenz nicht auf Aktivität getestet wurde, kann auch hier nicht gesagt werden, ob das daraus resultierende Protein aktiv wäre. In Kapitel 3.2.6 wird diese Änderung jener drei Aminosäuren vergleichend in den Proteinstrukturmodellen besprochen.

```

GU254280 ATGGTGTGCATCAAGAGTCTTGTGTTGTTAAGCCTAGTGAGCCAACCCCAATGTCAA 60
ArHCT ATGGTGTGCATCAAGAGTCTTGTGTTGTTAAGCCTAGTGAGCCAACCCCAATGTCAA 60
*****

GU254280 CTTTCTTACCAGAAAGTGACCAGGTCAAGCCATGGACACATGCACCGTATTCTTCGTT 120
ArHCT CTTTCTTACCAGAAAGTGACCAGGTCAAGCCATGGACACATGCACCGTATTCTTCGTT 120
*****

GU254280 TACCAGCCAGAAGTCGATAACTCAGTTTCAACATCTCTGAAAACCTCAAGTTTCATTA 180
ArHCT TACCAGCCAGAAGTCGATAACTCAGTTTCAACATCTCTGAAAACCTCAAGTTTCATTA 180
*****

GU254280 AGCCGTGCATGGTACCGTACTACCCATTAGCCGGCGTTTGAATGGTATTGGTGGAGGC 240
ArHCT AGCCGTGCATGGTACCGTACTACCCATTAGCCGGCGTTTGAATGGTATTGGTGGAGGC 240
*****

GU254280 CGATTGAGCTTCATTGCAACACGATGGGGCTGTGATTATCGAAGCTGAATCAGATGCC 300
ArHCT CGATTGAGCTTCATTGCAACACGATGGGGCTGTGATTATCGAAGCTGAATCAGATGCC 300
*****

GU254280 CGACTCGAAGATTTTGGTGACTTTCGCCCCACATCGGAGACAATAAAGTAGCACCTTAT 360
ArHCT CGACTCGAAGATTTTGGTGACTTTCGCCCCACATCGGAGACAATAAAGTAGCACCTTAT 360
*****

GU254280 GTTGATTACGCTAAAGATGTTAGTGAGTTGCCTTTGTACTAGTGCAACTCACTAGGTT 420
ArHCT GTTGATTACGCTAAAGATGTTAGTGAGTTGCCTTTGTACTAGTGCAACTCACTAGGTT 420
*****

GU254280 AAGTGTGGTGGTATTGGCATTGGAATAGCTATGTCATATCGTATCGGATGGAAGGG 480
ArHCT AAGTGTGGTGGTATTGGCATTGGAATAGCTATGTCATATCGTATCGGATGGAAGGG 480
*****

GU254280 GCATTGGATTTATTACTACATGGGCGAAAATTAACCGCGGTGAGAAAGGGATTATTGAA 540
ArHCT GCATTGGATTTATTACTACATGGGCGAAAATTAACCGCGGTGAGAAAGGGATTATTGAA 540
*****

GU254280 CCTTTTCATGATCGAACAGCTTTTACAAAGGTGACCCACGGCAAAACCGCGCTGTGAT 600
ArHCT CCTTTTCATGATCGAACAGCTTTTACAAAGGTGACCCACGGCAAAACCGCGCTGTGAT 600
*****

GU254280 CACGTCGAGCTCAAAGTTACCCCGTCTTGCTTGAAACAAAAGCGGAAGGAAGAGCGG 660
ArHCT CACGTCGAGCTCAAAGTTACCCCGTCTTGCTTGAAACAAAAGCGGAAGGAAGAGCGG 660
*****

GU254280 GCGAAGGAAACTACGACAAGAATGTTGAACCTGTCGAAAATCAAGTTGACAAACTCAAG 720
ArHCT GCGAAGGAAACTACGACAAGAATGTTGAACCTGTCGAAAATCAAGTTGACAAACTCAAG 720
*****

GU254280 GAAAAATCCAATCTAGGTAAACCAAGGATTACGTTGGTCTGAGTATTCTAGGTTGAA 780
ArHCT GAAAAATCCAATCTAGGTAAACCAAGGATTACGTTGGTCTGAGTATTCTAGGTTGAA 780
*****

GU254280 GCCATGTCGGGCACATTTGGAGATGTGCATCCAAGGCACGTAGGCATGAAAATGAACAA 840
ArHCT GCCATGTCGGGCACATTTGGAGATGTGCATCCAAGGCACGTAGGCATGAAAATGAACAA 840
*****

GU254280 TTAACGCTTTGCGCATAACAATGATTGTCGCAACCGTTTACGTCCTCTGCCACCG 900
ArHCT TTAACGCTTTGCGCATAACAATGATTGTCGCAACCGTTTACGTCCTCTGCCACCG 900
*****

GU254280 AGGTACTCCGAAATGCCACAATGGTTACAACATCAATAGCTGAATCTGGCGAGCTCCTG 960
ArHCT AGGTACTCCGAAATGCCACAATGGTTACAACATCAATAGCTGAATCTGGCGAGCTCCTG 960
*****

GU254280 TCAAATCCATTGGGCTTGGCTTTGTATGTAGTGTGATCCGAAAATGCATCGACAAGGTC 1020
ArHCT TCAAATCCATTGGGCTTGGCTTTGTATGTAGTGTGATCCGAAAATGCATCGACAAGGTC 1020
*****

GU254280 GACGATGATTACATAAAATCAGCAACGGATTCTTGATTAGTCAAGATGATTGACTCCA 1080
ArHCT GACGATGATTACATAAAATCAGCAACGGATTCTTGATTAGTCAAGATGATTGACTCCA 1080
*****

GU254280 TATAGGCTGGATTCCACAATGTTGGTTCTACTGAAGGGGTTTTTCTTGGCAATCCAAT 1140
ArHCT TATAGGCTGGATTCCACAATGTTGGTTCTACTGAAGGGGTTTTTCTTGGCAATCCAAT 1140
*****

GU254280 TTAGCAATAACAAGTTGGGTCGGACTACCCATTAATGATGTGGATTTTGGATGGGAAAG 1200
ArHCT TTAGCAATAACAAGTTGGGTCGGACTACCCATTAATGATGTGGATTTTGGATGGGAAAG 1200
*****

GU254280 CCCATTACATGGGCCCTACAGCTCTAGGTTATGATGGAAGTGTGATATTCCCGGG 1260
ArHCT CCCATTACATGGGCCCTACAGCTCTAGGTTATGATGGAAGTGTGATATTCCCGGG 1260
*****

GU254280 AAAGATGATGGGTCAGTTATTGTCCCTATCCGCTACAGGTGGCTCACATTGATGACTTC 1320
ArHCT AAAGATGATGGGTCAGTTATTGTCCCTATCCGCTACAGGTGGCTCACATTGATGACTTC 1320
*****

GU254280 GAGAAATTTTTTATGAAGATATTTGA 1347
ArHCT GAGAAATTTTTTATGAAGATATTTGA 1347
*****
    
```

Abbildung 39
 Alignment des Sequenzierungsergebnisses der ArCAS mit der Ursprungssequenz (GU254280).
 Grau unterlegt: Unterschiede der beiden Sequenzen

GU254280	MVCIKSSCVVKPSEPTPNVKLFLPESDQVKPWTAPVFFVYQPEVDNSVSTLENLKFSL	60
ArHCT	MVCIKSSCVVKPSEPTPNVKLFLPESDQVKPWTAPVFFVYQPEVDNSVSTLENLKFSL	60

GU254280	SRALVYYYPLAGRLNGIGGRFELHCNTMGAVII EAESDARLEDFGDFRPTSETTKLAPY	120
ArHCT	SRALVYYYPLAGRLNGIGGRFELHCNTMGAVII EAESDARLEDFGDFRPTSETTKLAPY	120

GU254280	VDYAKDVSELPLLLVQLTRFKCGGIGIGIAMSHIVSDGKGAFGFITTWAKINRGEKGIIE	180
ArHCT	VDYAKDVSELPLLLVQLTRFKCGGIGIGIAMSHIVSDGKGAFGFITTWAKINRGEKGIIE	180

GU254280	PFHDRTAFYKGDPTAKPRCDHVELKGYPVLLGNKSAKEERAKETTRMLNLSKNQVDKLLK	240
ArHCT	PFHDRTAFYKGDPTAKPRYDHVELKGYPVLLGNKSAKEERAKETTRMLNLSKNQVDKLLK	240

GU254280	EKSNLKGPKDYVGREYSRFEAMSGHIWRCASKARRHENEQLTSLRITIDCRNLRPPLPP	300
ArHCT	EKANLKGPKDYVGREYSRFEAMSGHIWRCASKARRHENEQLTSLRITIDCRNLRPPLPP	300

GU254280	RYSGNATMVTTSIAESGELLSNPLGLGFVCSVIRKIDKVDDDYIKSATDFLISQDDLTP	360
ArHCT	RYSGNATMVTTSIAESGELLSNPLGLGFVCSVIRKIDKVDDDYIKSATDFLISQDDLTP	360

GU254280	YRSGFHNVGSTEGVFLGNPNLAITSWVGLPINDVDFGWGKPIYMGPTALGYDGKLLIIPG	420
ArHCT	YRSGFHNVGSTEGVFLGNPNLAITSWVGLPINDVDFGWGKPIYMGPTALGYDGKLLIIPG	420

GU254280	KDDGSVIVPIRLQVAHIDDFEKFFYEDI 448	
ArHCT	KDDGSVIVPIRLQVAHIDDFEKFFYEDI 448	

Abbildung 40

Alignment der translatierten Sequenzen der ArCAS mit der Ursprungssequenz (GU254280). Grau unterlegt sind die veränderten Aminosäuren.

Da sich die ArCAS-Volllänge nach diesem Schritt im Klonierungsvektor (pDrive) befand, wurde ein erneuter Restriktionsverdau mit NdeI und XhoI durchgeführt, um das PCR-Produkt zu erhalten. Der Zielvektor (pET15b) wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut. Der Verdau wurde über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Banden des geschnittenen Vektors und des PCR-Produkts extrahiert. Anschließend erfolgte eine Ligation der ArCAS in den pET15b Vektor. Als Expressionsstamm wurden SoluBL21™ Zellen ausgewählt, welche mit dem Plasmid transformiert wurden. Nach einer Kontrolle der Transformation durch eine Plasmid-isolation mit anschließendem Restriktionsverdau, wurde eine Glycerol-Dauerkultur angelegt.

3.2.6 Proteinstruktur-Modell

Mit Hilfe von Phyre2, einer Online-Software, welche durch den Sequenzvergleich mit bekannten Proteinstrukturen durchführt, wurde ein Modell des Proteins erstellt (Kelley et al. 2015). Dieses Modell ist in Abbildung 41A zu sehen. Als Grundlage dieses Modells dienten verschiedene Hydroxycinnamoyltransferasen, in Abbildung 41B und C sind exemplarisch zwei dieser Proteine zu sehen. Es handelt sich dabei um eine HSQT aus *Coffea canephora* (pdb 4G0B) und eine HST aus *Sorghum bicolor* (pdb 4KE4).

Der Unterschied dieser beiden zueinander lässt sich unter anderem im blauen Loop-Bereich der Strukturen erkennen. In diesem Bereich ähnelt das Modell der ArCAS dem der HSQT. Auch im Bereich der roten Faltblätter lässt sich ein Unterschied erkennen. Im Bereich der gelben Helices ist zu sehen, dass die der ArCAS eine andere Ausrichtung aufweisen, als die der anderen HCTs. Dies könnte ein Grund für die Unterschiedlichkeit der Substrate dieser Enzyme sein. Ob diese Struktur jedoch relevant für Substratbindung ist, ist nicht geklärt.

Da es sich um ein Modell auf Grundlage anderer Kristallstrukturen handelt, sind Aussagen über den Zusammenhang zwischen Proteinmodell und Substraten eher hypothetischer Natur. Eine sichere Auskunft über die genaue Proteinstruktur könnten Kristallstrukturanalysen, idealerweise mit gebundenem Substrat, geben.

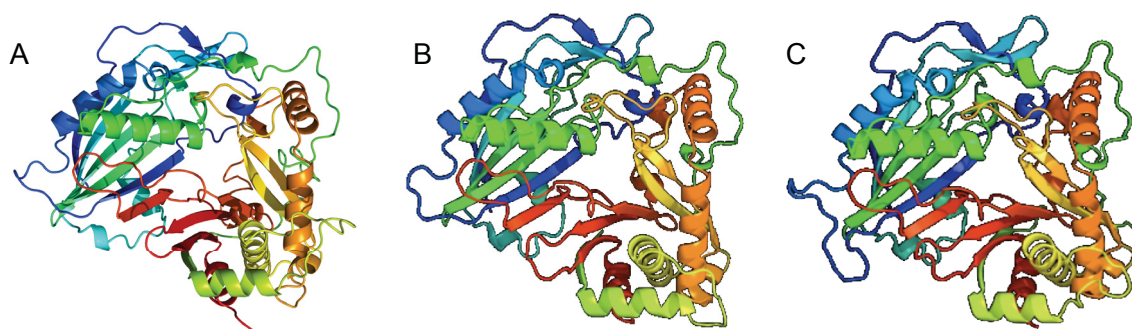


Abbildung 41

Proteinmodell der ArCAS und beispielhaft die Modelle zweier Vergleichssequenzen erstellt mit Phyre2

A: Modell ArCAS, B: HSQT aus *Coffea canephora* (pdb 4G0B) (Lallemand et al. 2012), C: HST aus *Sorghum bicolor* (pdb 4KE4) (Walker et al. 2013).

In Abbildung 42 sind die Proteinstrukturmodelle der ArCAS und der Originalsequenz gegenüber gestellt.

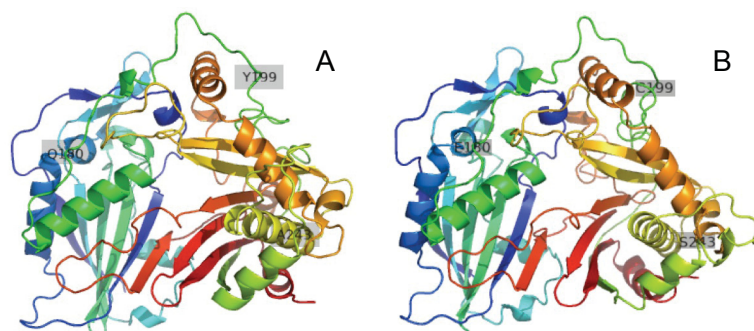


Abbildung 42

Vergleich der Proteinstrukturmodelle der ArCAS (A) mit dem Modell der Originalsequenz (B) erstellt mit Phyre2. Grau unterlegt sind die drei Aminosäuren, welche die beiden Sequenzen unterscheiden.

Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, unterscheiden sich diese zwei Sequenzen lediglich in drei veränderten Aminosäuren. Es handelt sich hierbei um eine Änderung der Aminosäure 180 von Glutamat (E) zu Glutamin (Q), 199 von Cystein (C) zu Tyrosin (Y) und 243 von Serin (S) zu Alanin (A).

Da gerade die Änderung einer schwefelhaltigen Aminosäure zu einer aromatischen Aminosäure wie Tyrosin die Struktur und damit unter Umständen auch die Substratbindung beeinflussen könnte, sind diese drei Aminosäuren in Abbildung 42 grau unterlegt. Wie zu erkennen, befinden sich diese drei Aminosäuren nicht Bereich der Helices und Faltblätter, sondern im Loop-Bereich und dürften somit keinen Einfluss auf die Proteinaktivität und Substratbindung haben.

3.2.7 Expression der ArCAS

Für die Expression der ArCAS wurde zunächst aus der Glycerol-Dauerkultur eine Übernachtskultur angelegt, welche am nächsten Tag in 100 ml LB-Medium, versetzt mit 100 μ M Ampicillin, überführt wurde. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 UpM inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,5 erreicht war. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Die weitere Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37 °C über Nacht und 220 UpM. Am nächsten Tag wurden die Zellen aufgeschlossen und das Protein über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Die Expression wurde durch eine SDS-PAGE überprüft (Kapitel 2.6.6). Im SDS-Gel war nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 zu erkennen, dass Protein gebildet wurde, dieses allerdings bereits in der Waschfraktion 10 eluiert wurde (Abbildung 43), die Elutionsfraktion enthielt deshalb kaum Protein.

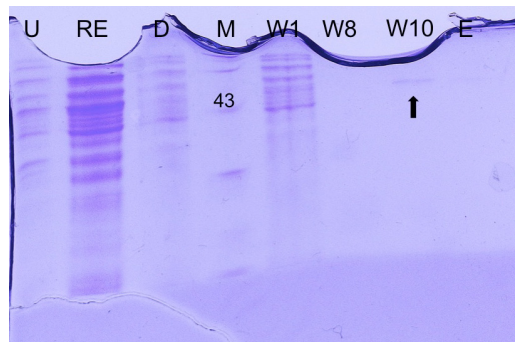


Abbildung 43

Erste Expression (SoluBL21, LB-Medium, 1 mM IPTG, 37 °C) und Aufreinigung der ArCAS

U: Unlöslicher Rückstand, RE: Rohextrakt, D: Durchlauf, M: Marker, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion mit Zielprotein, markiert durch Pfeil

Für weitere Aufreinigungen wurde deshalb auf das Waschen mit Waschpuffer 2 verzichtet. Da die Menge an Protein eher gering war, wurden die Expressionsbedingungen optimiert. Zunächst wurde die Expressionstemperatur von 37 °C auf 25 °C gesenkt. Für eine bessere Belüftung der Zellen wurde ein Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. In einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen werden 100 ml LB-Medium gegeben. In Abbildung 44 ist das Ergebnis dieser ersten Optimierung zu erkennen. In der Elutionsfraktion ist eine Bande bei ungefähr 50 kDa zu sehen, dies entspricht der erwarteten Größe. Auch zu erkennen ist, dass sich im unlöslichen Rückstand keine größere Menge des Zielproteins befindet.

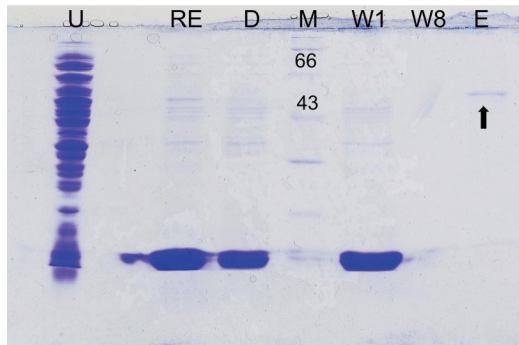


Abbildung 44

SDS-Gel der Expression von ArCAS bei 25 °C im Schikanekolben mit LB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG

U: Unlöslicher Rückstand, RE: Rohextrakt, D: Durchlauf, M: Marker, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion mit Zielprotein, markiert durch Pfeil

Um den Einfluss der eingesetzten IPTG-Konzentration auf die Proteinmenge zu untersuchen, wurde eine weitere Testreihe durchgeführt. Es wurde eine Übernachtskultur der ArCAS angelegt und diese in vier Schikanekolben mit je 100 ml LB-Medium überführt. Alle vier Suspensionen wurden entsprechend bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit 0,1; 0,5; 1 und 5 mM IPTG induziert.

Die Kulturen wurden über Nacht bei 25 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Aufreinigung und SDS-PAGE zeigte sich, dass 1 mM IPTG die beste Induktionwirkung zeigt.

Um den Einfluss des Mediums auf die Proteinmenge zu untersuchen, wurde ein weiterer Versuch mit je 100 ml LB- und TB-Medium durchgeführt. Nach Expression und Aufreinigung wurde die Proteinmenge bestimmt. Während die Kultur in LB-Medium 0,36 mg/ml Protein enthielt, stieg die Proteinmenge im TB-Medium auf 0,59 mg/ml und verdoppelte sich nahezu. Auf dem SDS-Gel (Abbildung 45A) und im Westernblot (Abbildung 45B) ist eine deutliche Proteinbande in der Elutionsfraktion zu erkennen. Um eine deutlichere Proteinbande zu erhalten, wurde für dieses SDS-Gel und den Westernblot eine TCA-Fällung mit 250 µl der Elutionsfraktion durchgeführt, welche in 50 µl rückgelöst wurde.

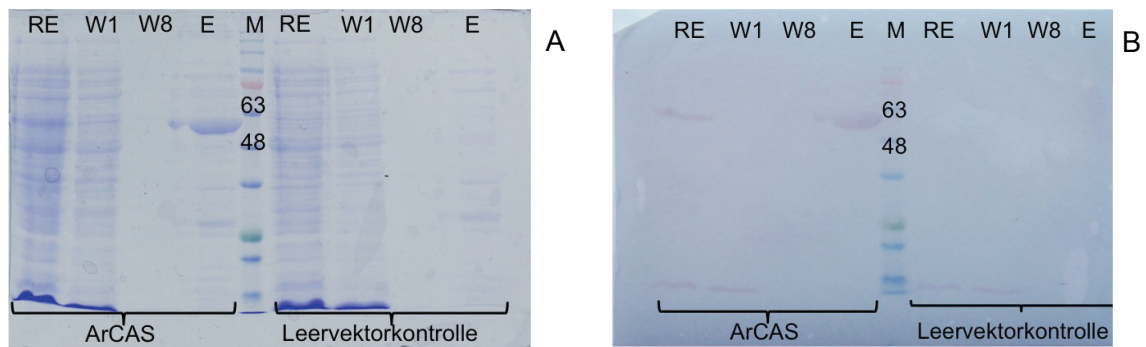


Abbildung 45

SDS-Gel nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 (A) und Westernblot (B) der Expression von ArCAS und einer Kontrolle mit dem Leervektor bei 25 °C im Schikanekolben mit TB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG nach TCA-Fällung der Elutionsfraktion

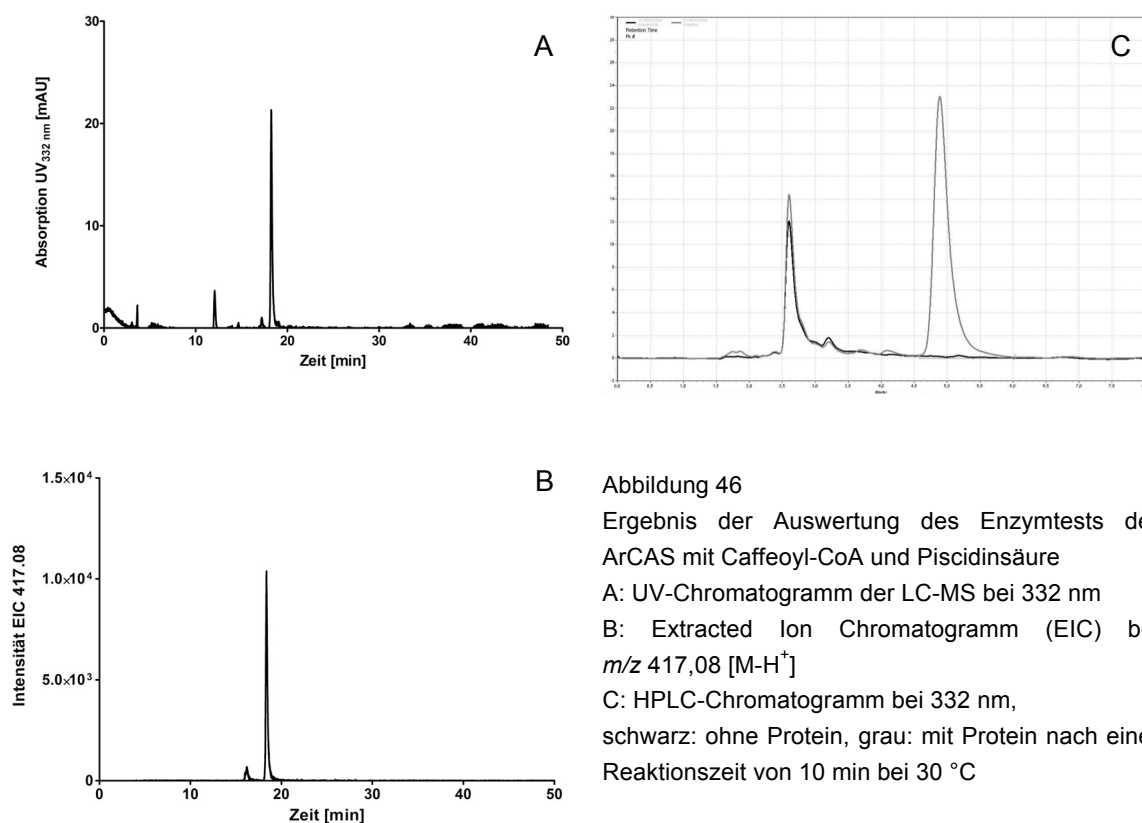
M: Marker, RE: Rohextrakt, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion

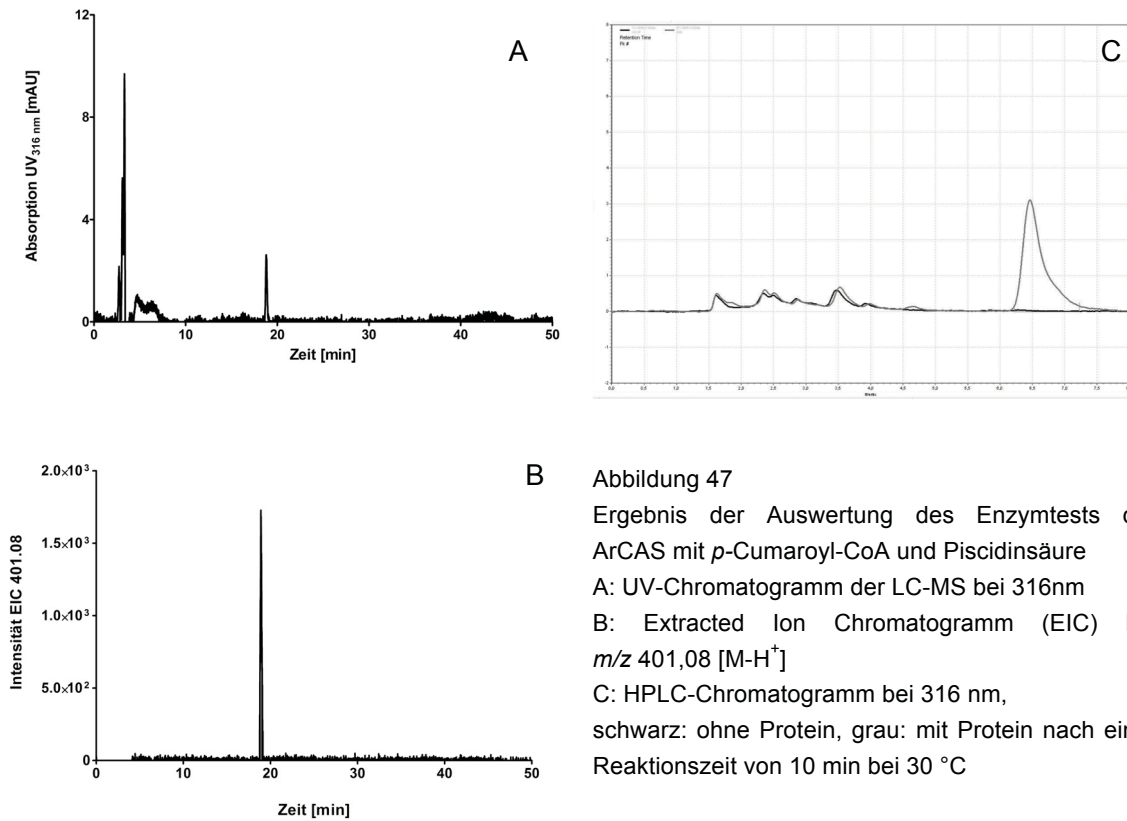
Zusammenfassend ist die Expression bei 25 °C in TB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG am besten geeignet, um das Protein zu exprimieren.

3.2.8 Bestimmung der Enzymaktivität der ArCAS

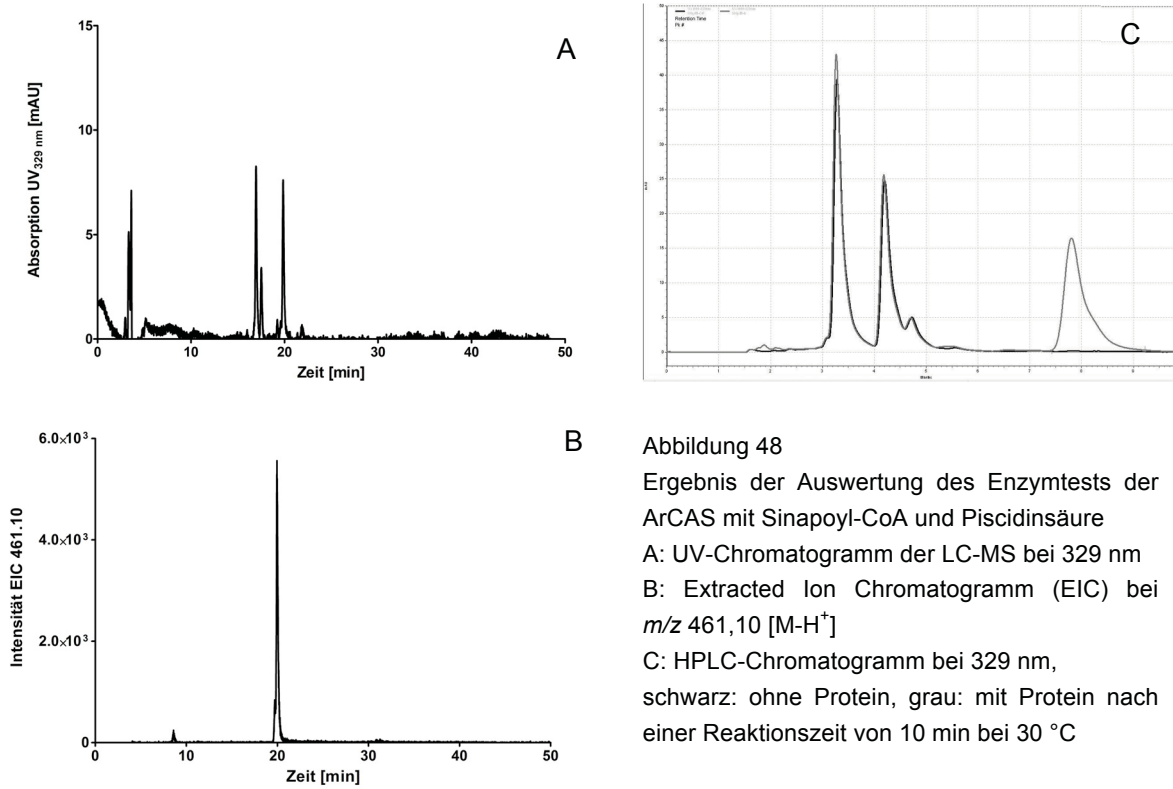
Nachdem das Protein aufgereinigt vorlag und auch ein Teil der Substrate isoliert bzw. synthetisiert werden konnte, fand ein erster Enzymtest statt.

Hierfür wurde das Protein mit Caffeoyl-CoA und Piscidinsäure für bis zu 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung mit HPLC und anschließender Untersuchung mit LC-MS zeigt, dass Caffeoylpiscidinsäure, CA PK, entstand. In Abbildung 46A und B ist das Ergebnis der LC-MS-Analyse zu erkennen. Mit einer Masse von m/z 471,08 entspricht das Reaktionsprodukt der erwarteten CA PK. In Abbildung 46C ist das HPLC-Chromatogramm des Enzymtests mit und ohne Protein dargestellt. Dies zeigt, dass die Bildung von CA PK enzymatisch gesteuert abläuft, da ohne Protein kein Produkt entsteht. Weitere CoA-Ester wurden getestet, hierbei zeigte sich, dass lediglich *p*-Cumaroyl-CoA (Abbildung 47A, B und C), Sinapoyl-CoA (Abbildung 48A, B und C) sowie Feruloyl-CoA (Abbildung 49A, B und C) akzeptiert wurden. Mit Cinnamoyl-, Isoferuloyl-, 3,4-Dihydroxycinnamoyl- und Dihydroxybenzoyl-CoA zeigte sich keine Produktbildung.





B Abbildung 47
 Ergebnis der Auswertung des Enzymtests der ArCAS mit *p*-Cumaroyl-CoA und Piscidinsäure
 A: UV-Chromatogramm der LC-MS bei 316 nm
 B: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) bei m/z 401,08 [M-H⁺]
 C: HPLC-Chromatogramm bei 316 nm, schwarz: ohne Protein, grau: mit Protein nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 30 °C



B Abbildung 48
 Ergebnis der Auswertung des Enzymtests der ArCAS mit Sinapoyl-CoA und Piscidinsäure
 A: UV-Chromatogramm der LC-MS bei 329 nm
 B: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) bei m/z 461,10 [M-H⁺]
 C: HPLC-Chromatogramm bei 329 nm, schwarz: ohne Protein, grau: mit Protein nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 30 °C

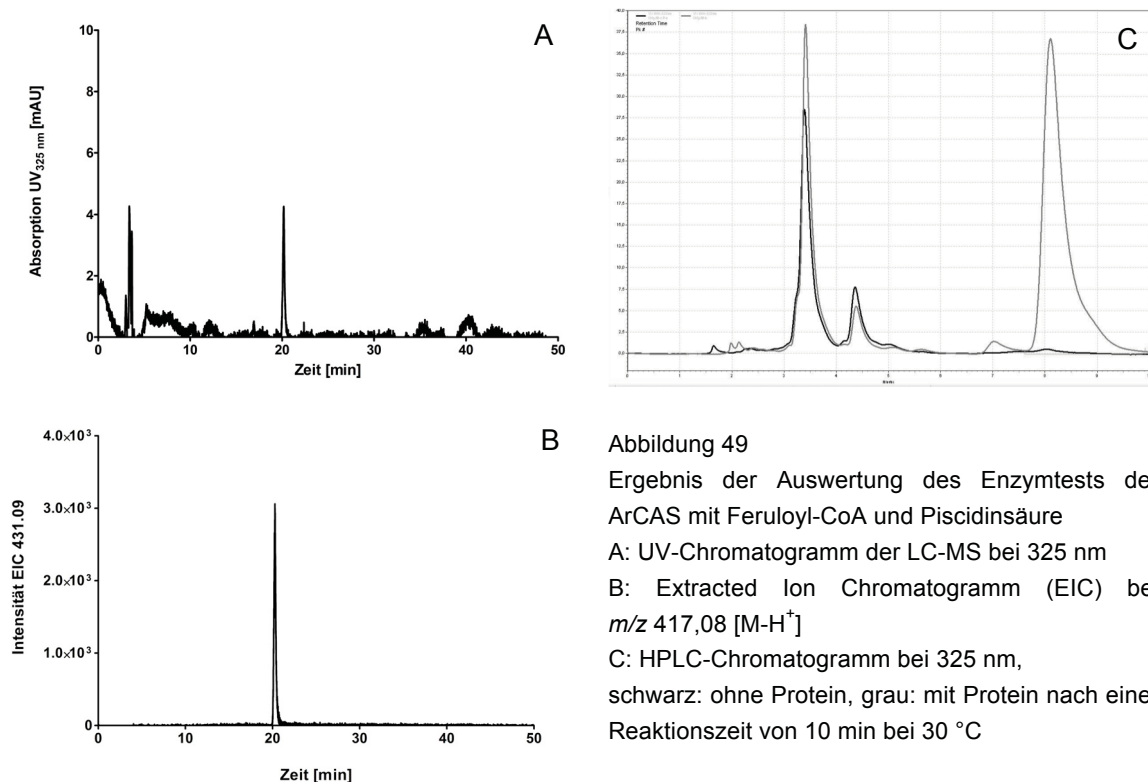


Abbildung 49
 Ergebnis der Auswertung des Enzymtests der ArCAS mit Feruloyl-CoA und Piscidinsäure
 A: UV-Chromatogramm der LC-MS bei 325 nm
 B: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) bei m/z 417,08 [M-H⁺]
 C: HPLC-Chromatogramm bei 325 nm, schwarz: ohne Protein, grau: mit Protein nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 30 °C

Auch andere Hydroxycinnamoyltransferasen zeigen dieses Verhalten, dass nicht alle angebotenen Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester akzeptiert werden. Eine RAS und eine HST aus *Coleus blumei* akzeptierten ebenfalls *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Feruloyl- sowie Sinapoyl-CoA jedoch weder Acetyl-, Malonyl-, Benzoyl- noch Anthraniloyl-CoA (Sander und Petersen 2011). Eine RAS aus Lavendel (*Lavandula angustifolia*) zeigte eine ähnliche Substratazeptanz (Landmann et al. 2011). Keines der angesprochenen Enzyme wurde allerdings mit Isoferuloyl-, 3,4-Dimethoxycinnamoyl- oder 3,4-Dihydroxybenzoyl-CoA getestet. Es ist also fraglich, ob diese Substrate, welche von ArCAS nicht akzeptiert wurden, von diesen Enzymen akzeptiert werden würden.

Interessant ist jedoch, dass jene CoA-Ester, die akzeptiert wurden, eine freie Hydroxy-Gruppe in *para*-Position besitzen. Möglicherweise ist diese Hydroxygruppe für die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms vonnöten. So besitzt Isoferulasäure zwar eine freie Hydroxygruppe, doch befindet sich diese, im Gegensatz zur Ferulasäure, in *meta*-Position. Zimtsäure hingegen besitzt keine Substitution am aromatischen Ring und wird, ebenso wie die zweifach methoxylierten Aromaten, nicht akzeptiert. Für die Untersuchung, welche Rolle diese Hydroxygruppe bei der Bindung spielt, können Kristallisationsversuche durchgeführt werden oder auch Mutationen im aktiven Zentrum vorgenommen werden, um zu klären, wie die Bindung der Substrate in der Bindetasche abläuft.

3.2.9 Testung der Substratspezifität der ArCAS

Wie im Stammbaum der ArCAS im Vergleich mit anderen HCTs zu sehen ist (Kapitel 3.2.14 Abbildung 56), gibt es Enzyme, zu welchen eine nahe Verwandtschaft besteht. Um zu sehen, ob die Substrate dieser Enzyme auch von der ArCAS akzeptiert werden, wurden mit diesen und strukturähnlichen Substraten Enzymtests durchgeführt (Kapitel 2.6.9.2). Hierfür wurden Caffeoyl-CoA und je eines der Substrate (Tabelle 10) verwendet. Die Tests wurden mittels HPLC bei einer Wellenlänge von 333 nm ausgewertet.

Keines der getesteten Substrate zeigte eine Produktbildung. In Abbildung 50 sind beispielhaft für alle getesteten Substrate die Chromatogramme des Tests mit Spermidin und Caffeoyl-CoA nach 0 und 10 min Reaktionszeit dargestellt.

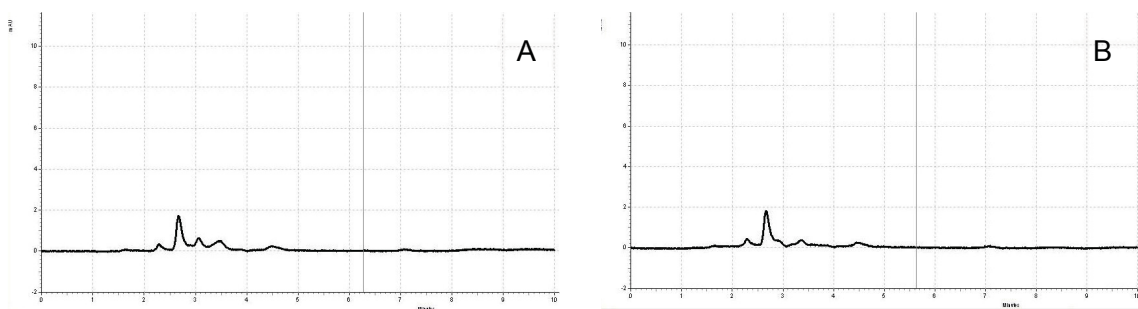
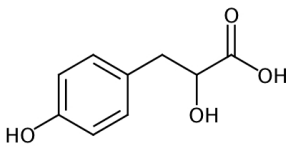
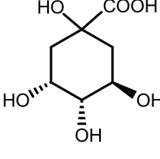
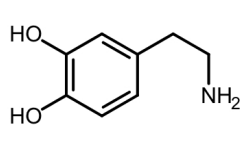
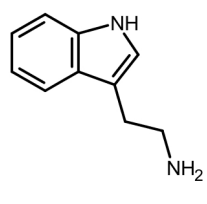
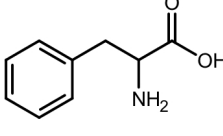
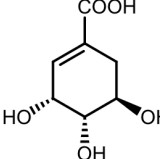
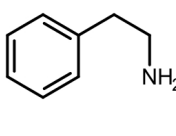
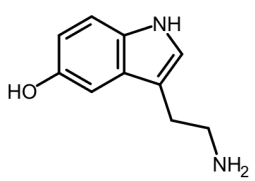
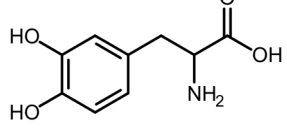
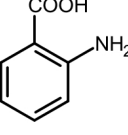
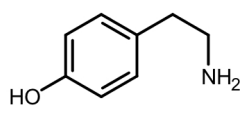
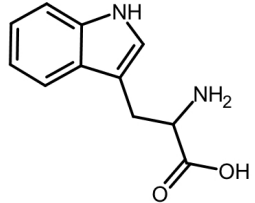
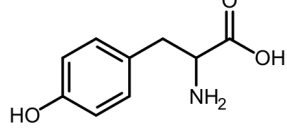
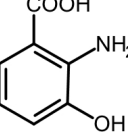
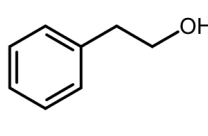
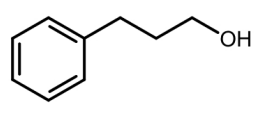
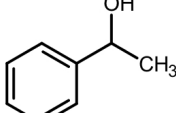
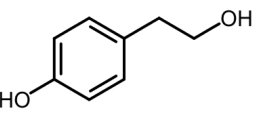
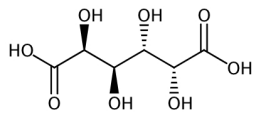
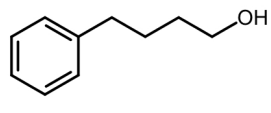
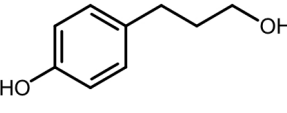
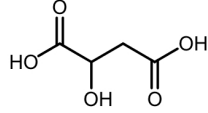
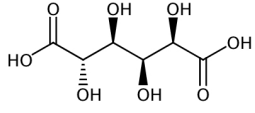
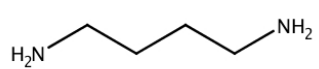
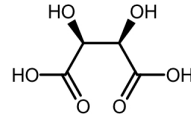
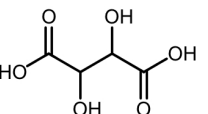
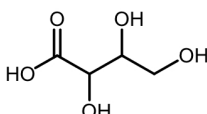
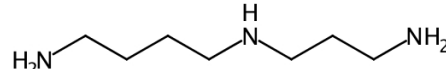
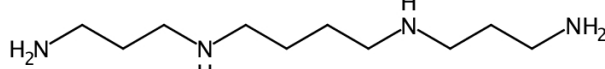


Abbildung 50

HPLC-Chromatogramme der Reaktion der ArCAS von Caffeoyl-CoA mit Spermidin.

A: Reaktionszeit 0 min, B: Reaktionszeit 10 min

Tabelle 11
Verwendete Substrate zur Testung der ArCAS

 p-Hydroxyphenylmilchsäure	 Chinasäure	 Dopamin	 Tryptamin
 D/L-Phenylalanin	 Shikimisäure	 Phenethylamin	 Serotonin
 D/DL-Dopa	 Anthranilsäure	 Tyramin	 D/L-Tryptophan
 DL/L-Tyrosin	 3-Hydroxy-anthranilsäure	 2-Phenylethanol	
 3-Phenyl-1-propanol	 1-Phenyl-ethanol	 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	 Galactarsäure
 4-Phenyl-1-butanol	 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	 D/L/DL-Äpfelsäure	 Glucarsäure
 Putrescin	 m-Weinsäure	 D/L-Weinsäure	 Threonsäure
 Spermin		 Spermidin	

Von den angebotenen Akzeptorsubstraten akzeptiert die ArCAS bislang nur Piscidinsäure und vermutlich Fukinsäure.

Die Rosmarinsäuresynthase aus *Coleus blumei* akzeptiert neben *p*-Hydroxyphenylmilchsäure auch andere Substrate (D-Phenylalanin, D-Tyrosin, D-DOPA), so wie die HST aus der gleichen Pflanze mehr Substrate als nur Shikimisäure akzeptiert (3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3-Aminobenzoesäure) (Sander und Petersen 2011). Ebenso akzeptiert die Rosmarinsäuresynthase aus Lavendel neben *p*-Hydroxyphenylmilchsäure auch Phenethylamin, Tryptamin, Tyramin und Shikimisäure (Landmann et al. 2011).

Eine HST aus der Rutenhirse (*Panicum virgatum*) akzeptiert neben dem Hauptsubstrat Shikimisäure auch Hydroxyanthranilsäure, (Di-)Hydroxybenzoesäure, Aminobenzoesäure, Catechol, Protocatechusäure und Gentisinsäure (Eudes et al. 2016).

Die Tatsache, dass *p*-Hydroxyphenylmilchsäure (*p*HPL) von der ArCAS nicht akzeptiert wird, ist ein erster Hinweis darauf, dass die Anlagerung eines Acetatrests aus Acetyl-CoA an *p*-Hydroxyphenylpyruvat (*p*HPP), wie es auch von Hasa und Tazaki (2004) prognostiziert wird, vor Verknüpfung des Hydroxycinnamylrests mit *p*HPL bzw. *p*HPP abläuft. Es wird also zunächst Piscidinsäure aus Tyrosin bzw. *p*HPP gebildet. Ob hierfür Acetyl-CoA oder eher Glycolyl-CoA genutzt wird und welche Enzyme daran beteiligt sind, ist noch zu klären.

3.2.10 Ermittlung des Einflusses von Ascorbat und DTT auf den Enzymtest

Wie in Kapitel 2.6.9 beschrieben, wurden dem Enzymtest zunächst standardmäßig Ascorbat und DTT zugegeben. Da sich aber in den Chromatogrammen einiger Enzymtests die Bildung weiterer Peaks im HPLC-Chromatogramm zeigte, welche nicht mit der Produktbildung zusammenhängen, wurde ein Test durchgeführt, um den Einfluss von Ascorbat und DTT auf die Menge an gebildetem Produkt und dem Auftauchen der störenden Signale zu untersuchen.

Hierfür wurden Caffeoyl-CoA und Piscidinsäure mit 5 µg Protein bei 30 °C für 10 min inkubiert. Dem Test wurde entweder 0,01 M DTT, 0,5 mM Ascorbat oder beide Substanzen zugegeben. Ein weiterer Test wurde ohne die Zugabe von DTT und Ascorbat durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 51 zu sehen. Die geringste Menge an Produkt zeigte sich bei der Verwendung von Ascorbat. Die anderen Tests weisen keinen signifikanten Unterschied zueinander auf, so dass auf eine Zugabe von DTT und Ascorbat verzichtet werden kann.

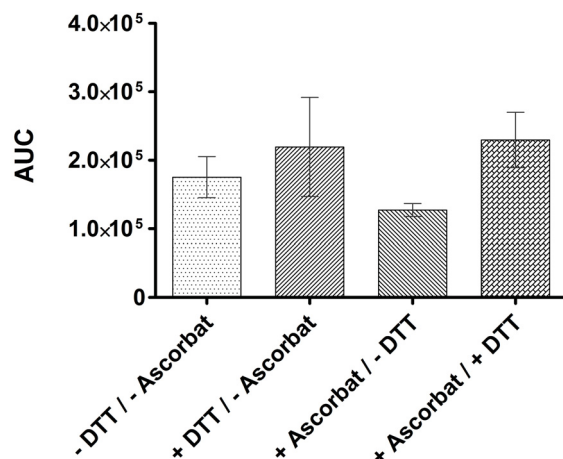


Abbildung 51
Ergebnis der Tests zur Untersuchung des Einflusses von Ascorbat und DTT auf die Produktmenge

Dennoch war bis dato unklar, woher die zusätzlichen Peaks im Chromatogramm kommen. Deshalb wurde ein weiterer Test, beschrieben in Kapitel 2.6.10 durchgeführt. Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme ergab, dass weder CoA, *N*-Hydroxysuccinimid noch Kaffeesäure einen zusätzlichen Peak verursachen.

Allerdings zeigte sich in Kombination mit Caffeoyl-CoA die Bildung eines Peaks, welcher nicht durch das Caffeoyl-CoA selbst ausgelöst wurde. Abbildung 52 zeigt das Chromatogramm des Caffeoyl-CoA, sowie das Chromatogramm von Caffeoyl-CoA mit DTT. Nur in Kombination mit DTT zeigt sich der zusätzliche Peak.

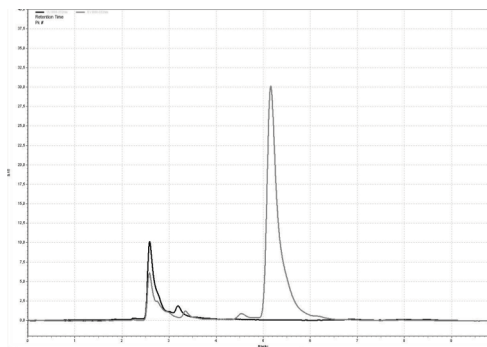


Abbildung 52
Test zur Untersuchung des Einflusses von DTT
schwarz: Caffeoyl-CoA
grau: Caffeoyl-CoA nach Reaktion mit DTT

Leider konnte nicht geklärt werden, was das Produkt dieser Reaktion ist, da weder Coenzym A noch Kaffeesäure allein zu dieser Reaktion führten, der Peak aber auch nicht auf einer Freisetzung der Kaffeesäure aus dem CoA-Ester beruht. Dennoch führte dieses Ergebnis dazu, dass weiteren Enzymtests kein DTT und auch kein Ascorbat mehr zugesetzt wurden.

3.2.11 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen der ArCAS

Zunächst wurde ein Test zur Bestimmung des Temperaturoptimums durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 53 dargestellt. Es zeigt sich eine typische Optimumskurve. Zunächst steigt mit zunehmender Temperatur die Enzymaktivität an, welche nach Erreichen des Optimums wieder absinkt. Das Optimum liegt bei 25-30 °C.

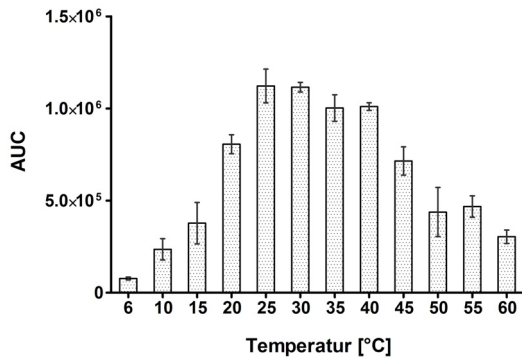


Abbildung 53

Temperaturoptimum der ArCAS. Enzymtest über 10 min in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 und 5 µg Protein. Substrate: 250 µM Caffeoyl-CoA und 50 µM Piscidinsäure. Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests mit je zwei Messwerten.

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde zunächst ein Test mit Britton-Robinson-Puffer durchgeführt, da dieser in einem pH-Bereich von 2-12 eingesetzt werden kann. Der Test ergab, dass das pH-Optimum im Bereich von pH 6 bis pH 8 zu finden ist (Abbildung 54A). Aus diesem Grund wurde ein weiterer Enzymtest mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,5 durchgeführt, da dieser Puffer auch später als Reaktionspuffer dienen sollte. Dieser Test ergab, dass das pH-Optimum bei pH 7 zu finden ist (Abbildung 54B).

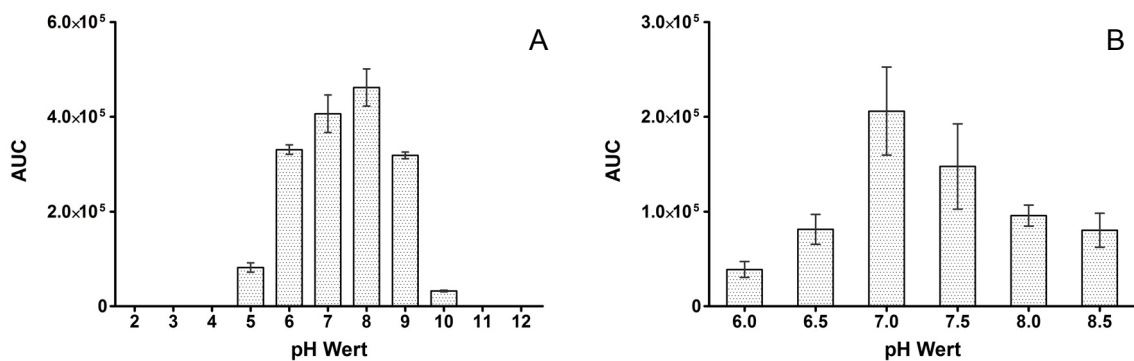


Abbildung 54

pH-Optimum der ArCAS

A: Enzymtest über 10 min in Britton-Robinson-Puffer im pH-Bereich von 2-12

B: Enzymtest über 10 min in 0,1 M KPi pH-Bereich von 6,0-8,5

Tests mit 5 µg Protein. Substrate: 250 µM Caffeoyl-CoA und 50 µM Piscidinsäure. Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests mit je zwei Messwerten

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionszeit wurde ein weiterer Enzymtest mit 250 μM Caffeoyl-CoA, 50 μM Piscidinsäure und 2,5 μg bzw. 5 μg Protein bei 30 °C in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 für 0-15 min durchgeführt. Es ist für spätere kinetische Untersuchungen des Enzymes wichtig, dass die Reaktion noch im linearen Bereich abläuft, da in diesem Bereich die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Produktkonzentration ist. In Abbildung 55 ist das Ergebnis des Tests zu sehen.

Der Kurvenverlauf mit 2,5 μg Protein zeigt zunächst einen linearen Anstieg und flacht dann ab, was auf suboptimale Reaktionsbedingungen hindeutet.

Der Kurvenverlauf für 5 μg zeigt einen steileren Anstieg als die Kurve mit 2,5 μg Protein. Nach 15 min Reaktionszeit sinkt die AUC allerdings ab. Dies kann ein Anzeichen für eine Produkthemmung sein. Auf Grund dieser Ergebnisse und der Forderung, dass für die Kinetik die Reaktion im linearen Bereich stattfinden muss, wurde eine Reaktionszeit von 3 min mit einer Proteinmenge von 2,5 μg für weitere Tests gewählt.

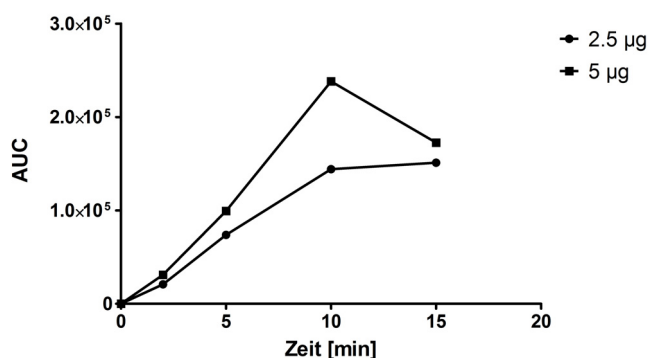


Abbildung 55

Ergebnis des Enzymtests zur Ermittlung der optimalen Reaktionszeit der ArCAS. Substrat 250 μM Caffeoyl-CoA und 50 μM Piscidinsäure bei 30 °C und 0,1 M KPi pH 7. Mittelwert aus zwei Messwerten.

3.2.12 Reverser Enzymtest mit Fukinolsäure

Da die Isolierung der Fukinsäure nicht erfolgreich war, konnten mit dieser keine Tests der ArCAS durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde ein reverser Enzymtest vorgenommen. Dieser sollte zeigen, ob die Rückreaktion aus Fukinolsäure zu Fukinsäure und Caffeoyl-CoA erfolgt. Dies spräche dafür, dass auch die Hinreaktion durch das Enzym katalysiert wird.

Die Auswertung des reversen Enzymtests ist in Tabelle 12 dargestellt. Im UV-Chromatogramm ist keine sichtbare Veränderung zu erkennen. Dies liegt daran, dass die eingesetzten und entstandenen Substrat- bzw. Produktmengen sehr gering sind. Auch die Extracted Ion Chromatogramme von Fukinolsäure zeigen keinen signifikanten Unterschied. Im Extracted Ion Chromatogramm von Fukinolsäure ist zunächst ein großer Peak bei der Retentionszeit der Fukinolsäure, da Fukinolsäure eines der Fragmente der Fukinolsäure ist. Im Extracted Ion Chromatogramm (m/z 271,04) des Tests mit Enzym und mit CoA ist jedoch zu erkennen, dass bei einer Retentionszeit von 5 Minuten ein zweiter Peak entsteht. Es wird Fukinsäure gebildet. Da dies nur geschieht, wenn Enzym und CoA vorhanden sind, nicht aber, wenn eine dieser Komponenten fehlt, handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion.

Da das Enzym die Rückreaktion von Fukinolsäure zu Fukinsäure und Caffeoyl-CoA katalysiert, kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym auch die Hinreaktion katalysiert. Dieses Verhalten konnte bereits für die Rosmarinsäuresynthese aus *Coleus blumei* gezeigt werden. Dieses Enzym katalysiert nicht nur die Reaktion, die zur Bildung der Rosmarinsäure führt, sondern auch die Rückreaktion zu den Edukten (Petersen 1991).

Tabelle 12

Übersicht über das Ergebnis des reversen Enzymtests der ArCAS mit Fukinolsäure und Coenzym A. Spalte 1: UV-Chromatogramm des jeweiligen Tests bei 332 nm; Spalte 2: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) der Fukinolsäure (m/z 433,07 [$M-H^+$]); Spalte 3: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) der Fukinsäure (m/z 271,04 [$M-H^+$])

	UV-Chromatogramm 332 nm	EIC Fukinolsäure (m/z 433,07)	EIC Fukinsäure (m/z 271,04)
ohne Enzym, ohne CoA			
ohne Enzym, mit CoA			
mit Enzym, ohne CoA			
mit Enzym, mit CoA			

3.2.13 Enzymkinetische Untersuchungen

Da *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Sinapoyl- und Feruloyl-CoA vom Enzym ArCAS akzeptiert wurden, konnten mit diesen Substraten enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt werden. Grundlage hierfür waren die in Kapitel 3.2.10 beschriebenen Reaktionsbedingungen. Caffeoyl-, Sinapoyl- und Feruloyl-CoA wurden im Bereich von 10-500 μM eingesetzt; *p*-Cumaroyl-CoA hingegen von 1-50 μM mit 50 μM Piscidinsäure als Akzeptor. Ein weiterer Test wurde mit 500 μM *p*-Cumaroyl-CoA und bis zu 125 μM Piscidinsäure durchgeführt.

In Tabelle 13 ist eine Übersicht über die Ergebnisse und deren Auswertung nach den entsprechenden Linearisierungsverfahren dargestellt. Alle getesteten Substrate zeigen in der direkt-linearen Auftragung (Michaelis-Menten) eine Kurve, die nahe der idealen hyperbolen Kurve liegt. Es kommt zu keiner sichtbaren Substrathemmung, dies würde man durch eine deutliche Absenkung der Produktmenge bei höheren Substratkonzentrationen erkennen.

Das am besten akzeptierte Substrat mit einem K_m -Wert von $6,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ ist *p*-Cumaroyl-CoA, der Wert für Caffeoyl-CoA beträgt $16,3 \pm 4,6 \mu\text{M}$. Diese Werte liegen in einem Bereich, in welchen auch die K_m -Werte der Rosmarinsäuresynthasen aus *Coleus blumei* und *Melissa officinalis* liegen (Sander und Petersen 2011; Weitzel und Petersen 2011). Vermutlich verläuft die Biosynthese der Cimicifugasäuren ähnlich wie die der Rosmarinsäure. *p*-Cumaroyl-CoA ist das natürliche Substrat, spätere Hydroxylierungen und auch Methylierungen folgen nach der Verknüpfung durch die Acyltransferase (Petersen et al. 1993). Aus diesem Grund ist es überraschend, dass Sinapoyl-CoA mit einem Wert von $10,5 \pm 2,7 \mu\text{M}$ besser von der ArCAS akzeptiert wird als Caffeoyl-CoA. Sinapoyl-CoA besitzt am Aromaten neben der freien Hydroxygruppe in *para*-Position zwei Methoxygruppen in *meta*-Position. Am schlechtesten akzeptiert wird Feruloyl-CoA mit einem Wert von $51,4 \pm 11,8 \mu\text{M}$.

Die spätere Hydroxylierung des *p*-Cumaroylanteils zu einem Caffeoylrest in einem Ester ist bereits aus den Reaktionen der HST und HQT bekannt. So konnten Schoch *et al.* (2001) zeigen, dass für die Hydroxylierung eine 3'-Hydroxylase verantwortlich ist, welche *p*-Cumaroylchinasäure und -shikimisäure zu Caffeoylchinasäure bzw. -shikimisäure hydroxyliert, nicht aber die freie Säure. Der Zwischenschritt über die Bildung der *p*-Cumaroylshikimisäure durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase (HST) ist ein entscheidender Schritt in der Biosynthese von Ligninbausteinen. Nur geknüpft an Shikimisäure kann der Cumaroylrest durch Hydroxylasen zu Caffeoylshikimisäure hydroxyliert werden. Nach Abspaltung der Shikimisäure steht Kaffeesäure bzw. Caffeoyl-CoA zur Weiterreaktion zu den Monolignolen zur Verfügung (Hoffmann et al. 2004).

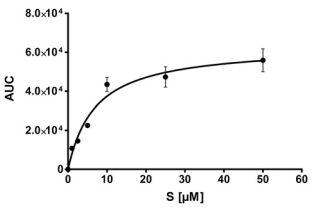
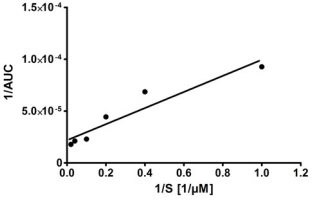
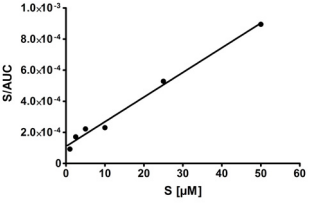
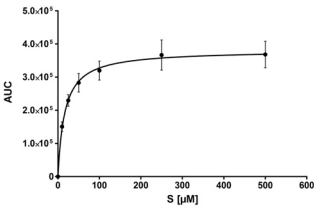
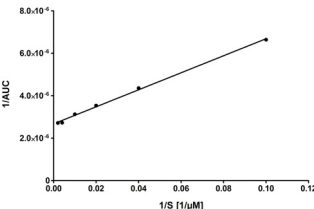
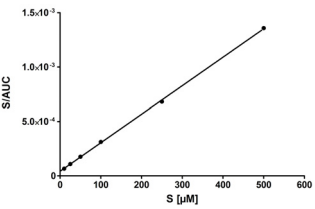
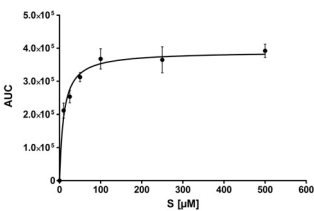
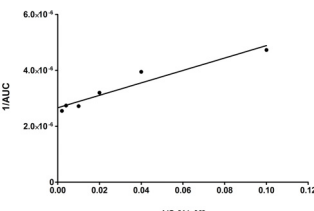
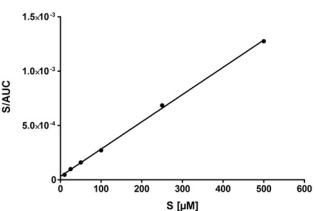
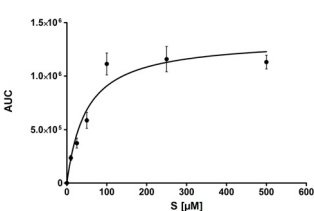
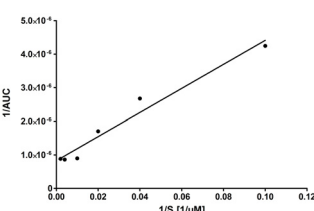
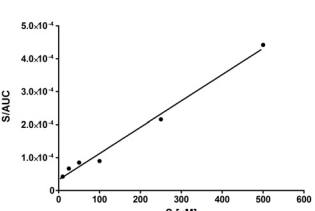
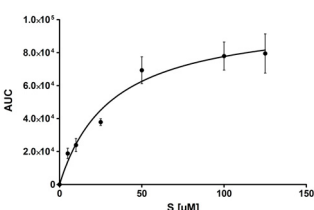
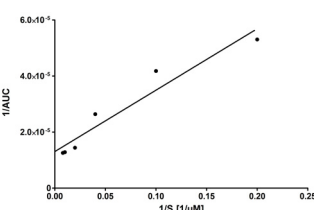
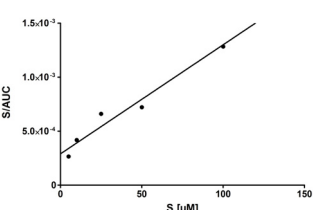
Geht man nun davon aus, dass die Hydroxylierung des *p*-Cumaroyl- und des Piscidinsäure-Anteils der Cimicifugasäuren analog zur Rosmarinsäure-Biosynthese erst nach der Verknüpfung zur Cimicifugasäure erfolgt, so ist fraglich, weshalb in *Actaea racemosa* bisher keine dieser Zwischenstufen nachgewiesen wurde.

Weder CA PP noch CA KP wurden in *Actaea racemosa* gefunden, jedoch in anderen *Actaea*-Arten (Iwanaga et al. 2010a, b; Kusano et al. 2001).

Möglich ist, dass diese Zwischenstufen nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, welche sie nur schwer nachweisbar machen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Enzyme, welche die anschließenden Hydroxylierungen und Methylierungen katalysieren, sehr aktiv in der Pflanze sind. Die Intermediate würden somit sehr schnell weiter metabolisiert werden.

Tabelle 13

Übersicht über die Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen. Auftrag und Berechnung der K_m -Werte nach Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf (MW \pm SEM, n = 6). Testung von *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Sinapoyl- und Feruloyl-CoA mit Piscidinsäure. Piscidinsäure mit *p*-Cumaroyl-CoA.

	Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk	Hanes-Woolf
<i>p</i>-Cumaroyl-CoA	 $6,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$	 $3,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$	 $6,9 \pm 2,4 \mu\text{M}$
Caffeoyl-CoA	 $16,3 \pm 4,6 \mu\text{M}$	 $14,8 \pm 2,5 \mu\text{M}$	 $17,1 \pm 7,2 \mu\text{M}$
Sinapoyl-CoA	 $10,5 \pm 2,7 \mu\text{M}$	 $8,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$	 $13,7 \pm 5,2 \mu\text{M}$
Feruloyl-CoA	 $51,4 \pm 11,8 \mu\text{M}$	 $43,3 \pm 5,6 \mu\text{M}$	 $45,0 \pm 19,9 \mu\text{M}$
Piscidinsäure	 $32,3 \pm 8,9 \mu\text{M}$	 $17,3 \pm 3,1 \mu\text{M}$	 $28,7 \pm 5,2 \mu\text{M}$

3.2.14 Phylogenetische Untersuchung der ArCAS

Um die gefundene Sequenz aus *Actaea racemosa* phylogenetisch einzuordnen, wurde ein Stammbaum mit Aminosäuresequenzen anderer Enzymen der BAHD-Familie erstellt (Abbildung 56). Eine Übersicht der verwendeten Sequenzen befindet sich im Anhang.

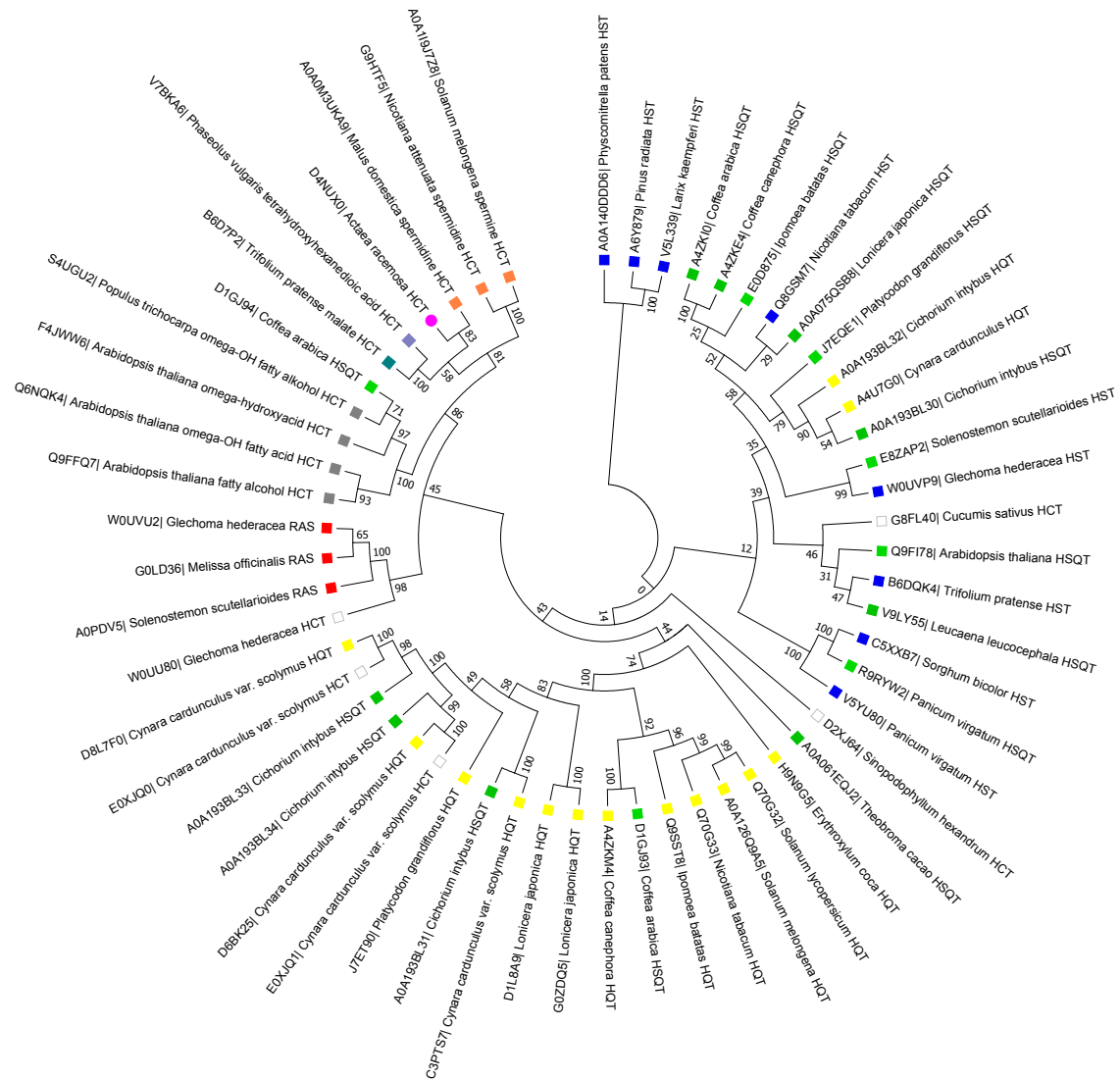


Abbildung 56

Stammbaum auf Basis von Aminosäuresequenzen, erstellt mit MEGA7 unter Verwendung der Most-Likelihood-Methode nach einem Alignment mit ClustalOmega.

ArCAS ●, HCT = Hydroxycinnamoyltransferase mit unbekanntem Akzeptorsubstrat □, Äpfelsäure HCT ■, HQT = Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinasäure HCT ■, HST = Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure HCT ■, HSQT = Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure/Chinasäure HCT ■, Spermin/Spermidin HCT ■, RAS = Rosmarinsäuresynthase = Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenylmilchsäure HCT ■, Tetrahydroxyhexandisäure HCT ■, ω-Hydroxycarbonsäuren/Fettalkohol Hydroxycinnamoyltransferase ■

Dem Stammbaum ist zu entnehmen, dass der höchste Verwandtschaftsgrad der ArCAS mit einer Spermidin HCT aus *Malus domestica* besteht (Elejalde-Palmett et al. 2015). Die möglichen Reaktionen dieses Enzyms sind in Abbildung 57 dargestellt. Aus dem aktivierten Hydroxyzimtsäureester, in diesem Fall *p*-Cumaroyl-CoA, entstehen durch Reaktion mit Spermidin nicht nur Mono-, sondern auch Di- und Trihydroxycumaroylspermidin. Anders als bei der Reaktion zur Bildung der Cimicifugasäuren handelt es sich hierbei um eine Amidbildung. Diese Reaktion wird durch die ArCAS nicht katalysiert (siehe Kapitel 3.2.8)

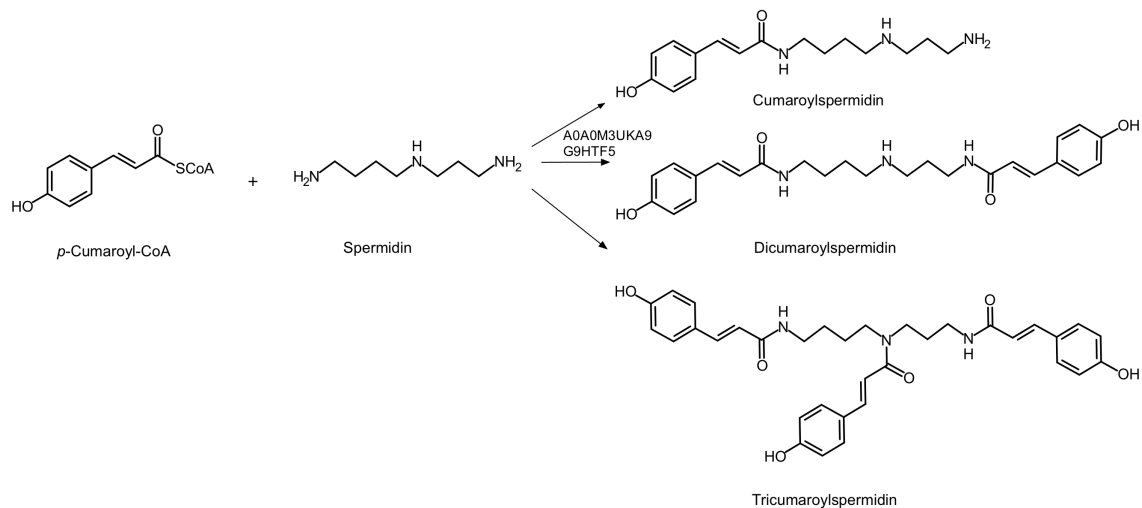


Abbildung 57

Reaktion von *p*-Cumaroyl-CoA mit Spermidin, katalysiert durch eine Hydroxycinnamoyltransferase, und die drei möglichen Reaktionsprodukte

Im Stammbaum in direkter Nähe zur ArCAS befindet sich eine Tetrahydroxyhexandisäure HCT aus *Phaseolus vulgaris*. Als Substrat fungieren sowohl Galactar-, als auch Glucarsäure. Die Reaktion ist beispielhaft mit *p*-Cumaroyl-CoA in Abbildung 58 aufgezeigt. Bisher konnte nicht geklärt werden, welche der Hydroxygruppen der Tetrahydroxyhexandisäure substituiert wird, vermutlich werden beide Ester gebildet (Sullivan 2017). Eine ähnlich ablaufende Reaktion katalysiert eine Malat HCT aus *Trifolium pratense*. Diese nutzt Äpfelsäure als Substrat und katalysiert die Reaktion zu *p*-Cumaroyläpfelsäure (Abbildung 59), aber mit Caffeoyl-CoA auch zu Caffeoyläpfelsäure (Sullivan 2009). Diese beiden Enzyme befinden sich auf einem Ast des Stammbaums, beide katalysieren die Reaktion eines Hydroxyzimtsäureesters mit einer Hydroxydicarbonsäure. Auch Piscidinsäure ist chemisch gesehen eine Hydroxycarbonsäure, welche jedoch mit einem Phenylring verknüpft ist. Aus chemischer Sicht ist die Nähe dieser Enzyme zueinander folglich nachvollziehbar. Dennoch akzeptiert die Cimicifugasäuresynthase (ArCAS) weder Galactar-, Glucar-, noch Äpfelsäure. Auch andere Hydroxycarbonsäuren wie Weinsäure und Threonsäure werden nicht als Substrate akzeptiert (siehe Kapitel 3.2.8).

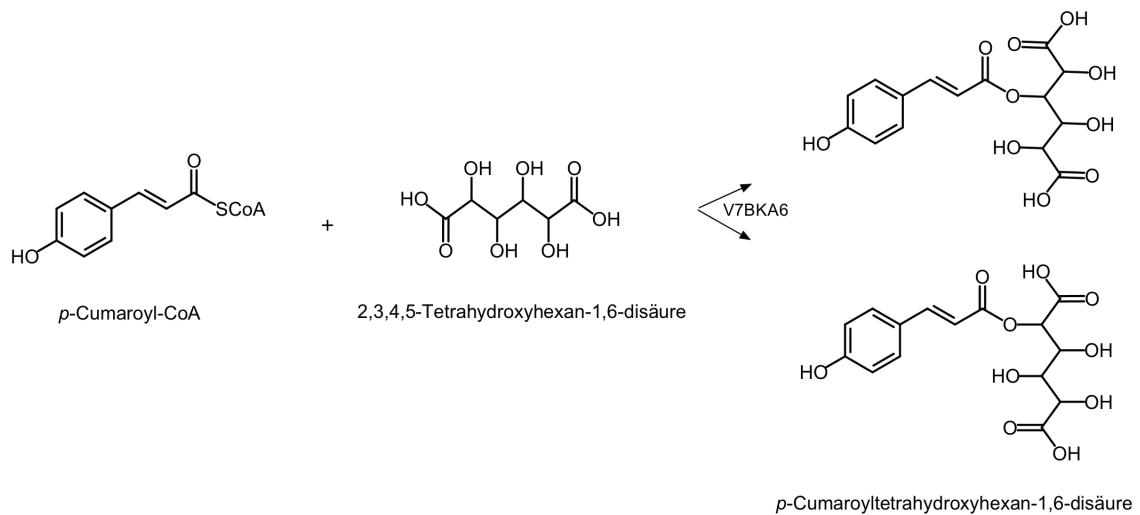


Abbildung 58

Reaktion von *p*-Cumaroyl-CoA mit einer Tetrahydroxyhexandisäure durch die entsprechende Hydroxycinnamoyltransferase

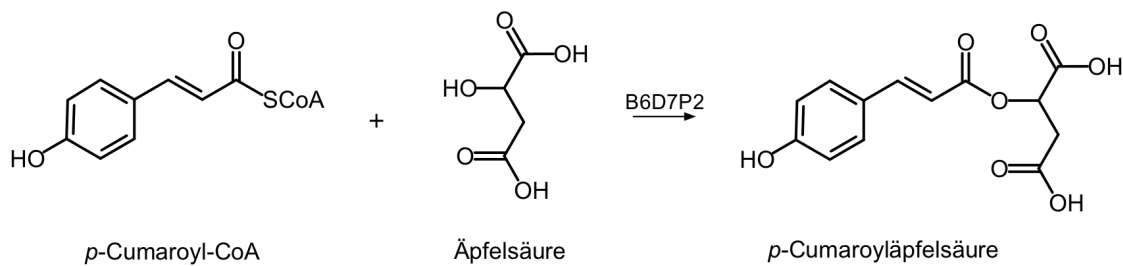
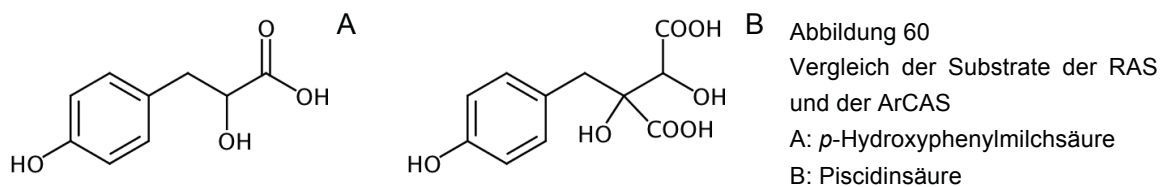


Abbildung 59

Reaktion von *p*-Cumaroyl-CoA mit Äpfelsäure durch die Malat HCT aus *Trifolium pratense*

Als eigenes Cluster befinden sich die Rosmarinsäuresynthasen aus Melisse, der Gundelrebe und der Buntnessel bereits etwas weiter entfernt. Das Substrat der Rosmarinsäuresynthase ist *p*-Hydroxyphenylmilchsäure. In Abbildung 60 ist eine Gegenüberstellung von *p*-Hydroxyphenylmilchsäure mit Piscidinsäure zu sehen.



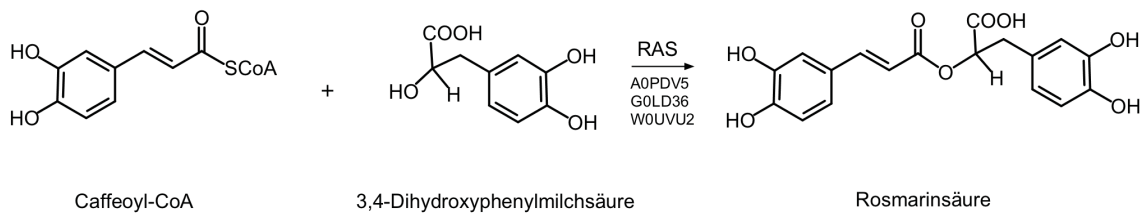


Abbildung 61

Reaktion der Rosmarinsäuresynthase mit Caffeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure zu Rosmarinsäure

In Abbildung 61 ist die Reaktion der Rosmarinsäuresynthase mit Caffeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure abgebildet. In den Pflanzen sind mit großer Wahrscheinlichkeit *p*-Cumaroyl-CoA und *p*-Hydroxyphenylmilchsäure die bevorzugten Substrate, welche zu *p*-Cumaroylhydroxyphenylmilchsäure verknüpft werden, anschließend erfolgt eine zweifache Hydroxylierung zu Rosmarinsäure (Petersen et al. 2009).

Biogenetisch ist es möglich, dass Piscidinsäure aus *p*-Hydroxyphenylmilchsäure hervorgeht (Hasa und Tazaki 2004), dennoch wird *p*HPL nicht von der ArCAS akzeptiert.

Eine weitere Gruppe von Hydroxycinnamoyltransferasen, welche in der Nähe der ArCAS clustert, sind die Fettalkohol- bzw. Hydroxyfettsäure HCTs. Diese übertragen die Hydroxycinnamoylgruppe aus dem Hydroxycinnamoyl-CoA-Thioester auf die freie Hydroxygruppe der langkettigen Carbonsäuren bzw. -alkohole.

In diesem Cluster findet sich eine HSQT aus *Coffea arabica*, welche an dieser Stelle eher als Ausreißer zu sehen ist, da sich diese Enzyme im oberen Teil des Stammbaumes befinden. Als HST, Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase, wird jenes Enzym bezeichnet, welches die Reaktion von *p*-Cumaroyl mit Shikimisäure zu *p*-Cumaroylshikimisäure katalysiert (Abbildung 62).

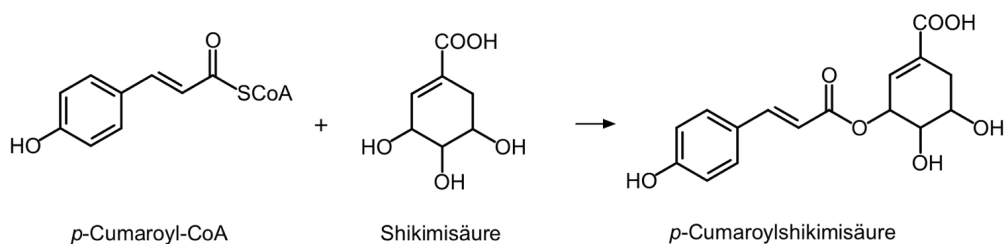


Abbildung 62

Reaktion der HST mit *p*-Cumaroyl-CoA und Shikimisäure zu *p*-Cumaroylshikimisäure

Diese Reaktion ist entscheidend für die Biosynthese von Monolignolen und Lignin, da nur über diesen Zwischenschritt eine Hydroxylierung in ortho-Stellung zur bereits bestehenden phenolischen OH-Gruppe stattfinden kann. Der Kaffeesäurerest wird im Anschluss wieder von der Shikimisäure abgespalten und auf Coenzym A übertragen (Hoffmann et al. 2004). Caffeoyl-CoA wird für die Weitersynthese der Monolignole benötigt (Gross 2008).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass in *Physcomitrella patens* nicht Shikimisäure sondern Threonsäure akzeptiert wird (Abbildung 63). Die daraus gebildete Cumaroylthreonsäure wird, ähnlich wie Cumaroylshikimisäure anschließend durch CYP-Enzyme hydroxyliert. Im Gegensatz zu den Angiospermen handelt es sich hierbei jedoch nicht um einen Zwischenschritt zur Lignin-Biosynthese, sondern um die Bildung von Vorstufen zur Synthese cuticulärer Biopolymere (Renault et al. 2017). Wie bereits erwähnt, wird Threonsäure nicht durch die ArCAS als Substrat akzeptiert.

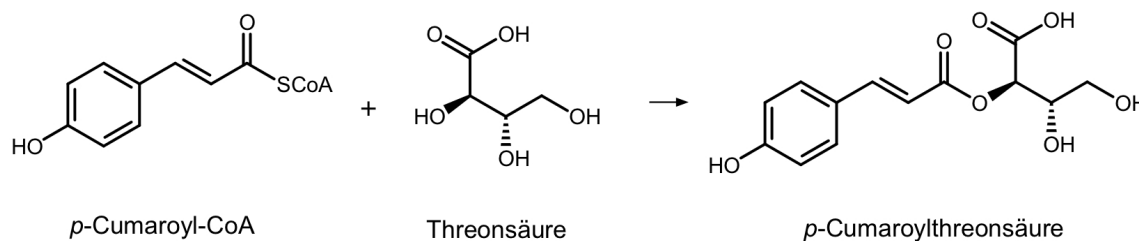


Abbildung 63

Enzymatisch katalysierte Reaktion von *p*-Cumaroyl-CoA mit Threonsäure in *Physcomitrella patens* (Renault et al. 2017)

Das Enzym HQT (Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinasäure Hydroxycinnamoyltransferase) überträgt die Hydroxycinnamoylreste aus *p*-Cumaroyl-CoA, oder Caffeoyl-CoA auf Chinasäure, das Produkt dieser Reaktion ist Chlorogensäure (Abbildung 64) (Niggeweg et al. 2004). Viele dieser Enzyme akzeptieren sowohl Chinasäure als auch Shikimisäure. In diesem Fall spricht man von einer HSQT. Die meisten dieser HSQTs haben eine deutliche Präferenz zu einem der beiden Substrate (Sonnante et al. 2010; Lallemand et al. 2012).

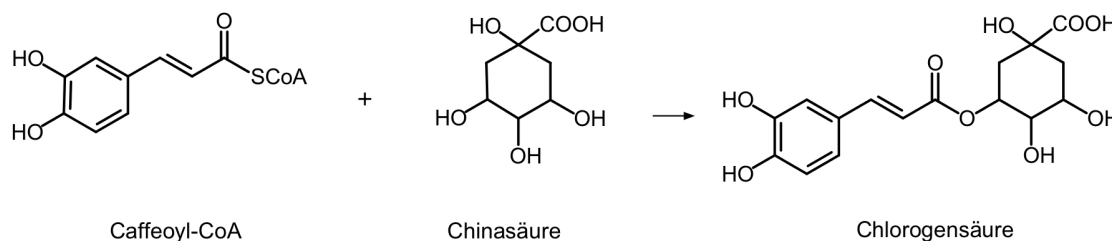


Abbildung 64

Reaktion der HQT mit Caffeoyl-CoA und Chinasäure zu Chlorogensäure

Da weitere Pflanzen der Gattung *Actaea* Cimicifugasäuren enthalten, *Petasites japonicus* Fukinolsäure enthält und Cimicifugasäure D (CA PK) in *Platycodon grandiflorum* nachgewiesen werden konnte (Wang et al. 2017), wäre es interessant, die Sequenzen der dafür verantwortlichen Enzyme zu finden, diese könnte man in den Stammbaum einpflegen, um weitere Verwandtschaften und Entwicklungen auf Genomebene zu untersuchen.

3.2.15 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes in *Actaea racemosa*

Um den Gesamtphenolgehalt in *Actaea racemosa* zu bestimmen, wurden zunächst die phenolischen Inhaltsstoffe aus den gefriergetrockneten Blättern, Blüten und dem Rhizom bzw. den Wurzeln extrahiert (Kapitel 2.4.8) Der Gesamtphenolgehalt wurde photometrisch bestimmt und an Hand einer Kaffeesäure-Kalibriergeraden als mg Kaffeesäure pro g Trockengewicht berechnet (Kapitel 2.4.10).

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Abbildung 65 dargestellt. Den höchsten Gehalt an Phenolen enthalten Blätter mit einem Wert von $90,1 \pm 4,0$ mg/g, gefolgt von Blüten mit $57,1 \pm 2,3$ mg/g, den geringsten Gehalt weisen Wurzeln mit $33,3 \pm 1,4$ mg/g auf.

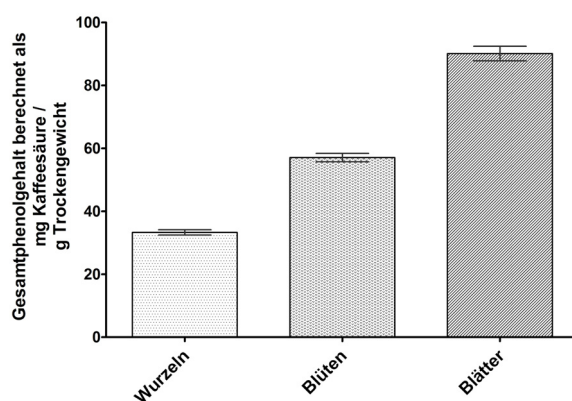


Abbildung 65
Gesamtphenolgehalte in Wurzeln, Blüten und Blättern von *Actaea racemosa*, berechnet als mg Kaffeesäure pro g Trockengewicht. MW \pm SEM, n = 3

Auch in anderen Pflanzen zeigt sich, dass der Gehalt an Polyphenolen in den Wurzeln im Gegensatz zu anderen Pflanzenteilen reduziert ist. Wurzelknollen von *Maranta arundinacea* enthalten durchschnittlich 38,31 mg Gallussäureequivalente (GAE) pro g Extrakt gegenüber 65,18 g GAE/g in den Blättern (Kusbandari et al. 2017). Untersuchungen von Pflanzenteilen von *Angelica shikokiana* zeigen, dass in den Wurzeln mit 19,10 mg GAE/g der Gehalt an Phenolen unter dem der Blätter mit 35,28 mg GAE/g liegt (Mira et al. 2013). Auch Fernando et al. (2013) konnten zeigen, dass der Gehalt in den Blättern von *Withania somnifera* am höchsten ist, gefolgt von den Blüten, Früchten, Stängel, und den geringsten Gehalt an Polyphenolen enthalten die Wurzeln.

3.2.16 Untersuchung der Verteilung der Cimicifugasäuren in *Actaea racemosa*

Die Extrakte aus Blättern, Blüten und Wurzeln von *Actaea racemosa*, welche für die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes genutzt wurden (Kapitel 3.2.15), wurden zusätzlich mit LC-MS untersucht, um die Verteilung der einzelnen Cimicifugasäuren in den Organen zu bestimmen. Anhand der spezifischen Massen und der Fragmentierungsmuster der Cimicifugasäuren können diese in den Chromatogrammen zugeordnet werden. Eine Übersicht über die UV-Chromatogramme gibt Abbildung 66.

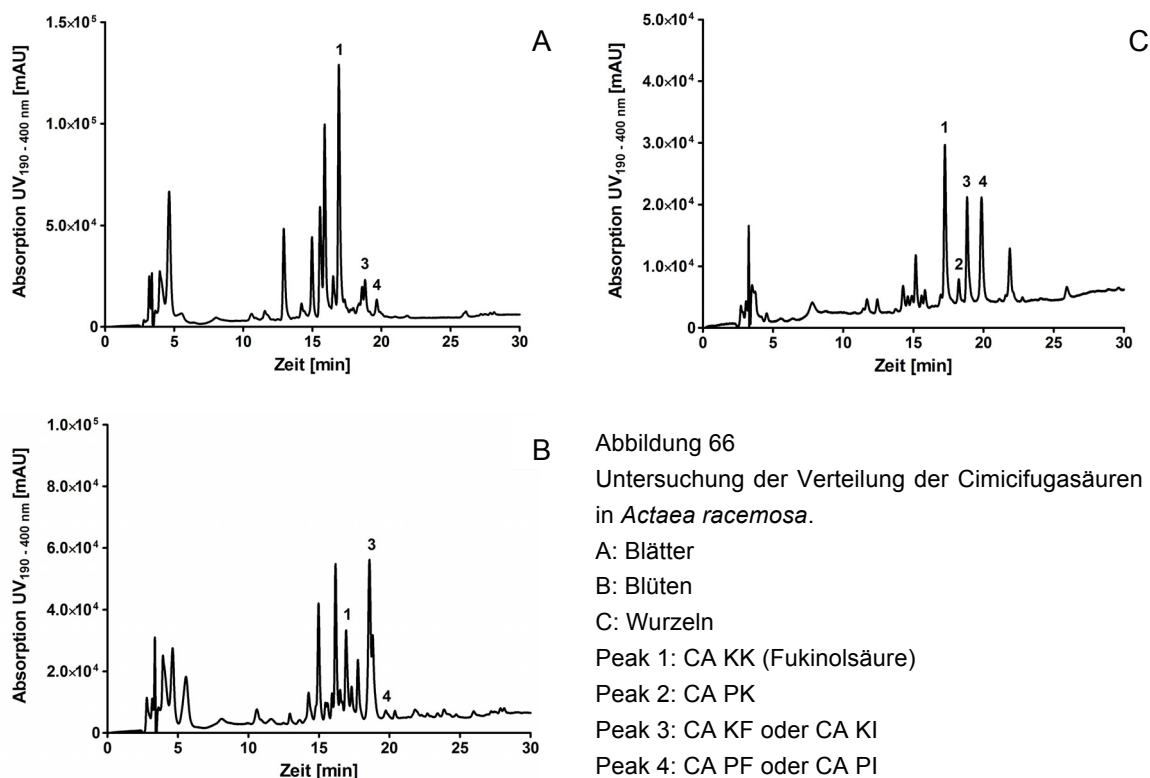


Abbildung 66
Untersuchung der Verteilung der Cimicifugasäuren in *Actaea racemosa*.

A: Blätter
B: Blüten
C: Wurzeln
Peak 1: CA KK (Fukinolsäure)
Peak 2: CA PK
Peak 3: CA KF oder CA KI
Peak 4: CA PF oder CA PI

In den Pflanzenteilen wurden CA KK (Fukinolsäure), CA PK, CA KF/KI und CA PF/PI gefunden, aber keine *p*-Cumarsäure- oder Sinapinsäurederivate. Zwar besitzen CA KP und CA PK die gleiche Masse, doch kann ein Vorkommen von CA PK auf Grund des Fragmentierungsmusters im Massenspektrum ausgeschlossen werden. Neben dem Massensignal m/z 417,08 [M-H⁺] (Abbildung 67) ist ein Fragment der Größe m/z 179,03 zu sehen; dies entspricht dem Fragment der Kaffeesäure. Wäre *p*-Cumarsäure Teil der Struktur, wäre ein Massensignal bei m/z 163,03 zu erwarten.

Auch die Derivate der Dihydroxybenzoesäure und Dimethoxybenzoesäure sind nicht in den Pflanzenteilen nachzuweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein. In Tabelle 14 ist eine Übersicht entsprechender Literatur und den dort gefundenen Cimicifugasäuren dargestellt. In keiner der Untersuchungen wurden Derivate der *p*-Cumarsäure, also CA PP und CA KP gefunden.

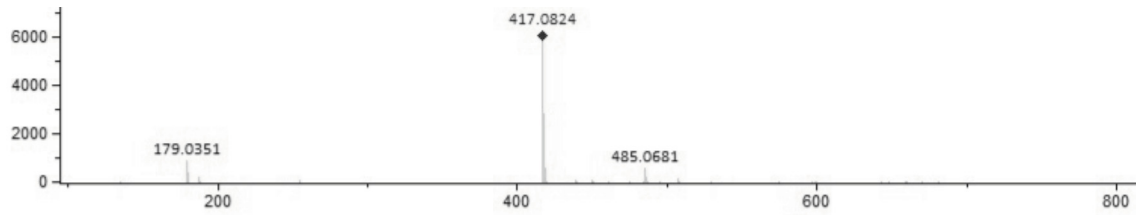


Abbildung 67

Fragmentierung des Massesignals m/z 417,08 [M-H⁺] des Peak 2 aus Abbildung 66

Tabelle 14

Bisher berichtetes Vorkommen der Cimicifugasäuren (CA) und Fukinolsäure (FA) in *Actaea racemosa* und die dazugehörigen Literaturquellen.

Alte Nomenklatur (Cimicifugasäure X)	FA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Neue Nomenklatur (CA XX)	K K	K F	K I	K P	P K	P F	P I	K D		K S	P S	P P	P D		
Kruse et al. (1999)															
Löser et. al (2000)															
Li et al. (2003)															
Nuntanakorn et al. (2006)															
Nuntanakorn et al. (2007)															
Gödecke et al. (2009b)															

In den UV-Chromatogrammen ist zu sehen, dass die höchste Menge an Inhaltsstoffen in den Blättern zu finden ist; dies bestätigt das Ergebnis aus Kapitel 3.2.15. Wie auch zu erkennen ist, findet sich in allen Pflanzenbestandteilen Fukinolsäure (CA KK), am meisten jedoch in den Blättern. CA PK hingegen findet sich nur in den Wurzeln und auch nur in einer geringen Menge. Vermutlich ist CA PK nur eine Zwischenstufe, welche zu CA KK hydroxyliert wird. CA PF/PI und CA KF/KI befinden sich in allen Pflanzenteilen, jedoch in unterschiedlichen Verteilungen. So befindet sich in den Blüten weit mehr des Fukinsäureesters als des Piscidinsäureesters. In den Wurzeln hingegen ist kein Unterschied zu sehen.

Weshalb die Verteilung der Säuren, sowie deren Mengen in den Pflanzenteilen so unterschiedlich ist, kann durch diese Untersuchung nicht geklärt werden. Noch ist völlig unklar, ob die einzelnen Cimicifugasäuren unterschiedliche biologische Aufgaben innerhalb der Pflanze besitzen und die Verteilung entsprechend der Ansprüche in den jeweiligen Pflanzenorganen vonstattengeht.

Inhaltsstoffe wie Rosmarinsäure und Chlorogensäure dienen in den Pflanzen als UV-Schutz und Schutz vor Fraßfeinden (Cle et al. 2008). Falls die Cimicifugasäuren ähnliche Funktion haben, so erklärt dies den höheren Gehalt in den Blättern gegenüber den Wurzeln, da Blätter zuweilen höherer UV-Strahlung ausgesetzt sind als die Wurzeln und das Rhizom. Zudem könnte die unterschiedliche Verteilung ein Hinweis auf eine getrennt ablaufende Synthese und Lagerung der Cimicifugasäuren innerhalb der Pflanze sein. Dieses Phänomen ist bereits für Tabak und die darin enthaltenen Alkaloide bekannt (Dawson 1941; Erb et al. 2009). Die Biosynthese findet dort in den Wurzeln statt, gespeichert werden die Alkaloide, unter anderem Nikotin, in den Blättern.

3.2.17 Untersuchung der Expression der ArCAS in *Actaea racemosa*

Wie in Kapitel 3.2.16 gezeigt, ist die Verteilung der Cimicifugasäuren innerhalb der Pflanzenorgane sehr unterschiedlich. Aus diesem Grund wurde auch die Expression der ArCAS in den unterschiedlichen Organen untersucht. Es wurde sowohl ein verkürzter Primer für die Amplifikation der ArCAS verwendet, wie auch ein degenerierter Primer für Actin. Dieses fungiert als Haushaltsgen. Haushaltsgene werden unabhängig vom Zelltyp exprimiert und können verwendet werden, um zu sehen, ob die eingesetzte RNA-Menge vergleichbar ist. Es wurde eine PCR mit cDNA aus Blättern, Blüten und Wurzeln durchgeführt, das Ergebnis dieser PCR nach einer Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 68 zu sehen.



Abbildung 68

Agarose-Gelelektrophorese der Expressionsanalyse der ArCAS und Actin in Blättern, Blüten und Wurzel/Rhizom von *Actaea racemosa* nach PCR mit 35 Zyklen

Auf dem Agarosegel sind deutlich die Banden des Actins (440 bp) zu erkennen. Wie erwünscht, sind diese in etwa gleich stark, so dass die eingesetzte RNA-Menge vergleichbar ist. Die Bande der ArCAS ist hingegen lediglich in den Wurzeln stark ausgeprägt und am schwächsten in den Blättern zu detektieren.

Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Ernte der Pflanzenteile die Expression der ArCAS in den Wurzeln am stärksten war. Untersuchungen im Verlauf des Jahres könnten darüber Aufschluss geben, ob die Expression im Jahresverlauf unterschiedlich ausgeprägt ist. In Zusammenhang mit der Verteilung der Cimicifugasäuren in den verschiedenen Pflanzenteilen könnte so geklärt werden, ob die Biosynthese der Cimicifuga getrennt von der Lagerung stattfindet.

3.2.18 Zusammenfassung der Untersuchung von *Actaea racemosa*

Die Traubensilberkerze, *Actaea racemosa*, ist eine pharmazeutisch genutzte Pflanze, welche eine große Zahl an phenolischen Verbindungen enthält. Eine Gruppe dieser phenolischen Verbindungen sind die sogenannten Cimicifugasäuren. Bisher war die Biosynthese dieser Verbindungen und deren Vorstufen nicht geklärt. Nach erfolgreicher Expression einer bis dato nicht charakterisierten Nukleotidsequenz aus einem EST-Sequenzierungsprojekt (Spiering et al. 2011) konnten erste Untersuchungen durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass Piscidinsäure, isoliert aus *Quillaja saponaria*, das Substrat des Proteins ist. Eine positive Reaktion ergab die Kombination von Piscidinsäure mit *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Sinapoyl- und Feruloyl-CoA. Dies führte zur Bildung der Cimicifugasäuren CA PP, CA PK, CA PS und CA PF. Die Testung der Fukinsäure als weiteres mögliches Substrat war nicht möglich, da eine Isolierung dieser bislang nicht erfolgreich war. Andere mögliche Substrate, wie *p*-Hydroxyphenylmilchsäure, Shikimi-säure, Äpfelsäure und verschiedene Aminosäuren wurden nicht akzeptiert. Die Charakterisierung des Enzyms ergab, dass *p*-Cumaroyl-CoA mit einem K_m -Wert von $6,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ das am besten akzeptierte Substrat der ArCAS ist.

Da eine Testung der Fukinsäure aus oben genannten Grund nicht möglich war, wurde ein reverser Enzymtest durchgeführt (Petersen und Alfermann 1988). Fukinolsäure (CA KK) wurde mit dem Enzym und CoA inkubiert. Es zeigte sich eine Bildung von Fukinsäure. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass auch Fukinsäure ein Substrat der ArCAS ist.

Der Biosyntheseweg der Cimicifugasäuren ergibt sich aus diesen Ergebnissen wie in Abbildung 69 gezeigt. Piscidin- bzw. Fukinsäure reagieren mit einem Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester zur entsprechenden Cimicifugasäure.

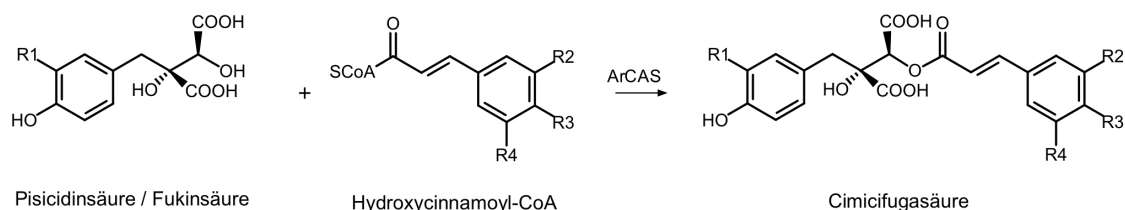


Abbildung 69

Biosynthese der Cimicifugasäuren

Durch die Extraktion der Inhaltsstoffe aus Blättern, Blüten und der Wurzel, konnte gezeigt werden, dass die Blätter mit $90,1 \pm 4,0$ mg/g den höchsten Phenolgehalt aufweisen, auch der Anteil an Cimicifugasäuren ist in den Blättern am höchsten. Dennoch sind die Cimicifugasäuren innerhalb der Pflanze nicht gleich verteilt. Weshalb die Cimicifugasäuren in unterschiedlichen Mengen und unterschiedlicher Verteilung in der Pflanze vorkommen, konnte durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Eine Analyse der Expression der ArCAS ergab jedoch, dass diese in den Wurzeln am stärksten exprimiert wird. Diese Tatsache führt zu der Überlegung, ob die Biosynthese und die Lagerung der Cimicifugasäuren in unterschiedlichen Organen ablaufen.

Eine Untersuchung der Cimicifugasäurenverteilung sowie der Expression der ArCAS im Verlauf des Jahres könnte hier weitere Informationen liefern.

Die Etablierung einer Zellkultur von *Actaea racemosa* blieb erfolglos, so dass Untersuchungen zur Expression und dem Verteilungsmuster im Zusammenhang einer Kulturcharakterisierung nicht durchführbar war. Ein Ziel ist es, eine solche Zellkultur, die Cimicifugasäuren synthetisiert und akkumuliert, zu etablieren. Mit dieser Zellkultur wäre es zudem möglich, die Biosynthese der Pigidin- und Fukinsäure zu untersuchen. Bisher ist unklar, wie diese beiden Strukturen entstehen. Hasa und Tazaki (2004) stellen die These von einer Addition von Acetat an Phenylpyruvat auf (Abbildung 70). Wahrscheinlicher ist jedoch die Addition eines Glycolrestes aus Glycolyl-CoA. Dies ließe sich aber nur durch weitere Untersuchungen klären.

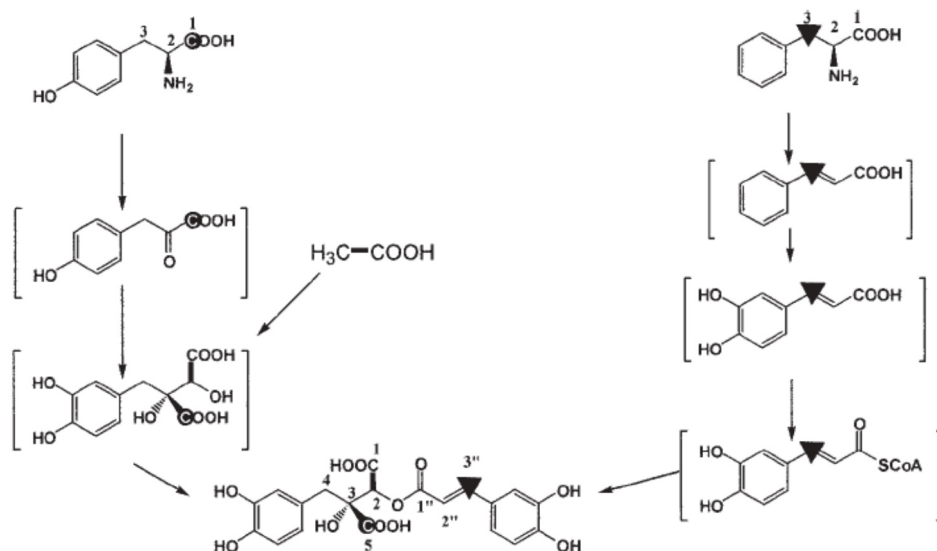


Abbildung 70

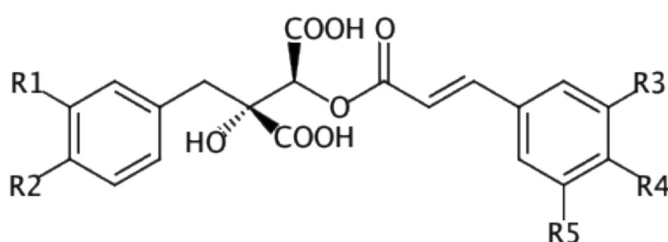
Hypothetischer Biosyntheseweg der Cimicifugasäuren aus Hasa und Tazaki (2004).

Ein weiteres Ziel ist die Isolierung oder Synthese der Fukinsäure, um auch mit dieser enzymatische Tests durchführen zu können.

4 Zusammenfassung

Eine wichtige Gruppe pflanzlicher Inhaltsstoffe sind phenolische Verbindungen, zu denen Hydroxyzimtsäureester wie Rosmarinsäure, Chlorogensäure, aber auch Zichoriensäure und die Cimicifugasäuren zählen. Die Biosynthese dieser Hydroxyzimtsäureester wird durch Hydroxycinnamoyltransferasen aus der BAHD-Superfamilie katalysiert.

Zichoriensäure wurde zuerst in der Zichorie, *Cichorium intybus* L. (Asteraceae), entdeckt. Es handelt sich um Dicafeoylweinsäure. Bisherige Untersuchungen mit Proteinrohextrakten aus Ackerschachtelhalm (*Equisetum arvense* L., Equisetaceae) und einer Erdnuss-Art (*Arachis glabrata* L., Fabaceae) zeigten, dass die Bildung der Zichoriensäure durch Reaktion von Weinsäure mit Caffeoyl-CoA zunächst zur Bildung von Kaffarsäure führt, die dann durch Anlagerung einer weiteren Kaffeesäure zu Zichoriensäure umgesetzt wird. Das daran beteiligte Enzym konnte jedoch noch nicht isoliert werden. Auch Basilikum (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae) enthält, neben Rosmarinsäure, Zichoriensäure. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteinrohextrakte führten unter Verwendung von *m*-, *L*- und *D*-Weinsäure mit Caffeoyl-CoA zu keiner Bildung von Zichoriensäure. Die von uns angelegten Zellkulturen enthielten Rosmarinsäure, jedoch keine nachweisbare Menge Zichoriensäure. Eine Elicitierung über bis zu 96 h mit 100 µM Methyljasmonat führte nicht zur Bildung von Zichoriensäure, jedoch stieg der Rosmarinsäuregehalt von anfangs 2,6 % auf 5,3 % im Trockengewicht. Eine Zufütterung von Weinsäure zu den Suspensionskulturen des Basilikums konnte die Zichoriensäure-Biosynthese nicht induzieren. Untersuchungen von Zellkulturen der Zichorie zeigten ebenfalls kein Vorhandensein der Zichoriensäure. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind nötig, da die Biosynthese der Zichoriensäure und die beteiligten Enzyme noch immer nicht bekannt sind.



Allgemeine Struktur der Cimicifugasäuren

R1: H, OH; R2: OH; R3: H, OH, OCH₃; R4: OH, OCH₃; R5: H, OH, OCH₃

Cimicifugasäuren erhielten ihren Namen von *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT., heute *Actaea racemosa* L., der Traubensilberkerze. Diese mehrjährige, ein ausgeprägtes Rhizom ausbildende Art der Ranunculaceae findet Verwendung in der Therapie von peri- und postmenopausalen Beschwerden. Die biologische Wirkung und die Biosynthese der Inhaltsstoffe der Traubensilberkerze sind bisher nicht aufgeklärt.

Eine bis dato nicht charakterisierte Nukleotidsequenz aus der Traubensilberkerze, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen Enzymen der BAHD-Enzymfamilie aufweist, konnte erfolgreich amplifiziert (ArCAS) und in *E. coli*-Zellen exprimiert werden. Das aufgereinigte Protein hat eine Größe von 50 kDa. Zur Testung auf Aktivität wurden zunächst die erforderlichen (Hydroxy)Cinnamoyl-CoA-Ester synthetisiert und Piscidinsäure aus einem Extrakt aus *Quillaja saponaria* isoliert. Tests des Enzyms mit Piscidinsäure und *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl-, Sinapoyl- und Feruloyl-CoA führten zur Bildung der entsprechenden Cimicifugasäuren. Die Charakterisierung des Enzyms unter vorher bestimmten optimalen Bedingungen zeigte, dass *p*-Cumaroyl-CoA mit einem K_m -Wert von $6,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ das am besten akzeptierte Substrat ist.

Ein reverser Enzymtest mit Fukinolsäure und Coenzym A als Substraten zeigt die Bildung von Fukinsäure. Dies ist ein erster Hinweis auf die Akzeptanz der Fukinsäure durch die ArCAS, da Fukinsäure für Tests nicht zur Verfügung stand.

Das Anlegen von Zellkulturen aus Frischmaterial und Samen der Traubensilberkerze war bisher nicht erfolgreich, doch stellen Zellkulturen eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen der Expression der ArCAS dar. Zudem ist die Biosynthese der Piscidin- und Fukinsäure bislang nicht untersucht, so dass auch in diesem Fall die Zellkulturen verwendet werden könnten.

Eine phylogenetische Untersuchung ergab eine Verwandtschaft der ArCAS mit einer Spermidin Hydroxycinnamoyltransferase aus *Malus domestica* Borkh., einer Äpfelsäure Hydroxycinnamoyltransferase aus *Trifolium pratense* L. und einer Tetrahydroxyhexandisäure Hydroxycinnamoyltransferase aus *Phaseolus vulgaris* L.. Trotz dieser phylogenetischen Nähe wurde keines der Substrate dieser Enzyme durch die ArCAS akzeptiert. Auch die Substrate anderer Hydroxycinnamoyltransferasen wie *p*-Hydroxyphenylmilchsäure, Chinasäure, Shikimisäure und verschiedene Aminosäuren wurden getestet, jedoch nicht durch das Enzym akzeptiert. Daraus lässt sich ableiten, dass ArCAS eine hohe Spezifität für die Bildung von Cimicifugasäuren hat.

Blüten, Blätter und Wurzeln von *Actaea racemosa* wurden extrahiert und der Gehalt an Polyphenolen mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz bestimmt. Den höchsten Gehalt an Polyphenolen wiesen die Blätter auf, den niedrigsten hingegen die Wurzeln. Weitere Untersuchungen der Extrakte zeigten, dass die Mengen an Cimicifugasäuren variieren. Ebenso unterscheidet sich die Verteilung der Cimicifugasäuren innerhalb der Pflanze, überdies sind nicht alle der bekannten Cimicifugasäuren nachweisbar.

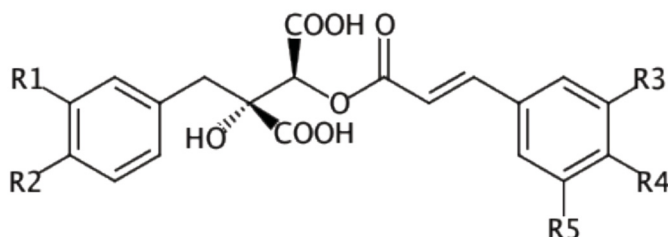
Die ArCAS ist das Hauptenzym der Cimicifugasäure-Biosynthese aus CoA-aktivierten Hydroxyzimtsäuren und Piscidinsäure. Durch die hier präsentierten Untersuchungen ist erstmalig ein Schritt der Bildung von Cimicifugasäuren in *Actaea racemosa* aufgeklärt worden.

5 Summary

An important group of plant compounds are phenolics, especially hydroxycinnamic acid esters like rosmarinic acid, chlorogenic acid, but also chicoric acid and cimicifugic acids. Most of these hydroxycinnamic acid esters are synthesised by BAHD-type hydroxycinnamoyltransferases.

Chicoric acid, dicaffeoyltartaric acid, was first isolated from *Cichorium intybus* L. (Asteraceae). The formation of chicoric acid is a two-step reaction. Caffeic acid is transferred from caffeoyl-CoA to tartaric acid to form caftaric acid, a further addition of caffeic acid leads to chicoric acid. This was observed in crude protein extracts from *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) and *Arachis glabrata* L. (Fabaceae). The main enzyme of this reaction was not isolated yet.

The common basil (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae) contains, amongst others, rosmarinic and chicoric acids. In this thesis, crude protein extracts of basil cell cultures were used to investigate the formation of chicoric acid. For the enzyme assays *m*-, *L*-, as well as *D*-tartaric acid were used with caffeoyl-CoA as donor substrate. None of these assays showed a formation of chicoric acid. There was even no chicoric acid present in cell cultures we established although rosmarinic acid could be found. Elicitation of the cell cultures up to 96 h with 100 μ M methyl jasmonate resulted in an increase of rosmarinic acid content from 2.6 % to 5.3 % of cell dry weight. However, the biosynthesis of chicoric acid was not induced. Supplementary feeding of tartaric acid to the cell cultures could not induce the biosynthesis of chicoric acid. Furthermore, investigations on cell cultures of *Cichorium intybus* revealed the absence of chicoric acid. Further research is necessary because the involved enzymes of chicoric acid biosynthesis are still unknown.



General structure of cimicifugic acids

R1: H, OH; R2: OH; R3: H, OH, OCH₃; R4: OH, OCH₃; R5: H, OH, OCH₃

Cimicifugic acids got the name from *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT., nowadays *Actaea racemosa* L.. This perennial plant from the family Ranunculaceae forms a distinct rhizome. Black cohosh is used against peri- and postmenopausal afflictions. Nevertheless, the biological effect and the biosynthesis of cimicifugic acids are not elucidated yet. An uncharacterised nucleotide sequence from *Actaea racemosa* with a high sequence similarity to enzymes from BAHD-superfamily was amplified (ArCAS) and expressed in *E. coli* cells.

The encoded protein has a molecular mass of 50 kDa. Different hydroxycinnamoyl-CoA esters have been synthesised and piscidic acid was isolated from *Quillaja saponaria* extracts. Assays with *p*-coumaroyl-, caffeoyl-, sinapoyl- and feruloyl-CoA as acceptor substrates lead on to the formation of the respective cimicifugic acids. Optimal conditions for the enzyme assays were determined and kinetic assays were performed. The best accepted substrate was *p*-coumaroyl-CoA with a K_m -value of $6.8 \pm 2.3 \mu\text{M}$.

A reverse enzyme assay, using fukinic acid and coenzyme A as substrates, showed the formation of fukiic acid by the enzyme. The isolation of fukiic acid was not possible, until now, so this result is a first evidence that fukiic acid is a substrate of ArCAS.

The establishment of plant cell cultures from fresh plant material as well as seeds was not successful. Cell cultures would be important for expression analysis and further investigations on the biosynthesis of piscidic and fukiic acid.

Investigations on the phylogenetic relationship of ArCAS with other BAHD-hydroxycinnamoyltransferases showed a close relationship to a spermidine hydroxycinnamoyltransferase from *Malus domestica*, as well as a malate hydroxycinnamoyltransferase from *Trifolium pratense* and a tetrahydroxyhexanedioic acid hydroxycinnamoyltransferase from *Phaseolus vulgaris*.

However, ArCAS did not accept the substrates of these enzymes. Also substrates from other hydroxycinnamoyltransferase like *p*-hydroxyphenyllactic acid, quinic acid, shikimic acid or amino acids showed no product formation. ArCAS therefore has a high specificity for the formation of cimicifugic acids.

Flowers, leaves and roots of *Actaea racemosa* were extracted and the total phenolic content determined using Folin-Ciocalteu reagent. The highest content could be found in leaves whereas the lowest was in the roots. Further investigations on these extracts revealed different distribution patterns of cimicifugic acids as well as different amounts of these acids in the different parts of the plant.

ArCAS is the main enzyme for the biosynthesis of cimicifugic acid from (hydroxy)cinnamoyl-CoA esters and piscidic acid. The investigations presented in this thesis are a first step to elucidate the biosynthesis of cimicifugic acids in *Actaea racemosa*.

6 Anhang

6.1 Verwendete Sequenzen für den Stammbaum

Coding / UNIPROT Nummer	Name und Herkunft des Enzyms
AAQ62868 / Q6NQK4	<i>Arabidopsis thaliana</i> ω -hydroxy fatty acid feruloyl-transferase
AAZ80046 / A4U7G0	<i>Cynara cardunculus</i> hydroxycinnamoyl-CoA:quinat hydroxycinnamoyltransferase
ABH04595 / Q9F178	<i>Arabidopsis thaliana</i> shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase
ABK79689 / C3PTS7	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> hydroxycinnamoyl-CoA:quinat hydroxycinnamoyltransferase
ABO40491 / A4ZKI0	<i>Coffea arabica</i> (coffee) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase
ABO47805 / A4ZKE4	<i>Coffea canephora</i> hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase
ABO52899 / A6Y879	<i>Pinus radiata</i> (Monterey pine) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate hydroxycinnamoyltransferase
ACI16631 / B6D7P2	<i>Trifolium pratense</i> malate O-hydroxycinnamoyl transferase
ACI28534 / B6DQK4	<i>Trifolium pratense</i> shikimate O-hydroxycinnamoyl transferase
ACZ52698 / D1L8A9	<i>Lonicera japonica</i> hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyltransferase
ADB44897 / D2XJ64	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> hydroxycinnamoyl transferase
ADD71921 / D4NUX0	<i>Actaea racemosa</i> BAHD-type hydroxycinnamoyl-transferase
ADL62854 / E0XJQ0	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> hydroxycinnamoyl-CoA transferase 1
ADL62855 / E0XJQ1	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> hydroxycinnamoyl-CoA transferase 2
AED94629 / F4JWW6	<i>Arabidopsis thaliana</i> ω -hydroxyacid hydroxycinnamoyltransferase

AED97769 / Q9FFQ7	<i>Arabidopsis thaliana</i> fatty alcohol: caffeoyl-CoA acyltransferase
AEJ88365 / G8FL40	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber) hydroxycinnamoyl-transferase
AEK80405 / G0ZDQ5	<i>Lonicera japonica</i> HQT
AEM63675 / J7EQE1	<i>Platycodon grandiflorus</i> hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/ quinate hydroxycinnamoyltransferase
AEM63676 / J7ET90	<i>Platycodon grandiflorus</i> hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase
AET80686 / G9HTF5	<i>Nicotiana attenuata</i> spermidine hydroxycinnamoyl transferase
AFF19203 / H9N9G5	<i>Erythroxylum coca</i> hydroxycinnamoyl-CoA:quininate hydroxycinnamoyltransferase
AGA20364 / V9LY55	<i>Leucaena leucocephala</i> (white popinac) hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyl transferase
AGJ03151 / S4UGU2	<i>Populus trichocarpa</i> (black cottonwood) ω -hydroxyacid/ fatty alcohol hydroxycinnamoyltransferase
AGM90558 / R9RYW2	<i>Panicum virgatum</i> (switchgrass) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase 2
AHA44839 / V5L339	<i>Larix kaempferi</i> hydroxycinnamoyl-CoA shikimate hydroxycinnamoyltransferase
AIG20957 / A0A075QSB8	<i>Lonicera japonica</i> hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase
AKP24035 / A0A119J7Z8	<i>Solanum melongena</i> (eggplant) spermine hydroxycinnamoyl transferase 4
ALF00095 / A0A0M3UKA9	<i>Malus domestica</i> (apple) spermidine hydroxycinnamoyl transferase
AMK01803 / A0A126Q9A5	<i>Solanum melongena</i> (eggplant) hydroxycinnamoyl coenzyme A-quininate transferase
AMK38063 / A0A140DDD6	<i>Physcomitrella patens</i> PpHCT1 shikimate transferase
ANN12608 / A0A193BL32	<i>Cichorium intybus</i> (chicory) hydroxycinnamoyl-CoA quinate transferase (HCT1)
ANN12609 / A0A193BL30	<i>Cichorium intybus</i> (chicory) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyl transferase (HCT2)

ANN12610 / A0A193BL31	<i>Cichorium intybus</i> (chicory) hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HQT1)
ANN12611 / A0A193BL33	<i>Cichorium intybus</i> (chicory) hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate transferase (HQT2)
ANN12612 / A0A193BL34	<i>Cichorium intybus</i> (chicory) hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HQT3)
AOX15526 / V7BKA6	<i>Phaseolus vulgaris</i> tetrahydroxyhexanedioic acid O-hydroxycinnamoyl transferase
BAJ14794 / E0D875	<i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase
BAJ14795 / Q9SST8	<i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato) hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyltransferase
BAO20883 / V5YU80	<i>Panicum virgatum</i> (switchgrass) hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase
CAD47830 / Q8GSM7	<i>Nicotiana tabacum</i> (common tobacco) hydroxycinnamoyl transferase (shikimate)
CAE46932 / Q70G33	<i>Nicotiana tabacum</i> (common tobacco) hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
CAE46933 / Q70G32	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato) hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
CAK55166 / A0PDV5	<i>Solenostemon scutellarioides</i> hydroxycinnamoyl transferase (hydroxyphenyllactate)
CAM84302 / D6BK25	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
CAR92145 / D8L7F0	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
CAT00081 / D1GJ93	<i>Coffea arabica</i> (coffee) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase
CAT00082 / D1GJ94	<i>Coffea arabica</i> (coffee) hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase
CBI83579 / E8ZAP2	<i>Solenostemon scutellarioides</i> hydroxycinnamoyl transferase (shikimate)

CBW35684 / G0LD36	<i>Melissa officinalis</i> (common balm) hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyltransferase
CDG56248 / W0UVP9	<i>Glechoma hederacea</i> hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase 1
CDG56251 / W0UVU2	<i>Glechoma hederacea</i> hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyltransferase 1
CDG56252 / W0UU80	<i>Glechoma hederacea</i> hydroxycinnamoyltransferase 1
EF153931 / A4ZKM4	<i>Coffea canephora</i> hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyltransferase
EOY04585 / A0A061EQJ2	<i>Theobroma cacao</i> (cocoa) hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase

6.2 Sequenzen zur Ableitung der Actin-Primer

Coding / UNIPROT Nummer	Name und Herkunft des Enzyms
JX436162 / J9R4U0	<i>Adonis aestivalis</i> actin mRNA, partial cds.
GQ324996 / C7EY48	<i>Thalictrum thalictroides</i> actin mRNA, partial cds.
AB819286 / U6C4Y9	<i>Delphinium grandiflorum</i> DgACTIN mRNA for actin, partial cds.
AB587096 / E5RUN8	<i>Coptis japonica</i> CjACT1 mRNA for actin, partial cds

6.3 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ArCAS	<i>Actaea racemosa</i> Cimicifugasäuresynthase
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
CA	Cimicifugasäure
cDNA	komplementäre DNA
CIA	Chlorogensäure
ChA	Zichoriensäure
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbamat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESI	Elektronensprayionisation
EtOH	Ethanol
FA	Fukinolsäure
GAE	Gallussäureequivalente
gDNA	genomische DNA
HCl	Salzsäure
HCT	Hydroxycinnamoyltransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HQT	Hydroxycinnamoyl-Chinasäure-Transferase
HSQT	Hydroxycinnamoyl-Shikimisäure/Chinasäure-Transferase

HST	Hydroxycinnamoyl-Shikimisäure-Transferase
IES	Indol-3-essigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KPi	Kaliumphosphatpuffer
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung Verhältnis
MeOH	Methanol
MJ	Methyljasmonat
MW	Mittelwert
NAA	1-Naphthylessigsäure
NBT	Nitrotetrazoliumblau
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>p</i> HPL	<i>p</i> -Hydroxyphenylmilchsäure
RA	Rosmarinsäure
RAS	Rosmarinsäuresynthase
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktosid

6.4 Aminosäurecodes

Aminosäure	3 Buchstabencode	1 Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Warad I, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2017) UHPLC/MS2-based approach for the comprehensive metabolite profiling of bean (*Vicia faba* L.) by-products: A promising source of bioactive constituents. *Food Research International* 93:87-96
- Ae N, Arihara J, Okada K, Yoshihara T, Johansen C (1990) Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. *Science* 248 (4954):477-480
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun ZK, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen A, De Vos RCH, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12 (5):647-661
- Albrecht MA, McCarthy BC (2007) Effects of storage on seed dormancy and survivorship in black cohosh (*Actaea racemosa* L.) and goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.). *Seed Science and Technology* 35 (2):414-422
- Albrecht MA, McCarthy BC (2011) Variation in dormancy and germination in three co-occurring perennial forest herbs. *Plant Ecology* 212 (9):1465-1477
- Bayer A, Ma XY, Stockigt J (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis - functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (10):2787-2795
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62 (3):293-300
- Beuerle T, Pichersky E (2002) Enzymatic synthesis and purification of aromatic Coenzyme A esters. *Analytical Biochemistry* 302 (2):305-312
- Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V (2007) *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, vol 6. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Boatright J, Negre F, Chen XL, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N (2004) Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology* 135 (4):1993-2011
- Bontpart T, Cheynier V, Ageorges A, Terrier N (2015) BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytologist* 208 (3):695-707
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2):248-254
- Bridge W, Coleman F, Robertson A (1948) Constituents of "Cortex *Piscidia erythrinae*." I. Structure of piscidic acid. *Journal of the Chemical Society* 1948:257-260
- Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK (2003) A new class of *N*-hydroxycinnamoyl-transferases - Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (Ec 2.3.1.64). *Journal of Biological Chemistry* 278 (16):13919-13927
- Carvalho KR, Silva AB, Torres MCM, Pinto FCL, Guimaraes L (2015) Cytotoxic alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* lindl. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26 (10):1976-1980
- Chen SN, Fabricant DS, Lu ZZ, Zhang HJ, Fong HHS, Farnsworth NR (2002) Cimicracemates A-D, phenylpropanoid esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa*. *Phytochemistry* 61 (4):409-413

- Cle C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69 (11):2149-2156
- Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR (2001) The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research* 15 (3):183-205
- D'Auria JC (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9 (3):331-340
- Dawson RF (1941) The localization of the nicotine synthetic mechanism in the tobacco plant. *Science* 94:396-397
- Dawson RMC (1986) *Data for biochemical research*. 3 edn. Clarendon Press, Oxford
- Ding P, Chen D (2008) Phenolic components of Radix Sophorae Tonkinensis. *Zhongcaoyao* 39 (2):186-188
- Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E (1998) Acetyl-CoA : benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal* 14 (3):297-304
- Díaz de Cerio E, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Ferranti P, Nicoletti R, Perrotta GM, Gómez-Caravaca AM (2018) Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (15):3547-3557
- Elejalde-Palmett C, de Bernonville TD, Glevarec G, Pichon O, Papon N, Courdavault V, St-Pierre B, Giglioli-Guivarc'h N, Lanoue A, Besseau S (2015) Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. *Journal of Experimental Botany* 66 (22):7271-7285
- Ellman GL (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74 (2):443-450
- Erb M, Lenk C, Degenhardt J, Turlings TCJ (2009) The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in Plant Science* 14 (12):653-659
- Eudes A, Pereira JH, Yogiswara S, Wang G, Benites VT, Baidoo EEK, Lee TS, Adams PD, Keasling JD, Loque D (2016) Exploiting the Substrate Promiscuity of Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase to Reduce Lignin. *Plant and Cell Physiology* 57 (3):568-579
- Fabricant DS, Nikolic D, Lankin DC, Chen SN, Jaki BU, Krunić A, van Breemen RB, Fong HHS, Farnsworth NR, Pauli GF (2005) Cimipronidine, a cyclic guanidine alkaloid from *Cimicifuga racemosa*. *Journal of Natural Products* 68 (8):1266-1270
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4):783-791
- Fernando I, Abeysinghe DC, Dharmadasa RM (2013) Determination of phenolic contents and antioxidant capacity of different parts of *Withania somnifera* (L.) Dunal. from three different growth stages. *Industrial Crops and Products* 50:537-539
- Ferrare K, Bidel LPR, Awwad A, Poucheret P, Cazals G, Lazennec F, Azay-Milhau J, Tournier M, Lajoix AD, Tusch D (2018) Increase in insulin sensitivity by the association of chicoric acid and chlorogenic acid contained in a natural chicoric acid extract (NCRAE) of chicory (*Cichorium intybus* L.) for an antidiabetic effect. *Journal of Ethnopharmacology* 215:241-248
- Fraser CM, Rider LW, Chapple C (2005) An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiology* 138 (2):1136-1148
- Freer PC, Clover AM (1901) Constituents of Jamaica dog-wood. *Pharmaceutical Archives* 4:21-28

- Fujiwara H, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Fukui Y, Yamaguchi M, Ashikari T, Kusumi T (1998) cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant Journal* 16 (4):421-431
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 (1):151-158
- Germination Guide. <http://www.onrockgarden.com/germination-guide/actaea-racemosa>.
- Gross GG (2008) From lignins to tannins: Forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* 69 (18):3018-3031
- Gödecke T, Lankin DC, Nikolic D, Chen SN, van Breemen RB, Farnsworth NR, Pauli GF (2009a) Guanidine Alkaloids and Pictet-Spengler Adducts from Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Journal of Natural Products* 72 (3):433-437
- Gödecke T, Nikolic D, Lankin DC, Chen SN, Powell SL, Dietz B, Bolton JL, van Breemen RB, Farnsworth NR, Pauli GF (2009b) Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts. *Phytochemical Analysis* 20 (2):120-133
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4):557-580
- Hanes CS (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 26:1406-1421
- Hasa Y, Tazaki H (2004) Biosynthesis of fukinolic acid isolated from *Petasites japonicus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68 (10):2212-2214
- He BJ, Liu ZY, Jin GS, Li YM (1980) Studies on an aqueous soluble active constituent of Chuan-Shan-Long (*Dioscorea nipponica* Makino). I. Isolation and identification of *p*-hydroxybenzyl tartaric acid (piscidic acid). *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 15 (12):764-765
- Heller W, Tamm C (1975) Fukiinsäure und 3'-O-Methylfukiinsäure, zwei phenolische Hydroxycarbonsäuren aus *Piscidia erythrina*. *Helvetica Chimica Acta* 58 (4):974-979
- Hengen PN (1995) Methods and Reagents - Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences* 20 (7):285-286
- Henneicke-von Zepelin H-H (2017) 60 years of *Cimicifuga racemosa* medicinal products. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 167 (7-8):147-159
- Ho P, Liu C, Chin K, Li Y (1980) Isolation and identification of *p*-hydroxybenzyltartaric acid (piscidic acid): a watersoluble active constituent of *Dioscorea nipponica*. *Yaoxue Tongbao* 15 (10):39
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16 (6):1446-1465
- Hohlfeld M, Veit M, Strack D (1996) Hydroxycinnamoyltransferases involved in the accumulation of caffeic acid esters in gametophytes and sporophytes of *Equisetum arvense*. *Plant Physiology* 111 (4):1153-1159
- Huang Y, Jiang B, Nuntanakorn P, Kennelly EJ, Shord S, Lawal TO, Mahady GB (2010) Fukinolic acid derivatives and triterpene glycosides from black cohosh inhibit CYP isozymes, but are not cytotoxic to Hep-G2 cells in vitro. *Current drug safety* 5 (2):118-124
- Hänsel R, Sticher O (2010) *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9.Auflage edn. Springer-Verlag, Berlin

- Ishikawa S, Adu-Gyamfi JJ, Nakamura T, Yoshihara T, Watanabe T, Wagatsuma T (2002) Genotypic variability in phosphorus solubilizing activity of root exudates by pigeonpea grown in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245 (1):71-81
- Iwanaga A, Kusano G, Warashina T, Miyase T (2010a) Hyaluronidase Inhibitors from "Cimicifugae Rhizoma" (a Mixture of the Rhizomes of *Cimicifuga dahurica* and *C. heracleifolia*). *Journal of Natural Products* 73 (4):573-578
- Iwanaga A, Kusano G, Warashina T, Miyase T (2010b) Phenolic Constituents of the Aerial Parts of *Cimicifuga simplex* and *Cimicifuga japonica*. *Journal of Natural Products* 73 (4):609-612
- Jennings AC (1981) The determination of dihydroxy phenolic-compounds in extracts of plant-tissues. *Analytical Biochemistry* 118 (2):396-398
- Jiang B, Ma C, Motley T, Kronenberg F, Kennelly EJ (2011) Phytochemical Fingerprinting to Thwart Black Cohosh Adulteration: a 15 *Actaea* Species Analysis. *Phytochemical Analysis* 22 (4):339-351
- Kaur B, McCoy J-A, Eisenstein E (2013) Efficient, Season-Independent Seed Germination in Black Cohosh (*Actaea racemosa* L.). *American Journal of Plant Sciences* 5 (4):77-83
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10 (6):845-858
- Kew - Seed Information Database. <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>.
- Kojima M, Uritani I (1972) Elucidation of the structure of a possible intermediate in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue. *Plant and Cell Physiology* 13 (6):1075-1084
- Koontz L (2014) TCA Precipitation. *Laboratory Methods in Enzymology* 541:3-10
- Krogh A (1967) Thin-layer chromatographic method for the separation and identification of phorbic and piscidic acids. *Acta Chemica Scandinavica* 21 (5):1372-1374
- Krogh A (1969) Screening tests for phorbic and piscidic acids in plants by thin-layer chromatography. *Acta Chemica Scandinavica* 23 (10):3590-3591
- Kruse SO, Lohning A, Pauli GF, Winterhoff H, Nahrstedt A (1999) Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. *Planta Medica* 65 (8):763-764
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7):1870-1874
- Kusano A, Seyama Y, Nagai M, Shibano M, Kusano G (2001) Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from *Cimicifuga* species on collagenolytic activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24 (10):1198-1201
- Kusano G (2001) Studies on the constituents of *Cimicifuga* species. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 121 (7):497-521
- Kusbandari A, Susanti H, Iop (2017) Determination of total phenolic content and antioxidant activity of methanol extract of *Maranta arundinacea* L fresh leaf and tuber. In: International Pharmacy Conference (IPC) on Product Authentication - Key Factor in Quality Control of Pharmaceutical Products, Univ Ahmad Dahlan, Fac Pharmacy, Yogyakarta, INDONESIA, Sep09 2017. IOP Conference Series-Materials Science and Engineering.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680
- Lallemant LA, Zubieta C, Lee SG, Wang YC, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy AA (2012) A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *Plant Physiology* 160 (1):249-260

- Landmann C, Hucherig S, Fink B, Hoffmann T, Dittlein D, Coiner HA, Schwab W (2011) Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta* 234 (2):305-320
- Lee J, Scagel CF (2013) Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Frontiers in chemistry* 1 (40)
- Lee JM, Scagel CF (2009) Chicoric acid levels in basil (*Ocimum basilicum*) leaves. *Food Chemistry* 115 (2009):650-656
- Lee SJ, Kim MK, Lee K-G (2017) Effect of reversed coffee grinding and roasting process on physicochemical properties including volatile compound profiles. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 44:97-102
- Legrand G, Delporte M, Khelifi C, Harant A, Vuylsteker C, Morchen M, Hance P, Hilbert JL, Gagneul D (2016) Identification and Characterization of Five BAHD Acyltransferases Involved in Hydroxycinnamoyl Ester Metabolism in Chicory. *Frontiers in Plant Science* 7 (741)
- Levsh O, Chiang YC, Tung CF, Noel JP, Wang Y, Weng JK (2016) Dynamic Conformational States Dictate Selectivity toward the Native Substrate in a Substrate-Permissive Acyltransferase. *Biochemistry* 55 (45):6314-6326
- Li WK, Sun YK, Liang WZ, Fitzloff JF, van Breemen RB (2003) Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (9):978-982
- Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56:658-666
- Löser B, Kruse SO, Melzig MF, Nahrstedt A (2000) Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Medica* 66 (8):751-753
- Ma XY, Koepke J, Panjekar S, Fritzsich G, Stockigt J (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 280 (14):13576-13583
- Maier C, Conrad J, Carle R, Weiss J, Schweiggert RM (2015) Phenolic constituents in commercial aqueous Quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) wood extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (6):1756-1762
- Michaelis L, Menten ML (1913) Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitung* 49:333-369
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant Journal* 38 (1):80-92
- Mira A, Tanaka A, Tateyama Y, Kondo R, Shimizu K (2013) Comparative biological study of roots, stems, leaves, and seeds of *Angelica shikokiana* Makino. *Journal of Ethnopharmacology* 148 (3):980-987
- Moore JA, Eng S (1956) Some new constituents of *Piscidia erythrina* L. *Journal of the American Chemical Society* 78 (2):395-398
- Morales-Quintana L, Moya-Leon MA, Herrera R (2015) Computational study enlightens the structural role of the alcohol acyltransferase DFGWG motif. *Journal of Molecular Modeling* 21 (8):10
- Mugford ST, Qi XQ, Bakht S, Hill L, Wegel E, Hughes RK, Papadopoulou K, Melton R, Philo M, Sainsbury F, Lomonosoff GP, Roy AD, Goss RJM, Osbourn A (2009) A Serine Carboxypeptidase-Like Acyltransferase Is Required for Synthesis of Antimicrobial Compounds and Disease Resistance in Oats. *Plant Cell* 21 (8):2473-2484

- Mülhardt C (2013) Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg,
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22 (6):746-754
- Nikolic D, Lankin DC, Cisowska T, Chen SN, Pauli GF, van Breemen RB (2015) Nitrogen-Containing Constituents of Black Cohosh: Chemistry, Structure Elucidation, and Biological Activities. Formation, Structure, and Activity of Phytochemicals 45:31-75
- Nordal A, Gether J, Haustveit G (1966a) Non-volatile acids of succulent plants exhibiting a marked diurnal oscillation in their acid content. II. Demonstration of piscidic acid as one of the predominating acids in *Opuntia ficus-indica*. *Acta Chemica Scandinavica* 20 (5):1431-1432
- Nordal A, Haustveit G, Gether J (1966b) Preparation of piscidic acid and some of its derivatives from Jamaica dogwood, *Piscidia erythrina*. *Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap* 28 (10-11):225-228
- Nordal A, Ogner G (1964) The nonvolatile acids of succulent plants exhibiting a marked diurnal oscillation in their acid content. I. The detection of piscidic acid in *Agave americana*. *Acta Chemica Scandinavica* 18 (8):1979-1983
- Nuntanakorn P, Jiang B, Einbond LS, Yang H, Kronenberg F, Weinstein IB, Kennelly EJ (2006) Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. *Journal of Natural Products* 69 (3):314-318
- Nuntanakorn P, Jiang B, Yang H, Cervantes-Cervantes M, Kronenberg F, Kennelly EJ (2007) Analysis of polyphenolic compounds and radical scavenging activity of four American *Actaea* species. *Phytochemical Analysis* 18 (3):219-228
- Okumura FS, Smeby RR, Strong FM (1955) Piscidic acid from *Narcissus poeticus*. *Journal of the American Chemical Society* 77 (21):5750-5751
- Otani T, Ae N, Tanaka H (1996) Phosphorus (P) uptake mechanisms of crops grown in soils with low P status. II. Significance of organic acids in root exudates of pigeonpea. *Soil Science and Plant Nutrition* 42 (3):553-560
- Pavlov A, Ilieva M (1999) The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic and caffeic acids by *Lavandula vera* MM cell culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15 (3):397-399
- Peng H, Yang TB, Whitaker BD, Trough F, Shanguan LF, Dong W, Jurick WM (2016) Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal. *Horticulture Research* 3 (16062)
- Petersen M (2013) Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews* 12 (1):207-227
- Petersen M (2016) Hydroxycinnamoyltransferases in plant metabolism. *Phytochemistry Reviews* 15 (5):699-727
- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hucherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70 (15-16):1663-1679
- Petersen M, Alfermann AW (1988) 2 new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell-cultures of *Coleus blumei* - Hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Zeitschrift für Naturforschung C* 43 (7-8):501-504
- Petersen M, Hausler E, Karwatzki B, Meinhard J (1993) Proposed biosynthetic-pathway for rosmarinic acid in cell-cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189 (1):10-14
- Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Molecules of interest - Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62 (2):121-125
- Petersen MS (1991) Characterization of rosmarinic acid synthase from cell-cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry* 30 (9):2877-2881

- Powell SL, Goedecke T, Nikolic D, Chen SN, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, van Breemen RB, Lankin DC, Pauli GF, Bolton JL (2008) In Vitro Serotonergic Activity of Black Cohosh and Identification of *N*-omega-Methylserotonin as a Potential Active Constituent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (24):11718-11726
- Products CoHM (2010) Community herbal monograph on *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., rhizoma. European Medicines Agency, London
- Qiu F, McAlpine JB, Krause EC, Chen S-N, Pauli GF (2014) Pharmacognosy of Black Cohosh: The Phytochemical and Biological Profile of a Major Botanical Dietary Supplement. In: Kinghorn AD, Falk H, Kobayashi J (eds) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 99. Springer International Publishing, Cham, pp 1-68
- Queffelec C, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet J-F, Debyser Z, Witvrouw M, Cotelle P (2008) The total synthesis of fukiic acid, an HIV-1 integrase inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (10):2268-2271
- Renault H, Alber A, Horst NA, Lopes AB, Fich EA, Kriegshauser L, Wiedemann G, Ullmann P, Herrgott L, Erhardt M, Pineau E, Ehlting J, Schmitt M, Rose JKC, Reski R, Werck-Reichhart D (2017) A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications* 8
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant-tissues. *Plant Molecular Biology* 5 (2):69-76
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239 (4839):487-491
- Sakamura S, Yoshihar T, Toyoda K (1969) Fukiic acid isolated from hydrolysate of a polyphenol in *Petasites japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 33 (12):1795-1797
- Sakamura S, Yoshihar T, Toyoda K (1973) Constituents of *Petasites japonicus* - structures of fukiic acid and fukinolic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 37 (8):1915-1921
- Sander M, Petersen M (2011) Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* 233 (6):1157-1171
- Sannai A, Fujimori T, Kato K (1982) Studies on Flavor Components of Roasted Chicory Root. *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (2):429-433
- Scarpati ML, Oriente G (1958) Chicoric acid (dicafeoyltartaric acid): Its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron* 4 (1-2):43-48
- 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 (39):36566-36574
- Seel E, Hils K (1917) Über Kaffee-Ersatzmittel. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel*
- Shalit M, Guterman I, Volpin H, Bar E, Tamari T, Menda N, Adam Z, Zamir D, Vainstein A, Weiss D, Pichersky E, Lewinsohn E (2003) Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiology* 131 (4):1868-1876
- Sonnante G, D'Amore R, Blanco E, Pierri CL, De Palma M, Luo J, Tucci M, Martin C (2010) Novel hydroxycinnamoyl-Coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid. *Plant Physiology* 153 (3):1224-1238

- Spiering MJ, Urban LA, Nuss DL, Gopalan V, Stoltzfus A, Eisenstein E (2011) Gene identification in black cohosh (*Actaea racemosa* L.): expressed sequence tag profiling and genetic screening yields candidate genes for production of bioactive secondary metabolites. *Plant Cell Reports* 30 (4):613-629
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for Coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant Journal* 14 (6):703-713
- Stander MA, Van Wyk B-E, Taylor MJC, Long HS (2017) Analysis of Phenolic Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) with a Comparison of Flavonoid-Based Compounds in Natural Populations of Plants from Different Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (47):10270-10281
- Struck D, Tegtmeier M, Harnischfeger G (1997) Flavones in extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Planta Medica* 63 (3):289-289
- Stöckigt J, Zenk MH (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl coenzyme a derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C* 30 (3):352-358
- Sullivan ML (2009) A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phasic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 150 (4):1866-1879
- Sullivan ML (2014) Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. *Planta* 239 (5):1091-1100
- Sullivan ML (2017) Identification of bean hydroxycinnamoyl-CoA:tetrahydroxyhexanedioate hydroxycinnamoyl transferase (HHHT): use of transgenic alfalfa to determine acceptor substrate specificity. *Planta* 245 (2):397-408
- Suzuki H, Nakayama T, Nishino T (2003) Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA : anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry* 42 (6):1764-1771
- Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports* 18 (6):485-489
- Tabata M (1977) Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. In: Barz W, Reinhard E, MH Z (eds) *Plant Tissue Cultures and Its Bio-technological Application*. Springer-Verlag, Berlin, pp 4-16
- Tacke E, Korfhage C, Michel D, Maddaloni M, Motto M, Lanzini S, Salamini F, Döring HP (1995) Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. *Plant Journal* 8 (6):907-917
- Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, Miyase T (1998a) Piscidic acid and fukiic acid esters from *Cimicifuga simplex*. *Phytochemistry* 49 (7):2115-2119
- Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, Sakurai N, Nagai M, Miyase T (1998b) Three new fukiic acid esters, cimicifugic acids A, B and C, from *Cimicifuga simplex*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 46 (2):362-365
- Tartoff KD, Hobbs CA (1987) Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* 9 (12)
- Teles FFF, Price RL, Whiting FM, Reid BL (1994) Circadian variation of non-volatile organic acids in the prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.). *Revista Ceres* 41 (238):614-622
- Tindall KR, Kunkel TA (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27 (16):6008-6013
- Touati R, Santos SAO, Rocha SM, Belhamel K, Silvestre AJD (2017) Phenolic composition and biological prospecting of grains and stems of *Retama sphaerocarpa*. *Industrial Crops and Products* 95:244-255

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9):4350-4354
- Tsai KL, Kao CL, Hung CH, Cheng YH, Lin HC, Chu PM (2017) Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by anti-oxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget* 8 (18):29600-29612
- Valente IM, Maia MRG, Malushi N, Oliveira HM, Papa L, Rodrigues JA, Fonseca AJM, Cabrita ARJ (2018) Profiling of phenolic compounds and antioxidant properties of European varieties and cultivars of *Vicia faba* L. pods. *Phytochemistry* 152:223-229
- Walker AM, Hayes RP, Youn B, Vermerris W, Sattler SE, Kang C (2013) Elucidation of the Structure and Reaction Mechanism of Sorghum Hydroxycinnamoyltransferase and Its Structural Relationship to Other Coenzyme A-Dependent Transferases and Synthases. *Plant Physiology* 162 (2):640-651
- Walker K, Croteau R (2000a) Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2):583-587
- Walker K, Croteau R (2000b) Taxol biosynthesis: Molecular cloning of a benzoyl-CoA : taxane 2 alpha-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25):13591-13596
- Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20):12715-12720
- Walker K, Long R, Croteau R (2002b) The final acylation step in Taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (14):9166-9171
- Walker K, Schoendorf A, Croteau R (2000) Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5 alpha-ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374 (2):371-380
- Wang CZ, Zhang NQ, Wang ZZ, Qi Z, Zhu HL, Zheng BZ, Li PY, Liu JP (2017) Nontargeted Metabolomic Analysis of Four Different Parts of *Platycodon grandiflorum* Grown in Northeast China. *Molecules* 22 (8)
- Wang G, Ma C (2009) Studies on phenolic compounds from *Sophora alopecuroides*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 34 (10):1238-1240
- Wang J, De Luca V (2005) The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate. *Plant Journal* 44 (4):606-619
- Watanabe S, Hashimoto K, Tazaki H, Iwamoto Y, Shinohara N, Satoh K, Sakagami H (2007) Radical scavenging activity and inhibition of macrophage NO production by fukinolic acid, a main phenolic constituent in Japanese butterbur (*Petasites japonicus*). *Food Science and Technology Research* 13 (4):366-371
- Weitzel C, Petersen M (2011) Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry* 72 (7):572-578
- Wichtl M (2008) Teedrogen und Phytopharmaka, vol 5., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage 5. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft,
- Xia YJ, Nicolau BJ, Schnable PS (1996) Cloning and characterization of CER2, an *Arabidopsis* gene that affects cuticular wax accumulation. *Plant Cell* 8 (8):1291-1304

- Yang Q, Reinhard K, Schiltz E, Matern U (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA : anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology* 35 (6):777-789
- Yannai S (2012) Dictionary of Food Compounds. 2nd edn. CRC Press,
- Yim SH, Kim HJ, Park SH, Kim J, Williams D, Jung DW, Lee IS (2012) Cytotoxic caffeic acid derivatives from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia*. *Archives of Pharmacal Research* 35 (9):1559-1565
- Yu XH, Gou JY, Liu CJ (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression. *Plant Molecular Biology* 70 (4):421-442
- Zenk M (1979) Biochemistry of Plant Phenolics. vol 12, 1 edn. Springer US, New York
- Zhang C, Ma Y, Gao H-M, Liu X-Q, Chen L-M, Zhang Q-W, Wang Z-M, Li A-P (2013) Non-alkaloid components from *Sophora flavescens*. *Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* 38 (20):3520-3524

Veröffentlichungen

Publikationen

Eingereicht:

“A BAHD hydroxycinnamoyltransferase from Actaea racemosa catalyses the formation of fukinolic and cimicifugic acids”

Wissenschaftliche Vorträge

„Searching for hydroxycinnamoyltransferase genes in rosmarinic acid producing plants“
Postgraduate Workshop der Sektion Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Nürnberg September 2014

„First insight into the biosynthesis of cimicifugic acids“
Postgraduate Workshop der Sektion Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Meisdorf September 2016

„First insight into the biosynthesis of cimicifugic acids in Actaea racemosa“
Postgraduate Workshop der Sektion Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Warberg Oktober 2018

Posterbeiträge

„Investigations on hydroxycinnamoyltransferases“
Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Freising September 2015

„Investigations on hydroxycinnamoyltransferases“
Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Aachen März 2016

„Investigations on the formation of cimicifugic acids in Actaea racemosa“
Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt März 2017

„Biosynthesis of cimicifugic acids in Actaea racemosa“
Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Kiel September 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Untersuchungen zur Bildung von Hydroxymzimtsäureestern in *Ocimum basilicum*,
Cichorium intybus und *Actaea racemosa*“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

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 06.11.2018

