

***Die Rolle der Sanguinarinreduktase in der
Kontrolle des Benzophenanthridin-
Metabolismus in Pflanzen***

DISSERTATION

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Henriette Ulrike Müller
geboren am 01.01.1985 in Greiz

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Werner Roos

2. Prof Dr. Martin Müller

3. Prof. Dr. Martin Röser

Halle (Saale), den 01.10.2012

verteidigt am: 08.03.2013

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Inhalt

Liste der Tabellen	VIII
Liste der Abbildungen	IX
Zusammenfassung	XII
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Entgiftungsmechanismen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe	1
1.1.1 Exkretion in extrazelluläre Kompartimente/ Extrazelluläre Biosynthese	1
1.1.2 Innere Exkretion in die Vakuole	2
1.1.3 Toxin-Toleranz durch Mutation des Zielproteins	3
1.1.4 Metabolisierung der eigenen Toxine.....	4
1.1.5 Metabolisierung pflanzlicher Toxine in Pilzen und Herbivoren	4
1.2 Benzophenanthridine – die Hauptalkaloide von <i>Eschscholzia californica</i>	5
1.2.1 Benzophenanthridin-Biosynthese	5
1.2.2 Induktion und Ablauf der Alkaloidbildung nach Elicitorkontakt	8
1.3 Die Sanguinarinreduktase – der Entgiftungsmechanismus der Benzophenanthridine in <i>Eschscholzia californica</i>	9
1.4 Zielsetzung	11
2 Materialien und Methoden	12
2.1 Chemikalien.....	12
2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kitsysteme.....	12
2.3 Oligonukleotide.....	12
2.4 Enzyme und Polymerasen	13
2.5 Plasmide und Mikroorganismen	13
2.6 Nährmedien	14
2.7 Zellkultivierung von <i>Eschscholzia californica</i>	15

2.8 Beschaffung des Pflanzenmaterials	15
2.9 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.9.1 Isolierung genomischer DNA.....	15
2.9.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	16
2.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
2.9.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.9.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	18
2.9.6 DNA-Sequenzierung	18
2.9.7 Erstellen von alignments und Stammbäumen	18
2.9.8 Gateway-Klonierung.....	19
2.9.8.1 Methodenüberblick	19
2.9.8.2 Auswahl des DNA-Abschnittes für den Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektor.....	20
2.9.8.3 Gateway Rekombinationsreaktionen	20
2.9.9 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	21
2.9.9.1 Herstellung hitzekompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	21
2.9.9.2 Hitzeschock	22
2.9.10 Plasmid-Isolation	22
2.9.10.1 Plasmid-Isolation aus <i>E.coli</i> mittels Alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979).....	22
2.9.10.2 Plasmid-Isolation aus <i>E.coli</i> mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System.....	23
2.9.11 Überprüfung des Transformationserfolges mittels Restriktionsanalyse.....	23
2.9.12 Transformation der Pflanzenzellen mittels Biolistic Bombardment	24
2.9.12.1 DNA-Goldpartikel-Präparation.....	24
2.9.12.2 Biolistic Bombardment	24
2.9.12.3 Zellkultivierung nach Biolistic Bombardment	25
2.9.13 Southern Blotting	26
2.9.13.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	26
2.9.13.2 DNA-Gelelektrophorese.....	26

2.9.13.3 Southern Transfer	27
2.9.13.4 Herstellung der markierten Sonde.....	28
2.9.13.5 Hybridisierung.....	28
2.9.14 Semiquantitative RT-PCR.....	29
2.9.14.1 RNA-Isolierung	29
2.9.14.2 Quantifizierung der RNA.....	29
2.9.14.3 cDNA-Synthese	30
2.9.14.4 PCR	30
2.10 Biochemische Methoden	31
2.10.1 Herstellung eines Extraktes der löslichen Proteine.....	31
2.10.1.1 Methode 1: aus Pflanzenmaterial.....	31
2.10.1.2 Methode 2: aus Zellkulturen.....	31
2.10.2 Abtrennung der mikrosomalen Fraktion.....	32
2.10.3 Präparation von Plasmamembran-Vesikeln im wässrigen Zwei-Phasen-System.....	32
2.10.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.10.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	33
2.10.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay-Kit	34
2.10.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting.....	35
2.10.5.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	35
2.10.5.2 Semidry-Blotting	36
2.10.5.3 Immunologischer Nachweis.....	37
2.10.5.4 Computergestützte Auswertung der entwickelten Western Blots.....	37
2.10.6 Herstellung von Dihydrobenzophenanthridinen.....	38
2.10.7 Enzymassay zur Bestimmung der Sanguinarinreduktase-Aktivität	38
2.10.8 Messung der Phospholipase A ₂ - Aktivität	39
2.10.9 Messung des vakuolären pH-Shifts	40
2.10.10 Messung der Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase	41

2.11 Experimente mit Zellsuspensionen	42
2.11.1 Vorbereitung der Zellsuspensionen	42
2.11.2 Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin.....	42
2.11.3 Inkubation von Zellsuspensionen mit Hefeelicitor	42
2.11.4 Inkubation von Zellsuspensionen mit Nigericin	43
2.11.5 Inkubation von Zellsuspensionen mit Elicitor und Dihydrobenzophenanthridinen.....	43
2.11.6 Fluorimetrische Quantifizierung der Alkaloide	43
2.12 HPLC- und MS-basierte Methodik.....	45
2.12.1 HPLC-Messungen.....	45
2.12.1.1 Extraktion aus Zellsuspensionen.....	45
2.12.1.2 Chromatographie, Identifizierung und Quantifizierung	45
2.12.2 Massenspektrometrische Analysen.....	47
2.12.2.1 ESI-FT-ICR-MS.....	47
2.12.2.2 LC-ESI-MS/MS	47
3 Ergebnisse – Teil 1: RNAi-induziertes Gen-silencing der Sanguinarinreduktase.....	49
3.1 Isogene der Sanguinarinreduktase	49
3.2 Transformation und Nachweis des silencings des Sanguinarinreduktase-Gens.....	50
3.2.1 Auswahl geeigneter Vektoren	50
3.2.2 Nachweis des Transformationsereignisses	50
3.3 Charakterisierung der RNAi-Zellstämme.....	52
3.3.1 Übersicht über wesentliche Charakteristika	52
3.3.2 Wachstum der Zell-Linien.....	53
3.3.3 Gehalt an Sanguinarinreduktase-Protein	54
3.3.4 Kopienzahl des Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektors.....	54
3.3.5 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Basaler Alkaloidgehalt.....	55
3.3.6 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Gruppe I: Zell-Linien JC, 2d und 5b	58
3.3.6.1 Alkaloidmetabolismus nach Sanguinarinzugabe	58

3.3.6.2 Alkaloid-Antworten auf Elicitorzugabe	62
3.3.7 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Gruppe II: Zell-Linien 1C2 _Ü , 2b _Ü und 3C1 _Ü	65
3.3.7.1 Alkaloidmetabolismus nach Sanguinarinzugabe	65
3.3.7.2 Alkaloidantworten auf Elicitorzugabe.....	67
3.3.8 Überblick und Fazit.....	71
3.4 Worauf beruhen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von transgenen Zellstämmen?	72
3.4.1 Aktivität der Phospholipase A ₂	72
3.4.2 Elicitor-ausgelöste Stimulation von vakuolären Na ⁺ /H ⁺ -Antiportern.....	73
3.4.3 Antworten auf künstlichen pH-Shift.....	74
3.4.4 Regulierung zweier ausgewählter Biosynthese-Gene des Alkaloidstoffwechsels nach Elicitorkontakt.....	76
3.4.5 Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase nach Elicitorkontakt.....	77
3.4.6 Einfluss von Dihydrosanguinarin auf die Elicitor-induzierte Alkaloidproduktion.....	79
3.5 Diskussion – die Rolle der Sanguinarinreduktase in der Benzophenanthridin-Biosynthese	84
3.5.1 Worauf beruhen die Unterschiede in der Elicitierbarkeit der Zellstämme?	84
3.5.1.1 Phänotyp der nicht elicitierbaren Zell-Linien (Gruppe I)	84
3.5.1.2 Phänotyp der hyper-elicitierbaren Zell-Linien (Gruppe II).....	85
3.5.2 Einfluss der Sanguinarinreduktase auf das Alkaloidspektrum	86
3.5.2.1 Grundsätzliches zur Biosynthese	86
3.5.2.2 Zum basalen Alkaloidspektrum.....	87
3.5.2.3 Das Alkaloidspektrum elicitierter Zellen.....	89
3.5.3 Fazit und Ausblick.....	89
4 Ergebnisse – Teil 2: Beiträge zur Evolution der Sanguinarinreduktase	91
4.1 Einführung und Zielstellung	91
4.2 Suche nach Sanguinarinreduktase-ähnlichen Sequenzen in verschiedenen Pflanzen mittels PCR	91
4.2.1 Suche in öffentlichen Datenbanken	91

4.2.2 Suche nach Gensequenzen mit Ähnlichkeit zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase	92
4.2.3 Suche nach dem Insert SEDVIDASFSGPM.....	96
4.3 Immunologischer Nachweis von Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein	98
4.3.1 Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in <i>Eschscholzia californica</i>	98
4.3.2 Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in ausgewählten Pflanzen	100
4.4 Nachweis der Sanguinarinreduktaseaktivität	102
4.4.1 Sanguinarinreduktase-Aktivität in <i>Eschscholzia californica</i>	102
4.4.2 Sanguinarinreduktase-Aktivität in ausgewählten Pflanzen.....	103
4.5 Zusammenfassung	105
4.6 Diskussion.....	106
4.6.1 Suche auf DNA-, Protein- und Aktivitätsebene	106
4.6.2 Der Vorläufer des Sanguinarinreduktase-Proteins.....	107
4.6.3 Welche Mutationen haben die Sanguinarinreduktase entstehen lassen?	109
4.6.4 Potentielle Selektionskriterien für die Evolution der Sanguinarinreduktase.....	110
4.6.5 Ausblick.....	112
5 Literaturverzeichnis	114
6 Verzeichnis der Abkürzungen	124
7 Anhang.....	126
7.1 Geräte.....	126
7.2 Verbrauchsmaterialien.....	127
7.3 Kitsysteme	128
7.4 Verwendete Vektoren für die Gateway-Klonierung	128
7.4.1 donor-Vektor	128
7.4.2 destination-Vektor.....	129
7.5 UPLC-MS/MS-Daten der Alkaloide der Zellkultur von <i>Eschscholzia californica</i>	129
7.6 Southern Blots.....	131

7.6.1 Southern Blots der Sanguinarinreduktase-Isogene.....	131
7.6.2 Southern Blots zur Bestimmung der Kopienzahl des Vektors pK7GWIWG2(II)	132
7.7 Liste aller mittels PCR untersuchten Pflanzen	132
7.8 Alignment der Proteinsequenzen des aktiven Zentrums nach ClustalW.....	136
7.9 Western Blots zum Nachweis von Sanguinarinreduktase und 1XQ6 in verschiedenen Pflanzen	138
7.10 Pflanzen ohne messbare Sanguinarinreduktase-Aktivität	144

Liste der Tabellen

Tabelle 1:	Oligonukleotide.....	12
Tabelle 2:	Enzyme, Polymerasen	13
Tabelle 3:	Verwendete Plasmide	14
Tabelle 4:	Stämme von <i>Escherichia coli</i>	14
Tabelle 5:	PCR-Pipettierschema.....	17
Tabelle 6:	Zusammensetzung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems.....	33
Tabelle 7:	Zusammensetzungen von Sammel- und Trenngel.....	36
Tabelle 8:	Identifizierte Benzophenanthridin- und Dihydroalkaloide in Kulturen von <i>Eschscholzia californica</i>	46
Tabelle 9:	Ergebnisse der Southern Blots zur Ermittlung der Isogene der Sanguinarinreduktase.	50
Tabelle 10:	Übersicht über wesentliche Charakteristika der transformierten Zell-Linien und des Wildtyps	52
Tabelle 11:	Detektierte Banden nach Southern Blot mit anti-pK7-Sonde.....	55
Tabelle 12:	Immunologische Nachweise von Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in ausgewählten Pflanzen	100
Tabelle 13:	Geräte	126
Tabelle 14:	Verbrauchsmaterialien.....	127
Tabelle 15:	Kitsysteme.....	128
Tabelle 16:	UPLC-MS/MS Daten der Alkaloide aus Zellkulturen von <i>Eschscholzia californica</i>	130
Tabelle 17:	Liste aller mittels PCR überprüften Pflanzen und Befunde.....	132
Tabelle 18:	Liste der Pflanzen ohne Sanguinarinreduktase-Aktivität.....	144

Liste der Abbildungen

Abbildung 1:	Benzophenanthridin-Biosynthese	7
Abbildung 2:	Dreidimensionales Modell von 1XQ6 (grau) und Sanguinarinreduktase (magenta)	10
Abbildung 3:	Mechanismus der Reduktion von Sanguinarin im aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase.....	10
Abbildung 4:	BP-Reaktion	19
Abbildung 5:	LR-Reaktion	20
Abbildung 6:	Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	34
Abbildung 7:	Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit.....	35
Abbildung 8:	Kalibriergerade zur Dihydrosanguinarin-Quantifizierung des Enzymassays.....	39
Abbildung 9:	Kalibriergerade zur Benzophenanthridin-Quantifizierung nach Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase-Enzymassay	41
Abbildung 10:	Kalibriergerade zur fluorimetrischen Quantifizierung der Dihydroalkaloide.....	44
Abbildung 11:	Kalibriergerade zur fluorimetrischen Quantifizierung der Benzophenanthridine	44
Abbildung 12:	HPLC-Kalibrierkurve mit Sanguinarin	46
Abbildung 13:	Bindestellen der Sonden für die Suche nach Isogenen	49
Abbildung 14:	destination-Vektor mit Primer-Bindestellen zum Nachweis der Transformation	51
Abbildung 15:	Wachstumskurven der Suspensionskulturen der transformierten Zell-Linien und des Wildtyps.....	53
Abbildung 16:	Western Blot zur Detektion des Sanguinarinreduktase-Proteins	54
Abbildung 17:	Basaler Alkaloidgehalt der untersuchten Zell-Linien	56
Abbildung 18:	Alkaloidmuster von Wildtyp, JC und 3C1 _Ü im basalen Zustand (MS-Messung)	57
Abbildung 19:	Alkaloidmuster der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach einmaliger Sanguinarinzugabe – Verlauf über vier Stunden.....	59
Abbildung 20:	Alkaloidmuster der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach periodischer Sanguinarinzugabe	61
Abbildung 21:	Alkaloidgehalte 48 Stunden nach Elicitorzugabe – Zell-Linien JC, 2d und 5b	63
Abbildung 22:	Alkaloidspektrum der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach Elicitorzugabe (50 µg/ml).....	64
Abbildung 23:	Alkaloidmuster der Zell-Linie 1C2 _Ü und des Wildtyps nach einmaliger Sanguinarinzugabe – Verlauf über 4 Stunden	65
Abbildung 24:	Alkaloidmuster der Zell-Linien 1C2 _Ü , 2b _Ü und des Wildtyps nach periodischer Sanguinarinzugabe	66
Abbildung 25:	Alkaloidgehalte 48 Stunden nach Elicitorzugabe – Zell-Linien 1C2 _Ü , 2b _Ü und 3C1 _Ü .	68
Abbildung 26:	Alkaloidspektren der Zell-Linien 1C2 _Ü , 2b _Ü und des Wildtyps nach Elicitierung (1 µg/ml).....	69
Abbildung 27:	Alkaloidmuster der Zell-Linien 1C2 _Ü , 3C1 _Ü und des Wildtyps nach Elicitierung (50 µg/ml).....	70
Abbildung 28:	Aktivität der Phospholipase A ₂ (PLA ₂) in der isolierten Plasmamembran.....	72
Abbildung 29:	pH-Shift nach Elicitorkontakt am Beispiel des Wildtyps	73
Abbildung 30:	Vergleich der maximalen pH-Wert-Änderung in der Vakuole nach Elicitierung.....	74
Abbildung 31:	Alkaloidgehalte nach Elicitierung und Nigericin-Pufferbehandlung	75
Abbildung 32:	Expression von BBE und 4'OMT nach Elicitorkontakt	76
Abbildung 33:	Spezifische Enzymaktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase	78

Abbildung 34:	Mikroskopische Analyse der Alkaloidproduktion nach Elicitorkontakt	79
Abbildung 35:	Effekt verschiedener DHS-Konzentrationen auf die Alkaloid-Antwort nach Elicitierung.....	80
Abbildung 36:	Effekt verschiedener Konzentrationen des Dihydroalkaloid-Mix auf die Alkaloid-Antwort nach Elicitierung.....	81
Abbildung 37:	Effekt von DHS auf die Signalkette nach Elicitierung	82
Abbildung 38:	Veränderung des Alkaloidmusters nach Zugabe von DHS und Elicitor im Wildtyp ..	83
Abbildung 39:	Zweige der Alkaloid-Biosynthese nach (S)-Scoulerin	88
Abbildung 40:	alignment der verschiedenen Proteinsequenzen des aktiven Zentrums aus öffentlichen Datenbanken	92
Abbildung 41:	alignment von Sanguinarinreduktase (SR) und 1XQ6 zur Suche nach SR-ähnlichen aktiven Zentren	93
Abbildung 42:	alignment der Peptidsequenzen mit Homologie zum aktiven Zentrum	94
Abbildung 43:	Kladogramm der gefundenen Sanguinarinreduktase-ähnlichen Sequenzen des aktiven Zentrums.....	95
Abbildung 44:	alignment von Sanguinarinreduktase (SR) und 1XQ6 zur Insertsuche.....	96
Abbildung 45:	alignment der Peptidsequenzen mit Ähnlichkeit zum Insert SEDVIDASFGPM	97
Abbildung 46:	Kladogramm der Sequenzen mit Ähnlichkeit zum Insert.....	97
Abbildung 47:	Immunologischer Nachweis des Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Proteins.....	99
Abbildung 48:	Expression der Sanguinarinreduktase nach täglicher Sanguinarinzugabe.....	100
Abbildung 49:	Enzymaktivität in Zellkultur und verschiedenen Pflanzenteilen von <i>Eschscholzia californica</i> (E.c.)	102
Abbildung 50:	Sanguinarinreduktase-Aktivität in ausgewählten Pflanzen	104
Abbildung 51:	DNA-Sequenzen, immunologischer und Aktivitätsnachweis der Sanguinarinreduktase.....	105
Abbildung 52:	Verteilung der untersuchten Spezies im Stammbaum der Angiospermen.....	108
Abbildung 53:	Übersicht der untersuchten Spezies der Pteridophyta und Gymnospermae	109
Abbildung 54:	Übersicht über Benzophenanthridin-Biosynthese und Vorkommen einer aktiven Sanguinarinreduktase in den untersuchten Arten der Ranunculales	111
Abbildung 55:	Vektorkarte von pDONR™ 222	128
Abbildung 56:	Vektorkarte von pK7GWIWG2(II)	129
Abbildung 57:	Southern Blots zur Dokumentation der Isogene der Sanguinarinreduktase	131
Abbildung 58:	Southern Blot zur Dokumentation der Kopienzahl des Vektors	132
Abbildung 59:	Ausschnitt des alignments der Sequenzen des aktiven Zentrums, erstellt mit ClustalW	137
Abbildung 60:	Western Blot SR (1)	138
Abbildung 61:	Western Blot 1XQ6 (1)	138
Abbildung 62:	Western Blot SR (2)	139
Abbildung 63:	Western Blot 1XQ6 (2)	139
Abbildung 64:	Western Blot SR (3)	139
Abbildung 65:	Western Blot 1XQ6 (3)	140
Abbildung 66:	Western Blot SR (4)	140
Abbildung 67:	Western Blot 1XQ6 (4)	140
Abbildung 68:	Western Blot SR (5)	141
Abbildung 69:	Western Blot 1XQ6 (5)	141
Abbildung 70:	Western Blot SR (6)	141

Abbildung 71:	Western Blot 1XQ6 (6)	142
Abbildung 72:	Western Blot SR (7)	142
Abbildung 73:	Western Blot 1XQ6 (7)	142
Abbildung 74:	Western Blot SR (8)	143
Abbildung 75:	Western Blot 1XQ6 (8)	143

Zusammenfassung

1. Die Sanguinarinreduktase katalysiert die Umwandlung der in vielen Papaveraceae gebildeten, zytotoxischen Benzophenanthridinalkaloide in weniger toxische Dihydroalkaloide. Das Enzym wurde zuerst in *Eschscholzia californica* entdeckt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in zahlreichen verwandten Pflanzenspezies identifiziert. Die Rolle des Enzyms in der Kontrolle des Benzophenanthridin-Metabolismus wurde durch silencing-Experimente in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* und durch den Vergleich seines Vorkommens mit der Benzophenanthridin-Biosynthese in 189 Pflanzen untersucht.
2. In Zellkulturen von *Eschscholzia californica* wird durch den Kontakt mit einem Hefe-Elicitor die Überproduktion von Benzophenanthridinalkaloiden ausgelöst. Dabei führen zwei unterschiedliche Signalwege zur Induktion biosynthetischer Enzyme und Schutzproteine. Die gebildeten Benzophenanthridine, vor allem das zuerst entstehende Sanguinarin, werden in die Zellwand ausgeschieden, nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration rückresorbiert, durch das zytosolische Enzym Sanguinarinreduktase reduziert und die entstehenden Dihydroalkaloide in die weniger toxischen, späten Benzophenanthridine umgewandelt (Vogel et al., 2010; Weiss et al., 2006).
3. Das selektive Ausschalten der Sanguinarinreduktase mittels RNAi führte zur Etablierung zweier Gruppen von transgenen Zellkulturen:
 - a) Gruppe I („nicht-elicitierbar“) zeigt eine verbleibende Sanguinarinreduktase-Aktivität von unter 7 % des Wildtyps und eine Kopienzahl des Vektors von mehr als 3. Der basale Alkaloidgehalt liegt unter dem des Wildtyps und über den LPC- Δ pH-Signalweg kann keine Alkaloidbildung ausgelöst werden.
 - b) Gruppe II („hyper-elicitierbar“) zeigt eine verbleibende Sanguinarinreduktase-Aktivität von 15 - 30 % des Wildtyps und etwa eine Kopie des Vektors im Genom. Der basale Alkaloidgehalt und die Induktion der Biosynthese über den LPC- Δ pH-Signalweg zeigen hier ein Mehrfaches der Biosyntheseleistung des Wildtyps.Die unterschiedlichen Phänotypen der beiden Gruppen sind wahrscheinlich auf das verbliebene Ausmaß der Reduktionskapazität der Sanguinarinreduktase zurückzuführen (siehe unten).
4. In den transgenen Zellstämmen der Gruppe I ist die Induktion der Alkaloidbiosynthese durch den LPC- Δ pH-Signalweg (auslösbar durch niedrige Elicitorkonzentrationen und künstliche pH-Shifts) praktisch ausgeschaltet. Dies wird durch die fehlende Alkaloidbildung nach Elicitorkontakt und die fehlende Überexpression der Biosyntheseenzyme 4'OMT und BBE belegt. Da die basale Alkaloidproduktion und die Induktion über den Jasmonatweg (auslösbar durch hohe

- Elicitorkonzentrationen) noch möglich sind, kann ein Ausfall biosynthetischer Enzyme nicht ursächlich für diesen Phänotyp sein, sondern der Ausfall des LPC- Δ pH-Signalwegs. Die sehr geringe Kapazität zur Reduktion von extern auftretendem Sanguinarin führt zu einer früheren bzw. stärkeren Anreicherung des Alkaloids nach Elicitierung als beim Wildtyp und kann damit den LPC- Δ pH-Signalweg durch die Hemmung der Phospholipase A₂ unterbrechen.
5. Die Zellstämme der Gruppe II reagieren auf niedrige Elicitorkonzentrationen mit einer circa dreifach höheren Bildungsrate von Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden als der Wildtyp. Die im Vergleich zur Gruppe I vorhandene höhere Restaktivität der Sanguinarinreduktase (15 – 30 % des Wildtyps) vermindert hier die frühe Anhäufung von Benzophenanthridinen an der Zelloberfläche und damit die Alkaloid-Hemmung der Phospholipase A₂. Bei der Suche nach der Ursache dieser Überproduktion stellte sich heraus, dass das Produkt der Sanguinarinreduktase, Dihydrosanguinarin, bei externem Zusatz im Wildtyp eine massive Hemmung der frühen Biosynthese verursacht, wahrscheinlich die Bildung von Coclaurin oder dessen Methylierung. Die gegenüber dem Wildtyp verminderte Aktivität der Sanguinarinreduktase in Gruppe II sollte (lokal) zu einem niedrigeren Gehalt ihres Produkts Dihydrosanguinarin führen und damit die Hemmung der Biosynthese aufheben.
 6. Das Alkaloidmuster des Wildtyps wird durch den im Vergleich zu anderen Metaboliten wesentlich höheren steady state Gehalt an Protopin dominiert. Die Umsetzung des Protopins durch die Protopin-6-Hydroxylase erfolgt daher bei hoher Substratkonzentration. Damit entsteht sehr wahrscheinlich ein hoher Konzentrationsdruck auch in Richtung der Folgereaktion, d.h. für die nicht-enzymatische Umlagerung des Produkts 6-Hydroxyprotopin, welche zur Entstehung des Benzophenanthridin-Grundgerüsts führt. Die Elicitor-induzierte Alkaloidüberproduktion beinhaltet eine erhebliche Vergrößerung des Protopin-Pools und damit einen beschleunigten Fluss in die Benzophenanthridin-Biosynthese, umgekehrt wird die Hemmung der Alkaloidüberproduktion durch Dihydrosanguinarin von einem fast völligen Verlust des Protopin-Pools begleitet.
 7. Eine regulatorische Rolle des Protopin-Pools wird dadurch unterstrichen, dass er in den nicht-elicitierbaren Zell-Linien ein deutlich niedrigeres Niveau erreicht, wohingegen die hyper-elicitierbaren Stämme anstelle von Protopin dessen Präkursor N-Methylstylopin etwa gleich stark akkumulieren. Außerdem wurde in den nicht-elicitierbaren Zell-Linien die Anhäufung einer, in *Eschscholzia californica* bisher nicht beschriebenen, Verbindung nachgewiesen, die sehr wahrscheinlich N-Methylsinactin, ein Homologon des N-Methylstylopins mit offenem Dioxolan-Ring, darstellt. Beides spricht für ein Ausweichen auf einen alternativen Biosyntheseweig infolge der blockierten Bildung des Benzophenanthridin-Grundgerüsts, d.h. von Dihydrosanguinarin.

8. Ein weiteres Merkmal der transgenen Zell-Linien ist die Anreicherung von Dihydrochelirubin, einem späten Benzophenanthridin, nach Elicitierung (Gruppe II) bzw. nach experimentellem Zusatz von Sanguinarin (Gruppe I und II). Offenbar wirkt Sanguinarin, welches in beiden Gruppen langsamer reduziert wird als im Wildtyp, hemmend auf die Hydroxylierung von Dihydrochelirubin ein.
9. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Screening nach dem Gen, dem Protein und der Aktivität der Sanguinarinreduktase in einer Vielzahl von Pflanzen aus evolutionär entfernten Familien durchgeführt.

Als charakteristische DNA-Sequenzen wurden kodierende Regionen für das aktive Zentrum und ein weiteres, für die Enzymaktivität essentielles Insert mittels PCR gesucht. Die für das aktive Zentrum kodierende DNA zeigt die höchste Ähnlichkeit zwischen den Spezies, welche die Fähigkeit zur Benzophenanthridin-Biosynthese besitzen. Dabei sind mindestens zwei eng verwandte Gruppen erkennbar. Die für das Insert kodierende Sequenz zeigt auch in diesen Spezies größere Unterschiede, offenbar ist in diesem Peptid vor allem die Anzahl der enthaltenen Aminosäuren bedeutsam.
10. Daneben besitzen auch andere Pflanzen Gene mit hoher Sequenzähnlichkeit zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase, die sehr wahrscheinlich keine Benzophenanthridine bilden und nachweislich keine Sanguinarinreduktase-Aktivität besitzen, zum Beispiel Spezies der Apocynaceae, Gentianaceae und Solanaceae. Da diese Pflanzenfamilien evolutionär „jünger“ sind als die der Ranunculales, spricht dies für den Verlust der zunächst vorhandenen, aktiven Sanguinarinreduktase, gemeinsam mit dem Verlust der Alkaloidbiosynthese bei der Entstehung dieser Familien.
11. In der Mehrheit der Pflanzen, in denen die Sanguinarinreduktase immunologisch detektiert werden konnte, wurde auch das inaktive Homologon 1XQ6 nachgewiesen. Vieles spricht dafür, dass beide Proteine nach Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind, d.h. aus einem „Rossmann fold NAD(P)H binding protein“. Im Falle der Sanguinarinreduktase waren dazu mehrere Mutationen im aktiven Zentrum und zugleich der Erwerb des oben genannten Inserts notwendig. Letzterer erfolgte sehr wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer.
12. Den Selektionsdruck für die Entstehung der Sanguinarinreduktase lieferte mit großer Wahrscheinlichkeit die Toxizität der Benzophenanthridine. Dafür sprechen mehrere Gründe:
 - eine enzymatisch aktive Sanguinarinreduktase wurde bisher nur in den Spezies der Papaveraceae gefunden, welche nachweislich quaternäre Benzophenanthridine produzieren,

- eine Korrelation mit dem Vorkommen anderer Alkaloide aus der Benzylisochinolin-Familie, z.B. der Protoberberine in Berberidaceae oder Protopin-Analoga in *Thalictrum*-Arten ist nicht erkennbar,
- extern appliziertes Sanguinarin verstärkt die Expression der Sanguinarinreduktase in *Eschscholzia californica*.

Die Co-Evolution von Sanguinarinreduktase und Benzophenanthridin-Biosynthese beruht nach den nun vorliegenden Daten nicht nur auf der Fähigkeit des Enzyms zur Entgiftung dieser Alkaloide, sondern auch auf der tiefgreifenden Wirkung seines Substrats und seines Produkts bei der Kontrolle dieser Biosynthese.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Entgiftungsmechanismen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe

Pflanzen produzieren eine Vielzahl von sekundären Metaboliten, die häufig zur Abwehr von Pathogenen und Herbivoren dienen. Diese besitzen auch gegenüber der eigenen Zelle eine potentielle Toxizität, da ihre molekularen Angriffsorte meist konserviert und vielfältig und daher auch in der Pflanze selbst vorhanden sind (Wink et al., 1998). Deshalb mussten die rezenten Pflanzen im Laufe der Evolution Entgiftungsmechanismen entwickeln, um toxische Effekte vom lebenden Zytoplasma fernzuhalten (Sirikantaramas et al., 2007a). Die wesentlichen Mechanismen werden im Folgenden beschrieben.

1.1.1 Exkretion in extrazelluläre Kompartimente/ Extrazelluläre Biosynthese

Ein Schutzmechanismus vor dem eigenen Toxin ist die Exkretion in das Außenmedium oder die Zellwand. Dabei ist neben der Separierung des Toxins meist auch seine Wirkung an der Zelloberfläche „beabsichtigt“, wie bei vielen extrazellulär wirksamen Phytoalexinen:

- So wird Sclareol, ein Diterpen zur Abwehr von Pilzbefall, welches auf der Blattoberfläche von *Nicotiana spp.* gefunden werden kann (Bailey et al., 1975), bei *Nicotiana plumbaginifolia* durch den ABC-Transporter NpPDR1 aus der Zelle gepumpt, bevor eine toxische Konzentration in der Zelle erreicht wird (Stukkens et al., 2005; Jasinski et al., 2001). Die Expression dieses Transporters in *Arabidopsis thaliana* führt dort ebenfalls zu einer Sclareol-Resistenz (van den Brûle et al., 2002).
- Wie später gezeigt wird, ist die Exkretion in die Zellwand auch für die zytotoxischen Benzophenanthridine ein essentieller Schritt zur Wirkung als Phytoalexin.

Eine weitere Möglichkeit, sich vor dem eigenen Toxin zu schützen, es dabei aber auch vorrätig zu halten, ist die Exkretion in Milchsäften.

- So finden Biosynthese und Akkumulation der Benzylisochinolinalkaloide von *Papaver somniferum* in verschiedenen Zelltypen statt: Die Enzyme der frühen Morphinbiosynthese sind in den Siebelementen und Parenchymzellen des Phloems lokalisiert, die Enzyme der letzten Schritte dagegen im Latex der spezialisierten Milchröhren, die mit dem Phloem assoziiert sind. In den Milchröhren findet auch die Akkumulation der Alkaloide statt, welche in Vesikeln gespeichert werden (Samanani et al., 2006; Weid et al., 2004; Bird et al., 2003; Facchini und De Luca, 1995). Ausdifferenzierte Milchröhren besitzen keine ursprünglichen Organellen mehr, sondern sind lückenlos mit Vesikeln gefüllt. Das Zytoplasma ist nur auf kleine Randbereiche begrenzt (Bock, 1996).
- Auch die Zwischenprodukte der Monoterpenindolalkaloid-Biosynthese in *Catharanthus roseus* werden zu mehreren Zelltypen, darunter Phloem- und Epidermiszellen, transportiert, um dann in

Idioblasten und/oder Milchröhren akkumuliert zu werden (Murata und De Luca, 2005; Burlat et al., 2004).

Ein alternativer Schutzmechanismus gegen eigene Toxine kann die extrazelluläre Biosynthese einschließen: So besitzt Tetrahydrocannabinolsäure, ein Cannabinoid aus *Cannabis sativa*, die Fähigkeit, durch Schädigung der Mitochondrien den Zelltod zu induzieren, und zwar als Abwehrmechanismus gegen pathogene Mikroorganismen, bei experimentellem Zusatz jedoch auch in den eigenen Zellen. Daher wird das Enzym Tetrahydrocannabinolsäure-Synthase, welches die Umwandlung von Tetrahydrocannabinol in die hochgiftige Säure katalysiert, nur in den glandulären Trichomen in *Cannabis sativa* exprimiert (Sirikantamaras et al., 2005). Auch der bereits toxische Vorläufer, Tetrahydrocannabinol, konnte nur in den glandulären Trichomen, der Zellwand der sekretorischen Zellen und in sekretorischen Vesikeln gefunden werden, aber niemals im Zytoplasma der sekretorischen Zellen selbst. Dies weist darauf hin, dass die Tetrahydrocannabinolsäure nur extrazellulär synthetisiert wird, um intrazellulären Schädigungen vorzubeugen (Kim und Mahlberg, 1997).

1.1.2 Innere Exkretion in die Vakuole

Die Akkumulation toxischer Verbindungen in der Vakuole ist ein seit langem bekannter und häufig untersuchter intrazellulärer Schutzmechanismus im Sekundärstoffwechsel.

- Das in der Wurzel von *Coptis japonica* produzierte Berberin wird von dort durch einen nicht genau bekannten Mechanismus zu den Rhizomzellen transportiert (Ikezawa et al., 2003). Dort wird Berberin durch einen ABC-Transporter der Plasmamembran ins Zytoplasma aufgenommen (Sakai et al., 2002) und ohne weitere Anhäufung in die Vakuole weitertransportiert, wo es zu erheblichen Konzentrationen akkumuliert. Dieser letzte Schritt wird durch einen spezifischen H⁺/Berberin-Antiporter des Tonoplasten katalysiert (Otani et al., 2005).
- Auch für die weit verbreiteten Flavonoide sind Beispiele für eine vakuoläre Kompartimentierung bekannt, am besten für die Anthocyane und Anthocyanine, welche oxidative und mutagene Wirkungen ausüben können (Rueff et al., 1995; Ahmed et al., 1994). In Mais konnte die Beteiligung eines vakuolären ABC-Transporters durch gezielte Mutagenese nachgewiesen werden (Goodman et al., 2004). In den Proanthocyanidin-synthetisierenden Zellen des Samenmantels von *Arabidopsis* ist der MATE-Transporter, TT12 (transparent testa), für den Transport der Flavonoide in die Vakuole verantwortlich (Debeaujon et al., 2001). TT12 ist ein Flavonoid/H⁺-Antiporter des Tonoplasten (Klein und Roos, 2009; Marinova et al., 2007). Zusätzlich können die Flavonoide über einen in derselben Membran lokalisierten Transporter der MRP/ABCC-Unterfamilie (Multidrug Resistance-Related Protein, Klasse C der ABC-Transporter) in die Vakuole abgesondert werden, wenn sie zuvor eine Konjugation mit Glutathion erfahren haben (Klein et al., 2000). Diese Reaktion wird durch Glutathion-S-Transferasen, unter anderem Bz2 in *Zea mays* (Marrs et al., 1995), AN9 in *Petunia* (Alfenito et al., 1998) oder TT19 in *Arabidopsis* (Kitamura et al., 2004),

katalysiert. Auch wenn Mutationen in den korrespondierenden Genen die Akkumulation der Pigmente im Zytoplasma und damit verbunden zelltoxische Effekte auslösten, ist noch nicht abschließend geklärt, ob eine vorherige Konjugation mit Glutathion für den Transport der Flavonoide in die Vakuole notwendig ist: weder AN9 noch Bz2 scheinen die Konjugation mit Glutathion direkt zu katalysieren, sondern dienen womöglich als zytoplasmatische Carrier-Proteine (Mueller et al., 2000; Klein und Roos, 2009).

1.1.3 Toxin-Toleranz durch Mutation des Zielproteins

Ein weiterer, eher seltener Resistenzmechanismus beinhaltet die Mutation des Zielproteins des Toxins in der Pflanzenzelle. Eines der wenigen Beispiele dafür ist Camptothecin, ein Monoterpenindol-Alkaloid, welches in *Ophiorrhiza pumila*, *Camptotheca acuminata*, *Nothapodytes foetida* und anderen, wenig verwandten Pflanzen vorkommt (Aimi et al., 1989; Govindachari und Viswanathan, 1972; Wall et al., 1966). Camptothecin ist eine Leitstruktur für Anti-Tumor-Medikamente, da es durch die Interaktion mit der DNA Topoisomerase I zur Apoptose führt. Diese Wirkung entfaltet das Alkaloid in allen untersuchten eukaryotischen Organismen, die Produzentenpflanzen tragen jedoch Punktmutationen in der Topoisomerase I und zeigen daher eine Resistenz gegenüber Camptothecin (Sirikantaramas et al., 2007b).

Diese Art von Resistenz erlaubt offenbar den Verzicht auf eine energie-abhängige Kompartimentierung, denn Camptothecin wird aus den Zellen von *Ophiorrhiza pumila* durch passiven Transport ins Kulturmedium abgegeben. Da ein passiver Transport auf einem Konzentrationsgradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum beruht, bedeutet das eine erhöhte lokale Konzentration von Camptothecin im Zytoplasma, welche auf die nicht mutierte Topoisomerase I toxisch wirken würde (Sirikantaramas et al., 2007b).

Bei der Untersuchung fünf verschiedener Camptothecin-produzierender Pflanzen (*Camptotheca acuminata*, *Nothapodytes foetida*, *Ophiorrhiza pumila*, *Ophiorrhiza liukuensis* und *Ophiorrhiza alata*), die zu verschiedenen Familien gehören, konnte festgestellt werden, dass diese zwar den gleichen Resistenzmechanismus, aber unterschiedliche Punktmutationen in der Topoisomerase I besitzen (Sirikantaramas et al., 2008). Da sich die Aktivierung des Biosyntheseweges und die Resistenzbildung nebeneinander entwickelt haben sollten, müssen beide Prozesse nach der Speziation dieser Pflanzen stattgefunden haben. Da die Pflanzen nur entfernt miteinander verwandt sind, kann man hier wahrscheinlich von konvergenter Evolution des Biosyntheseweges ausgehen (Sirikantaramas et al., 2009; Wink, 2008; Wink, 2003).

Ein ähnlicher Schutzmechanismus, d.h. Resistenz durch die Veränderung der Zielstruktur, wurde bisher nur in Mikroorganismen, beispielsweise in dem Pilz *Cephalosporium caerulens*, gefunden. Er produziert Cerulenin, einen potenten Inhibitor der Fettsäuresynthese in vielen Organismen, und ist selbst resistent durch eine veränderte Fettsäuresynthese (Kawaguchi et al., 1979).

1.1.4 Metabolisierung der eigenen Toxine

Die Umwandlung eines toxischen Phytoalexins in eine ungiftige Form – jedoch nur im Umfeld der Produzentenzelle – ermöglicht einen Schutzmechanismus, der nur bei sehr wenigen Pflanzen nachgewiesen wurde. Häufiger ist diese Art der Entgiftung in Pilzen oder herbivoren Insekten (siehe unten).

- In Blättern von *Coffea arabica* und *Camellia sinensis* wird Coffein zu Theophyllin, 3-Methylxanthin und Xanthin metabolisiert; letzteres kann über den Purinstoffwechsel weiter zu Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut werden (Ashihara et al., 1997; Ashihara et al., 1996).
- Die aus cyanogenen Glykosiden gebildete Blausäure kann durch die Enzyme Rhodanase und β -Cyanoalaninsynthase, die beide unterschiedliche Abbauewege einleiten, entgiftet werden. Beide Enzyme sind auch in Pflanzen nachweisbar, für die keine Produktion von cyanogenen Glykosiden bekannt ist (Miller und Conn, 1980) und spielen daher eine mögliche Rolle in der allelopathischen Interaktion.
- Zellen von *Eschscholzia californica*, dem Objekt dieser Arbeit, sezernieren zur Pathogenabwehr Benzophenanthridinalkaloide in die Zellwand und das umgebende Medium. Diese entfalten ihre Toxizität durch die Interkalation in doppelsträngige DNA und Interaktion mit verschiedenen thiolgruppenhaltigen Enzymen und Transportern (Wink et al., 1998; Schmeller et al., 1997). Sanguinarin gilt als das am stärksten toxische Benzophenanthridinalkaloid (Ulrichová et al., 2001; Faddeeva und Beliaeva, 1997). Dabei sind die Alkaloid-produzierenden Zellen nicht automatisch resistent gegenüber dem eigenen Toxin, sondern schützen sich auf metabolischem Wege: sobald die Konzentration der ausgeschiedenen Benzophenanthridine einen Schwellenwert in der Zellwand erreicht, werden sie wieder aufgenommen und mit Hilfe eines zytoplasmatischen Enzyms, der Sanguinarinreduktase, sofort in die weniger giftigen Dihydroalkaloide umgewandelt. Diese werden in die späte Biosynthese eingespeist und liefern weniger toxische Endprodukte (Weiss et al., 2006).
Dieser einzigartige Recycling-Mechanismus erlaubt den Produzentenzellen von diesen Verbindungen als Phytoalexin zu profitieren, ohne sich selbst zu schädigen. Eine detaillierte Beschreibung der Sanguinarinreduktase ist in Abschnitt 1.3 zu finden.

1.1.5 Metabolisierung pflanzlicher Toxine in Pilzen und Herbivoren

In Pilzen wurden verschiedene Metabolisierungswege nachgewiesen, die zur Reduktion der Toxizität pflanzlicher Sekundärstoffe dienen. Beispielsweise besitzen verschiedene Pilze Enzyme zur Hydrolyse der Zuckeranteile von Saponinen, unter anderem die Avenacinase zur Entgiftung von Avenacin A-1 aus Hafer, Tomatinase zur Entgiftung von α -Tomatin aus der Tomate oder α -Chaconinase zur Entgiftung von α -Chaconin aus der Kartoffel (Morrissett und Osbourn, 1999). Andere Strategien sind

die Demethylierung, zum Beispiel von Pisatin, einem Isoflavonoid aus Leguminosen durch eine induzierbare Cytochrom P-450 Monooxygenase aus *Nectria haematococca* (Morrissey und Osbourn, 1999; VanEtten et al., 1989), oder die Hydroxylierung, beispielsweise von Camalexin, einem Indolderivat aus Brassicaceen durch *Rhizoctonia solani* (Morrissey und Osbourn, 1999).

Die enzymatische Entgiftung ist auch ein häufiger Schutzmechanismus der herbivoren Insekten, die damit die pflanzliche Phytoalexin-Abwehr überwinden und neue Wirtspflanzen zur Ernährung gewinnen können. Die Hauptenzymklassen, die von Insekten zur Entgiftung pflanzlicher Toxine verwendet werden, sind die Cytochrom P-450-Monooxygenasen und Glutathion-S-Transferasen, die meistens im Darm- und Fettgewebe der Insekten lokalisiert sind (Després et al., 2007). Zusätzlich scheinen auch die UDP-Glycosyltransferasen von Bedeutung zu sein (Després et al., 2007; Mackenzie et al., 2005).

So ist es möglich, dass sich sowohl die Raupen des Europäischen als auch des Asiatischen Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* bzw. *Ostrinia furnacalis*) bevorzugt von Maispflanzen ernähren (Kojima et al., 2010; Yan et al., 1999; Houseman et al., 1992; Reid et al., 1991), obwohl diese cyclische Hydroxamsäuren (z.B. DIMBOA) enthalten, die für die meisten Herbivoren toxisch sind (Niemeyer, 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Abbaureaktion der cyclischen Hydroxamsäuren an das Vorhandensein von UDP-Glucose gebunden ist, was auf die Beteiligung von UDP-Glycosyltransferasen hindeutet (Kojima et al., 2010).

Eine Phenol-UPD-Glycosyltransferase spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Phenolen, Flavonoiden und Coumarinen bei dem Maulbeerspinner *Bombyx Mori* (Luque et al., 2002). Weiterhin werden Cytochrom P-450-Enzyme in Verbindung mit der Adaption der Ritterfalter der Art *Papilio* an die toxischen Furanocumarine, die in ihren Wirtspflanzen vorkommen, gebracht (Li et al., 2007). Die Larven des Großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae*) vermögen die phenolischen Verbindungen ihrer Wirtspflanze durch Deacylierung, Deglycosylierung und Konjugation mit Sulfaten zu metabolisieren (Ferrerres et al., 2009).

1.2 Benzophenanthridine – die Hauptalkaloide von *Eschscholzia californica*

1.2.1 Benzophenanthridin-Biosynthese

Die Benzophenanthridine zählen zur großen Gruppe der Benzylisochinolinalkaloide. Diese umfasst mehr als 2500 bekannte Verbindungen, deren Grundstrukturen sich in die folgenden 8 Gruppen einteilen lassen: einfache Benzylisochinoline wie Papaverin; Boldine, z.B. Aporphin; Bisbenzyltetrahydroisochinoline wie Tubocurarin; Morphinane, z.B. Morphin; Benzophenanthridine, wie Sanguinarin; Protopine, z.B. Protopin; Protoberberine, wie Berberin; sowie Phthalidisochinoline, z.B. Noscopin (Springob und Kutchan, 2009). Die Biosynthese beginnt mit L-Tyrosin und enthält als letztes gemeinsames Intermediat (S)-Reticulin (siehe Abbildung 1).

(S)-Reticulin wird durch die stereoselektive Kondensation von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd gebildet, die zunächst zu (S)-Norcoclaurin führt, welches in vier aufeinanderfolgenden Schritten in (S)-Reticulin umgewandelt wird. Der zu den Benzophenanthridinen führende Zweig der Biosynthese wird durch das in Vesikeln enthaltene Berberinbrückenenzym eröffnet, welches die Bildung von (S)-Scoulerin ermöglicht. Dieses Enzym ist spezifisch für (S)-Reticulin und agiert ohne Cofaktor. Das Produkt dieser Phenol-Kupplungsreaktion verlässt die Vesikel und erhält in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff in zwei aufeinanderfolgenden Schritten zwei Methylenedioxybrücken: aus (S)-Scoulerin entsteht (S)-Cheilanthifolin und daraus wiederum (S)-Stylopin (Zenk, 1994). Beide Enzyme sind Cytochrom P-450 beinhaltende Komplexe, die hochgradig substratspezifisch und stereoselektiv sind. Durch eine N-Methyltransferase wird anschließend (S)-cis-N-Methylstylopin produziert. Dieses Enzym ist ebenfalls hochgradig stereoselektiv und katalysiert nur die Methylierung am Stickstoff von Tetrahydroprotoberberinalkaloiden der (S)-Konfiguration. Die nächstfolgende Reaktion wird durch einen mikrosomalen, Cytochrom P-450 beinhaltenden, Enzymkomplex katalysiert, der in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH stereo- und regiospezifisch das Kohlenstoffatom an Position 14 des (S)-cis-N-Methylstylopins hydroxyliert und so zum Protopin führt. Ein weiteres Enzym der mikrosomalen Fraktion katalysiert eine Hydroxylierung in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH. Das so gebildete 6-Hydroxyprotopin wird in einer spontanen, nicht enzymabhängigen Reaktion umgelagert, wobei Dihydrosanguinarin und damit der Grundkörper des Benzophenanthridinalkaloid-Typs entsteht. Letzteres wird durch ein zytosolisches Enzym, der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DhbOx), in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert, wodurch das quarternäre, vollständig aromatisierte Benzophenanthridin Sanguinarin gebildet wird (Kutchan et al., 1991).

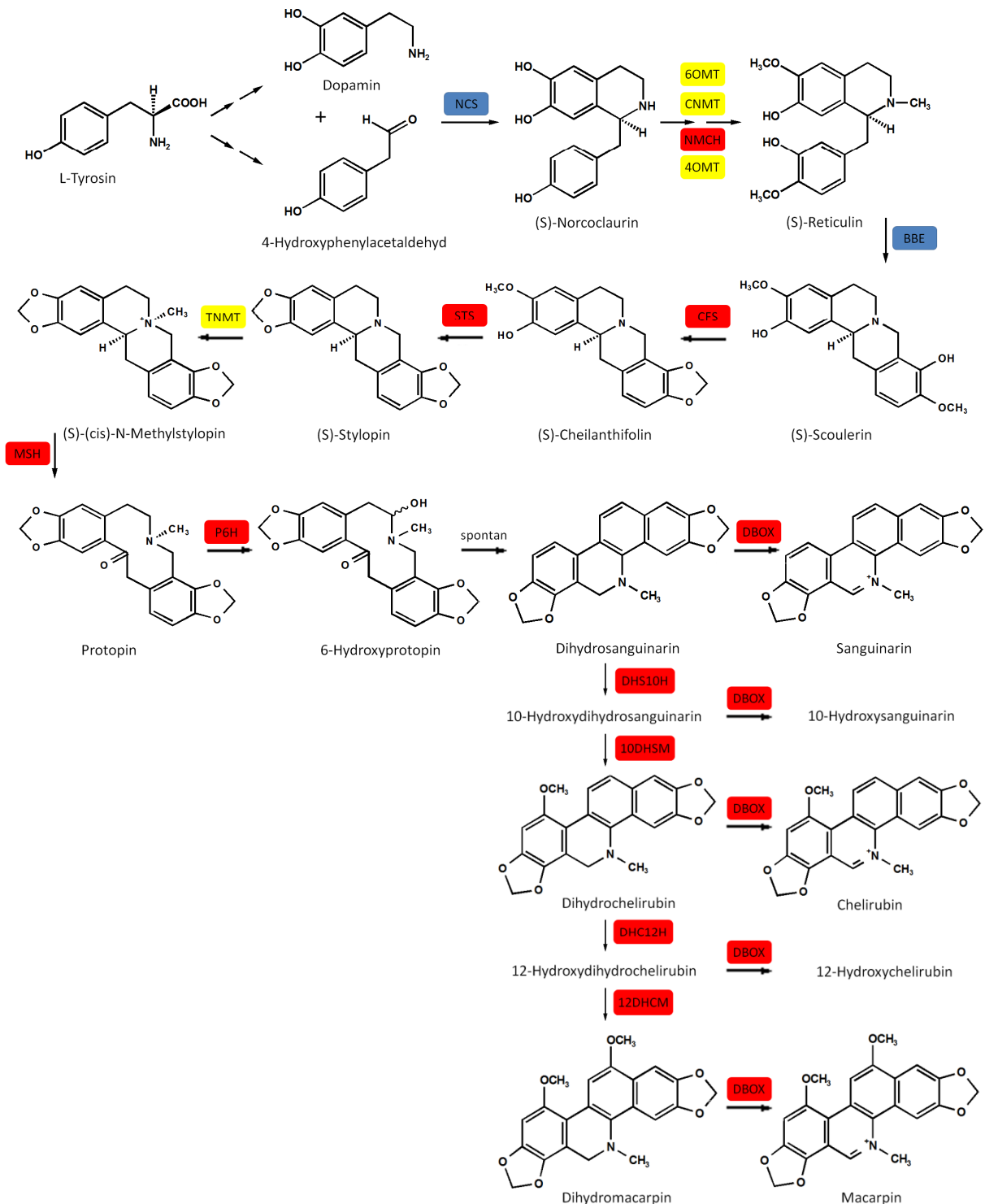
Dihydrosanguinarin ist der Ausgangspunkt für weitere hydroxylierte und methoxylierte Alkaloide. So kann durch die Dihydrosanguinarin-10-Hydroxylase eine weitere Hydroxylgruppe an Position 10 eingeführt werden, die 10-Hydroxydihydrosanguinarin-10-O-methyltransferase katalysiert die Bildung von Dihydrochelirubin. Beide Enzyme sind substratspezifisch und katalysieren nur die Reaktionen der Dihydroalkaloide, jedoch nicht die der entsprechenden oxidierten Verbindungen. Die Bildung von Dihydromacarpin aus Dihydrochelirubin erfolgt über eine weitere Hydroxylase und Methyltransferase, die ebenfalls spezifisch nur diese Dihydro-Derivate umwandeln.

Zur Bildung der Benzophenanthridinalkaloide aus den entsprechenden Dihydroverbindungen dient die bereits erwähnte Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase, ein Enzym, das wahrscheinlich Kupfer im aktiven Zentrum enthält. Es benutzt molekularen Sauerstoff als weiteres Substrat und bildet Wasserstoffperoxid als zweites Endprodukt. Die Oxidation des Dihydromacarpins zum Macarpin schließt den Syntheseweg vom L-Tyrosin über (S)-Reticulin zum Macarpin ab, der mit 19 spezifischen Enzymen und einer spontanen Umlagerung zu den längsten im Detail bekannten Biosynthesewegen des Sekundärstoffwechsels zählt (Zenk, 1994).

Abbildung 1: Benzophenanthridin-Biosynthese

Erstellt nach Roos und Klein, 2009; Zenk, 1994 und Kutchan et al., 1991. Ausgewählte Enzyme der Biosynthese sind nach ihrer Lokalisation im Zytosol (gelb), der Membran des ER (rot) oder im Lumen von zytosolischen Vesikeln (blau) dargestellt.

BBE: Berberinbrückenzym; CFS: Cheilanthifolin-Synthase; CNMT: Coclaurin-N-Methyltransferase; DBOX: Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase; DHC12H: Dihydrochelirubin-12-Hydroxylase; 12DHCM: S-Adenosyl-L-Methionin:12-Hydroxydihydrochelirubin-12-O-Methyltransferase; DHS10H: Dihydrosanguinarin-10-Hydroxylase; 10DHSM: S-Adenosyl-L-Methionin:10-Hydroxydihydrosanguinarin-10-O-Methyltransferase; MSH: N-Methylstylopin-14-Hydroxylase; NCS: Norcoclaurin-Synthase; NMCH: N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase; 4OMT: 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin 4'-O-Methyltransferase; 6OMT: Norcoclaurin 6-O-Methyltransferase; P6H: Protopin-6-Hydroxylase; STS: Stylopin-Synthase; TNMT: Tetrahydroprotoberberin-*cis*-N-Methyltransferase.



1.2.2 Induktion und Ablauf der Alkaloidbildung nach Elicitorkontakt

Die Biosynthese der Benzophenanthridine erfolgt konstitutiv in der Wurzel (als permanenter Schutzmechanismus gegen Mikroorganismen im Boden), während der Wurzelentwicklung und in den oberirdischen Pflanzenteilen ist sie durch Elicitoren auslösbar (Angelova et al., 2010).

Der Signaltransfer zur Genaktivierung wurde in kultivierten Zellen der Wurzel detailliert untersucht. In den Zellkulturen lassen sich zwei voneinander unabhängige Signalwege unterscheiden: nach Gabe einer geringen Konzentration des Elicitors (Konzentration etwa 1 µg Rohpräparat/ml, siehe auch unter 2.11.3) erfolgt zunächst die Aktivierung einer Phospholipase A₂ in der Plasmamembran über ein mit dem Enzym assoziiertes G-Protein (Heinze et al., 2007; Roos et al., 2006; Viehweger et al., 2006 und 2002). Dabei bildet die Untereinheit G α einen stabilen Proteinkomplex mit der Phospholipase A₂, der durch GTP aktiviert werden kann. Ob die G $\beta\gamma$ Untereinheiten eine Rolle bei der Interaktion von G α mit bestimmten Zielproteinen spielen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Heinze et al., 2007).

Über die Aktivierung der Phospholipase A₂ wird Lysophosphatidylcholin (LPC) generiert, welches einen transienten Peak 2 bis 3 Minuten nach Elicitorkontakt erreicht (Viehweger et al., 2002). Nach etwa 10 Minuten konnten pH-Shifts in der Vakuole und im Zytoplasma beobachtet werden (Viehweger et al., 2006; Roos et al., 1998). LPC dient demnach als intrazytoplasmatisches second messenger-Molekül zwischen Plasmamembran und Vakuole, wie durch konfokale pH-Topographie *in situ* gezeigt werden konnte: es führt zur Aktivierung eines vakuolären Na⁺/H⁺-Antiporters, einem Protonenefflux aus der Vakuole und damit zu einer kurzfristigen Ansäuerung des Zytoplasmas (Viehweger et al., 2002). Die im Zytoplasma gemessenen pH-Shifts sind ein notwendiges und hinreichendes Intermediärsignal zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese: letztere wird auch durch artifizielle Ansäuerung des Zytoplasmas ausgelöst (Viehweger et al., 2006) und die Aufhebung des Protonengradienten am Tonoplasten verhindert die Wirkung des Elicitors. Die dadurch aktivierten Gen-Kontroll-Proteine wurden erst in letzter Zeit aufgefunden (Buchheim, Kurz und Roos, unveröffentlicht).

Die Induktion von Biosynthese-Enzymen ist etwa drei Stunden nach Elicitorkontakt auf mRNA-Ebene nachweisbar (Viehweger et al., 2006; Roos et al., 1998). Das rate-limitierende Enzym ist dabei die 4'-O-Methyltransferase (4'OMT), deren Überexpression etwa nach 6 Stunden messbar und mit der Bildung der Stress-protectiven Proteine hsp70, Cyclophilin und Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verbunden ist (Angelova et al., 2010). Nach etwa 10 Stunden sind die ersten neugebildeten Dihydroalkaloide nachweisbar, von denen etwa 20 % in Benzophenanthridine umgewandelt werden. Etwa 14 bis 20 Stunden nach Elicitorkontakt ist die Anreicherung der rot fluoreszierenden Benzophenanthridine im Bereich der Zellwand im Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Weiss et al., 2006; Viehweger et al., 2006).

Bei Zugabe wesentlich höherer Konzentrationen des Hefeelicitors wird außerdem der Jasmonat-Weg aktiviert, was ebenfalls zur Alkaloidproduktion führt, jedoch gemeinsam mit den Reaktionen des

hypersensitiven Zelltods. Diese bekannte Abwehrreaktion vieler Pflanzen äußert sich in der verwendeten Zellkultur u. a. in der Bildung von Polyphenolen („browning“), dem Verlust von Kaliumionen (Färber et al., 2003; Roos et al., 1998) und der Repression vieler Transkripte (Angelova et al., 2010). Demgegenüber ist der LPC-pH-Weg eine selektive, jenseits von Apoptose-Reaktionen ablaufende Signalkette zum Anschalten des Alkaloidstoffwechsels (Roos et al., 2006).

1.3 Die Sanguinarinreduktase – der Entgiftungsmechanismus der Benzophenanthridine in *Eschscholzia californica*

Die Sanguinarinreduktase (NAD(P)H: Sanguinarin Oxidoreduktase) wurde aus Zellsuspensionskulturen von *Eschscholzia californica* isoliert. Es ist ein lösliches Protein von 29,4 kDa, liegt als Monomer vor und katalysiert die NAD(P)H-abhängige Reduktion der Benzophenanthridine zu den entsprechenden Dihydroalkaloiden. Das Enzym bevorzugt Sanguinarin und Chelerythrin als Substrate vor den stärker substituierten Alkaloiden (Weiss et al., 2006).

Eine *in silico* Analyse zeigte, dass es mehrere Proteine in Pflanzen gibt, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Sanguinarinreduktase aufweisen, zum Beispiel eine NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase aus *Oryza sativa* oder ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, 1XQ6, aus *Arabidopsis thaliana*. Alle Proteine sind Mitglieder der Superfamilie der „Rossmann fold NAD(P)H/NAD(P)⁺ Bindeproteine“, aber außer für die Sanguinarinreduktase selbst ist für keines der Proteine eine Aktivität zur Reduktion von Sanguinarin bekannt, für 1XQ6 wurde sie experimentell ausgeschlossen (Vogel et al., 2010). Vergleicht man die Sequenz der Sanguinarinreduktase mit denen der homologen Proteine aus der Datenbank, so findet man mehrere, nur in diesem Enzym enthaltene Motive und Inserts. Aufbauend auf der bekannten 3D-Struktur des Proteins 1XQ6 konnte ein Homologie-Modell errechnet werden (siehe Abbildung 2). Daraus leitet sich die Struktur des aktiven Zentrums ab, mit deren Hilfe der wahrscheinliche Mechanismus der Katalyse modelliert wurde (siehe Abbildung 3).

Dabei bilden die Aminosäuren Cystein 157, Asparaginsäure 158 und Histidin 161 wahrscheinlich Wasserstoffbrücken zu einem der Dioxolanringe des Sanguinarins aus. Im inaktiven Protein 1XQ6 stehen anstelle des Cysteins Threonin und anstelle der Asparaginsäure Asparagin. Weiterhin ist der zweite Dioxolanring des Sanguinarins in Reichweite zum Lysin 175, mit dem es ebenfalls Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Methionin 166 geht offenbar hydrophobe Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ringgerüst der Benzophenanthridine ein. Im Protein 1XQ6 steht Leucin an der Stelle des Methionins. Diese Aminosäureaustausche waren mit großer Wahrscheinlichkeit essentiell für die Evolution des katalytischen Zentrums, wie durch gerichtete Mutagenese bestätigt wurde (Vogel et al., 2010). Bei diesen Experimenten zeigte sich auch, dass außer den im katalytischen Zentrum lokalisierten Aminosäuren die Anwesenheit eines außerhalb liegenden Inserts von 13

Aminosäuren für die Aktivität erforderlich ist. Die inaktiven homologen Proteine enthalten dieses Insert nicht (weiterführende Details in den Kapiteln 4.2.3 und 4.6).

Abbildung 2: Dreidimensionales Modell von 1XQ6 (grau) und Sanguinarinreduktase (magenta) Nach Vogel et al., 2010; eingezeichnet sind die errechneten docking sites von Sanguinarin (SG) und NADPH.

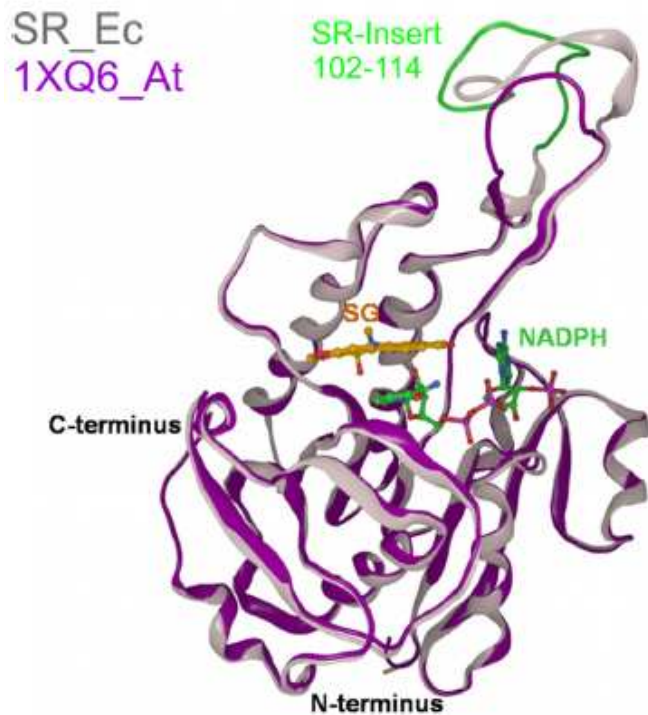
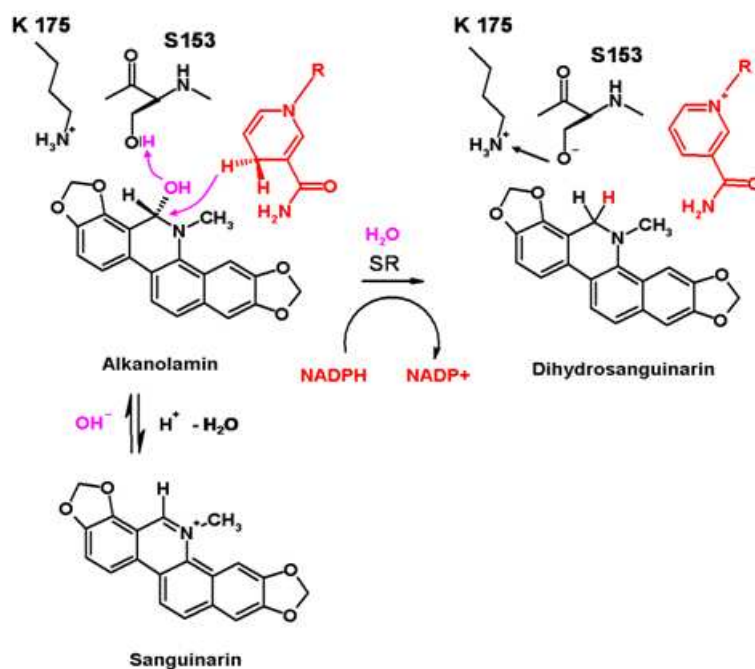


Abbildung 3: Mechanismus der Reduktion von Sanguinarin im aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase

nach Vogel et al. (2010)



1.4 Zielsetzung

Die Sanguinarinreduktase ist ein neuentdecktes Enzym des Benzophenanthridinstoffwechsels, welches nicht direkt für den Ablauf der Biosynthese benötigt wird. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des vermuteten Zusammenhangs zwischen der durch dieses Enzym bewirkten Entgiftung toxischer Benzophenanthridine und der Regulation der Alkaloidbildung in *Eschscholzia californica* und anderen Pflanzenspezies. Dazu sollten

1. Zellstämme generiert werden, welche durch RNAi-ausgelöstes silencing eine stark verminderte Expression des Enzyms zeigen. Die Konsequenzen des silencings sollten auf den Ebenen der Proteinmenge und der verfügbaren Enzymaktivität gemessen und die Wirkung auf die Fähigkeit zur Alkaloidbildung, Synthesekapazität und das Alkaloidspektrum untersucht werden;
2. Gene und Proteine mit Homologie zur Sanguinarinreduktase sowie Enzymaktivitäten zur Reduktion von Sanguinarin in möglichst vielen Pflanzen innerhalb und außerhalb der Papaveraceae – bei bekannter oder wahrscheinlich fehlender Fähigkeit zur Benzophenanthridinbildung – ermittelt und vergleichend dargestellt werden. Die Experimente sollten damit Hinweise auf den evolutionären Ursprung des Enzyms liefern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem	(Darmstadt, D)
GE Healthcare	(Freiburg, D)
Merck	(Darmstadt, D)
Roth	(Karlsruhe, D)
Serva	(Heidelberg, D)
Sigma	(Aldrich, D)

2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kitsysteme

Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kitsysteme sind im Anhang in den Tabellen 13 bis 15 aufgelistet.

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide dieser Arbeit sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie wurden von der Firma Biomers (Ulm, D) bezogen, als Stammlösungen mit einer Konzentration von 150 pmol/μl bei -20°C aufbewahrt und als Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 15 pmol/μl verwendet. Bei den Primern mit „for“ bzw. „F“ im Namen handelt es sich um „Forward“-Primer, währenddessen „rev“ bzw. „R“ für „Reverse“-Primer steht.

Tabelle 1: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Amplifikation von	Sequenz (5' – 3')
4'OMT for2	} 4'OMT	CCA TCT CAA ATG TCA ATT CTG
4'OMT rev2		GAT GAC CTT CTA AAT ATT CCC
ActEc337427_for	} Aktin	TAT AAT GAG CTT CGT TGG C
ActEc337427_rev		CAT GAG CGC ATT GTC AAA T
BBE for2	} BBE	GGT ATG ATG TCA AGA AAA TAT
BBE rev		CCG AGG ACG GAT AAA GT
F 416SR B1	} Sequenz der Sanguinarinreduktase	<i>GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC</i>
		<i>TGC TAA AAA AAT GGG TGT CAA AC</i>
R 691SR B2	} für die Gateway- Klonierung	<i>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC</i> <i>AAT CTC CAA AGC CTG AAC GCA AGC</i>

Oligonukleotid		Sequenz (5' – 3')
F7	} Insert SEDVIDASFSGPM	GCT TTG RTN ATT CTA ACA AGT
F7_4		TTG ATG CTT TGA TAA TTC TAA C
F7_5		GCT TTG ATA ATT CTA ACA AGT
F7_6		GAT GCT TTG ATA ATT CTA ACA A
R7_5		GAA CAA TAT GTT TGA CAC CC
GWIWG2Seq1R	} sense und antisense der Sanguinarin- reduktase im Vektor pK7GWIWG2(II)	ACA TTA CAA TTT ACT ATT
GWIWG2Seq2F		AAC CTT ACC TCA TCA TTT
GWIWG2Seq3R		ATC ACA TAG TGC GGC CGC C
GWIWG2Seq4F		TTG CGG ACT CTA GCA TGG
pK7 Kan for	} Kanamycin-Resistenz im Vektor pK7GWIWG2 (II)	CTC GTC AAG AAG GCG ATA GA
pK7 Kan rev		CTC GGA TGG AAG CCG GTC TT
F13	} aktives Zentrum der Sanguinarin- reduktase	ATT GGA TTG GAC AGA AGA ATC
R23		TCC AGA ATC AGC CAA ATA T
R30		AAA GGA GTA GTA ACT TGA GA

Die für die Gateway-Klonierung benötigten attB1 und attB2 Linker sind kursiv gedruckt.

2.4 Enzyme und Polymerasen

In Tabelle 2 sind die verwendeten Enzyme und Polymerasen zusammengefasst.

Tabelle 2: Enzyme, Polymerasen

Enzyme	Hersteller
BP Clonase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	Sigma (Saint Louis, USA)
LR Clonase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ribonuclease A (aus Rinderpankreas)	Sigma (Saint Louis, USA)

Polymerase	Hersteller
RedTaq DNA Polymerase	Se genetic (Borken, D)

2.5 Plasmide und Mikroorganismen

Die Plasmide, die Grundlage für diese Arbeit waren, sind in Tabelle 3 aufgelistet, die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz
pDONR222	Kan ^R , Cm ^R , attP1/P2, <i>ccdB</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pK7GWIWG2(II)	Spec ^R , Kan ^R , Cm ^R , 2x attR1/R2, <i>ccdB</i>	VIB (Department of Plant Systems Biology, University of Gent)

Tabelle 4: Stämme von *Escherichia coli*

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>ccdB</i>	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i>	Invitrogen
<i>survival</i>	<i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> <i>tonA::Ptrc-ccdA</i>	(Karlsruhe, D)
TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> D139 Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.6 Nährmedien

Im folgenden Abschnitt werden die Zusammensetzung der Nährmedien, sowie die Bedingungen für die Kultivierung von *Escherichia coli* beschrieben.

Zur Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium bei einer Temperatur von 37°C benutzt.

<u>LB-Medium</u>	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Natriumchlorid 1 % (w/v) Trypton Mit Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt. Zur Herstellung eines festen LB-Mediums wurde ein Anteil von 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugefügt.
------------------	--

Die Selektion plasmid-tragender *E. coli* wurde mit Hilfe von Antibiotika-Zusatz durchgeführt:

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration im Medium</u>
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und nach Abkühlen den autoklavierten Nährmedien zugegeben. Feste Nährmedien mit Antibiotika-Zusatz wurden bei +4°C gelagert.

Die einstündige Kultivierung der mittels Hitzeschock transformierten *E.coli* erfolgte bei 37°C in SOC-Medium.

<u>SOC-Medium</u>	0,05 % (w/v) Natriumchlorid 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 20 mM Glucose Auf pH 7,0 mit Natronlauge eingestellt und autoklaviert.
-------------------	--

2.7 Zellkultivierung von *Eschscholzia californica*

Die Kalli von *Eschscholzia californica* wurden auf Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965), welches durch den Zusatz von 0,8 % Agar-Agar verfestigt wurde, kultiviert. Nach jeweils circa 30 Tagen wurden Teile der Kalli auf frisches Nährmedium umgesetzt. Im weiteren Verlauf der Arbeit erhaltene transformierte, demnach mit einer Resistenz gegen Antibiotika der Kanamycin-Gruppe ausgestattete Kalli wurden auf Selektionsnährmedium kultiviert, welches 100 µg/ml Paromomycin enthält. Dazu wurde eine Paromomycin-Stammlösung angefertigt und sterilfiltriert. Das benötigte Volumen dieser Lösung wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugesetzt.

Die Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* wurden ebenfalls in Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965) auf einem Rundschüttler bei 100 UpM, einer Temperatur von 24°C und Dauerlicht (circa $7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) kultiviert. Nach 9 bzw. 10 Tagen erfolgte das Überimpfen in frische Nährlösung. Dabei wurden die Zellen des abgelaufenen Wachstumszyklus steril abfiltriert und ein Teil davon so in frische Nährlösung überführt, dass die Zellsuspension eine Frischmasse von circa 50 mg/ml aufwies. Die verbliebenen abfiltrierten Zellen wurden erneut abgesaugt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die im weiteren Verlauf der Arbeit erhaltenen Suspensionskulturen der transformierten Zell-Linien wurden nach obigem Verfahren kultiviert, zusätzlich wurde der Nährlösung 100 µg/ml Paromomycin hinzugefügt.

2.8 Beschaffung des Pflanzenmaterials

Alle verwendeten pflanzlichen Materialien wurden im Botanischen Garten der Martin-Luther-Universität in Halle gesammelt, Blätter von *Arabidopsis thaliana* stammen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Baginsky. Die Pflanzenteile wurden schnellstmöglich mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung der pflanzlichen genomischen DNA erfolgte nach dem Protokoll von Allen et al. (2006). Dafür wurden sterile Mörser und Pistille verwendet, die auf -80°C vorgekühlt worden waren. Ein Teil des gefrorenen Pflanzenmaterials bzw. der eingefrorenen Zellen der Suspensionskulturen wurden mit flüssigem Stickstoff in den Mörser gegeben und mit dem Pistill verrieben. Die Prozedur wurde einige Male wiederholt, bis aus dem Pflanzen- bzw. Zellmaterial ein feiner Puder entstand. Davon wurden 200 mg in je ein vorgekühltes 2 ml-Eppendorfgefäß abgefüllt, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Fortführung des Protokolls bei -80°C aufbewahrt.

Zur DNA-Isolation aus dem Pflanzenmaterial bzw. den Zellen der Suspensionskultur wurde der Extraktionspuffer auf 65°C erhitzt. Die eingefrorenen Proben wurden mit je 1,2 ml des Puffers versetzt, mit Hilfe des Vortex gemischt und 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Rückstände wurde 10 Minuten bei 13.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß, welches mit 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamyalkohol (25:24:1 v/v/v) gefüllt war, überführt und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Trennung der beiden Phasen wurde erneut 10 Minuten bei 13.500 g zentrifugiert und der wässrige Überstand jeweils in ein mit 800 µl Isopropanol (vorgekühlt auf -20°C) befülltes 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 13.500 g zentrifugiert, um das DNA-Pellet von der Lösung abzutrennen. Das Pellet wurde in 250 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 2,5 µl einer RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit 25 µl einer 3 M Natriumacetatlösung versetzt und vermischt. Nach dem Zusatz von 600 µl vorgekühltem Ethanol (96 %) wurden die Proben bei -20°C für 20 Minuten stehen gelassen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13.500 g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das verbliebene DNA-Pellet mit vorgekühltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Morgen mit circa 60 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur Verbesserung der Löslichkeit der DNA wurden die Proben bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Extraktionspuffer	0,1 M	Tris pH 8,0
	1,4 M	Natriumchlorid
	0,02 M	EDTA
	2 g (w/v)	Cetyltrimethylammoniumbromid
	1 % (v/v)	Mercaptoethanol (erst kurz vor Verwendung zugesetzt)
RNase-Lösung 10 mg/ml	Nach ihrer Herstellung wurde die Lösung 15 min lang gekocht um vorhandene DNase zu inaktivieren, anschließend wurde sie aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.	

2.9.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die quantitative Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht die optische Dichte $OD = 1$ einem DNA-Gehalt von 50 µg/µl. Desweiteren konnte durch den Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} die Verunreinigung mit Proteinen bestimmt werden. Der Quotient liegt bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 (Mülhardt, 2009).

2.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) nach Saiki et al. (1985) verwendet.

Dazu wurden Primer entworfen, die die zu vervielfältigende DNA-Sequenz vom 3'- und 5'-Ende her eingrenzen (siehe Tabelle 1). Die einzelnen PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 20 µl oder 60 µl durchgeführt, die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: PCR-Pipettierschema

Komponenten	Endkonzentration
Template	100 – 250 ng
10x PCR-Puffer	1x
Primer forward (150 pM)	12 pM
Primer reverse (150 pM)	12 pM
Taq DNA Polymerase (1 U/µl)	1,0 U
dNTP-Mix (10mM)	0,2 mM

Der Ablauf einer Amplifikation lief wie folgt:

Initialdenaturierung	94°C	5:00min
35 Zyklen:		
Denaturierung	94°C	0:20min
Annealing	x°C	0:30min
Elongation	72°C	1:00min
Terminale Elongation	72°C	5:00min

x - die Annealingtemperatur richtete sich jeweils nach den Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.

Im Anschluss wurde der PCR-Ansatz auf 4°C abgekühlt.

2.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente, welche mittels PCR amplifiziert wurden, erfolgte elektrophoretisch. Dabei wurden 1%ige Agarosegele mit einem Zusatz von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht sichtbar macht, sowie 1x TBE als Laufpuffer verwendet. Vor dem Beladen der Gele wurden die PCR-Proben mit 1/10 des Auftragevolumens an 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Längenstandard diente SmartLadder von Eurogentec (Köln, D). Anschließend wurde eine Spannung von 130 V angelegt und eine Laufzeit von 40 bis 60 Minuten abgewartet. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele mit UV-Licht (320 nm) bestrahlt, mit Hilfe einer Digitalkamera aufgenommen und dokumentiert. Um bestimmte DNA-Fragmente einer Sequenzierung unterziehen zu können, mussten einige Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert werden (siehe Abschnitt 2.9.5).

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml	
1%ige Agarosegele	1% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer, aufgeköcht und nach Abkühlen Ethidiumbromid zugesetzt.	
10x TBE-Puffer	108 g/l Tris 55 g/l Borsäure 0,02 M EDTA pH 8	
10x DNA-Ladepuffer	20 % (w/v) 0,1 M 1 % (w/v) 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	Ficoll 400 Na ₂ EDTA SDS Bromphenolblau Xylencyanol

2.9.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, D) verwendet. Zusammensetzungen der dabei benutzten Lösungen sowie die detaillierte Vorgehensweise sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Das Prinzip dieser Extraktionsmethode beruht auf dem Auflösen der aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Bande in einem Puffer bei 50°C, Bindung der DNA an eine Qiaquick Spin Säule, Waschen der DNA mit einer ethanolhaltigen Pufferlösung sowie dem Eluieren der DNA von der Säule mit bidestilliertem Wasser. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde in ihrer Konzentration vermessen (siehe Abschnitt 2.9.2), zum Sequenzieren vorbereitet (siehe Abschnitt 2.9.6) oder bei -20°C aufbewahrt.

2.9.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Abschnitte erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D). Die Vorbereitung der Proben richtete sich nach den Firmenangaben.

2.9.7 Erstellen von alignments und Stammbäumen

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms CLC Sequence Viewer (Version 6.5.4) von CLC bio A/S (Aarhus, DK) dargestellt und mit vorgegebenen DNA-Abschnitten verglichen.

Handelte es sich um Sequenzen, die bei der Suche nach der Sanguinarinreduktase in verschiedenen Pflanzen erhalten wurden, so wurden diese mit dem Programm Fast PCR (Version 5.5.103) von Primer Digital Ltd. (Helsinki, FIN) in die entsprechenden Proteinsequenzen umgeschrieben. Anschließend wurden sie in das Programm CLC Sequence Viewer geladen und die entsprechenden alignments oder Stammbäume erstellt.

Zum Erstellen der Kladogramme wurde die Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) verwendet. Bei diesem Verfahren werden zunächst alle Sequenzen unabhängig voneinander betrachtet und diejenigen mit den geringsten Unterschieden paarweise ausgewählt. Diese Paare stellen die äußeren Äste des Stammbaums dar. Nach einer erneuten Berechnung der Sequenzunterschiede zwischen diesen Paaren werden die nächstverwandten zu einem Ast mit zwei Taxa zusammengefügt, wobei jeweils ein gemeinsamer Ursprung angenommen wird. Dies erfolgt so lange, bis alle Sequenzen in den Baum eingefügt worden sind. UPGMA basiert auf der Annahme der Molekularen Uhr, das heißt auf einer etwa konstanten Evolutionsgeschwindigkeit an allen Stellen des Baumes (Sneath and Sokal, 1973). Weiterhin wurde das „bootstrapping-Verfahren“ angewendet, um zu testen, wie widerstandsfähig der Stammbaum gegenüber Fehlern ist. Das ist davon abhängig, wie sicher die verschiedenen Verzweigungspunkte sind. Das Maß für diese Sicherheit wird neben den Verzweigungspunkten in Prozent angegeben. Je höher dieser „bootstrapping-Wert“ liegt, desto mehr Vertrauen kann man in den zugehörigen Verzweigungspunkt setzen (Dawkins, 2009).

2.9.8 Gateway-Klonierung

2.9.8.1 Methodenüberblick

Zur Erzeugung eines RNAi-Vektors zum silencing der Sanguinarinreduktase wurde die Gateway-Klonierungsmethode (Hartley et al., 2000) verwendet.

Diese Methode beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ zwischen sogenannten *att*-Seiten (*attachment-sites*), welche als Bindestellen für die Rekombinationsproteine dienen. Ein schematischer Überblick findet sich in den Abbildungen 4 und 5.

Abbildung 4: BP-Reaktion

Dargestellt ist die erste Reaktion im Verlauf der Gateway-Klonierung. Ein PCR-Produkt, was zuvor mit *attB*-Seiten flankiert wurde, wird mit dem donor-Vektor, welcher *attP*-Seiten besitzt, und dem BP-Clonase™-II-Mix inkubiert. Es entsteht ein entry-Klon mit *attL*-Seiten und ein Nebenprodukt, welches *attR*-Seiten aufweist. Die Abbildung wurde dem Script „Gateway® Technology with Clonase™ II“ der Firma Invitrogen entnommen.



Abbildung 5: LR-Reaktion

Es schließt sich die zweite Reaktion bei der Gateway-Klonierung an. Der entry-Klon mit den *attL*-Seiten wird mit dem Zielvektor (destination-Vektor), welcher *attR*-Seiten enthält, und LR-Clonase™-II-Mix inkubiert. Ein Expressionsklon mit *attB*-Seiten und ein Nebenprodukt mit *attP*-Seiten entstehen. Die Abbildung wurde dem Script „Gateway®Technology with Clonase™ II“ der Firma Invitrogen entnommen.



2.9.8.2 Auswahl des DNA-Abschnittes für den Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektor

Für die Klonierung in den RNAi-Vektor wurde ein Abschnitt von 297 bp aus der cDNA der Sanguinarinreduktase ausgewählt; in diesem Bereich befindet sich auch das aktive Zentrum des Enzyms (siehe auch unter 3.1).

Zur Flankierung der Sequenz mit den *attB*-Seiten wurden die Primer F416SR B1 sowie R691SR B2 verwendet. Die Durchführung der PCR, Agarosegelelektrophorese sowie die Extraktion der Bande aus dem Gel erfolgte wie oben beschrieben (2.9.3 – 2.9.5).

2.9.8.3 Gateway Rekombinationsreaktionen

Zur Erzeugung eines entry-Klons musste das im donor-Vektor vorhandene *ccdB*-Gen, was innerhalb der *attP1* und *attP2*-Seiten liegt, gegen das mit *attB1* und *attB2*-markierte PCR-Produkt ausgetauscht werden. Das *ccdB*-Gen, ein sogenanntes Selbstmordgen, kodiert für ein Produkt, welches toxisch auf Bakterien wirkt, sodass nur Klone wachsen können, bei denen der Austausch tatsächlich stattgefunden hat. Die *attB*-Seiten des PCR-Produktes reagieren spezifisch mit den *attP*-Seiten des Vektors unter Katalyse des BP-Clonase™-II-Mixes (Prinzip siehe Abbildung 4).

Zur Durchführung der Reaktion wurden verwendet:

7 µl *attB*-PCR Produkt (150 ng)

1 µl donor-Vektor (150 ng/µl)

Nach Zugabe von 2 µL der BP-Clonase-II wurde die Mischung 90 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl einer Proteinase K-Lösung (2 µg/µl) hinzugefügt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor die Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen erfolgte.

Der Vektor pDONR222 wurde als donor-Vektor verwendet (Karte des Vektors im Anhang unter 7.4.1).

Zur Erzeugung eines Expressionsklons musste eine Klonierung in einen destination-Vektor erfolgen. Dieser besitzt *attR*-Seiten, die spezifisch mit den *attL*-Seiten des entry-Klons unter Zugabe der LR-Clonase™-II reagieren. Es bildet sich schließlich ein Expressionsklon mit *attB*-Seiten (siehe dazu Abbildung 5).

Zur Durchführung der Reaktion wurden verwendet:

7 µl entry-Klon (150 ng)

1 µl destination-Vektor (150 ng/µl)

Nach Zugabe von 2 µl der LR-Clonase-II wurde die Mischung 16 Stunden bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit 1 µl einer Proteinase-K-Lösung (2 µg/µl) für 10 Minuten bei 37°C behandelt, bevor die Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen erfolgte.

Als destination-Vektor wurde der im Anhang unter 7.4.2 mit einer Karte aufgeführte Vektor pK7GWIWG2(II) verwendet, welcher die *attR1* und *attR2*-Seiten zweimal in umgekehrter Reihenfolge aufweist. Folglich kann der Abschnitt des entry-Klons, der durch die *attL1*- und *attL2*-Seiten begrenzt ist, einmal in sense- und einmal in antisense-Richtung eingebaut werden, sodass sich nach der Transformation in die entsprechende Zell-Linie und abgelaufener Transkription eine hairpin-RNA bilden kann, die zum gewünschten silencing-Effekt führt.

2.9.9 Transformation von *Escherichia coli*

2.9.9.1 Herstellung hitzekompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung von hitzekompetenten *E.coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer kleinen Menge des Glycerinstocks (10 % Glycerin, Lagerung bei -80°C) der TOP-10-*E.coli*-Zellen beimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 160 UpM inkubiert.

Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 500 µl der Übernachtskultur beimpft und anschließend bei 37°C und 160 UpM bis zu einer optischen Dichte von 0,3 inkubiert. Zur Überprüfung der optischen Dichte wurde ein Teil der Hauptkultur in einer Plastikzelle 1:1 mit LB-Medium verdünnt und bei einer Wellenlänge von 560 nm am Photometer vermessen.

Schließlich wurden die Bakterienzellen der Hauptkultur bei 4°C und 5000 UpM zehn Minuten lang abzentrifugiert, in 25 ml kalter Lösung A aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurden die *E.coli*-Zellen erneut bei 4°C und 5000 UpM zehn Minuten lang abzentrifugiert und anschließend in 4 ml kalter Lösung B aufgenommen. Die so hergestellten hitzekompetenten Zellen wurden auf Eis aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Lösung A:	100 mM	Kaliumchlorid
	50 mM	Manganchlorid
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	Calciumchlorid
	15 % (v/v)	Glycerin

Lösung B:	75 mM	Calciumchlorid
	10 mM	MOPS, pH 7,0
	10 mM	Kaliumchlorid
	15 % (v/v)	Glycerin

2.9.9.2 Hitzeschock

Zur Durchführung des Hitzeschocks wurde ein Aliquot der hitzekompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der zu transformierenden DNA hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde zunächst 30 Minuten lang auf Eis, dann 30 Sekunden bei 42°C, und schließlich weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 250 µl des auf 37°C vorgewärmten SOC-Mediums (Zusammensetzung siehe unter 2.6) hinzupipettiert und das Reaktionsgefäß eine Stunde bei 37°C und 600 UpM geschüttelt. Die Mischung wurde anschließend zur Selektion der positiven Transformanden auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.10 Plasmid-Isolation

2.9.10.1 Plasmid-Isolation aus *E.coli* mittels Alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979)

Dieses Verfahren wurde vor allem genutzt, um schnell und kostengünstig eine Vielzahl von Klonen auf ihre erfolgreiche Transformation hin zu überprüfen.

Vorbereitend wurden Kolonien, die nach der Transformation auf dem Selektionsmedium gewachsen waren, gepickt, und damit circa 5 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, angeimpft. Dieses wurde über Nacht bei 37°C und 160 UpM geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden anschließend entnommen und im 1,5 ml-Eppendorfgefäß bei 13.000 UpM und Raumtemperatur eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der vorangegangene Schritt noch einmal wiederholt. Die dadurch vom Medium abgetrennten Bakterienzellen wurden in 100 µl Lösung I aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. Es wurden 200 µl Lösung II hinzugefügt und das Eppendorfgefäß fünf Mal invertiert. Schließlich wurden 150 µl Lösung III zum Ausfällen der Proteine dazu pipettiert und wiederum fünf Mal invertiert. Das Eppendorfgefäß wurde anschließend fünf Minuten lang auf Eis inkubiert, bis die Zellbestandteile und ausgefallenen Proteine durch eine achtminütige Zentrifugation bei 13.000 UpM und Raumtemperatur von der Lösung abgetrennt wurden. Der so erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zum Ausfällen der DNA mit 450 µl Isopropanol versetzt. Die anschließende Zentrifugation bei 13.000 UpM und Raumtemperatur für 10 Minuten trennte die Plasmid-DNA von dem Überstand ab. Das so erhaltene Pellet wurde mit 150 µl Ethanol (70 %, v/v) und einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 13.000 UpM und Raumtemperatur gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mindestens 30 Minuten lang getrocknet und zur Durchführung weiterer Analysen in 30 µl, auf 40°C erwärmten, bidestillierten Wasser gelöst.

Lösung 1:	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA, pH 8,0
Lösung 2:	0,2 N	Natronlauge
	1 % (w/v)	SDS
Lösung 3:	5 M	Kaliumacetat

2.9.10.2 Plasmid-Isolation aus E.coli mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Um isolierte Plasmid-DNA sequenzieren lassen zu können (siehe 2.9.6), wurden die Bakteriensuspensionen mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System von Promega (Mannheim, D) aufgearbeitet.

Dazu wurde eine Übernachtskultur (wie unter 2.9.10.1 beschrieben) vorbereitet. 1,8 ml dieser Bakteriensuspension wurde anschließend in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und zum Abtrennen des Nährmediums bei Raumtemperatur und 13.000 UpM fünf Minuten lang zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Alle weiteren Schritte sowie die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Das Prinzip dieser Plasmid-Isolation beruht auf der Lyse der Bakterien, Bindung der Plasmid-DNA an eine Säule, Waschen mit ethanolhaltigem Puffer sowie Elution der Plasmid-DNA mit bidestilliertem Wasser. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

2.9.11 Überprüfung des Transformationserfolges mittels Restriktionsanalyse

Zur schnellen Überprüfung des Transformationserfolges wurde die nach 2.9.10.1 isolierte Plasmid-DNA einem Verdau mittels Restriktionsendonukleasen unterworfen. Die verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen. Der Verdau wurde wie folgt angesetzt:

3 µg	Vektor-DNA
2 µl	10x Reaktionspuffer
2 U	Restriktionsenzym (BsrG I)
2 µl	RNase A (0,2 mg/ml)

Auf das Endvolumen von 20 µl wurde mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Der Ansatz wurde bei 37°C über Nacht inkubiert und die DNA anschließend mittels Gel-Elektrophorese (nach 2.9.4) aufgetrennt. Waren Fragmente der gesuchten Größe vorhanden, wurden weitere 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 160 UpM inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach 2.9.10.2 isoliert und zur genauen Überprüfung des Transformationsereignisses sequenziert (siehe 2.9.6).

2.9.12 Transformation der Pflanzenzellen mittels Biolistic Bombardment

2.9.12.1 DNA-Goldpartikel-Präparation

Um die Transformation der Zellen mittels der mit DNA beladenen Goldpartikel durchführen zu können, wurde zunächst eine Goldsuspension (60 mg/ml) vorbereitet. Das eingewogene Goldpulver wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol (96 %, v/v) gewaschen, indem die Suspension kräftig mit Hilfe des Vortex geschüttelt und der Ethanol anschließend bei Raumtemperatur und 13.000 UpM eine Minute lang abzentrifugiert wurde. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Schließlich wurden die Goldpartikel zweimal nach obiger Prozedur mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, und anschließend mit dem entsprechenden Volumen an Ethanol (96 %, v/v) aufgenommen.

Zum Beladen der Goldpartikel mit der entsprechenden Plasmid-DNA wurden aus der vorbereiteten Goldsuspension 40 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Goldpartikel wurden durch eine einminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13.000 UpM vom Überstand abgetrennt. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit jeweils 80 µl bidestilliertem Wasser angefügt: nach jedem Wasserzusatz wurde mindestens eine Minute lang mit Hilfe des Vortex geschüttelt, eine Minute lang bei 13.000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Anschließend wurden 60 µl einer Plasmid-DNA-Wasser-Lösung, die zuvor auf 0,1 µg/µl eingestellt worden war, zu den Goldpartikeln pipettiert. Die Suspension wurde vorsichtig mit Hilfe des Vortex geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden zur Präzipitation der DNA 20 µl einer 0,1 M Spermidin-Lösung und 50 µl einer 2,5 M Calciumchlorid-Lösung tröpfchenweise zugegeben und das Eppendorfgefäß etwa drei Minuten bei geringer Geschwindigkeit mit dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurden die Goldpartikel von der Lösung durch eine einminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13.000 UpM abgetrennt. Es wurden 200 µl Ethanol (96 %, reinst, v/v) zu den beladenen Goldpartikeln hinzupipettiert und die Suspension etwa zwei Minuten vorsichtig im Ultraschallbad durchmischt. Eine erneute Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13.000 UpM für eine Minute trennte die Waschlösung von den mit DNA-beladenen Goldpartikeln ab. Schließlich wurden 84 µl Ethanol (96 %, reinst, v/v) zupipettiert. Für jeden Vorgang des Biolistic Bombardment wurden 14 µl dieser Lösung eingesetzt. Vor jedem Abnehmen dieses Volumens wurde die Suspension im Ultraschallbad gemischt (Protokoll verändert nach IPK Gatersleben, D).

2.9.12.2 Biolistic Bombardment

Sieben Tage vor der Durchführung des Biolistic Bombardments wurden Kalli von *Eschscholzia californica* auf sterile Filterblättchen und frisches Nährmedium umgesetzt, sodass ein Anwachsen und Adaptieren der Zellen möglich war.

Zellen aus Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* wurden wie folgt vorbereitet: Es wurden etwa 1 ml einer auf 50 mg/ml eingestellten Suspensionskultur auf ein Filterblättchen gegeben und das überschüssige Nährmedium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt.

Die Stopping Screens sowie die Rupture Disks (1100 psi) wurden nach Geräteanleitung in die Biolistic PDS-1000/He Delivery System – Maschine eingebaut. Die kurz zuvor hergestellte DNA-Goldsuspension wurde auf die Makrocarrier pipettiert; diese wurden nach dem Verdampfen des Lösungsmittels ebenfalls in das Gerät eingesetzt. Die sterilen Filterblättchen mit den sieben Tage alten Kalli bzw. den frisch abgesaugten Zellen der Suspensionskultur von *Eschscholzia californica* konnten anschließend mit den DNA-beladenen Goldpartikel beschossen werden.

2.9.12.3 Zellkultivierung nach Biolistic Bombardment

Zur Selektion der Zellen mit einem positiven Transformationsereignis wurde das Vorhandensein einer Resistenz gegenüber der Antibiotikagruppe der Kanamycine auf dem eingesetzten destination-Vektor ausgenutzt. Um zu überprüfen, ab welcher Menge des Antibiotikums das Wachstum nicht transformierter Zellen von *Eschscholzia californica* gehemmt wird bzw. die Zellen absterben, wurde eine Konzentrationsreihe mit dem Antibiotikum Paromomycin (der Kanamycin-Gruppe zugehörig) erstellt. Festes Nährmedium wurde mit 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml und 150 µg/ml Paromomycin versetzt und mit Kallus von *Eschscholzia californica* beimpft. Nach 14 Tagen war bereits deutlich sichtbar, dass eine Wachstumshemmung schon bei einer Konzentration von 25 µg/ml Paromomycin einsetzt, ab 100 µg/ml zeigte sich ein komplettes Absterben der nicht transformierten Kallus-Zellen von *Eschscholzia californica*. Daher wurde im weiteren Verlauf zur Selektion eine Konzentration von 100 µg/ml Paromomycin verwendet.

Im Verlauf der ersten Versuchseinstellung wurden die Kalli bzw. die Zellen der Suspensionskultur von *Eschscholzia californica* auf dem Filterblättchen nach dem Beschuss mit den DNA-beladenen Goldpartikeln zwei Tage auf festem Nährmedium ohne Selektion subkultiviert, bevor sie auf Selektionsmedium zunächst mit der halben Dosis des Antibiotikums (50 µg/ml Paromomycin), nach weiteren fünf bis sieben Tagen auf Selektionsmedium mit der vollen Dosis an Antibiotikum (100 µg/ml Paromomycin) umgesetzt wurden.

Die zweite Versuchseinstellung bestand aus einer siebentägigen Subkultivation der mit beladenen Goldpartikeln beschossenen Kalli auf festem Nährmedium ohne Selektion. Im Anschluss wurden die Kalli 14 Tage auf Selektionsmedium mit der halben Dosis des Antibiotikums (50 µg/ml Paromomycin) belassen, bis sie zur weiteren Kultivierung auf Selektionsmedium mit der vollen Dosis (100 µg/ml Paromomycin) umgesetzt wurden.

Nach weiteren 14-30 Tagen konnten kleine, hellbeige-farbene Zellhaufen von toten, dunkelbraun gefärbten Kalli selektiert werden. Unter der Annahme, dass jeder Zellhaufen aus einer einzelnen Zelle entstanden war, wurden die einzelnen Zellhaufen voneinander getrennt auf Nährmedium mit 100 µg/ml Paromomycin gesetzt und weiter kultiviert. Nach jeweils 30 Tagen wurden die Kalli auf

frischen Nährboden, welcher stets 100 µg/ml Paromomycin enthielt, überimpft. Nachdem genügend Zellmasse aus den transformierten Kalli kultiviert werden konnte, wurde eine geringe Menge (in etwa 50 bis 100 mg) abgenommen, in 5 ml LS-Medium überimpft und auf einem Rundschüttler bei 100 UpM, 24 °C und Dauerlicht (circa 7 µmol·m⁻²·s⁻¹) kultiviert, bis eine dichte Zellsuspension entstanden war. Die Zellen wurden anschließend steril abfiltriert, und in eine Menge von 20 ml LS-Medium überführt. Die Kultivation erfolgte wie beschrieben, bis die Zellsuspension sichtbar dick gewachsen war. Dieser Prozess wurde mit einer Menge von 50 ml, 100 ml und schließlich 150 ml wiederholt. Es entstanden Zellsuspensionen der transformierten Kalli, die im weiteren Verlauf wie die Zellen des Wildtyps von *Eschscholzia californica* nach einem Wachstumszyklus von 9 bzw. 10 Tagen kultiviert werden konnten (siehe auch unter 2.7). Die Kultivation im Flüssigmedium erfolgte ebenfalls unter ständigem Zusatz von 100 µg/ml Paromomycin.

2.9.13 Southern Blotting

Ziel des Southern Blotting ist es, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren und anschließend einzelne spezifische DNA-Abschnitte durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde nachweisen zu können (Mülhardt, 2009).

2.9.13.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Genomische DNA (Isolation beschrieben unter 2.9.1) wurde zunächst einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen unterworfen. Die verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen. Der Verdau wurde wie folgt angesetzt:

40 µg	genomische DNA
5 µl	10x Reaktionspuffer
50 U	Restriktionsenzym (Hind III; Eco RI; Xho I)
2 µl	0,1 M Spermidin

Auf das Endvolumen von 50 µl wurde mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Der Ansatz wurde schließlich über Nacht bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.9.13.2 DNA-Gelelektrophorese

Es wurden 1%ige Agarose-Gele (siehe unter 2.9.4) mit dem Format 15 cm x 20 cm x 1,5 cm hergestellt. Die mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaute genomische DNA wurde mit 5 µl des 10x DNA-Ladepuffers versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Weiterhin wurden ein Längenstandard (Smart Ladder, Eurogentec, Köln, D) sowie eine Positivkontrolle zur Überprüfung der korrekten Ausführung des Southern Blottings aufgetragen. Als Positivkontrolle diente die im späteren

Verlauf zur Herstellung der Sonde mittels PCR amplifizierte DNA. Diese wurde stark verdünnt eingesetzt (100 pg pro Geltasche).

Nach Beladen des Gels erfolgte die elektrophoretische Auftrennung über etwa 19 bis 20 Stunden bei 30 V. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert (siehe unten).

2.9.13.3 Southern Transfer

Das Agarosegel wurde zunächst in eine Plastikschaale gegeben, mit Depurinierungslösung bedeckt und für 30 Minuten bei 50 UpM geschüttelt. So sollte sichergestellt werden, dass auch DNA-Fragmente über 5 kbp effizient auf die Nylonmembran transferiert werden konnten. Nach Ablauf der Zeit wurde zur Trennung der beiden DNA-Stränge die Depurinierungslösung mit der Denaturierungslösung ausgetauscht und ebenfalls bei 50 UpM für 30 Minuten inkubiert. Als letzter Schritt wurde das Gel zur Neutralisation bei 50 UpM für 30 Minuten in Neutralisierungslösung geschüttelt.

Weiterhin wurden eine Nylonmembran, mehrere Lagen Whatman-Blotting Papier und Zellstoff auf die Größe des Agarosegels zugeschnitten, sowie eine Plastikwanne mit etwa 750 ml des 10x SSC-(Transfer-)Puffers befüllt. Über die Wanne wurde eine Glasscheibe gelegt und mit einer Lage Whatman-Papier beschickt, das etwa 2 cm breiter als das Agarosegel war und in der Länge in die Plastikwanne hinreichte, sodass es sich mit dem Puffer vollsaugen konnte. Anschließend wurde das Gel mit den Taschen nach unten luftblasenfrei auf das Whatman-Papier aufgelegt. Die Ränder des Gels wurden zur Seite des Whatman-Papiers mit Parafilm ausgelegt, um zu vermeiden, dass der Transferpuffer am Gel vorbeiläuft. Schließlich wurde die mit 10x SSC befeuchtete Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Drei Lagen in Transferpuffer getränktes, zurechtgeschnittenes Whatman-Papier wurden oben aufgelegt und darauf schließlich der trockene Zellstoff aufgestapelt. Eine Glasplatte wurde für einen gleichmäßigen Andruck auf den Stapel gelegt und mit einem Gewicht von etwa 100 g beschwert. Der Transfer wurde für mindestens 16 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der Stapel abgebaut und die Nylonmembran drei Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA kovalent an die Membran zu binden (cross-linking). Es schloss sich der Vorgang der Hybridisierung an (siehe unten).

10x SSC (Transferpuffer): 1,50 M Natriumchlorid
0,15 M Trinatriumcitrat
pH-Wert: 7,0. Autoklaviert.

Depurinierungslösung: 0,25 M Salzsäure

Denaturierungslösung: 0,50 M Natriumhydroxid
1,50 M Natriumchlorid

Neutralisierungslösung: 1,00 M Tris
1,50 M Natriumchlorid
pH-Wert: 7,5. Autoklaviert.

2.9.13.4 Herstellung der markierten Sonde

Zur Herstellung der markierten Sonde wurde zunächst der entsprechende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert, auf einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA extrahiert (siehe Abschnitte 2.9.3 bis 2.9.5). Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt (2.9.2).

Die Markierung der DNA erfolgte, wie in der Anweisung zu dem Kit „Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System“ (GE Healthcare, Freiburg, D) beschrieben, mit Alkalischer Phosphatase. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

2.9.13.5 Hybridisierung

Ein Volumen von 0,125 ml pro cm² der Nylonmembran wurde zunächst in einer Hybridisierungsflasche auf 55 °C vorgeheizt. Zur Vorhybridisierung wurde die Nylonmembran in die Flasche gegeben und in einem Hybridisierungssofen bei 55°C und 25 UpM mindestens 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die markierte Sonde zugesetzt und über Nacht bei den gleichen Bedingungen hybridisiert.

Zum Waschen der Membran wurde zunächst der primary wash buffer auf 55 °C erhitzt. Die Waschlösung wurde in die Hybridisierungsflasche eingefüllt und die Membran 10 Minuten bei 55°C und 25 UpM gewaschen, derselbe Vorgang wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt. Pro Waschschritt wurden 2 – 3 ml des Puffers je cm² der Nylonmembran verwendet. Anschließend wurde ein Überschuss an secondary wash buffer in die Hybridisierungsflaschen zu der Membran gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur und 25 UpM gewaschen. Auch dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Detektion des zuvor erzeugten Signals (siehe unten).

Hybridisierungspuffer:	0,5 M 4 % (w/v)	Natriumchlorid blocking-Reagenz
	In Hybridisierungsreagenz (GE Healthcare, Freiburg, D; Zusammensetzung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen) lösen.	
primary wash buffer:	2 M 0,1 % (w/v) 50 mM 150 mM 1 mM 0,2 % (w/v)	Harnstoff Natriumdodecylsulfat Natriumphosphat Natriumchlorid Magnesiumchlorid blocking-Reagenz
secondary wash buffer:	50 mM 100 mM 2 mM	Tris Natriumchlorid Magnesiumchlorid
	pH-Wert: 10,0.	

2.9.13.6 Detektion

Die Erzeugung eines chemilumineszenten Signals von der mit Alkalischer Phosphatase markierten Sonde erfolgte mit Hilfe des CDP-Star Detection Reagent (GE Healthcare, Freiburg, D). Die Zusammensetzung der Lösung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Die hybridisierte und gewaschene Nylonmembran wurde auf eine saubere, flache Oberfläche gelegt und Reste des Waschpuffers entfernt. Anschließend wurde das Detektionsreagenz auf die Membran pipettiert (30 bis 40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) und fünf Minuten darauf belassen. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde die Membran von der Lösung befreit und in eine Filmkassette gelegt. Alle weiteren Abläufe erfolgten in einer Dunkelkammer. Ein Film wurde eine Stunde lang auf die Nylonmembran platziert, anschließend entwickelt und fixiert (Entwickler- und Fixierungslösung: Firma Kodak, Rochester, USA). Der fertige Film wurde anschließend mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

2.9.14 Semiquantitative RT-PCR

2.9.14.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von reiner und möglichst unbeschädigter RNA wurde der RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, D) genutzt. Die genauen Zusammensetzungen der Lösungen sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Es wurde eine Menge von jeweils 100 mg Zellkulturmaterial mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe von Mörser und Pistill zu einem feinen Puder zermahlen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden nach Anleitung des Herstellers und auf Eis mit RNase freien Materialien und Chemikalien durchgeführt, zentrifugiert wurde stets bei Raumtemperatur.

Das Prinzip der RNA-Isolation beruht auf einer Lyse der Zellen, Inaktivierung der RNasen, Binden der RNA an eine Säule, Waschen mit ethanolhaltigem Puffer und anschließende Elution mit RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die Konzentration der erhaltenen RNA (siehe unter 2.9.14.2) bestimmt, die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -20°C .

2.9.14.2 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der erhaltenen RNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer. Bei dieser Wellenlänge entspricht die optische Dichte $OD = 1$ einem RNA-Gehalt von 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Desweiteren konnte durch den Quotienten $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ die Reinheit der RNA bestimmt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen (Mülhardt, 2009).

2.9.14.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (St.Leon-Rot, D) benutzt. Zusammensetzungen der Lösungen sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Zunächst wurde eine Mischung aus 10 µl RNA (100 ng/µl), 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer (100 µM) und 1 µl DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, welche fünf Minuten bei 65°C inkubiert wurde, um GC-reiche Bereiche oder Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurden auf Eis folgende Lösungen in angegebener Reihenfolge zupipettiert:

4 µl	5x Reaction-Puffer
1 µl	RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	dNTP Mix (10 mM)
1 µl	RevertAid™ H Minus M-MuV Reverse Transkriptase (200 u/µl).

Die erhaltene Mischung wurde zur cDNA-Synthese 60 Minuten lang bei 42°C inkubiert, anschließend zum Reaktionsabbruch fünf Minuten bei 70°C erhitzt. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.9.14.4 PCR

Zur Durchführung der PCR wurde die nach 2.9.13.3 hergestellte cDNA zunächst 1:50, 1:100, 1:200 und 1:500 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Um herauszufinden, welche der Verdünnungen ein auswertbares Ergebnis lieferte, wurde eine PCR mit 35 Zyklen angesetzt, wobei die verwendeten Primer (Amplifikation von Aktin, Berberinbrückenenzym und 4'OMT, siehe unter 2.3) zuvor auf ihre Fähigkeit, ein einzelnes, spezifisches Produkt zu liefern, überprüft worden waren. Die jeweilige verdünnte cDNA, deren PCR eine Bande mit mittlerer bis starker Intensität lieferte, wurde für folgende Versuche eingesetzt.

Zur semi-quantitativen Auswertung der Expression des Zielgens war es notwendig, den exponentiellen Bereich der Amplifikation der zuvor gebildeten cDNA zu ermitteln. Dazu wurde die entsprechende PCR nach den Zyklen 20, 24, 28, 32, 36 und 40 abgebrochen, das jeweilige Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.9.4) aufgetrennt, unter UV-Licht mit einer Digitalkamera dokumentiert und die Fluoreszenzintensität des PCR-Produktes mit Hilfe des Computerprogrammes Optimas (Optimas Corporation, Houston, USA) unter vorheriger Subtraktion der Fluoreszenz des Hintergrundes quantifiziert. Nach Auswahl des Zyklus', der sich im exponentiellen Bereich der Amplifikation befindet, wurde die PCR (nach 2.9.3) angesetzt, dabei wurde neben dem jeweiligen Zielgen das „house-keeping gene“ Aktin mitgeführt, sowie Negativkontrollen ohne Template. Die Quantifizierung der Intensitäten der PCR-Produkte erfolgte wie oben beschrieben. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten, wurden die jeweiligen Transkriptmengen der Zielgene auf das mitgeführte Aktin bezogen.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Herstellung eines Extraktes der löslichen Proteine

Zur Abtrennung des Proteins der Sanguinarinreduktase, welches zur im Zytoplasma löslichen Fraktion gehört, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, die sich nach dem verwendeten Ausgangsmaterial richteten.

2.10.1.1 Methode 1: aus Pflanzenmaterial

Ungefähr 2 g des Pflanzenmaterials wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe von Mörser und Pistill verrieben. Nachdem ein feines Pulver erhalten worden war, wurden 3 bis 5 ml des Aufarbeitungspuffers zugegeben und erneut mit flüssigem Stickstoff verrieben. Die Mischung wurde in ein 15 ml-Falcon Tube eingefüllt und im Kühlschrank aufgetaut. Eine Zentrifugation bei 4°C, 14.000 x g und 45 Minuten schloss sich an, um den Extrakt von den unlöslichen Bestandteilen zu trennen. Zur Abtrennung der löslichen Proteine vom mikrosomalen Pellet wurde schließlich 60 Minuten bei 4°C und 100.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Zur Entfernung störender niedermolekularer Verbindungen wurde der Extrakt in Dialysekammern über Nacht bei 4°C in TE-Puffer und unter ständigem Rühren dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Proteingehalt des Extrakts nach Herstellung geeigneter Verdünnungen bestimmt (siehe 2.10.4.1), anschließend mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Aufarbeitungspuffer:	50 mM MOPS
	5 mM Natrium-EDTA
	1 mM PMSF
	5 mM GSH
	5 mM Ascorbinsäure
	0,2 % BSA
	1,0 % Polyclar AT

TE-Puffer:	10 mM Tris pH 7,4
	1 mM EDTA pH 8,0

2.10.1.2 Methode 2: aus Zellkulturen

Um die Fraktion der löslichen Proteine abzutrennen, wurden circa 20 g der bei -80°C gelagerten, abgefilterten Zellen der verschiedenen Suspensionskulturen mit dem doppelten Volumen an Trockeneis grob gemörsert. Zur feinen Zerkleinerung wurde das Gemisch in einer Zelmühle mit einem Blender gemahlen. Anschließend wurde 25 ml kalter Proteinextraktionspuffer zugesetzt (100 ml des Puffers enthielten jeweils eine halbe Tablette Protease Inhibitor Cocktail Set 1, Roche), unter Rühren langsam aufgetaut und schließlich nochmals mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Stabes einige

Minuten lang homogenisiert. Zur Abtrennung subzellulärer Fraktionen wurde das Gemisch 20 Minuten lang bei 4°C und 2000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der erhaltene Überstand erneut bei 4°C und 14.300 UpM 30 Minuten lang zentrifugiert. Zur Herstellung des Extraktes der löslichen Proteine wurde der resultierende Überstand wiederum bei 4°C und 100.000 x g für 60 Minuten lang zentrifugiert. Der Proteinextrakt wurde abgenommen, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert, oder sofort zur Bestimmung der Proteinkonzentration weiterverwendet.

Proteinextraktionspuffer (pH 7,5):	50 mM MOPS
	300 mM Saccharose
	5 mM Natrium-EDTA
	1 mM PMSF
	5 mM Dithioerythrit
	5 mM Ascorbinsäure
	0,6 % Polyclar AT

2.10.2 Abtrennung der mikrosomalen Fraktion

Um die Aktivität der Phospholipase A₂ messen zu können, war es notwendig, die Plasmamembran von den anderen Fraktionen des Zellaufschlusses abzutrennen. Dazu wurde wie unter 2.10.1.2 beschrieben vorgegangen. Nach dem letzten Schritt (Zentrifugation bei 100.000 x g) wurde allerdings das Pellet zur weiteren Aufarbeitung verwendet. Das so erhaltene Pellet wurde mit etwa 2 ml Suspensionspuffer überspült, der Überstand sogleich verworfen und das Pellet erneut in 2 ml Suspensionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Suspensionspuffer (pH 7,5):	330 mM Saccharose
	4 mM Dikaliumhydrogenphosphat
	1 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	5 mM Kaliumchlorid
	1 mM Dithioerythrit
	0,1 mM EDTA

2.10.3 Präparation von Plasmamembran-Vesikeln im wässrigen Zwei-Phasen-System

Zur Gewinnung der Plasmamembran-Vesikel wurde die Methode des wässrigen Zwei-Phasen-Systems verwendet. Um die Reinheit der Plasmamembran zu erhöhen, wurde das Zwei-Phasen-System drei Mal durchlaufen, sodass drei 36 g Systeme, deren Zusammensetzung in Tabelle 6 beschrieben ist, hergestellt werden mussten (Dordschbal, 2002).

Die mikrosomale Fraktion (aus 2.10.2) wurde mit Suspensionspuffer auf ein Volumen von 9 ml gebracht und zu einem der drei Zwei-Phasen-Systeme gegeben. Den übrigen beiden Systemen wurde jeweils 9 ml reiner Suspensionspuffer zugesetzt. Anschließend wurde alles kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung bei 4°C und 2000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Die Oberphase konnte nun

vorsichtig abgenommen werden. Diese Vorgehensweise wurde zweimal wiederholt, sodass die Vesikelsuspension alle drei Systeme einmal durchlaufen konnte. Die dreifach gereinigte Oberphase wurde schließlich mit demselben Volumen an Suspensionspuffer versetzt. Die so erhaltene Mischung wurde bei 4°C und 36.900 UpM 60 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 10 ml Suspensionspuffer gewaschen, erneut bei 4°C und 36.900 UpM 60 Minuten lang zentrifugiert und schließlich je nach Größe in 300 bis 1000 µl Solubilisationspuffer aufgenommen und über Nacht bei 8°C und 300 UpM solubilisiert. Abschließend wurde bei 4°C und 60.000 UpM 40 Minuten lang zentrifugiert, sodass der Überstand, der die solubilisierte Plasmamembran enthielt, abgetrennt werden konnte. Dieser wurde aliquotiert, direkt weiterverwendet oder mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Suspensionspuffer (pH 7,5):	siehe unter 2.10.2	
Solubilisationspuffer (TENC, pH 7,5):	50 mM	Natriumchlorid
	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
	0,5 % (w/V)	Natriumcholat

Tabelle 6: Zusammensetzung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems

Komponenten	36 g System
20 % (w/w) Dextran T-500	11,7 g
40 % (w/w) PEG 3350	5,85 g
Saccharose	3,05 g
200 mM Kaliumphosphat	0,675 ml
200 mM Kaliumchlorid	0,675 ml
10 mM EDTA	0,270 ml
100 mM DTE	0,270 ml
Bidestilliertes Wasser	4,91 ml

2.10.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.10.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) wurde für die Proteinextrakte, die nach Methode 1 (Pflanzen) hergestellt worden waren, verwendet.

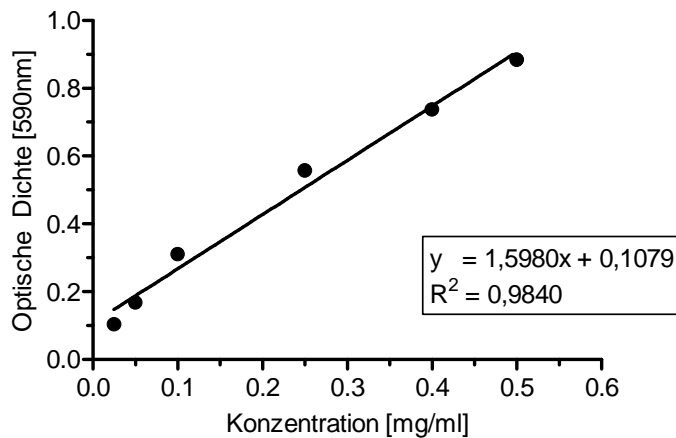
Dafür wurde zunächst eine Kalibriergerade mit einem Albumin-Standard in den entsprechenden Verdünnungen erstellt (siehe Abbildung 6).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Je 50 µl der Proteinverdünnung und 1,0 ml des Farbreagens wurden in eine Plastikkuvette gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die

Extinktion bei 590 nm gegen den entsprechenden Blindwert vermessen, der destilliertes Wasser anstelle der Proteinlösung enthielt.

Abbildung 6: Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Aufgetragen ist die verwendete Konzentration des Albuminstandards gegen die Extinktion bei 590 nm. Die aus der linearen Regression erhaltene Beziehung zwischen den zwei Größen ist in der abgebildeten Gleichung dargestellt (n= 1).



Bradford-Farbreagenz: 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250, gelöst in 50 ml 95 % (v/v) Ethanol, Zusatz von 100 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure, ad 1 l mit bidestilliertem Wasser.

2.10.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay-Kit

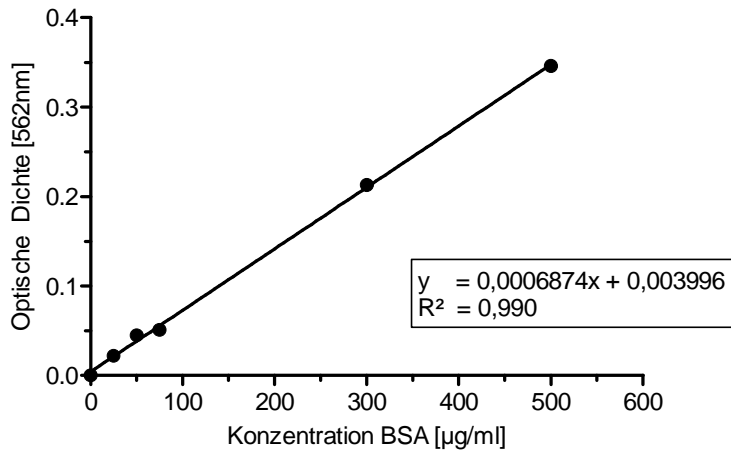
Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA Protein Assay-Kits (Thermo Scientific, Rockford, USA) erfolgte für Proteinextrakte, die nach Methode 2 (siehe 2.10.1.2) hergestellt worden waren.

Die Zusammensetzungen und Vorbereitungen der einzelnen Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Ein Blindwert, der statt Proteinlösung Suspensionspuffer enthielt, wurde stets mitgeführt.

Um die Proteinkonzentration schließlich ermitteln zu können, wurde eine Kalibrierung mit Hilfe eines Albumin-Standards (BSA), der in entsprechenden Verdünnungen eingesetzt und wie die Proben behandelt wurde, durchgeführt (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7: Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit

Aufgetragen ist die Konzentration des verwendeten Albumin-Standards gegen die optische Dichte bei 562 nm. Die aus der linearen Regression erhaltene Beziehung zwischen den zwei Größen ist in der abgebildeten Gleichung dargestellt (n = 1).



2.10.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting

2.10.5.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese beruht auf einer Vorbehandlung der Proteinproben mit SDS und DTE. DTE führt zum Aufbrechen der Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Die Behandlung mit SDS resultiert in einer Denaturierung sowie dem Aufbrechen der Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es bildet sich ein linearer Proteinstrang, der von vielen Molekülen SDS komplexiert wird und somit negativ geladen ist. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient daher zum Auftrennen von Proteingemischen nur nach ihrer Molekülgröße, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und wird durch einen Molekularsiebeffekt erzeugt, der durch die Dichte und den Grad der Vernetzung der Polyacrylamid-Gelmatrix hervorgerufen wird.

Das in dieser Arbeit verwendete SDS-Gelelektrophorese-System (12,5%ig) nach Laemmli (1970) mit Tris/Glycin- und Tris/HCl-Puffern besteht aus einem großporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel, die übereinandergeschichtet sind. Ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 7 angegeben. Gibt man die Proteinprobe auf das Sammelgel auf und legt eine Spannung an, so wird das niedermolekulare Glycin zum Leitton und wandert voraus, die Proteine werden zu Folgeionen und konzentrieren sich in einer Bande. Erst im engporigen Trenngel werden die Protein-SDS-Komplexe nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit 4x Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Für die Gelelektrophorese wurde ein 1x Laufpuffer verwendet und Spannungen zwischen 100 und 150 Volt angelegt. Der Molekulargewichtsstandard

PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot, D) wurde zur Größenorientierung genutzt.

Tabelle 7: Zusammensetzungen von Sammel- und Trenngel

Komponenten	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung	1,75 ml	10,00 ml
Bidestilliertes Wasser	7,50 ml	8,50 ml
Sammelgelpuffer	3,13 ml	-
Trenngelpuffer	-	5,00 ml
10 % (w/v) APS	100 µl	125 µl
TEMED	25 µl	25µl

Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Sammelgelpuffer (pH 6,8):	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS
Trenngelpuffer (pH 8,8):	2 M Tris/HCl 0,5 % SDS
10x Laufpuffer (pH 8,3):	0,25 M Tris 2,5 M Glycin 1 % SDS
4x SDS-Probenpuffer (pH 6,8):	0,2 M Tris/HCl 8 % (w/v) SDS 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 40 % (v/v) Glycerin 0,08 % (w/v) Bromphenolblau 0,02 M DTE, Frisch zugesetzt

2.10.5.2 Semidry-Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine geeignete Trägermatrix, eine Nitrocellulosemembran, übertragen. Dazu musste ein Blot aufgebaut werden. Hierzu wurden das Blottingpapier und die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Neun Lagen Blottingpapier wurden in Puffer 3 getränkt und auf der Kathode des Blotters luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurde das Gel, was in Puffer 2 inkubierte, auf den Stapel aufgelegt. Darauf wurden die Nitrocellulosemembran und 3 Lagen Blottingpapier, ebenfalls in Puffer 2 getränkt, gelegt. 6 Lagen Blottingpapier, eingelegt in Puffer 1, schlossen den Stapel ab. Der Anodenteil wurde angeschlossen und die Proteine bei 100 mV 90 Minuten lang transferiert. Die übertragenen Proteine interagierten mit der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen. Während des Blottingvorganges blieb die Anordnung der Proteine erhalten und das SDS aus den Komplexen wurde

ausgewaschen. So konnten die Proteine zum Teil renaturieren und ihre Tertiär- und Sekundärstruktur wiedererlangen.

Puffer 1 (pH 10,4):	300 mM 20 % (v/v)	Tris Methanol
Puffer 2 (pH 10,4):	25 mM 20 % (v/v)	Tris/HCl Methanol
Puffer 3 (pH 10,4):	25 mM 20 % (v/v) 40 mM 0,01 %	Tris/HCl Methanol γ -Aminocapronsäure SDS

2.10.5.3 Immunologischer Nachweis

Der immunologische Nachweis der auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine beruht auf der hochspezifischen Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Als primäre Antikörper wurden entweder der anti-Sanguinarinreduktase *E. californica*- oder der anti-1XQ6-A. *thaliana*-Antikörper (beide aus Kaninchen, IPK Gatersleben, D) in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet, als sekundärer Antikörper diente ein boviner anti-rabbit IgG-HRP (sc2370)-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in der Verdünnung 1:3000. Die verdünnten Antikörper-Lösungen wurden mit LowCross Buffer hergestellt.

Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurde die Membran über Nacht in Blockierungslösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Membran drei Mal jeweils 10 Minuten in TBS-T geschüttelt, anschließend in eine Stunde lang mit dem primären Antikörper inkubiert und daraufhin wieder drei Mal jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Es schloss sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper an. Die Membran wurde schließlich drei Mal jeweils 10 Minuten in TBS-T und drei Mal jeweils 10 Minuten mit destilliertem Wasser geschüttelt.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe der ECL Western Blotting Detection Reagents der Firma GE Healthcare (Freiburg, D) nach deren Anleitung. Die eigentliche Detektion erfolgte in der Dunkelkammer. Dabei wurden Entwickler und Fixierer der Firma Kodak (Rochester, USA) benutzt. Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

Um die Membran erneut zum immunologischen Nachweis einsetzen zu können, wurden die gebundenen Antikörper durch die Behandlung mit RotiFree der Firma Roth (Karlsruhe, D) für eine Stunde bei 65°C entfernt.

2.10.5.4 Computergestützte Auswertung der entwickelten Western Blots

Die Proteinbanden, die auf den entwickelten Filmen der Western Blots zu sehen waren, wurden mit Hilfe des Programmes Optimas® 6.2 (Optimas Corporation, Houston, USA) quantifiziert. Dazu wurde

die Abbildung in ein 16 bit Graustufenbild umgewandelt und der Grauwert jeder Bande nach Subtraktion des Hintergrundes gemessen.

2.10.6 Herstellung von Dihydrobenzophenanthridinen

Zur Herstellung von Dihydrosanguinarin bzw. einer Mischung aus Dihydrobenzophenanthridinen wurde reines Sanguinarin (HPLC grade) oder ein Mix aus Benzophenanthridinen (vorwiegend aus Sanguinarin und Chelerythrin zusammengesetzt, Arbeitsgruppe V.Simánek, Palacký-Universität Olmütz, Tschechien) verwendet. Dazu wurde eine bestimmte Menge in destilliertem Wasser gelöst und mit einer Spatelspitze Natriumborhydrid versetzt. Die daraufhin entfärbte Lösung wurde zum Entfernen des überschüssigen, sehr reaktiven (und damit zelltoxischen) Natriumborhydrids mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und zur Phasentrennung etwa 10 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, anschließend die Ethylacetat-Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft. Schließlich wurden die entstandenen Dihydrobenzophenanthridine in einem bestimmten Volumen destilliertem Wasser oder Ethanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.10.7 Enzymassay zur Bestimmung der Sanguinarinreduktase-Aktivität

Das Prinzip des hier durchgeführten Enzymassays beruht auf der Umsetzung von Sanguinarin zu Dihydrosanguinarin bei Vorhandensein der Sanguinarinreduktase, und damit einer Zunahme der Fluoreszenz bei 460 nm und der Abnahme der Fluoreszenz bei 580 nm. Da die Sanguinarinreduktase NADPH als Cofaktor benötigt, wurde ein NADPH-regenerierendes System aus Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und NADP^+ zugegeben.

Zur Adaption des Enzymassays auf Proteinextrakte aus Zellkulturen bzw. Pflanzenmaterial wurden verschiedene Sanguinarinkonzentrationen (1 bis 10 μM) und Inkubationszeiten getestet. Dabei hat sich eine Sanguinarinkonzentration von 2,5 μM als optimal erwiesen; die Einwirkzeit von 20 Minuten wurde gewählt, da in diesem Zeitraum ein ausreichend großer Umsatz stattfand, ohne bereits im abgesättigten Bereich des Enzyms zu liegen.

Der Reaktionsansatz pro Well der Mikrotiterplatte betrug 270 μl . Er enthielt 1 mM Glucose-6-Phosphat, 20 μM NADP^+ , 10 mU/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 2 mM Glutathion, 2,5 μM Sanguinarin und 300 ng der jeweiligen Proteinlösung.

Zuerst wurden Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase sowie die NADP^+ -Lösung in die Wells pipettiert und zur NADPH-Bildung 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Glutathion und die Proteinlösung zugegeben. Zum Start der Reaktion wurde Sanguinarin zupipettiert, nach 20 Minuten Wartezeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 μl einer 1 M Salzsäurelösung gestoppt. Die Messung am Fluoreszenz-Reader erfolgte bei folgenden Einstellungen: Messparameter zur

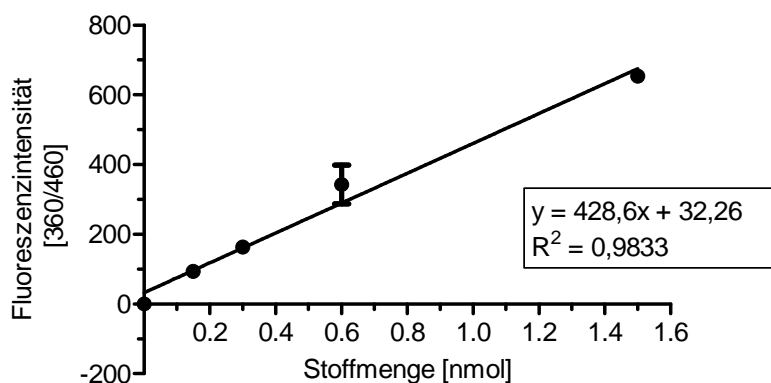
Erfassung von Sanguinarin: Exzitation 485 nm, Emission: 580 nm, Sensitivität: 60; Messparameter zur Erfassung des entstandenen Dihydrosanguinarins: Exzitation 360 nm, 460 nm, Sensitivität: 60.

Zur Umrechnung der erhaltenen Fluoreszenzwerte in Stoffmengen wurde eine Kalibriergerade mit verschiedenen Dihydrosanguinarinkonzentrationen erstellt, gezeigt in Abbildung 8.

Jede Probe wurde mehrfach vermessen (n=24). Als Basiswert wurden jeweils Ansätze mitgeführt, die alle Reagenzien, bis auf die Sanguinarinlösung, die durch bidestilliertes Wasser ersetzt wurde, enthielten. Diese erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden von den Aktivitäten subtrahiert. Da Sanguinarin im Überschuss auch spontan in Dihydrosanguinarin umgewandelt wird, wurde außerdem eine Leerwertprobe mitgeführt, die alle Reagenzien, bis auf die verdünnte Proteinlösung, enthielt. Diese wurde ebenfalls von der erhaltenen Aktivität abgezogen.

Abbildung 8: Kalibriergerade zur Dihydrosanguinarin-Quantifizierung des Enzymassays

Dargestellt ist die Beziehung zwischen erhaltenen Fluoreszenzwerten und eingesetzten Stoffmengen von Dihydrosanguinarin. Es wurde ein Volumen von 300 µl pro Well vermessen, was sich aus bidestilliertem Wasser und der entsprechenden Menge einer Dihydrosanguinarinstammlösung (500 µM) zusammensetzte (n=3).



2.10.8 Messung der Phospholipase A₂- Aktivität

Zur Messung der Phospholipase-A₂-Aktivität (verändert nach Heinze et al., 2007) wurde die nach 2.10.3 isolierte Plasmamembran auf einen Proteingehalt von 0,5 µg/µl eingestellt. Zur Messung der reinen Phospholipase-A₂-Aktivität wurden 80 µl der Plasmamembranvesikel-Lösung sowie 120 µl TENC-Puffer in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und 10 Minuten bei 8°C und 150 UpM inkubiert. Anschließend wurden 50 µl dieser Mischung in Wells einer Mikrotiterplatte verteilt, mit 170 µl Substratlösung versetzt und nach 30 Sekunden am Fluoreszenz-Reader bei folgenden Einstellungen vermessen: Exzitation: 485 nm, Emission: 515 nm, Sensitivität: 60.

Zusätzlich wurde zu jedem Ansatz der entsprechende Leerwert, d. h. ohne Plasmamembranvesikel, mitgeführt und anschließend von den erhaltenen Messwerten abgezogen.

TENC-Puffer, pH 7,5:	20 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	50 mM	Natriumchlorid
	0,5 %	Natriumcholat

Phospholipase-A ₂ -Messpuffer:	20 mM Tris 0,02 % CHAPS pH 7,0
Substratlösung:	500 nM Bis-BODIPY FL-C11-PC in Phospholipase-A ₂ -Messpuffer

2.10.9 Messung des vakuolären pH-Shifts

Die Messung des pH-Shifts beruht auf der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von 5-Carboxyfluorescein, wodurch der Quotient der Fluoreszenzintensitäten, die nach aufeinanderfolgender Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen erhalten werden, eine Funktion des pH darstellt (Viehweger et al., 2002; Roos, 2000).

Die Zellen wurden mit dem Acetoxymethylester des 5'-Carboxyfluoresceindiacetats (5-CFDA, AM) inkubiert. Dieses bei neutralem pH membranpermeable Molekül akkumuliert in intakten Zellen, da erst dort der lipophile Acetoxymethylester-Rest durch unspezifische Esterasen abgespalten wird. Das gebildete 5'-Carboxyfluoresceindiacetat reichert sich aufgrund seines niedrigen pK_a-Wertes von 6,5 in der Vakuole an, wo durch saure Esterasen die Acetatreste abgespalten werden. Dort bildet sich ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Mono- und Dianion, welches aufgrund unterscheidbarer Exzitationspektren zur pH-Messung genutzt werden kann. Damit gibt die Änderung des Intensitätsquotienten bei den unten genannten Fluoreszenzparametern eine Änderung des vakuolären pH wieder (Roos, 2000).

Zur Messung des pH-Shifts wurden die Zellen wie unter 2.11.1 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 200 nM 5-CFDA, AM und 100 µM Eserin (dient zur Hemmung extrazellulärer Esterasen und dadurch zur Verhinderung extrazellulärer Fluoreszenz durch freigesetztes 5'-Carboxyfluoresceindiacetat) versetzt. Nach Ablauf von einer Stunde wurde in mikroskopischen Stichproben sichergestellt, dass die Emission des Fluorophors praktisch ausschließlich von den Vakuolen ausging. In diesem Fall wurden die Zellen abgfiltriert, mit 100 mM Sorbit gewaschen und in das entsprechende Volumen an Nährlösung (NL-P) zur Einstellung der optimalen Zelldichte zurückgeführt. 100 µl der Zellsuspension wurde in je ein Well einer Mikrotiterplatte mit einem Boden aus Quarzglas pipettiert, und entweder 5 µl Wasser oder 5 µl Elicitorlösung (Konzentration optimiert auf maximalen pH-Shift beim Wildtyp) versetzt, gemischt und sofort am Fluoreszenzreader vermessen. Die Fluoreszenzintensität wurde in Abständen von 2,5 Minuten über einen Zeitraum von 30 Minuten bei folgenden Einstellungen quantifiziert: zur Erfassung des Dianions: Exzitation 485 nm, Emission: 525 nm, Sensitivität: 50; Erfassung des Monoanions: Exzitation: 440 nm, Emission: 528 nm, Sensitivität: 50. Der Quotient der Messwerte wurde mit Hilfe einer Kalibriergerade (erhalten aus 5'CFDA enthaltenden Puffern, nach Sophie Weigl, unveröffentlicht) auf pH-Werte umgerechnet.

Stammlösung 5-CFDA, AM:	10 mM in DMSO
Stammlösung Eserin:	100 mM in Ethanol (96 %, v/v)

2.10.10 Messung der Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

Da die Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase nach Elicitierung ansteigt (Arakawa et al., 1992; Schumacher und Zenk, 1988), wurden die Zellsuspensionen der verschiedenen Zell-Linien, wie unter 2.11.1 beschrieben, vorbereitet und so mit einem Hefeelicitator versetzt, dass die Endkonzentrationen in der Zellsuspension 5 µg/ml oder 50 µg/ml betragen (Inkubation siehe unter 2.11.2).

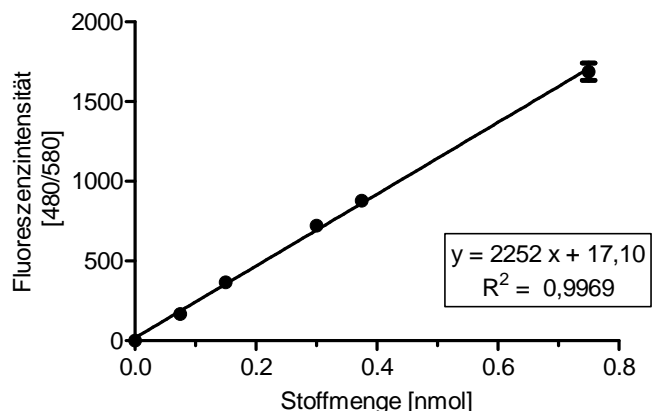
Da es sich bei der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase um ein Protein der löslichen Fraktion handelt, konnten die Proteinextrakte wie unter 2.10.1.1 beschrieben 24 Stunden nach Elicitorzusatz gewonnen werden. Da das Enzym durch Glutathion und PMSF stark inhibiert wird (Arakawa et al., 1992), wurde der Aufarbeitungspuffer ohne beide Komponenten hergestellt und verwendet. Die Konzentration der erhaltenen Proteinextrakte wurde mittels BCA-Kit (siehe 2.10.4.2) bestimmt.

Zur Durchführung des Enzymassays wurde eine Menge von 808 µl der Proteinlösung (3 ng/µl) und 560 µl eines 10 µM Dihydroalkaloid-Mixes (Herstellung siehe unter 2.10.6) in ein 2 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und bei 37°C 40 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120 µl einer 1 M Salzsäure-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden pro Kompartiment jeweils 150 µl dieser Mischung in einer Mikrotiterplatte am Fluoreszenz-Reader vermessen. Messparameter zur Erfassung der entstandenen Benzophenanthridine: Exzitation 485 nm, Emission: 580 nm, Sensitivität: 60.

Da die Dihydroalkaloide an der Luft anfällig für die Oxidation zu den entsprechenden Benzophenanthridinen sind, wurden zur Kontrolle Leerwerte gemessen, bei denen die Proteinlösung durch Wasser ersetzt wurde. So konnten die ohne Zutun der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase entstandenen Gehalte an Benzophenanthridinen von den späteren Messwerten abgezogen werden. Um die gemessenen Fluoreszenzintensitäten später in Stoffmengen umrechnen zu können, wurde eine Kalibrierkurve erstellt (siehe Abbildung 9).

Abbildung 9: Kalibriergerade zur Benzophenanthridin-Quantifizierung nach Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase-Enzymassay

Dargestellt ist die Beziehung zwischen erhaltenen Fluoreszenzwerten und eingesetzten Stoffmengen von Benzophenanthridin-Alkaloid-Mix. Es wurde ein Volumen von 150 µl pro Well vermessen, was sich aus bidestilliertem Wasser und der entsprechenden Menge einer Benzophenanthridinstammlösung (10 mM) zusammensetzte (n=8).



2.11 Experimente mit Zellsuspensionen

2.11.1 Vorbereitung der Zellsuspensionen

Für die folgenden Experimente wurden stets Zellsuspensionen mit einem Frischmassegehalt von 50 mg/ml verwendet, die aus sieben Tage alten Kulturen hergestellt wurden.

Dazu wurde zunächst die Frischmasse der Kulturen bestimmt, indem die Nährlösung mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellmasse abgewogen wurde. Dies wurde pro Kultur drei Mal durchgeführt. Anschließend wurde das berechnete Volumen der sieben Tage alten Zellsuspension unter sterilen Bedingungen auf eine Gaze pipettiert, sodass die Nährlösung abgefiltert werden konnte. Die Zellen wurden mit 100 mM Sorbit gewaschen, abgefiltert und in dem entsprechenden Volumen an Nährlösung ohne Phosphat (NL-P 75 %) resuspendiert.

2.11.2 Inkubation von Zellsuspensionen mit Sanguinarin

Die nach 2.11.1 vorbereitete Zellsuspension wurde mit so mit Sanguinarin versetzt, dass ein Gehalt von 3,32 µg/ml Zellsuspension (10 µM) entstand. Die Suspensionen wurden kräftig durchmischt und zur Probennahme auf einem Schüttler bei 100 UpM, 24°C und Dauerlicht (circa 7 µmol·m⁻²·s⁻¹) weiterkultiviert. Es wurde pro Zellstamm stets eine Zellsuspension („Kontrolle“) mitgeführt, die nicht mit Sanguinarin behandelt wurde, um unspezifische Effekte auszuschließen.

Stammlösung Sanguinarin 3,32 mg/ml: 3,675 mg Sanguinarinchlorid-Hydrat; auf einen Milliliter mit bidestilliertem Wasser auffüllen und sterilfiltrieren.

2.11.3 Inkubation von Zellsuspensionen mit Hefeelicitor

Die nach 2.11.1 vorbereitete Zellsuspension wurde so mit einem Hefeelicitor versetzt, dass ein Endgehalt von entweder 1 µg/ml Zellsuspension oder 50 µg/ml Zellsuspension entstand. Die so behandelte Zellsuspension wurde eine Stunde lang auf einem Schüttler bei 100 UpM, 24°C und Dauerlicht (circa 7 µmol·m⁻²·s⁻¹) kultiviert. Anschließend wurde der Elicitor unter sterilen Bedingungen abgewaschen, indem die Zellen abgefiltert, mit 100 mM Sorbit gewaschen und in dem entsprechenden Volumen an Nährlösung ohne Phosphat (NL-P 75 %) resuspendiert wurden. Die Zellsuspensionen wurden zur weiteren Probennahme unter den oben genannten Bedingungen weiterkultiviert. Es wurde pro Zellstamm stets eine Zellsuspension („Kontrolle“) mitgeführt, die nicht elicitiert wurde, um die basalen Veränderungen im Alkaloidgehalt mit der Zeit feststellen zu können.

Stammlösung Hefeelicitor (1 mg/ml): Rohextrakt hergestellt nach Gundlach, 1992 und Schumacher et al., 1987; Aufreinigung der Glykoproteinfraktion durch Ultrafiltration (30 kDa), FPLC und SDS-PAGE; Konzentrationen im Text beziehen sich auf die Trockenmasse des Rohextrakts der Elicitorpräparation.

2.11.4 Inkubation von Zellsuspensionen mit Nigericin

Aus der nach 2.11.1 vorbereiteten Zellsuspension wurden die Zellen erneut mit Hilfe einer Gaze abgefiltert und in demselben Volumen eines Puffers (pH 4,5) resuspendiert. Anschließend wurde Nigericin so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 4 μM in der Zellsuspension entstand. Die Einwirkzeit betrug drei Minuten. Anschließend wurde die Suspension abgefiltert, die Zellen mit 100 mM Sorbit gewaschen und in dem entsprechenden Volumen von Nährlösung (NL-P 75 %) resuspendiert. Die weitere Kultivierung wurde auf einem Schüttler bei 100 UpM, 24°C und Dauerlicht (circa $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durchgeführt, um zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnehmen zu können. Parallel dazu wurde pro Zellstamm eine unbehandelte („Kontrolle“, versetzt mit 96 % Ethanol (v/v) zum Ausschluss von Lösungsmittelleffekten) und eine elicitierte (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Zellsuspension mitgeführt, um basale Veränderungen im Alkaloidgehalt festzustellen und Elicitor- und Nigericin-Effekte vergleichen zu können.

Nigericin-Stammlösung (4 mM): gelöst in 96 % Ethanol (v/v).

2.11.5 Inkubation von Zellsuspensionen mit Elicitor und Dihydrobenzophenanthridinen

Die nach 2.11.1 vorbereiteten Zellsuspensionen wurden mit Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zellsuspension) versetzt. Anschließend wurde sofort bzw. nach unterschiedlicher Zeitdauer Dihydrosanguinarin bzw. Dihydroalkaloid-Mix (Stammlösungen hergestellt nach 2.10.6, Endgehalte waren unterschiedlich) zugesetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte auf einem Schüttler bei 100 UpM, 24°C und Dauerlicht (circa $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), sodass zu verschiedenen Zeitpunkten Proben gezogen werden konnten. Desweiteren wurden stets eine unbehandelte Zellsuspension („Kontrolle“, versetzt mit 96 % Ethanol (v/v) zum Ausschluss von Lösungsmittelleffekten), eine nur mit Dihydrosanguinarin bzw. Dihydroalkaloid-Mix behandelte Zellsuspension sowie eine elicitierte (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Zellsuspension mitgeführt.

Stammlösung Dihydrosanguinarin/Dihydroalkaloid-Mix (500 μM): gelöst in 96 % Ethanol (v/v)

2.11.6 Fluorimetrische Quantifizierung der Alkaloide

Zur fluorimetrischen Quantifizierung der Alkaloide mussten diese zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Daher wurde zu 500 μl Zellsuspension ein Volumen von 500 μl einer methanolischen Kalilauge gegeben, kräftig geschüttelt und zur Abtrennung der Zellreste 15 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 UpM zentrifugiert. Es wurden jeweils 150 μl der Lösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 15 μl einer 5 N Schwefelsäure versetzt.

Die Messung erfolgte bei folgenden Einstellungen: Messparameter zur Erfassung von Benzophenanthridinen: Exzitation 485 nm, Emission: 580 nm, Sensitivität: 60; Messparameter zur Erfassung der Dihydroalkaloide: Exzitation 360 nm, Emission 460 nm, Sensitivität: 60.

Die Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die jeweiligen Alkaloidgehalte erfolgte mit Hilfe den zuvor erstellten Kalibriergeraden (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

Abbildung 10: Kalibriergerade zur fluorimetrischen Quantifizierung der Dihydroalkaloide

Dargestellt ist die Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration an Dihydrosanguinarin. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Messungen (n = 6).

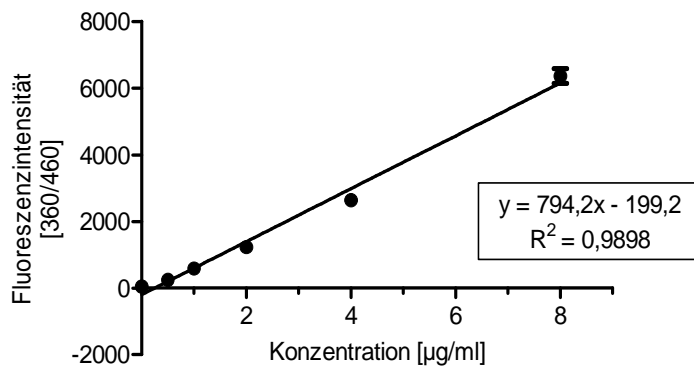
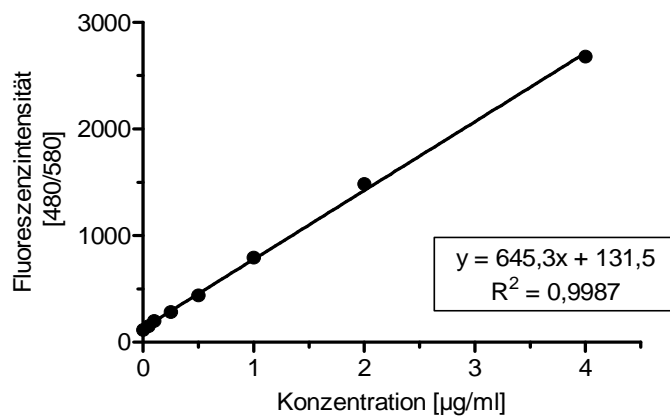


Abbildung 11: Kalibriergerade zur fluorimetrischen Quantifizierung der Benzophenanthridine

Dargestellt ist die Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Sanguinarin-Konzentration. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Messungen (n = 6).



2.12 HPLC- und MS-basierte Methodik

2.12.1 HPLC-Messungen

2.12.1.1 Extraktion aus Zellsuspensionen

Von den entsprechend vorbehandelten Zellsuspensionen (siehe unter 2.11.1 – 2.11.5) wurden 2 ml entnommen und mit demselben Volumen an Ethylacetat versetzt. Anschließend wurde mindestens 30 Sekunden mit Hilfe des Vortex kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 13.000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere (Ethylacetat-)Phase wurde abgenommen und der Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom eingedampft. Der so erhaltene Rückstand wurde mit 60 µl Methanol (HPLC grade) aufgenommen und zur Abtrennung von unlöslichen Verunreinigungen 15 Minuten bei 13.000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert.

2.12.1.2 Chromatographie, Identifizierung und Quantifizierung

Zur Analyse der Alkaloidmuster wurden jeweils 40 µl des Alkaloidextraktes in die HPLC eingespritzt und bei einer Flussrate von 1 ml/min und folgendem Gradienten, bestehend aus Laufmittel A - bidestilliertes Wasser/Trifluoressigsäure, pH 1,9 – und Laufmittel B – Acetonitril (HPLC grade) - aufgetrennt:

Zeit (min)	B (%)
0	40
7	50
25	80
30	80

Die Säule wurde nach jeder Auftrennung 10 Minuten mit 40 % Acetonitril, 5 Minuten mit 20 % Methanol und schließlich erneut 5 min mit 40 % Acetonitril gespült.

Zur Identifizierung der Alkaloidpeaks dienten zum einen die bei der Elution über den Diodenarray-Detektor aufgenommenen Absorptionsspektren, die mit einer Spektrenbibliothek des Programms Chromeleon (Version 6.80) der Dionex Corporation (Germering, D) abgeglichen wurden (weitere Daten und Absorptionsspektren aus: Dagmar Weiß, Dissertation, Universität Halle, 2004), zum anderen wurden Fraktionen der Peaks gesammelt und zur massenspektrometrischen Analyse eingereicht (Massenspektrometrie: Frau Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle, D). Die so erhaltenen Molekulargewichte konnten einzelnen Alkaloiden zugeordnet werden. Dabei entsprach das Masse/Ladungsverhältnis der Benzophenanthridinalkaloide ihrem Molekulargewicht, währenddessen die ungeladenen

Dihydroalkaloide bei der Analyse protoniert wurden. Ihr Molekulargewicht ergab sich aus $[M+H]^+$. Eine Übersicht der mittels HPLC identifizierten Alkaloide ist in Tabelle 8 dargestellt.

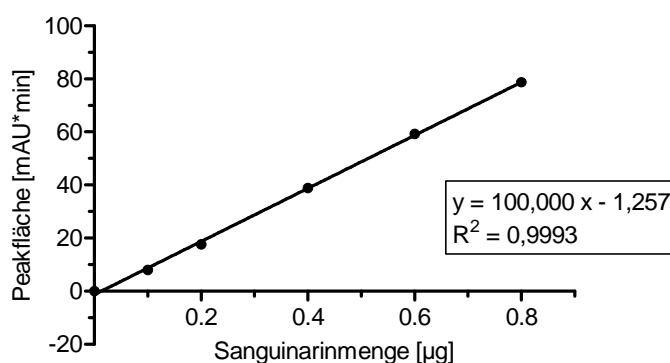
Tabelle 8: Identifizierte Benzophenanthridin- und Dihydroalkaloide in Kulturen von *Eschscholzia californica*

Alkaloid	Molekular-Gewicht	m/z [M] ⁺ bzw. [M+H] ⁺	Retentionszeit
10-Hydroxydihydrosanguinarin	349	350	5.75 min
12-Hydroxydihydrochelirubin	379	380	6.57 min
Dihydromacarpin	393	394	9.12 min
Dihydrochelerythrin	349	350	9.93 min
Dihydrochelirubin	363	364	11.04 min
Dihydrosanguinarin	333	334	11.89 min
10-Hydroxysanguinarin	348	348	7.33 min
12-Hydroxychelirubin	378	378	7.81 min
10-Hydroxychelerythrin	364	364	8.01 min
Sanguinarin	332	332	8.13 min
Chelirubin	362	362	10.01 min
Macarpin	392	392	12.81 min

Grundlage für die Quantifizierung der aus den Zellsuspensionen extrahierten Alkaloide bildete eine Kalibrierung der HPLC mit Sanguinarin bei 280 nm (Dissertation Dagmar Weiß, Universität Halle, 2004). Hierbei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration im Bereich von 2,5 – 20 µg/ml und den Peakflächen festgestellt werden (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12: HPLC-Kalibrierkurve mit Sanguinarin

40 µl der Lösungen von Sanguinarin (HPLC grade) in Methanol (HPLC grade) wurden wie unter 2.12.1.2 beschrieben mit der HPLC vermessen. Die bei 280 nm erhaltenen Peakflächen wurden gegen die jeweilige Sanguinarinmenge aufgetragen. Daten ergeben sich aus Mittelwerten und Standardabweichungen aus zwei Messungen (n= 2).



Alle weiteren Benzophenanthridinalkaloide, mit Ausnahme von 10-Hydroxychelerythrin, besitzen im Vergleich zu Sanguinarin identische Absorptionseigenschaften bei 280 nm. Zur Quantifizierung der

Dihydrobenzophenanthridinalkaloide wurden die relativen Absorptionen bei 280 nm ermittelt und auf die Absorption des Sanguinarins bezogen ($A_{\text{Sang.}} = 100 \%$): Dihydrosanguinarin 77 %, 10-Hydroxydihydrosanguinarin 52 %, Dihydrochelirubin und 12-Hydroxydihydrochelirubin 58 %, sowie Dihydromacarpin 88 %. Zur Quantifizierung von 10-Hydroxychelerythrin sowie Dihydrochelerythrin wurde eine relative Absorption von 125 % zugrunde gelegt (siehe auch Dissertation Dagmar Weiß, Universität Halle, 2004).

2.12.2 Massenspektrometrische Analysen

Massenspektrometrische Analysen nach vorausgehender UPLC-Trennung der Alkaloide wurden am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle durch Dr. Jürgen Schmidt und Ramona Heinke durchgeführt.

2.12.2.1 ESI-FT-ICR-MS

Die hochaufgelösten ESI-Massenspektren der nach 2.12.1.1 hergestellten Extrakte aus den Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* wurden mit einem Bruker Apex III Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) aufgenommen (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Dieses war mit einer Infinity™ Zelle, einem 7,0 Tesla supraleitenden Magneten (Bruker, Karlsruhe, D), einem RF-only hexapole ion guide sowie einer externen Elektrospray-Ionenquelle (ESI, Agilent, off axis spray) ausgerüstet. Stickstoff wurde bei 150°C als Trockengas verwendet. Die Probelösungen wurden kontinuierlich durch einen Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 120 µl/h zugeführt.

Die Daten von 16 Scans wurden jeweils gemittelt und mit Hilfe der Bruker XMASS-Software (Version 7.0.8) ausgewertet.

2.12.2.2 LC-ESI-MS/MS

Die ESI-Massenspektren der nach 2.12.1.1 hergestellten Extrakte aus den Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica* wurden mit einem LCQ DECA XP MAX Massenspektrometer mit Ionenfalle (ThermoFinnigan, San Jose, USA), ausgerüstet mit einer Elektrospray-Ionenquelle (Elektrospray-Spannung 5 kV, Trockengas: Stickstoff, Temperatur der Kapillare: 275°C, Spannung an der Kapillare: 30 V), aufgenommen. Das MS-System war mit einem Acquity UPLC-System, Dioden-Array-Detektor (Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA) und einer Waters Acquity UPLC Säule (BEH C8, 1,7 µm, 1.0 x 100 mm) gekoppelt.

Die Elution startete mit einem Gradienten von 90:10 aus Wasser und Acetonitril (beide Eluenten mit 0,2 % Essigsäure versetzt) für zwei Minuten. Innerhalb der nächsten 13 Minuten wurde auf 0:100

(Wasser : Acetonitril) umgestellt und die isokratische Elution 10 Minuten bei einer Flussrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ beibehalten. Die Säulentemperatur betrug 40°C. MS²-Versuche wurden nach einer Auswahl der gesuchten Ionen bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 35 – 45 % im Positiv-Ionen-Modus (Aktivierungsenergie: 0,250; Aktivierungszeit: 30,0 msec) durchgeführt. Die Isolationsbreite wurde bei 2 Da gesetzt.

Eine Auflistung der Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster der Alkaloide ist im Anhang unter 7.5 zu finden.

3 Ergebnisse – Teil 1: RNAi-induziertes Gen-silencing der Sanguinarinreduktase

3.1 Isogene der Sanguinarinreduktase

Um mit einem RNAi-basierten silencing möglichst alle mRNAs der Sanguinarinreduktase zu erreichen, war zunächst ein Überblick über die in *Eschscholzia californica* für dieses Protein kodierenden Gene erforderlich. Dazu wurden verschiedene Southern Blots angefertigt, um sowohl Sequenzen für das aktive Zentrum als auch für das Insert SEDVIDASFSGPM zu identifizieren. Die Sequenzen der hierzu verwendeten DNA-Sonden sind in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13: Bindestellen der Sonden für die Suche nach Isogenen

Oben: cDNA der Sanguinarinreduktase; unten: dazugehörige Aminosäuresequenz. Die Bindestelle von Sonde 1 ist blau markiert, die für Sonde 2 orange. Die später für das RNAi-basierte silencing ausgewählte Sequenz ist rot unterstrichen.

```

ATGGCAGATTCATCTAAAAAGCTAACTGTTCTTCTTTCTGGAGCTTCTGGATTAACCTGGTTCTCTTGCA
M A D S S K K L T V L L S G A S G L T G S L A
TTCAAGAAATGAAAGAAAGATCAGACAAATTTGAGGTTAGAGGTCTGGTTAGATCAGAAGCAAGTAAA
F K K L K E R S D K F E V R G L V R S E A S K
CAAAAACCTGGTGGAGGAGATGAAATATTCATTGGTGATATTCAGATCCTAAAACCCCTAGAACCAGCT
Q K L G G G D E I F I G D I S D P K T L E P A
ATGGAAGGAATTGATGCTTTGATAATTCTAACAGTGCTATACCTAGGATGAAACCAACTGAGGAATTT
M E G I D A L I I L T S A I P R M K P T E E F
ACTGCTGAAATGATTAGTGGTGGGAAGATCAGAAGATGTGATTGATGCAATCTTTTCAGGTCCAATGCCT
T A E M I S G G R S E D V I D A S F S G P M P
GAATTTTATTATGATGAAGGACAATACCCAGAACAAGTTGATTGGATTGGACAGAAGAATCAAATTGAT
E F Y Y D E G Q Y P E Q V D W I G Q K N Q I D
ACTGCTAAAAAATGGGTGTCAAACATATTTGTTCTTTGGTGGATCTATGGGTGGATGTGACCCGTGATCAC
T A K K M G V K H I V L V G S M G G C D P D H
TTCTTGAATCATATGGGAAATGGAAATATTTTGATTTGGAAGAGAAAGGCTGAACAATATTTGGCTGAT
F L N H M G N G N I L I W K R K A E Q Y L A D
TCTGGAGTCCCATACACTATCATTAGGGCTGGAGGGTTAGATAACAAAGCCGGTGGAGTAAGGGAACCTG
S G V P Y T I I R A G G L D N K A G G V R E L
TTGGTTGCTAAGGATGATGTCTTGCTTCTACTGAAAACGGGTTTCATCGCTAGGGCCGATGTTGCTGAA
L V A K D D V L L P T E N G F I A R A D V A E
GCTTGCCTTCAGGCTTTGGAGATTGAGGAAGTGAAGAACAAGCATTGATTTGGGGTCAAAGCCAGAA
A C V Q A L E I E E V K N K A F D L G S K P E
GGAGTTGGTGAAGCCACAAGGATTTCAGGGCTCTATTTTCTCAAGTTACTACTCCTTTTGA
G V G E A T K D F K A L F S Q V T T P F *

```

Sonde 1

Sonde 2

Sequenz für RNAi

In Tabelle 9 sind die Banden aufgelistet, die mit der jeweiligen Sonde unter Verwendung von jeweils zwei Restriktions-Endonukleasen erhalten wurden.

Dabei konnten jeweils fünf Banden mit Sonde 1, sowie vier Banden mit Sonde 2 detektiert werden.

Da Sonde 1 an einen DNA-Abschnitt bindet, der für das aktive Zentrum der Sanguinarinreduktase kodiert, gibt es wahrscheinlich mindestens fünf Isogene mit ähnlichen Sequenzen in diesem Bereich.

Sonde 2 ist hingegen komplementär zu einem DNA-Abschnitt, der das für die Sanguinarinreduktase typische Insert SEDVIDASFSGPM enthält. Somit besitzen mindestens vier der fünf Isogene dieses spezifische Insert. Es ist durchaus vorstellbar, dass Isogene mit einem der Sanguinarinreduktase ähnlichen aktiven Zentrum existieren, die allerdings kein Insert besitzen, zum Beispiel das bereits vorgestellte Homologon 1XQ6.

Für ein RNAi-basiertes silencing wurde eine Sequenz nahe dem aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase ausgewählt, welche in allen Isogenen vorkommt. Damit sollte das gleichzeitige Ausschalten aller mRNAs der Sanguinarinreduktase erreicht werden (siehe auch Abbildung 13).

Tabelle 9: Ergebnisse der Southern Blots zur Ermittlung der Isogene der Sanguinarinreduktase

Die Durchführung des Southern Blots erfolgte wie unter 2.9.13 beschrieben. In der Tabelle sind die bei der Verwendung der angegebenen Restriktasen und der in Abbildung 13 dargestellten Sonden erhaltenen DNA-Bruchstücke nach ihrer Größe sortiert.

Es handelt sich um ein typisches Resultat, welches vier Mal mit Sonde 1 und zwei Mal mit Sonde 2 bestätigt wurde (Abbildungen siehe auch unter 7.6.1).

	Hind III	Eco RI	Xho I
Sonde 1	10 kbp	6 kbp	
	8 kbp	5 kbp	
	7,5 kbp	4,3 kbp	
	3,5 kbp	3,5 kbp	
	1,7 kbp	2,2 kbp	
Sonde 2		9 kbp	10 kbp
		4,7 kbp	8 kbp
		4,2 kbp	6 kbp
		3,5 kbp	4,8 kbp

3.2 Transformation und Nachweis des silencings des Sanguinarinreduktase-Gens

3.2.1 Auswahl geeigneter Vektoren

Die RNAi-Transformation wurde an Kalluskulturen von *Eschscholzia californica* mit Hilfe des biolistischen Verfahrens durchgeführt (siehe unter 2.9.12).

Unter mehreren getesteten Gateway-Vektoren (pHELLSGATE, pB7GWIWG2 (II), pH7GWIWG2 (II), pK7GWIWG2 (II)) konnte die ausgewählte DNA-Sequenz der Sanguinarinreduktase nur in das Konstrukt pK7GWIWG2 (II) (Universität von Gent) erfolgreich kloniert werden. Der Vektor wurde in diesem Labor ein weiteres Mal mit Erfolg für ein RNAi-induziertes silencing benutzt (Sophie Weigl, unveröffentlicht).

3.2.2 Nachweis des Transformationsereignisses

Die Überprüfung des Transformationserfolges in den selektierbaren *Eschscholzia californica*-Klonen erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Durchführung siehe unter 2.9.3). Dazu wurden zwei DNA-Bereiche amplifiziert, welche jeweils die eingebrachte Sequenz des Sanguinarinreduktase-Gens und zugleich flankierende Regionen des RNAi-Vektors enthielten (siehe Abbildung 14).

Weiterhin wurde versucht, Kontroll-Zell-Linien zu etablieren, um unspezifische Veränderungen durch den Transformationsprozess zu erfassen. Dazu wurden Kalli mit dem unveränderten pK7GWIWG2(II)-Vektor sowie mit einer Variante dieses Vektors ohne die zweifach vorhandenen *ccdB*-Genkopien (welche im destination-Vektor durch die RNAi-Sequenzen ersetzt werden) transformiert. Trotz erfolgtem Einbau des Vektors (Nachweis der flankierenden Region von der Kanamycin-Resistenz bis zum p35S-Promotor mittels PCR) konnte bei gleicher Behandlung kein Wachstum dieser Kalli auf Selektionsmedium verzeichnet werden. Daher wurde der Wildtyp der *Eschscholzia californica*-Zellkultur im Folgenden als Vergleich zu den transformierten Zell-Linien herangezogen.

3.3 Charakterisierung der RNAi-Zellstämme

3.3.1 Übersicht über wesentliche Charakteristika

Die Übersicht in Tabelle 10 vergleicht Sanguinarinreduktase-Aktivität, Kopienzahl des RNAi-Vektors, Menge an verbliebenem Sanguinarinreduktase-Protein, den basalen Alkaloidgehalt sowie die Antworten auf Elicitor zwischen den transgenen Zellstämmen und dem Wildtyp.

Tabelle 10: Übersicht über wesentliche Charakteristika der transformierten Zell-Linien und des Wildtyps

Spezifische Enzymaktivität der Sanguinarinreduktase (Methodik siehe 2.10.7);

Menge an Sanguinarinreduktase-Protein: Western Blotting (siehe 2.10.5, ausführlicher unter 3.3.3);

Kopienzahl des RNAi-Vektors: Southern Blotting (siehe 2.9.13, ausführlichere Beschreibung unter 3.3.4);

basaler Alkaloidgehalt (siehe unter 2.12.1), Übersicht in Abbildung 17.

Name der Zell-Linie	Sanguinarin-reduktase-Aktivität (nkat/mg Protein)	Menge an Sanguinarin-reduktase-Protein	Kopienzahl des RNAi-Vektors	Basaler Alkaloidgehalt (ng/mg Frischmasse)	Alkaloidantwort auf niedrige Elicitor-konzentration (1 µg/ml)	Alkaloidantwort auf hohe Elicitor-konzentration (50 µg/ml)
				a) Dihydroalkaloide b) Benzophen-anthridine		
Wild-typ	8,61 (= 100 %)	100 %	Keine	a) 7,75 b) 3,85	Vorhanden	Vorhanden
JC	0,62 (6,9 %)	5,05 %	3	a) 4,53 b) 0,41	Keine Reaktion	Vorhanden
2d	< 0,02 (0 %)	3,25 %	4	a) 2,99 b) 0,22	Keine Reaktion	Vorhanden
5b	0,31 (3,6 %)	0,15 %	4	a) 2,28 b) 0,24	Keine Reaktion	Vorhanden
1C2_ü	0,52 (6,1 %)	14,91 %	1	a) 13,48 b) 2,40	Im Überschuss	Im Überschuss
2b_ü	1,97 (22,9 %)	29,31 %	1	a) 24,43 b) 5,40	Im Überschuss	Im Überschuss
3C1_ü	1,08 (12,5 %)	22,65 %	1	a) 15,89 b) 5,66	Im Überschuss	Im Überschuss

Während drei der Zellstämme nur jeweils eine Kopie des RNAi-Vektors enthalten, wurden bei den anderen drei bis vier Kopien ins Genom eingebaut. Letzteres führte zu einem stärkeren silencing-Effekt des Sanguinarinreduktase-Genes und korreliert mit deutlichen Unterschieden im Alkaloidgehalt und der Elicitierbarkeit. Diese in Tabelle 10 zusammengestellten Parameter lassen überraschenderweise die Zugehörigkeit jedes Zellstammes zu einer von zwei Gruppen erkennen:

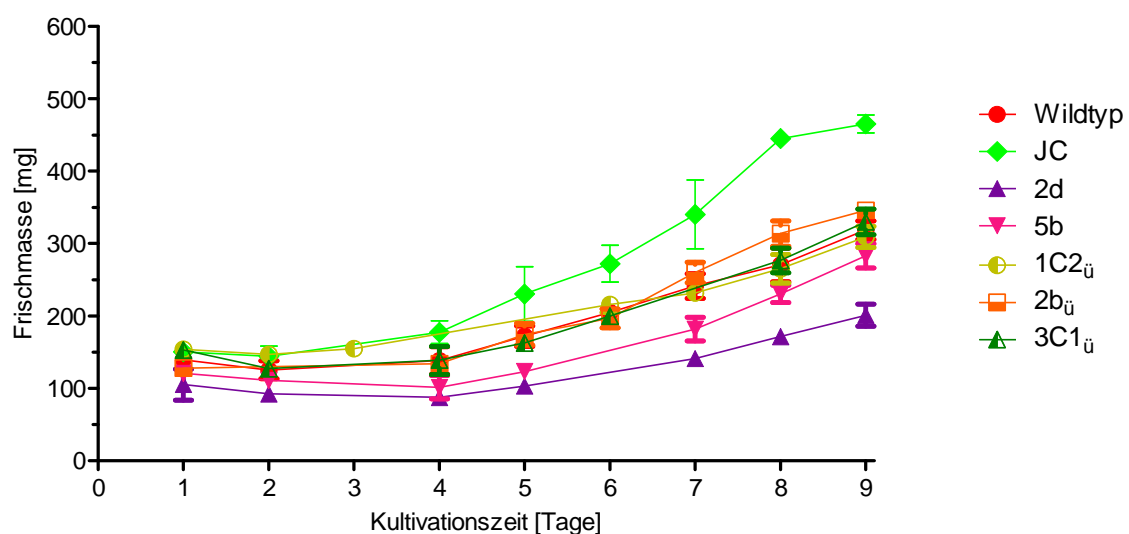
- Gruppe 1 (nicht elicitierbar): Zell-Linien JC, 2d, 5b;
- Gruppe 2 (hyper-elicitierbar): Zell-Linien 1C2_ü, 2b_ü, 3C1_ü.

3.3.2 Wachstum der Zell-Linien

Die Wachstumsraten der ausgewählten transformierten Zell-Linien unterscheiden sich nicht wesentlich vom Wildtyp. Bei dem in Abbildung 15 dargestellten Experiment wurde aus versuchstechnischen Gründen mit unterschiedlichen Zellmengen gestartet. Dennoch zeigen alle Kulturen nach Ablauf der lag-Phase eine Verdopplung der Frischmasse in 3,5 – 4 Tagen. Die relativ größten Unterschiede bestehen zwischen den Zell-Linien 2d und JC, die aber hinsichtlich aller anderen Untersuchungskriterien derselben Gruppe angehören. Dies zeigt, dass durch die Transformation mit dem RNAi-Konstrukt keine essentiellen, für das Wachstum limitierenden Prozesse des Grundstoffwechsels und des Zellzyklus' getroffen wurden und die Veränderungen im Alkaloidstoffwechsel nicht mit dem Wachstum korrelieren.

Abbildung 15: Wachstumskurven der Suspensionskulturen der transformierten Zell-Linien und des Wildtyps

Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Frischmasse (n=3).



3.3.3 Gehalt an Sanguinarinreduktase-Protein

Die verbliebene Menge des Sanguinarinreduktase-Proteins wurde nach SDS-PAGE der aus den Suspensionskulturen gewonnenen Extrakte der löslichen Proteine mittels Western Blotting nachgewiesen (siehe 2.10.5). Dazu diente ein spezifisches anti-Sanguinarinreduktase-Antiserum, welches die Detektion dieses Proteins ohne wesentliche Kreuzreaktivität mit dem inaktiven Homologen 1XQ6 ermöglicht, vermutlich aufgrund des Erkennens des für die Sanguinarinreduktase spezifischen Inserts SEDVIDASFGPM (Vogel et al., 2010).

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, ist die vorhandene Proteinmenge an Sanguinarinreduktase in den transformierten Zell-Linien deutlich verringert.

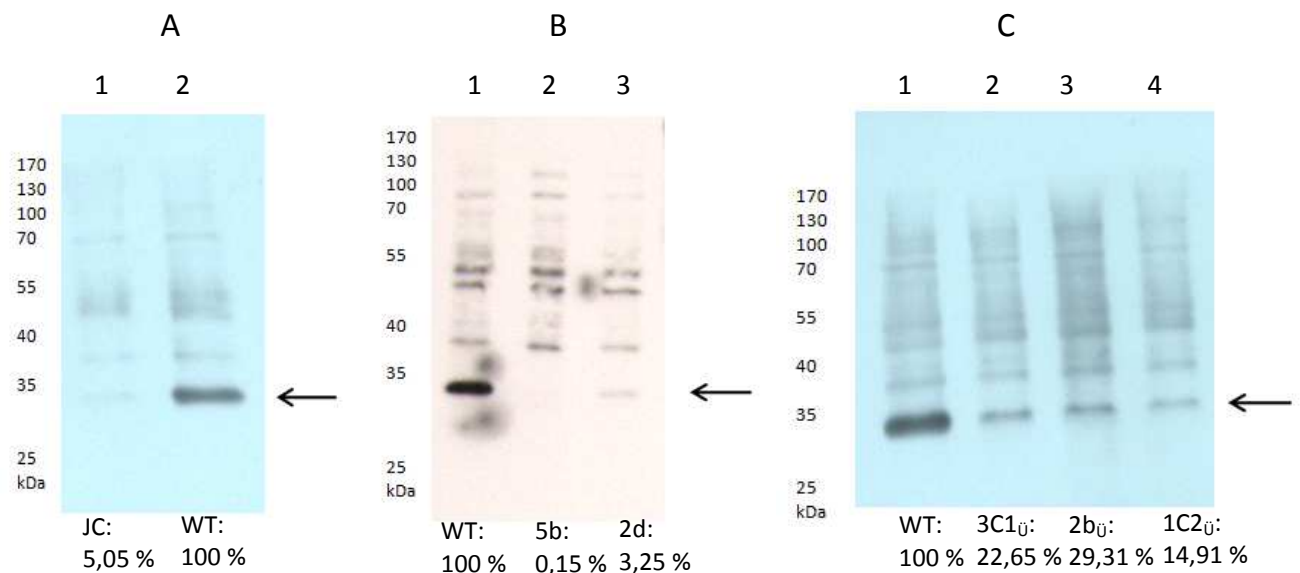
Abbildung 16: Western Blot zur Detektion des Sanguinarinreduktase-Proteins

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine (5 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (siehe 2.10.5.1-2.10.5.3). Die so erhaltenen Blots wurden computergestützt ausgewertet und die Proteinbanden quantifiziert (bezogen auf den Wildtyp, nach 2.10.5.4). Der Pfeil an der rechten Seite markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei circa 34 kDa. Links sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Blot A: Spur 1 – JC; Spur 2 – Wildtyp;

Blot B: Spur 1 – Wildtyp; Spur 2 – 5b; Spur 3: 2d.

Blot C: Spur 1 – Wildtyp; Spur 2 – 3C1_Ü; Spur 3 – 2b_Ü; Spur 4 – 1C2_Ü.



3.3.4 Kopienzahl des Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektors

Mit Hilfe von Southern Blotting (wie unter 2.9.13 beschrieben) sollte die Kopienzahl des Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektors im Genom der transformierten Zell-Linien bestimmt werden. Um eine Verwechslung mit der Sequenz der genuine Sanguinarinreduktase auszuschließen, wurde eine Sonde von 350 bp gewählt, die einen Bereich der Kanamycin-Resistenz des Vektors nachweist (anti-

pK7-Sonde). Sie wurde mit Hilfe der Primer pK7 Kan for sowie pK7 Kan rev (siehe Primerliste unter 2.3) amplifiziert.

Wie in Tabelle 11 ersichtlich, wurde dieser Abschnitt des Vektors in den transformierten Zell-Linien JC, 2d und 5b drei bis vier Mal gefunden, während nur jeweils eine Kopie in den Zell-Linien 1C2_ü, 2b_ü und 3C1_ü detektiert wurde. Erwartungsgemäß ließ sich in der genomischen DNA des Wildtyps keine Kopie des Vektors nachweisen.

Hieraus ergibt sich die Einteilung der transformierten Zell-Linien in eine Gruppe mit niedriger und eine Gruppe mit hoher Kopienzahl des Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektors. Da sich beide Gruppen auch im Alkaloidgehalt und in ihrer Alkaloid-Antwort grundlegend unterscheiden, werden sie im Folgenden getrennt voneinander behandelt.

Tabelle 11: Detektierte Banden nach Southern Blot mit anti-pK7-Sonde

Die Durchführung des Southern Blots mit der anti-pK7-Sonde erfolgte wie unter 2.9.13 beschrieben, als Restriktase wurde Hind III verwendet. In der Tabelle sind die detektierten Banden bei den einzelnen Zell-Linien aufgeführt. Der Wildtyp wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Eine Abbildung des Southern Blots findet sich im Anhang unter 7.6.2. Es wird ein typisches Ergebnis dargestellt, welches durch eine Wiederholung bestätigt wurde.

	JC	2d	5b	1C2 _ü	2b _ü	3C1 _ü	Wildtyp
Banden	8 kbp 4 kbp 2,5 kbp	8 kbp 3,8 kbp 2,5 kbp 2 kbp	9 kbp 4,5 kbp 3 kbp 2 kbp	9 kbp	8 kbp	9 kbp	-

3.3.5 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Basaler Alkaloidgehalt

Als Ausgangspunkt zur Charakterisierung des Alkaloidstoffwechsels wurde das Benzophenanthridin-Muster im nicht-stimulierten Zustand untersucht. Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, unterstreichen die Gesamtgehalte die Zuordnung der transgenen Zellstämme zu Gruppe 1 (Gehalt geringer als im Wildtyp) oder Gruppe 2 (Gehalt deutlich höher als im Wildtyp).

Die transgenen Zell-Linien enthalten ein ähnliches Dihydroalkaloid-Muster wie der Wildtyp, die überproduzierenden Stämme weisen aber zusätzlich die quaternären Endprodukte 10-Hydroxysanguinarin, Chelirubin und/oder Macarpin auf. Das beim silencing der Expression der Sanguinarinreduktase erreichte Niveau korreliert also sehr deutlich mit dem Umfang und dem Alkaloidmuster der nicht-stimulierten Benzophenanthridin-Biosynthese.

Dabei stellte sich die Frage, ob diese Veränderungen bereits auf der Stufe früherer Intermediate, d.h. vor der Bildung des Benzophenanthridin-Grundgerüsts, auftreten. Da für die meisten dieser Verbindungen Reinsubstanzen und genaue spektrale Daten nicht zugänglich waren, wurden diese Analysen mit Hilfe massenspektrometrischer Detektion (ESI-FT-ICR-MS bzw. ESI-MS/MS, siehe unter

2.12.2) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die steady state-Gehalte der vor den Benzophenanthridinen gebildeten Alkaloide fast völlig von Protopin und dessen unmittelbarem Vorläufer N-Methylstylopin dominiert werden. In Abbildung 18 sind diese Metabolite für den Wildtyp und jeweils einen Vertreter beider Gruppen der Transformanten dargestellt.

Im Wildtyp akkumuliert im Wesentlichen Protopin, in der hyper-elicitierbaren Zell-Linie 3C1₀ hauptsächlich N-Methylstylopin, und zwar jeweils in gleichem Umfang. Dagegen sind in dem nicht-elicitierbaren Zellstamm JC beide Metabolite auf deutlich geringerem Niveau vorhanden. In letztgenannter Zell-Linie wurde auch eine erhebliche Menge des sehr frühen Intermediates 4'-O-Methyl-N-methylcoclaurin gefunden. Sehr wahrscheinlich existiert in der Umgebung von Protopin ein zellulärer Präkursor-Pool erheblichen Ausmaßes, der den Fluss in die Benzophenanthridin-Biosynthese kontrolliert. In den nicht-elicitierbaren Zell-Linien wird dieser Pool deutlich geringer aufgefüllt als im Wildtyp.

In dieses Bild passt auch die Akkumulation einer weiteren Verbindung, die vermutlich alternativ zum Protopin gebildet wird und zu N-Methylstylopin homolog ist. Diese ist wahrscheinlich als N-Methylsinactin zu bezeichnen, kann aber wegen der geringen Fragmentierung über MS-Daten nicht eindeutig identifiziert werden (Formeln siehe in Abbildung 39). Diese Verbindung akkumuliert in beiden Gruppen, besonders aber in den nicht-elicitierbaren Zellstämmen (ausführlicher unter 3.5.2.2).

Abbildung 17: Basaler Alkaloidgehalt der untersuchten Zell-Linien

Vier Tage nach Umsetzen der Zellen in eine Nährlösung ohne Phosphat (Zelldichte: 50 mg/ml) wurden die Alkaloide extrahiert, mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Es ist ein typisches Experiment dargestellt, mehrere Wiederholungen ergaben ähnliche Daten (FM – Frischmasse).

Legende:

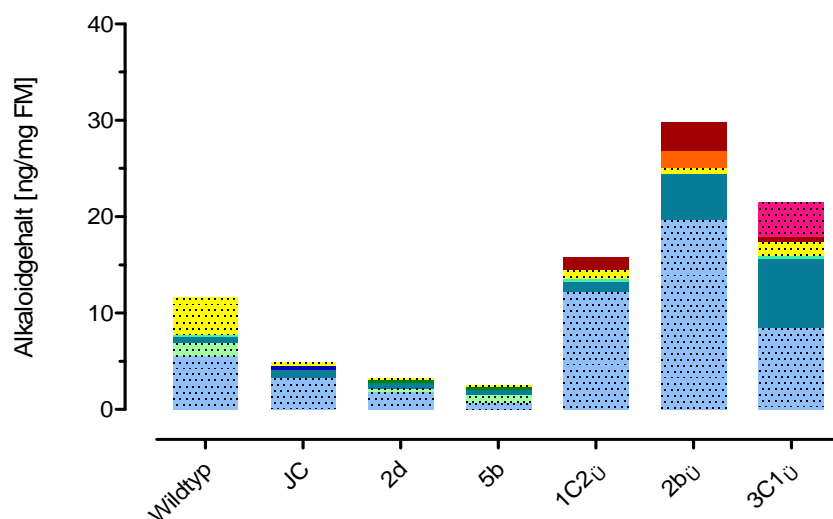
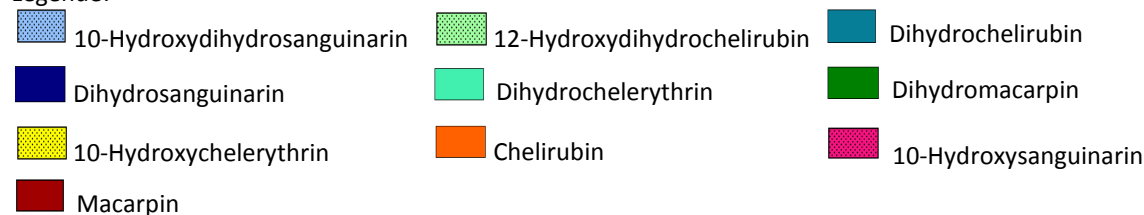
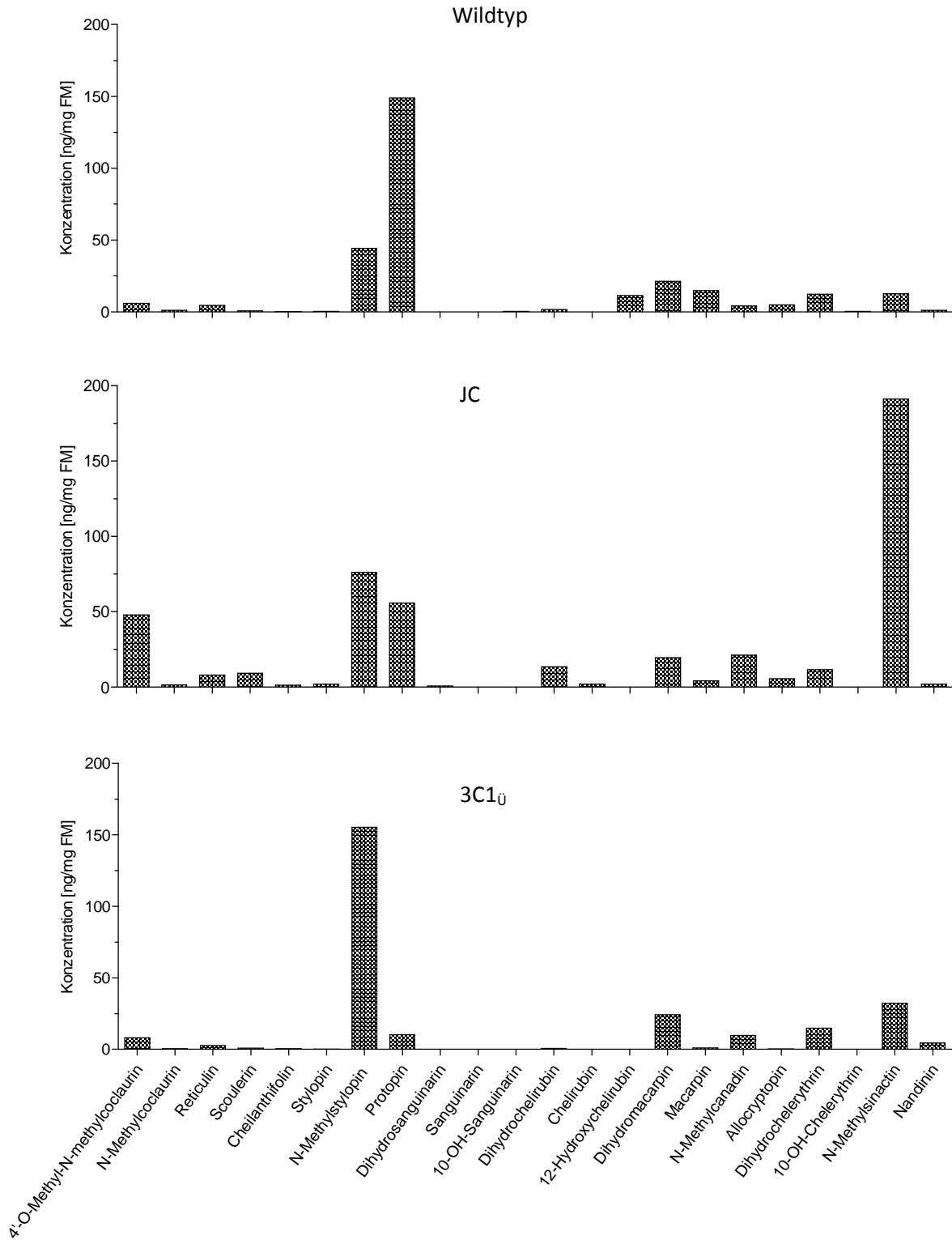


Abbildung 18: Alkaloidmuster von Wildtyp, JC und 3C1_Ü im basalen Zustand (MS-Messung)

Es wurden Proben von sieben Tage alten Zellen des Wildtyps und der transgenen Zellstämme JC und 3C1_Ü genommen, wie unter 2.12.1.1 beschrieben aufgearbeitet und die Alkaloidgehalte nach UPLC-Trennung mittels ESI-FT-ICR-MS bzw. ESI-MS/MS (siehe 2.12.2) bestimmt.

Dargestellt ist der Alkaloidgehalt des Grundzustands der einzelnen Zell-Linien. Gezeigt ist ein typisches Experiment.



3.3.6 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Gruppe I: Zell-Linien JC, 2d und 5b

3.3.6.1 Alkaloidmetabolismus nach Sanguinarinzugabe

A Reaktion auf einmalige Sanguinarinzugabe

Wie in der Einleitung unter 1.1.4 und 1.3 beschrieben, benötigen die Zellen von *Eschscholzia californica* die Sanguinarinreduktase zur Reduktion toxischer Benzophenanthridinalkaloide. Die dabei gebildeten Dihydroalkaloide sind zugleich auch Intermediate der Biosynthese.

Da die transformierten Zell-Linien eine geringere Menge des Proteins und der Aktivität der Sanguinarinreduktase aufweisen, sollte mit dem folgenden Experiment überprüft werden, welche Konsequenzen sich daraus für die Umsetzung von extern appliziertem Sanguinarin ergeben.

Die Analyse der Alkaloidspektren mittels HPLC (siehe Abbildung 19) ergab einen deutlich verlangsamten Abbau des zugesetzten Sanguinarins in den transgenen Zell-Linien. So ist es vier Stunden nach Zugabe in Zell-Linie JC noch nachweisbar, währenddessen im Wildtyp bereits nach zwei Stunden kein Sanguinarin mehr gefunden werden konnte. Das fehlende Sanguinarin wird jedoch meist nicht durch eine entsprechende Menge an Dihydroalkaloiden und hier erfassten Folgeprodukten ersetzt, sodass die gemessene Summe der Alkaloidgehalte in der Zellsuspension abfällt. Dies deutet darauf hin, dass aus Sanguinarin neben und nach dem Dihydrosanguinarin weitere, bisher nicht in der HPLC erfassbare Verbindungen entstehen.

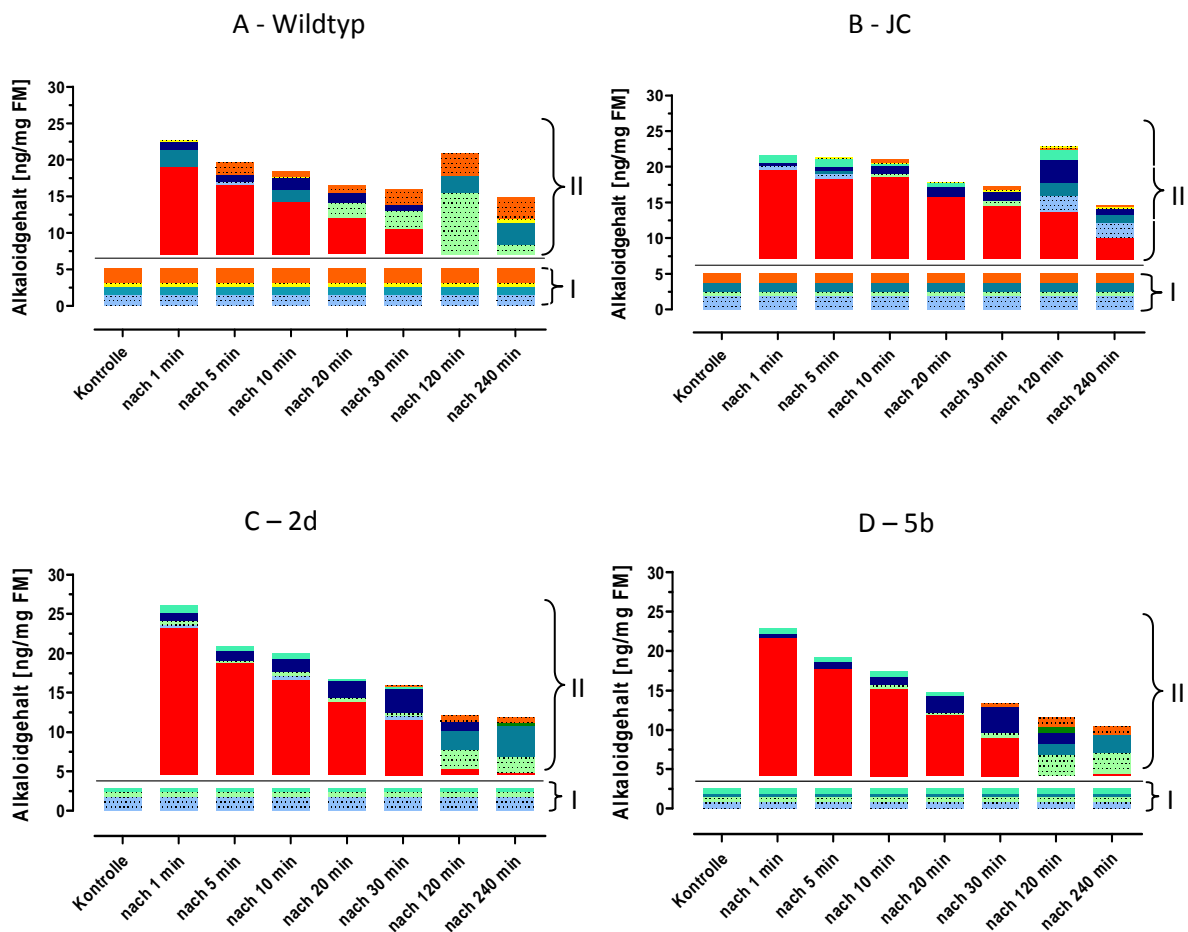
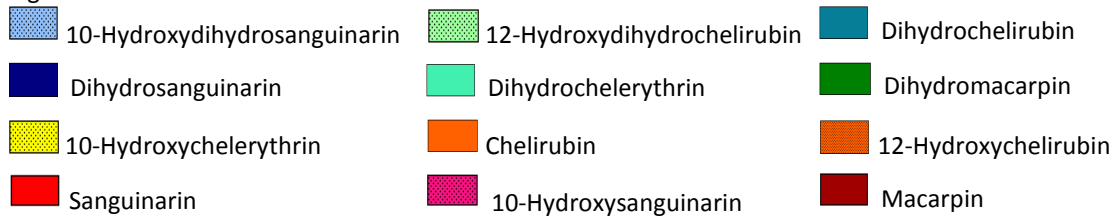
Außerdem zeigen die transgenen Zell-Linien, insbesondere 2d und 5b, bei längerer Inkubation eine dem Wildtyp vergleichbare Bildung von Dihydroalkaloiden, was auf eine noch erhebliche Reduktionsfähigkeit hinweist.

Um die Konsequenzen aus den Aktivitätsunterschieden der Sanguinarinreduktase deutlicher zu erkennen, wurden daher Experimente mit wiederholtem Sanguinarinzusatz unternommen (siehe unter Abschnitt B).

Abbildung 19: Alkaloidmuster der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach einmaliger Sanguinarinzugabe – Verlauf über vier Stunden

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Sanguinarinzugabe (Endkonzentration 10 µM) wurden Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind der genuin produzierte Alkaloidgehalt (I), sowie die nach Sanguinarinzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse (z.B. Abbildung A: Sanguinarin nach 1 min: (19 – 7) ng/mg FM = 12 ng/mg FM). Dargestellt ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:



B Reaktion auf wiederholten Zusatz von Sanguinarin

Im nächsten Schritt wurde den Zellkulturen wiederholt Sanguinarin zugesetzt. Dies sollte in etwa die kontinuierliche Produktion von Benzophenanthridinen in einer elicitierten Kultur nachahmen.

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, wird Sanguinarin auch bei wiederholter Zugabe über einen mehrtägigen Zeitraum vollständig metabolisiert (abgesehen von kleinen Restmengen in Zell-Linie JC).

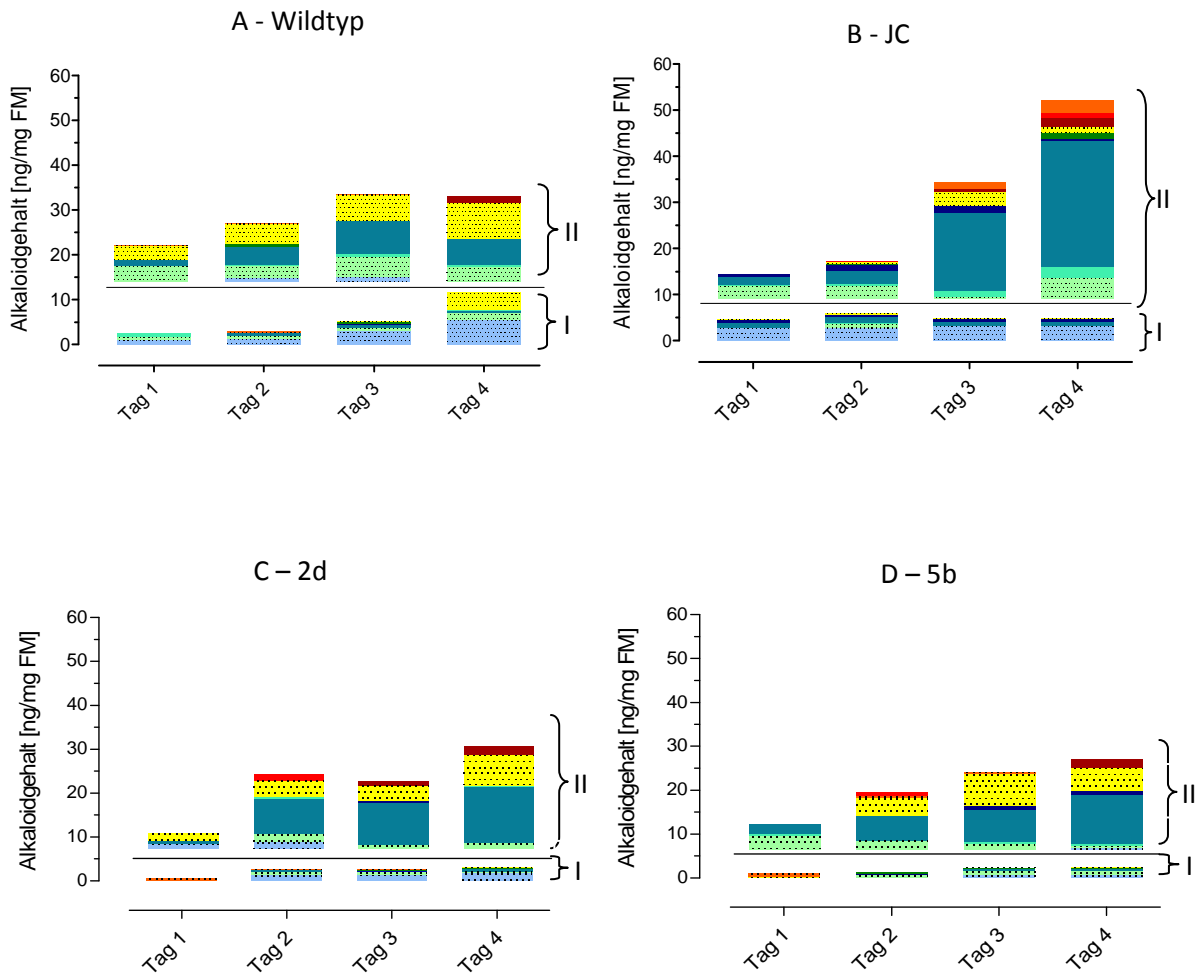
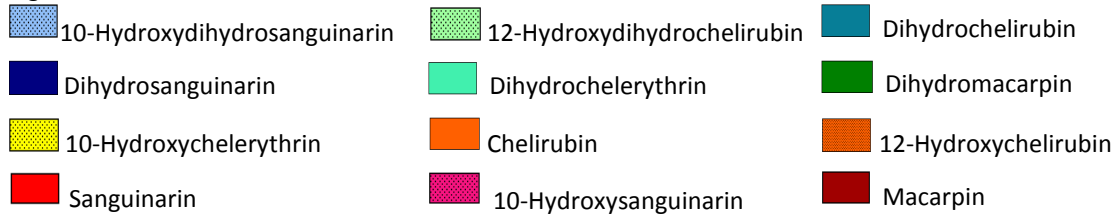
Im Wildtyp akkumuliert nicht das zuerst entstehende Dihydrosanguinarin, sondern dessen Metabolite Dihydrochelirubin und sein 12-Hydroxy-Derivat. In den transgenen Zellstämmen ist Dihydrosanguinarin oft nachweisbar, wenn auch in sehr geringen Gehalten. Die Hauptmenge des aufgenommenen Sanguinarins wird dort in Dihydrochelirubin umgewandelt. Dieser Vorgang führt in Zell-Linie JC zu einem erhöhten Gehalt an Gesamtalkaloiden. Offenbar beschleunigt das Fehlen der Sanguinarinreduktase die Bildung dieses Intermediats und/oder hemmt dessen Metabolisierung.

Sowohl im Wildtyp als auch in den transgenen Zellstämmen akkumuliert 10-Hydroxychelerythrin, das, wie bisher angenommen, auf einem zu Sanguinarin alternativen Biosyntheseweg aus dem gemeinsamen Präkursor Scoulerin entsteht (siehe Abbildung 39). In den hier vorgestellten Experimenten wird es jedoch nicht nur in unbehandelten Kulturen (zum Beispiel Wildtyp, Tag 4) oder nach Elicitierung neu gebildet (siehe unter 3.3.6.2 und 3.3.7.2), sondern entsteht auch aus dem zugesetzten Sanguinarin oder dessen Metaboliten. Dies spricht für die Anwesenheit eines Enzyms, welches die Öffnung eines Dioxolan-Ringes am Benzophenanthridin-Grundgerüst katalysiert. Diese Reaktion wird durch das silencing der Sanguinarinreduktase wenig beeinflusst, wie der unveränderte steady state-Gehalt dieser Verbindung in zwei von drei transgenen Zellstämmen andeutet.

Abbildung 20: Alkaloidmuster der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach periodischer Sanguinarinzugabe

Den jeweiligen Zellsuspensionen wurde im Abstand von 24 Stunden Sanguinarin zu einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt. Vier Stunden nach jeder Zugabe wurden Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind die Alkaloidgehalte der jeweils unbehandelten Parallelkultur (I), sowie die nach Sanguinarinzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:



3.3.6.2 Alkaloid-Antworten auf Elicitorzugabe

Wie bereits in der Einleitung unter 1.2.2 beschrieben, reagieren die Zellen des Wildtyps von *Eschscholzia californica* auf einen Glykoprotein-Elicitor aus Hefezellen (im Folgenden als „Hefeelicitor“ bezeichnet) mit der Überproduktion von Benzophenanthridinen und Dihydroalkaloiden (Gundlach et al., 1992; Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2002).

Bei der Untersuchung der transgenen Zellstämme stellte sich nun die Frage, ob die Zellen trotz drastisch verminderter Expression der Sanguinarinreduktase und damit reduzierter Fähigkeit zur Entgiftung der Benzophenanthridine weiterhin zur Überproduktion dieser Alkaloide in der Lage sind.

Abbildung 21 zeigt die Alkaloidgehalte, die 48 Stunden nach Elicitorzugabe gemessen wurden.

Besonders bemerkenswert ist, dass nach Zusatz der geringen Elicitormenge keine der transformierten Zell-Linien dieser Gruppe Benzophenanthridine oder ihre vorausgehenden Dihydroalkaloide produziert. Diese Aussage wurde durch HPLC-Messungen von Zellextrakten bestätigt. Es wurden dabei nur Spuren von Alkaloiden, insbesondere Dihydrobenzophenanthridinen, nachgewiesen.

Erhöhte man die Elicitorkonzentration um das 50-fache, so produzierten die transgenen Zell-Linien messbare Mengen an Dihydroalkaloiden, während Benzophenanthridine nicht nachweisbar waren. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass deren Gehalt unter der Nachweisgrenze des Verfahrens lag, da jeweils nur etwa 20 % der Dihydroalkaloide, die quantitativ den größten Teil der Alkaloid-Antwort ausmachen, in die finalen Benzophenanthridine umgewandelt werden. Im Vergleich dazu zeigt der Wildtyp die typischen Alkaloidgehalte und deren Anstieg nach Elicitorkontakt.

Die Fähigkeit der transgenen Zellkulturen zu einer messbaren Produktion von Alkaloiden nach Kontakt mit hohen Elicitorkonzentrationen ist bemerkenswert, weil damit gezeigt wird, dass die fehlende Reaktion auf niedrige Elicitorkonzentrationen nicht auf einer Blockade der Biosynthese (etwa dem Ausfall eines Enzyms) beruht. Sie spricht eher für eine selektive Blockade des Δ pH-LPC-Signalwegs. Hohe Elicitorkonzentrationen können zusätzlich den Jasmonat-Weg aktivieren (siehe auch unter 1.2.2). Da dieser Signalweg offenbar nicht (völlig) ausgeschaltet ist, konnte untersucht werden, ob das Fehlen der Sanguinarinreduktase Verschiebungen im Alkaloidspektrum zur Folge hat. In Abbildung 22 ist das Alkaloidmuster, welches nach Zugabe von 50 μ g/ml Elicitor mit Hilfe der HPLC erhalten wurde, dargestellt.

Beim Wildtyp ist die erwartete Zunahme der Benzophenanthridine zu erkennen, welche vornehmlich auf 10-Hydroxychelerythrin, 10-Hydroxysanguinarin sowie Macarpin beruht. Die transformierten Zell-Linien bildeten nach Zugabe des Elicitors nur maximal 10 % der Alkaloidmenge des Wildtyps. In Zell-Linie JC konnte dabei hauptsächlich Dihydrochelirubin und 10-Hydroxychelerythrin nachgewiesen werden, die Zell-Linien 2d und 5b wiesen dazu noch Spuren an Benzophenanthridinen, wie 10-Hydroxysanguinarin, auf. Offenbar ist in den transgenen Zellstämmen die Biosynthese noch möglich, aber deutlich verlangsamt. Insbesondere ist die Bildung der oxidierten Alkaloide, d.h. der

Benzophenanthridine, aus ihren Vorläufern, den Dihydroalkaloiden, vermindert. Auf die Rolle der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase, welche diesen Prozess katalysiert, wird später noch eingegangen (siehe unter 3.4.5).

Aus physiologischer Sicht ist die verringerte Bildung der zytotoxischen Benzophenanthridine eine sinnvolle Anpassung an die verminderte Kapazität zur Reduktion dieser Alkaloide. Damit bietet sich auch eine Erklärung für die wenig veränderte Lebensfähigkeit und Wachstumsrate der transgenen Zell-Linien.

Abbildung 21: Alkaloidgehalte 48 Stunden nach Elicitorzugabe – Zell-Linien JC, 2d und 5b

Dargestellt sind in

A - die Gehalte an Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden,

B - die Gehalte an Benzophenanthridinalkaloiden,

die 48 Stunden nach Zugabe des Hefeelicitors wie unter 2.11.3 beschrieben, gemessen wurden. Dabei sind in der jeweiligen Abbildung links die Gehalte nach niedriger Elicitorkonzentration (E1 entspricht 1 µg/ml), und rechts die Mengen nach hohen Elicitorkonzentrationen (E50 entspricht 50 µg/ml) abgebildet. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten zu je fünf Messwerten. Entsprechende Kontrollen ohne Elicitorzusatz wurden mitgeführt, daraus erhaltene Messwerte (Basalproduktion) wurden von den Messwerten nach Elicitierung abgezogen. Die aus den Fluoreszenzen ermittelten Konzentrationen wurden nach Kalibrierung entweder als Dihydroanguinarin oder Sanguinarin berechnet (siehe unter 2.11.6). Die negativen Alkaloidgehalte ergeben sich durch den Abzug der Basalproduktion, der in diesem Fall größer als die Produktion nach Elicitierung war.

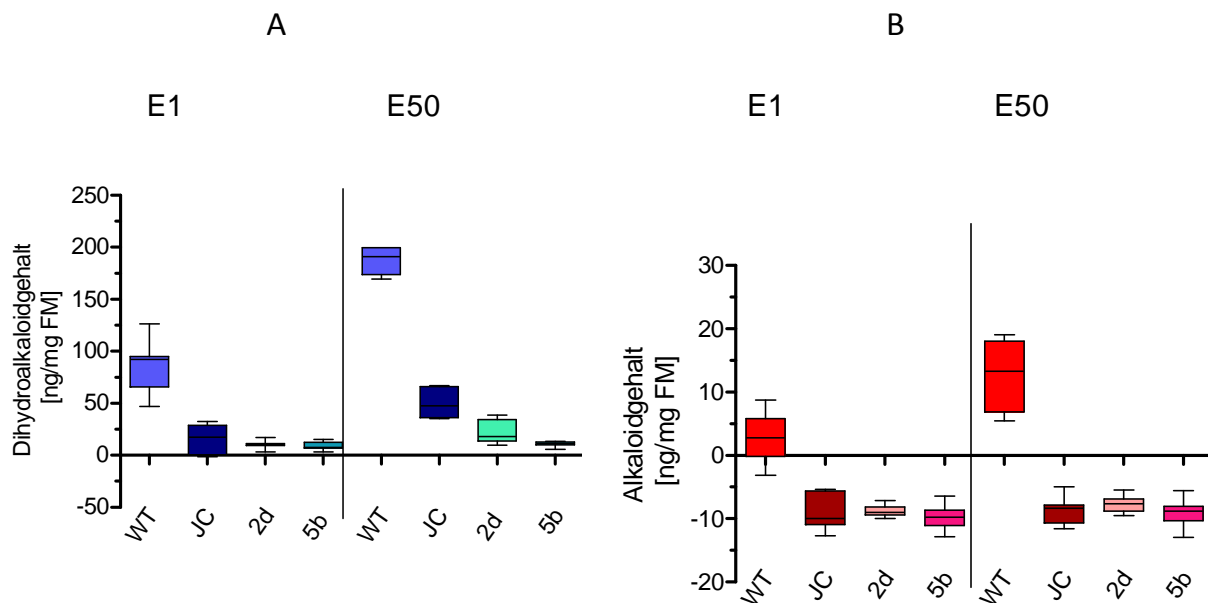
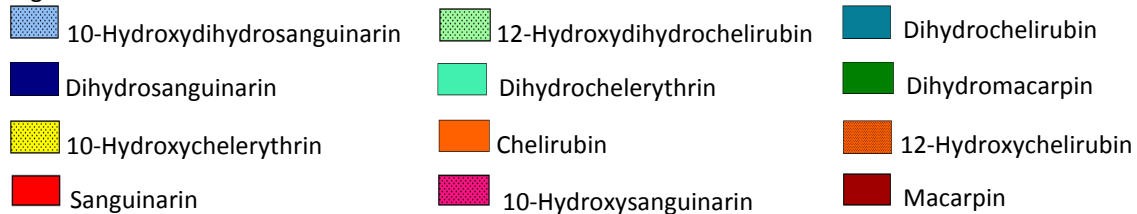


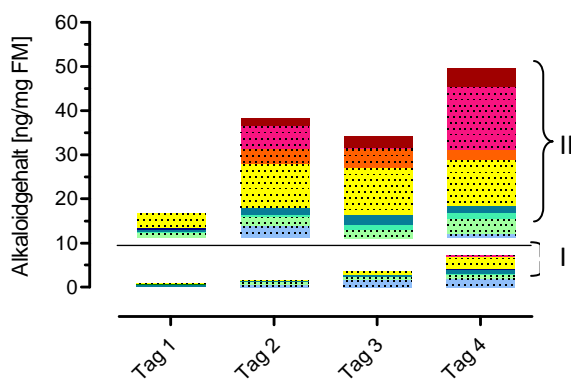
Abbildung 22: Alkaloidspektrum der Zell-Linien JC, 2d, 5b und des Wildtyps nach Elicitorzugabe (50 µg/ml)

Nach Elicitierung (50 µg/ml) wurden täglich Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind die Alkaloidgehalte der jeweils nicht elicitierten Parallelkultur (I), sowie die nach Elicitierung gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde. Es ist auf eine unterschiedliche Skalierung der y-Achse zu achten.

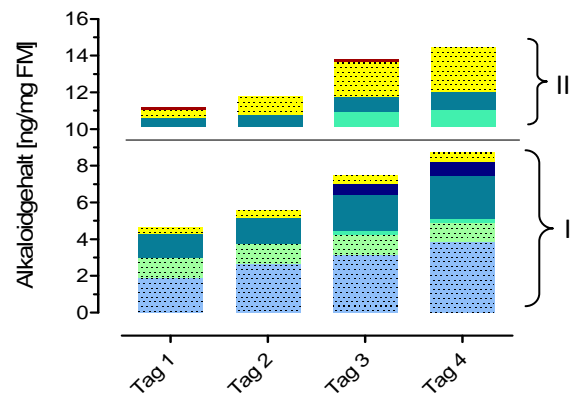
Legende:



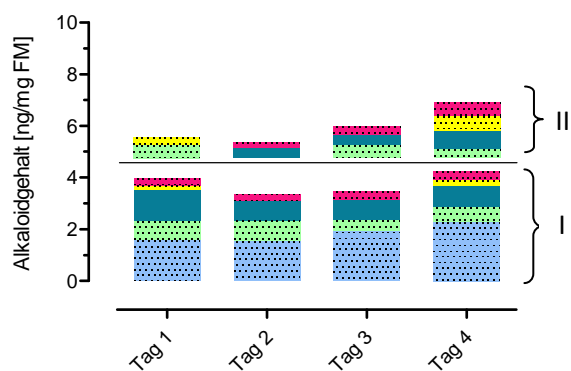
A - Wildtyp



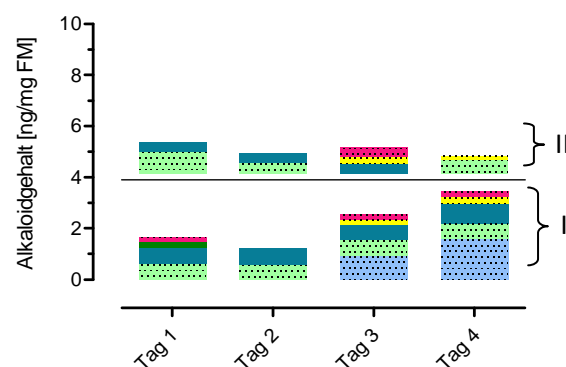
B - JC



C - 2d



D - 5b



3.3.7 Alkaloidmetabolismus und Alkaloid-Antworten – Gruppe II: Zell-Linien 1C2_Ü, 2b_Ü und 3C1_Ü

3.3.7.1 Alkaloidmetabolismus nach Sanguinarinzugabe

A Reaktion auf einmalige Sanguinarinzugabe

Die folgenden Untersuchungen wurden mit Zellstamm 1C2_Ü durchgeführt, der sich als repräsentativ für die Zell-Linien der Gruppe 2 (1C2_Ü, 2b_Ü und 3C1_Ü) erwiesen hatte.

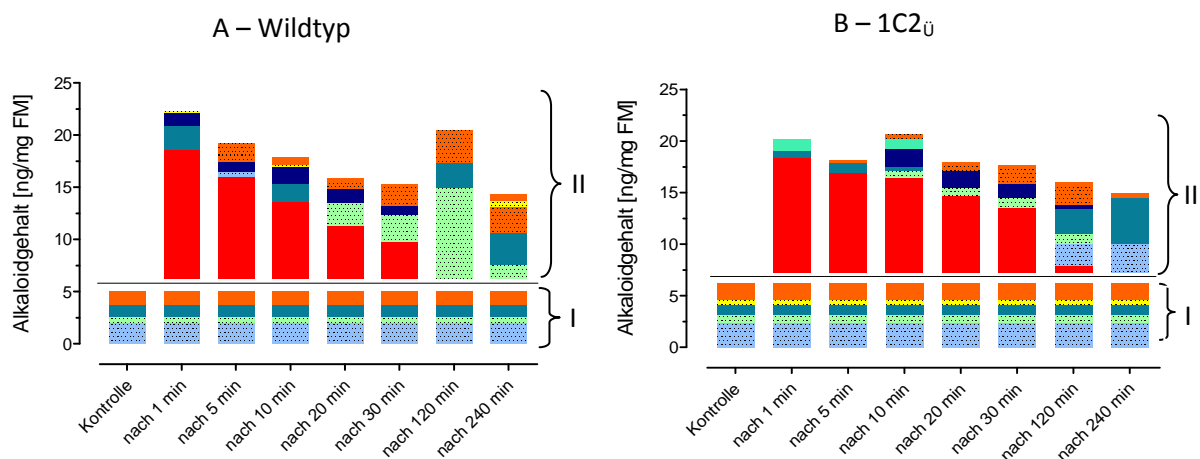
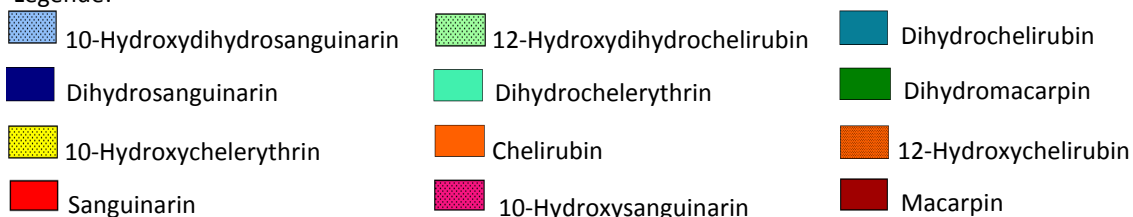
In Abbildung 23 ist der verlangsamte Abbau des extern zugegebenen Sanguinarins durch den transgenen Zellstamm deutlich erkennbar. Auffällig sind weiterhin das spätere Auftauchen des Dihydrosanguinarins sowie die verstärkte Akkumulation von Dihydrochelirubin, welches sich im Wildtyp offenbar stärker als 12-Hydroxyderivat anreichert.

Offenbar findet auch in der zweiten Gruppe der transgenen Zell-Linien neben der verlangsamten Bildung von Dihydroalkaloiden eine reduzierte Metabolisierung der späten Alkaloide statt (vgl. auch Abbildung 19 unter 3.3.6.1 A).

Abbildung 23: Alkaloidmuster der Zell-Linie 1C2_Ü und des Wildtyps nach einmaliger Sanguinarinzugabe – Verlauf über 4 Stunden

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Sanguinarinzugabe (Endkonzentration 10 µM) wurden Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind der Alkaloidgehalt der jeweils unbehandelten Parallelkultur (I), sowie die nach Sanguinarinzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:



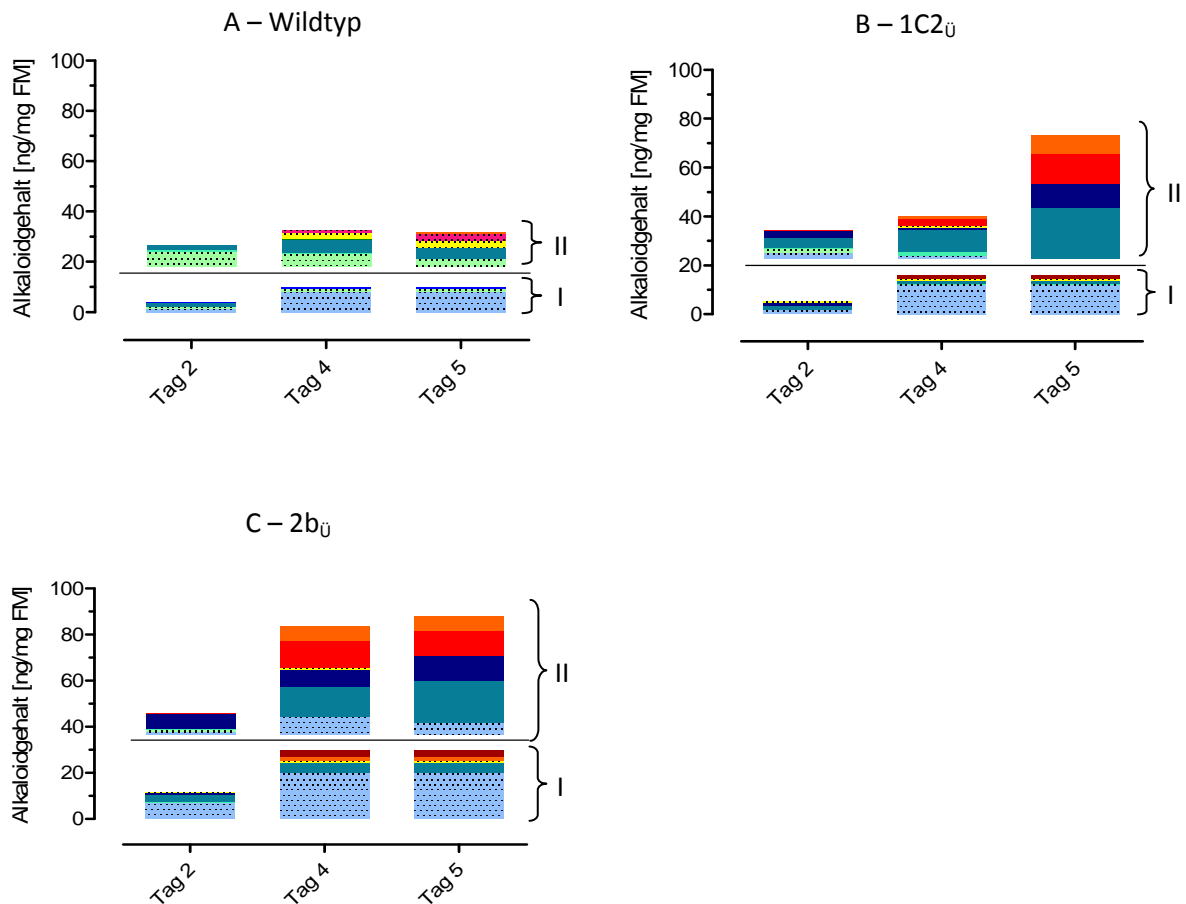
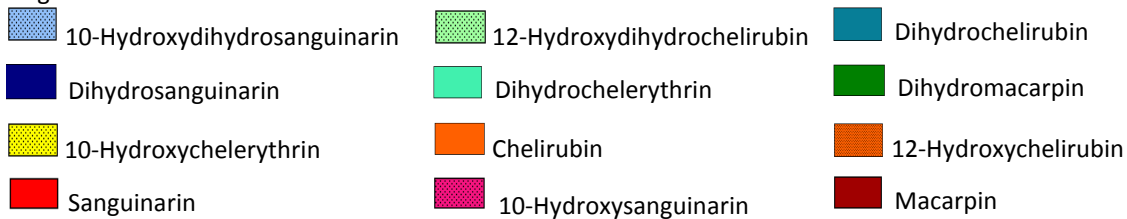
B Reaktion auf wiederholten Zusatz von Sanguinarin

Um die Entgiftungskapazität der Zellen der transgenen Zellstämme der Gruppe II weiter zu testen, wurde täglich Sanguinarin zugesetzt (siehe Abbildung 24; vgl. Gruppe I unter 3.3.6.1 B).

Abbildung 24: Alkaloidmuster der Zell-Linien 1C2_Ü, 2b_Ü und des Wildtyps nach periodischer Sanguinarinzugabe

Den jeweiligen Zellsuspensionen wurde im Abstand von 24 Stunden Sanguinarin zu einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt. Vier Stunden nach jeder Zugabe wurden Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind die Alkaloidgehalte der jeweils unbehandelten Parallelkultur (I), sowie die nach Sanguinarinzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:



Die Zell-Linien der Gruppe 2 bilden bei wiederholtem Zusatz von Sanguinarin eine ähnliche Menge Dihydrochelirubin, das aber hier teilweise zu Chelirubin oxidiert wird. Sowohl die Fähigkeit zur Reduktion des Sanguinarins als auch der Metabolisierung des Dihydrosanguinarins stoßen hier an ihre Grenzen, wie aus der Anwesenheit von nicht umgesetztem Sanguinarin und Dihydrosanguinarin hervorgeht. Auch in dieser Gruppe von transgenen Zellstämmen bleibt die Umwandlung von zugesetztem Sanguinarin auf der Stufe des Dihydrochelirubins bzw. Chelirubins stehen, obwohl das Endprodukt der Biosynthesekette, Macarpin, prinzipiell gebildet werden kann, wie die nicht elicierten Kulturen zeigen. Im Unterschied zu den Zell-Linien aus Gruppe 1 ist die, auch im Wildtyp nachgewiesene, Bildung von 10-Hydroxychelerythrin aus dem zugegebenen Sanguinarin kaum oder nicht sichtbar.

Da in beiden Gruppen nach periodischer Sanguinarinzugabe große Mengen an Dihydrochelirubin akkumulieren, ist eine Hemmung der nachfolgenden Biosynthese-Schritte in allen transgenen Zellstämmen sehr wahrscheinlich.

3.3.7.2 Alkaloidantworten auf Elicitorzugabe

Zur Überprüfung der Elicitierbarkeit der Zell-Linien 1C2₀, 2b₀ und 3C1₀ wurden diese mit einem Hefe-Elicitor versetzt (vgl. auch 3.3.6.2).

Als Antwort auf niedrige Elicitor-Konzentrationen (1 µg/ml) wurden in den transformierten Zellstämmen deutlich höhere Mengen an Dihydrobenzophenanthridinen als im Wildtyp produziert (Abbildung 25 A). Der Gehalt an neu gebildeten Benzophenanthridinalkaloiden unterschied sich hingegen nicht wesentlich (Abbildung 25 B).

Unter Verwendung der hohen Elicitor-Konzentration (50 µg/ml) wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (Abbildung 25 A), wobei in zwei von drei Zell-Linien auch ein erhöhter Gehalt an Benzophenanthridinen auftrat (Abbildung 25 B).

Beim Vergleich der Alkaloidmuster (siehe Abbildung 26) wird deutlich, dass die Biosynthese im Wesentlichen mit der Bildung und Akkumulation von Dihydrochelirubin aus 10-Hydroxydihydrosanguinarin abbricht. Dagegen sind im Wildtyp die Benzophenanthridine 10-Hydroxysanguinarin und Macarpin gut neben ihren Dihydro-Vorstufen nachweisbar.

Bei dem analogen Experiment mit hoher Elicitor-Konzentration (siehe Abbildung 27) ergibt sich ein völlig anderes Bild: neben den deutlich erhöhten Mengen der Dihydroalkaloide dominieren die oxidierten Endprodukte, d.h. die Benzophenanthridine 10-Hydroxychelerythrin, Chelirubin und Macarpin. In den transgenen Zellstämmen ist diese Tendenz merklich verstärkt, jedoch, im Vergleich zum Wildtyp, ohne starke Veränderungen in den Anteilen der Dihydroalkaloide und der oxidierten Produkte.

Abbildung 25: Alkaloidgehalte 48 Stunden nach Elicitorzugabe – Zell-Linien 1C2_ü, 2b_ü und 3C1_ü

Dargestellt sind in

A - die Gehalte an Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden,

B - die Gehalte an Benzophenanthridinalkaloiden,

die 48 Stunden nach Zugabe des Hefeelicitors wie unter 2.11.3 beschrieben, gemessen wurden. Dabei sind in der jeweiligen Abbildung links die Gehalte nach niedriger Elicitorkonzentration (E1 entspricht 1 µg/ml), und rechts die Mengen nach hohen Elicitorkonzentrationen (E50 entspricht 50 µg/ml) abgebildet. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten zu je fünf Messwerten. Entsprechende Kontrollen ohne Elicitorzusatz wurden mitgeführt, daraus erhaltene Messwerte (Basalproduktion) wurden von den Messwerten nach Elicitierung abgezogen. Die aus den Fluoreszenzen ermittelten Konzentrationen wurden nach Kalibrierung entweder als Dihydrosanguinarin oder Sanguinarin berechnet. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

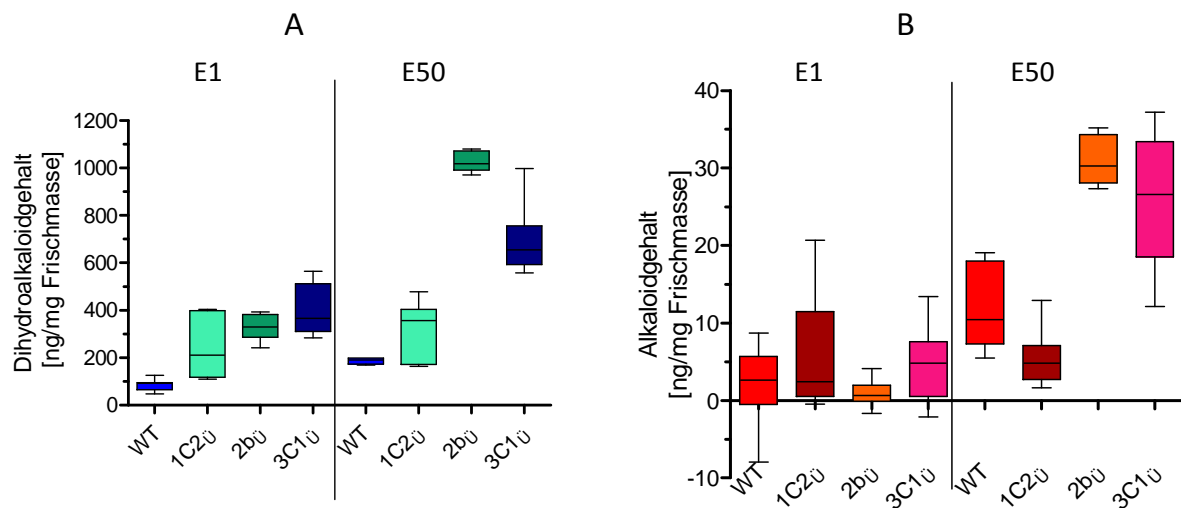


Abbildung 26: Alkaloidspektren der Zell-Linien 1C2_ü, 2b_ü und des Wildtyps nach Elicitierung (1 µg/ml)

Nach Elicitierung (1 µg/ml) wurden täglich Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind der Alkaloidgehalt der jeweils unbehandelten Parallelkultur (I), sowie die nach Elicitorzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:

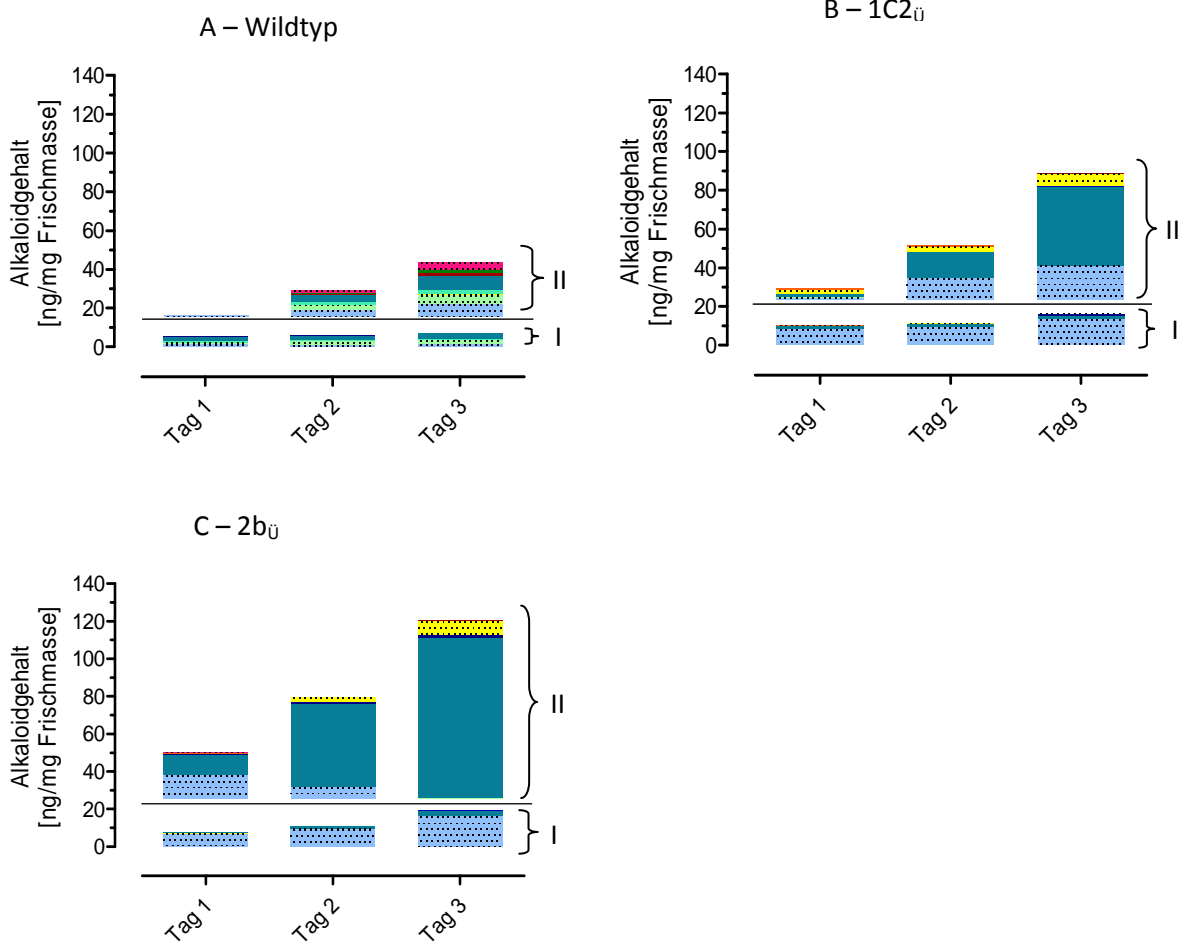
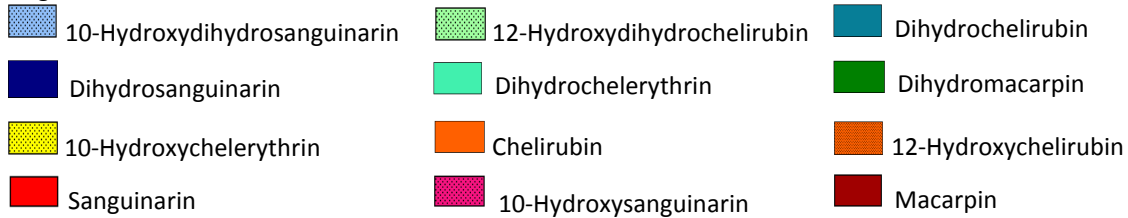
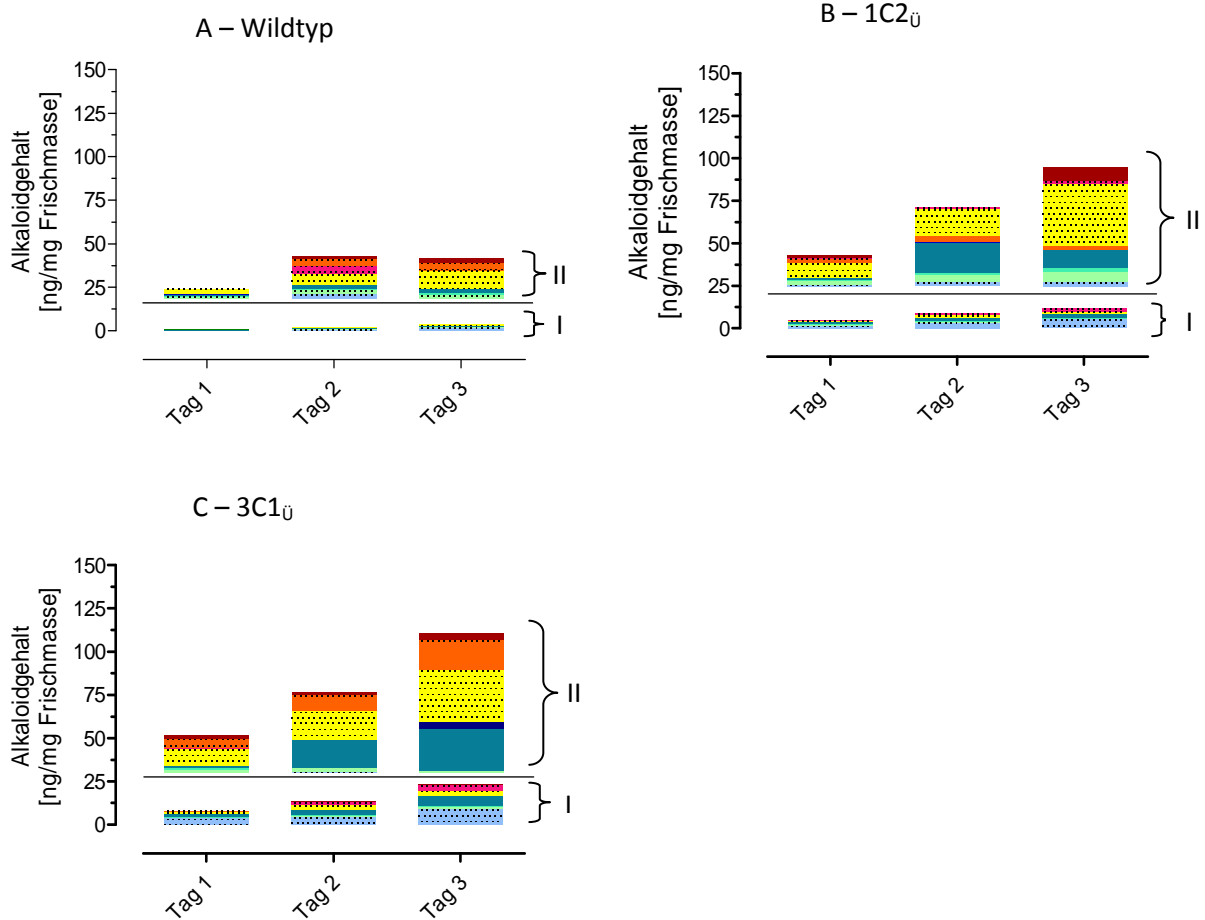
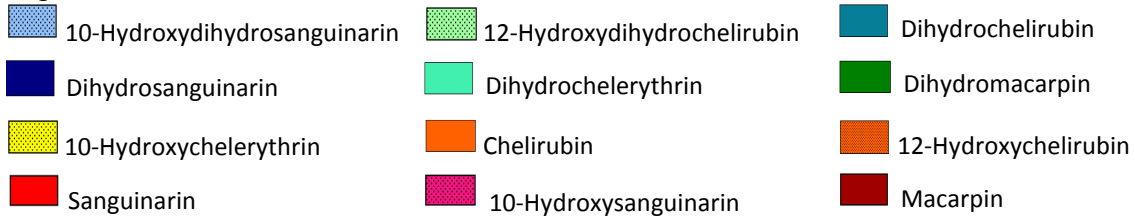


Abbildung 27: Alkaloidmuster der Zell-Linien 1C2Ü, 3C1Ü und des Wildtyps nach Elicitierung (50 µg/ml)

Nach Elicitierung (50 µg/ml) wurden täglich Proben entnommen, extrahiert und die Hauptalkaloide mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (siehe unter 2.12.1). Aus dem Diagramm sind der Alkaloidgehalt der jeweils unbehandelten Parallelkultur (I), sowie die nach Elicitorzusatz gemessenen Alkaloide (II) zu entnehmen. Die einzelnen Segmente sind als Stapel dargestellt, d.h. die Gehalte ergeben sich als Differenzen der y-Achse. Abgebildet ist ein typisches Experiment, welches durch Wiederholungen mehrfach bestätigt wurde.

Legende:



3.3.8 Überblick und Fazit

Als ein erstes Fazit zum Alkaloidmetabolismus nach dem silencing der Sanguinarinreduktase lässt sich feststellen, dass

- in allen transgenen Zellstämmen die Umsetzung des extern applizierten Sanguinarins verlangsamt ist, besonders bei wiederholtem Zusatz. Dies weist darauf hin, dass die Reduktion dieses Alkaloids am Enzym die Geschwindigkeit der folgenden Umwandlungen limitiert. Das Reaktionsprodukt Dihydrosanguinarin bleibt in den transgenen Zell-Linien trotz geringerer Bildungsrate länger nachweisbar als im Wildtyp. Offenbar wird nicht nur seine Bildung, sondern auch die weitere Umsetzung gehemmt.
- die Umwandlung des zugesetzten Sanguinarins in den transgenen Linien meist auf der Stufe des Dihydrochelirubins bzw. seiner oxidierten Form stehenbleibt.
- in den hyper-elicitierbaren Transformanten bei wiederholtem Zusatz von Sanguinarin (als Nachahmung einer Überproduktion nach Elicitorgabe) die Grenze der Umsetzung von Sanguinarin erreicht und das gebildete Dihydrosanguinarin nicht vollständig weiterverarbeitet wird.
- die Transformanten der Gruppe 1 die Fähigkeit zur Alkaloid-Antwort auf Elicitorkontakt verloren haben bzw. (bei hohen Elicitorkonzentrationen) deutlich schwächer reagieren als der Wildtyp.
- es in den Transformanten der Gruppe 2 nach Elicitorkontakt zu einer mehrfach erhöhten Alkaloidproduktion kommt, wobei niedrigere Elicitorkonzentrationen im Wesentlichen bis zur Akkumulation von Dihydrochelirubin führen, hohe Elicitorkonzentrationen dagegen zum vollen Spektrum der Benzophenanthridine einschließlich der Bildung von Macarpin.

3.4 Worauf beruhen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von transgenen Zellstämmen?

Die bisher gezeigten Unterschiede in der Alkaloidbildung nach Elicitorkontakt korrelieren mit den Unterschieden in der Kopienzahl des RNAi-Vektors im Genom der Transformanten (Überblick unter 3.3.1). Für die Interpretation dieser Befunde ist es wesentlich, ob die Veränderungen allein auf der enzymatischen Ebene, d.h. im Alkaloidmetabolismus stattfinden, oder ob in den transgenen Zell-Linien auch die Signalkette beeinträchtigt bzw. verändert wurde. Als ein erster Schritt hierzu wurden bekannte Elemente der Signalkette zur Expression des Alkaloidstoffwechsels vergleichend untersucht.

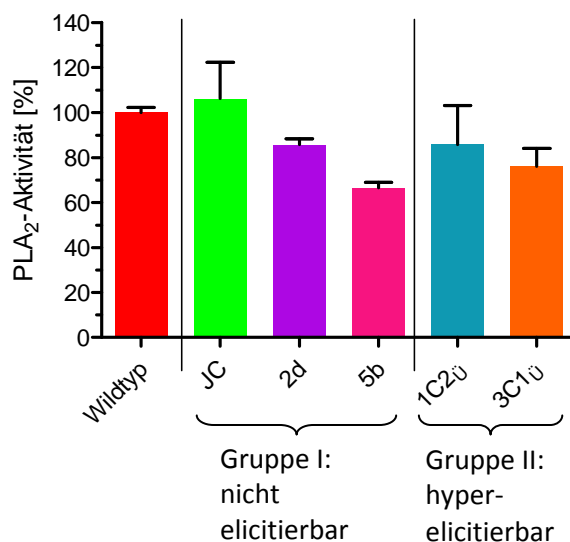
Für einen besseren Überblick werden im folgenden Text die Zellstämme der Gruppe II wegen der starken Alkaloidantwort auf Elicitor auch als „hyper-elicitierbar“ bezeichnet, die Zell-Linien der Gruppe I hingegen wegen der fehlenden Alkaloidproduktion nach Gabe der niedrigen Elicitorkonzentration als „nicht elicitierbar“.

3.4.1 Aktivität der Phospholipase A₂

Wie bereits in der Einleitung unter 1.2.2 erläutert, steht am Anfang der Signalkette die Aktivierung einer Phospholipase A₂ an der Plasmamembran durch den Hefeelicitor über ein assoziiertes G-Protein. Abbildung 28 stellt die Phospholipase A₂-Aktivität in der isolierten Zellmembran dar. Dabei zeigen die transgenen Zell-Linien keine erheblichen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Die Transformationen haben also in keinem Fall eine Veränderung der Phospholipase A₂-Aktivität der Plasmamembran verursacht.

Abbildung 28: Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) in der isolierten Plasmamembran

In der isolierten Plasmamembran wurde die Aktivität von Phospholipase A₂ als Initialrate der Hydrolyse des fluorogenen Substrats BODIPY-FL-PC gemessen (siehe unter 2.10.8). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.



3.4.2 Elicitor-ausgelöste Stimulation von vakuolären Na⁺/H⁺-Antiportern

Die Aktivierung der Phospholipase A₂ durch den Hefeelicitor resultiert unter anderem in einem transienten Peak von Lysophosphatidylcholin, welches als second messenger zwischen Plasmamembran und Tonoplast fungiert. Es aktiviert Na⁺/H⁺-Antiporter der Vakuole und führt damit zum Efflux vakuolärer Protonen und zur Ansäuerung des Zytoplasmas (Viehweger et al., 2006; Viehweger et al., 2002; Roos et al., 2006).

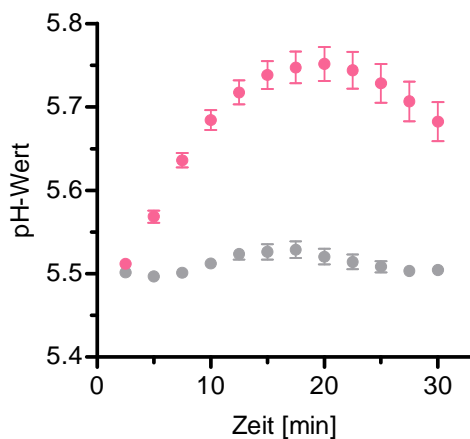
Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Elicitierbarkeit zwischen den beiden Gruppen von transgenen Zell-Linien und dem Wildtyp durch eine verringerte Bildung von Lysophosphatidylcholin durch die Phospholipase A₂ oder die fehlende Wirkung dieses Signalmoleküls auf die Na⁺/H⁺-Antiporter bedingt sind, wurden in Ganzzellen nach Elicitorkontakt pH-Shifts in der Vakuole gemessen (siehe Abbildung 29).

Abbildung 29: pH-Shift nach Elicitorkontakt am Beispiel des Wildtyps

Nach Akkumulation der pH-Sonde 5'-Carboxyfluorescein wurde die Veränderung des vakuolären pH-Wertes nach Elicitorkontakt über einen Zeitraum von 30 min an Zellen der Suspensionskultur des Wildtyps gemessen (siehe auch unter 2.10.9). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Experiment mit 8 Einzelmessungen.

Legende:

● nicht eliciert ● eliciert

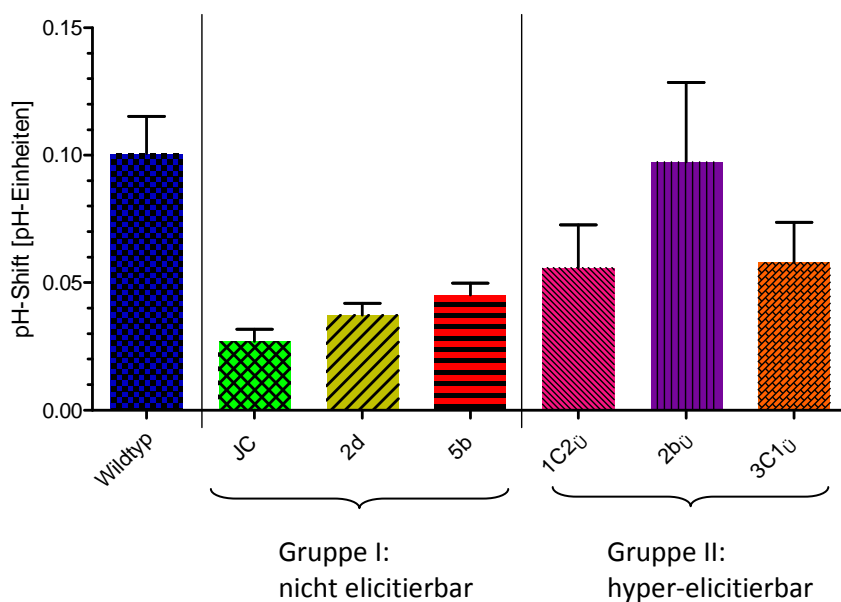


Auf diese Weise sollte selektiv die Funktionsfähigkeit eines wesentlichen Teils des LPC/ Δ pH-Signalwegs geprüft werden. Da mit mikroskopischen Untersuchungen (konfokale pH-Topographie an permeabilisierten Einzelzellen nach Viehweger et al., 2002) ein enormer Aufwand verbunden gewesen wäre, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geleistet werden konnte, erfolgten ratiometrische Messungen an Zellsuspensionen in Mikrotiterplatten mit Hilfe des Fluorimeters. Dies bedingte die vorherige Einstellung einer optimalen Elicitorkonzentration, da erste Experimente zeigten, dass in den aus messtechnischen Gründen erforderlichen hohen Zelldichten höhere Elicitorkonzentrationen als 1 μ g/ml zur Auslösung von reproduzierbaren pH-Shifts notwendig waren. Da der Jasmonat-Signalweg jedoch keine pH-Shifts auslöst (Viehweger et al., 2006; Färber et al., 2003), bleibt die Selektivität des LPC/ Δ pH-Signalwegs gewährleistet.

Abbildung 30 zeigt die maximalen Änderungen des vakuolären pH-Wertes nach Elicitorkontakt. In allen untersuchten Zellstämmen wurden eindeutig pH-Shifts registriert, allerdings meist geringere als im Wildtyp. Nur in einem Fall (2b_Ü) war der maximale pH-Shift einer überproduzierenden Zell-Linie signifikant höher als in den nicht-elicitierbaren Linien. Da die hyper-elicitierbaren Zellstämme (Gruppe II) mehr Alkaloide bilden als der Wildtyp (siehe unter 3.3.7.2), spielt das Ausmaß der messbaren pH-Wert-Änderungen unter den gewählten Bedingungen offenbar eine untergeordnete Rolle. Die Unterschiede in der Elicitierbarkeit zwischen beiden Gruppen (zum Beispiel zwischen 5b und 1C2_Ü) sind daher kaum auf Unterschiede im Efflux vakuolärer Protonen zurückzuführen.

Abbildung 30: Vergleich der maximalen pH-Wert-Änderung in der Vakuole nach Elicitierung

Die Veränderung des vakuolären pH-Wertes nach Elicitierung wurde über einen Zeitraum von 30 min an Zellen der angegebenen Suspensionskulturen gemessen (Methodik siehe unter 2.10.9). Aufgetragen ist jeweils die größte Differenz des pH-Wertes zwischen einer elicitierten und einer nicht-elicitierten Suspension in der Mikrotiterplatte, die in einem Experiment wie in Abbildung 29 dargestellt, auftrat. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Experimenten mit jeweils 8 Einzelmessungen.



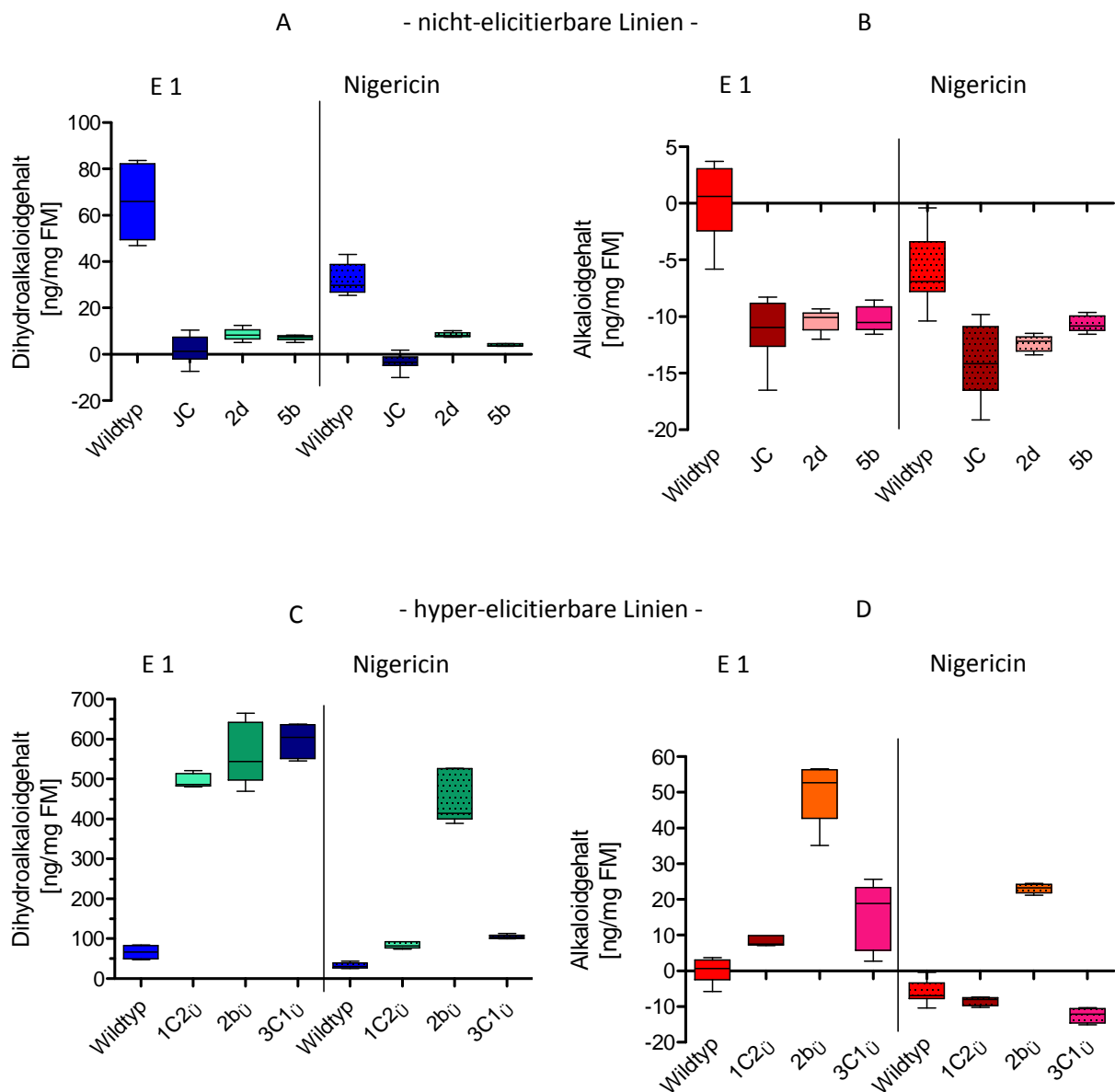
3.4.3 Antworten auf künstlichen pH-Shift

Weder die Aktivierung der Phospholipase A₂ noch die vakuolären pH-Shifts nach Elicitorzugabe lassen entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von transgenen Zell-Linien erkennen. Deshalb wurde geprüft, ob die nach dem pH-Shift auftretenden bzw. dadurch ausgelösten Ereignisse in den transgenen Stämmen wesentlich verändert sind. Dazu bot sich die Methode der künstlichen pH-Shifts an (Angelova et al., 2010). Diese beruht auf der Verwendung des Ionophors Nigericin, welches in intakten Zellen einen artifiziellen, experimentell kontrollierbaren K⁺/H⁺-Austausch über die Zellmembran ermöglicht. Durch den Wechsel des externen Puffers kann eine reversible Ansäuerung des Cytoplasmas über einen definierten Zeitraum erfolgen (Methodik siehe unter 2.11.4). Vergleicht man die Alkaloidantworten auf den durch Nigericin ausgelösten pH-Shift vom

Wildtyp und den transgenen Zell-Linien, so werden erhebliche Unterschiede sichtbar (Abbildung 31). Die Zellstämme aus Gruppe I (nicht elicitierbar) reagieren deutlich geringer als die der Gruppe II (hyper-elicitierbar). Dies spricht dafür, dass die pH-abhängige Genexpression von rate-limitierenden Enzymen der Biosynthese in den hyper-elicitierbaren Linien stärker ausgeprägt ist als in den nicht elicitierbaren Stämmen und dem Wildtyp.

Abbildung 31: Alkaloidgehalte nach Elicitierung und Nigericin-Pufferbehandlung

Nicht-elicitierbare (A und B) sowie hyper-elicitierbare Zellstämme (C und D) wurden jeweils mit niedriger Elicitorkonzentration (1 µg/ml) oder künstlichen pH-Shifts behandelt (Methodik siehe unter 2.11.3 und 2.11.4). Nach 48 Stunden wurden die Gehalte an Dihydrobenzophenanthridinen (A und C), sowie Benzophenanthridinen (B und D) gemessen. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten zu je fünf Messwerten. Kontrollen ohne Elicitor- bzw. Nigericinzusatz wurden mitgeführt und deren Messwerte (Basalproduktion) abgezogen. Die aus den Fluoreszenzen ermittelten Konzentrationen wurden nach Kalibrierung entweder als Dihydroanguinarin oder Sanguinarin berechnet. Die negativen Alkaloidgehalte ergeben sich durch den Abzug der Basalproduktion, der in diesem Fall größer als die Produktion nach Elicitierung bzw. Nigericinzugabe war. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.



Generell ist zu erkennen, dass alle Alkaloid-Anstiege nach künstlich ausgelöstem pH-Shift geringer ausfallen als nach Elicitierung (siehe Abbildung 31). Dies spiegelt sehr wahrscheinlich eine gewisse Toxizität des Nigericins wider, welches durch Zellschädigungen die Alkaloidbildung einschränkt (Angelova et al., 2010). Dennoch liegen die Alkaloidgehalte der hyper-elicitierbaren Stämme noch deutlich über dem Gehalt des Wildtyps.

3.4.4 Regulierung zweier ausgewählter Biosynthese-Gene des Alkaloidstoffwechsels nach Elicitorkontakt

Der durch die Na^+/H^+ -Antiporter ausgelöste pH-Shift führt im Wildtyp zur Expression einiger Biosynthesegene, beispielsweise Berberinbrückenenzym (BBE) und 4'-O-Methyltransferase (4'OMT) (Viehweger et al., 2006; Angelova et al., 2010). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression beider Enzyme in je einem Vertreter aus beiden Gruppen der transgenen Zell-Linien untersucht (siehe Abbildung 32).

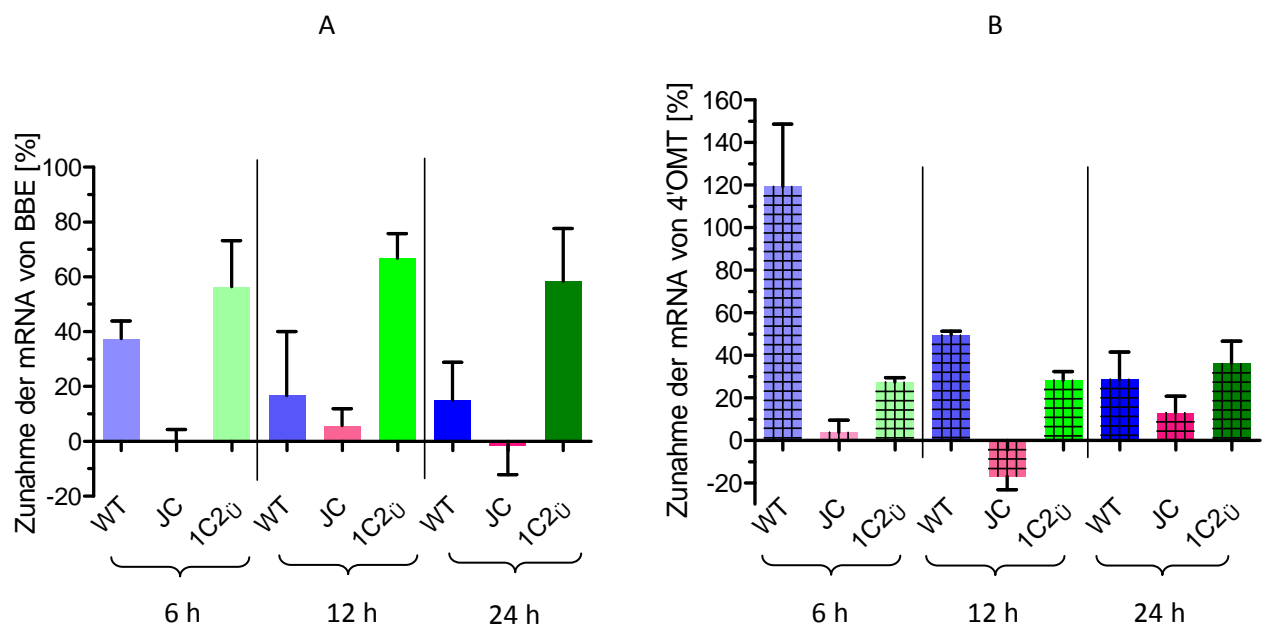
Abbildung 32: Expression von BBE und 4'OMT nach Elicitorkontakt

Die Änderung der mRNA-Menge von Berberinbrückenenzym (BBE) sowie 4'-O-Methyltransferase (4'OMT) wurde 6, 12 und 24 Stunden nach Elicitierung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mittels semi-quantitativer RT-PCR (wie unter 2.9.14 beschrieben), bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Hochregulierung von

A – BBE

B – 4'OMT

zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elicitierung. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten ($n = 3$). Zu jeder Zell-Linie und jedem Messpunkt wurde eine entsprechende Kontrolle ohne Elicitorzusatz mitgeführt, deren mRNA-Menge als Basallevel gesetzt wurde.



Im Wildtyp führt der Elicitorkontakt erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg der mRNA von BBE und 4'OMT. In Zell-Linie JC (Gruppe I) ist für keines der beiden Enzyme ein signifikanter Anstieg

der mRNA nachweisbar. Dagegen steigt in Zellstamm 1C2_Ü (Gruppe II) die mRNA-Menge von BBE erheblich über das Niveau des Wildtyps. Bei der mRNA der 4'OMT findet im Vergleich zum Wildtyp zwar generell eine geringere Zunahme statt, dennoch unterscheidet sich die hyper-elicitierbare Zell-Linie deutlich von dem nicht-elicitierbaren Zellstamm. Die detaillierte Klärung der quantitativen Abhängigkeiten von mRNA-Level und Biosyntheserate würde intensive weiterführende Experimente erfordern. Es bestehen aber auch aufgrund der aktuellen Daten kaum Zweifel am Zusammenhang zwischen der gemessenen Alkaloidantwort der transgenen Zellstämme und der Induzierbarkeit von Biosynthese-Enzymen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verringerung der Menge bzw. Expression der Sanguinarinreduktase (auf <5 % in JC und etwa 15 % in 1C2_Ü) erhebliche und unterschiedliche Wirkungen auf die Elicitor-ausgelöste Expression der Alkaloidbiosynthese ausübt. Diese werden später im Zusammenhang diskutiert (siehe unter 3.5).

3.4.5 Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase nach Elicitorkontakt

Wie bereits gezeigt, besteht der basale Alkaloidgehalt des Wildtyps und der transgenen Zellstämme zum größten Teil aus Dihydrobenzophenanthrinen (siehe Abbildung 17). Auch der Elicitor-ausgelöste Anstieg betrifft vorrangig die Dihydroalkaloide. Benzophenanthridine werden erst bei relativ hohen Gehalten der Dihydroalkaloide gebildet, und treten besonders bei Zugabe hoher Elicitormengen auf, welche bereits apoptotische Reaktionen auslösen (Weiss et al., 2006).

Die Bildung der Benzophenanthridine ist eine Oxidation der Dihydroalkaloide durch Luftsauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Sie wird durch die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DhbOx) katalysiert (Schumacher und Zenk, 1988).

Da sich die beiden Gruppen der transgenen Zellstämme auch im Gehalt an oxidierten Alkaloiden unterscheiden, wurde die spezifische Aktivität der DhbOx vergleichend untersucht (siehe Abbildung 33). Im Wildtyp wird durch Elicitorkontakt ein Anstieg der Aktivität und Proteinmenge dieses Enzyms ausgelöst, wie schon seit längerem bekannt (Schumacher und Zenk, 1988). In Zell-Linie JC (Gruppe I) konnte ein solcher Anstieg kaum festgestellt werden, wohingegen bei Zellstamm 1C2_Ü (Gruppe II) bereits ohne Elicitor eine erhöhte Aktivität der DhbOx vorhanden war, welche nach Elicitorzugabe noch deutlich zunahm.

Diese Befunde zur DhbOx liefern eine naheliegende Erklärung für die Unterschiede im Gehalt an oxidierten, quaternären Alkaloiden in elicitierten Zellen der transgenen Stämme und des Wildtyps (siehe auch Abbildungen 22, 26 und 27). Sie sind auch gut mit dem Auftreten der Alkaloide bei mikroskopischer Untersuchung vereinbar (siehe Abbildung 34): Während die rot fluoreszierenden Benzophenanthridinalkaloide in den Zellen des Wildtyps erstmals 22 Stunden nach Elicitorkontakt sichtbar werden, treten sie in den Zellen der Linie 1C2_Ü bereits nach 15 Stunden auf. Dagegen sind in den Zellen von JC (Gruppe I) auch 22 Stunden nach Elicitorung noch keine Benzophenanthridine unter dem Mikroskop sichtbar. Insgesamt sprechen die aktuellen Daten dafür, dass die DhbOx vor

allem über den LPC/ Δ pH-Signalweg induziert wird. Dieser ist in den nicht-elicitierbaren Zellen sehr wahrscheinlich blockiert (siehe unter 3.5.1.1). Das verstärkte Auftreten der oxidierten quaternären Alkaloide in den hyper-elicitierbaren Zellstämmen spiegelt nicht nur die erhöhte Aktivität der DhbOx wider, sondern auch den Anstieg der Konzentration ihrer Substrate.

Abbildung 33: Spezifische Enzymaktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

Die spezifische Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase (DhbOx) wurde vor und 24 Stunden nach Elicitorkontakt (E0: ohne; E5: 5 μ g/ml; E50: 50 μ g/ml) in Extrakten löslicher Proteine aus Zellen des Wildtyps und jeweils einer transgenen Zell-Linie aus Gruppe I (JC) und II (1C2_ü) gemessen (Methodik siehe unter 2.10.10). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten mit jeweils 8 Einzelmessungen.

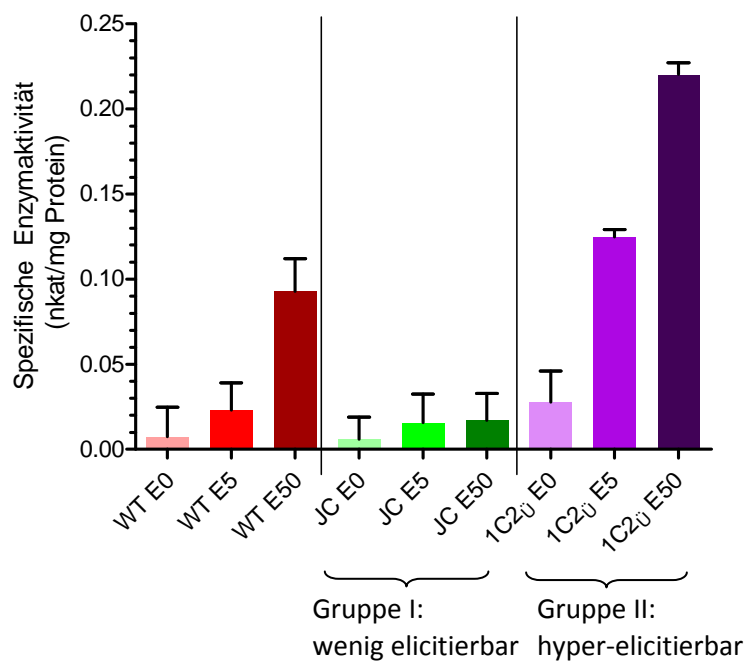


Abbildung 34: Mikroskopische Analyse der Alkaloidproduktion nach Elicitorkontakt

Zellsuspensionen des Wildtyps und jeweils einer transgenen Zell-Linie aus Gruppe I (JC) und Gruppe II (1C2_Ü) wurden wie unter 2.11.1 beschrieben vorbereitet und mit Elicitor (1 µg/ml) versetzt (siehe auch 2.11.3). Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von 7 µl entnommen und im Fluoreszenz-Mikroskop Leica DM IRE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) untersucht. Die Fluoreszenz der Dihydroalkaloide (Exzitation: 360 nm; Emission: 390-490 nm) und die der Benzophenanthridine (Exzitation: 490 nm, Emission >590 nm) wurden getrennt photographiert (Kamera: Hamamatsu ORCA, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, D) und die digitalisierten Aufnahmen mit Hilfe des Programms Thumbs 8 (Cerious Software Inc., USA) in rote bzw. blaue RGB-Farben umgewandelt und anschließend superpositioniert.

Dargestellt sind Bilder eines typischen Experiments, welches mehrfach bestätigt wurde (aufgenommen von M. Golecki unter Anleitung von W. Roos).

Die blaue Fluoreszenz der Dihydroalkaloide ist im Wesentlichen in der Vakuole akkumuliert, welchen den größten Teil der Zelle ausfüllt. Die rote Fluoreszenz der Benzophenanthridine ist an Vesikel gebunden, welche beweglich im Zytoplasma auftreten. Diese Vesikel enthalten DhbOx, wie nach ihrer Isolation im Dichtegradienten gemessen wurde (M. Heinze und W. Roos, persönliche Mitteilung).

**3.4.6 Einfluss von Dihydrosanguinarin auf die Elicitor-induzierte Alkaloidproduktion**

Die Interpretation der unterschiedlichen Phänotypen, welche nach erfolgreichem silencing des Gens der Sanguinarinreduktase erhalten wurden, muss vom verminderten Gehalt an Enzymprotein und der damit korrelierten, reduzierten Aktivität der Sanguinarinreduktase ausgehen (siehe auch Tabelle 10). Das Produkt, Dihydrosanguinarin, wird weder im Wildtyp noch in den transgenen Zellstämmen zu wesentlichen Anteilen akkumuliert, da es offenbar rasch metabolisiert wird. Man kann davon ausgehen, dass die Unterschiede in der Aktivität der Sanguinarinreduktase (Wildtyp: 100 %, Gruppe I:

ca. 5 %, Gruppe II: ca. 15 %) zu unterschiedlichen steady-state-Gehalten dieser Verbindung führen, zumindest wenn außerhalb der Zelle akkumulierte Benzophenanthridine aufgenommen und umgesetzt werden. Dafür sprechen zumindest die Experimente zum Metabolismus des extern applizierten Sanguinarins (siehe unter 3.3.6.1 und 3.3.7.1).

Um zu zeigen, welche Wirkungen Dihydrosanguinarin (DHS) auf den Ablauf der Biosynthese und der Alkaloid-Antwort besitzt, wurde diese Verbindung dem Wildtyp zugesetzt. Dabei wurde sich die Tatsache zunutze gemacht, dass DHS bei Zugabe von außen sehr rasch (binnen Sekunden) von den Zellen aufgenommen wird.

Der Zusatz von DHS gemeinsam mit dem Elicitor führt im Wildtyp schon ab einer Konzentration von 0,5 μM zu einer verringerten Alkaloidproduktion; ab 2,5 μM DHS werden praktisch keine Alkaloide neu gebildet, sondern nur das zugegebene DHS abgebaut (siehe Abbildung 35). Um zu überprüfen, ob auch andere Dihydrobenzophenanthridine diese Wirkung zeigen, wurde derselbe Versuch mit einer Mischung aus Dihydroalkaloiden (DH-Mix, vorwiegend bestehend aus DHS, Dihydrochelerythrin, Dihydrochelirubin u. a.) wiederholt (siehe Abbildung 36). Hier kommt es ebenfalls zu einer Hemmung der Biosynthese, jedoch erst ab einer Konzentration von 7,5 μM . Offenbar wird der starke hemmende Effekt auf die Elicitor-induzierte Alkaloidbiosynthese im Wesentlichen durch DHS ausgelöst, welches auch im Mix vorhanden ist.

Abbildung 35: Effekt verschiedener DHS-Konzentrationen auf die Alkaloid-Antwort nach Elicitierung

Der Wildtyp-Zellkultur wurden verschiedene Konzentrationen an Dihydrosanguinarin (DHS) zugegeben, anschließend wurde zu einem Teil der Zellsuspension Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugefügt. Der Gehalt an Dihydroalkaloiden wurde sofort nach Zusatz bestimmt. Die durch Elicitierung ausgelöste Alkaloidproduktion wurde nach weiteren 24 Stunden gemessen (Methodik siehe unter 2.11.5 und 2.11.6).

Dargestellt ist die von den Zellen neu gebildete Menge an Dihydroalkaloiden (24 Stunden nach Elicitierung). Die aus den Fluoreszenzen ermittelten Gehalte wurden nach Kalibrierung als Dihydrosanguinarin berechnet. Negative Daten ergeben sich, wenn der Abbau des zugesetzten DHS die Neuproduktion von Dihydroalkaloiden überwiegt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten zu je fünf Messwerten.

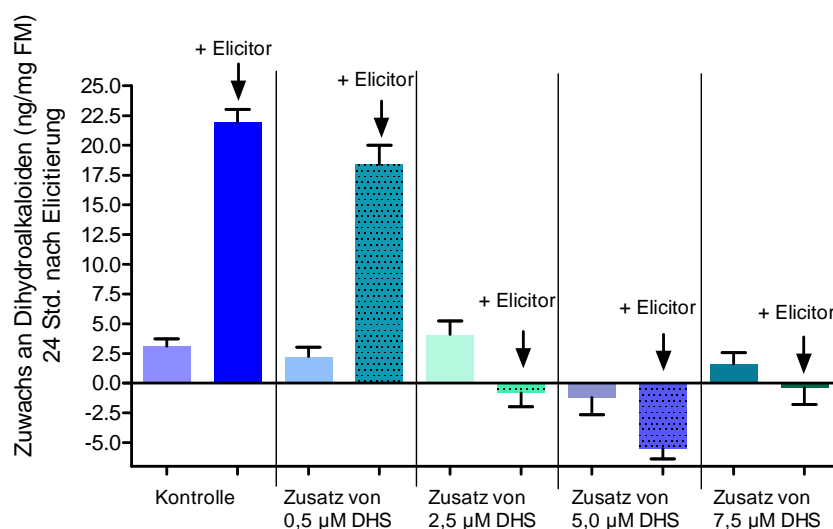
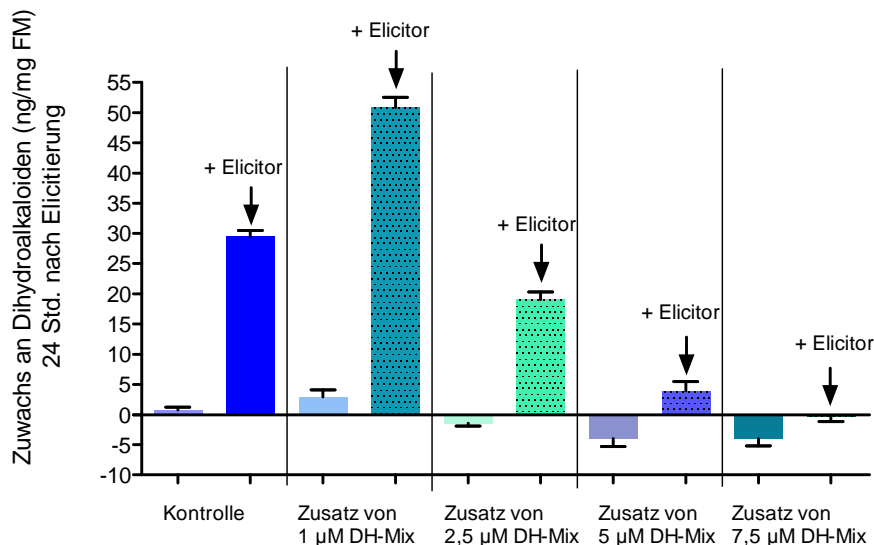


Abbildung 36: Effekt verschiedener Konzentrationen des Dihydroalkaloid-Mix auf die Alkaloid-Antwort nach Elicitierung

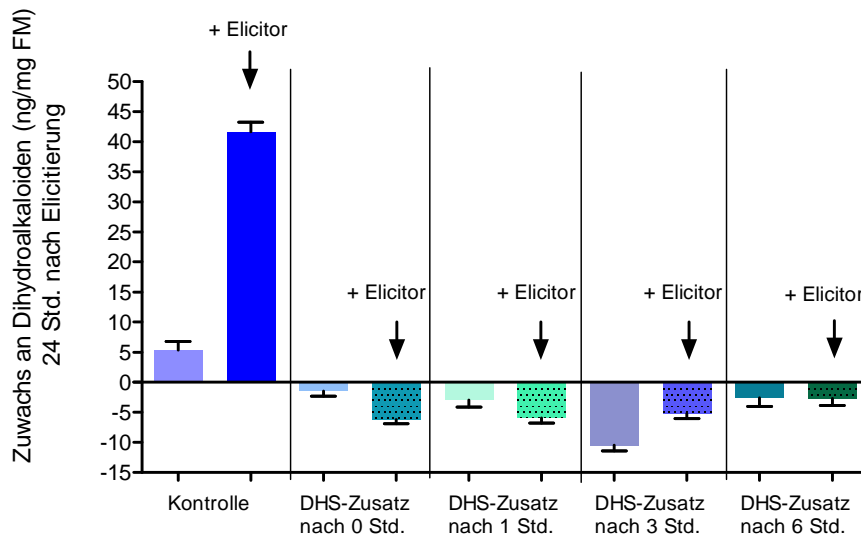
In einem Experiment analog zu Abbildung 35 wurde statt DHS eine Mischung der von *Eschscholzia californica* gebildeten Dihydroalkaloide zugesetzt (Methodik siehe unter 2.11.5 und 2.11.6).



Zur Eingrenzung des Angriffspunktes von DHS wurde von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass die Überexpression der Biosynthese-Enzyme auf Proteinebene etwa 4 bis 6 Stunden nach dem Elicitorkontakt erfolgt; ein Anstieg der Alkaloidbildung ist nach etwa 10 Stunden nachweisbar (Viehweger et al., 2006; Angelova et al., 2010). In weiteren Versuchen wurde den Kulturen daher zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elicitorkontakt DHS zugesetzt. Die Hemmung der Alkaloidbildung war in allen Fällen von gleicher Effizienz (siehe Abbildung 37). Versuche unter Zugabe des 7,5 µM DH-Mix führten zu ähnlichen Ergebnissen. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von DHS und anderer Dihydroalkaloide nicht auf die Signalkette gerichtet ist: in diesem Fall würde sie nur bei den frühen Zusätzen eintreten, da beispielsweise der pH-Shift bereits nach 30 Minuten erfolgt ist (Roos et al., 2006). Auch ein Effekt auf die Expression der Biosynthese-Enzyme ist weniger wahrscheinlich, da im Zeitraum zwischen 3 und 6 Stunden bereits die meisten neu gebildeten Enzyme nachweisbar sind (Angelova et al., 2010; Kurz, 2009). Deshalb ist die enzymatische Ebene, das heißt die Biosynthese selbst, der wahrscheinlichste Angriffspunkt für die Hemmwirkung von DHS. Eine geringe Beteiligung früherer Ereignisse lässt sich natürlich nicht völlig ausschließen.

Abbildung 37: Effekt von DHS auf die Signalkette nach Elicitierung

Elicitor (1 µg/ml) wurde zu jeweils einem Ansatz der Wildtyp-Zellkultur gegeben, der Zusatz von 5 µM DHS erfolgte entweder ebenfalls sofort, oder nach Ablauf von einer, drei oder sechs Stunden zu beiden Ansätzen. Der Gehalt an Dihydroalkaloiden wurde sofort nach Zugabe bestimmt. Die durch Elicitierung ausgelöste Alkaloidproduktion wurde nach weiteren 24 Stunden gemessen (Methodik siehe unter 2.11.5 und 2.11.6). Dargestellt ist die von den Zellen neu gebildete Menge an Dihydroalkaloiden (24 Stunden nach Elicitierung). Die aus den Fluoreszenzen ermittelten Gehalte wurden nach Kalibrierung als Dihydrosanguinarin berechnet. Negative Daten ergeben sich, wenn der Abbau des zugesetzten DHS die Neuproduktion von Dihydroalkaloiden überwiegt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten zu je fünf Messwerten.



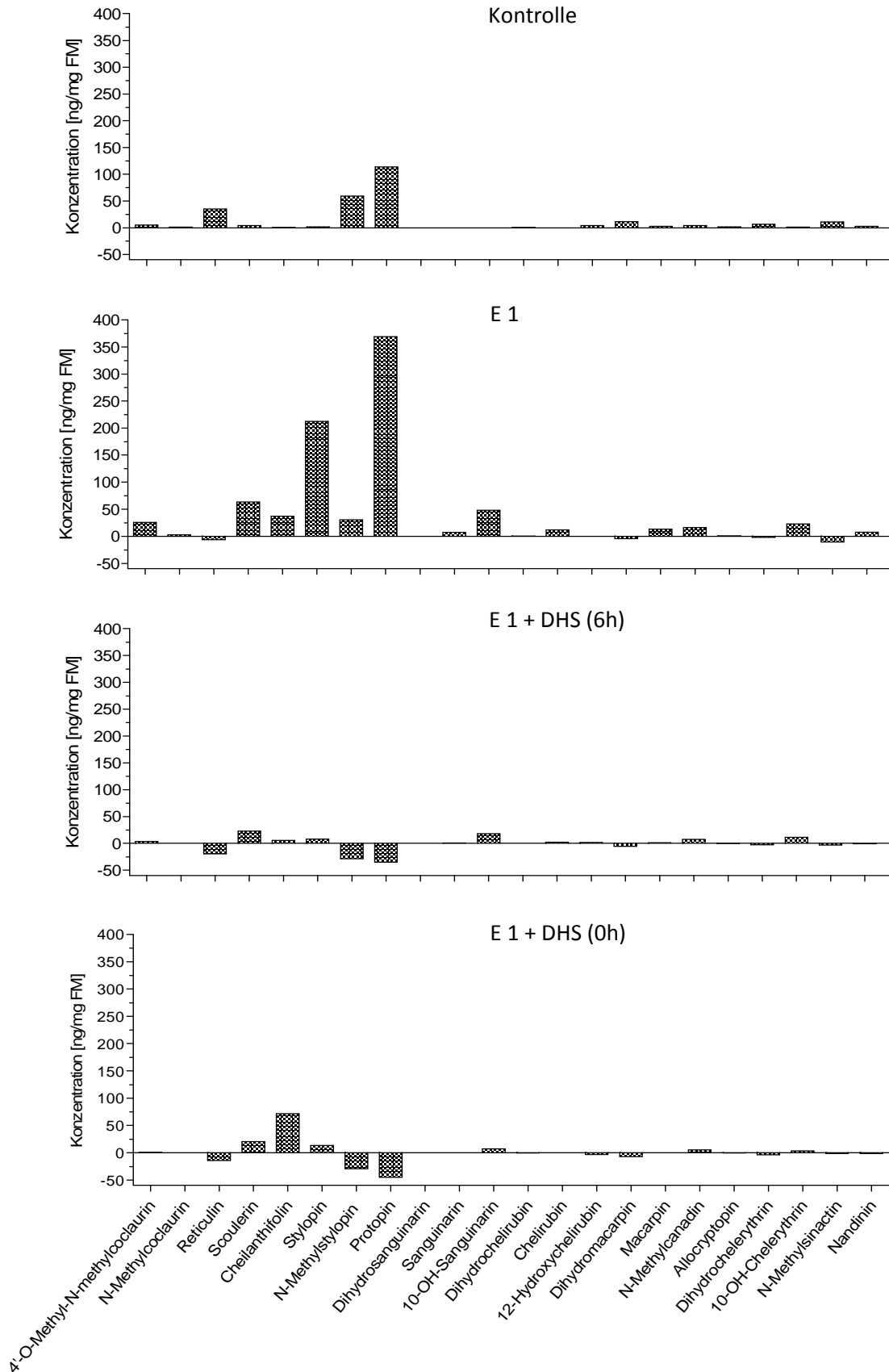
Um zu überprüfen, ob sich bei der Hemmung der Alkaloidproduktion durch DHS Intermediate der Biosynthese anreichern, wurde der Einfluss dieser Verbindung auf das Alkaloidmuster elicierter Zellen des Wildtyps untersucht (siehe Abbildung 38). Um auch frühe Metabolite zu erfassen, für die keine spektralen Daten zur HPLC-gestützten Identifizierung bekannt sind, wurden diese Analysen mit MS/MS-basierter Detektion durchgeführt (Labor Dr. Schmidt, IPB Halle; siehe unter 2.12.2).

Wie bereits gezeigt, werden die Metabolitmuster des Wildtyps durch die Peaks von Protopin und (in geringerem Maße) dessen Vorläufer N-Methylstylopin dominiert (siehe Abbildung 18). Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, wird der Protopin-Pool nach Elicitorkontakt erheblich vergrößert, dazu kommt die Akkumulation des nahen Vorläufers Stylopin. Dies spricht erneut dafür, dass die Höhe des Protopin-Pools eine entscheidende Regelgröße für die Rate der Benzophenanthridin-Biosynthese darstellt.

Dieses Metabolitspektrum wird durch Dihydrosanguinarin drastisch verändert, und zwar sowohl bei gleichzeitiger Gabe als auch 6 Stunden nach Elicitor. Die steady state Konzentrationen aller messbaren Alkaloide sind im Vergleich zur elicitierten Kultur stark erniedrigt; dies fällt besonders bei den frühen Alkaloiden zwischen N-Methylcoclaurin und Protopin ins Gewicht. Dies spricht dafür, dass ein sehr früher Schritt der Biosynthese durch Dihydrosanguinarin (oder einen daraus gebildeten Metaboliten) blockiert wird, etwa die Bildung von Coclaurin oder dessen Methylierung. Das Produkt der Sanguinarinreduktase, welches das erste Intermediat der Biosynthese mit Benzophenanthridin-Ring darstellt, hat also eine tiefgreifende Hemmwirkung auf die gesamte Biosynthese-Kette.

Abbildung 38: Veränderung des Alkaloidmusters nach Zugabe von DHS und Elicitor im Wildtyp

Der Wildtyp-Zellkultur wurde Elicitor (E1, 1 µg/ml), Elicitor und DHS (5 µM) nach 6 Stunden (E1+DHS (6h)) oder Elicitor und DHS (5 µM) zum gleichen Zeitpunkt (E1+DHS (0h)) zugefügt. Ein Ansatz ohne Zusatz wurde als Kontrolle mitgeführt. 24 Stunden nach Zugabe des Elicitors wurden Proben genommen, wie unter 2.12.1.1 beschrieben aufgearbeitet und die Alkaloidgehalte mittels ESI-FTICR-MS bzw. LC-ESI-MS/MS bestimmt (siehe unter 2.12.2). Dargestellt ist die von den Zellen neu gebildete Menge an Alkaloiden, sowie der Ausgangsalkaloidgehalt der Kontrolle.



3.5 Diskussion – die Rolle der Sanguinarinreduktase in der Benzophenanthridin-Biosynthese

Im Folgenden wird der Versuch unternommen, die durch das silencing der Sanguinarinreduktase erhaltenen Ergebnisse mit bereits vorliegenden Daten zu einer aktuellen Interpretation zusammenzuführen. Dies soll zur Aufklärung der molekularen Abläufe dienen, in welche die Sanguinarinreduktase eingreift.

Man kann davon ausgehen, dass der Mangel an diesem Enzym in allen transgenen Zell-Linien zu einer initialen Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Sanguinarin (bzw. Benzophenanthridinen) und Dihydrosanguinarin (bzw. Dihydrobenzophenanthridinen) zugunsten der oxidierten Alkaloide führt, wobei sich die Konzentrationen beider Verbindungen im nicht-elicitierten Zustand in den hier benutzten Probemengen unter der Nachweisgrenze bewegen. Das unterschiedliche Ausmaß der noch verbliebenen Reduktionskapazität führt wahrscheinlich zu den beiden hier erhaltenen Phänotypen.

Der rasche Anstieg von Dihydroalkaloiden im Wildtyp, welcher mehrfach nach Zusatz externer Benzophenanthridine gezeigt wurde (siehe unter 3.3.6.1 und 3.3.7.1; sowie Klein und Roos, 2009; Weiss et al., 2006), ist nur durch die Aktivität der im Zytoplasma vorkommenden Sanguinarinreduktase erklärbar. Verringerte Aktivität sollte daher zumindest lokal die steady state-Konzentration von Dihydrosanguinarin senken und die der Benzophenanthridine erhöhen.

3.5.1 Worauf beruhen die Unterschiede in der Elicitierbarkeit der Zellstämme?

3.5.1.1 Phänotyp der nicht elicitierbaren Zell-Linien (Gruppe I)

In diesen Zellstämmen ist die Induktion der Alkaloidbiosynthese durch niedrige Elicitorkonzentrationen und künstliche pH-Shifts praktisch ausgeschaltet. Dies wird durch die fehlende Überexpression der Biosynthese-Enzyme 4'-O-Methyltransferase (4'OMT) und Berberinbrückenenzym (BBE) sowie den fehlenden Anstieg der Alkaloidbildung nach Zusatz niedriger Elicitorkonzentrationen belegt.

Die Ursache liegt jedoch nicht im Ausfall biosynthetischer Enzyme, da eine basale Alkaloidproduktion noch nachweisbar ist (siehe auch Abbildung 17), welche durch hohe Elicitorkonzentrationen (und damit über den Jasmonat-Weg) induziert werden kann.

Die fehlende Wirkung geringer Elicitorkonzentrationen spricht deshalb für den Ausfall der Δ pH/LPC-Signalkette. Hierfür bieten bereits vorhandene Ergebnisse von Heinze und Roos (unveröffentlicht) einen wesentlichen Anhaltspunkt: Im Wildtyp wird das Signalenzym Phospholipase A₂ an der Plasmamembran durch extern angebotene Benzophenanthridine (10 μ M) stark gehemmt, wobei 10-Hydroxychelerythrin und Chelirubin am wirksamsten sind. Diese Alkaloide sind Produkte der

Biosynthese und zugleich Substrate der Sanguinarinreduktase, ihr Gehalt sollte daher bei fehlender Sanguinarinreduktase-Aktivität zumindest kurzfristig ansteigen. Dieser Anstieg, etwa bei der initialen Alkaloidbildung nach Elicitorkontakt, ist in einer Zellsuspension, die sich unter anderem durch Unterschiede in Zellalter und Entwicklungsphase stets heterogen zusammensetzt, nicht einfach nachweisbar. Daher wurde das Auftreten von Alkaloiden im Medium simuliert, indem den Kulturen Sanguinarin zu einer Konzentration von 10 μM zugesetzt wurde. Wie aus den bereits gezeigten Daten hervorgeht (siehe Abbildung 19) benötigen die transgenen Zellstämme deutlich mehr Zeit, um das zugegebene Sanguinarin zu reduzieren und weiter abzubauen. Die Kapazität zur Reduktion von extern auftretendem Sanguinarin ist also in den transgenen Zell-Linien erwartungsgemäß geringer (siehe Tabelle 10). Damit scheint die Annahme berechtigt, dass sich Sanguinarin und die folgenden Benzophenanthridine bei der durch Elicitorzusatz ausgelösten Alkaloidproduktion früher bzw. stärker an der Zelloberfläche anreichern als im Wildtyp, und damit den Induktionsweg auf der Stufe der Phospholipase A_2 unterbrechen. Diese Annahme steht nicht im Widerspruch zum unveränderten Niveau der Phospholipase A_2 -Aktivität in den transgenen Zellstämmen (siehe unter 3.4.1), da bei der Herstellung der dort verwendeten gereinigten Plasmamembran-Vesikel die Alkaloide entfernt werden.

3.5.1.2 Phänotyp der hyper-elicitierbaren Zell-Linien (Gruppe II)

Diese Zellstämme reagieren auf niedrige Elicitorkonzentrationen mit einer circa dreifach höheren Bildungsrate von Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden als der Wildtyp. Dies ist zunächst mit der oben genannten Alkaloid-Hemmung der Phospholipase A_2 vereinbar, da diese Zell-Linien eine wesentliche Restaktivität an Sanguinarinreduktase besitzen (etwa 15 % des Wildtyps). Die resultierende Kapazität zur Reduktion von Sanguinarin und frühen Benzophenanthridinen sollte daher zumindest in der Phase der basalen Alkaloidbildung und dem für den Signaltransfer entscheidenden Zeitraum bis circa eine Stunde nach Elicitorkontakt ausreichenden Schutz des Signalzyklus ermöglichen.

Bei der Suche nach der Ursache der Überproduktion stellte sich heraus, dass das Produkt der Sanguinarinreduktase, Dihydrosanguinarin, bei externem Zusatz (2,5 μM) im Wildtyp eine vollständige Hemmung der frühen Biosynthese verursacht (siehe unter 3.4.6). Auch wenn der Dihydrosanguinarin-sensitive Schritt bisher nicht genau lokalisiert werden konnte, sprechen andere Daten für einen Angriff an der (S)-Norcoclaurin-6'-O-Methyltransferase (6'OMT), d.h. am Coclaurin-bildenden Enzym: nach Inui et al. (2007) ist dieses Enzym rate-limitierend für die gesamte Benzophenanthridin-Biosynthese, da seine Überexpression einen starken Anstieg der Biosyntheserate bewirkt. Proteom-Studien an elicitierten *Papaver*-Kulturen (Zulak et al., 2009) und der hier benutzten *Eschscholzia*-Kultur (Angelova et al., 2010) kommen zu dem gleichen Ergebnis. Im letzteren Fall wird jedoch die 4'OMT (das Reticulin-bildende Enzym) nach Elicitorzusatz am stärksten überexprimiert, welche allerdings eine erhebliche Nebenaktivität als 6'OMT besitzt (Inui et al., 2007).

Bei der Beurteilung der durch Dihydrosanguinarin bewirkten Hemmung muss auch die Kompartimentierung der Alkaloidbiosynthese berücksichtigt werden: die Sanguinarinreduktase ist ein lösliches Enzym im Zytoplasma (Weiss et al., 2006), ebenso wie die 6'OMT (Facchini und St-Pierre, 2005), welche deshalb gut für das dort durch die Sanguinarinreduktase produzierte Dihydrosanguinarin erreichbar ist. Das im Verlauf der Biosynthese gebildete Dihydrosanguinarin befindet sich dagegen sehr wahrscheinlich in Vesikeln, welche die Protopin-6-Hydroxylase und die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase enthalten (Heinze und Roos, unveröffentlicht; Klein und Roos, 2009; Facchini und St-Pierre, 2005). Die feedback-Hemmung der Alkaloidbiosynthese wird daher vermutlich nur durch das im Zytoplasma vorhandene Dihydrosanguinarin ausgelöst.

Die geringere Aktivität der Sanguinarinreduktase in den transgenen Zellstämmen sollte zu einer (lokalen) Verringerung von Dihydrosanguinarin und weiterer Dihydroalkaloide und damit zur Verminderung bzw. Aufhebung der Blockade in der frühen Alkaloidbiosynthese führen, sodass im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte Bildung von Alkaloiden möglich ist. Die vorhandene Restaktivität der Sanguinarinreduktase in dieser Gruppe hält wahrscheinlich die lokale Konzentration der Benzophenanthridine an der Zelloberfläche unter der Hemmkonzentration für die Phospholipase A₂, zumindest beim Empfang des Elicitor-Signals (im Gegensatz zu Gruppe I, siehe oben).

Der Unterschied in der Elicitierbarkeit der beiden Gruppen von transgenen Zellstämmen kommt nach dieser Vorstellung also durch die unterschiedliche Empfindlichkeit von Schlüsselenzymen für die Substrate und Produkte der Sanguinarinreduktase zustande. Eine vollständige Hemmung der Phospholipase A₂ *in vitro* erfordert mindestens 10 µM der aktivsten Benzophenanthridine (Heinze und Roos, unveröffentlicht). Die Hemmkonzentration von Dihydrosanguinarin, dem Produkt der Sanguinarinreduktase, für das vollständige Abschalten der frühen Alkaloidbiosynthese (siehe Abbildung 35) beträgt 2,5 µM. Da hier Ganzzellen verwendet wurden, kann die im Zytoplasma erreichte Konzentration noch darunter liegen, denn die Aufnahme der Alkaloide in die Zelle erfolgt passiv (Weiss et al., 2006). Deshalb erlaubt die Restaktivität der Sanguinarinreduktase in den Zell-Linien der Gruppe II eine Überproduktion aufgrund der Verminderung des Dihydrosanguinarins; in den Zellstämmen der Gruppe I (mit stark verminderter Sanguinarinreduktase-Aktivität) wird die Elicitierung aufgrund der Blockade der Phospholipase A₂ durch Benzophenanthridine gestoppt.

3.5.2 Einfluss der Sanguinarinreduktase auf das Alkaloidspektrum

3.5.2.1 Grundsätzliches zur Biosynthese

Detaillierte Untersuchungen des Alkaloidspektrums haben weitere Hinweise auf den Einfluss der Sanguinarinreduktase innerhalb der Biosynthesekette der Benzophenanthridine erbracht.

Zum Vergleich der Alkaloidmuster beider Gruppen sind Kenntnisse über die hohe Variabilität der Biosynthese hilfreich. Der Benzophenanthridin-Zweig beginnt mit der Bildung von Cheilanthifolin aus

Scoulerin. Das typische Grundgerüst der Benzophenanthridine wird jedoch erst durch die Protopin-6-Hydroxylase geschaffen, gefolgt von der nicht-enzymatischen Umlagerung ihres Produkts, 6-Hydroxyprotopin in Dihydrosanguinarin (Zenk, M.H., 1994; siehe auch Abbildung 1).

Wie aus Abbildung 39 hervorgeht, bestehen für die weitere Abfolge der Biosynthese nach Scoulerin grundsätzlich drei Möglichkeiten, d.h. die Bildung der Dioxolanguruppe kann zuerst an Ring A oder an Ring D erfolgen. Dadurch entstehen zwei Reihen von Metaboliten, von denen eine über Cheilanthifolin und Protopin zum Sanguinarin, die andere über Canadin und Allocryptopin zum Chelerythrin führt. Aus der erstgenannten Reihe leitet sich ein Seitenzweig ab, der von Cheilanthifolin zu Sinactin und N-Methylsinactin führt. Die Metabolite der Protopin-Reihe (ausgenommen Sanguinarin) dominieren das Spektrum des Wildtyps, N-Methylsinactin reichert sich in den transgenen Zellkulturen an. Die aus Canadin entstehenden Metabolite sind in allen verwendeten Kulturen in geringen Mengen nachweisbar (siehe Abbildung 18).

3.5.2.2 Zum basalen Alkaloidspektrum

Einen guten Ausgangspunkt zur Erklärung der extremen Unterschiede in den Biosynthese-Leistungen der transgenen Zell-Linien bieten die steady state-Konzentrationen der Intermediate.

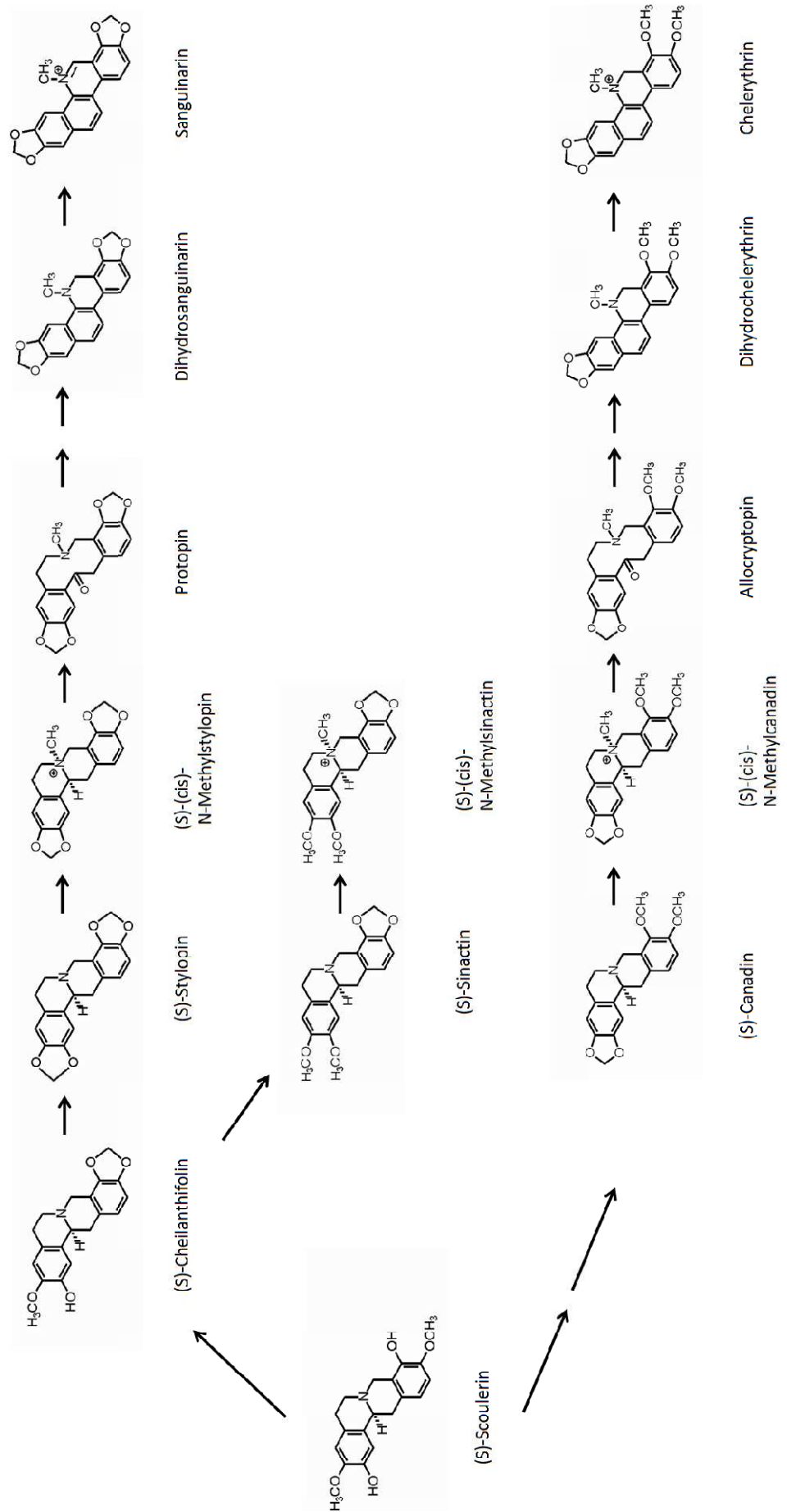
Im Wildtyp übersteigt die steady state-Konzentration des Protopins die der späteren Alkaloide um ein Mehrfaches (siehe Abbildung 18). In den nicht-elicitierbaren Stämmen ist der Protopin-Pool deutlich erniedrigt, in den hyper-elicitierbaren Stämmen tritt anstelle von Protopin dessen Vorläufer N-Methylstylopin in etwa gleicher Menge auf. Elicitor-Kontakt führt im Wildtyp zu einer Vervielfachung des Protopin-Gehalts; die vollständige Hemmung der Benzophenanthridin-Überproduktion durch Dihydrosanguinarin wird von einem fast völligen Fehlen des Protopins begleitet (siehe Abbildung 38).

Diese Befunde lassen den Protopin-Pool als eine Schaltstelle des Biosynthese-Weges erscheinen: sehr wahrscheinlich erfordert die spontane (nicht-katalysierte) Bildung von Dihydrosanguinarin aus 6-Hydroxyprotopin die schnelle Bereitstellung dieser Verbindung durch die Protopin-6-Hydroxylase. Dies erfolgt offenbar erst nach Akkumulation einer hohen Schwellenkonzentration des Substrats. Dieser Protopin-Gehalt wird in den nicht-elicitierbaren Zell-Linien nicht erreicht, wie die steady-state-Konzentrationen vermuten lassen. In den hyper-elicitierbaren Stämmen könnte das zuvor gebildete N-Methylstylopin an dessen Stelle treten, sodass der Konzentrationsdruck zur Substratanlieferung für die Protopin-6-Hydroxylase von diesem Präkursor ausgeht.

Für die regulatorische Wirkung des Protopin-Pools spricht auch, dass in den nicht-elicitierbaren Zell-Linien nicht nur geringere Gehalte dieser Verbindung auftreten, sondern offenbar auch Metabolite in einen Seitenzweig abfließen, d.h. in die Bildung des N-Methylsinactins, einem Homologen des N-Methylstylopins mit nur einem Dioxolan-Ring (siehe Abbildung 18).

Abbildung 39: Zweige der Alkaloid-Biosynthese nach (S)-Scoulerin

Erstellt nach Rueffer und Zenk, 1987; Bhakuni und Jain, 1986, sowie Takao et al., 1983.



3.5.2.3 Das Alkaloidspektrum elicitierter Zellen

Der Zusatz des Elicitors bewirkt in den Zellen des Wildtyps einen Anstieg fast aller, nach dem Scoulerin folgenden Metabolite, im Besonderen von Protopin (etwa 4fach) und Stylopin (etwa 150fach). In Übereinstimmung mit den oben genannten Argumenten sollte vor allem der enorme Gehalt des Protopin-Pools den Fluss in die Benzophenanthridin-Biosynthese beschleunigen. Dies äußert sich in einem erheblichen Anstieg der Dihydroalkaloid-Menge, von der nur ein geringer Teil (etwa 20 %) zu den Benzophenanthridinen oxidiert wird (siehe Abbildung 26). Erst bei hohen Elicitorkonzentrationen, welche auch zu hypersensitiver Reaktion und Zelltod führen, erfolgt eine Oxidation des überwiegenden Teils der Dihydroalkaloide (siehe Abbildung 27). Der Anstieg der Elicitorkonzentration führt also nicht zu einer Zunahme der Gesamt-Alkaloidbiosynthese, sondern nur zur Beschleunigung des letzten Schritts. Dies stimmt mit der gemessenen Aktivität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase überein (siehe auch Abbildung 33).

Die Auswirkungen der Elicitierung auf das Alkaloidspektrum der transgenen Zell-Linien wurden bisher nur für die leichter quantifizierbaren fluoreszierenden Alkaloide gemessen, um die Anzahl der benötigten hochaufgelösten MS-Messungen in sinnvollen Grenzen zu halten. In den hyper-elicitierbaren Zellstämmen kommt die durch niedrige Elicitorkonzentration ausgelöste Alkaloidproduktion auf der Stufe des Dihydrochelirubins zum Stehen, zumindest wird diese Verbindung gegenüber dem Mix der Endprodukte im Wildtyp (hauptsächlich die Dihydroverbindungen von 10-Hydroxysanguinarin, Chelirubin, 12-Hydroxychelirubin und Macarpin) deutlich angereichert. In den nicht elicitierbaren Zell-Linien, nicht aber im Wildtyp, akkumuliert dieselbe Verbindung, jedoch erst nach externem Zusatz von Sanguinarin. Offenbar wirkt Sanguinarin, welches in beiden Gruppen von transgenen Zellstämmen langsamer reduziert wird als im Wildtyp (siehe unter 3.3.6.1 und 3.3.7.1), hemmend auf die Hydroxylierung von Dihydrochelirubin. Es ist gut vorstellbar, dass diese Reaktion bei hohem Metabolitfluss rate-limitierend wird und damit zur Anhäufung von Dihydrochelirubin führt.

3.5.3 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der silencing-Experimente haben erhebliche, kontrollierende Einflüsse der Sanguinarinreduktase auf die Biosynthese der Benzophenanthridine gezeigt. Es wurde gefunden, dass sowohl die Substrate als auch die Produkte dieses Enzyms, vor allem Sanguinarin und Dihydrosanguinarin, in den Fluss der Biosynthese eingreifen. Zu den Auswirkungen des silencings gehören vor allem

- die Hemmung der frühen Biosynthese (vor der Bildung des zentralen Intermediats Reticulin) durch das Produkt, Dihydrosanguinarin;

- die Hemmung des LPC/ Δ pH-Signalwegs auf der Stufe der Phospholipase A₂ durch das Substrat, Sanguinarin. Dies hat die verminderte Expression der Biosynthese-Enzyme zur Folge, von denen BBE und 4'OMT auf mRNA-Ebene und Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase auf Aktivitätsebene analysiert wurden;
- die Hemmung der Hydroxylasen der Biosynthese bei der Umsetzung von Dihydrochelirubin und N-Methylstylopin, vermutlich durch das Substrat, Sanguinarin.

Diese Hinweise von physiologischer und zellbiologischer Ebene rechtfertigen weiterführende Experimente, unter anderem die Prüfung des Einflusses von Dihydrosanguinarin und Sanguinarin auf die Biosynthese-Enzyme *in vitro*. Dies kann zum Beispiel mit Hilfe rekombinanter Enzyme geschehen, die in *Eschscholzia* und verwandten Spezies weitgehend kloniert wurden (Übersicht unter anderem in Ziegler und Facchini, 2008). Zur Ermittlung der Spezifität können verschiedene Benzophenanthridine, die beispielsweise aus elicitierten Zellen mittels HPLC isoliert werden können, sowie strukturähnliche Alkaloide der Benzylisochinolinfamilie verwendet werden.

Die Sanguinarinreduktase dient also nicht nur der Entgiftung toxischer Benzophenanthridine, sondern trägt wesentlich dazu bei, dass die Biosynthesekapazität dieser Phytoalexine streng reguliert wird. Es ist deshalb zu erwarten, dass dieses Enzym wesentlich für den Erhalt der Fitness der Benzophenanthridin-Produzenten ist und seine Entstehung und Entwicklung ein essentielles Ereignis in der Evolution der Alkaloid-produzierenden Papaveraceae darstellt.

4 Ergebnisse – Teil 2: Beiträge zur Evolution der Sanguinarinreduktase

4.1 Einführung und Zielstellung

Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels haben gezeigt, dass die Sanguinarinreduktase eine essentielle Funktion in der Regulation des Alkaloidstoffwechsels besitzt. Obwohl nicht direkt an der Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide beteiligt, hat das vollständige oder partielle Fehlen des Enzyms erhebliche Konsequenzen für die Biosynthesefähigkeit – vom totalen Ausfall bis zur Überproduktion. Offenbar existiert ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivität der Sanguinarinreduktase und der Fähigkeit zur Benzophenanthridin-Biosynthese.

Im Folgenden wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob die Sanguinarinreduktase nur in Benzophenanthridin-produzierenden Pflanzen vorkommt und ob über die Ähnlichkeit mit homologen Genen/Proteinen anderer Pflanzen die Evolution dieses Enzyms nachvollzogen werden kann (siehe auch unter 1.3).

In einer Auswahl von 189 Pflanzen, vorzugsweise Papaveraceae und Ranunculaceae (eine Liste aller bearbeiteten Pflanzen ist im Anhang unter 7.7 aufgeführt), wurde nach folgenden Hinweisen für die Existenz einer Sanguinarinreduktase gesucht, wobei von den entsprechenden Charakteristika in *Eschscholzia californica* ausgegangen wurde:

1. DNA-Sequenzen mit Homologie zum Gen der Sanguinarinreduktase,
2. Proteine mit Bindefähigkeit zu einem Sanguinarinreduktase-spezifischen Antikörper,
3. lösliche Proteine mit Sanguinarinreduktase-Aktivität.

4.2 Suche nach Sanguinarinreduktase-ähnlichen Sequenzen in verschiedenen Pflanzen mittels PCR

4.2.1 Suche in öffentlichen Datenbanken

Die Suche nach Pflanzen mit Sanguinarinreduktase-ähnlichen Genen bzw. Proteinen in öffentlich zugänglichen Datenbanken ergab relativ wenige Treffer: Es konnten 31 Proteine aus 15 verschiedenen Pflanzen mit Übereinstimmungen zwischen 65 und 50 % gefunden werden (Suche in NCBI-Datenbank, blastp, vom 30.12.2011). Dies beruht im Wesentlichen auf der geringen Anzahl und Vielfalt der dort enthaltenen Pflanzenspezies und Gene mit Relation zum Sekundärstoffwechsel.

Beschränkt man die so gefundene Auswahl auf die zentrale, das aktive Zentrum umfassende Region von 26 Aminosäuren (siehe auch unter 4.2.2), entsteht das in Abbildung 40 gezeigte alignment. Die Sequenz der Sanguinarinreduktase aus *Eschscholzia californica* unterscheidet sich von allen Homologen durch zahlreiche Veränderungen in den Aminosäuren des aktiven Zentrums. Außerdem

ist in keinem der Homologen das Insert SEDVIDASFSGPM enthalten. Letzteres hat sich bei Mutagenese-Experimenten als wesentlich für die Enzymaktivität erwiesen, obwohl es nicht zur Binderegion von Sanguinarin oder NAD(P)H gehört (Vogel et al., 2010).

Abbildung 40: alignment der verschiedenen Proteinsequenzen des aktiven Zentrums aus öffentlichen Datenbanken

Das alignment wurde wie unter 2.9.7 beschrieben erstellt. Aminosäuren, die sich von der Konsensus-Sequenz (siehe letzte Zeile) unterscheiden, sind farbig hinterlegt. Gleiche Proteinsequenzen aus derselben Pflanze, die in der NCBI-Datenbank mehrfach unter verschiedenen Bezeichnungen gefunden wurden, sind nur einmal dargestellt. Ziffern hinter den Speziesnamen dienen zur Unterscheidung verschiedener Proteinsequenzen aus derselben Pflanzenart.

Medicago trunculata	H I V L V G S M G G	T N P N H P L N S L	G N G N I L	26
Brachypodium distachyon	H I V L V G S M G G	T N P N H P L N S L	G N G N I L	26
Oryza sativa	H I V L V G S M G G	T N P N H P L N S L	G N G N I L	26
Zea mays	H I V L V G S M G G	T N P N H P L N S M	G N G N I L	26
Arabidopsis lyrata	H I V V V G S M G G	T N P D H P L N K L	G N G N I L	26
Arabidopsis thaliana (2)	H I V V V G S M G G	T N P D H P L N K L	G N G N I L	26
Glycine max	H I V L V G S M G G	T D L N H P L N S L	G N G N I L	26
Vitis vinifera	H I V L V G S M G G	T D L N H P L N S L	G N G N I L	26
Picea sitchensis	Q I V L V G S M G G	T N P N H P L N S L	G N G K I L	26
Populus trichocarpa	Q I V L V G S M G G	T N L N H P L N S L	G N G N I L	26
Ricinus communis	Q I V L V G S M G G	T N L N H P L N S L	G N G N I L	26
Arabidopsis thaliana (3)	Q I V L V G S M G G	T N I N H P L N S I	G N A N I L	26
Arabidopsis thaliana	Q I V L V G S M G G	T N I N H P L N S I	G N A N I L	26
Brachypodium distachyon (2)	Q I V L V G S M G G	T D L N H P L N K L	G N G N I L	26
Hordeum vulgare	Q I V L V G S M G G	T D I N H P L N K L	G N G N I L	26
Zea mays (2)	H I V L V G S M G G	T D I N H P L N K L	G N A N I L	26
Sorghum bicolor	H I V L V G S M G G	T D T N H P L N K L	G N A N I L	26
Oryza sativa (2)	Q V V L V G S M G G	T D V N H P L N K L	G N A N I L	26
Physcomitrella patens (3)	Q I V L V G S M G G	T D E A N P L N S L	G N G N I L	26
Physcomitrella patens (2)	H I V L V G S M G G	Q N P N H M L N S L	G N G K I L	26
Physcomitrella patens	H I V I V G S M G G	Q N P N H M L N S L	G N G K I L	26
Selaginella moellendorffii (2)	Q I V L V G S M G G	T D D N H P L N S L	G N G K I L	26
Selaginella moellendorffii	Q I V L V G S M G G	T D E N H P L N S L	G N G K I L	26
Selaginella moellendorffii (3)	H V V L V G S M G G	T N E N H P L N L L	G N G K I L	26
Eschscholzia californica	H I V L V G S M G G	C D P D H F L N H M	G N G N I L	26
Consensus	H I V L V G S M G G	T N P N H P L N S L	G N G N I L	

Dieses unzureichende Suchergebnis wurde zum Anlass genommen, ein PCR-Screening nach DNA-Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den beiden essentiellen Regionen der Sanguinarinreduktase (d.h. aktives Zentrum und Insert SEDVIDASFSGPM) in einer Auswahl der oben genannten Pflanzenspezies durchzuführen (Methodik siehe unter 2.9.1 – 2.9.7).

4.2.2 Suche nach Gensequenzen mit Ähnlichkeit zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase

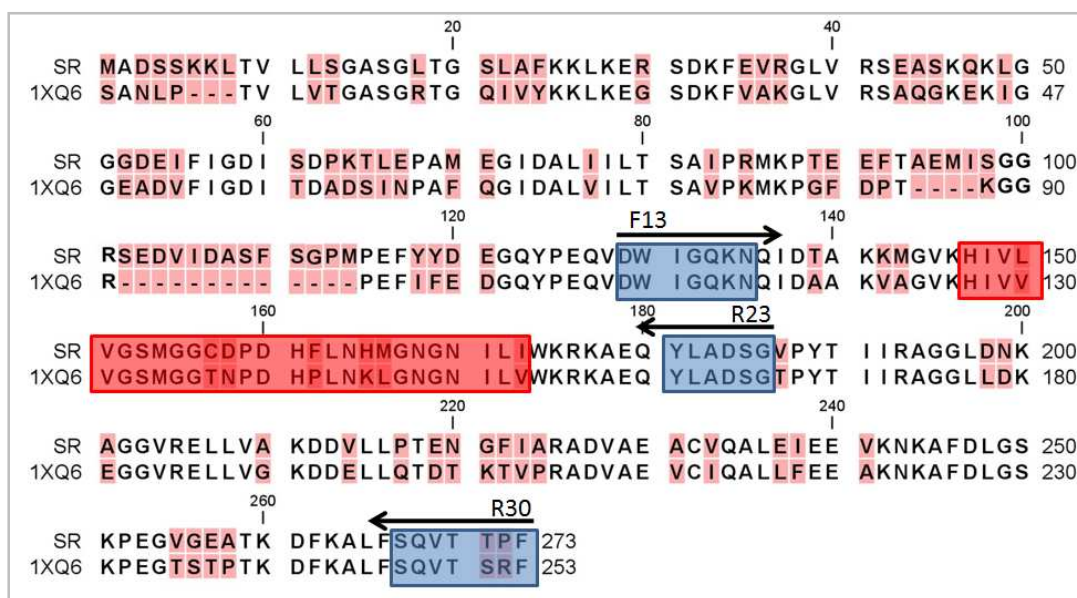
Als Ausgangspunkt diente ein Vergleich der Proteinsequenzen von Sanguinarinreduktase und 1XQ6, dargestellt in Abbildung 41.

Bei dem Protein 1XQ6 handelt es sich um ein enzymatisch inaktives Homologon aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine der Sanguinarinreduktase ähnliche Raumstruktur besitzt (siehe auch unter 1.3). Um sicherzustellen, dass homologe Sequenzen in Genen bzw. Proteinen unabhängig von ihrer

Sanguinarinreduktase-Aktivität gefunden werden, wurden bei der Ableitung der Primer übereinstimmende Regionen zwischen Sanguinarinreduktase und 1XQ6 gewählt, welche das aktive Zentrum (Aminosäuren 147-173) flankieren. Dort wurden die für die Enzymaktivität wesentlichen Unterschiede erwartet (Vogel et al., 2010). Um die Wahrscheinlichkeit zum Auffinden Sanguinarinreduktase-ähnlicher Gene auch in unbekanntem Templates noch weiter zu erhöhen, wurden zwei verschiedene Primer-Kombinationen genutzt (siehe Abbildung 41).

Abbildung 41: alignment von Sanguinarinreduktase (SR) und 1XQ6 zur Suche nach SR-ähnlichen aktiven Zentren

Dargestellt sind die Proteinsequenzen beider Proteine (Methodik unter 2.9.7), wobei die nicht übereinstimmenden Aminosäuren rosa hinterlegt sind. Das aktive Zentrum ist rot umrandet, die blau markierten Sequenzen waren Vorlage für das Erstellen der Primer auf DNA-Ebene. Sie sind gekennzeichnet mit dem jeweiligen Namen und der späteren Leserichtung der Taq-Polymerase.



Die durch PCR ermittelten, dem aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase ähnlichen DNA-Sequenzen wurden durch Translation *in silico* in korrespondierende Proteinsequenzen umgeschrieben, um die Vergleichbarkeit mit homologen Proteinen anderer Pflanzen zu ermöglichen. Das alignment dieser Sequenzen ist in Abbildung 42 dargestellt. Dieselben Daten werden in Abbildung 43 als phylogenetischer Stammbaum gezeigt. Andere Algorithmen liefern ähnliche Ergebnisse (mit ClustalW erstelltes alignment derselben Sequenzen im Anhang unter 7.8).

In der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Pflanzen sind homologe Sequenzen nicht vorhanden (bzw. durch PCR nicht amplifizierbar). Nur 50 von 189 Pflanzen zeigen erkennbare Homologie mit der Sequenz, die für das aktive Zentrum des Enzyms kodiert. Davon stimmen 14 der gefundenen Proteinsequenzen vollständig mit der Sanguinarinreduktase aus *Eschscholzia californica* überein. Charakteristisch für diese Gruppe ist das Auftreten von C₁₅₇ und D₁₆₀. Innerhalb dieser „*Eschscholzia*“-Gruppe befinden sich drei Genprodukte aus Pflanzen, für die keine

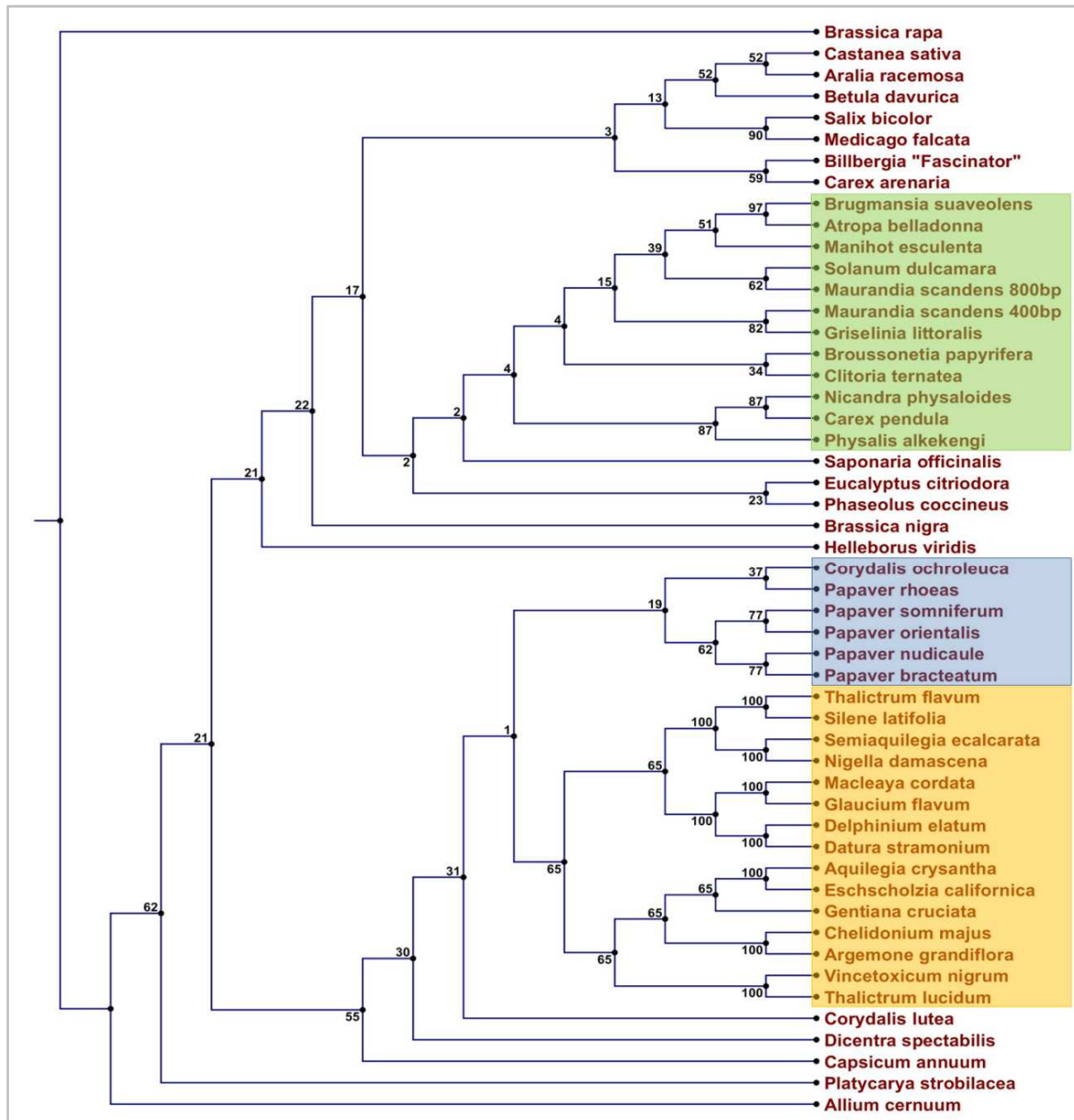
Abbildung 42: alignment der Peptidsequenzen mit Homologie zum aktiven Zentrum

Dargestellt sind die 50 Proteinsequenzen, die nach PCR und anschließender Sequenzierung aus den DNA-Abschnitten mit Homologie zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase abgeleitet wurden (siehe 2.9.1 – 2.9.7). Aminosäuren, die sich von der Konsensus-Sequenz (letzte Zeile) unterscheiden, sind farbig hinterlegt. Jede Sequenz wurde in mindestens zwei getrennt hergestellten DNA-Extrakten derselben Pflanze gefunden. Eine Liste mit allen bearbeiteten Pflanzen findet sich im Anhang (Daten teilweise aus Müller, H. U., Diplomarbeit, 2011).

		157	160																
Eschscholzia californica	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Aquilegia crisantha	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Argemone grandiflora	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Chelidonium majus	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Datura stramonium	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Delphinium elatum	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Glaucium flavum	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Macleaya cordata	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Nigella damascena	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Semiaquilegia ecalcarata	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Silene latifolia	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Thalictrum flavum	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Thalictrum lucidum	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Vincetoxicum nigrum	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Gentiana cruciata	HI - VLVGSMG	G	C	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Papaver rhoeas	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Papaver bracteatum	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Papaver nudicaule	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Papaver orientale	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Papaver somniferum	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Corydalis ochroleuca	HI - VLVASMG	G	T	D	P	D	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Corydalis lutea	HI - VLVASMG	G	M	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Capsicum annuum	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	26
Dicentra spectabilis	HI SMLVGS	G	C	D	P	D	H	F	L	N	D	M	G	N	G	N	I	L	27
Atropa belladonna	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Brugmansia suaveolens	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Carex pendula	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	G	L	G	N	D	N	I	L	26
Clitoria ternatea	HI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Griselinia littoralis	QI - VLVGSMG	G	T	N	L	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Maurandia scandens 400bp	QI - VLVGSMG	G	T	N	L	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Maurandia scandens 800bp	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Nicandra physaloides	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	G	L	G	N	D	N	I	L	26
Physalis alkekengi	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	G	L	G	N	D	N	I	L	26
Solanum dulcamara	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Manihot esculenta	QI - VLVGSMG	G	T	N	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Aralia racemosa	QI - VLVGSMG	G	T	D	L	S	N	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Castanea sativa	QI - VLVGSMG	G	T	D	L	N	N	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Betula davurica	QV - VLVGSMG	G	T	D	L	N	N	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Carex arenaria	QI - VLVGSMG	G	T	D	V	N	H	P	L	N	S	I	G	N	G	N	I	L	26
Medicago falcata	QI - VLVGSMG	G	T	D	L	N	H	P	L	N	S	L	G	D	G	N	I	L	26
Salix bicolor	QI - VLVGSMG	G	T	D	L	N	H	P	L	N	S	L	G	G	G	N	I	L	26
Phaseolus coccineus	HV - VLVGSMG	G	T	N	T	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Broussonetia papyrifera	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Eucalyptus citriodora	QV - VLVGSMG	G	T	N	L	D	H	P	L	N	S	L	G	N	G	N	I	L	26
Billbergia "Fascinator"	HI - VLVGSMG	G	T	D	V	N	N	P	L	N	S	I	G	N	G	N	I	L	26
Saponaria officinalis	HI - VLVGSMG	G	T	N	A	N	H	P	L	N	S	L	A	N	G	N	I	L	26
Brassica nigra	QI - VLEWSMG	G	T	N	I	N	N	P	L	N	S	I	G	N	A	N	I	L	26
Allium cernuum	- - - VEGSMG	V	C	D	P	D	F	F	V	N	H	M	G	N	G	N	I	L	23
Platycarya strobilacea	QIG - LVGSMG	G	T	N	L	I	N	P	L	N	T	W	G	N	G	N	K	L	26
Helleborus viridis	HI - VLVGSMC	G	T	I	P	D	H	P	L	N	S	I	D	N	G	N	I	L	26
Brassica rapa	- - - - -	-	-	E	P	D	H	F	L	N	F	M	G	N	G	N	I	L	15
Consensus	HI - VLVGSMG	G	T	D	P	N	H	F	L	N	H	M	G	N	G	N	I	L	

Abbildung 43: Kladogramm der gefundenen Sanguinarinreduktase-ähnlichen Sequenzen des aktiven Zentrums

Das Kladogramm wurde mit Hilfe der Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) erstellt (siehe auch unter 2.9.7). An den Verzweigungspunkten ist der bootstrapping-Wert angegeben. Gruppen von Spezies mit hoher Ähnlichkeit sind markiert.



Benzophenanthridin-Biosynthese bekannt ist (*Silene*, *Gentiana* und *Vincetoxicum*). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Anwesenheit Sanguinarinreduktase-ähnlicher Gene nicht unbedingt an die Fähigkeit zur Alkaloidbildung gebunden ist.

Die nächsten Verwandten finden sich in der „*Papaver*“-Gruppe. Diese teilen mit der „*Eschscholzia*“-Gruppe die Aminosäuren F₁₆₂, H₁₆₅ und M₁₆₆, jedoch meist nicht C₁₅₇ und D₁₆₀ (siehe oben). Wie später gezeigt wird, besitzen alle Pflanzen mit messbarer Sanguinarinreduktase-Aktivität die Aminosäuren F₁₆₂, H₁₆₅ und M₁₆₆.

Weniger homologe, jedoch noch erkennbar verwandte Sequenzen finden sich unter anderem in den Solanaceae (*Atropa belladonna*, *Solanum dulcamara*, *Physalis alkekengi*, und andere), Fabaceae (*Phaseolus coccineus* und *Clitoria ternatea*), sowie der Scrophulariaceae *Maurandia scandens*. Diese Gruppe zeigt nicht die oben genannten Aminosäuren des aktiven Zentrums und weist außerdem weitere Unterschiede auf, zum Beispiel Asparagin statt Asp₁₅₈ oder Prolin statt Phe₁₆₂.

4.2.3 Suche nach dem Insert SEDVIDASFSGPM

Das Vorhandensein eines Inserts zwischen Aminosäure 102 und 114 im Protein der Sanguinarinreduktase ist einer der auffälligsten Unterschiede zu anderen homologen Proteinen (siehe im Vergleich mit 1XQ6 in Abbildung 44) und neben dem aktiven Zentrum ein für die enzymatische Aktivität essentielles Strukturelement (Vogel et al., 2010).

Daher wurde in allen Pflanzen, bei denen zuvor eine DNA-Sequenz für ein der Sanguinarinreduktase ähnliches aktives Zentrum nachgewiesen worden war, nach diesem Insert gesucht. Nach mehreren Tests wurden mit den in Abbildung 44 gezeigten Primer-Kombinationen optimale Ansatzpunkte für die Amplifizierung des SEDVIDASFSGPM-Inserts und seiner Homologen gefunden.

Die Proteinsequenzen, die aus den DNA-Amplifikaten dieser Suche abgeleitet wurden, sind in Abbildung 45 dargestellt. Abbildung 46 zeigt dieselben Daten als phylogenetischen Stammbaum.

Abbildung 44: alignment von Sanguinarinreduktase (SR) und 1XQ6 zur Insertsuche

Dargestellt sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider Proteine (Methodik siehe 2.9.7), wobei die nicht übereinstimmenden Aminosäuren rosa hinterlegt sind. Das Insert ist rot gekennzeichnet, die blau markierten Sequenzen davor und danach waren Vorlage für das Erstellen der Primer auf DNA-Ebene. Sie sind gekennzeichnet mit dem jeweiligen Namen und der späteren Leserichtung der Taq-Polymerase.

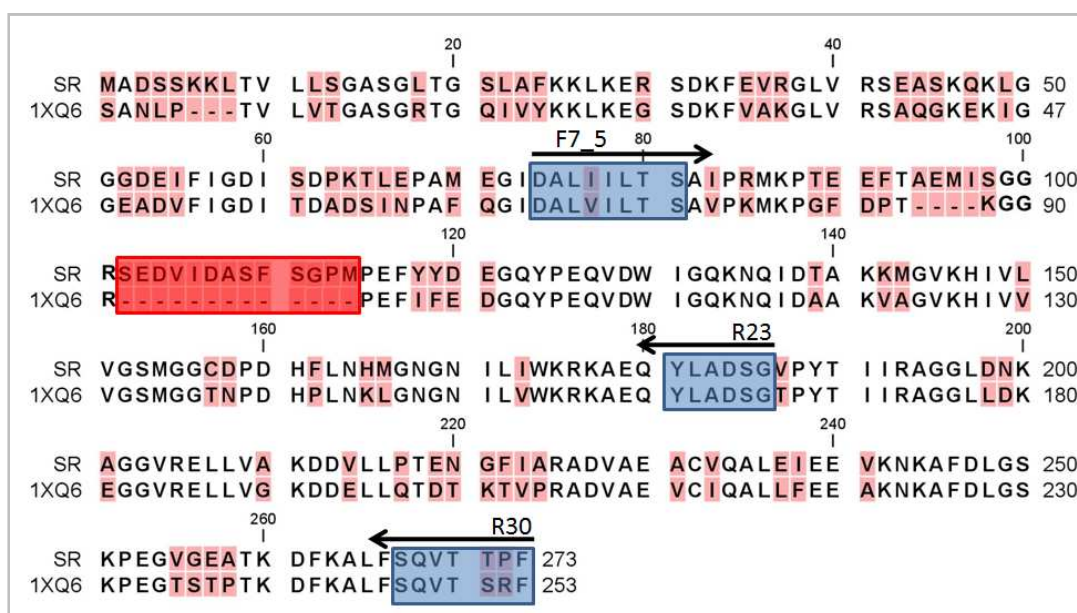


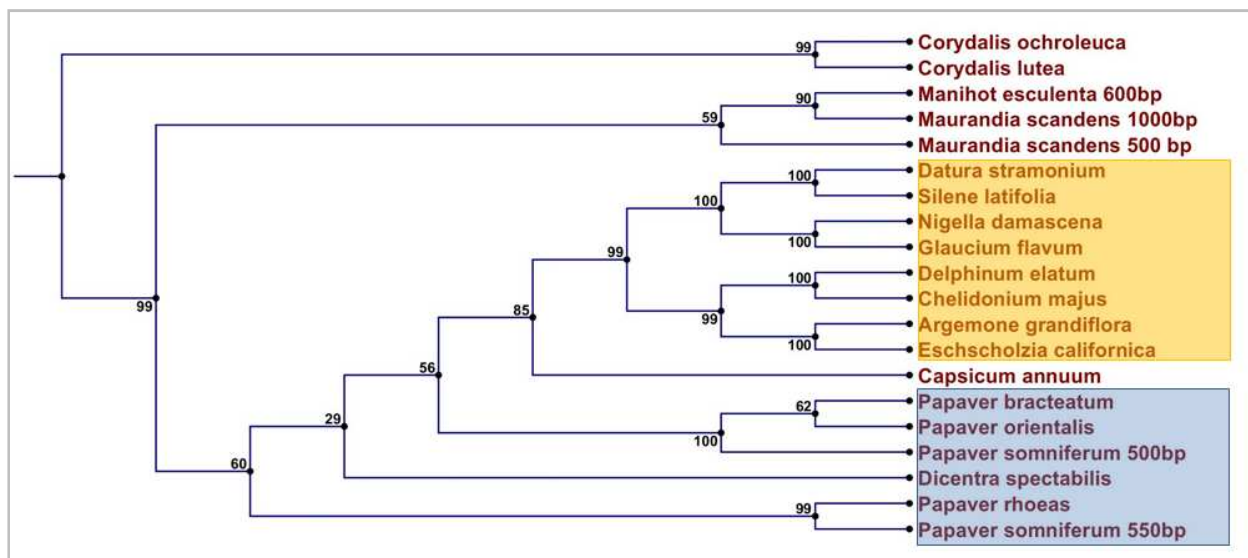
Abbildung 45: alignment der Peptidsequenzen mit Ähnlichkeit zum Insert SEDVIDASFGPM

Dargestellt sind die Proteinsequenzen, die mittels PCR und anschließender Sequenzierung aus den DNA-Abschnitten mit Homologie zum Insert der Sanguinarinreduktase abgeleitet wurden. Aminosäuren, die sich von der Sequenz aus *Eschscholzia californica* unterscheiden, sind rosa hinterlegt. Die Sequenzen sind nach absteigender Ähnlichkeit sortiert. Jede Sequenz wurde in mindestens zwei verschiedenen DNA-Extrakten derselben Pflanze gefunden (Methodik siehe unter 2.9.1 – 2.9.7).

Eschscholzia californica	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Argemone grandiflora	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Chelidonium majus	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Delphinium elatum	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Glaucium flavum	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Nigella damascena	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Silene latifolia	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Datura stramonium	SEDVI - - - DA SFSGPM	13
Papaver somniferum 500bp	AEDLI - - - DG SFQGS I	13
Papaver somniferum 550bp	AEDVFGE - SF DFNGPM	15
Papaver rhoeas	AEEVFMEDSF DFNGPM	16
Papaver orientale	AEDLI - - - DG SFQGT I	13
Papaver bracteatum	AEDLI - - - DG SFQGT I	13
Dicentra spectabilis	VEDYMNE - DG SFHENM	15
Capsicum annuum	RKDVI - - - DA SFSWPM	13
Corydalis lutea	RAETYFNKDG SLSEDI	16
Corydalis ochroleuca	- - - - - FNKDG SLSEDV	11
Maurandia scandens 1000bp	- - - - - - - - TYSGGR	6
Maurandia scandens 500 bp	GEPGL - - - - - S I S G - R	10
Manihot esculenta 600bp	- - - - - - - - SVQGGR	6

Abbildung 46: Kladogramm der Sequenzen mit Ähnlichkeit zum Insert

Das Kladogramm wurde mit Hilfe der Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) erstellt (siehe auch 2.9.7). An den Verzweigungspunkten ist der bootstrapping-Wert angegeben. Gruppen von Spezies mit hoher Ähnlichkeit sind markiert.



Es wird deutlich, dass die meisten Gene, welche ein mit der Sanguinarinreduktase übereinstimmendes aktives Zentrum besitzen, auch die Sequenz für das Insert SEDVIDASFGPM enthalten, mit Ausnahme von *Macleaya cordata*. Auch hier zeigt sich die „Papaver-Gruppe“ (blau) als

nächster Verwandter der „*Eschscholzia*-Gruppe“ (orange), wie bereits beim Vergleich der aktiven Zentren. Dies stimmt zunächst mit früheren Befunden zur Enzymstruktur überein, das heißt der Tatsache, dass ein „korrektes“ aktives Zentrum und Insert SEDVIDASFSGPM nur gemeinsam ein aktives Enzym ergeben (siehe auch unter 4.5). Allerdings ist die Homologie des Inserts, besonders in der *Papaver*-Gruppe, wenig ausgeprägt, d.h. es treten auch in Pflanzen mit aktiver Sanguinarinreduktase deutliche Sequenzunterschiede auf, zum Beispiel in *Papaver rhoeas* oder *Corydalis ochroleuca*. Andererseits wurden auch Homologe des Inserts in Pflanzen gefunden, in denen weder eine aktive Sanguinarinreduktase nachgewiesen wurde noch die Biosynthese von Benzophenanthridinen bekannt ist, wie etwa bei *Maurandia scandens* oder *Capsicum annum*.

4.3 Immunologischer Nachweis von Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein

4.3.1 Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in *Eschscholzia californica*

Zum selektiven Nachweis der Sanguinarinreduktase und des inaktiven Homologons 1XQ6 auf Proteinebene standen zwei Antiseren mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung: Während das anti-1XQ6-Antiserum beide Proteine mit etwa gleicher Sensitivität erkennt, reagiert das anti-Sanguinarinreduktase-Antiserum wesentlich empfindlicher mit dem Protein der Sanguinarinreduktase (siehe Abbildung 47). Dieses Serum erkennt wahrscheinlich vorrangig das Insert SEDVIDASFSGPM (Vogel et al., 2010).

Um das Protein der Sanguinarinreduktase ebenso wie potentielle inaktive Homologe sichtbar zu machen, wurde ein paralleles Screening mit beiden Antiseren in den Pflanzen durchgeführt, welche eine DNA-Sequenz mit Homologie zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase besitzen.

Um die Untersuchung der umfangreichen Pflanzenauswahl (und die Entnahme des Untersuchungsmaterials) zu erleichtern, wurde zunächst überprüft, in welchen Pflanzenteilen die Aktivität der Sanguinarinreduktase oder ähnlicher Enzyme erwartet werden kann.

Wie aus dem Western Blot in Abbildung 47 A hervorgeht, ist die Sanguinarinreduktase in allen untersuchten Organen (Wurzel, Stengel, Blatt, Blüte und Frucht) von *Eschscholzia californica* nachweisbar, wobei diese Proben ähnlich wie die Zellkultur aufgeschlossen wurden. In Blättern von *Arabidopsis thaliana* (Spur 3) detektiert das spezifische anti-Sanguinarinreduktase-Antiserum bei der erwarteten Molmasse von etwa 34 kDa keine Bande, wohl aber nach Zusatz von Extrakten aus *Eschscholzia* (Spur 1 und 2).

Das anti-1XQ6-Antiserum (Abbildung 47 B, Spur 3) erkennt in Blättern von *Arabidopsis thaliana* die erwartete Bande bei circa 27 kDa. Zur Unterscheidbarkeit der Banden der Sanguinarinreduktase und 1XQ6-Proteins wurden Mischungen aus *Arabidopsis*- und *Eschscholzia*-Extrakten analysiert; diese zeigten jeweils beide Banden (Spur 1 und 2, Abbildung 47 B).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Suche nach dem Protein und später auch der Enzymaktivität auf die Blätter der Untersuchungspflanzen beschränkt.

Die experimentelle Fähigkeit zum selektiven Nachweis beider homologen Proteine erlaubt erste Hinweise auf ihre Anwesenheit in beiden Pflanzen: in *Arabidopsis thaliana* ist die Sanguinarinreduktase nicht enthalten (siehe auch Abbildung 47 A), in *Eschscholzia californica* kommen wahrscheinlich in den meisten Organen beide Proteine vor, während in der Wurzel nur die Sanguinarinreduktase exprimiert wird. Dies zeigt eine organspezifische Expression dieser Proteine und die erwartete Rolle der Sanguinarinreduktase in der Pathogenabwehr der unterirdischen Pflanzenteile. Dafür spricht auch die Zunahme der Proteinmenge der Sanguinarinreduktase nach Kontakt der Zellkultur (welche aus Zellschichten der oberen Wurzel und des Hypokotyls etabliert wurde) mit Sanguinarin (siehe Abbildung 48).

Abbildung 47: Immunologischer Nachweis des Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Proteins

Spur 1: Proteinmischung aus *Arabidopsis thaliana*, Blatt und *Eschscholzia californica*, Stengel; Spur 2: Proteinmischung aus *Arabidopsis thaliana*, Blatt und *Eschscholzia californica*, Wurzel; Spur 3: *Arabidopsis thaliana*, Blatt; Spur 4: *Eschscholzia californica*, Frucht; Spur 5: *Eschscholzia californica*, Blüte; Spur 6: *Eschscholzia californica*, Stengel; Spur 7: *Eschscholzia californica*, Wurzel; Spur 8: *Eschscholzia californica*, Blatt; Spur 9: *Eschscholzia californica*, Suspensionskultur.

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Hilfe
A - des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums oder
B - des anti-1XQ6-Antiserums
detektiert (nach 2.10.5). Die Pfeile rechts markieren die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei etwa 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben (Daten teilweise aus Müller, H. U., Diplomarbeit, 2011).

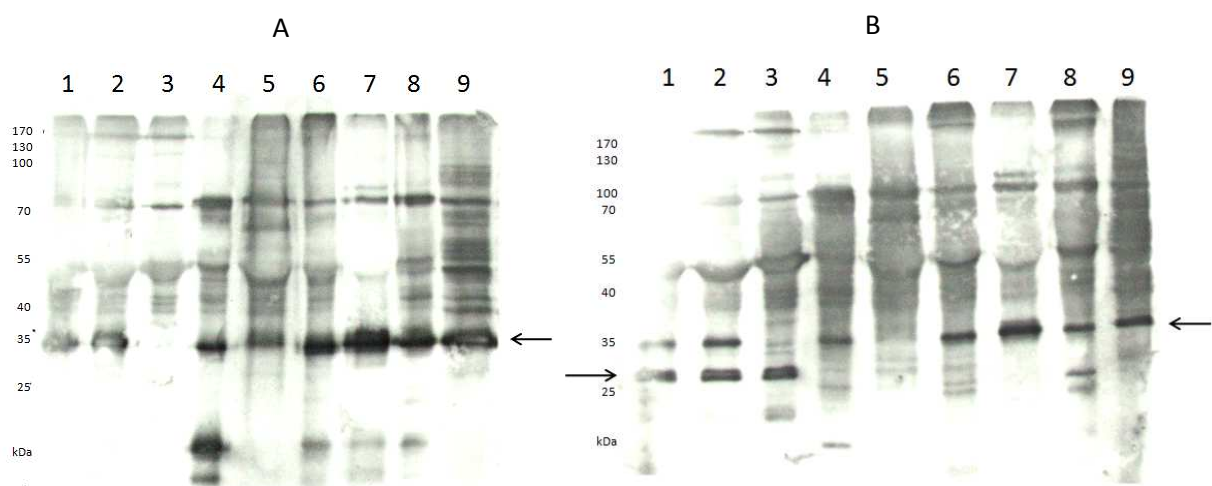
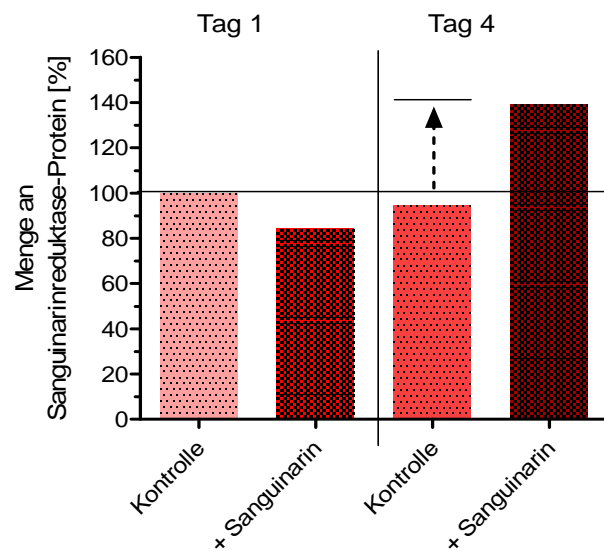


Abbildung 48: Expression der Sanguinarinreduktase nach täglicher Sanguinarinzugabe

Gezeigt ist ein Vergleich der Mengen an Sanguinarinreduktase-Protein der Zellkultur von *Eschscholzia californica* am ersten und vierten Tag nach täglicher Zugabe von 10 μ M Sanguinarin. Entsprechende Kontrollen ohne Alkaloidzugabe wurden mitgeführt. Die Proben wurden 4 Stunden nach Sanguinarzugabe genommen und wie unter 2.10.1.2 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend wurden jeweils 5 μ g der Extrakte der löslichen Proteine auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden schließlich auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (Methodik siehe 2.10.5). Die so erhaltenen Banden des Sanguinarinreduktase-Proteins wurden wie unter 2.10.5.6 beschrieben ausgewertet, wobei der Wert der unbehandelten Kontrollkultur an Tag 1 willkürlich auf 100 % gesetzt wurde.



4.3.2 Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in ausgewählten Pflanzen

Um zu prüfen, ob die in den verschiedenen Pflanzen mittels PCR gefundenen DNA-Abschnitte mit der Anwesenheit von Sanguinarinreduktase-ähnlichen Proteinen korrelieren, wurden Proteinextrakte dieser Arten hergestellt und nach SDS-Gelelektrophorese Western Blots angefertigt (siehe 2.10.5).

Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der Befunde aus allen ausgewählten Pflanzen, die Bilder der Blots sind im Anhang unter 7.9 dokumentiert.

Tabelle 12: Immunologische Nachweise von Sanguinarinreduktase- und 1XQ6-Protein in ausgewählten Pflanzen

Pflanzenspezies mit bekannter Benzophenanthridin-Biosynthese sind rot hervorgehoben, die Mitglieder der Papaveraceae und Ranunculaceae sind unterstrichen (Daten teilweise aus Müller, H. U., Diplomarbeit, 2011)

Pflanze	Detektiert mit Antiserum	
	anti-Sanguinarinreduktase	anti-1XQ6
<i>Allium cernuum</i>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Aquilegia crisantha</i></u>	40 kDa	27 kDa
<i>Arabidopsis thaliana</i>	kein Signal	27 kDa
<i>Aralia racemosa</i>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Argemone grandiflora</i></u>	34 kDa	kein Signal
<i>Atropa belladonna</i>	40 kDa	27 kDa
<i>Berberoa incana</i>	34 kDa	27 kDa
<i>Betula davurica</i>	kein Signal	25 kDa
<i>Billbergia ‚Fascinator‘</i>	34 kDa	28 kDa
<i>Brassica nigra</i>	34 kDa	27 kDa

Pflanze	Detektiert mit Antiserum	
	anti-Sanguinarinreduktase	anti-1XQ6
<i>Brassica rapa</i>	30 kDa	27 kDa
<i>Broussonetia papyrifera</i>	kein Signal	28 kDa
<i>Brugmansia suaveolens</i>	34 kDa	28 kDa
<i>Capsicum annuum</i>	32 kDa	25 kDa
<i>Carex arenaria</i>	32 kDa	25 kDa
<i>Carex pendula</i>	kein Signal	27 kDa
<i>Castanea sativa</i>	kein Signal	kein Signal
<u><i>Chelidonium majus</i></u>	38 kDa	27 kDa
<i>Clitoria ternatea</i>	kein Signal	25 kDa
<u><i>Corydalis lutea</i></u>	32 kDa	27 kDa
<u><i>Corydalis ochroleuca</i></u>	34 kDa	25 kDa
<i>Datura stramonium</i>	36 und 38 kDa	27 kDa
<u><i>Delphinium elatum</i></u>	34 kDa	27 kDa
<u><i>Dicentra spectabilis</i></u>	33 kDa	27 kDa
<i>Eucalyptus citriodora</i>	kein Signal	kein Signal
<i>Gentiana cruciata</i>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Glaucium flavum</i></u>	34 kDa	26 kDa
<i>Griselinia littoralis</i>	kein Signal	kein Signal
<u><i>Helleborus viridis</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Macleaya cordata</i></u>	34 kDa	kein Signal
<i>Manihot esculenta</i>	34 kDa	27 kDa
<i>Maurandia scandens</i>	kein Signal	kein Signal
<i>Medicago falcata</i>	kein Signal	27 kDa
<i>Nicandra physaloides</i>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Nigella damascena</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Papaver bracteatum</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Papaver orientalis</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Papaver rhoeas</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Papaver somniferum</i></u>	32 kDa	kein Signal
<i>Phaseolus coccineus</i>	kein Signal	25 kDa
<i>Physalis alkekengi</i>	kein Signal	25 kDa
<i>Platycarya strobilacea</i>	kein Signal	27 kDa
<i>Salix bicolor</i>	kein Signal	kein Signal
<i>Saponaria officinalis</i>	32 kDa	27 kDa
<u><i>Semiaquilegia ecalcarata</i></u>	34 kDa	27 kDa
<i>Silene latifolia</i>	33 kDa	27 kDa
<i>Solanum dulcamara</i>	kein Signal	28 kDa
<u><i>Thalictrum flavum</i></u>	kein Signal	27 kDa
<u><i>Thalictrum lucidum</i></u>	kein Signal	27 kDa
<i>Vincetoxicum nigrum</i>	40 kDa	27 kDa

Es ist klar erkennbar, dass die für die Sanguinarinreduktase spezifische Bande vorrangig in den Benzophenanthridin-produzierenden Pflanzen erscheint. Dagegen ist das inaktive Homologon 1XQ6 in praktisch allen untersuchten Pflanzen vorhanden. Überraschenderweise konnte in einigen

Papaver-Spezies kein Sanguinarinreduktase-Protein nachgewiesen werden, obwohl *Papaver*-Arten prinzipiell zur Benzophenanthridin-Biosynthese befähigt sind. Allerdings wurden die individuellen Probenpflanzen hierauf nicht untersucht, und es sind erhebliche Unterschiede in der Biosynthesekapazität bekannt. Die Daten sprechen jedoch auch dafür, dass Proteine mit Ähnlichkeit zur Sanguinarinreduktase in Pflanzen existieren, welche wahrscheinlich keine Sanguinarinreduktase-Aktivität besitzen, wie etwa in *Capsicum annuum*, *Vincetoxicum nigrum* oder *Brassica rapa* (siehe auch unter 4.4.2).

4.4 Nachweis der Sanguinarinreduktaseaktivität

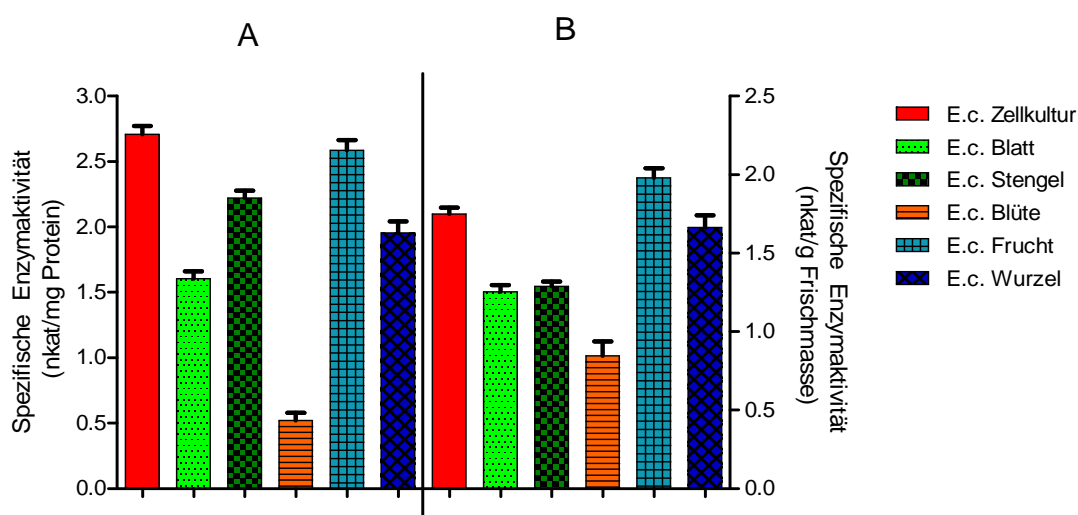
4.4.1 Sanguinarinreduktase-Aktivität in *Eschscholzia californica*

Als Ausgangspunkt wurde die Aktivität der Sanguinarinreduktase in Zellen der Suspensionskultur von *Eschscholzia californica* sowie in verschiedenen Teilen der Pflanze untersucht. Da *Eschscholzia californica* ihre Alkaloide hauptsächlich in der Wurzel akkumuliert, kann man zunächst annehmen, dass sich dort auch die größte Sanguinarinreduktase-Aktivität befindet.

Wie aus Abbildung 49 A ersichtlich, zeigt die Wurzel tatsächlich eine hohe Sanguinarinreduktase-Aktivität, die aber von den Früchten noch übertroffen wird. Ähnliche Verhältnisse zeigen sich beim Bezug auf die Frischmasse der jeweiligen Pflanzenteile (siehe Abbildung 49 B). Die Anwesenheit von Sanguinarinreduktase-Aktivität in den oberirdischen Pflanzenteilen erscheint sinnvoll, da dort die Bildung der Alkaloide durch Elicitoren induzierbar ist, und zwar in einem ähnlichen Maß wie in der Zellkultur (Angelova et al., 2010).

Abbildung 49: Enzymaktivität in Zellkultur und verschiedenen Pflanzenteilen von *Eschscholzia californica* (*E.c.*)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie unter 2.10.7 beschrieben. Dargestellt sind A) die spezifische Aktivität der Sanguinarinreduktase unter den löslichen Proteinen, B) die Verteilung der Aktivität der Sanguinarinreduktase unter verschiedenen Organen der Ganzpflanze (Daten teilweise aus Müller, H. U., Diplomarbeit, 2011).



4.4.2 Sanguinarinreduktase-Aktivität in ausgewählten Pflanzen

Anschließend wurde die Fähigkeit zur Reduktion von Sanguinarin in den löslichen Proteinen der Blätter solcher Pflanzen getestet, bei denen zuvor eine DNA-Sequenz mit Ähnlichkeit zum aktiven Zentrum der Sanguinarinreduktase nachgewiesen werden konnte. In den weitaus meisten dieser Pflanzen wurde keine Enzymaktivität gefunden (siehe Anhang unter 7.10). Die Anwesenheit einer zum Gen der Sanguinarinreduktase ähnlichen DNA-Sequenz führt also meist nicht zur Bildung eines entsprechenden Proteins.

Allerdings zeigten alle Pflanzen, in denen eine deutliche Sanguinarinreduktase-Aktivität gemessen wurde (siehe Abbildung 50), beim vorhergehenden immunologischen Test die Anwesenheit des Proteins der Sanguinarinreduktase (eine Ausnahme: *Papaver rhoeas*). Dies unterstreicht nicht nur die prinzipielle Zuverlässigkeit beider Methoden, sondern weist auch darauf hin, dass die Fähigkeit zur Reduktion von Sanguinarin durch Expression vorhandener Gene mit hoher Ähnlichkeit zur Sanguinarinreduktase eingeschaltet werden kann. Es gibt bisher keine Hinweise, dass pflanzliche Proteine, welche keine oder nur geringe Ähnlichkeit mit der Sanguinarinreduktase besitzen, zur Reduktion von Sanguinarin in der Lage sind; dies gilt sowohl für DNA- als auch Proteinebene.

Pflanzen mit nachweisbarer Enzymaktivität zeigen eine hohe Ähnlichkeit hinsichtlich der DNA-Sequenz für das aktive Zentrum, d.h. sie gehören entweder zur „*Eschscholzia*“- oder „*Papaver*“-Gruppe (einzige Ausnahme: die relativ nahe verwandte *Dicentra spectabilis*). In Vertretern der weniger verwandten Pflanzen wurde in keinem Fall Sanguinarinreduktase-Aktivität gemessen. Die in Abbildung 51 (siehe unter 4.4) zusammengefassten Daten unterstreichen die Spezifität der Sanguinarinreduktase auf Proteinebene: wenn mehrere Veränderungen gegenüber dem aktiven Zentrum von *Eschscholzia* vorliegen, wird keine Enzymaktivität gefunden.

Allerdings wurde auch in mehreren Pflanzen der „*Eschscholzia*“- oder „*Papaver*“-Gruppe weder die Aktivität noch das Protein der Sanguinarinreduktase gefunden, zum Beispiel in *Nigella damascena*, *Papaver bracteatum* und *Papaver orientalis*. Weiterführende Versuche könnten hier klären, ob etwa die Expression des Sanguinarinreduktase-Proteins nicht konstitutiv, sondern unter Bedingungen oder Zeitpunkten erfolgt, die bei der Probennahme nicht gegeben waren.

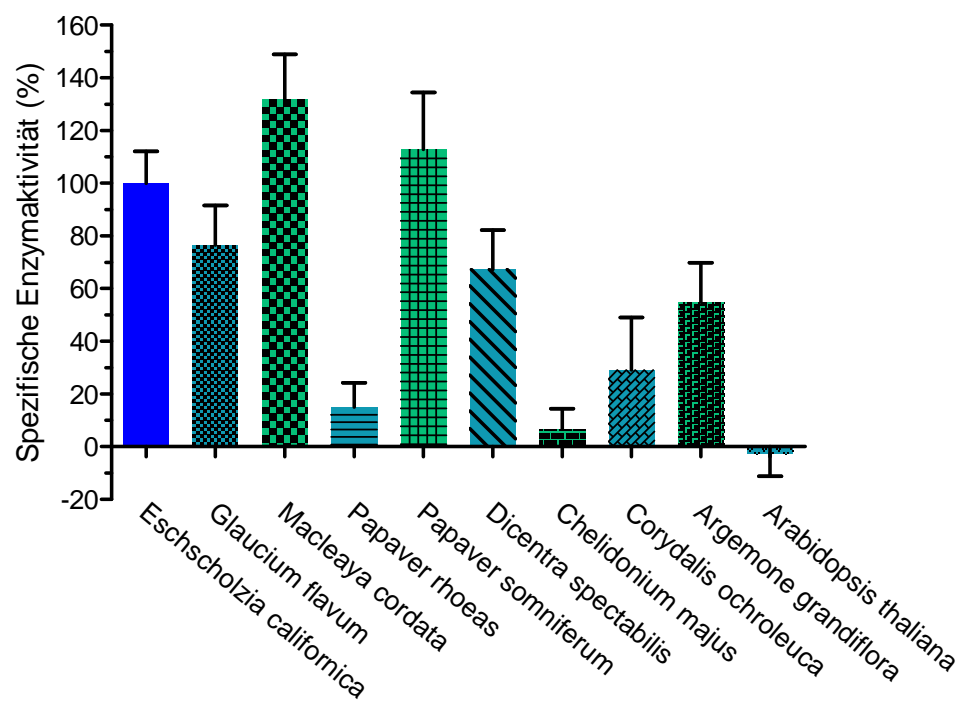
Dieses Problem unterstreicht die Notwendigkeit, die Variabilität des Pflanzenmaterials bei der Interpretation angemessen zu berücksichtigen. Besonders die Aktivitätsdaten stellen Momentaufnahmen dar, welche mit dem Blattmaterial aus dem Botanischen Garten erhalten wurden. Unterschiede, die sich aus der Entwicklungsphase der Pflanze und den Standortbedingungen ergeben, sind daher nicht kompensiert. Morphologische Unterschiede der Blattstruktur können die Extraktion der Proteine und damit die Bezugsbasis verändern, enthaltene Sekundärstoffe die Aktivität der Sanguinarinreduktase beeinflussen.

Die aktuellen Daten auf Aktivitäts- und Proteinebene lassen daher nur eine tendenzielle Aussage zu. Dennoch ist zu erkennen, dass das Vorkommen der aktiven Sanguinarinreduktase eng mit dem

Vorkommen einer Benzophenanthridin-Biosynthese korreliert ist, und zwar enger als mit der Existenz der spezifischen Gensequenzen.

Abbildung 50: Sanguinarinreduktase-Aktivität in ausgewählten Pflanzen

Die Enzymaktivitätsbestimmung mittels Enzymassay erfolgte wie unter 2.10.7 beschrieben. In acht der getesteten Pflanzen wurde eine signifikante Aktivität der Sanguinarinreduktase, das heißt die Umsetzung von Sanguinarin zu Dihydrosanguinarin, gemessen. Die spezifische Enzymaktivität (nkat/mg Protein) von *Eschscholzia californica* wurde als 100 %-Wert gesetzt. Der erhaltene Wert von *Arabidopsis thaliana* als dient als Negativkontrolle. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 8 verschiedenen Messungen (Daten teilweise aus Müller, H. U., Diplomarbeit, 2011).



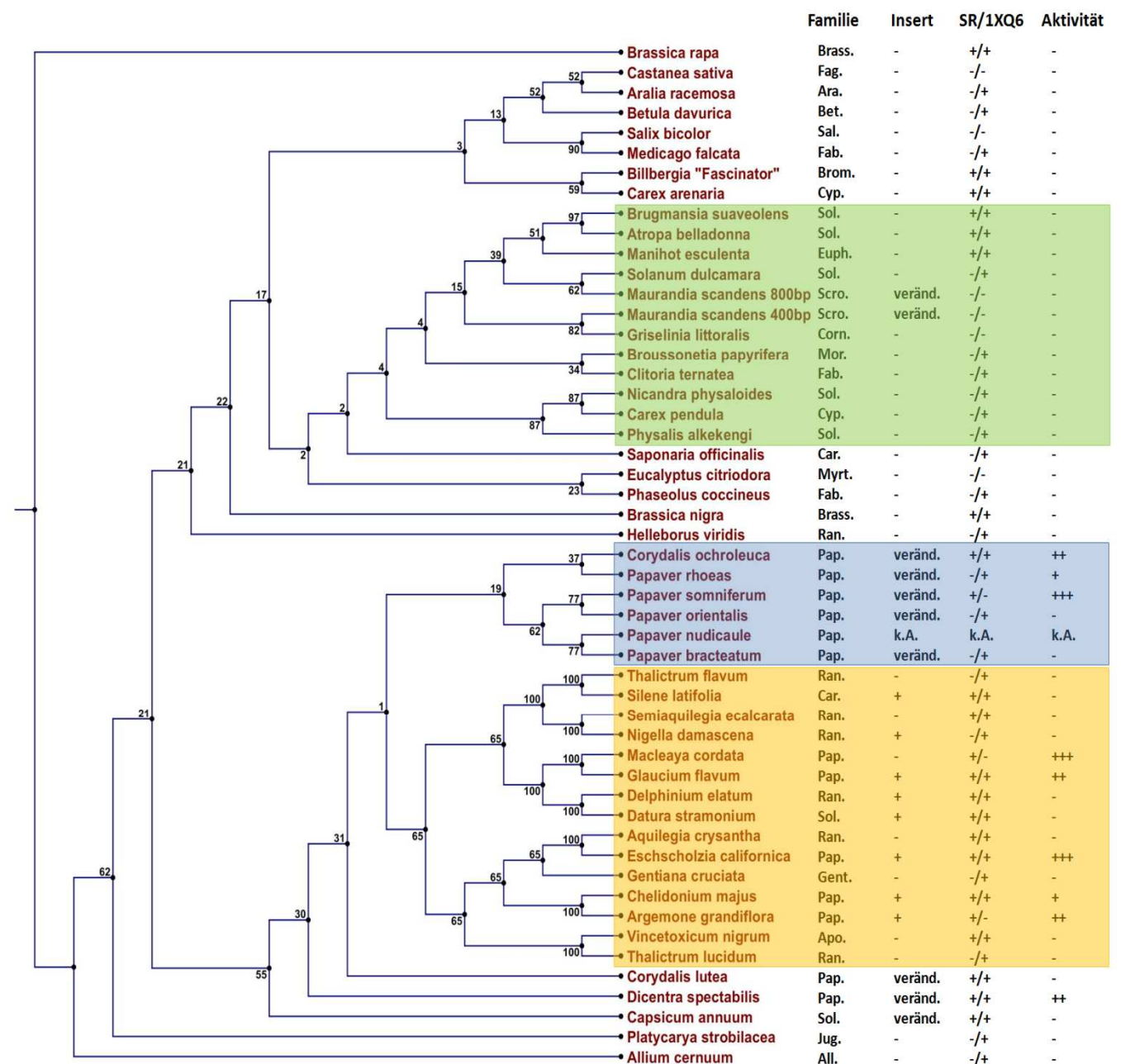
4.5 Zusammenfassung

Einen zusammenfassenden Überblick über die Suche nach dem Enzym Sanguinarinreduktase auf DNA-, Protein- und Aktivitätsebene gibt Abbildung 51.

Abbildung 51: DNA-Sequenzen, immunologischer und Aktivitätsnachweis der Sanguinarinreduktase

Dargestellt ist das Kladogramm der gefundenen Sanguinarinreduktase-ähnlichen Sequenzen des aktiven Zentrums. Nebenstehende Tabelle zeigt die entsprechende Pflanzenfamilie, Ergebnisse der immunologischen Detektion (Sanguinarinreduktase-/1XQ6-Protein), gefundene Sanguinarinreduktase-Aktivität, sowie das Vorhandensein eines Inserts (+: positiver Befund; -: negativer Befund, k.A. – keine Angabe).

All.: Alliaceae; Apo.: Apocynaceae; Aral.: Araliaceae; Bet.: Betulaceae; Brass.: Brassicaceae; Brom.: Bromeliaceae; Car.: Caryophyllaceae; Corn.: Cornaceae; Cyp.: Cyperaceae; Euph.: Euphorbiaceae; Fab.: Fabaceae; Fag.: Fagaceae; Gent.: Gentianaceae; Jug.: Juglandaceae; Mor.: Moraceae; Myrt.: Myrtaceae; Pap.: Papaveraceae; Ran.: Ranunculaceae; Sal.: Salicaceae; Scro.: Scrophulariaceae; Sol.: Solanaceae.



4.6 Diskussion

4.6.1 Suche auf DNA-, Protein- und Aktivitätsebene

DNA-Sequenzen mit erkennbarer Ähnlichkeit zu den für die Sanguinarinreduktase essentiellen Genabschnitten finden sich offenbar in zahlreichen Pflanzen. Dies gilt nicht nur für die Sequenz, die für das aktive Zentrum kodiert, sondern auch für das Insert SEDVIDASFSGPM. Generell zeigen die Benzophenanthridin-Produzenten, welche alle zu den Ranunculales gehören, die höchste Homologie zum Gen der Sanguinarinreduktase. Nah verwandte Sequenzen wurden aber auch in Spezies anderer Familien gefunden, wie der Apocynaceae *Vincetoxicum nigrum*, der Caryophyllaceae *Silene latifolia*, der Solanaceae *Datura stramonium* und der Gentianaceae *Gentiana cruciata*. Da diese Pflanzenfamilien evolutionär „jünger“ sind als die Ranunculales, spricht dies für den Verlust einer zunächst vorhandenen, aktiven Sanguinarinreduktase, gemeinsam mit dem Verlust der Alkaloidbiosynthese bei der Entstehung dieser Familien.

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kommen Liscombe et al. (2005) nach Untersuchung der Spezies-Verteilung der Norcoclaurinsynthese, d.h. einem frühen Enzym der hier untersuchten Biosynthese. Norcoclaurin gehört zu den zentralen Intermediaten und ist daher ein Präkursor aller Benzophenanthridine. Die Aktivität dieses Enzyms wurde nicht nur in den Produzenten der Benzylochinolinalkaloide gefunden, sondern auch in einigen Pflanzen, für welche die Bildung dieser Alkaloide nicht bekannt bzw. wenig wahrscheinlich ist. Die Autoren schließen daraus, dass zwar die ursprüngliche Fähigkeit zur Alkaloidbiosynthese in später entstandenen Pflanzen verlorengegangen ist, die Expression einzelner Enzyme der ehemaligen Biosynthese-Kette aber noch als „molekularer fingerprint“ im Genom verblieben ist. Ähnliche Argumente erklären die Existenz der Strictosidinsynthese, einem Enzym aus der Biosynthese der monoterpenoiden Indolalkaloide, in der Vakuole von *Arabidopsis thaliana* (Fabbri et al., 2000).

Bei der immunologischen Suche auf Proteinebene wurde zwischen dem Nachweis der Sanguinarinreduktase, sowie des homologen, aber inaktiven Proteins 1XQ6 unterschieden. Offenbar kommen 1XQ6 und ähnliche Proteine bei den untersuchten Pflanzen sehr viel häufiger vor (42 von 50 Pflanzen) als die Sanguinarinreduktase (24 von 50 Pflanzen, davon 11 aus der „*Eschscholzia*“-Gruppe).

Die Suche auf Aktivitätsebene ergab eine signifikante Enzymaktivität in 8 der 50 untersuchten Pflanzen, davon zeigen sieben auch den immunologischen Nachweis der Sanguinarinreduktase.

Bei der immunologischen Detektion wurde in den weitaus meisten Pflanzen mit Sanguinarinreduktase auch das homologe, aber inaktive Protein 1XQ6 nachgewiesen. Wegen der hohen Selektivität der Antiseren spricht dies dafür, dass beide Gene und Proteine anwesend sind und daher echte Paraloge darstellen. Vermutlich existiert also ein gemeinsamer Vorläufer, aus dem nach Genduplikation beide Gene und Proteine hervorgingen.

Nur drei Spezies enthalten das Protein der Sanguinarinreduktase, nicht aber 1XQ6 (*Argemone grandiflora*, *Macleaya cordata* und *Papaver somniferum*). Falls dies nicht durch organspezifische oder zeitlich begrenzte Expression erklärt werden kann, wäre hier das (relativ seltene) Auftreten von Orthologen vorstellbar, d.h. die Sanguinarinreduktase würde das (funktionslose?) Protein 1XQ6 ersetzen.

4.6.2 Der Vorläufer des Sanguinarinreduktase-Proteins

Das Gen der Sanguinarinreduktase, d.h. die Umgebung des aktiven Zentrums, hat einen Vorläufer, der die Flankenregionen enthält (etwa HIVLVGSMGG und GNGNIL, siehe auch Abbildung 42), in der Kernregion (CDPDHFLNHM in *Eschscholzia californica*) aber stark mutiert ist. Dies ist bereits ein erster Hinweis darauf, dass die Kernregion bedeutungsvoll für die Funktion des Proteins ist und einer Anpassung und Selektion unterlag.

Das Vorläufergen ist in vielen, aber nicht allen untersuchten Angiospermen enthalten, und wie aus Abbildung 52 hervorgeht, treten Elemente des Gens der Sanguinarinreduktase bereits in mehreren Ordnungen der Monokotyledonen auf. *In silico* –Daten zeigen typische Sequenzen sogar vor Entstehung der Gymnospermen, etwa im Laubmoos *Physcomitrella* und der Bärlapppflanze *Selaginella* (NCBI-Datenbank, blastp, Suche vom 30.12.2011, siehe auch Abbildung 40). Offenbar ist das Auftreten aber sporadisch, da eigene PCR-Untersuchungen in Gymnospermen und Farnen keine homologen Sequenzen lieferten (siehe Abbildung 53).

Typisch für die in Abbildung 52 gezeigte Speziesverteilung ist, dass neben dem konzentrierten Auftreten der zur Sanguinarinreduktase homologen Sequenzen in den frühen Eukotyledonen (Ranunculales) sehr viele Funde auch in den später evolvierten Dikotyledonen, inklusive Rosiden und Asteriden, gemacht wurden. Dies unterstützt die bereits vorgestellte Vermutung, dass bei der Entstehung dieser Pflanzen aus einem mit den Ranunculales gemeinsamen Vorläufer die Fähigkeit zur Biosynthese von Benzophenanthridinen verloren gegangen ist. Eine mögliche Ursache könnte die infolge der hohen Aufwendungen für die Etablierung der Alkaloidbiosynthese erschwerte Anpassung an neue Umweltbedingungen sein. Dies verminderte oder kompensierte den Selektionsvorteil der Benzophenanthridin-bildenden Pflanzen und damit auch den Selektionsdruck zugunsten der Sanguinarinreduktase, was zur Anhäufung inaktivierender Mutationen führte.

Abbildung 52: Verteilung der untersuchten Spezies im Stammbaum der Angiospermen

Die Darstellung beruht auf DNA-Sequenzen der 18S rDNA, *rbcl*- und *atpB*-Gene (entnommen aus dem von der Angiosperm Phylogeny Group (APG III) publizierten Stammbaum von 2003). Untersuchte Ordnungen sind markiert: grün – DNA-Sequenzen mit Ähnlichkeit zum Bereich des aktiven Zentrums nachgewiesen (siehe Abbildung 42); Zahlen bezeichnen die positiven Befunde als Teil der insgesamt untersuchten Spezies; orange – kein Nachweis, Zahlen bezeichnen die insgesamt untersuchten Spezies.

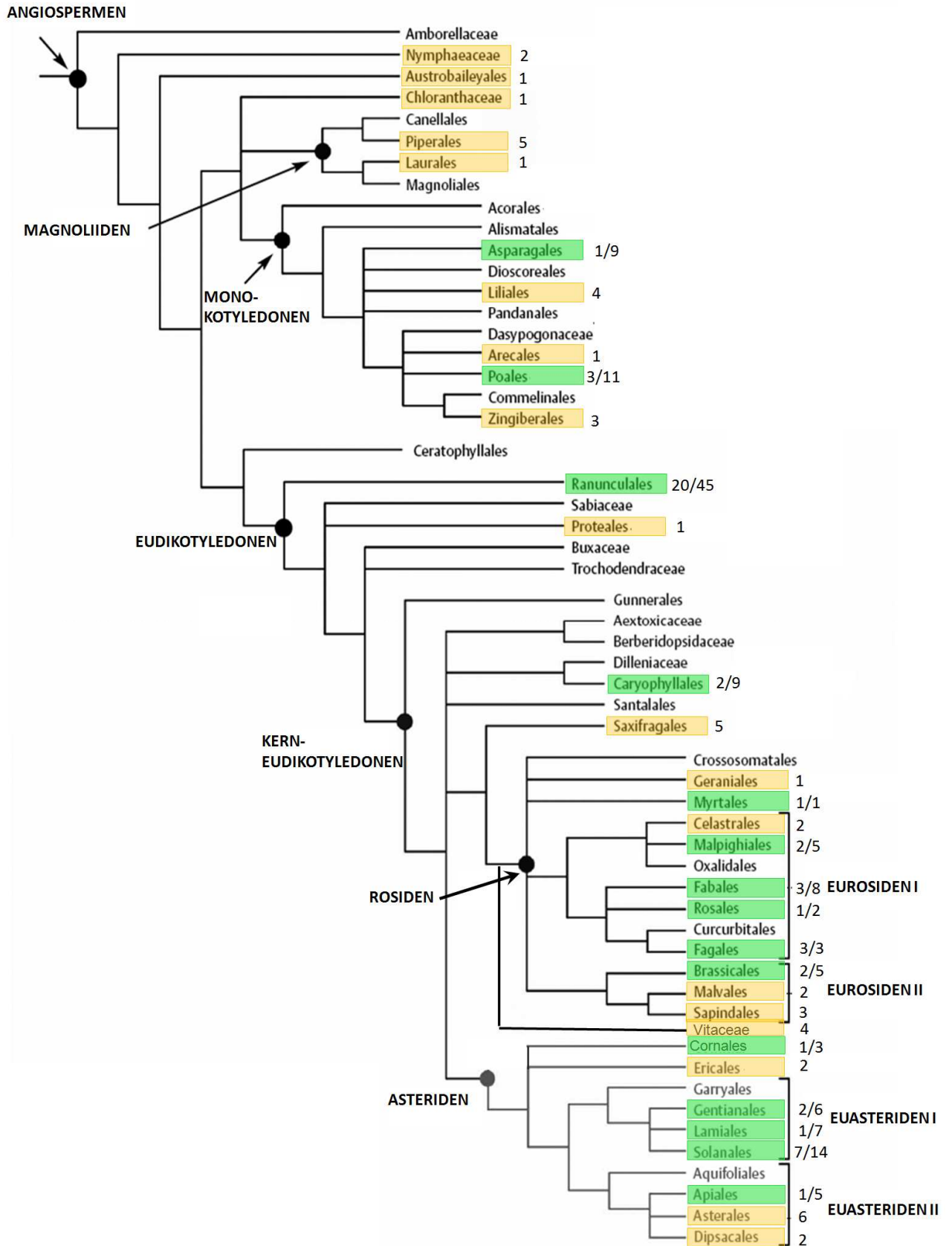
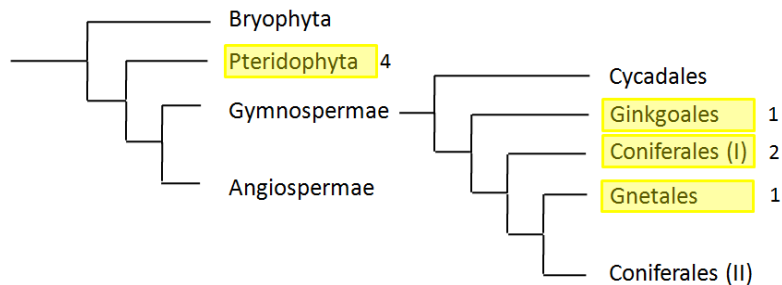


Abbildung 53: Übersicht der untersuchten Spezies der Pteridophyta und Gymnospermae

Die Ordnungen, aus denen einzelne Spezies auf ein Sanguinarinreduktase-ähnliches aktives Zentrum untersucht wurden, sind umrahmt. Die Zahlen geben die Anzahl der untersuchten Spezies wieder. Der Stammbaum wurde vereinfacht aus Chaw et al., 2000, übernommen.

**4.6.3 Welche Mutationen haben die Sanguinarinreduktase entstehen lassen?**

Die vorliegenden Experimente haben konkrete Hinweise auf essentielle, positiv selektierte Mutationen während der Evolution der Sanguinarinreduktase geliefert:

- Im aktiven Zentrum ist die Sequenz NHMCDPDHFHM essentiell; Veränderungen dieses Peptids sind mit dem Verlust an Enzymaktivität verbunden. Dies wird auch durch die fehlende Aktivität von 1XQ6 (TN statt C₁₅₇D₁₅₈, P statt F₁₆₂, KL statt H₁₆₅M₁₆₆, siehe auch Abbildung 41) und die reduzierte Aktivität nach der gerichteten Mutagenese von C₁₅₇ und H₁₆₁ (Vogel et al., 2010) belegt.
- In Übereinstimmung mit weiteren der oben genannten Mutagenese-Versuche zeigen die aktuellen Ergebnisse, dass neben den Mutationen im aktiven Zentrum der Erwerb des Inserts SEDVIDASFSGPM für die Evolution der aktiven Sanguinarinreduktase essentiell war. Dabei sind Mutationen an bis zu 10 Positionen dieses Peptids ohne Einfluss auf dessen Wirksamkeit, wie anhand von *Papaver somniferum* und *Papaver rhoeas* gezeigt. Dies unterstützt die postulierte Wirkung dieser Peptidsequenz als Element zur Raumerfüllung („Abstandshalter“) und nicht aufgrund von selektiven Bindeeigenschaften (siehe auch Abbildung 2). Da die mehrfache Entstehung einer DNA-Sequenz von 39 Nukleotiden durch Mutation und Selektion sehr unwahrscheinlich ist, erscheint die Herkunft des Inserts durch horizontalen Gentransfer naheliegend.
- Der Erwerb dieses Inserts erfolgte unabhängig von der Selektion der Mutationen, die das aktive Zentrum geschaffen haben. Das Insert findet sich daher auch in Pflanzen ohne funktionierende Sanguinarinreduktase, wie in *Capsicum annuum* und *Corydalis lutea*.
- Das Vorhandensein des aktiven Zentrums und des Inserts sind notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzungen für ein aktives Enzym, wie an den Daten von *Delphinium elatum*, *Nigella damascena*, *Datura stramonium* und *Silene latifolia* ersichtlich. Neben der Existenz bisher nicht untersuchter, für die Funktion vielleicht essentieller Bereiche der

Sanguinarinreduktase (beispielsweise das Insert AEMI) ist hier auch an mögliche Pseudogene der Sanguinarinreduktase zu denken, das heißt, Gene, die nach Veränderung des Promotors nicht (mehr) exprimiert werden, etwa nach dem Wegfall einer einst vorhandenen Benzophenanthridin-Biosynthese. Die Existenz eines Pseudogens der Sanguinarinreduktase wäre unter anderem für *Nigella damascena* denkbar, da hier sowohl die DNA-Sequenz für das aktive Zentrum als auch für das typische Insert in *Eschscholzia* gefunden wurde, aber das Protein der Sanguinarinreduktase immunologisch nicht detektiert werden konnte.

4.6.4 Potentielle Selektionskriterien für die Evolution der Sanguinarinreduktase

Der Selektionsdruck auf die Evolution der Sanguinarinreduktase ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Toxizität der Benzophenanthridinalkaloide zustande gekommen. Dafür sprechen folgende Gründe:

- a) Benzophenanthridine, besonders Sanguinarin, zeigen eine erhebliche Toxizität gegenüber Zellkulturen verschiedener Pflanzen, z.B. *Nicotiana* und *Lysopersicum*. Zellen von *Eschscholzia californica* tolerieren erheblich höhere Sanguinarinkonzentrationen, zeigen jedoch Vergiftungserscheinungen, wenn der Gehalt von NAD(P)H, dem Co-Substrat der Sanguinarinreduktase, absinkt (Weiss et al., 2006). Die Toxizität der Dihydroalkaloide ist deutlich geringer als die der Benzophenanthridine (siehe auch unter 1.1.4).
- b) Eine aktive Sanguinarinreduktase wurde bisher nur in solchen Spezies der Papaveraceae gefunden, welche nachweislich diese Alkaloide produzieren, obwohl das Gen der Sanguinarinreduktase bzw. dessen essentielle Sequenzen wesentlich weiter verbreitet sind. Abbildung 54 unterstreicht abschließend die enge Bindung der aktiven Expression der Sanguinarinreduktase an das Alkaloidmuster: die untersuchten Pflanzen der Ranunculales stammen aus drei Familien (Ranunculaceae, Papaveraceae und Berberidaceae), davon lieferten nur Vertreter der Papaveraceae auf allen Ebenen positive Befunde, wobei das uneinheitliche Bild der *Papaver*-Arten weiterer Klärung bedarf. In einigen der untersuchten Pflanzen der Ranunculaceae existieren homologe Sequenzen zur Sanguinarinreduktase, jedoch keine Enzymaktivität, während in den Berberidaceae keinerlei Hinweise auf Sanguinarinreduktase gefunden wurde.

Dies korreliert mit der Spezies-Bindung der Alkaloid-Biosynthese: die frühen Schritte der Benzylochinolin-Synthese sind in allen drei Familien nachgewiesen, die Bildung des quaternären Benzophenanthridin-Grundgerüsts nur in Papaveraceae. In einigen Spezies der Ranunculaceae, zum Beispiel *Thalictrum*-Arten, existiert ein vielfältiges Alkaloidmuster, das über Protopin zum Chelidonin, einem Benzophenanthridin mit nicht quaternär gebundenem Stickstoff, reicht, nicht aber zum klassischen Benzophenanthridin-Grundgerüst (Liscombe et al., 2009). In *Berberis* wurde der zu den Benzophenanthridinen führende Zweig nicht beschrieben,

d.h. aus dem gemeinsamen Intermediat Scoulerin entstehen dort nicht Protopin und Sanguinarin, sondern Berberin.

Dies lässt vermuten, dass die Selektion zugunsten der Sanguinarinreduktase spezifisch von den quaternären Benzophenanthridinen ausging. Dabei dürfte nicht nur die Fähigkeit des Enzyms zu deren Entgiftung, sondern auch die spezifische Wirkung seines Substrats und Produkts bei der Kontrolle der Biosynthese eine wesentliche Rolle spielen (siehe Kapitel 3).

- c) Zellkulturen von *Eschscholzia californica* reagieren auf den Zusatz von Sanguinarin mit einer Überexpression der Sanguinarinreduktase (siehe Abbildung 48; W. Roos und V. Voigt, unveröffentlicht).

Abbildung 54: Übersicht über Benzophenanthridin-Biosynthese und Vorkommen einer aktiven Sanguinarinreduktase in den untersuchten Arten der Ranunculales

(nach Angiosperm Phylogeny Website: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html> vom 11.05.2011). Dargestellt sind die untersuchten Spezies aus den Familien der Ranunculaceae, Berberidaceae und Papaveraceae. Das Auftreten eines Sanguinarinreduktase-ähnlichen Gens, Aktivität der Sanguinarinreduktase sowie die konkret nachgewiesene Biosynthese von Benzophenanthridinen (BPA) (nach Simanek, 1985; Krane et al., 1984) ist mit einem Punkt markiert.



Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Protein und Aktivität der Sanguinarinreduktase im Wesentlichen nur in Benzophenanthridin-produzierenden Pflanzen gefunden wurden. Dabei zeigen sich zwei verwandte Gen-Cluster, die „*Eschscholzia*“- und die „*Papaver*“-Gruppe. DNA-Sequenzen für essentielle Elemente dieses Enzyms existieren jedoch auch in Spezies, die sehr wahrscheinlich keine Benzophenanthridine produzieren. Die Evolution der Sanguinarinreduktase aus einem „Rossmann fold NAD(P)H binding protein“ erfolgte über das Zusammentreffen von mehreren Mutationen im aktiven Zentrum mit dem Erwerb eines typischen Inserts, vermutlich durch horizontalen Gentransfer. Das Vorkommen immunologisch kreuzreaktiver, jedoch enzymatisch inaktiver Proteine in einigen Pflanzen weist auf die Existenz weiterer Strukturelemente mit Bedeutung für die Aktivität der Sanguinarinreduktase hin.

Den Selektionsdruck für die Entstehung der Sanguinarinreduktase lieferte mit großer Wahrscheinlichkeit die Toxizität der Benzophenanthridine. Letztere verstärken auch die Expression des Enzyms bei externem Kontakt mit Zellen, Blättern und Gewebeschnitten. Wahrscheinlich haben bereits vor der Entstehung der Ranunculales Elemente der Benzophenanthridin-Biosynthese und eine Sanguinarinreduktase existiert, und der spätere Verlust der Biosynthese in Pflanzen außerhalb der Ranunculales führte zur Inaktivierung des Enzyms auf DNA- und Proteinebene.

4.6.5 Ausblick

Weiterführende Arbeiten könnten prüfen, ob die nun erstmals in mehreren Pflanzen nachgewiesene Sanguinarin-reduzierende Aktivität immer ein Homologon der Sanguinarinreduktase aus *Eschscholzia californica* anzeigt, oder ob auch andere, struktur- aber nicht sequenzähnliche Proteine diese Funktion besitzen. Die bisherigen Daten sprechen dafür, dass es in Pflanzen keine zur Sanguinarinreduktase alternativen Proteine mit gleicher oder ähnlicher Funktion bei der Reduktion externer Benzophenanthridine gibt. Dagegen wurden Proteine mit geringer Sequenzähnlichkeit, aber großer Strukturähnlichkeit in Mensch und Bakterien gefunden (Vogel et al., 2010). Zur Klärung dieser Frage müssten die hier vorgestellten Gensonden in möglichst vielen Pflanzen sowohl zum *in vitro*- als auch zum *in silico*-Screening eingesetzt werden. Gefundene Gene können durch rekombinante Produktion auf ihre enzymatische Aktivität und Spezifität geprüft werden.

Benzophenanthridin-produzierende Pflanzen, die in den hier dargestellten Analysen keinen Hinweis auf eine Sanguinarinreduktase-Aktivität ergaben, aber essentielle Elemente des Gens besitzen, sollten ausführlicheren Tests in verschiedenen Organen, Entwicklungsphasen und unter dem Einfluss von Stressoren unterzogen werden. Damit könnte gezeigt werden, ob die Sanguinarinreduktase dort nur unter besonderen Bedingungen exprimiert wird.

Das für die Enzymaktivität extrem wichtige Insert SEDVIDASFSGPM könnte durch horizontalen Gentransfer in das Genom aufgenommen worden sein. Deshalb sollte nach der in *Eschscholzia*

californica enthaltenen Gensequenz, aber auch den als funktionell erachteten homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen, in Mikroorganismen des Bodens gesucht werden (PCR-gestützt und *in silico*).

5 Literaturverzeichnis

- Ahmed, M. S., K. Ainley, J. H. Parish, S. M. Hadi. 1994. Free radical-induced fragmentation of proteins by quercetin. *Carcinogenesis* **15**: 1627-1630.
- Aimi, N., M. Nishimura, A. Miwa, H. Hoshino, S. Sakai, J. Haginiwa. 1989. Pumiloside and deoxypumiloside; plausible intermediates of camptothecin biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **30**: 4991-4994.
- Alfenito, M. R., E. Souer, C. D. Godman, R. Buell, J. Mol, R. Koes, V. Walbot. 1998. Functional complementation of anthocyanins sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferase. *Plant Cell* **10**: 1135-1149.
- Allen, G. C., M. A. Flores-Vergara, S. Krasnyanski, S. Kumar and W. F. Thompson. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols* **1**: 2320-2325.
- Angelova, S., M. Buchheim, D. Frowitter, A. Schierhorn, W. Roos. 2010. Overproduction of alkaloid phytoalexins in california poppy cells is associated with the co-expression of biosynthetic and stress-protective enzymes. *Molecular Plant* **3**: 927-939.
- Angiosperm Phylogeny group (APGII), 2003. An update of the angiosperm phylogeny group classification of orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- Arakawa, H., W. G. Clark, M. Psenak, C. J. Coscia. 1992. Purification and characterization of Dihydrobenzophenanthridine Oxidase from elicited *Sanguinaria Canadensis* cell cultures. *Archives of biochemistry and biophysics* **299**: 1-7.
- Ashihara, H., A. M. Monteiro, T. Moritz, F. M. Gillies, A. Crozier. 1996. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea Arabica* L. *Planta* **198**: 334-339.
- Ashihara, H., F. M. Gillies, A. Crozier. 1997. Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Cell Physiology* **38**: 413-419.
- Bailey J. A., G. A. Carter, R. S. Burden, R. L. Wain. 1975. Control of rust diseases by diterpenes from *Nicotiana glutinosa*. *Nature* **255**: 328-329.

- Bhakuni, D.S., S. Jain. 1986. Protoberberine Alkaloids. In: Brossi, A. (editor) – The alkaloids Vol. 28. Orlando Academic Press; pp. 95-171.
- Bird, D. A., V. R. Franceschi, P. J. Facchini. 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* **15**: 2626-2635.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-23.
- Bock, A. 1996. Immunocytoologische Untersuchungen zur Kompartimentierung der Alkaloidbiosynthese bei Vertretern der *Papaveraceae*. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Burlat, V., A. Oudin, M. Courtois, M. Rideau, B. St-Pierre. 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant Journal* **38**: 131-141.
- Chaw, S.-M., C. L. Parkinson, Y. Cheng, T. M. Vincent, J. D. Palmer. 2000. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from Conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4086-4091.
- Dawkins, R. 2009. Geschichten vom Ursprung des Lebens – eine Zeitreise auf Darwins Spuren. 2. Auflage, Ullstein Buchverlage GmbH, Berlin.
- Debeaujon, I., A. J. Peeters, K. M. Leon-Kloosterziel, M. Koornneef. 2001. The TRANSPARENT TESTA 12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**: 853-871.
- Després, L., J. P. David, C. Gallet. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 298-307.

- Dordschbal, B. 2002. Aktivität und Regulation von Phospholipase A₂ in der Plasmamembran von *Eschscholzia californica*. Dissertation, *MLU Halle-Wittenberg*.
- Fabbri, M., G. Delp, O. Schmidt, U. Theopold. 2000. Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**: 191-196.
- Facchini, P. J., V. De Luca. 1995. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* **7**: 1811-1821.
- Facchini, P. J., B. St-Pierre. 2005. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current opinion in plant biology* **8**: 657-666
- Faddeeva, M. D., T. N. Beliaeva. 1997. Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants, intracellular targets of their action. *Tsitologija* **39**: 181-208.
- Färber, K., B. Schumann, O. Miersch, W. Roos. 2003. Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* **62**: 491-500.
- Ferreres, F., F. Fernandes, D. M. Pereira, J. A. Pereira, P. Valentao, P. B. Andrade. 2009. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae*-*Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9035-9043.
- Goodman, C. D., P. Casati, V. Walbot. 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* **16**: 1812-1826.
- Govindachari, T.R., N. Viswanathan. 1972. Alkaloids of *Mappia foetida*. *Phytochemistry* **11**: 3529-3531.
- Gundlach, H. 1992. Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, *Universität München*.
- Gundlach, H., M. J. Müller, T. M. Kutchan, M. H. Zenk. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2389-2393.

- Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**: 1788-95.
- Heinze, M., J. Steighardt, A. Gesell, W. Schwartze, W. Roos. 2007. Regulatory interaction of the Ga protein with phospholipase A₂ in the plasma membrane of *Eschscholzia californica*. *The Plant Journal* **52**: 1041-1051.
- Houseman, J. G., F. Campos, N. M. R. Thie, B. J. R. Philogene, J. Atkinson, P. Morand, J. T. Arnason. 1992. Effect of the maize-derived compounds DIMBOA and MBOA on growth and digestive processes of European corn borer. *Journal of Economic Entomology* **85**: 669-674.
- Ikezawa, N., M. Tanaka, M. Nagayoshi, R. Shinkyō, T. Sakaki, K. Inouye, F. Sato. 2003. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 38557-38565.
- Inui, T., K. I. Tamura, N. Fujii, T. Morishige, F. Sato. 2007. Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-O-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Physiology* **48**: 252-262.
- Invitrogen: „Gateway®Technology with Clonase™ II“. Version vom 07.11.2010. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/gateway_clonaseii_man.pdf
- Jasinski, M., Y. Stukkens, H. Degand, B. Purnelle, J. Marchand-Brynaert, M. Boutry. 2001. A plant plasma membrane ATP-binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* **12**: 1095-1107.
- Kawaguchi, A., H. Tomoda, S. Okuda, J. Awaya, S. Omura. 1979. Cerulenin resistance in a cerulenin-producing fungus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **197**: 30-35.
- Kim, E. S., and P. G. Mahlberg. 1997. Plastid development in disc cells of glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Molecules and Cells* **7**: 352-359.
- Kitamura, S., N. Shikazono, A. Tanaka. 2004. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **37**: 104-114.

- Klein, M., E. Martinoia, G. Hoffmann-Thoma, G. Weissenböck. 2000. A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant Journal* **21**: 289-304.
- Klein, M., W. Roos. 2009. Handling dangerous molecules: transport and compartmentation of plant natural products. In: A. E. Osbourn and V. Lanzotti (eds.), *Plant-derived natural products: synthesis, function, and application*. Chapter 12. Springer Science + Business Media.
- Kojima, W., T. Fujii, M. Suwa, M. Miyazawa, Y. Ishikawa. 2010. Physiological adaptation of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* to chemical defenses of its host plant, maize. *Journal of Insect Physiology* **56**: 1349-1355.
- Krane, B. D., M. Fagbule, M. Shamma, B. Gozler. 1984. The benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products* **47**:1-43.
- Kurz, T. 2009. Genexpressionsanalysen in elicitierten Suspensionskulturzellen von *Eschscholzia californica* Cham. und Identifizierung von EcaERF2 als transkriptioneller Regulator der Alkaloidbiosynthese. Dissertation, *MLU Halle-Wittenberg*.
- Kutchan, T. M., H. Dittrich, D. Bracher, M. H. Zenk. 1991. Enzymology and molecular biology of alkaloid biosynthesis. *Tetrahedron* **47**: 5945-5954.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, X. C., M. A. Schuler, M. R. Berenbaum. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* **52**: 231-253.
- Linsmaier, E. M., F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **18**: 100-127.
- Liscombe, D.K., B. P. MacLeod, N. Loukanina, O. I. Nandi, P. J. Facchini. 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* **66**: 1374-1393.

- Liscombe, D.K., J. Ziegler, J. Schmidt, C. Ammer, P. J. Facchini. 2009. Targeted metabolite and transcript profiling for elucidating enzyme function: isolation of novel N-methyltransferases from three benzyloisoquinoline alkaloid-producing species. *The Plant Journal* **60**: 729-743.
- Luque, T., K. Okano, D. R. O'Reilly. 2002. Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP-glucosyltransferase. *European Journal of Biochemistry* **269**: 819-825.
- Mackenzie, P. J., K. W. Bock, B. Burchell, C. Guillemette, S. Ikushiro, T. Iyanagi, J. O. Miners, I. S. Owens, D. W. Nebert. 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics* **15**: 677-685.
- Marinova, K., L. Pourcel, B. Weder, M. Schwarz, D. Barron, J. M. Routaboul, I. Debeaujon, M. Klein. 2007. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* **19**: 2023-2038.
- Marrs, K. A., M. R. Alfenito, A. M. Lloyd, V. Walbot. 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**: 397-400.
- Miller, J. M., E. E. Conn. 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiology* **65**: 1199-1202.
- Morrissey, J. P., A. E. Osbourn. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 708-724.
- Mülhardt, C. 2009. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mueller, L. A., C. D. Goodman, R. A. Silady, V. Walbot. 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* **123**: 1561-1570.
- Murata, J., V. De Luca. 2005. Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-O-methyltransferase to leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. *Plant Journal* **44**: 581-594.
- Niemeyer, H. M. 2009. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one: key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 1677-1696.

- Otani, M., N. Shitan, K. Sakai, E. Martinoia, F. Sato, K. Yazaki. 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* **138**: 1939-1946.
- Reid, L. M., J. T. Arnason, C. Nozzolillo, R. I. Hamilton. 1991. Laboratory and field resistance to the European corn borer in maize germplasm. *Crop Science* **31**: 1496-1502.
- Roos, W., S. Evers, M. Hieke, M. Tschöpe, B. Schumann. 1998. Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Plant Physiology* **118**: 349-364.
- Roos, W., B. Dordschbal, J. Steighardt, M. Hieke, D. Weiss, G. Saalbach. 1999. A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1448**: 390-402.
- Roos, W. 2000. Ion mapping in plant cells – methods and applications in signal transduction research. *Planta* **210**: 347-370.
- Roos, W., K. Viehweger, B. Dordschbal, B. Schumann, S. Evers, J. Steighardt, W. Schwartze. 2006. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways – the case of *Eschscholtzia californica*. *Journal of Plant Physiology* **163**: 369-381.
- Rueff, J., J. Gaspar, A. Laires. 1995. Structural requirements for mutagenicity of flavonoids upon nitrosation. A structure-activity study. *Mutagenesis* **10**: 325-328.
- Rueffer M., M. H. Zenk. 1987. Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. *Tetrahedron Letters* **28**: 5307-5310.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sakai, K., N. Shitan, F. Sato, K. Ueda, K. Yazaki. 2002. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1879-1886.

- Samanani, N., J. Alcantara, R. Bourgault, K. G. Zulak, P. J. Facchini. 2006. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *The Plant Journal* **47**: 547-563.
- Schmeller, T., B. Latz-Brüning, M. Wink. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* **44**:257-266.
- Schumacher, H.-M., H. Gundlach, F. Fiedler, M. H. Zenk. 1987. Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports* **6**: 410-413.
- Schumacher, H.-M., M. H. Zenk. 1988. Partial purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* **7**: 43-46.
- Simanek, V. 1985. Benzophenanthridine alkaloids. In: Brossi, A. (editor) – The alkaloids Vol. 26. Orlando Academic Press; pp. 185-240.
- Sirikantaramas, S., F. Taura, Y. Tanaka, Y. Ishikawa, S. Morimoto, Y. Shoyama. 2005. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiology* **46**: 1578-1582.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, K. Saito. 2007a. Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews* **7**: 467-477.
- Sirikantaramas, S., H. Sudo, T. Asano, M. Yamazaki, K. Saito. 2007b. Transport of camptothecin in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Phytochemistry* **68**: 2881-2886.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, K. Saito. 2008. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 6782-6786.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, K. Saito. 2009. A survival strategy: The coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry* **70**: 1894-1898.

- Sneath, P. H. A., R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W. H. Freeman and Company, USA.
- Springob, K., T. M. Kutchan. 2009. Introduction to the different classes of natural products. In: A. E. Osbourn and V. Lanzotti (eds.), *Plant-derived natural products: synthesis, function, and application*. Chapter 2. Springer Science + Business Media.
- Stukkens, Y., A. Bultreys, S. Grec, T. Trombik, D. Vanham, M. Boutry. 2005. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiology* **139**: 341-352.
- Takao, N., M. Kamigauchi, M. Okada. 1983. Biosynthesis of Benzo[c]phenanthridine alkaloids Sanguinarine, Chelirubine and Macarpine. *Helvetica Chimica Acta* **66**: 473-484.
- Teuscher, E., M. F. Melzig and U. Lindequist. 2004. Biogene Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 6. Auflage.
- Ulrichová, J., Z. Dvůrák, J. Vicar, J. Lata, J. Smrzová, A. Sedo, V. Simánek. 2001. Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models. The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Toxicology Letters* **125**: 125-132.
- van den Brûle, S., A. Müller, A. J. Fleming, C. C. Smart. 2002. The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal sclareol. *Plant Journal* **30**: 649-662.
- VanEtten, H. D., D. E. Matthews, P. S. Matthews. 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annual Review of Phytopathology* **27**: 143-164.
- Viehweger, K., B. Dordschbal, W. Roos. 2002. Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *The Plant Cell* **14**: 1509-1525.
- Viehweger, K., W. Schwartze, B. Schumann, W. Lein, W. Roos. 2006. The Gα protein controls a pH dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *The Plant Cell* **18**: 1510-1523.
- Vogel, M., M. Lawson, W. Sippl, U. Conrad, W. Roos. 2010. Structure and mechanism of sanguinarine reductase, an enzyme of alkaloid detoxification. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 18397-18406.

- Wall, M. E., M. C. Wani, C. Cook, K. Palmer, A. McPhail, G. Sim. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Journal of the American Chemical Society* **88**: 3888-3890.
- Weid, M., J. Ziegler, T. M. Kutchan. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 13957-13962.
- Weiß, D. 2004. Die Sanguinarin-Reduktase – ein neues Redoxenzym mit essentiellen Funktionen in Metabolismus und Kompartimentierung der Benzophenanthridine in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*. Dissertation, MLU Halle-Wittenberg.
- Weiss, D., A. Baumert, M. Vogel, W. Roos. 2006. Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell and Environment* **29**: 291-302.
- Wink, M., T. Schmeller, B. Latz-Bruning. 1998. Modes of action of allelochemical alkaloids: Interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology* **24**: 1881-1937.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**: 3-19.
- Wink, M. 2008. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Products Communications* **3**: 1205-1216.
- Yan, F., X. Liang, X. Zhu. 1999. The role of DIMBOA on the feeding of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of Applied Entomology* **123**: 49-53.
- Zenk, M. H. 1994. The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* **66**: 2023-2028.
- Ziegler, J., P. J. Facchini. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 735-769.
- Zulak, K. G., M. F. Khan, J. Alcantara, D. C. Schriemer, P. J. Facchini. 2009. Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. *Molecular Cell Proteome* **8**: 86-98.

6 Verzeichnis der Abkürzungen

4'OMT	–	3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'O-Methyltransferase
6'OMT	–	(S)-Norcocclaurin-6'O-Methyltransferase
ABC	–	<u>A</u> TP- <u>B</u> inding <u>C</u> assette
BBE	–	Berberinbrückenzym
Bis-BODIPY FL-C11-PC	–	1,2-Bis-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Undecanoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
BSA	–	Bovines Serum-Albumin
5-CFDA, AM	–	5'-Carboxyfluoresceindiacetat, Acetoxymethylester
CHAPS	–	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DhbOx	–	Dihydrobenzophenanthridinoxidase
DHS	–	Dihydrosanguinarin
DIMBOA	–	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on
DTE	–	Dithioerythrit
<i>E. coli</i>	–	<i>Escherichia coli</i>
ER	–	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	–	Elektronenspray-Ionenquelle
FM	–	Frischmasse
FT-ICR-MS	–	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransformations- <u>I</u> onen- <u>C</u> yclotron- <u>M</u> assenspektrometer
GSH	–	Glutathion
GTP	–	Guanosintriphosphat
HPLC	–	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
LPC	–	Lysophosphatidylcholin
MATE	–	<u>M</u> ultidrug <u>a</u> nd <u>T</u> oxic <u>E</u> xtrusion
MOPS	–	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	–	messengerRNA
MRP	–	<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Related <u>P</u> rotein
MS	–	Massenspektrometer
NADH	–	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NAD ⁺	–	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADPH	–	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
NADP ⁺	–	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (oxidiert)
ORF	–	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	–	<u>P</u> olyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	–	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNAi	–	RNA interference
SDS	–	Natriumdodecylsulfat
TEMED	–	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	–	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UDP	–	Uridindiphosphat
UPGMA	–	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UPLC	–	<u>U</u> ltra <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
UpM	–	Umdrehungen pro Minute

7 Anhang

7.1 Geräte

Verwendete Geräte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-System	Roth (Karlsruhe, D)
Analysenwaagen L2200P/H160/R16P-D1	Sartorius (Göttingen, D)
Autoklav Systec 2540 ELV	Tuttnauer (Breda, NL)
Autoklav Varioklav 400E	H+P Labortechnik (Oberschleissheim, D)
Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Bio-Rad (München, D)
Blender HGB2wt	Waring (Torrington, USA)
Blotter V10-SDB	Techne (Cambridge, UK)
Digitalkamera Camedia E10	Olympus (Hamburg, D)
Gefrierschrank	Gorenje (München, D)
Gefriertruhe	Sanyo (München, D)
Heizplatte Monotherm	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CH)
HPLC UltiMate 3000 bestehend aus:	Dionex Softron GmbH (Germering, D)
UltiMate 3000 Pumpe	
UltiMate 3000 Autosampler	
UltiMate 3000 Photodioden Array Detektor	
RF 2000 Fluoreszenzdetektor	
Säulenofen Typ STH 585	
HPLC Foxy Jr. Fraktionssammler	Teledyne Isco, Inc. (Lincoln, USA)
HPLC Säulen:	Macherey-Nagel (Düren, D)
Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 120-10 C18	
Trennsäule EC 250/4 Nucleosil 120-10 C18	
Hybridisierungsflasche (38x75mm)	LabMarket GmbH (Mannheim, D)
Hybridisierungsöfen Enviro-Genie	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Kühlschrank Foron	EFS Hausgeräte (Duisburg, D)
Lichtkasten Color Control	BIOTEC-Fischer (Reiskirchen, D)
Magnetrührer Monotherm	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CH)
Microplate Fluorescence Reader FL_x800	BioTek Instruments (Winooski, USA)
PCR Maschine Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
PCR Maschine Progene SI 1202	Techne (Cambridge, USA)
pH-Meter pMX3000	WTW (Weilheim, D)
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem SE250	Hofer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Schüttelmaschine AK 85	Novotron (Ludwigsburg, D)
Schüttelmaschine	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Schüttler KS 500	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Spannungsgeber E832 und E443	Consort (Turnhout, B)
Spektrometer Ultrospec II/Genequant 1300	GE Healthcare (Freiburg, D)

Gerät	Hersteller
Sterilbank LF MRF	Steag Laminar Flow Prozesstechnik (Reutlingen, D)
Sterilisator HST 5020/3020	MLW (Medizin- und Labortechnik Werke, ehem. DDR)
Temperierbarer Schüttler VORTEMP	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Thermomixer	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
Transilluminator C-20M	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Ultraschallbad Sonorex TK52H	Bandelin Schalltec GmbH (Mörfelden-Walldorf, D)
Ultra-Turrax T8	IKA Werke (Stauffen, D)
Ultrazentrifuge TL 100 und Optima LE-80 K	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Ultrazentrifuge K23 D	MLW (Medizin- und Labortechnik Werke, ehem. DDR)
Vakuumpumpe Typ PM 16763-860.3	RNF Neuberger (Freiburg, D)
Vortex MS 2- IKA	IKA Werke (Stauffen, D)
Zellmühle ZM1000	Retsch (Hahn, D)
Zentrifuge EBA 21	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
Zentrifuge 3K12	Sigma (Osterode am Harz, D)

7.2 Verbrauchsmaterialien

Verwendete Verbrauchsmaterialien finden sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
bis-BODIPY FL C₁₁-PC	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dialysekammern, Ausschlussgrenze 10 kDa	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Filter Discs, Durchmesser 24 mm	Munktell & Filtrak GmbH (Bärenstein, D)
Gold Mikrocarrier, 1,0 µ	Bio-Rad (München, D)
Hybond ECL für Western Blotting	GE Healthcare (Freiburg, D)
Hybond – N⁺ für Southern Blotting	GE Healthcare (Freiburg, D)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Freiburg, D)
Low Cross Buffer	Candor Bioscience (Weißensberg, D)
Makrocarrier	Bio-Rad (München, D)
Mikrotiterplatten, schwarz	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Rupture Disks, 1100 psi	Bio-Rad (München, D)
Stopping Screens	Bio-Rad (München, D)
Whatman Blotting Papier	GE Healthcare (Freiburg, D)

7.3 Kitsysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten Kitsysteme werden in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Kitsysteme

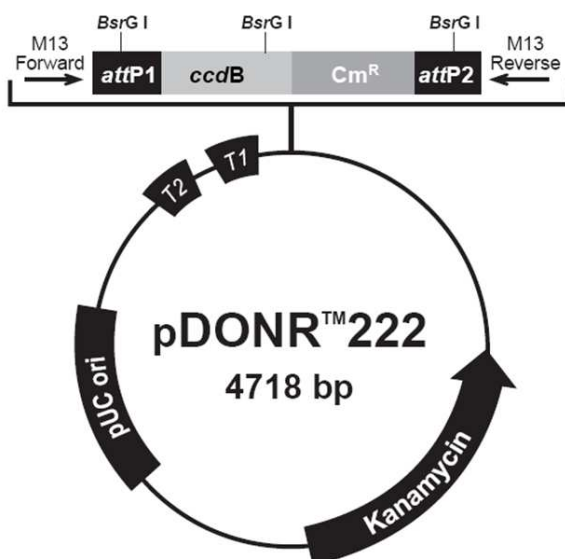
Kitsystem	Hersteller
Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System	GE Healthcare (Freiburg, D)
BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific (Rockford, USA)
CDP-Star Detection Reagent	GE Healthcare (Freiburg, D)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Freiburg, D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega (Mannheim, D)

7.4 Verwendete Vektoren für die Gateway-Klonierung

7.4.1 donor-Vektor

Der Vektor pDONR™222 wurde als donor-Vektor für die Gateway-Klonierung verwendet. Charakteristisch sind die *attP*-Seiten sowie das darin liegende *ccdB*-Gen (siehe Abbildung 55). Eine Selektion kann in *E.coli* durch Kanamycin erfolgen.

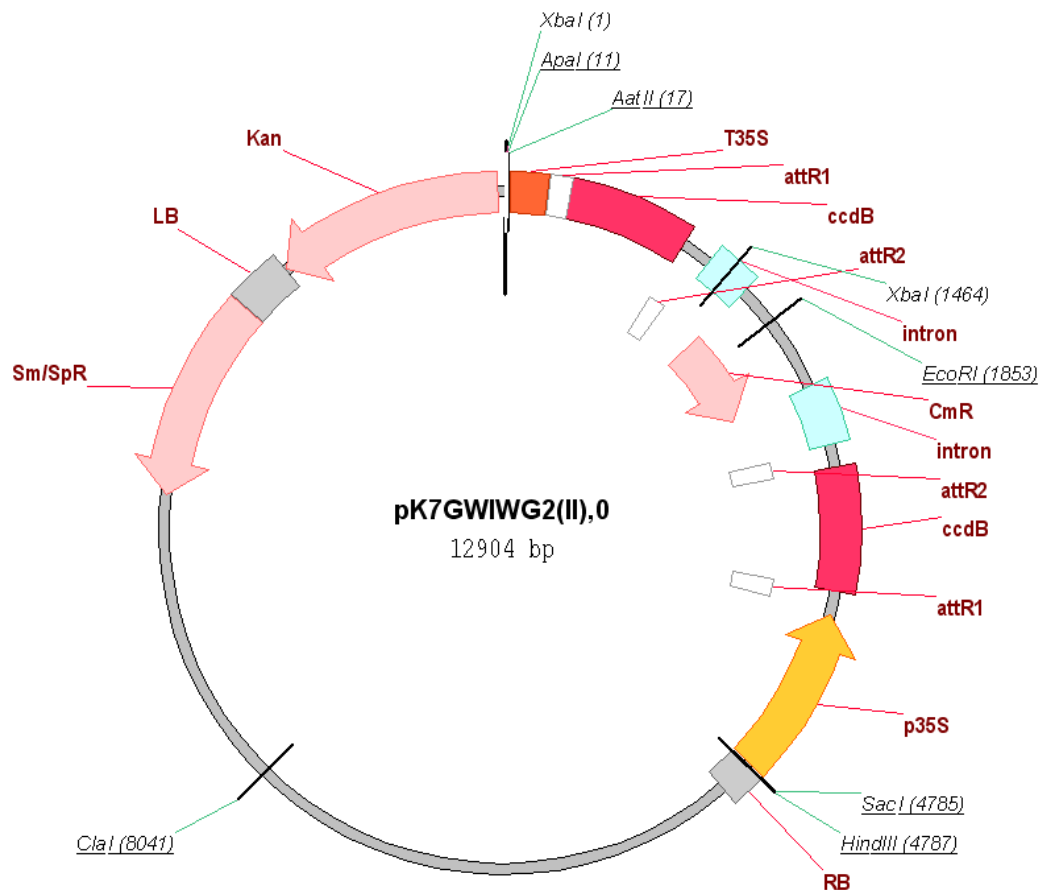
Abbildung 55: Vektorkarte von pDONR™ 222



7.4.2 destination-Vektor

Der destination-Vektor pK7GWIWG2(II) wurde zur Herstellung des Sanguinarinreduktase-RNAi-Vektors verwendet. Charakteristisch sind die *attR1*- und *attR2*-Seiten, die zweimal in umgekehrter Reihenfolge vorkommen, und das *ccdB*-Gen umschließen (siehe Abbildung 56). Zur Selektion kann in *E.coli* Spectinomycin (Sp^R) sowie Chloramphenicol (Cm^R) verwendet werden.

Abbildung 56: Vektorkarte von pK7GWIWG2(II)



7.5 UPLC-MS/MS-Daten der Alkaloide der Zellkultur von *Eschscholzia californica*

Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster der Alkaloide, die mittels UPLC aufgetrennt und MS/MS detektiert wurden (siehe 2.12.2.2), sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: UPLC-MS/MS Daten der Alkaloide aus Zellkulturen von *Eschscholzia californica*

Alkaloid	Retentionszeit [min]	m/z [M+H] ⁺	Ionenfalle MS ² [m/z, rel. Intensität %]
Reticulin	3,75	330	330 (-), 299 (6), 192 (100), 175 (1)
Scoulerin	4,08	328	328 (26), 311 (9), 279 (8), 178 (100), 151 (7)
N-Methylcoclaurin	4,32	300	300 (3), 269 (100), 237 (15), 192 (61), 175 (15), 143 (17), 107 (22)
Cheilanthifolin	4,33	326	326 (39), 309 (27), 277 (15), 190 (15), 178 (100), 176 (26), 151 (29)
4'-O-Methyl-N-methylcoclaurin	4,70	314	314 (3), 283 (100), 271 (7), 251 (7), 192 (12), 175 (19), 121 (9)
Protopin	4,93	354	354 (22), 336 (100), 323 (42), 305 (41), 293 (16), 283 (12), 275 (55), 247 (11), 206 (31), 189 (32), 188 (99), 178 (10), 149 (58)
N-Methylsinactin	5,02	354	keine MS ² -Daten
Allocryptopin	5,15	370	370 (5), 352 (100), 339 (12), 321 (37), 309 (10), 290 (21), 206 (14), 190 (13), 188 (54), 165 (3), 149 (5)
N-Methylcanadin	5,25	354	354 (13), 336 (100), 323 (21), 305 (33), 295 (7), 283 (6), 275 (41), 247 (8), 206 (40), 190 (84), 189 (14), 188 (35), 175 (6), 149 (15)
N-Methylstylopin	5,26	338	338 (4), 307 (5), 190 (100), 188 (5)
Nandinin	5,30	326	326 (3), 325 (3), 309 (8), 190 (4), 176 (100)
Stylopin	5,33	324	324 (47), 323 (11), 307 (23), 277 (10), 176 (100), 149 (44)
Sanguinarin	5,76	332	332 (100), 304 (11)
10-Hydroxysanguinarin	5,77	348	348 (100), 333 (8), 320 (28), 318 (6), 290 (6)
Berberin (int. Standard)	5,91	336	keine MS ² -Daten
12-Hydroxychelirubin	6,04	378	378 (56), 363 (100), 350 (4), 335 (7)
10-Hydroxychelerythrin	6,20	364	364 (23), 350 (8), 349 (100), 348 (7), 334 (4)
Macarpin	6,53	392	392 (100), 377 (27), 375 (9), 364 (9), 278 (20), 260 (6), 167 (16), 149 (30)
Chelirubin	6,55	362	362 (100), 361 (32), 348 (14), 347 (62), 344 (7), 334 (14)
Dihydrochelirubin	11,48	364	keine MS ² -Daten
Dihydrosanguinarin	11,49	334	keine MS ² -Daten
Dihydromacarpin	13,21	394	394 (3), 393 (4), 377 (100), 376 (3)
Dihydrochelerythrin	13,22	350	350 (6), 349 (5), 333 (100), 332 (5)

7.6 Southern Blots

7.6.1 Southern Blots der Sanguinarinreduktase-Isogene

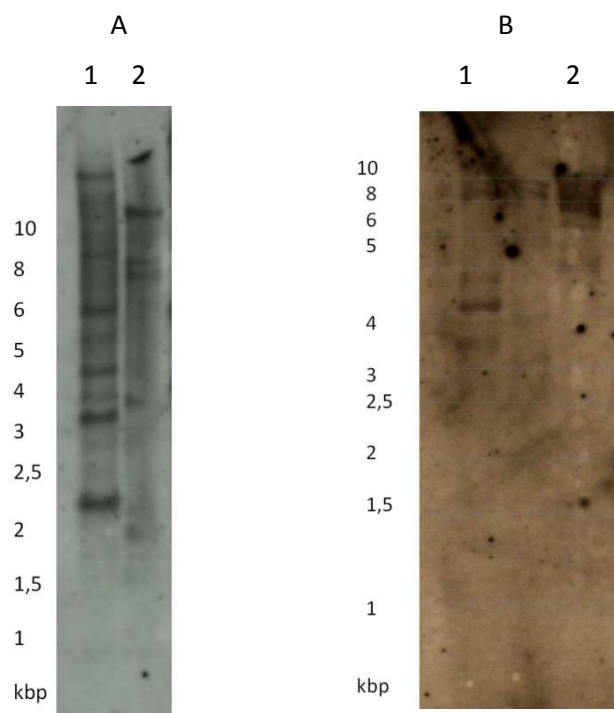
Beispielhaft sind hier zwei Abbildungen der Southern Blots aufgeführt, die zu den Ergebnissen aus Tabelle 10 unter 3.1 geführt haben.

Abbildung 57: Southern Blots zur Dokumentation der Isogene der Sanguinarinreduktase

Die Durchführung des Southern Blots erfolgte wie unter 2.9.13 beschrieben.

A – Verwendung von Sonde 1; Spur 1: Restriktionsenzym Eco RI, Spur 2: Restriktionsenzym Hind III

B – Verwendung von Sonde 2; Spur 1: Restriktionsenzym Eco RI; Spur 2: Restriktionsenzym Xho I



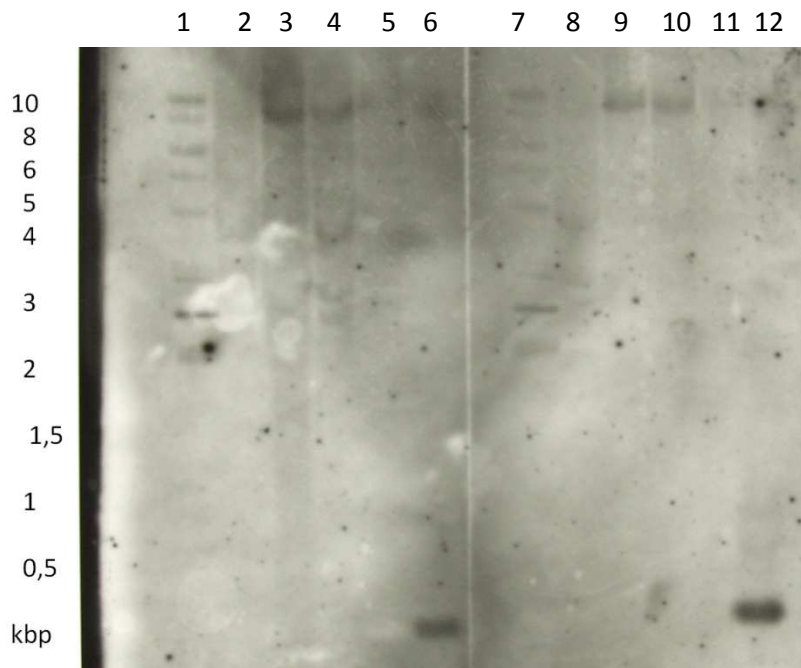
7.6.2 Southern Blots zur Bestimmung der Kopienzahl des Vektors pK7GIWG2(II)

Beispielhaft ist eine Abbildung des Southern Blots aufgeführt, die zur Bestimmung der Kopienzahl des anti-Sanguinarinreduktase-Vektors in den transgenen Zell-Linien wie unter 3.3.4 beschrieben, geführt hat.

Abbildung 58: Southern Blot zur Dokumentation der Kopienzahl des Vektors

Die Durchführung des Southern Blots erfolgte wie unter 2.9.13 beschrieben unter Verwendung des Restriktionsenzym Hind III.

Spur 1 und 7: Marker; Spur 2 und 8: Wildtyp; Spur 3: JC; Spur 4: 2b; Spur 5: 5b; Spur 6 und 12: Sonde als Positivnachweis; Spur 9: 1C2_Ü, Spur 10: 2b_Ü; Spur 11: 3C1_Ü.



7.7 Liste aller mittels PCR untersuchten Pflanzen

Tabelle 17 listet alle Pflanzen auf, aus denen genomische DNA isoliert wurde, mit welcher dann eine PCR mit den angegebenen Primern durchgeführt wurde. Gefundene Banden wurden aus dem Gel extrahiert und zum Sequenzieren geschickt.

Tabelle 17: Liste aller mittels PCR überprüften Pflanzen und Befunde

Pflanzenfamilie	Art	Gefundene Banden	
		F13/R23	F13/R30
Alliaceae	<i>Allium cernuum</i>		400 bp
	<i>Allium schoenoprasum</i>		200, 600, 1100 bp
	<i>Allium cepa</i>		700 bp
Altingiaceae	<i>Liquidambar styraciflua</i>		300 bp
Amaranthaceae	<i>Atriplex roseum</i>		
	<i>Atriplex hortensis</i>		

Pflanzenfamilie	Art	Gefundene Banden	
		F13/R23	F13/R30
Amaryllidaceae	<i>Chenopodium henricus</i>		
	<i>Galanthus elwesii</i>		
Apiaceae	<i>Levisticum officinale</i>		
	<i>Conium maculatum</i>		
Apocynaceae	<i>Laserpitium hispidum</i>		
	<i>Asclepias incarnata</i>	340, 400 bp	
	<i>Vinca major</i>		900 bp
	<i>Vinca minor</i>	400 bp	400, 500 bp
Araliaceae	<i>Vincetoxicum nigrum</i>	200, 350, 1000 bp	
	<i>Aralia racemosa</i>	700, 800 bp	
Arecaceae	<i>Howea forsteriana</i>	200, 250, 700 bp	
Aristolochiaceae	<i>Asarum europaeum</i>	200 bp	
	<i>Aristolochia macrophylla</i>	800 bp	
Asparagaceae	<i>Aristolochia clematitis</i>	800 bp	400 bp
	<i>Asparagus schoberiodes</i>		
	<i>Convallaria majalis</i>	400, 500, 600 bp	400 bp
Asphodelaceae	<i>Kniphofia</i>	300, 350, 400 bp	
Asteraceae	<i>Bellis perennis</i>		
	<i>Alchemilla vulgaris</i>		
	<i>Eriophyllum lanatum</i>		400 bp
	<i>Potentilla reptans</i>	400 bp	400, 1000, 1500 bp
	<i>Picris hieracioides</i>		
Berberidaceae	<i>Berberis empetrifolia</i>		
	<i>Berberis buxifolia</i>		400, 500 bp
	<i>Epimedium pubigerma</i>	200 bp	
	<i>Mahonia bealei</i>		
Betulaceae	<i>Nandina domestica</i>	800 bp	900 bp
	<i>Betula davurica</i>	350, 400 bp	
Boraginaceae	<i>Cynoglossum officinale</i>		
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i>	200 bp	400 bp
	<i>Sinapis alba</i>	200, 600, 1000 bp	400, 500, 900 bp
	<i>Brassica nigra</i>	400, 450 bp	500 bp
	<i>Brassica napus</i>		500 bp
	<i>Berteroa incana</i>		
Bromeliaceae	<i>Billbergia „Fascinator“</i>	200, 600 bp	450, 600, 700 bp
Campanulaceae	<i>Lobelia speciosa</i>	1500, 2000 bp	500 bp
Caprifoliaceae	<i>Weigela praecox</i>		
Caryophyllaceae	<i>Silene latifolia</i>	400 bp	
	<i>Silene nutans</i>		
	<i>Saponaria officinalis</i>	1500 bp	
Celastraceae	<i>Saponaria ocymoides</i>	3000 bp	
	<i>Maytenus riedetiercum</i>		
Cercidiphyllaceae	<i>Euonymus japonicus</i>		
	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>		
Chloranthaceae	<i>Chloranthus spicatus</i>		600 bp
Colchicaceae	<i>Colchicum autumnale</i>		
	<i>Colchicum bornmuelleri</i>		
	<i>Colchicum cilicicum</i>		
Convolvulaceae	<i>Quamoclit lobata</i>	600, 1500 bp	300, 400, 900 bp

Pflanzenfamilie	Art	Gefundene Banden	
		F13/R23	F13/R30
Cornaceae	<i>Griselinia littoralis</i>	900 bp	200 bp
	<i>Cornus amomum</i>		
Cupressaceae	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	1000 bp	400, 500, 1000 bp
Cyperaceae	<i>Carex arenaria</i>	300 bp	
	<i>Carex pendula</i>	300 bp	
Dicksoniaceae	<i>Dicksonia antarctica</i>		
Dryopteridaceae	<i>Dryopteris carthusiana</i>	200, 250, 1000 bp	200, 600, 1000 bp
Ephedraceae	<i>Ephedra dystachia</i>	400 bp	
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia dulcis</i>	450, 600 bp	300, 500 bp
	<i>Euphorbia esula</i>		
Fabaceae	<i>Manihot esculenta</i>	400 bp	
	<i>Vicia venosa</i>	200, 250, 400 bp	
	<i>Phaseolus coccineus</i>	450 bp	
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	200 bp	400 bp
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>		
	<i>Thermopsis montana</i>		
	<i>Lupinus polyphyllus</i>		450 bp
	<i>Medicago falcata (x varia)</i>	350 bp	400, 900 bp
	<i>Clitoria ternatea</i>	500 bp	600, 700, 800 bp
	<i>Castanea sativa</i>	400, 800 bp	1500 bp
Fagaceae	<i>Dicentra spectabilis</i>	200, 400, 500 bp	900, 1000 bp
Fumariaceae	<i>Gentiana cruciata</i>	400 bp	600 bp
Gentianaceae	<i>Geranium dalmaticum</i>		
Geraniaceae	<i>Nautilocalyx forгатii</i>		
Gesneriaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	700, 1050 bp	400 bp
Ginkgoaceae	<i>Hamamelis vernalis</i>		
Hamamelidaceae	<i>Hypericum prolificum</i>	300, 400, 450 bp	
Hypericaceae	<i>Iris ruthenica</i>		
Iridaceae	<i>Iris acutifolia</i>	700 bp	400 bp
	<i>Platycarya strobilacea</i>	400 bp	
Juglandaceae	<i>Salvia officinalis</i>		
Lamiaceae	<i>Lavandula officinalis</i>		
	<i>Origanum vulgare</i>		
	<i>Ocimum basilicum</i>		
	<i>Neolitsea sericea</i>		
Lauraceae	<i>Camassia quamash</i>	500 bp	
Liliaceae	<i>Orchidantha maxillarioides</i>	300 bp	400 bp
Lowiaceae	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	300 bp	
Malvaceae	<i>Lavathera thuringiaca</i>		
	<i>Cocculus laurifolius</i>	900 bp	1700 bp
Menispermaceae	<i>Cocculus carolinus</i>		
	<i>Stephania cephelearum</i>	400 bp	
	<i>Triclisia subcordata</i>	200, 400, 800 bp	1200 bp
	<i>Broussonetia papyrifera</i>	400, 1100 bp	500, 550 bp
Moraceae	<i>Eucalyptus citriodora</i>	800, 1000 bp	800, 1500, 2500 bp
Myrtaceae	<i>Nelumbo nucifera</i>		600 bp
Nelumbonaceae	<i>Nymphaea rubra</i>		
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea spec</i>		
	<i>Davidia involucrata</i>	800 bp	800 bp
Nyssaceae			

Pflanzenfamilie	Art	Gefundene Banden	
		F13/R23	F13/R30
Oleaceae	<i>Syringa yunnanensis</i>	800 bp	
Papaveraceae	<i>Macleaya microcarpa</i>		
	<i>Corydalis lutea</i>	600 bp	800 bp
	<i>Papaver nudicaule</i>	200 bp	
	<i>Papaver rhoeas</i>	350 , 700 bp	
	<i>Macleaya cordata</i>		400 bp
	<i>Papaver argemone</i>	400, 500, 800 bp	1700 bp
	<i>Chelidonium majus</i>	200 bp	
	<i>Papaver bracteatum</i>	400, 800 bp	
	<i>Trollius europaeus</i>		400 bp
	<i>Glaucium flavum</i>		500 bp
	<i>Papaver somniferum</i>	300 bp	
	<i>Argemone grandiflora</i>	200, 500, 800 bp	300, 600, 1500 bp
	<i>Papaver orientalis</i>	400 bp	
	<i>Corydalis ochroleuca</i>	200 bp	
Pinaceae	<i>Pinus halepensis</i>		
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i>		
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	400, 500 bp	400, 800 bp
Pittosporaceae	<i>Pittosporum undulatum</i>		
Plumbaginaceae	<i>Limonium sinuatum</i>		
Poaceae	<i>Aira praecox</i>	300 bp	
	<i>Sorghum halepense</i>		200 bp
	<i>Zea mays</i>		600 bp
	<i>Agriopyrum caninum</i>	200 bp	
	<i>Hordeum jubatum</i>	350 bp	
	<i>Secale cereale</i>	300, 400, 800 bp	500 bp
	<i>Elymus canadensis</i>		
	<i>Poa pratensis</i>	300 bp	600, 1500 bp
Polemoniaceae	<i>Phlox paniculata</i>	700, 1800 bp	
Polygonaceae	<i>Rheum palmatum</i>		400 bp
Primulaceae	<i>Lysimachia clethroides</i>		900 bp
Pteridaceae	<i>Pteris cretica</i>	500 bp	700, 800 bp
Ranunculaceae	<i>Nigella damascena</i>	200 bp	
	<i>Aconitum napellus</i>		
	<i>Delphinium elatum</i>	200 bp	
	<i>Helleborus orientalis</i>		
	<i>Ranunculus repens</i>		500, 800, 1200 bp
	<i>Clematis recta</i>	400, 600 bp	800 bp
	<i>Thalictrum flavum</i>	200, 250 bp	500, 800 bp
	<i>Aquilegia vulgaris</i>	400 bp	
	<i>Pulsatilla vulgare</i>		
	<i>Consolida regalis</i>		
	<i>Adonis amurensis</i>	200, 400 bp	400, 800, 1000 bp
	<i>Thalictrum lucidum</i>		
	<i>Aquilegia crysantha</i>	400 bp	
	<i>Cimicifuga rubifolia</i>		
	<i>Semiaquilegia ecalcarata</i>	400, 800, 1000 bp	500, 800, 1000 bp
	<i>Adonis flammea</i>		1000 bp
	<i>Hepatica transsylvanica</i>		

Pflanzenfamilie	Art	Gefundene Banden	
		F13/R23	F13/R30
	<i>Ranunculus lanuginosus</i>		
	<i>Anemone leveillei</i>		
	<i>Aconitum lycoctonum</i>		400, 1000, 1500 bp
	<i>Helleborus viridis</i>	400 bp	1000 bp
Rhamnaceae	<i>Ziziphus jujuba</i>	500, 600 bp	500, 1000 bp
Rutaceae	<i>Choysia ternata</i>		550 bp
	<i>Ruta graveolens</i>	350 bp	
	<i>Dictamnus albus</i>		
Salicaceae	<i>Salix bicolor</i>	400 bp	
Saxifragaceae	<i>Tellima grandiflora</i>	200 bp	
	<i>Heuchera sanguinea</i>		
Schisandraceae	<i>Kadsura japonica</i>	500 bp	
Scrophulariaceae	<i>Penstemon hirsutis</i>		
	<i>Maurandia scandens</i>	400, 800 bp	400, 800, 1000 bp
Solanaceae	<i>Solanum dulcamara</i>	600 bp	
	<i>Atropa belladonna</i>	400, 1000 bp	
	<i>Datura stramonium</i>	200, 300, 800bp	
	<i>Hyoscyamus niger</i>		
	<i>Nicotiana tabacum</i>	200 bp	
	<i>Capsicum annum</i>	700 bp	
	<i>Brugmansia suaveolens</i>	400, 600, 800 bp	500 bp
	<i>Solanum lycopersicum</i>		
	<i>Solanum nigrum</i>	700, 800 bp	
	<i>Physalis alkekengi</i>	200 bp	450, 900, 1400 bp
	<i>Schizanthus pinnatus</i>		600 bp
	<i>Nicandra physaloides</i>	1200 bp	
	<i>Petunia axillaris</i>		
Strelitziaceae	<i>Strelitzia reginae</i>		
Tectariaceae	<i>Tectaria cicutaria</i>	250, 300, 500 bp	400, 600, 900 bp
Valerianaceae	<i>Valeriana officinalis</i>		
Verbenaceae	<i>Verbena rigida</i>		500 bp
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	200, 250, 400 bp	500, 600 bp
	<i>Parthenocissus inserta</i>		
	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>		
	<i>Vitis vulpina</i>		
Zingiberaceae	<i>Alpina zerumbet</i>		

7.8 Alignment der Proteinsequenzen des aktiven Zentrums nach ClustalW

Das alignment der Sequenzen des aktiven Zentrums der Sanguinarinreduktase, die mit Hilfe der PCR ermittelt wurden, wurde mit Hilfe des Algorithmus ClustalW erstellt und ist in Abbildung 59 dargestellt (siehe auch unter 4.2.2).

Abbildung 59: Ausschnitt des alignments der Sequenzen des aktiven Zentrums, erstellt mit ClustalW

Dieselben Proteinsequenzen, die in Abbildung 42 dargestellt sind, wurden mit Hilfe des Algorithmus ClustalW zu einem alignment zusammengefasst. Dargestellt ist hier ein Ausschnitt daraus. Aminosäuren, die sich von der Konsensus-Sequenz (siehe letzte Zeile) unterscheiden, sind farbig hinterlegt.

				20	
Maurandia scandens 400bp	Q I V - LVG - SM	GGT N L N H P L N	S L G N G N I L	26	
Griselinia littoralis	Q I V - LVG - SM	GGT N L N H P L N	S L G N G N I L	26	
Eucalyptus citriodora	Q V V - LVG - SM	GGT N L D H P L N	S L G N G N I L	26	
Medicago falcata	Q I V - LVG - SM	GGT D L N H P L N	S L G D G N I L	26	
Salix bicolor	Q I V - LVG - SM	GGT D L N H P L N	S L G G G N I L	26	
Betula davurica	Q V V - LVG - SM	GGT D L N N P L N	S L G N G N I L	26	
Castanea sativa	Q I V - LVG - SM	GGT D L N N P L N	S L G N G N I L	26	
Aralia racemosa	Q I V - LVG - SM	GGT D L S N P L N	S L G N G N I L	26	
Atropa belladonna	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Solanum dulcamara	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Brugmansia suaveolens	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Maurandia scandens 800bp	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Manihot esculenta	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Nicandra physaloides	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	G L G N D N I L	26	
Carex pendula	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	G L G N D N I L	26	
Physalis alkekengi	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	G L G N D N I L	26	
Papaver orientale	H I V - LVG - SM	GGT D P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Papaver somniferum	H I V - LVG - SM	GGT D P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Papaver nudicaule	H I V - LVG - SM	GGT D P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Papaver bracteatum	H I V - LVG - SM	GGT D P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Corydalis ochroleuca	H I V - L V A - SM	GGT D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Corydalis lutea	H I V - L V A - SM	GG M D P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Thalictrum flavum	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Argemone grandiflora	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Glaucium flavum	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Aquilegia crsantha	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Semiaquilegia ecalcarata	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Silene latifolia	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Macleaya cordata	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Thalictrum lucidum	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Datura stramonium	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Delphinium elatum	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Nigella damascena	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Chelidonium majus	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Eschscholzia californica	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Vincetoxicum nigrum	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Gentiana cruciata	H I V - LVG - SM	GG C D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Dicentra spectabilis	H I S M L V G - SM	GG C D P D H F L N	D M G N G N I L	27	
Brassica rapa	- - - - - - - - -	- - - E P D H F L N	F M G N G N I L	15	
Allium cernuum	- V E - - - G - SM	G V C D P D F F V N	H M G N G N I L	23	
Papaver rhoeas	H I V - LVG - SM	GGT D P D H F L N	H M G N G N I L	26	
Capsicum annuum	Q I V - LVG - SM	GGT N P N H F L N	H M G N G N I L	26	
Helleborus viridis	H I V - LVG - SM	C G T I P D H P L N	S I D N G N I L	26	
Broussonetia papyrifera	H I V - LVG - SM	GGT D P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Billbergia "Fascinator"	H I V - LVG - SM	GGT D V N N P L N	S I G N G N I L	26	
Carex arenaria	Q I V - LVG - SM	GGT D V N H P L N	S I G N G N I L	26	
Phaseolus coccineus	H V V - LVG - SM	GGT N T N H P L N	S L G N G N I L	26	
Saponaria officinalis	H I V - LVG - SM	GGT N A N H P L N	S L A N G N I L	26	
Clitoria ternatea	H I V - LVG - SM	GGT N P N H P L N	S L G N G N I L	26	
Platycarya strobilacea	Q I G - LVG - SM	GGT N L I N P L N	T W G N G N K L	26	
Brassica nigra	Q I V - L - E W S M	GGT N I N N P L N	S I G N A N I L	26	
Consensus	H I V - LVG - SM	GGT D P N H F L N	H M G N G N I L		

7.9 Western Blots zum Nachweis von Sanguinarinreduktase und 1XQ6 in verschiedenen Pflanzen

Die Western Blots, die zum Nachweis der Sanguinarinreduktase und des Homologons 1XQ6 angefertigt wurden, sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Einen Überblick gibt die Tabelle 13 im Kapitel 4.3.2.

Abbildung 60: Western Blot SR (1)

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Corydalis lutea*; Spur 2: *Thalictrum flavum*; Spur 3: *Griselinia littoralis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Brassica rapa*; Spur 7: *Aralia racemosa*; Spur 8: *Macleaya cordata*; Spur 9: *Allium cernuum*.

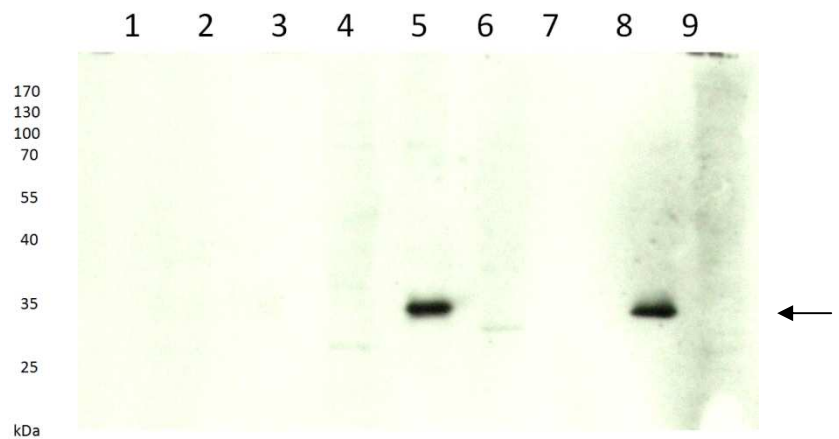


Abbildung 61: Western Blot 1XQ6 (1)

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Corydalis lutea*; Spur 2: *Thalictrum flavum*; Spur 3: *Griselinia littoralis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Brassica rapa*; Spur 7: *Aralia racemosa*; Spur 8: *Macleaya cordata*; Spur 9: *Allium cernuum*.

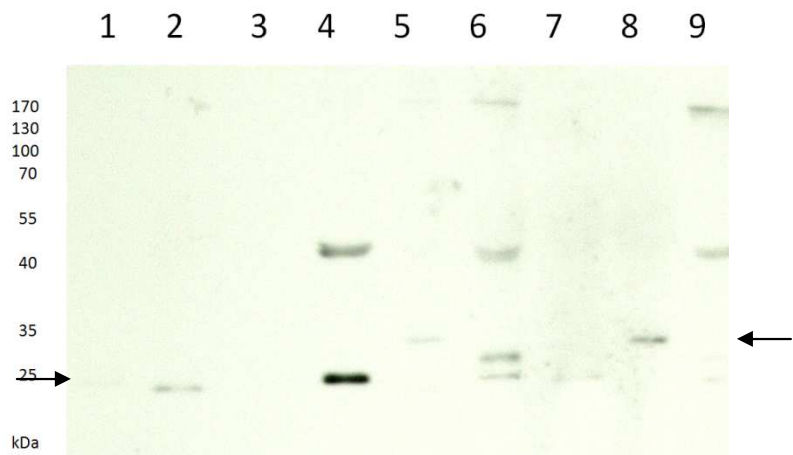
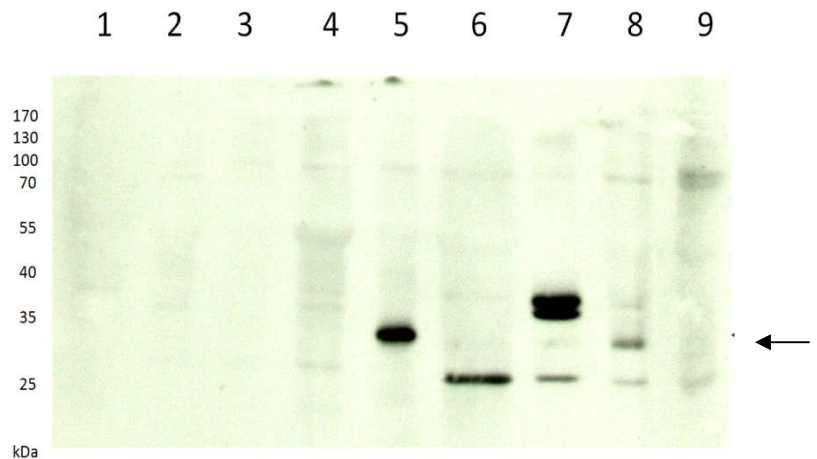


Abbildung 62: Western Blot SR (2)

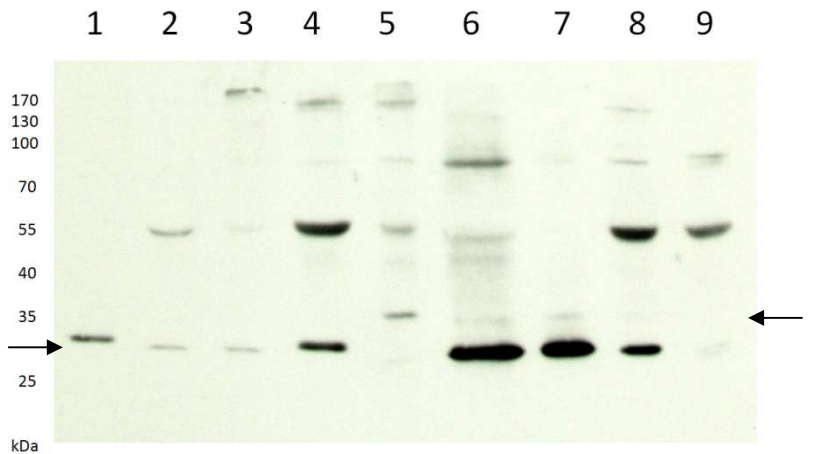
Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Solanum dulcamara*; Spur 2: *Carex pendula*; Spur 3: *Papaver orientale*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Silene latifolia*; Spur 7: *Datura stramonium*; Spur 8: *Dicentra spectabilis*; Spur 9: *Medicago falcata*

**Abbildung 63: Western Blot 1XQ6 (2)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Solanum dulcamara*; Spur 2: *Carex pendula*; Spur 3: *Papaver orientale*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Silene latifolia*; Spur 7: *Datura stramonium*; Spur 8: *Dicentra spectabilis*; Spur 9: *Medicago falcata*

**Abbildung 64: Western Blot SR (3)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

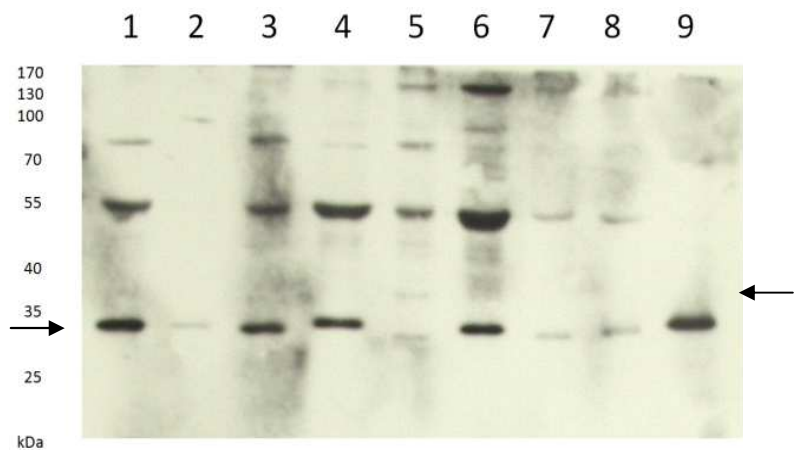
Spur 1: *Vincetoxicum nigrum*; Spur 2: *Chelidonium majus*; Spur 3: *Nigella damascena*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Aquilegia crsantha*; Spur 7: *Papaver bracteatum*; Spur 8: *Atropa belladonna*; Spur 9: *Helleborus viridis*



Abbildung 65: Western Blot 1XQ6 (3)

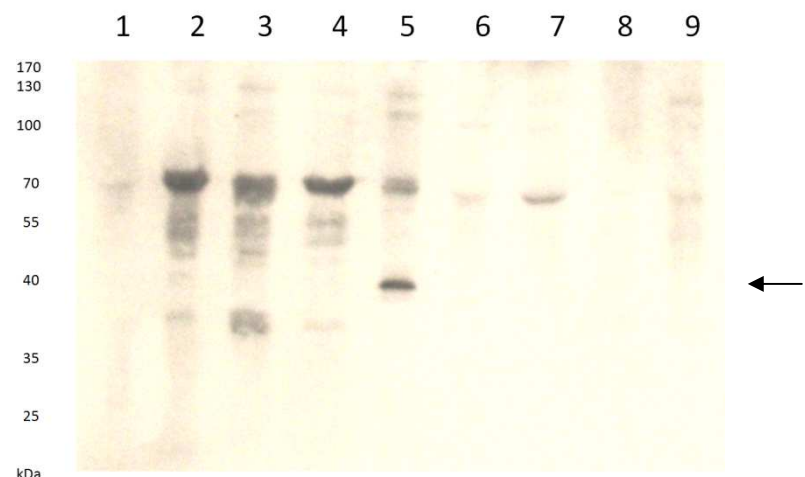
Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Vincetoxicum nigrum*; Spur 2: *Chelidonium majus*; Spur 3: *Nigella damascena*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Aquilegia crisantha*; Spur 7: *Papaver bracteatum*; Spur 8: *Atropa belladonna*; Spur 9: *Helleborus viridis*

**Abbildung 66:** Western Blot SR (4)

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Nicandra physaloides*; Spur 2: *Gentiana cruciata*; Spur 3: *Saponaria officinalis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Papaver somniferum*; Spur 7: *Papaver rhoeas*; Spur 8: *Delphinium elatum*; Spur 9: *Thalictrum lucidum*

**Abbildung 67:**Western Blot 1XQ6 (4)

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Nicandra physaloides*; Spur 2: *Gentiana cruciata*; Spur 3: *Saponaria officinalis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Papaver somniferum*; Spur 7: *Papaver rhoeas*; Spur 8: *Delphinium elatum*; Spur 9: *Thalictrum lucidum*

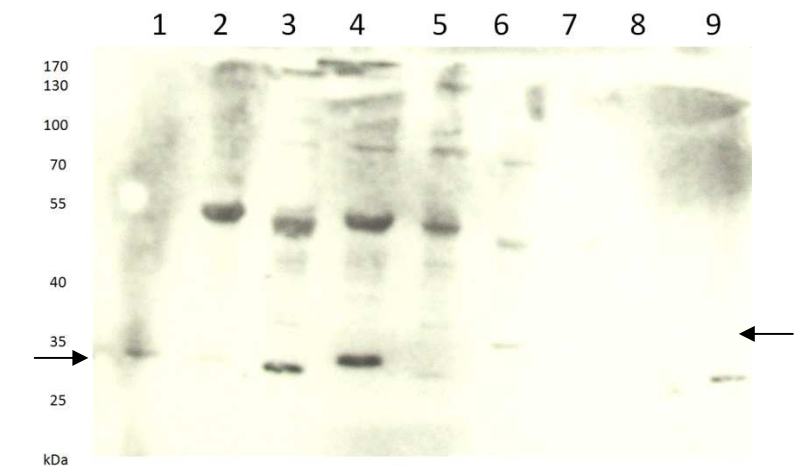
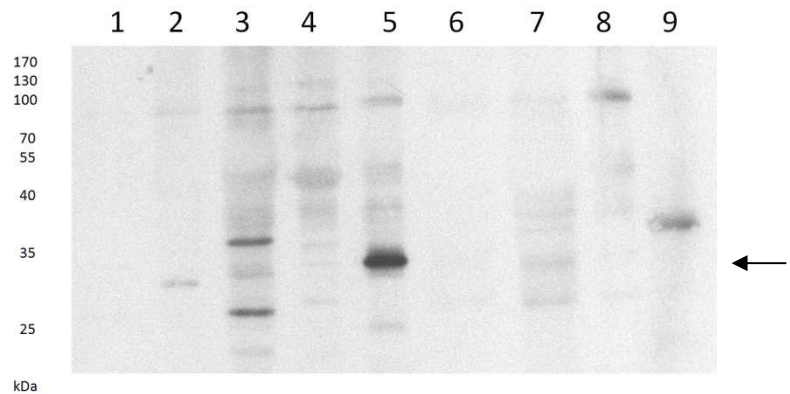


Abbildung 68: Western Blot SR (5)

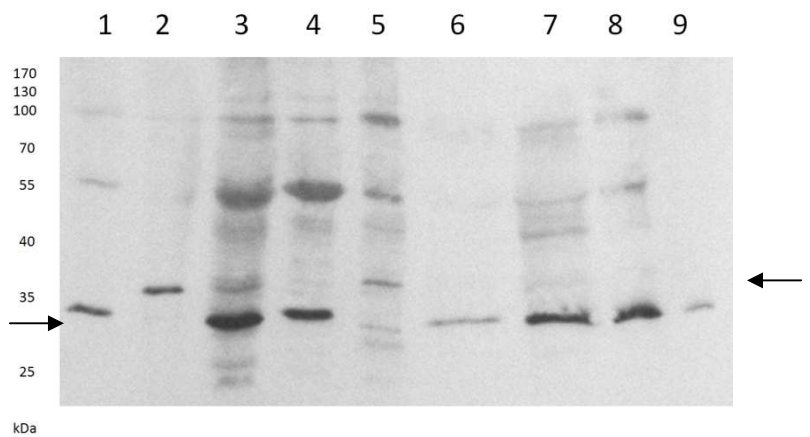
Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Papaver bracteatum*; Spur 2: *Papaver somniferum*; Spur 3: *Saponaria officinalis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Papaver rhoeas*; Spur 7: *Delphinium elatum*; Spur 8: *Nigella damascena*; Spur 9: *Chelidonium majus*

**Abbildung 69: Western Blot 1XQ6 (5)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Papaver bracteatum*; Spur 2: *Papaver somniferum*; Spur 3: *Saponaria officinalis*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Papaver rhoeas*; Spur 7: *Delphinium elatum*; Spur 8: *Nigella damascena*; Spur 9: *Chelidonium majus*

**Abbildung 70: Western Blot SR (6)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Eucalyptus citriodora*; Spur 2: *Betula clavurica*; Spur 3: *Billbergia fascinator*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Castanea sativa*; Spur 7: *Salix bicolor*; Spur 8: *Maurandia scandens*; Spur 9: *Capsicum annuum*

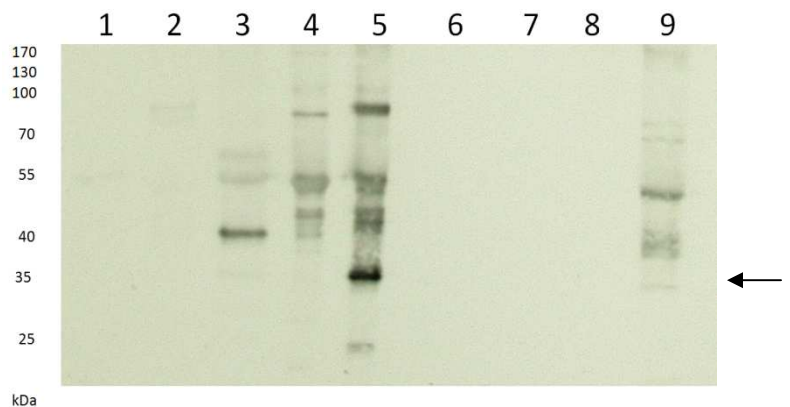
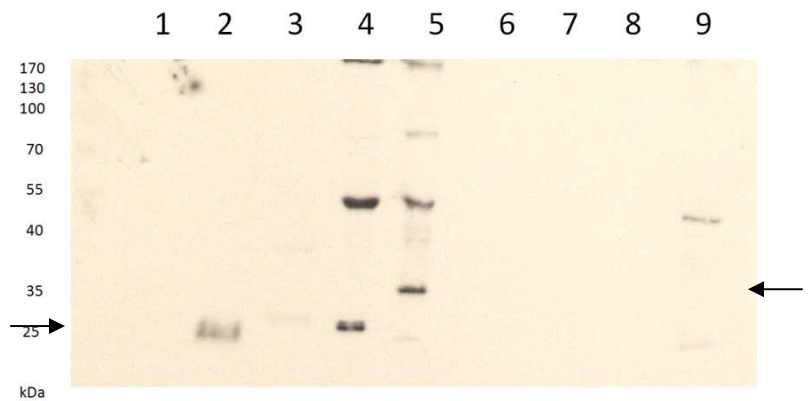


Abbildung 71: Western Blot 1XQ6 (6)

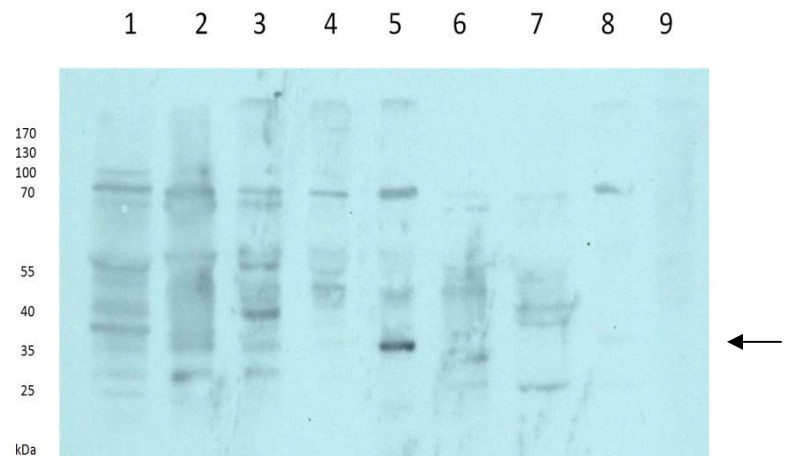
Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Eucalyptus citriodora*; Spur 2: *Betula clavurica*; Spur 3: *Billbergia fascinator*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Castanea sativa*; Spur 7: *Salix bicolor*; Spur 8: *Maurandia scandens*; Spur 9: *Capsicum annuum*

**Abbildung 72: Western Blot SR (7)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Brassica nigra*; Spur 2: *Berteroa incana*; Spur 3: *Manihot esculenta*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Carex arenaria*; Spur 7: *Phaseolus coccineus*; Spur 8: *Corydalis ochroleuca*; Spur 9: *Physalis alkekengi*

**Abbildung 73: Western Blot 1XQ6 (7)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Brassica nigra*; Spur 2: *Berteroa incana*; Spur 3: *Manihot esculenta*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Carex arenaria*; Spur 7: *Phaseolus coccineus*; Spur 8: *Corydalis ochroleuca*; Spur 9: *Physalis alkekengi*

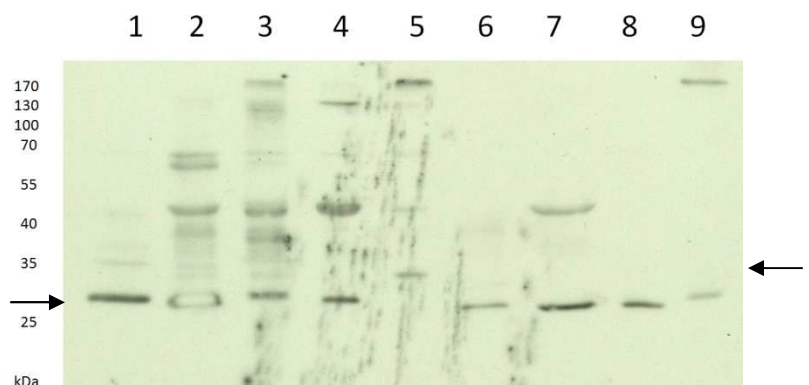
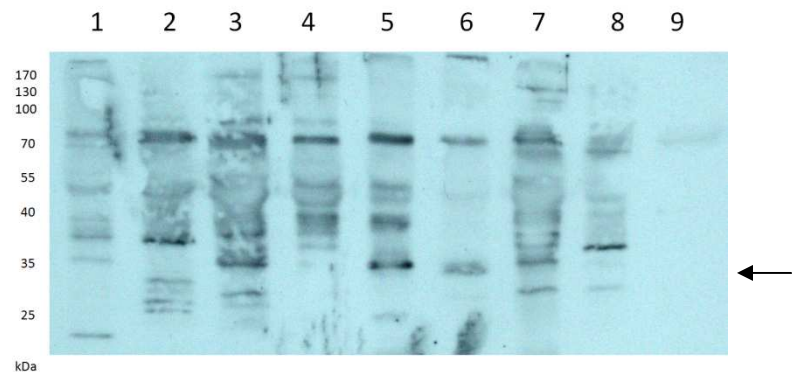


Abbildung 74: Western Blot SR (8)

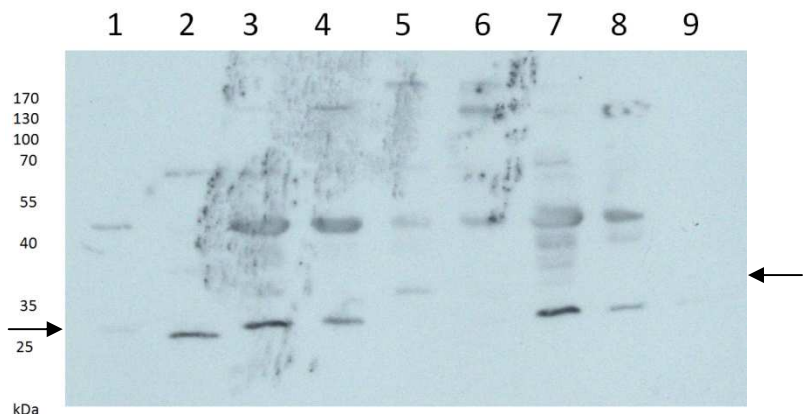
Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-Sanguinarinreduktase-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Capsicum annuum*; Spur 2: *Clitoria ternatea*; Spur 3: *Semiaquilegia ecalcarata*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Argemone grandiflora*; Spur 7: *Brugmansia suaveolens*; Spur 8: *Broussonetia papyrifera*; Spur 9: *Platycarya strobilacea*

**Abbildung 75: Western Blot 1XQ6 (8)**

Durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (20 µg pro Spur) wurden auf eine Nitrocellulose-membran übertragen und mit Hilfe des anti-1XQ6-Antiserums detektiert (nach 2.10.5). Der Pfeil rechts markiert die Banden der Sanguinarinreduktase bei etwa 34 kDa, links die Banden von 1XQ6 bei ca. 27 kDa. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Spur 1: *Capsicum annuum*; Spur 2: *Clitoria ternatea*; Spur 3: *Semiaquilegia ecalcarata*, Spur 4: *Arabidopsis thaliana*; Spur 5: *Eschscholzia californica*; Spur 6: *Argemone grandiflora*; Spur 7: *Brugmansia suaveolens*; Spur 8: *Broussonetia papyrifera*; Spur 9: *Platycarya strobilacea*



7.10 Pflanzen ohne messbare Sanguinarinreduktase-Aktivität

Eine Liste der Pflanzen, in denen keine messbare Sanguinarinreduktase-Aktivität festgestellt werden konnte, findet sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: Liste der Pflanzen ohne Sanguinarinreduktase-Aktivität

<i>Allium cernuum</i>	<i>Brugmansia suaveolens</i>	<i>Griselinia littoralis</i>	<i>Platycarya strobilacea</i>
<i>Aquilegia crisantha</i>	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Helleborus viridis</i>	<i>Salix bicolor</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Carex arenaria</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Saponaria officinalis</i>
<i>Aralia racemosa</i>	<i>Carex pendula</i>	<i>Maurandia scandens</i>	<i>Semiaquilegia ecalcarata</i>
<i>Atropa belladonna</i>	<i>Castanea sativa</i>	<i>Medicago falcata</i>	<i>Silene latifolia</i>
<i>Berteroa incana</i>	<i>Clitoria ternatea</i>	<i>Nicandra physaloides</i>	<i>Solanum dulcamara</i>
<i>Betula davurica</i>	<i>Corydalis lutea</i>	<i>Nigella damascena</i>	<i>Thalictrum flavum</i>
<i>Billbergia ‚Fascinator‘</i>	<i>Datura stramonium</i>	<i>Papaver bracteatum</i>	<i>Thalictrum lucidum</i>
<i>Brassica nigra</i>	<i>Delphinium elatum</i>	<i>Papaver orientalis</i>	<i>Vincetoxicum nigrum</i>
<i>Brassica rapa</i>	<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>	
<i>Broussonetia papyrifera</i>	<i>Gentiana cruciata</i>	<i>Physalis alkekengi</i>	

Danksagung

Für die erfolgreiche Fertigstellung der vorliegenden Arbeit gilt mein herzlichster Dank:

Herrn Professor Dr. Werner Roos, für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas, den wissenschaftlichen Beistand, die vielen Anregungen sowie die zahlreichen Stunden der gemeinschaftlichen Arbeit an dem Thema, was wesentlich zum Gelingen beigetragen hat;

dem Botanischen Garten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Vielzahl der kultivierten Pflanzen und für die Erlaubnis, von einigen etwas Blattmaterial entnehmen zu dürfen;

Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) sowie Dr. Jürgen Schmidt und Frau Ramona Heinke (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) für die Durchführung zahlreicher massenspektrometrischer Untersuchungen sowie hilfreicher Unterstützung bei der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse;

allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Zellbiologie, vor allem Sophie Weigl und Dr. Carolin Massalski, sowie Dr. Michael Heinze, Beate Schöne und Gabi Danders für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Anregungen und tolle Zusammenarbeit;

meiner Familie und meinem Freund, für ihre Geduld mit mir, ihre Unterstützung, Hilfe und Trost in schwierigen Stunden – irgendwann zahlt sich doch alles aus!

Lebenslauf

Zur Person

Name	Müller
Vorname	Henriette Ulrike
Akademischer Grad	Diplom-Pharmazeutin, Diplom-Lebensmittelchemikerin
Geburtsdatum	01. Januar 1985
Geburtsort	Greiz
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Auf der Hardt 25, 56130 Bad Ems

Beruflicher Werdegang

seit 05/2012	Prüfleiter der Teileinheit „Lebensmitteluntersuchung“ der Laborabteilung 3 „Lebensmittel- und Ökochemie“ am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Koblenz
--------------	--

Hochschulausbildung

seit 12/2008	Promotion am Institut für Pharmazie, Abt. Molekulare Zellbiologie Thema: „Die Rolle der Sanguinarinreduktase in der Kontrolle des Benzophenanthridin-Metabolismus in Pflanzen“
10/2008 – 04/2012	Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Einstieg im Hauptstudium <ul style="list-style-type: none">• 11/2010 – 04/2011: Erarbeitung einer Diplomarbeit am Institut für Pharmazie, Abt. Molekulare Zellbiologie, mit dem Thema: „Screening nach Mechanismen zur Entgiftung pflanzlicher Toxine auf DNA- und Protein-Ebene“• Prüfungsleistung des zweiten Prüfungsabschnittes der Staatsprüfung: Sehr gut (1,0)• 05/2011 – 04/2012: Praktisches Jahr zur Absolvierung des dritten Abschnitts der Staatsprüfung für staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerinnen und Lebensmittelchemiker am Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt in Halle (Gesamtnote: „Sehr gut“)
10/2003 - 10/2008	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg <ul style="list-style-type: none">• Praktisches Halbjahr am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München, Erarbeitung einer Diplomarbeit mit dem Thema „Detektion von Schwefelost-induzierten Schäden an humanen immortalisierten Keratinozyten“ [Gewinnerin des Heinz-Gerngroß-Förderpreises der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie 2008]• Praktisches Halbjahr in der Adler-Apotheke, Halle/Saale• Abschlüsse: Diplom-Pharmazeutin (Note: 1,0) Approbierte Apothekerin (Note: 1,42)

Militärische Ausbildung

- 02/2004 – 03/2004 Vierwöchiger **Offizierslehrgang** an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München
- 07/2003 Eintritt in die Bundeswehr als **Soldat auf Zeit** (Verpflichtungszeitraum: 17 Jahre), anschließend dreimonatige Grundausbildung in Feldkirchen, Bayern

Schulbildung

- 08/1995 – 07/2003 Staatliches **Gymnasium** in Greiz
• Abschluss: Abitur (Note 1,0)
- 08/1991 – 07/1995 **Grundschule** in Mohlsdorf

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Diplomarbeiten

- Müller H. U.** (2011) "Screening nach Mechanismen zur Entgiftung pflanzlicher Toxine auf DNA- und Protein-Ebene", *Institut für Pharmazie, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Müller H. U.** (2008) "Detektion von Schwefelost-induzierten Schäden an humanen immortalisierten Keratinozyten", *Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München.*

Poster

- Müller H. U., Balszuweit F., Kehe K., and Thiermann H.** (2008) "A simple and accurate method to determine sulfur-mustard-induced DNA damage", *Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München.*

Publikationen

- Müller, H. U., R. Heinke, J. Schmidt, W. Roos.** (2012) "The detoxifying enzyme sanguinarine reductase has strong regulatory impacts on benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *In preparation*
- Müller, H. U., W. Roos.** (2012) "Sanguinarine reductase – evolution of an enzyme for the handling of toxic alkaloids. *In preparation*
- Müller H. U.** (2008) "Detektion von Schwefelost-induzierten DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assays in Kombination mit Reparaturenzymen." *Wehrmedizin. Monatschrift, 52. Jahrgang, Heft 12:367-71.*

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema

„Die Rolle der Sanguinarinreduktase in der Kontrolle des Benzophenanthridin-Metabolismus in Pflanzen“

von mir selbst, ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Doktorarbeit wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -, deren Promotionsordnung ich anerkenne, vorgelegt.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Bad Ems, den 29.09.2012

Henriette Müller