

**Abbau von Speichertriglyzeriden in keimenden
Samen der Gurke (*Cucumis sativus*)**

Dissertation



**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Thomas Balkenhohl

Halle (Saale) 2000

**Abbau von Speichertriglyzeriden in keimenden
Samen der Gurke (*Cucumis sativus*)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Thomas Balkenhohl
geb. am 19.9.1967 in Arnsberg

Gutachter:

1.Prof. Dr. Wasternack

2.Prof. Dr.Ulbrich-Hoffmann

3.Prof. Dr. Kühn

Halle (Saale), den 7.2.2000

Akürzungsverzeichnis

ε	Extinktionskoeffizient
(9 <i>S</i>)-H(P)ODE	(9 <i>S</i>)-Hydro(pero)xy-(10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeciensäure
(13 <i>S</i>)-H(P)ODE	(13 <i>S</i>)-Hydro(pero)xy-(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i>)-octadeciensäure
13-H(P)OTE	(13 <i>S</i>)-Hydro(pero)xy-(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i>)-octadecatriensäure
13-KODE	13-Keto-(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i>)-octadeciensäure
9,10-EODE	9,10-Epoxy-(9 <i>Z</i>)-octadeciensäure
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
A	Ampère
Abs	Absorption
AS	Ammoniumsulfat
BHT	3,5-Di- <i>t</i> butyl-4-hydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CF	Chromatofokussierung
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
CMC	kritische micellare Konzentration
COSY	Korrelationsspektroskopie
CP-HPLC	Chiralphasen-HPLC
d	Tag
DL	1,3-Dilinolein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EV	Elutionsvolumen
g	Erdbeschleunigung
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMQC	Heteronukleare Mehrquantenkohärenz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAC	Anionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
K _{av}	relative Elution = $(V_e - V_o)/(V_t - V_o)$
KDa	Kilodalton
K _M	Michaelis Konstante
LOX	Lipoxygenase
M	Molar (Mol/Liter)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
ML	Monolinolein
NaN ₃	Natriumazid
NC	Nitrozellulose
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pI	Isoelektrischer Punkt
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur oder Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Gelfiltrationschromatographie
SP-HPLC	Normalphasen-HPLC
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TL	Trilinolein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Lipidkörper	1
1.2 Lipidkörper-gebundene Lipasen	3
1.3 Der Lipidkörper in Gurkenkeimlingen	5
1.4 Ziel der Arbeit	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Chemikalien	8
2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht	8
2.3 Aufschluss des Pflanzenmaterials	8
2.4 Zellfraktionierung	9
2.5 Lipidextraktion	10
2.6 Hydrolyse der Lipide	10
2.7 HPLC-Analysen	11
2.7.1 Umkehrphasen-Analyse der Triacylglyceride	11
2.7.1.1 UV-Detektion	11
2.7.1.2 Chemilumineszenzdetektion von Lipidhydroperoxiden	11
2.7.1.3 Präparative Isolierung von Lipoxygenase-Produkten	12
2.7.2 Umkehrphasen-Analyse der Fettsäuren	12
2.7.3 Normalphasen-Analyse der Fettsäuren	13
2.7.4 Chiralphasen-Analyse der Fettsäuren	13
2.8 GC/MS-Analyse der Fettsäuren	13
2.9 NMR-Spektroskopie	14
2.10 Enzymtests	14
2.10.1 Messung der Lipase-Aktivität	14
2.10.2 Messung der Lipoxygenase-Aktivität	16
2.10.2.1 Photometrische Messung	16
2.10.2.2 Polarographische Messung	17
2.11 Proteinbestimmung	17
2.12 Solubilisierung von Lipidkörperproteinen	18

2.12.1	Solubilisierung mit Octylglucosid	18
2.12.2	Solubilisierung mit Kochsalz	18
2.13	Reinigung der Lipase	19
2.13.1	Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF	19
2.13.2	Anionenaustauschchromatographie an Mono Q	20
2.13.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie	20
2.13.4	Gelfiltrationschromatographie	21
2.14	Elektrophoresetechniken	22
2.14.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.14.2	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.14.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	23
2.15	Westernblotting und Immundetektion von Proteinen	24
2.15.1	Halbtrockenblot-Verfahren	24
2.15.2	Proteinfärbung der Nitrozellulosemembran mit <i>Fast-Green</i>	24
2.15.3	Immundetektion von Lipoxygenase	24
2.16	Proteinblotting und N-terminale Sequenzierung	25
2.17	Oxidation von Triacylglyceriden und Phospholipiden mit Lipoxygenase	25
2.17.1	Oxidation von 1,3-Dilinolein, Trilinolein und Trilinolenin	25
2.17.2	Oxidation von Dilinoleoyl-Phosphatidylcholin	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Struktur-Analyse oxygenierter Triacylglyceride aus den Keimblättern der Gurke	27
3.1.1	Trennung der Triacylglyceride auf der Umkehrphase	27
3.1.2	Vergleichende Chromatographie-Experimente	28
3.1.3	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung	30
3.1.3.1	HPLC-Analyse der Fettsäuren	30
3.1.3.1.1	Analyse auf der Umkehrphase	30
3.1.3.1.2	Analyse auf der Normalphase	32
3.1.3.1.3	Analyse auf der Chiralphase	33
3.1.3.2	GC/MS-Analyse der Fettsäuren	34
3.1.4	Quantifizierung des Peroxidgehaltes der isolierten Lipide	36
3.1.5	Zusammenfassung der Strukturanalysen	39
3.1.6	Keimungskinetik der oxygenierten Triacylglyceride	41

3.2	Oxygenierte Triacylglyceride in den Keimblättern der Sonnenblume	44
3.3	Nachweis einer Lipidkörper-assoziierten Lipase	47
3.4	Zellfraktionierung der Gurkenkeimlinge	48
3.5	Keimungskinetik der Lipase	49
3.6	Reinigung der Lipidkörper-assoziierten Lipase	52
3.6.1	Solubilisierung mit Kochsalz	52
3.6.2	Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF	53
3.6.2	Ionenaustauschchromatographie an Mono Q	54
3.6.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose	55
3.6.4	Gelfiltrationschromatographie	56
3.6.4	Reinigungstabelle und SDS-PAGE der Reinigungsschritte	57
3.7	Bewertung der Reinigung	58
3.7.1	Messung der LOX-Aktivität in den Lipase-aktiven Fraktionen	60
3.7.2	Vergleich der Lipase-Aktivität mit der Intensität der Bande im Gel	60
3.7.3	Zweidimensionale-Gelelektrophorese der HIC-Fraktion	61
3.7.4	Test der rekombinanten LOX auf Lipase-Aktivität	62
3.8	Charakterisierung der Lipidkörper-assoziierten Lipase	63
3.8.1	Natives Molekulargewicht	63
3.8.2	pH-Optimum	63
3.8.3	Temperatur-Optimum	64
3.8.4	Isoelektrischer Punkt	65
3.8.5	Inhibitoren und Stimulatoren	65
3.8.6	Substratspezifität	67
3.9	Aminosäuresequenzanalyse	69
3.10	Lipase-Aktivität in den Lipidkörpern anderer Ölsaaten	72
4.	Diskussion	73
4.1	Strukturanalyse oxygenierter Triacylglyceride	73
4.2	Reinigung der Lipase	78
4.2.1	Isolierung einer 110 kDa Bande	78
4.2.2	Bewertung der Reinigung	81
4.2.3	Aminosäuresequenzanalyse	82
4.3	Charakterisierung der Lipase	84

4.3.1	Molekulargewicht	84
4.3.2	pH-Optimum	85
4.3.3	Isoelektrischer Punkt	85
4.3.4	Inhibitoren und Stimulatoren	86
4.3.5	Substratspezifität	87
4.4	Alternativer Abbau der Linolsäure in der β -Oxidation	89
4.5	Weiterführende Arbeiten	91
5.	Zusammenfassung	93
6.	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

Pflanzen sind in der Lage verschiedene chemische Substanzklassen als Energiespeicher und als Reservestoffe für den Kohlenstoff-Metabolismus zu verwenden. Hierfür kommen besonders die in den Plastiden gelagerten Kohlenhydrate, die Proteine aus den Proteinkörpern oder die in den Lipidkörpern gespeicherten Lipide in Frage. Während die Prozesse der Mobilisierung von Stärke in den Plastiden [Beck und Ziegler, 1989] und von Proteinen in den Proteinkörpern [Chrispeels, 1991] im Wesentlichen verstanden sind, gibt es über den Abbau der Lipide in den Lipidkörpern keine detaillierten Vorstellungen.

1.1 Lipidkörper

Pflanzen die fettreiche Samen besitzen, verwenden die in den Lipidkörpern gelagerten Triacylglyceride als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in den Anfangsstadien der Keimung. Lipidkörper, früher auch als Sphärosomem oder Oleosomem bezeichnet, sind sphärische Organellen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2 μm . Sie bestehen aus einer Triacylglycerid-Matrix die von einem Phospholipidmonolayer umgeben ist. Diese Monolayermembran trägt für den Lipidkörper charakteristische Proteine, die sowohl strukturelle als auch enzymatische Funktionen haben können [Huang, 1994].

Die Lipidkörper entstehen während der Samenreifung am endoplasmatischen Retikulum [Wanner et al., 1981; Huang, 1992]. Für diesen Prozess werden zwei mögliche Wege diskutiert (Abb. 1). Einmal könnten die am ER synthetisierten Triacylglyceride zwischen die beiden Schichten der Phospholipiddoppelmembran eingelagert werden, um schließlich diesen aufgeweiteten Membranbereich von der restlichen ER-Membran abzuschneiden und ins Cytosol freizusetzen. Dieser Abschnürungsvorgang gewährleistet, dass die polare Seite der Phospholipide zum Cytosol gerichtet ist, während die hydrophoben Fettsäurereste zur Triacylglyceridmatrix zeigen. Bei diesem Weg geht man davon aus, dass vor dem Abschnürungsvorgang die entsprechenden Membranbereiche des ER mit den Lipidkörperproteinen ausgestattet wurden. Alternativ dazu könnte es auf der cytosolischen Seite des ER zur Bildung eines Öltropfens kommen, der nach seiner Freisetzung vom ER mit einer Phospholipidmonolayermembran und Proteinen ausgestattet wird [Napier et al., 1996].

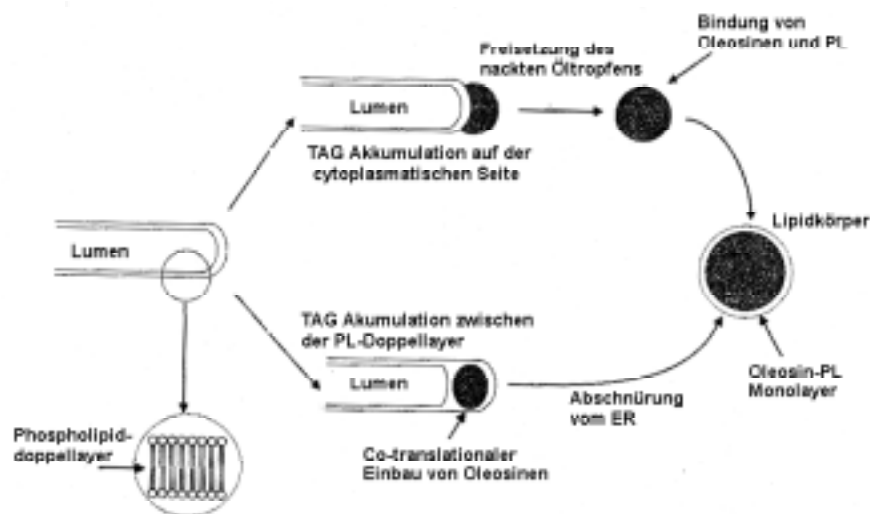


Abb. 1: Schematische Darstellung zweier möglicher Wege der Lipidkörper Entstehung am endoplasmatischen Retikulum. Der obere Teil der Abbildung beschreibt die Freisetzung eines „nackten“ Öltropfens vom ER in das Cytosol mit anschließender Anlagerung von Proteinen und Phospholipiden. Der im unteren Teil der Abbildung beschriebene Weg geht davon aus, dass es zur simultanen Synthese von TAGs und Lipidkörperproteinen am ER kommt. Der fertige Lipidkörper wird schließlich vom ER abgeschnürt und ins Cytosol entlassen. (PL) Phospholipide, (TAG) Triacylglyceride. Abbildung übernommen aus Napier et al. [1996].

Die dominierende Proteinklasse am Lipidkörper ist die der Oleosine. Sie können bis zu 8 % (w/w) des Gesamtproteins im Samen ausmachen [Huang, 1992]. Oleosine sind nicht nur zahlenmäßig die häufigsten Lipidkörperproteine, ihr Vorkommen ist auch auf dieses Organell beschränkt [Huang, 1994]. Diese hydrophoben, alkalischen Proteine ($pI < 6,2$) mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 26 kDa bedecken die gesamte Oberfläche des Lipidkörpers und besitzen hauptsächlich eine strukturelle Funktion. So wird durch die Wechselwirkung der Oleosine mit den Phospholipiden eine stabile amphipathische Schicht auf der Oberfläche der Triacylglyceride gebildet welche die Integrität der Lipidkörper aufrechterhält [Huang, 1994]. Dies gilt besonders für die Samenreife, in der diese Organellen im dehydratisierten Zustand über einen langen Zeitraum eng aneinander gepresst vorliegen. Im keimenden Samen verleihen die Oleosine dem Lipidkörper eine negative Oberflächenladung und verhindern so, durch elektrostatische Abstoßung, ein Aggregieren der einzelnen Organellen. Weiterhin wird vermutet das Oleosine als Dockingproteine für Enzyme dienen, die während der Keimung neu synthetisiert werden und an der Metabolisierung der Speicherlipide beteiligt sind. So konnte kürzlich in verschiedenen Samen ein Oleosin nachgewiesen werden, dass eine konservierte C-terminale Phosphat-bindende und eine ebenso konservierte N-terminale Calcium-bindende Domäne besitzt [Chen et al., 1999]. Beide Domänen haben einen hydrophilen Charakter und sind auf der Oberfläche der Lipidkörper

lokalisiert: Für dieses Protein, das mit dem Namen Caleosin bezeichnet wird, vermutet man das es nach Phosphorylierung und Calcium-Bindung als Rezeptor für andere Proteine fungieren könnte.

Während Oleosine permanent am Lipidkörper nachweisbar sind, werden andere Proteine nur zu bestimmten Entwicklungsstadien der Pflanze gebildet. Besonders während der Keimung wird der Lipidkörper mit einem neuen Satz von Proteinen ausgestattet, die überwiegend Funktionen beim Abbau der Speicherlipide einnehmen. Eine zentrale Rolle besitzen hier die Lipasen, die nach ihrer *de novo* Synthese im Cytosol zum Lipidkörper transportiert werden um dort die in der Matrix gelagerten Triacylglyceride zu hydrolysieren [Huang, 1992].

1.2 Lipidkörper-gebundene Lipasen

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) katalysieren die Hydrolyse von Triacylglyceriden. In Pflanzen findet man diese Enzyme insbesondere in den Fett-speichernden Organen. Das sind Samen, Pollen und in einigen Fällen auch Wurzeln oder Blätter. Bisher wurden nur die Lipasen aus Samen näher untersucht, da sie hier in ausreichender Menge für eine biochemische Analyse zugänglich sind (Huang, 1994).

Während der Keimung sind Lipasen für die Spaltung der in den Lipidkörpern fettreicher Samen gespeicherten Triacylglyceride verantwortlich. Je nach Pflanzenspezies kann diese Lipase direkt am Lipidkörper oder in anderen subzellulären Kompartimenten wie in den Glyoxysomen und im Cytosol lokalisiert sein [Huang, 1994].

Bis auf eine Ausnahme, der sauren Lipase aus Rizinussamen [Ory et al., 1969, Altaf et al., 1997], ist allen Lipasen gemeinsam, dass sie keine Aktivität in ruhenden Samen besitzen und erst während der Keimung aktiv werden. Unterschiede findet man jedoch in ihrer Substratspezifität, dem pH-Optimum, der Hydrophobizität des Moleküls, Reaktivität gegenüber Sulfhydrylgruppen und der schon erwähnten subzellulären Verteilung [Huang, 1994].

In Samen verschiedener Ölsaaten konnten an der Monolayermembran des Lipidkörpers lokalisierte Lipasen nachgewiesen werden. 50 bis 80 % der gesamten Lipase-Aktivität eines Samenextraktes kann mit dem Lipidkörper assoziiert sein [Huang, 1994]. Trotzdem ist die Proteinmenge der Lipasen an diesem Organell vergleichsweise gering, die dominierenden Proteine sind die Oleosine.

Unter den Lipidkörper-assoziierten Lipasen der verschiedenen Pflanzenspezies ist jene aus dem Rizinusamen in verschiedener Hinsicht eine Ausnahme. Das Enzym besitzt ein saures pH-Optimum von pH 4,5 und lässt sich schon im ungekeimten Samen nachweisen [Ory et al., 1969, Altaf et al., 1997]. Diese Lipase besitzt keine Substratspezifität gegenüber bestimmten in den Triacylglyceriden vorhandenen Fettsäuren und hydrolysiert Mono-, Di- und Triacylglyceride gleichermaßen gut [Ory et al., 1962, Lin und Huang, 1986, Altaf et al., 1997]. Während der Keimung nimmt die Aktivität dieser sauren Lipase ab, und eine neutrale durch Calcium-Ionen stimulierbare Lipase-Aktivität lässt sich nachweisen. Von ihr wird vermutet wird, dass sie für die Hydrolyse der Speicherlipide verantwortlich ist [Hills und Beevers, 1987, 1989]. Ob es sich bei dieser neutralen Lipase um ein neu synthetisiertes Protein, oder um eine modifizierte Form der sauren Lipase handelt, ist noch nicht geklärt [Huang, 1994].

Neben Rizinus wurde auch eine Lipidkörper-gebundene Lipase im Scutellum des Maiskeimlings entdeckt. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein sehr hydrophobes Protein, dass fest mit der Monolayermembran assoziiert ist. Auch durch wiederholtes waschen der Lipidkörper mit höhermolaren Salzlösungen konnte die Lipase nicht abgelöst werden [Lin und Huang, 1984, 1986]. In ungekeimten Samen lässt sich dieses Enzym nicht nachweisen. Während der Keimung kommt es dann zu einer *de novo* Synthese der Lipase, die schließlich zum Abbau der Speicherlipide führt [Huang, 1994].

Weiterhin wurden auch in Raps- und Senfkeimlingen Lipasen am Lipidkörper gefunden. Diese beiden Pflanzen gehören zur Familie der Cruciferen. Spezies dieser Familie besitzen einen hohen Gehalt an Erucasäure in ihren Triacylglyceriden. In Rapsamen ist die Lipase-Aktivität nur während der Keimung nachweisbar, wobei 50 % der Gesamtaktivität des Samens in der Lipidkörperfraktion zu finden ist. Im Gegensatz zu den Lipasen aus Mais und Rizinus, ist die Lipase aus Rapsamen aber nur schwach an der Lipidkörpermembran gebunden. Sie lässt sich schon mit verdünnten Puffern oder Salzlösungen ablösen [Huang, 1994]. Die Lipase aus Senfsamen ist der Rapslipase in vieler Hinsicht ähnlich. Ihre Aktivität lässt sich nur in keimenden Samen nachweisen, sie besitzt ebenfalls ein alkalisches pH-Optimum und weist die selbe subzelluläre Verteilung auf [Lin und Huang, 1983].

Außerdem wurden Lipidkörper-assoziierte Lipasen in *Elaeis guineensis* [Oo und Stumpf, 1983], in Kiefern Samen [Hammer und Murphy, 1993, 1994] und in Samen von *Vernonia galamensis* [Ncube et al., 1995] nachgewiesen, wobei im letzteren Fall der Hauptanteil der Gesamtlipase-Aktivität in der löslichen Fraktion lokalisiert war.

Für die Lipasen aus pflanzlichen Samen ist bekannt, dass sie eine hohe Selektivität für bestimmte Fettsäuren aufweisen können. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um die in den eigenen Triacylglyceriden dominierenden Fettsäure [Adlercreutz et al., 1997]. Zum Beispiel hydrolysiert die Lipase aus Mais bevorzugt Triacylglyceride die Linol- und Ölsäure enthalten, diese machen den Hauptbestandteil des Maisöls aus [Lin et al., 1986]. Raps- und Senfsamen besitzen in ihren Speicherfetten große Mengen Erucasäure und deren Lipasen weisen eine Spezifität für Triacylglyceride die Erucasäure besitzen auf [Lin und Huang, 1983]. Die Triacylglyceride aus den Samen von *Vernonia galamensis* bestehen zu größten Teil aus Trivernolin und die Lipase welche die für die Hydrolyse der Speicherlipide verantwortlich ist besitzt eine Spezifität für Vernolsäure [Ncube et al., 1995].

1.3 Der Lipidkörper in Gurkenkeimlingen

Wie schon erwähnt wurde, besitzen Lipasen eine zentrale Rolle im Metabolismus der Speicherlipide während der Keimung. Inwieweit noch weitere Proteine an der Auslösung der unmittelbaren Abbauprozesse und ihrer Regulation beteiligt sind, wird derzeit kontrovers diskutiert.

Im Unterschied zu vielen Ölsaaten, bei denen während der Keimung Lipidkörper-assoziierte Lipasen nachgewiesen wurden, konnte in Gurkensamen bisher keine Lipase-Aktivität am Lipidkörper festgestellt werden [Huang, 1987; Schwennesen, 1988; Feussner und Kindl, 1992]. Man fand jedoch heraus, dass in den frühen Stadien der Keimung eine Lipoxygenase (LOX) *de novo* synthetisiert und zum Lipidkörper transportiert wird [Feussner u. Kindl, 1992]. Durch immunologische Studien konnte dieses Enzym schon am ersten Tag der Keimung an der Lipidkörpermembran nachgewiesen werden [Feussner et al., 1996]. Im weiteren Verlauf der Keimung erfolgt eine kontinuierliche Zunahme in der Proteinmenge der LOX. Sie erreicht am dritten Tag ein Maximum und geht anschließend wieder zurück. Zum Zeitpunkt der maximalen Proteinmenge ist dieses Enzym eines der dominierenden Proteine am Lipidkörper und weist unter den Proteinen des Keimlings eine der höchsten Neusyntheseraten auf [Sturm et al., 1985].

Außer der LOX wird noch ein weiteres Protein *de novo* synthetisiert und zum Lipidkörper transportiert. Für dieses Protein, dass eine Homologie zu Patatin, dem vakuolären Speicherprotein der Kartoffel, aufweist konnte eine Phospholipase A₂-Aktivität nachgewiesen

werden [May et al., 1998]. Beide Proteine, die LOX als auch die PLA₂ erscheinen etwa zeitgleich am Lipidkörper.

LOXs sind Dioxygenasen, sie katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau von molekularem Sauerstoff in ungesättigte Fettsäuren, die ein (1Z, 4Z)-Pentadiensystem besitzen [Siedow, 1991]. Die an der Lipidkörpermembran nachgewiesene LOX besitzt einige besondere Charakteristika die sie von anderen LOXs unterscheidet. Sie weist ein alkalisches pH-Optimum zwischen 7,5 und 8,5 [Feussner u. Kindl, 1992] sowie eine ungewöhnliche Produktspezifität auf: Das Enzym oxygeniert Linol- bzw. Linolensäure zu (13S)-Hydroperoxy-(9Z, 11E)-octa-decadiensäure ((13S)-HPODE) bzw. zu (13S)-Hydroperoxy-(9Z, 11E, 15Z)-octadecatrien-säure ((13S)-HPOTE). Arachidonsäure wurde durch das gereinigte Enzym zu (15S)-HPETE, (12S)-HPETE und (8S)-HPETE in einem Verhältnis von 76:4:20 oxygeniert [Feussner u. Kühn, 1995]. Weiterhin ist diese LOX in der Lage Trilinolein *in vitro* zu den entsprechenden mono-, di- und tri-(13S)-HPODE-Derivaten zu oxygenieren [Feussner et al., 1995; 1998b].

Triacylglyceride in den Lipidkörpern ruhender Gurkensamen enthalten überwiegend Linolsäure. Diese Fettsäure ist neben Linolensäure das häufigste Substrat für pflanzliche LOXs. In ersten Untersuchungen an Lipidkörpern 4-d-alter Gurkenkeimblätter wurden in den Triacylglyceriden oxygenierte Fettsäuren entdeckt, die Produkte einer LOX-Reaktion sein konnten. Weiterhin stellte man fest, dass (13S)-HODE, das reduzierte LOX-Produkt der Linolsäure, vom Lipidkörper ins Cytosol freigesetzt wird, aber keine Freisetzung von Linolsäure erfolgt. [Feussner et al.; 1995].

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein Modell des Speicherlipidabbaus in den Samen der Gurke aufgestellt. Dieses schlägt vor, dass zunächst durch die enzymatische Aktivität der PLA₂ die Integrität der Phospholipidmonolayermembran zerstört wird und dadurch die am Lipidkörper lokalisierten LOX Zugang zu ihrem Substrat, den in der Matrix lokalisierten Triacylglyceriden bekommt. Daraufhin oxygeniert dieses Enzym die Linolsäurereste der Lipide zu den entsprechenden (13S)-HPODE-Derivaten. Diese werden anschließend zu den entsprechenden Hydroxid-Derivaten reduziert und durch eine für diese oxygenierten Fettsäuren spezifische Triacylglycerid-Lipase abgespalten [Feussner et al., 1995]. Alternativ könnte auch erst die Hydrolyse der Hydroperoxide durch die Lipase und dann die Reduktion an den freien Fettsäuren erfolgen. Das reduzierende Enzym als auch die Lipase sind in Gurkensamen aber bisher unbekannt. Der weitere Abbau der oxygenierten Fettsäuren erfolgt dann in der β -Oxidation der Glyoxysomen. Hierbei werden Reduktionsäquivalente und Acetyl-CoA Moleküle gewonnen, die der Keimling für seine Syntheseprozesse benötigt.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zunächst darin, die oxygenierten Triacylglyceride aus den Gurkenkeimblättern zu isolieren und anhand einer Strukturanalyse zu zeigen, dass es sich tatsächlich um Produkte der am Lipidkörper lokalisierten LOX handelt. Schließlich galt es Mengenveränderungen dieser potentiellen LOX-Produkte über den Verlauf der Keimung festzustellen, um eventuell Hinweise auf eine physiologische Bedeutung, besonders in Hinsicht auf den vorgeschlagenen Abbauweg der Speicherlipide, zu bekommen.

Bisherige Experimente, eine Lipase-Aktivität am Lipidkörper der Gurke zu messen führten zu keinem positiven Ergebnis [Huang, 1987, Feussner und Kindl, 1992]. Es ist aber bekannt, dass pflanzliche Lipasen eine hohe Selektivität für bestimmte Fettsäuren in ihren Triacylglycerid-Substraten aufweisen können [Adlercreutz, 1997]. Dies führte zu der Annahme, dass diese Versuche aufgrund der Wahl des falschen Substrates gescheitert waren. In dieser Arbeit sollte deshalb erneut versucht werden, mit den oxygenierten Triacylglyceriden als Substrat, eine lipolytische Aktivität am Lipidkörper der Gurke nachzuweisen.

Falls sich mit diesem speziellen Substrat eine Lipase-Aktivität am Lipidkörper detektieren ließ, galt es dieses Enzym mit Hilfe von chromatographische Methoden zu reinigen und anschließend zu charakterisieren. Die Ergebnisse sollten dann weitere Hinweise auf den postulierten Abbauweg der Speicherlipide in den Gurkenkeimlingen geben und der Vergleich mit den Lipasen anderer Ölsaaten zum Verständnis der Charakteristika keimungsinduzierter Lipasen, insbesondere ihrer Substratspezifität, beitragen.

In abschließenden Experimenten mit den Lipidkörpern anderer Ölsaaten galt es festzustellen, ob sich der vorgeschlagene Abbauweg der Triacylglyceride auf andere Pflanzen-Spezies übertragen lässt, oder ob dieser auf die Gurke beschränkt bleibt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von den Firmen Biorad (München), Boehringer-Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Fettsäurestandards Linolsäure, (13*S*)-HODE und (9*S*)-HODE stammten von Cayman Chemical Company (USA).

2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

Samen der Gurke (*Cucumis sativus*), Sorte chinesische Schlange, wurden für 1 h in lauwarmen Leitungswasser vorgequollen und danach auf Filterpapier über feuchtem Vermiculit ausgelegt. Die Keimung der Samen erfolgte bei 27 °C unter 100 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln. Die Keimblätter wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter wenig Lichteinfall geerntet und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Die Samen anderer Ölsaaten sind nach der gleichen Vorgehensweise angekeimt und aufgearbeitet worden. Außer den Samen der Gurke wurde das Saatgut folgender Pflanzen verwendet:

- Ricinus (*Ricinus communis*), Sorte Zanzibarensis
- Kürbis (*Cucurbita maxima*), Sorte Riesenmelone
- Melone (*Cucumis melo*), Sorte Charentais
- Ringelblume (*Calendula officinalis*), Sorte Prinzess Goldgelb
- Lein (*Linum usitatissimum*), Sorte Linola
- Sonnenblume (*Helianthus annuus*), Sorte Albena

Das Saatgut aller Pflanzen wurde von der Erfurter Samenzucht GmbH (Walluf) bezogen.

2.3 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Die geernteten Keimblätter wurden mit dem auf 4 °C temperierten Aufschlussmedium in einem Verhältnis von ungefähr 1,5 ml pro Gramm Pflanzenmaterial versetzt und homogenisiert. Dies erfolgte bei kleinen Mengen (bis zu 10 g) durch Zerhacken der

Keimblätter mit einer Rasierklinge, bei größeren Mengen durch Homogenisation in einem Waring-Blendor (Bender-Hobein, München). Das Homogenat wurde anschließend durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden) filtriert, der Rückstand verworfen und das Filtrat als Ausgangsmaterial für weitere Fraktionierungsschritte eingesetzt.

Aufschlussmedium:

Tris-HCl (pH 7,5)	150	mM
Kaliumchlorid	10	mM
EDTA	1,5	mM
MgCl ₂	0,1	mM
Saccharose	15 %	(w/v)
DTT	5	mM

2.4 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung erfolgte durch Zentrifugation des filtrierten Homogenates in Ausschwingrotoren. Für größere Mengen wurde der Rotor SW 28 und für kleinere Mengen der Rotor SW 60 (Beckman, München) verwendet. Alle Fraktionierungsschritte erfolgten bei 4 °C sofern nicht anders angegeben.

Das Homogenat wurde einer ersten Zentrifugation bei 300×g für 20 min unterzogen. Das resultierende Pellet mit den darin befindlichen Zelltrümmern wurde verworfen und der Überstand erneut bei 5.000×g für 45 min zentrifugiert, um Mitochondrien und Glyoxysomen zu sedimentieren. Der Überstand wurde wieder abgenommen und in einem letzten Zentrifugationsschritt bei 100.000×g für 45 min in eine mikrosomale Fraktion (Pellet), einer löslichen Fraktion (Überstand) und in einer Fraktion der Lipidkörper (obere Fettschicht) getrennt.

Sollten nur die Lipidkörper isoliert werden, erfolgte eine direkte Zentrifugation des filtrierten Zellhomogenates bei 100.000×g für 45 min. Die obere Fettschicht wurde mit einem Spatel abgehoben, in Aufschlussmedium homogenisiert und unter den selben Bedingungen erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die so gewaschenen Lipidkörper wieder abgenommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.5 Lipidextraktion

Die Extraktion der Lipide aus den isolierten Lipidkörpern wurde nach einer Methode von Bligh und Dyer [1959] durchgeführt. Dazu homogenisierte man die durch Zentrifugation gewonnenen Lipidkörper (2.4) zunächst mit einer Mischung aus 10 ml 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4), 25 ml Methanol und 12,5 ml Chloroform. Durch die anschließende Zugabe von weiteren 12,5 ml des Na-Phosphat-Puffers und 12,5 ml Chloroform erfolgte eine Phasentrennung, die man durch eine niedrigtourige Zentrifugation der Probe unterstützte. Die Chloroformphase wurde entnommen, im Rotationsverdampfer verdampft und der Rückstand in 2 ml Chloroform gelöst. Nach der Zugabe von 2 µl einer 100 µM BHT-Lösung als Antioxidantien, konnten die auf diese Weise isolierten Lipide unter Argonatmosphäre bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

2.6 Hydrolyse der Lipide

Um die Fettsäurezusammensetzung der Lipide aufklären zu können, war es notwendig die Fettsäuren vom Glyceringerüst abzuspalten. Dies erfolgte durch eine Hydrolyse der Lipide unter alkalischen Bedingungen. Vor der Hydrolyse fügte man den in Chloroform gelösten Lipiden eine Spatelspitze Natriumborhydrid hinzu, um in der Probe befindliche Lipidhydroperoxide zu den entsprechenden Lipidhydroxiden zu reduzieren. Anschließend wurde der Hydrolyse-Ansatz in ein Schliffreagenzglas pipettiert, mit Argon begast und für 20 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert.

Hydrolyse-Ansatz

50 µl Probe
800 µl Methanol
150 µl 40 % (w/v) Kaliumhydroxid

Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 150 µl konz. Essigsäure, um die Lösung auf einen pH-Wert von 3 anzusäuern. Der Überstand wurde abgenommen, mit 4 ml Wasser versetzt und zweimal mit 5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden im Stickstoffstrom verdampft, der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C unter Argon gelagert.

2.7 HPLC Analysen

Die HPLC-Analysen wurden alternativ an einer Shimadzu- (CR4A; Shimadzu, Japan), Beckman- (System Gold; Beckman, München) oder Merck HPLC Anlage (6200A; Merck, Darmstadt), jeweils mit einem Diodenarray-Detektor gekoppelt, durchgeführt.

2.7.1 Umkehrphasen-Analyse der Triacylglyceride

Die Analyse der Triacylglyceride auf der Umkehrphase (RP-HPLC) erfolgte an einer Nucleosil C-18 Säule (KS-System, 250 × 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel, Düren). Hierbei wurde ein binärer Gradient der folgenden Laufmittelgemische verwendet.

Laufmittel A:	Methanol/Wasser/Essigsäure	(90/10/0,1; v/v)
Laufmittel B:	Methanol/Essigsäure	100/0,1; v/v)
Flussrate:	1 ml/min	
Gradient:	0 → 10 min	100 % A.
	10 → 30 min	linearer Anstieg auf 100 % B
	30 → 80 min	100 % B

2.7.1.1 UV-Detektion

Zur Detektion von Lipoxygenase-Produkten wurde die Absorption ihres konjugierten Dien-systems bei einer Wellenlänge von 234 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Eichung des Detektors mit (13S)-HODE. Ungesättigte Lipide detektierte man bei einer Wellenlänge von 210 nm. Zur Quantifizierung des Trilinoleins wurde eine Eichung des Detektor mit der käuflichen Standardsubstanz durchgeführt.

2.7.1.2 Chemilumineszenzdetektion von Lipidhydroperoxiden

Simultan zur UV-Absorptionsmessung mit dem Diodenarraydetektor wurde eine Chemilumineszenzdetektion auf Lipidhydroperoxide nach einer Methode von Yamamoto et al. [1987] durchgeführt. Hierzu wurde dem Säuleneluat nach dem Verlassen des Diodenarraydetektors eine Mikroperoxidase/Isoluminol-Lösung (Sigma, Deisenhofen) zugemischt und die durch Lipidhydroperoxide hervorgerufene Lichtemission in einem Luminometer (LB506C; Berthold, Wildbad) gemessen [Kühn, 1998].

2.7.1.3 Präparative Isolierung von Lipoxygenase-Produkten

Zur präparativen Isolierung der LOX-Produkte aus den Lipidextrakten 4-d-alter Gurkenkeimlinge wurden die folgenden vier Chromatographieschritte durchgeführt:

1. In einem ersten Schritt erfolgte eine grobe Trennung und Isolierung identifizierter LOX-Produkte an einer präparativen RP-HPLC Säule (Zorbax ODS Säule, P_H-16, 250 × 21,2 mm, 10 µm Partikelgröße; DuPont, Bad Nauheim) unter Verwendung des in obigen Methanol/Wasser-Gradienten bei einer Flussrate von 7 ml/min.
2. Anschließend wurden die fraktionierten LOX-Produkte in getrennten Chromatographieläufen an einer semipräparativen RP-HPLC Säule (Nucleosil C-18 Säule, KS-System 250 × 10 mm; 10 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel, Düren) von kontaminierenden Substanzen befreit. Die Trennung erfolgte mit Hilfe des Methanol/Wasser-Gradienten bei einer Flussrate von 4 ml/min.
3. Dieser Reinigungsschritt wurde noch einmal an einer analytischen RP-HPLC Säule (Nucleosil C-18 Säule (KS-System 250 × 4,6 mm; 5 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel, Düren) wiederholt. Flussrate und Gradient wie unter 2.7.1 beschrieben.
4. In einem letzten Reinigungsschritt erfolgte eine Abtrennung von kontaminierenden Substanzen auf der analytischen RP-HPLC Säule unter isokratischen Laufmittelbedingungen. Hierbei verwendete man für die Peaks 1 bis 3 (siehe 3.1.1) ein Laufmittelgemisch von Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis von 95/5/0,1 (v/v), die Peaks 4 und 5 wurden bei einem Laufmittelgemisch von Methanol/Essigsäure (100/0,1; v/v) präpariert. Die Flussrate betrug in beiden Fällen 1 ml/min.

2.7.2 Umkehrphasen-Analyse der Fettsäuren

Die Umkehrphasen-Analyse (RP-HPLC) der Fettsäuren erfolgte ebenfalls an einer Nucleosil C-18 Säule (KS-System, 250 × 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel, Düren). Das Lösungsmittelgemisch bestand aus Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis von 85/15/0,1 (v/v). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Für die Analyse der Lipase-Tests (siehe 2.9.1) wurde bei gleicher Flussrate ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril/Wasser/Essigsäure (70/30/0,1; v/v) verwandt. Der Vorteil dieser Lösungsmittelgemisches lag in einem auf dem Säulenmaterial lastenden geringeren Druck, so dass eine große Anzahl von stark heterogenen Proben analysiert werden konnten, ohne die Säule zu schädigen.

Die Detektion der LOX-Produkte erfolgte durch eine Absorptionsmessung bei 234 nm, ungesättigte Fettsäuren wurden bei 210 nm detektiert. Für eine Quantifizierung von HODE und Linolsäure wurde der Detektor mit den Fettsäurestandards bei der entsprechenden Wellenlänge kalibriert.

2.7.3 Normalphasen-Analyse der Fettsäuren

Die Trennung der Hydro(pero)xyfettsäure-Isomere (9-H(P)ODE, 13-H(P)ODE, 13-KODE) auf der Normalphase (SP-HPLC) wurde an einer Zorbax SIL Säule (250 × 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; DuPont, Bad Nauheim) durchgeführt. Als Lösungsmittelgemisch wurde n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure (100/2/0,1; v/v) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 234 nm, die Ketofettsäure 13-KODE wurde durch ihre Absorption bei 270 nm. detektiert.

2.7.4 Chiralphasen-Analyse der Fettsäuren

Die Enantiomeren-Trennung der Hydroxyfettsäuren, (13*S*)-HODE von (13*R*)-HODE bzw. (9*S*)-HODE von (9*R*)-HODE, auf der Chiralphase (CP-HPLC) erfolgte an einer Chiracel OD Säule (250 × 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Diacel Chem. Industries, Tokyo, Japan). Das Laufmittelgemisch bestand aus n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure (100/5/0,1; v/v). Die Flussrate betrug 1ml/min. Die Detektion der Fettsäuren erfolgte durch die Absorptionsmessung bei 234 nm.

2.8 GC/MS-Analyse der Fettsäuren

Die GC/MS-Analysen wurden an einem Hewlett-Packard GC/MS-System durchgeführt. Die Trennung der Fettsäurederivate erfolgte an einer RSL-150 Säule (Polydimethyl Siloxan, 30 m × 0,32 mm; 0,25 µm Filmdicke; Research Separation Labs, Belgien). Hierbei wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 2 min bei 180 °C mit einer anschließenden Erhöhung der Temperatur auf 250 °C bei einer Steigung von 5 °C/min. Die Injektor-Temperatur betrug 275 °C und die der Ionenquelle 180 °C. Die Detektion der Fettsäuremethylester erfolgte im Elektronenionisationsmodus bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV.

Vor der Analyse wurden die Fettsäuren derivatisiert. Dazu wurde die Probe zunächst in 1 ml 0,1 M Diazomethan in Diethylether aufgenommen und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Auf diese Weise erfolgte eine Methylierung der Carboxylgruppen. Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in 50 µl Pyridin sowie 150 µl Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid gelöst und für 2,5 h bei RT stehen gelassen um so Hydroxylgruppen in den Fettsäuren zu silylieren. Daraufhin verdampfte man das Lösungsmittel wieder, löste den Rückstand in 50 µl Methanol und analysierte diesen auf der GC/MS. Die Analyse der isolierten Fraktionen aus den Gurkentriacylglyceriden wurden von Dr. R. Rathmann (Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt Universität Berlin) durchgeführt, während die Auswertung der Lipase-Tests mit den Substraten Tripalmitin, Tristearin und Triolein durch Dr. I. Feussner, IPB Halle, erfolgte.

2.9 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Messungen wurden an einem VARIAN Unity 500 Spektrometer bei 499,84 MHz (¹H) mit einer NALORAC 3 mm „microsample inverse-detection probe“ durchgeführt. Als Lösungsmittel diente CDCl₃ mit Tetramethylsilan als internem Standard. Zweidimensionale COSY und HMQC Spektren wurden nach dem Standard VARIAN Puls Programm aufgenommen. Die Analysen wurden freundlicherweise von Dr. A. Porzel, IPB Halle, durchgeführt.

2.10 Enzymtests

2.10.1 Messung der Lipase-Aktivität

Die katalytische Aktivität der Lipase konnte durch die Quantifizierung des freigesetzten (13S)-HODE über die RP-HPLC bestimmt werden (siehe 2.7.2). Als Substrat dienten die aus den Triacylglyceriden 4-d-alter Keimblätter der Gurke präparierten LOX-Produkte (Peaks 1-5). Die Isolierung der Peaks erfolgte an einer semipräparativen RP-HPLC Säule (Ultrasphere ODS, 250 × 10 mm; 5 µm Partikelgröße; Beckman, München) unter Verwendung des in 2.7.1 beschriebenen Gradienten bei einer Flussrate von 4 ml/min. Nach der Vereinigung der

verschiedenen LOX-Produkte wurde das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und die Menge an verestertem 13-HODE photometrisch bei 234 nm mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten ($2,5 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol}$) quantifiziert. Nach Zugabe von 2 μl einer 1 mM BHT Lösung als Antioxidantien, konnte das auf diese Weise hergestellte Substrat für mehrere Monate unter Argonatmosphäre bei -80°C gelagert werden.

Für die Lipase Test-Ansätze wurde eine entsprechende Menge entnommen, das Chloroform verdampft und der Rückstand in 5 % (w/v in Wasser) gum arabicum (Sigma, Deisenhofen) durch Ultraschallbehandlung emulgiert. Diese Substratlösung hatte eine Konzentration von 2,5 μM an verestertem (13S) -HODE. Der Reaktions-Ansatz wurde nach dem folgendem Schema zusammenpipettiert, so dass eine Endkonzentration von 0,25 μM an verestertem (13S)-HODE im Test-Ansatz vorhanden war:

Test-Ansatz

10 μl Test-Puffer

30 μl Wasser

10 μl Substrat

50 μl Enzymlösung

Test-Puffer: 1 M Tris-HCl (pH 8,5), 0,5 M NaCl, 50 mM CaCl_2

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Enzymlösung gestartet und für 10 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Durch den Zusatz von 10 μl konz. Essigsäure wurde die Reaktion abgestoppt und die freigesetzten Fettsäuren mit 200 μl Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde abgenommen, verdampft, der Rückstand in 200 μl einer Acetonitril/Wasser/Essigsäure Mischung (70/30/0,1; v/v) aufgenommen und die Menge des freigesetzten 13-HODE auf der RP-HPLC, wie unter 2.7.2 beschrieben, quantifiziert.

Die Analyse wurde an einer Nukleosil C-18 Säule (KS-System, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, 5 μm Partikelgröße; Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min eluierte das freigesetzte (13S)-HODE mit einer Retentionszeit von 5,8 min von der Säule.

2.10.2 Messung der Lipoxygenase-Aktivität

2.10.2.1 Photometrische Messung

Die photometrische Bestimmung der LOX-Aktivität erfolgte nach einer Methode von Grossman und Zakut [1979]. Die dazu benötigte Substratlösung stellte man auf folgende Weise her: 40 µl Linolsäure wurden in 2 ml Methanol unter Zugabe von 76,8 µl Tween 20 gelöst, im Rotationsverdampfer eingeengt und mit 48 ml 0,05 M Na-Phosphat Puffer (pH 9,0) aufgefüllt. Unter Zugabe von 1-3 Tropfen 1 M NaOH und unter leichtem Schwenken des Kolbens ging die Linolsäure, die sich als Niederschlag an der Glaswand befand, in Lösung. Daraufhin stellte man den pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf 9,0 ein und füllte die Lösung mit dem obigen Na-Phosphat Puffer auf ein Volumen von 51,2 ml auf. Die so hergestellte Lösung hatte eine Linolsäurekonzentration von 2,5 mM und konnte unter Argonatmosphäre bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden. Der Test-Ansatz wurde nach folgendem Schema zusammen pipettiert, so dass die Linolsäure in einer Endkonzentration von 0,25 mM vorlag.

Test-Ansatz

870 µl Test-Puffer

100 µl Substrat

30 µl Enzymlösung

Testpuffer: 0,1 Tris-HCl (pH 8,5)

Die photometrische Messung erfolgte in Halbmikro-Quarzküvetten bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Enzymlösung gestartet und über einen Zeitraum von 10 min bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt. Die Aktivität der LOX konnte mit Hilfe des molaren Absorptionskoeffizienten der entstehenden HODEs anhand der folgenden Formel berechnet werden.

$$\Delta E \times V_g / 2,5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \times V_p = \text{Aktivität [mol/min]}$$

ΔE : Absorptionsänderung pro Minute

V_g : Gesamtvolumen des Test-Ansatzes in ml

V_p : Volumen der Enzymlösung in ml

$2,5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ Molarer Absorptionskoeffizient

2.10.2.2 Polarographische Messung

Die polarographische Messung der LOX-Aktivität mit einer Sauerstoffelektrode wurde immer dann durchgeführt, wenn die Enzymreaktion aufgrund eines trübem Testansatzes photometrisch nicht zu verfolgen war. Gründe für eine Trübung waren einmal Detergenz-solubilisierete Proteinproben oder die Verwendung von emulgiertem Trilinolein als Substrat. Die Messung des Sauerstoff-Verbrauchs erfolgte mit einer Sauerstoff-Elektrode der Firma Biolytik (Bochum). Zur Herstellung der Substratlösung wurden 176 µl (200µM) Trilinolein in 100 µl einer 10 % (w/v) Na-Desoxycholatlösung und 250 µl Ethanol gelöst, mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) auf 5 ml aufgefüllt und eine Minute mit Ultraschall behandelt. Die so hergestellte Trilinolein-Lösung hatte eine Molarität von 40 mM. Die Endkonzentration im Test betrug 4 mM.

Test-Ansatz

700 µl Test-Puffer
100 µl Substrat
200 µl Enzymlösung

Test-Puffer: 0,1 M K-Phosphat (pH 7,5)

Die Messung erfolgte in einer auf 24,8 °C temperierten Messkammer und wurde durch die Zugabe der Substratlösung gestartet. Anhand des Sauerstoff-Verbrauchs konnte die katalytische Aktivität der LOX berechnet werden.

2.11 Proteinbestimmung

Modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford

Die meisten Proteinbestimmungen wurden mit dem „Protein-Assay“ der Firma Biorad (München) nach einer modifizierten Methode von Bradford [Bradford, 1976] durchgeführt. Als Standardprotein diente Rinderserumalbumin.

Modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry

Proteinproben mit einer hohen Detergenzkonzentration oder mit Fett- bzw. Fettsäurekontaminationen konnten mit der Bradford-Methode nicht quantifiziert werden. Hier wurde auf eine modifizierte Methode nach Lowry [Peterson et al. 1979] zurückgegriffen.

Dazu wurde der „DC Protein-Assay“ der Firma Biorad (München) verwendet. Auch hier diente Rinderserumalbumin als Eichprotein.

2.12 Solubilisierung von Lipidkörperproteinen

Alle Solubilisierungsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 4 °C.

2.12.1 Solubilisierung mit Octylglucosid

Integrale Membranproteine sind mit ihren hydrophoben Bereichen tief in der Lipidschicht der Membran verankert, oder durchspannen sie sogar. Die Solubilisierung eines integralen Membranproteins erfordert mehr oder minder die Zerstörung der Membran mittels Detergenzien. Hierbei werden die Proteine durch die Detergenzmoleküle aus der Membran herausgelöst und in Lösung gehalten.

Nachdem man die Lipidkörper durch Ultrazentrifugation isoliert hatte (siehe 2.4), wurden diese in 2 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) homogenisiert und anschließend zweimal mit je 4 ml Eis-gekühltem Diethylether extrahiert. Die Etherphasen wurden verworfen, restliches Diethylether im Stickstoffstrom verdampft und die wässrige Phase mit 2 ml einer 50 mM Octylglucosid-Lösung (Calbiochem, Bad Soden), in dem obigen Tris-HCl Puffer, versetzt. Die Endkonzentration des Detergenz betrug so 25 mM. Nachdem der Ansatz für 1 h bei 4 °C unter leichtem schütteln inkubiert wurde, erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 100.000×g für 45 min. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, der ca. 90 % der Lipase-Aktivität enthielt, bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.12.2 Solubilisierung mit Kochsalz

Periphere Membranproteine sind durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Komponenten der Membran verbunden, wahrscheinlich fast immer durch Bindung an integrale Membranproteine [Kindl, 1991]. Diese Wechselwirkungen kann man durch Verwendung hoher Salzkonzentrationen, extremen pH-Werten oder durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Probe aufheben, so dass die Proteine in Lösung gehen.

Um periphere Membranproteine von den Lipidkörpern abzulösen, wurde die durch Zentrifugation gewonnene Fettschicht (siehe 2.4) in 10 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) der 1 M NaCl enthielt, homogenisiert. Nach der Inkubation bei 4 °C über Nacht und unter leichtem schütteln, wurden die auf diese Weise solubilisierten Membranproteine durch eine Ultrazentrifugation bei 100.000×g für 45 min vom Lipidkörper getrennt. Um das Sedimentieren der in Lösung gegangenen Proteine während der Zentrifugation zu vermeiden, wurde diese bei einer Temperatur von 15 °C durchgeführt. Die Fettschicht wurde mit einem Spatel abgehoben und verworfen, der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Ungefähr 50 % der Lipase-Aktivität der Lipidkörperfraktion konnte auf diese Weise in Lösung gebracht werden.

2.13 Reinigung der Lipase

Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an einer BioLogic-System Anlage (BioRad, München), mit Ausnahme der Gelfiltrationschromatographie welche an einer Beckman HPLC (System Gold; Beckman, München) durchgeführt wurde. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm.

2.13.1 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF

Zur Aufreinigung der Lipase wurde zuerst eine Trennung der Proteine nach ihrer Oberflächenladung an Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Dazu sind zunächst die mit NaCl solubilisierten Proteine über PD-10 Säulen (Pharmacia, Freiburg) gegen einen 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) entsalzt worden. Anschließend wurde die Proteinprobe, um nochmals die Ionenstärke zu verringern, mit Puffer A 1 zu 3 verdünnt und auf die ebenfalls mit Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschersäule geladen. Das Säulenvolumen betrug 20 ml, die Abmessungen der Säule waren 1,6 × 10 cm. Nach der Applizierung der Probe wurden die Proteine mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert und die einzelnen Fraktionen auf Lipase-Aktivität getestet:

Puffer A: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT
Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl
Flussrate: 0,8 ml/min.
Fraktionsvolumen 5 ml

Gradient: 0 → 40 ml 100 % Puffer A
40 → 140 ml linearer Anstieg auf 50 % Puffer B
140 → 160 ml linearer Anstieg auf 100 % Puffer B
160 → 200 ml 100 % Puffer B

2.13.2 Anionenaustauschchromatographie an Mono Q

Die weitere Aufreinigung der Lipase erfolgte an einer Mono Q Säule (Pharmacia, Freiburg). Die Säule hatte ein Volumen von 1 ml und wurde vor der Chromatographie mit Puffer A äquilibriert. Die Fraktionen der Chromatographie an Q-Sepharose FF mit Lipase-Aktivität wurden mit Puffer A 1:3 verdünnt, um erneut die Ionenstärke zu senken und mit einer Flussrate von 0,3 ml/min auf die Säule geladen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf Lipase-Aktivität getestet.

Puffer A: 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT
Puffer B: A + 1 M NaCl
Flussrate: 0,3 ml/min.
Fraktionsvolumen 1 ml

Gradient: 0 → 2 ml 100 % A
2 → 22 ml linearer Anstieg auf 50 % Puffer B
22 → 24 ml linearer Anstieg auf 100 % B
24 → 26 ml 100 % B

2.13.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Eine Trennung der Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen wurde an einer Phenyl-Superose Säule (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die aktiven Fraktionen der Mono Q Säule wurden zur Erhöhung der Ionenstärke 1 zu 2 mit Puffer C verdünnt und mit einem Flussrate von 0,1 ml/min auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule geladen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem abnehmenden Ammoniumsulfat-Gradienten. Aufgefangene Fraktionen wurden auf Lipase-Aktivität getestet.

Puffer A: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 30 % AS-Sättigung 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT
Puffer B: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT
Puffer C: wie Puffer A mit 60 % AS-Sättigung (4 °C)
Flussrate: 0,4 ml/min
Fraktionsvol.: 1 ml

Gradient: 0 → 5 ml 100 % A
5 → 12 ml linearer Anstieg auf 100 % B
12 → 22 ml 100 % B

2.13.4 Gelfiltrationschromatographie

Als letzten Reinigungsschritt erfolgte eine Trennung der Proteine nach ihrem nativen Molekulargewicht an einer Gelfiltrationssäule. Dazu wurden die Lipase-aktiven Fraktionen der HIC mit festem Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 60 % eingestellt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem schwenken inkubiert. Durch eine anschließende Ultrazentrifugation bei 100.000×g für 20 min wurden die präzipitierten Proteine sedimentiert, in 50 µl Gelfiltrationspuffer gelöst und auf die Säule appliziert. Es folgte eine isokratische Elution der Proteine, wobei die einzelnen Fraktionen auf Lipase-Aktivität getestet wurden. Um das Molekulargewicht der eluierten Proteine zu bestimmen, wurde eine Kalibrierung der Säule mit Proteinen verschiedener Molekulargewichte durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine Thyroglobulin: 670 kDa, IgG: 158 kDa, Ovalbumin: 44 kDa, Myoglobulin: 17 kDa, Vitamin B₁₂: 1,35 kDa verwendet.

Säule: Bio-Select SEC-125
Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 150 mM NaCl, 12,5 mM CHAPS, 1,5 mM NaN₃
Flussrate: 0,5 ml/min
Fraktionsvolumen: 250 µl

2.14 Elektrophoresetechniken

Um die Proteine der Lipidkörperfraktion geoelektrophoretisch auftrennen zu können, mussten diese vor der Elektrophorese entfettet werden. Dazu wurde ein Aliquot der durch Zentrifugation gewonnenen Lipidschicht (2.4) zunächst mit 2 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2/1; v/v) homogenisiert und anschließend durch eine Zentrifugation bei 14.000×g für 10 min von dem fettreichen Überstand getrennt. Dieser wurde verworfen und das Proteinpellet je zweimal mit 2 ml Methanol und nachfolgend mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen. Danach resuspendierte man die Proteinprobe in einer 10 % SDS-Lösung und quantifizierte die Proteinkonzentration mit Hilfe des DC Protein-Assays (2.11). Anschließend wurde die Probe mit doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer [Lämmli, 1970] 1:2 verdünnt und für 10 min bei 60 °C erhitzt. Die Herstellung anderer Proteinproben erfolgte wie in den Kapiteln 2.14.1 – 2.14.3 beschrieben.

2.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration der Säuleneluat wurden die Proteine vor der Elektrophorese gefällt. Dies geschah mit Hilfe der StratacleanTM-Matrix (Stratagene, Heidelberg). Diese Matrix hat die Eigenschaft, Proteine sehr fest zu binden. Sie wird daher in der Molekularbiologie genutzt, um DNA-modifizierende Enzyme von den Nukleinsäuren zu trennen, findet aber auch in der Proteinkonzentrierung vor der SDS-PAGE Anwendung [Ziegler et al., 1997]. Dazu wurden zu den verdünnten Proteinlösungen 10 µl StratacleanTM pipettiert und 30 min geschüttelt. Die Matrix wurde 2 min bei 14.000×g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die so behandelten Proteine wurden nach einer Methode von Lämmli [1970] in einem 8 % Trenngel elektrophoretisch getrennt.

2.14.2 Tricin-SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Tricin-SDS-PAGE Gelsystem nach Schägger [Jagow und Schägger, 1994] hat gegenüber dem System nach Lämmli den Vorteil, dass es für Proteine im Molekulargewichtsbereich von 1 bis 100 kDa, insbesondere für Membranproteine eine gleichmäßig gute Trennung mit hoher Bandenschärfe gewährleistet. Um dies mit dem Lämmli System zu erreichen müsste man Gele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen herstellen. Der Nachteil des Tricin-SDS-

PAGE Systems besteht in seiner langen Laufzeit (ca. 3 – 4 h) gegenüber dem Lämmli System (1,5 h). Die elektrophoretische Trennung der Lipidkörperproteine, die im Wesentlichen Molekulargewichte zwischen 10 und 120 kDa aufwiesen, wurde in einem 10 % Tricin-SDS-PAGE Gel durchgeführt.

2.14.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) handelt es sich um eine Kombination der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) in der ersten Dimension und der SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Die in der ersten Dimension durchgeführte IEF-Gelelektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über einen pH-Bereich von 3-10 (Servalyte, Serva, Heidelberg) nach einer Methode von Robertson [Robertson et al.; 1987]. Hierzu wurde die Proteinproben durch eine 10 % TCA-Fällung aufkonzentriert [Pohl, 1990], das resultierende Proteinpellet mit 80 % Aceton gewaschen und in Lysispuffer aufgenommen. Nach beendeter iso-elektrischer Fokussierung wurde das IEF-Gel längs in Streifen geschnitten, die Probenstreifen in SDS-Probenpuffer für 15 min inkubiert und anschließend in eine präparative Sammelgeltasche eines 8 % SDS-PAGE Gels nach Lämmli überführt (s.o.). Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurde ein Streifen des IEF-Gels in 12 gleich große Stücke geschnitten, die Gelstücke für 1 h in dest. Wasser geschüttelt und anschließend der pH-Wert der Lösung bestimmt. Die Detektion der Proteine erfolgte entweder durch Silberfärbung [Dunn, 1993] oder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg).

2.15 Westernblotting und Immunodetektion von Proteinen

2.15.1 Halbtrockenblot Verfahren

Nach der SDS-PAGE wurde eine Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher-Schüll, Dassel) nach dem Halbtrockenblot Verfahren [Westermeier, 1993] durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 57 mA für 1,5 h. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für die folgenden Schritte in eine Glaspetrischale übertragen.

2.15.2 Proteinfärbung der Nitrozellulosemembran mit Fast-Green

Da im Allgemeinen im Anschluss an die Proteinfärbung ein spezifischer Immunnachweis folgte, wurde eine reversible Färbemethode durchgeführt [Westermeier, 1990]. Durch diese Färbung ließ sich die Menge des später spezifisch zu detektierenden Proteins abschätzen und der Molekulargewichtsmarker einzeichnen.

„Fast-Green“-Färbelösung:	Fast-Green	0,1 % (w/v)
	Essigsäure	1 % (v/v)

Die Nitrozellulosemembran wurde direkt nach dem Transfer für 5 min in Fast Green Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Entfärbung des grünen Hintergrundes mit destilliertem Wasser bis distinkte Proteinbanden sichtbar wurden. Der Molekulargewichtsmarker konnte dann mit Kugelschreiber markiert werden, der angefärbte Blot wurde zur Dokumentation kopiert und schließlich mit 0,2 M Natronlauge entfärbt.

2.15.3 Immunodetektion von Lipoxygenase

Nach dem Proteintransfer auf Nitrozellulose und der reversiblen Anfärbung mit „Fast Green“ wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit 3 % BSA in PBS (20 mM Na-Phosphat (pH 7,0) 150 mM NaCl) blockiert und anschließend mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen die Lipidkörper-LOX der Gurke gerichtet war [Feussner und Kindl, 1992], für 1,5 h inkubiert. Hierzu wurde der Antikörper 1 : 1000 in PBS mit 3 % BSA verdünnt. Die weiteren Schritte erfolgten nach Standardmethoden, der Nachweis des Antigen-Antikörper Komplexes wurde durch einen Sekundärantikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase durchgeführt.

2.16 Proteinblotting und N-terminale Sequenzierung

Die Lipase-aktiven Fraktionen der Chromatographie an Phenyl-Superose wurden, wie unter 2.13.1 beschrieben, mit Hilfe der StratacleanTM Matrix gefällt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (BioRad, München) im Halbtrockenblot-Verfahren [Westermeier, 1993]. Hierzu wurde die Membran vor dem Transfer mit Methanol aktiviert. Die Übertragung erfolgte bei 50 mA für 1 h. Danach wurde die Membran mit 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg) in 50 % Methanol gefärbt und nachfolgend mit einer Lösung aus 50 % Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt. Schließlich wurde die zu sequenzierende Proteinbande ausgeschnitten.

Die Proteinprobe wurde tryptisch gespalten und die resultierenden Peptide auf der HPLC an einer LC-Packings PIC-15-05-C18P3 (180 µm ID) Säule aufgetrennt und nachfolgend an einem 494CLC Protein-Sequencer sequenziert.

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte nicht nur mit der auf PVDF geblotteten-, sondern auch mit einer aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ausgeschnittenen Proteinbande. Weiterhin wurde der tryptische Verdau einer HIC-Fraktion in Lösung mit anschließender Trennung und Ansequenzierung der Spaltprodukte, wie oben beschrieben, durchgeführt. Diese Arbeiten erfolgten bei der BASF AG, Ludwigshafen.

2.17 Oxidation von Triacylglyceriden und Phospholipiden mit Lipoxygenase

2.17.1 Oxidation von 1,3-Dilinolein, Trilinolein und Trilinolenin

Je 50 mg der Lipide wurden in 200 µl einer 10 % (w/v) Na-Desoxycholat Lösung unter Zugabe von 500 µl Ethanol gelöst, mit 0,1 M Na-Borat-Puffer (pH 9,0) auf 10 ml aufgefüllt und für eine Minute mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die verschiedenen Lipide durch sukzessive Zugabe der LOX 1 aus Soja (Sigma, Deisenhofen), in einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml gelöst in dem obigen Na-Borat-Puffer, über einen Zeitraum von 15 Minuten oxidiert. Nach der Inkubation wurden die entstandenen Lipidhydroperoxide durch die Zugabe einer Spatelspitze Natriumborhydrid zu ihren entsprechenden Lipidhydroxiden reduziert und der dabei erhöhte pH-Wert sofort wieder ,mit einer 0,1 M HCl Lösung, auf einen Wert von unter 8,5 gesenkt. Anschließend extrahierte man die

Reaktionsprodukte mit drei Volumen einer Chloroform/Methanol Mischung (2/1; v/v). Das Lösungsmittelgemisch wurde verdampft, der Rückstand in 1 ml Chloroform aufgenommen und die Konzentration der LOX-Produkte durch die Absorptionsmessung bei 234 nm mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für konjugierte Diensysteme ($\epsilon 2,5 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol}$) bestimmt. Nach der Zugabe von 2 μl einer 1 mM BHT-Lösung wurden die extrahierten Lipide unter Argon bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.17.2 Oxidation von Dilinoleoyl-Phosphatidylcholin

20 μM des Phospholipids wurde in 400 μl einer 10 % (w/v) Na-Desoxycholat Lösung und 200 μl Ethanol gelöst, mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) auf 10 ml aufgefüllt und eine Minute mit Ultraschall behandelt. Nach sukzessiver Oxidation durch die Soja-LOX 1 (s.o.) und nachfolgender Reduktion der Produkte mit Natriumborhydrid wurde der Reaktionsansatz, wie unter 2.17.1 beschrieben, extrahiert, quantifiziert und gelagert.

3. Ergebnisse

3.1 Struktur-Analyse oxygenierter Triacylglyceride aus den Keimblättern der Gurke

3.1.1 Trennung der Triacylglyceride auf der Umkehrphase

Untersuchungen an Gurkenkeimlingen zeigten, dass bereits in den frühen Stadien der Keimung eine spezifische Lipoxygenase (LOX) synthetisiert und zum Lipidkörper transportiert wird. Schon in 1-d-alten Keimlingen ließ sich diese LOX, über Aktivität und Proteinvorkommen, an der Membran des Lipidkörpers nachweisen [Feussner und Kindl, 1992]. Im weiteren Verlauf der Keimung wird dieses Enzym dann zu einem der dominierenden Proteine dieses Organells [Feussner, 1993; Feussner et al., 1996].

In ersten Experimenten konnten in den Speicherlipiden der Gurkenkeimlinge am vierten Tag der Keimung große Mengen des LOX-Produktes (13S)-HPODE gefunden werden [Feussner et al., 1995]. Um zu klären, ob die Triacylglyceride in den Keimblättern der Gurke tatsächlich *in vivo* Substrate der Lipidkörper-LOX sind, sollten diese eingehender auf das Vorkommen von Reaktionsprodukten einer LOX untersucht werden.

Um eine detaillierte Analyse zu ermöglichen, wurden die Triacylglyceride unter nichtreduzierenden Bedingungen an einer Umkehrphasen-HPLC-Säule (RP-HPLC) aufgetrennt. Während ungesättigte Verbindungen durch die Absorption ihrer Doppelbindungen bei 210 nm detektiert wurden (nicht gezeigt), erfolgte der Nachweis von LOX-Produkten über die Absorptionsmessung des Eluates bei 234 nm (Detektion des konjugierten Diensystems der Hydro(pero)xy-fettsäuren). Simultan wurde ein Chemilumineszenz-Test auf Lipidhydroperoxide durchgeführt. Dazu mischte man dem Säuleneluat nach dem Passieren des UV-Detektors eine Lösung aus Isoluminol und Mikroperoxidase zu und detektierte die durch Hydroperoxide hervorgerufene Lichtemission in einem Luminometer [Yamamoto et al., 1987].

In Abb. 2a ist das Chromatogramm der Triacylglycerid-Analyse aus 4-d-alten Keimblättern der Gurke bei einer Absorption von 234 nm dargestellt. Es wurden fünf dominierende Peaks (1-5) voneinander getrennt, die alle das für LOX-Produkte charakteristische Spektrum konjugierter Diene mit einem relativen Absorptionsmaximum bei 234 nm aufwiesen (siehe Fenster). Aus Abbildung 2b wird deutlich, dass alle fünf Peaks in der Chemilumineszenzmessung, wenn auch

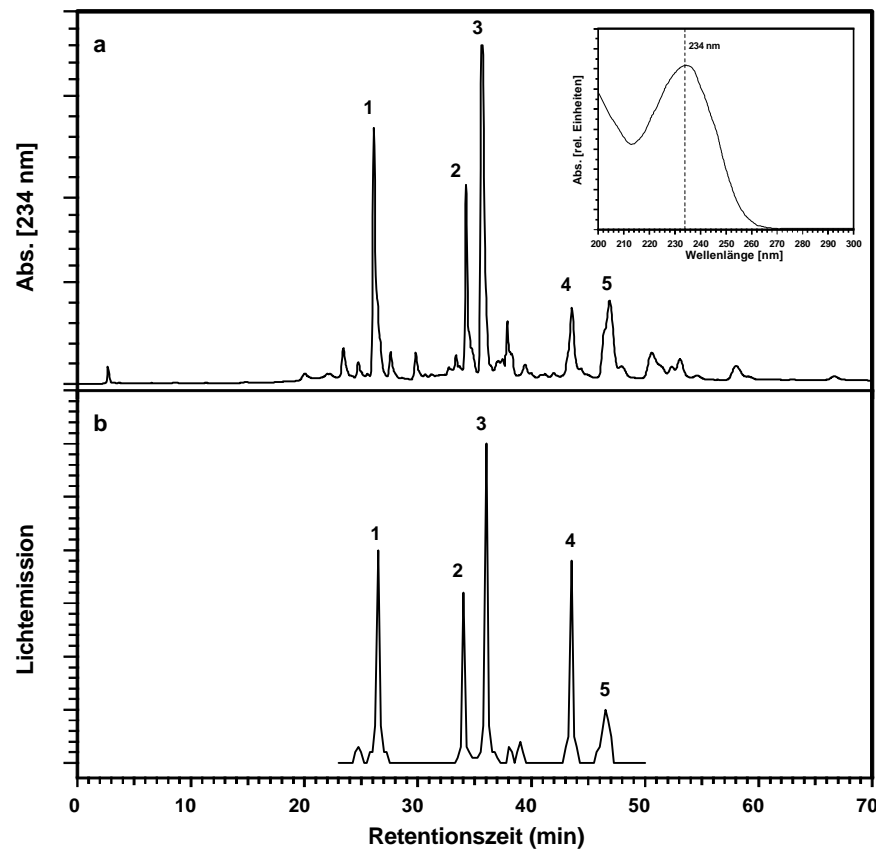


Abb. 2 a-b: RP-HPLC-Analyse von Lipidextrakten der Lipidkörper aus 4-d-alten Keimblättern der Gurke. Die Lipidkörper wurden durch Ultrazentrifugation isoliert, ihre Lipide extrahiert und mittels RP-HPLC (siehe 2.7.1) analysiert. Die Detektion erfolgte bei 234 nm (a), zwischen 23 und 50 Minuten wurde zusätzlich die Lichtemission gemessen (b). Die mit 1-5 bezeichneten Peaks wurden für weitere Analysen isoliert. Das Fenster in Abb. 2a zeigt ein für die Peaks 1-5 repräsentatives Spektrum.

mit unterschiedlicher Intensität, eine Lichtemission hervorriefen. Bei den aufgetrennten Verbindungen handelte es sich demnach um Lipidhydroperoxide. Beide Charakteristika, das relative Absorptionsmaximum bei 234 nm und der Besitz von Peroxidgruppen, deuteten darauf hin, dass es sich bei den getrennten Verbindungen um LOX-Produkte handeln könnte. Für eine strukturelle Analyse der fünf Peaks wurden diese mittels präparativer RP-HPLC Chromatographie gereinigt (siehe 2.7.1.3).

3.1.2 Vergleichende Chromatographie-Experimente

Aus der Literatur war bekannt, dass Linolsäure mit über 70 Prozent, bezogen auf die Gesamtfettsäurezusammensetzung, die dominierende Fettsäure der Speicherlipide des Gurkensamens ist [Carreras et al., 1989; Matsui und Kajiwara, 1995]. Es konnte sich daher bei den Peaks 1-5 zum größten Teil um unterschiedlich stark oxygenierte Derivate des Trilinoleins (TL) handeln. Um erste Hinweise darauf zu bekommen, wurde mit der Analyse geeigneter Standardsubstanzen begonnen. Dazu wurden zunächst die Retentionszeiten der Lipide Monolinolein (ML), 1,3-Dilinolein (DL) und TL sowie deren LOX-Produkte unter identischen Trennparametern ermittelt und mit denen der isolierten Peaks 1-5 verglichen (Tab. 1). Phospholipide blieben unberücksichtigt, da diese aufgrund ihrer höheren Polarität unter den gewählten Trennbedingungen nicht auf der RP-HPLC-Säule retardierten und somit kein Bestandteil der isolierten Peaks sein konnten.

Tab. 1: Vergleich der Retentionszeiten der isolierten Peaks 1-5 mit denen von Standardsubstanzen. Als Standardsubstanzen wurden die Lipide Monolinolein (ML), 1,3-Dilinolein (DL), Trilinolein (TL) sowie die LOX-Produkte des DL und TL verwendet. Hierbei gibt die Zahl die Anzahl der durch die LOX oxygenierten Linolsäurereste im Lipidmolekül an. Die Detektion der LOX-Produkte erfolgte bei 234 nm, während die Lipide ML, DL und TL bei 210 nm detektiert wurden (2.7.1.1). Die Herstellung der oxygenierten Standardsubstanzen wurde, wie unter 2.17.1 beschrieben, durchgeführt.

Peak	RT [min]	Lipid	RT [min]	Ox. Lipid	RT [min]
1	26	ML	7	DL-Derivat 2	9,1
2	34	DL	36	DL-Derivat 1	24,5
3	35,5	TL	77	TL-Derivat 3	26
4	43,5			TL-Derivat 2	34
5	47			TL-Derivat 1	47

Unter den verwendeten Chromatographiebedingungen eluieren polare Verbindungen eher als unpolare Verbindungen. Daher wurde bei dem Vergleich der Retentionszeiten von ML, DL und TL mit denen der isolierten Peaks deutlich, dass Oxygenierungsprodukte von Diacylglyceriden und Triacylglyceriden als Bestandteil dieser Peaks in Frage kamen, jedoch Monoacylglyceride und deren Oxygenierungsprodukte wegen ihrer höheren Polarität ausgeschlossen werden konnten. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Retentionszeit von Peak 1 mit der des TL-Derivates 3 identisch war. Ebenso stimmten die Retentionszeiten von Peak 2 und dem TL-Derivat 2 sowie die Retentionszeiten von Peak 4 und dem TL-Derivat 1 überein.

Um das identische Retentionsverhalten der Peaks 1, 2 und 4 mit den entsprechenden Standardsubstanzen (Oxygenierungsprodukte des TL) abzusichern, wurden Koinjektionen

äquimolarer Mengen von Peak 1 mit dem TL-Derivat 3, Peak 2 mit dem TL-Derivat 2 und Peak 4 mit dem TL-Derivat 1 durchgeführt (nicht gezeigt). Alle Analysen ergaben immer einen homogenen Peak, der annähernd die doppelte Fläche gegenüber den Einzelanalysen besaß. Somit war davon auszugehen, dass es sich bei den Peaks 1 bis 5 um oxygenierte Triacylglyceride handelte, wobei die Peaks 1, 2 und 4 sehr wahrscheinlich die verschiedenen LOX-Produkte des TL darstellten.

3.1.3 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung

Um die Fettsäurezusammensetzung der Peaks 1-5 zu bestimmen, wurden zunächst die Lipidhydroperoxide der isolierten Peaks durch die Zugabe von Natriumborhydrid zu den entsprechenden Lipidhydroxiden reduziert. Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der Lipide unter alkalischen Bedingungen (2.6). Die so freigesetzten Fettsäuren konnten dann mittels HPLC oder nach ihrer Derivatisierung mit Hilfe der GC/MS bestimmt und quantifiziert werden.

3.1.3.1 HPLC-Analyse der Fettsäuren

3.1.3.1.1 Analyse auf der Umkehrphase

Ungesättigte Fettsäuren und deren LOX-Produkte sollten durch die Analyse der hydrolysierten Peaks auf der RP-HPLC nachgewiesen werden. Außerdem war es so möglich, das HODE zu Linolsäure Verhältnis in den einzelnen Peaks genau zu bestimmen, um daraus eventuell Schlüsse auf deren Oxygenierungsgrad zu ziehen.

Die Trennung der Fettsäuren erfolgte an einer RP-HPLC-Säule unter isokratischen Laufmittelbedingungen, wobei die Absorption simultan bei 210 nm (Detektion der Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren) und 234 nm (Detektion des konjugierten Diensystems von LOX-Produkten) gemessen wurde.

Repräsentativ für alle Analysen ist hier die chromatographische Trennung des Hydrolysates von Peak 4 in Abb. 3a und b dargestellt. Bei einer Retentionszeit von 5,8 Minuten eluierte eine Substanz von der Säule, die man anhand ihres Spektrums (Fenster) und GC/MS-Analysen (nicht gezeigt) als HODE identifizierte. Die Menge der Substanz wurde durch die Integration der Peakfläche bei 234 nm bestimmt. Die Detektion ungesättigter Fettsäuren bei 210 nm ergab ebenfalls nur einen Peak, der aufgrund seiner Retentionszeit (15,5 min) und einer GC/MS-Analyse als Linolsäure identifiziert wurde. Die Quantifizierung dieser Fettsäure erfolgte durch die Integration der Peakfläche bei 210 nm.

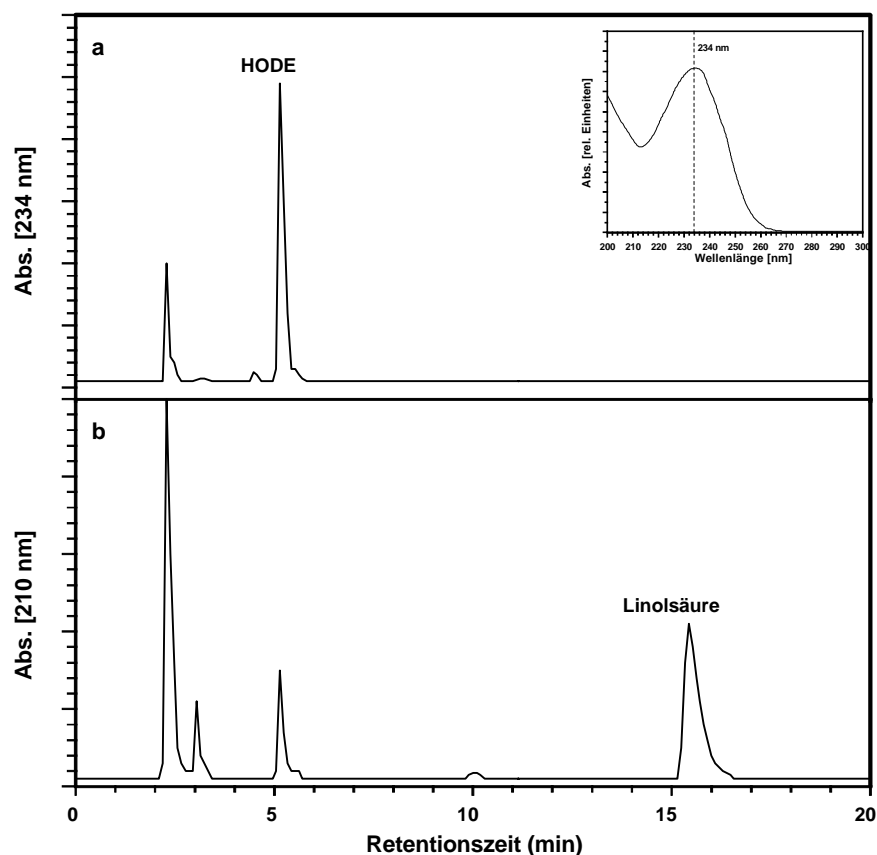


Abb. 3 a-b: RP-HPLC-Analyse von Peak 4. Nach der Isolation der Lipidhydroperoxide aus den Lipidextrakten der Gurke (2.7.1.3), ihrer Reduzierung zu den entsprechenden Lipidhydroxiden und alkalischer Hydrolyse wurde die Analyse der freigesetzten Fettsäuren auf der RP-HPLC, wie unter 2.7.2 beschrieben, durchgeführt. Die Detektion von LOX-Produkten erfolgte bei 234 nm (a), ungesättigte Fettsäuren wurden durch die Absorptionmessung bei 210 nm nachgewiesen (b). Das Fenster in Abb. 3a zeigt das Absorptionsspektrum von HODE.

Bei der Analyse der anderen Peaks ließ sich ebenfalls nur Linolsäure und das entsprechende LOX-Produkt (HODE) detektieren, wobei aber das Verhältnis der beiden Fettsäuren zueinander variierte. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Auswertung der RP-HPLC-Analysen der Peaks 1 bis 5. Die Menge von HODE und Linolsäure (L) wurde durch Integration der Peakflächen aus Abb. 3 bei 234 nm (HODE) bzw. bei 210 nm (L), nach einer Kalibrierung mit den Standardsubstanzen der beiden Fettsäuren, bestimmt.

Peak	RT [min]	L:HODE Verhältnis
1	26	1 : 19
2	34	1 : 1,7
3	35,5	1 : 5,8
4	43,5	1 : 0,4
5	47	1 : 0,6

3.1.3.1.2 Analyse auf der Normalphase

Bei der LOX katalysierten Oxygenierung der Linolsäure sind zwei Positionsisomere möglich. Die Hydroperoxidgruppe kann in dem Reaktionsprodukt am C-9 (9-HPODE) oder am C-13 (13-HPODE) gebunden sein. Beide Isomere wie auch ihre Reduktionsprodukte (9-HODE, 13-HODE) lassen sich chromatographisch an einer Normalphasen-Säule (SP-HPLC) trennen.

Um die Position der Hydroxidgruppe in der oxygenierten Linolsäure der Peaks 1-5 bestimmen zu können, wurde das in den RP-HPLC Trennungen (3.1.3.1) isolierte HODE auf der SP-HPLC analysiert. Abb. 4 zeigt beispielhaft das Chromatogramm der Analyse des HODE aus Peak 4. Die dominierende Verbindung mit einer Retentionszeit von 7,5 Minuten wurde anhand von Standardsubstanzen und seines Spektrums als 13-Hydroxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure (13-HODE) identifiziert. Andere potentielle LOX-Produkte der Linolsäure wie 9-HODE und alle all-E Isomere kamen nur in Spuren vor. Die Analyse der anderen Peaks ergab vergleichbare Ergebnisse. Alle Peaks enthielten überwiegend 13-HODE als LOX-Produkt der Linolsäure.

Als ein weiteres potentielles LOX-Produkt wurde mit Hilfe dieser Methode 13-Keto-(9Z,11E)-octadecadiensäure (13-KODE) anhand seiner Absorption bei 270 nm nachgewiesen (nicht gezeigt). Der Anteil betrug zwischen 5-7 % der gesamten oxygenierten Fettsäuren aller Peaks.

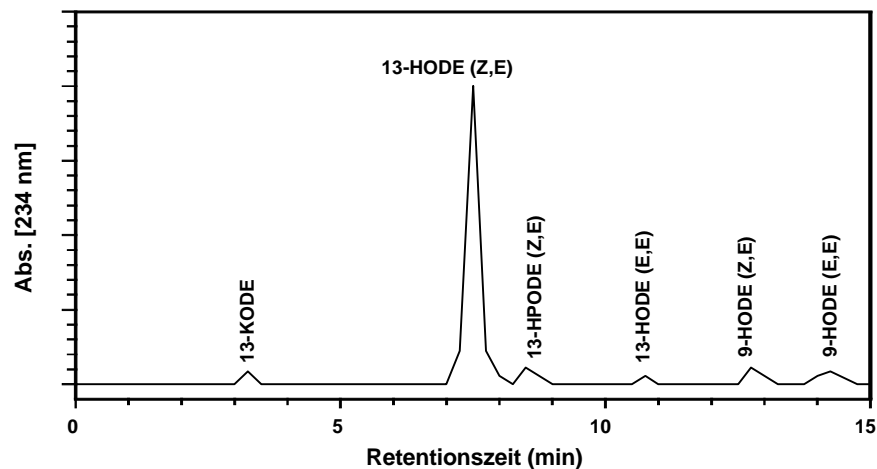


Abb. 4: SP-HPLC-Analyse von Peak 4. Nach Reduktion und Hydrolyse der Lipide in Peak 4, wurde das HODE aus den freigesetzten Fettsäuren über die RP-HPLC (siehe Abb. 3) isoliert und anschließend auf der SP-HPLC analysiert (siehe 2.7.3). Zur Detektion der Hydroxyfettsäuren wurde die Absorption bei 234 nm gemessen, Ketofettsäuren konnten bei 270 nm detektiert werden (nicht gezeigt).

3.1.3.1.3 Analyse auf der Chiralphase

Das C-Atom an Position 13 des 13-HODE besitzt vier verschiedene Substituenten. Aufgrund dieses asymmetrischen C-Atoms ist das Molekül chiral und es sind zwei verschiedene Enantiomere (*R/S*) des 13-HODE möglich. Bis auf wenige Ausnahmen [Hada et al., 1997] besitzen die Produkte einer LOX katalysierten Reaktion ausschließlich die *S*-Konfiguration. Sie wird daher als charakteristisch für die Wirkung von LOXs angesehen.

Die beiden möglichen Enantiomere des 13-HODE lassen sich an einer chiralen-HPLC-Säule (CP-HPLC) trennen. Dazu wurde diese Fettsäure aus den hydrolysierten Peaks über RP-HPLC und nachfolgender SP-HPLC, wie oben beschrieben, isoliert und anschließend auf einer Chiralphase analysiert. In Abb. 5 ist das Chromatogramm der Analyse von 13-HODE aus Peak 4 dargestellt. Die Verbindung besitzt fast ausschließlich die *S*-Konfiguration. (13*R*)-HODE kam nur in Spuren vor und ist wahrscheinlich durch eine autokatalytische Reaktion entstanden. Die Analyse des 13-HODE der anderen Peaks ergab ein identisches Ergebnis. Alle aus den Triacylglyceriden der Gurke isolierten Peaks enthielten als alleiniges LOX-Produkt (13*S*)-HODE. Weiterhin war dieses Ergebnis ein Beweis für eine enzymatisch katalysierte Oxidation der Speicherlipide, da im Falle eines autokatalytischen Prozesses beide Enantiomere zu ca. 50 % vorgelegen hätten.

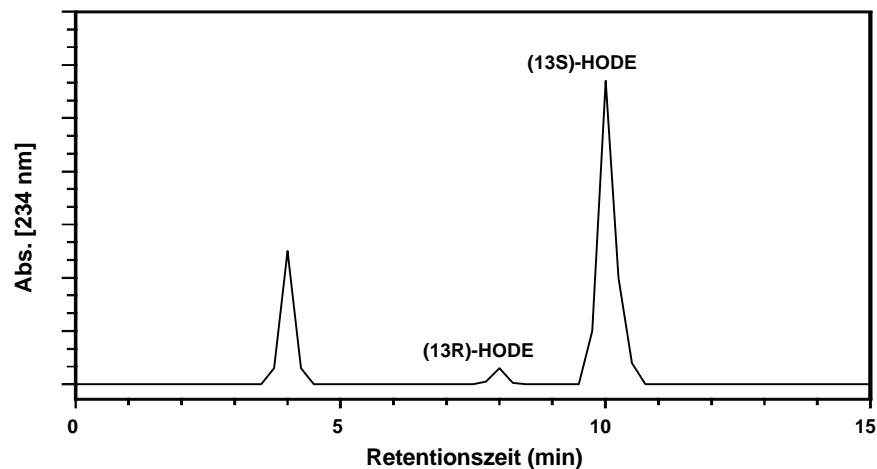
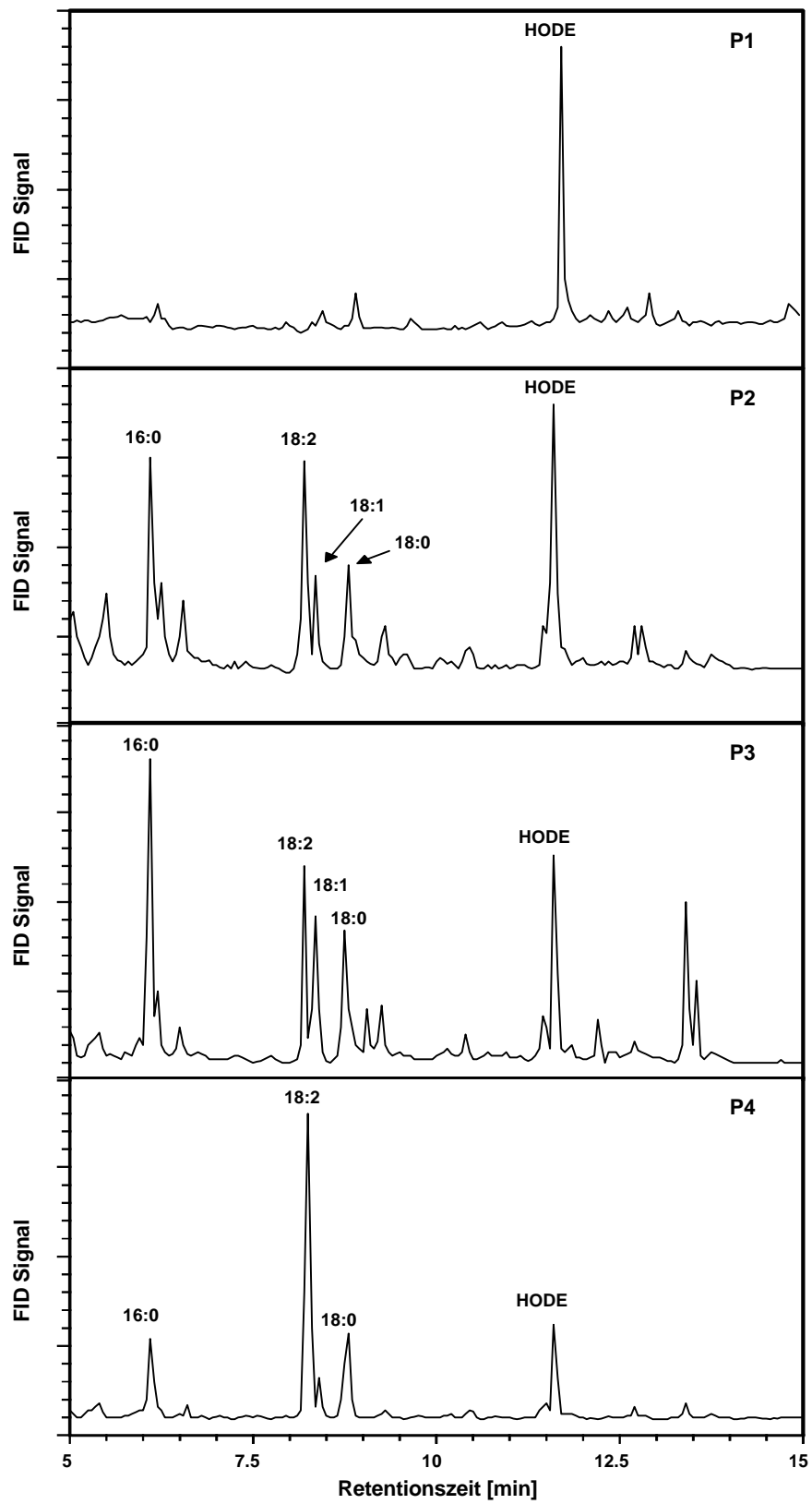


Abb. 5: CP-HPLC-Analyse von 13-HODE aus Peak 4. Nach Reduktion und Hydrolyse der Lipide in Peak 4 wurde 13-HODE aus den freigesetzten Fettsäuren über RP-HPLC (Abb. 3) und nachfolgender SP-HPLC (Abb. 4) isoliert. Die Analyse auf der Chiralphase wurde, wie unter 2.7.4 beschrieben, durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 234 nm.

3.1.3.2 GC/MS-Analyse der Fettsäuren

Da über die HPLC nicht alle Fettsäuren detektiert werden konnten, wurden die Peaks 1-5 mit Hilfe der GC/MS überprüft. Nach der Derivatisierung der Fettsäuren, bei der Carboxylgruppen methyliert und eventuelle Hydroxylgruppen silyliert wurden, erfolgte die gaschromatographische Auftrennung des Fettsäuregemisches. Man erhielt so eine vollständige Analyse der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Peaks, wobei die getrennten Fettsäuren anhand ihrer Massenspektren identifiziert wurden.

In Abb. 6 sind die Chromatogramme der GC/MS-Analysen dargestellt. Ihre Auswertung kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Peak 1 (P1) enthielt ausschließlich HODE. Im Peak 2 (P2) waren die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren Linolsäure und HODE in einem Verhältnis von ungefähr 1:1,5. Weiterhin konnten Palmitinsäure und in geringerer Menge Öl- und Stearinsäure gefunden werden. Die dominante Fettsäure in Peak 3 (P3) war Palmitinsäure. Zusätzlich konnte Linolsäure, HODE sowie geringe Mengen an Öl- und Stearinsäure detektiert werden. Peak 4 (P4) enthielt hauptsächlich Linolsäure und HODE, in einem Verhältnis von ungefähr 3:1. In geringerer Menge ließ sich Palmitin- und Stearinsäure nachweisen.



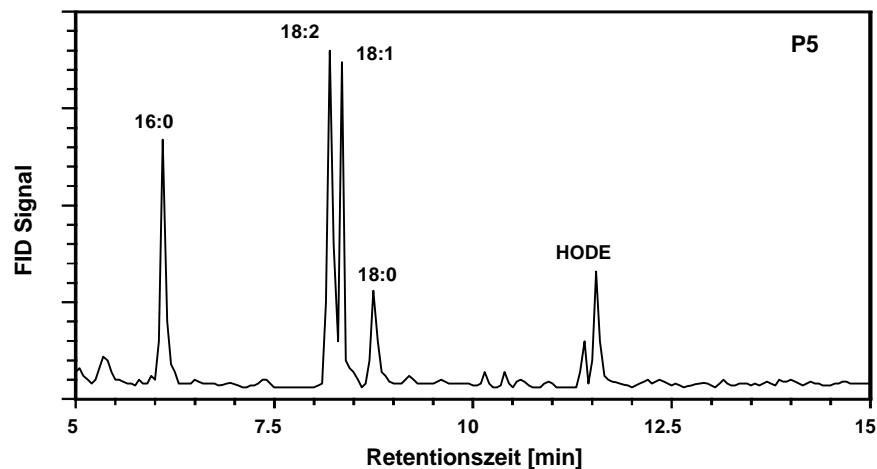


Abb. 6: GC/MS-Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Peaks 1-5 (P1-P5). Nach Reduzierung und Hydrolyse (2.6), wurden die freigesetzten Fettsäuren, wie unter 2.8 beschrieben, derivatisiert und anschließend gaschromatographisch analysiert. In den Chromatogrammen gekennzeichnete Fettsäuren wurden anhand ihrer Massenspektren identifiziert. 16:0 Palmitinsäure; 18:0 Stearinsäure; 18:1 Ölsäure; 18:2 Linolsäure.

Die Analyse von Peak 5 (P5) ergab Palmitinsäure, Linol- und Ölsäure als häufigste Fettsäuren. Zusätzlich ließ sich HODE und Stearinsäure detektieren. Das Verhältnis von Linolsäure zu HODE betrug ungefähr 3:1.

Auffällig bei diesen Analysen war der Nachweis von relativ hohen Mengen an Palmitin- und Stearinsäure in den Peaks 2-5. Er kann nur durch eine Verunreinigung mit Weichmachern während der Isolation der Proben erklärt werden (H. Kühn, pers. Mitteilung).

3.1.4 Quantifizierung des Peroxidgehaltes der isolierten Lipide

Die Lipidhydroperoxide in den Lipidextrakten 4-d-alter Gurkenkeimblätter konnten durch UV-Detektion mit gekoppelter Chemilumineszenzmessung nachgewiesen werden. Es kam unter den gewählten Chromatographieparametern zwar nicht zur Trennung von Lipidhydroperoxiden und Lipidhydroxiden, da aber nur Hydroperoxide durch die Chemilumineszenzdetektion nachweisbar sind, konnte man diese von den Hydroxiden unterscheiden. Die Messung der Chemilumineszenz ist jedoch stark von Quencheffekten beeinflusst. Deshalb war eine exakte Quantifizierung der Lipidhydroperoxide nur bedingt möglich.

Eine wesentlich bessere quantitative Bestimmung von Lipidhydroperoxiden ermöglicht die NMR-Spektroskopie. Erste Messungen an Modellverbindungen durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigten, dass eine Unterscheidung von Hydroperoxy- und Hydroxyderivaten möglich ist [Frankel et al., 1990]. Untersuchungen an Lipidextrakten der Keimblätter aus 4-d-altigen Gurkenkeimlingen durch ^1H , ^{13}C -verschiebungskorrelierte 2D-NMR-Experimente konnten dies anhand der unterschiedlichen ^{13}C -Verschiebungen des C-13 Atoms (13-HPODE: δ 86,8 vs. 13-HODE: δ 72,8) und der olefinischen C-Atome von 13-HODE bzw. 13-HPODE bestätigen. Ein Nachteil solcher 2D-NMR-Messungen ist aber die relativ große erforderliche Probenmenge (100-500 mg). Um dennoch die Peroxidmenge in den einzelnen isolierten Fraktionen bestimmen zu können, erfolgte die Analyse durch ^1H -NMR-Spektroskopie bei der wesentlich geringere Mengen (10-50 mg) benötigt werden. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen für die im Tieffeldbereich liegenden Protonen der Standardverbindungen 13-HPODE und 13-HODE sind in der Abb. 7 dargestellt. Die jeweilige Zuordnung konnte durch Analyse der ^1H , ^1H -COSY-2D-NMR-Spektren zweifelsfrei getroffen werden. Ein Vergleich der Differenzen für chemische Verschiebungen von 13-HPODE und 13-HODE zeigte, dass diese erwartungsgemäß für H-13 bzw. H-12 am größten waren. Für eine Bestimmung des HPODE zu HODE-Verhältnisses in den einzelnen Peaks durch Integration der Signalflächen waren beide Signale jedoch ungeeignet. Das H-13- ^1H -NMR Signal von 13-HODE fiel mit einem Methylenprotonensignal des Glycerins (glc- CH_2) zusammen. Die H-12-Signale von 13-HPODE und 13-HODE waren oft von Signalen überlagert, die von olefinischen Protonen an nicht konjugierten Doppelbindungen stammten, wie sie zum Beispiel in Linol- und Ölsäure vorkommen. Dagegen war trotz der kleineren Verschiebungsdifferenz (13-HPODE/13-HODE: $\Delta\delta$ 0,06) das H-11-Signal gut für eine quantitative Auswertung geeignet [Feussner et al., 1997c]. Aus den in der Abb. 7 gezeigten ^1H -NMR Spektren lässt sich erkennen, dass in allen Peaks ausschließlich 13-HPODE nachweisbar war. Die Ergebnisse, die durch Integration der Signale erhalten wurden, sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Weiterhin konnte mit dieser Methode keine Palmitin- und Stearinsäure in den Peaks 2-5 gefunden werden. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den beiden Fettsäuren um eine Kontamination aus den Weichmachern handelte. Die NMR-Analysen wurden freundlicherweise von Fr. Dr. A. Porzel, IPB Halle, durchgeführt.

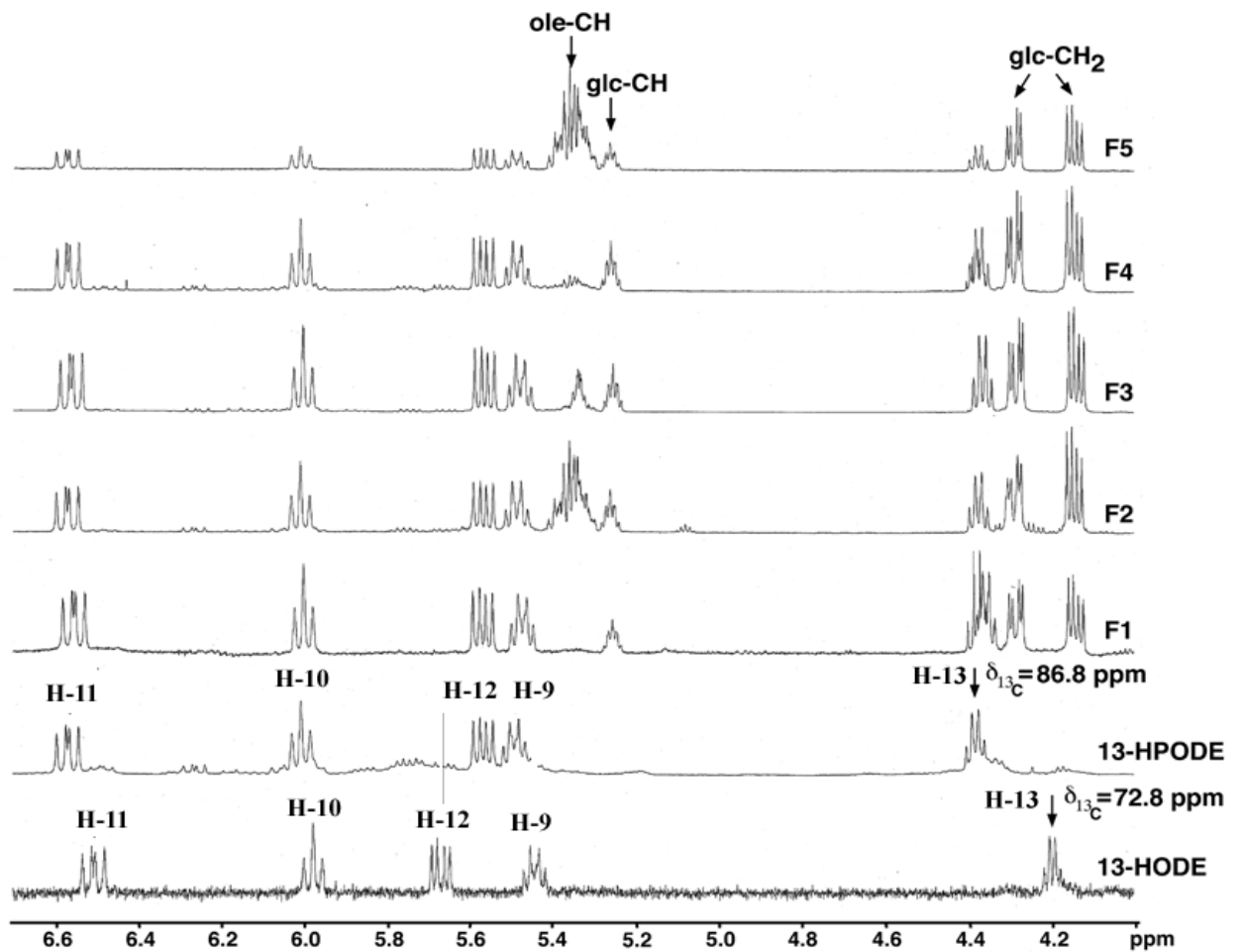


Abb. 7: Niedrigfeld-Bereich der ¹H-NMR-Spektren der Peaks 1 bis 5 (F1-F5) und der Standardsubstanzen 13-HPODE und 13-HODE. Die Peaks 1 bis 5 wurden, wie unter 2.7.1.3 beschrieben, über die RP-HPLC fraktioniert. ole-CH olefinische Protonensignale; glc-CH₂ Methylenprotonensignal des Glycerins.

Tab. 3: Berechnung des HPODE zu HODE Verhältnisses der Peaks anhand der Flächen der Protonensignale am C-11.

Peak	RT [min]	HPODE : HODE-Verhältnis [¹ H-NMR]
1	26	19 : 1
2	34	16 : 1
3	35,5	30 : 1
4	43,5	9 : 1
5	47	19 : 1

3.1.5 Zusammenfassung der Strukturanalysen

Bei den aus den Triacylglyceriden der Gurke isolierten Peaks 1-5 handelte es sich zweifelsfrei um LOX-Produkte. Beweise dafür waren:

- Das charakteristische konjugierte Dienspektrum.
- Die einheitliche chirale Zusammensetzung des reduzierten Reaktionsproduktes: Nur das *S*-Enantiomer der oxygenierten Linolsäure ((13*S*)-HODE) konnte detektiert werden.
- Die Identifizierung der Verbindungen als Hydroperoxide.

Die einzelnen Peaks unterschieden sich jedoch in dem Grad der Oxygenierung und in ihrer Fettsäurezusammensetzung, wobei der überwiegende Teil aber LOX-Produkte des Trilinoleins waren. Weiterhin machten die Analysen deutlich, dass einige Peaks aus einer heterogenen Mischung von mehreren strukturell sehr ähnlichen Substanzen bestanden.

Peak 1:

Aufgrund der Fettsäurezusammensetzung (GC/MS und RP-HPLC Analysen) und der selben Retentionszeit wie das TL-Derivat 3 handelte es sich bei diesem Peak um das TL-Derivat 3. Das Glyceringerüst dieses Triacylglycerids ist mit drei Molekülen (13*S*)-HPODE verestert (HODE/HODE/HODE).

Peak 2:

Dieser Peak hatte eine identische Retentionszeit wie das TL-Derivat 2. Durch die HPLC-Analysen wurde ein Linolsäure zu (13*S*)-HODE Verhältnis von ungefähr 1:2 bei einer etwas variierenden Fettsäurezusammensetzung in der GC/MS bestimmt. Dieser Peak enthielt somit ein Triacylglycerid mit der Fettsäurezusammensetzung HODE/HODE/Linolsäure, was der des TL-Derivates 3 entsprach. Bei den Fettsäuren Palmitin-, Stearin- und Ölsäure handelte es sich wahrscheinlich um Kontaminationen.

Peak 3:

Aufgrund der zum TL-Derivat 2 ähnlichen Retentionszeit und dem im Vergleich zu Peak 2 etwas veränderten Verhältnis der Fettsäuren zueinander (GC/MS), handelte es sich bei diesem Peak um eine Mischung von Triacylglyceriden, die jeweils zwei Moleküle (13*S*)-HODE besaßen, sich aber in der dritten Fettsäure unterschieden (HODE/HODE/X). Als dritte Fettsäure kam neben Linolsäure vor allem Ölsäure in Frage, wodurch sich das ungewöhnliche Linolsäure zu HODE Verhältnis (RP-HPLC) von 1:5,8 erklären ließ. Palmitin- und

Stearinsäure stammten wahrscheinlich wiederum aus einer Kontaminierung der Probe mit Weichmachern.

Peak 4:

Dieser Peak besaß eine identische Retentionszeit wie das TL-Derivat 1 und hatte ein Linolsäure zu HODE-Verhältnis von 1 zu 0,4. Andere Fettsäuren wie Palmitin- und Stearinsäure kamen nur in Spuren vor. Der Peak wurde als das TL-Derivat 1 identifiziert (HODE/Linolsäure/Linol-säure).

Peak 5:

Die Fettsäurezusammensetzung ließ erkennen, dass es sich bei diesem Peak um eine Mischung von Triacylglyceriden handelte, die ein Molekül (13S)-HODE enthielten, die anderen beiden Fettsäuren aber sehr stark variierten (HODE/X/X). Dies führte zu der offensichtlichen Inhomogenität dieses Peaks. Als Fettsäuren kamen hier Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure in Frage.

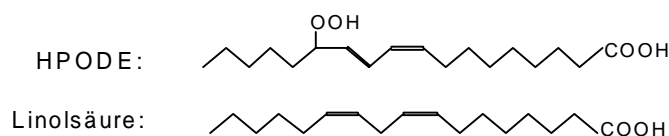
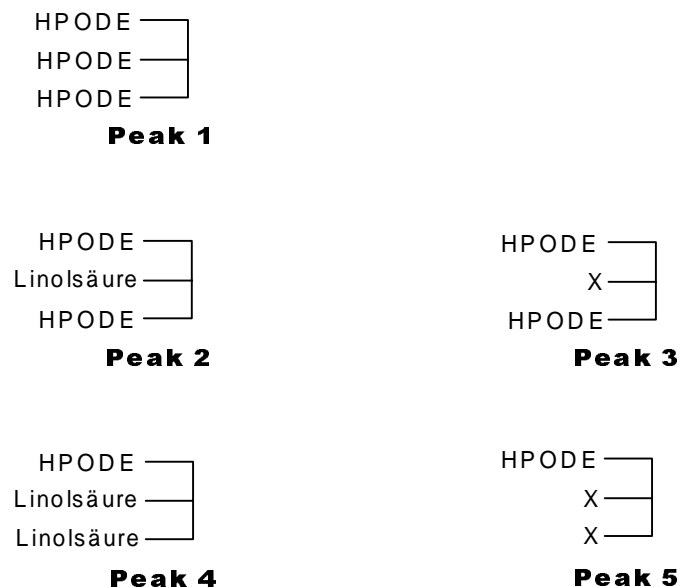


Abb. 8: Schematische Darstellung der analysierten Triacylglyceride. Die Position der Fettsäuren im Molekül ist willkürlich gewählt. X: Variierende Fettsäure; hierfür kommen die unter dem jeweiligen Peak im Text erwähnten Fettsäuren in Frage.

3.1.6 Keimungskinetik der oxygenierten Triacylglyceride

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand der Lipidextrakte aus 4-d-alten Keimblättern. Dabei stellten sich aber folgende Fragen: (1) Zu welchem Zeitpunkt während der Keimung werden die einzelnen LOX-Produkte gebildet? Hier sollte herausgefunden werden, ob die Synthese der identifizierten Verbindungen annähernd simultan stattfindet oder ob die verschiedenen Peaks zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstehen. (2) Lassen sich Änderungen in der Gesamtmenge der LOX-Produkte während des Keimungsverlaufs feststellen? Um diese Fragen zu klären, wurden gleiche Mengen an Keimblättern zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, die Lipidkörper isoliert und die daraus extrahierten Triacylglyceride mit Hilfe der HPLC analysiert und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Die HPLC-Chromatogramme in Abb. 9 repräsentieren drei ausgewählte Zeitpunkte, welche die Veränderungen unter den Triacylglyceriden im Verlauf der Keimung deutlich machen. Die Chromatogramme als auch die quantitative Darstellung der einzelnen Peaks in Abb. 10 zeigen, dass die verschiedenen Verbindungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildet wurden. Im Anfangsstadium der Keimung (6 h, nicht gezeigt) waren nur geringe Mengen der Peaks 4 und 5 detektierbar, die aber bis zum Zeitpunkt 24 h kontinuierlich zunahmten. 48 h nach Beginn der Keimung traten dann massiv die Peaks 1-3 auf. Zu diesem Zeitpunkt warfen die Keimlinge die Samenschale ab und breiteten die Keimblätter aus. Im weiteren Verlauf der Keimung verschob sich dann das Verhältnis der einzelnen LOX-Produkte zueinander. Die Menge der Peaks 4 und 5 nahm zugunsten der Peaks 1 bis 3 ab, wobei die größte Zunahme im Peak 1 festzustellen war. Eine Analyse der Triacylglyceride zu einem noch späteren Keimungszeitpunkt (6 d, nicht gezeigt) auf der RP-HPLC zeigte, dass der Peak 1 zur dominierenden Verbindung geworden war. Im Verlauf der Keimung kommt es demnach zu einer Verschiebung unter den LOX-Produkten zugunsten der höher oxygenierten Verbindungen.

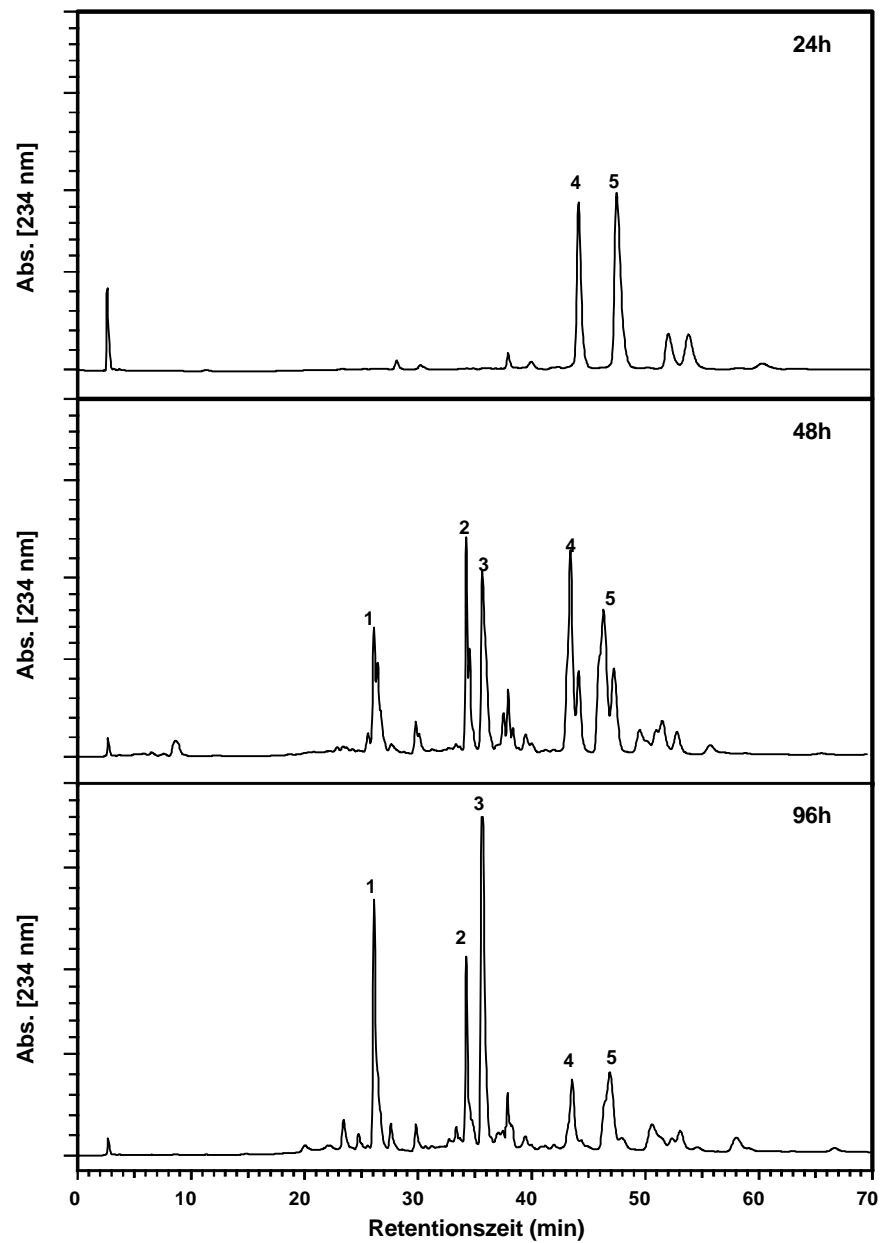


Abb. 9: Keimungskinetik oxygenierter Triacylglyceride in den Keimblättern der Gurke. Lipidkörper aus verschiedenen Keimungsstadien der Gurke (24 h, 48 h, 96 h) wurden durch Ultrazentrifugation isoliert, die Lipide extrahiert und auf der RP-HPLC, wie unter 2.7.1 beschrieben, analysiert.

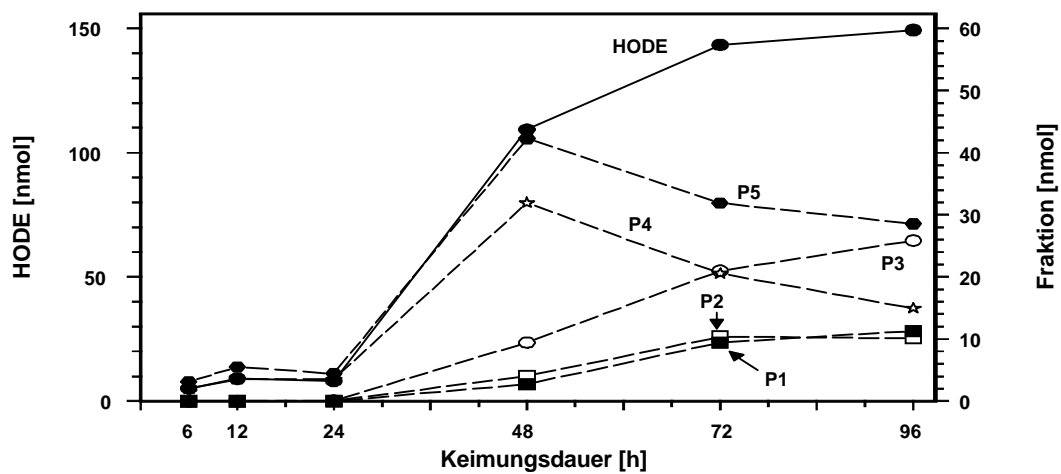


Abb. 10: Bestimmung von (13*S*)-HODE in den Triacylglyceriden der Gurkenkeimlinge. Durch die Integration der Flächen der Peaks 1-5 in den Chromatogrammen aus Abb. 9 wurde für jeden Zeitpunkt die Menge der einzelnen Peaks bestimmt, daraus die Gesamtmenge an (13*S*)-HODE berechnet und gegen die Keimungsdauer aufgetragen (— HODE). Zum Vergleich sind die Kinetiken der einzelnen Peaks mit eingezeichnet (---1-5). Hierbei ist der unterschiedlich hohe Oxygenierungsgrad der verschiedenen LOX-Produkte zu beachten. So beinhaltet 1 nmol des Peaks 1 drei nmol (13*S*)-HODE, 1 nmol der Peaks 2 und 3 je 2 nmol (13*S*)-HODE und 1 nmol der Peaks 4 u. 5 je 1 nmol (13*S*)-HODE (siehe 3.1.5).

Die quantitative Analyse Gesamtmenge an verestertem (13*S*)-HODE zu verschiedenen Zeitpunkten der Keimung (Abb. 10) machte deutlich, dass bis zum Zeitpunkt von 24 h nur geringe Mengen an LOX-Produkten zu finden waren, dann aber ein starker Anstieg erfolgte, der zum Ende des Beobachtungszeitraumes (96 h) eine Sättigung zu erreichen schien.

3.2 Oxygenierte Triacylglyceride in den Keimblättern der Sonnenblume

Die Fettsäurezusammensetzung der Triacylglyceride der Sonnenblumensamen ist nahezu identisch mit denen der Gurkensamen [Rodriguez-Rosales et al., 1998]. Außerdem konnte auch bei der Sonnenblume während der Keimung eine Lipidkörper-assoziierte LOX nachgewiesen werden (eigene Daten, nicht gezeigt). Um herauszufinden, ob die Triacylglyceride der Sonnenblume ebenfalls oxygenierte Fettsäuren enthalten, wurden diese aus den Keimblättern unterschiedlich alter Sonnenblumensamen isoliert und chromatographisch unter nichtreduzierenden Bedingungen, wie unter 2.7.1 beschrieben, analysiert (Abb. 11).

Das Chromatogramm des 96 h Wertes der Sonnenblume hat sehr große Ähnlichkeit mit dem der Gurke (vergl. Abb. 2). Die fünf in den Speicherlipiden der Gurke indentifizierten Peaks konnten auch, mit untereinander etwas veränderten Verhältnissen, in den Triacylglyceriden der Sonnenblume identifiziert werden. Weiterhin wurde durch die Chemilumineszenz-Messung (Abb. 11 d) deutlich, das alle fünf Peaks Lipidhydroperoxide enthielten.

Um die oxygenierten Fettsäuren in den Triacylglyceriden der Sonnenblume genauer zu untersuchen, wurde ein Lipidgemisch aus 4-d-alten Sonnenblumenkeimlingen reduziert und hydrolysiert. Aus diesem Totalhydrolysat wurden die LOX-Produkte, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, über die RP-HPLC präpariert und auf der Normalphase (2.7.3) sowie anschließender Chiralphase (2.7.4) analysiert (nicht gezeigt). Bei diesen Experimenten konnte, analog zu den Ergebnissen aus der Gurke, als alleiniges LOX-Produkt (13*S*)-HODE gefunden werden. Die Triacylglyceride der Sonnenblume dienen also ebenso wie die der Gurke einer am Lipidkörper assoziierten LOX, die spezifisch für die Bildung von (13*S*)-HPODE ist, als Substrat.

Die Bestimmung des HPODE zu HODE Verhältnisses wurde durch NMR-Messungen an einem Gesamtlipidextrakt durchgeführt (nicht gezeigt). Diese Analyse ergab eine Verhältnis von 1 zu 1,26 (HPODE zu HODE). Im Unterschied zu den LOX-Produkten in den Triacylglyceriden der Gurke, die fast ausschließlich in der Hydroperoxid-Form vorliegen, sind demnach ca. 50 % der LOX-Produkte in der Sonnenblume zu ihren entsprechenden Hydroxiden reduziert.

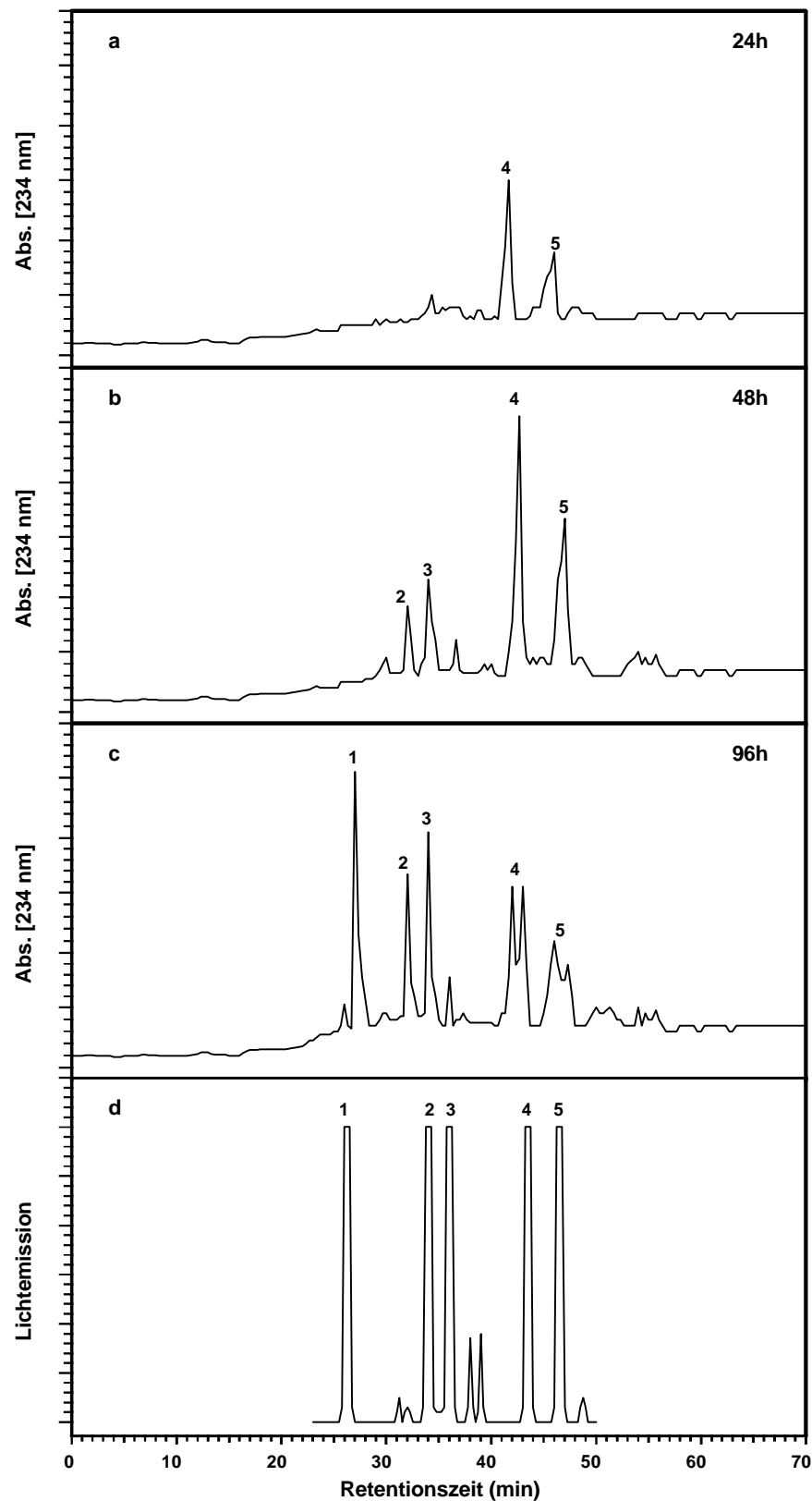


Abb. 11 a-d: RP-HPLC-Analyse von Lipidextrakten der Sonnenblume. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 96 h) geerntete Keimblätter wurden aufgearbeitet, die Lipidkörper durch Ultrazentrifugation isoliert und die Speicherlipide aus diesen extrahiert. Die Analyse auf der RP-HPLC erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. (a-c) Detektion bei 234 nm, (d) Chemilumineszenz-Messung des 96 h Wertes (wegen der zu empfindlichen Einstellung des Detektors sind die Signale am oberen Rand abgeschnitten).

Eine abschließende Untersuchung der Keimungskinetik der oxygenierten Speicherlipide der Sonnenblume zeigte eine auffallend hohe Ähnlichkeit mit den Analysen aus der Gurke (Abb. 11). Auch bei der Sonnenblume war ein differenziertes Auftreten der einzelnen Peaks zu beobachten. In den frühen Stadien der Keimung (24 h) konnten nur die Peaks 4 und 5 detektiert werden, diese nahmen im weiteren Verlauf der Keimung bis zu einem Zeitpunkt von 48 h zu, zeitgleich entstanden die Peaks 1 bis 3. Zwischen 48 h und 96 h änderte sich die Situation. Es kam zu einer verstärkten Bildung der mehrfach-oxygenierten Triacylglyceride (Peak 1-3), hingegen nahm die Menge der einfach-oxygenierten Triacylglyceride (Peak 4 und 5) ab. So fand man 96 h nach Keimungsbeginn überwiegend den Peak 1 (TL-Derivat 3). Die Menge der Peaks 4 und 5 hatte sich aber gegenüber den 48 h Wert beträchtlich verringert. Ähnlich wie in der Gurke kommt es also auch in der Sonnenblume zu einer Verschiebung im Produktmuster der LOX zugunsten der höher oxygenierten Verbindungen.

3.3 Nachweis einer Lipidkörper-assoziierten Lipase

Bei der Mobilisierung der Speicherlipide während des Keimungsprozesses besitzen Lipasen eine zentrale Funktion [Huang, 1994]. Sie spalten die Fettsäuren vom Glyceringerüst ab und leiten so deren Abbau in der β -Oxidation ein [Kindl, 1987]. Das dabei entstehende Acetyl-CoA kann über den Citrat-Zyklus für die ATP-Gewinnung eingesetzt werden oder wird über den Glyoxylat-Zyklus in Richtung Gluconeogenese geschleust. Die so gewonnene Energie und die Kohlenhydrate verwendet der Keimling zum Wachstum bis er in der Lage ist, Photosynthese zu betreiben [Kindl, 1991].

In Samen verschiedener Ölsaaten ließen sich während des Keimungsprozesses Lipidkörpergebundene Lipasen nachweisen. So wurde zum Beispiel in Rapssamen eine Lipase entdeckt, deren lipolytische Aktivität im Verlauf der Keimung ansteigt und nach 5 Tagen ein Maximum aufweist [Fuchs, 1995]. Ebenso fand man in Rizinus- und Maissamen Lipidkörper-assoziierte Lipasen, die vermutlich den Abbau der Speicherlipide einleiten [Lin et al., 1984]. In keimenden Gurkensamen war es jedoch bisher nicht möglich, eine Lipase am Lipidkörper nachzuweisen. Nur in einer Fraktion die Glyoxysomen und Mitochondrien enthielt, fand man eine lipolytische Aktivität, die aber so gering war, dass sie nicht für die Mobilisierung der Speicherlipide verantwortlich sein sollte [Schwennesen, 1988].

Für Lipasen aus pflanzlichen Samen ist bekannt, dass sie eine hohe Selektivität für bestimmte Fettsäuren aufweisen können. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um die jeweils in den Speicherlipiden der Samen dominierende Fettsäure [Adlercreutz et al., 1997]. So wurde zum Beispiel in Samen einer Vernonie (*Vernonia galamensis*), deren Samenöl zu 80 % aus Vernolsäure (9,10-Epoxy-(12Z)-octadecadiensäure) besteht, eine Lipase nachgewiesen, die bevorzugt Trivernolin hydrolysiert, deren Metabolisierung von Triolein aber nur minimal ist [Ncube et al., 1995].

Aus den vorangegangenen Analysen der Gurkenkeimlinge ist ersichtlich geworden, dass die LOX-Produkte in den Triacylglyceriden im Verlauf der Keimung zunehmen. Es bestand die Vermutung, dass diese einer hochspezifischen Lipase als Substrat dienen und daher frühere Versuche eine Lipase-Aktivität am Lipidkörper der Gurkensamen nachzuweisen, möglicherweise aufgrund der Wahl eines falschen Substrates gescheitert waren.

Deshalb sollte erneut versucht werden, am Lipidkörper der Gurke eine Lipase-Aktivität nachzuweisen. Dazu wurden zunächst die Speicherlipide aus 4-d-alten Keimlingen extrahiert, die darin enthaltenen Lipidhydroperoxide durch die Zugabe von Triphenylphosphin zu den entsprechenden Lipidhydroxiden reduziert und nachfolgend die Peaks 1-5 über die RP-HPLC, wie unter 2.7.1.3 beschrieben, isoliert. Anschließend wurden die LOX-Produkte in 5 % (w/v)

gum arabicum durch Ultraschall-Behandlung emulgiert (2.10.1). Mit dem so hergestellten Substrat wurden Lipidkörper aus 4-d-alten Gurkenkeimlingen bei unterschiedlichem pH-Werten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die verschiedenen Ansätze auf einen pH-Wert von 3 angesäuert, die Lipide mit n-Hexan extrahiert und mit Hilfe der RP-HPLC auf freigesetzte Fettsäuren (2.7.2) analysiert. Auf diese Weise konnte unter alkalischen Bedingungen eine gegenüber den Kontrollen (Hitze-denaturierter Lipidkörper und Lipidkörper ohne externe Substratzugabe) erhöhte Freisetzung von (13S)-HODE nachgewiesen werden.

Daraufhin wurde ein Lipase-Test entwickelt, in dem eine Mischung der reduzierten Peaks 1-5 aus 4-d-alten Gurkenkeimlingen als Substrat Verwendung fand. In dem schließlich etablierten Test-System wurde die zu messende Probe mit dem Substrat bei einem pH-Wert von 8,5 für 5 min bei 40 °C inkubiert (2.10.1).

3.4 Zellfraktionierung der Gurkenkeimlinge

Um heraus zu finden, ob die am Lipidkörper gefundene Lipase-Aktivität auf dieses Organell beschränkt ist oder ob auch andere Kompartimente der Zelle eine hydrolytische Aktivität mit diesen Eigenschaften besitzen, wurde an 4-d-alten Gurkenkeimlingen eine Trennung der Zellkompartimente durch Ultrazentrifugation durchgeführt (2.4). Hierbei erfolgte eine Trennung des Zellhomogenates in eine Fraktion größerer Organellen (Mitochondrien und Glyoxysomen), einer mikrosomalen Fraktion, einer löslichen Fraktion sowie in eine Fraktion der Lipidkörper.

In allen vier Fraktionen konnte eine lipolytische Aktivität gefunden werden (Abb. 12), die jedoch unterschiedlich hoch ausfiel. Die Gesamtaktivität war in der Lipidkörperfraktion am höchsten, die in der löslichen Fraktion gemessene Aktivität war hingegen sehr gering. Sowohl in der mikrosomalen- als auch der Fraktion größerer Organellen (Mitochondrien und Glyoxysomen), ließ sich mit dem oxygeniertem Substrat eine hohe lipolytische Aktivität nachweisen. Bezog man die lipolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen auf die Proteinmenge (spezifische Aktivität), so besaß auch in diesem Fall der Lipidkörper eine gegenüber den anderen Fraktionen mindestens 2-fach höhere Aktivität (nicht gezeigt).

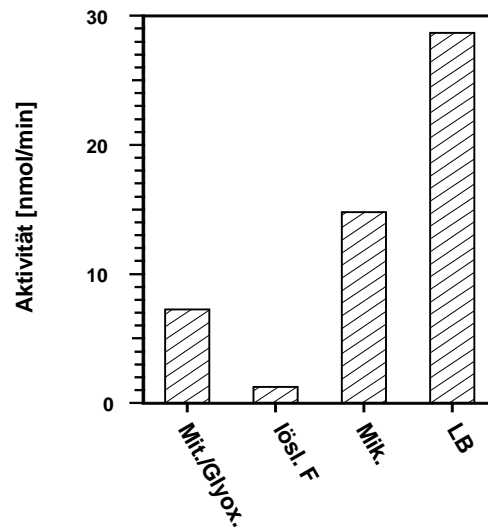


Abb. 12: Lipase-Aktivität in Subfraktionen 4-d-alter Gurkenkeimblätter. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Ultrazentrifugation wie unter 2.4 beschrieben in Mitochondrien und Glyoxysomen (Mit./Glyox.), Mikrosomen (Mik.), einer löslichen Fraktion (lösl. F) sowie der Lipidkörper (Lb) getrennt und auf Lipase-Aktivität getestet (2.10.1). Hierbei wurde nur die Freisetzung von (13S)-HODE berücksichtigt.

3.5 Keimungskinetik der Lipase

Aus dem Subfraktionierungsexperiment lies sich erkennen, dass der größte Teil der gemessenen Lipase-Aktivität der keimenden Gurkensamen in den Lipidkörpern zu finden ist. Um die Lipase zu reinigen und zu charakterisieren sollte das Enzym von der Lipidkörpermembran abgelöst und ein Aktivitätsprofil über den Keimungsverlauf bestimmt werden. Dazu wurden Lipidkörper aus unterschiedlich lange angekeimten Gurkensamen isoliert und die Proteine der Lipidkörpermembran mit Hilfe des Detergenz Octylglucosid in einer Konzentration von 25 mM (in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8,5), wie unter 2.12.1 beschrieben, solubilisiert. Anschließend wurde die Lipase-Aktivität in den Solubilisaten gemessen und gegen den Keimungsverlauf grafisch dargestellt.

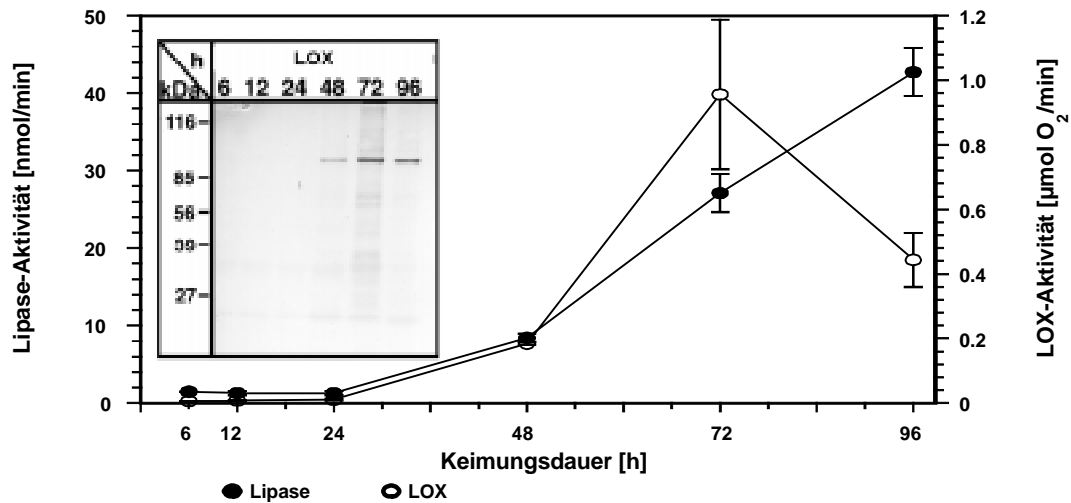


Abb. 13: Keimungsverlauf der Lipase-Aktivität in der Gurke. Gleiche Mengen Keimblätter der Zeitpunkte 6h/12h/24h/48h/72h/96h wurden aufgearbeitet, die Lipidkörper isoliert und die Proteine, wie unter 2.12.1 beschrieben, solubilisiert, um anschließend die Lipase-Aktivität in den Solubilisaten zu messen. Die LOX-Aktivität wurde an intakten Lipidkörpern polarographisch bestimmt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert von fünf Messungen einer Aufarbeitung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (s_{n-1}) an. Fenster: Western-Blot Analyse des LOX-Proteins über den Verlauf der Keimung: Identische Mengen an Keimblättern der verschiedenen Zeitpunkte wurden aufgearbeitet, die Lipidkörper isoliert, entfettet und in gleiche Volumina SDS-Probenpuffer aufgenommen (2.14). Anschließend wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Daraufhin erfolgte eine Immundetektion mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen die Lipidkörper-LOX aus der Gurke gerichtet war (2.15).

Aus der Abb. 13 wird deutlich, dass bis zum Zeitpunkt von 24 h keine nennenswerte Lipase-Aktivität zu messen war, dann aber eine Zunahme bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stattfand.

Zusätzlich wurde während der Keimung die LOX-Aktivität an isolierten Lipidkörpern bestimmt und eine Immundetektion auf LOX durchgeführt. Im Falle der LOX war nach 24 h ein Anstieg der Aktivität festzustellen, der nach 72 h ein Maximum erreichte und dann abfiel. Die während der Keimung gemessene Aktivität der LOX korrelierte mit ihrer Proteinmenge (Fenster in Abb. 13). Das Enzym ließ sich im Western-Blot erst nach 48 h detektieren, erreichte eine maximale Proteinmenge nach 72 h die sich bis zum Zeitpunkt von 96 h wieder verringerte.

Bezogen man die Aktivität beider Enzyme auf die Proteinmenge, so unterschied sich der Verlauf beider enzymatischer Aktivitäten nicht wesentlich von dem obigen. Dies war darauf

zurückzuführen, dass die Proteinmenge am Lipidkörper über den untersuchten Zeitraum annähernd konstant blieb.

Es wurde deutlich, dass die Aktivitäten beider Enzyme unterschiedliche Zeitverläufe besaßen: Eine Zunahme in der Lipase-Aktivität erfolgte erst nach dem Aktivitätsanstieg der LOX und erreichte ihren, über den Beobachtungszeitraum, maximalen Wert zu einem Zeitpunkt, bei dem die Aktivität der LOX ihr Maximum längst überschritten hatte und absank. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die *in vivo* Aktivität der Lipase von der Anwesenheit der LOX-Produkte abhängen könnte.

3.6 Reinigung der Lipidkörper-assoziierten Lipase

3.6.1 Solubilisierung mit Kochsalz

Die Reinigung war mit erheblichen Problemen verbunden. In ersten Versuchen, bei denen das Octylglucosid-Solubilisat mit chromatographischen Methoden aufgetrennt werden sollte, zeigte sich, dass die Trennmatrix durch Protein-Detergenz-Fett Aggregate sehr schnell verstopfte und dies auch nicht durch höhere Detergenz-Konzentrationen oder die Wahl eines anderen Detergenz verhindert werden konnte. Der Versuch, durch eine intensivere Entfettung der Probe mit Diethylether das Problem zu lösen, führte zu einem fast vollständigen Verlust der Lipase-Aktivität. Um dennoch eine chromatographische Trennung der Lipidkörper-Proteine zu ermöglichen, wurden diese alternativ mit einer 1 M NaCl-Lösung (in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8,5) vom Lipidkörper abgelöst (2.12.2). Auf diese Weise ließ sich ca. 50 % der Lipase-Aktivität solubilisieren (Abb. 14), was zudem zu einer 10-fachen Anreicherung der Lipase führte. Nach Entsalzung an Sephadex G-25 (PD-10 Säulen, Pharmacia) wurden die Proteine auf eine Anionenaustauschersäule geladen.

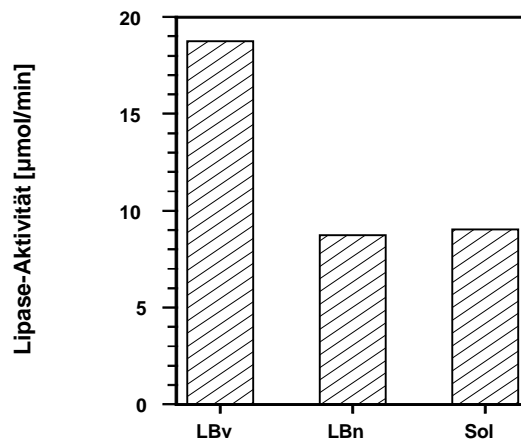


Abb. 14: Lipase-Aktivität in den Fraktionen nach Solubilisierung der Lipidkörperproteine mit 1 M NaCl. Die Lipidkörper wurden isoliert, in 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,5), der 1 M NaCl enthielt, homogenisiert und für 12 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung von Lipidkörpern und solubilisiertem Protein durch Ultrazentrifugation (2.12.2). LBv/LBn: Lipidkörper vor/nach der Solubilisierung, Sol: Solubilisat.

3.6.2 Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF

Bei der angewandten Methode handelte es sich um eine Anionenaustauschchromatographie (IAC). Hierbei binden die im alkalischen Milieu des Solubilisates negativ geladenen Proteine an die positiv geladene Säulenmatrix. Um sicher zugehen, dass restliche NaCl-Ionen eine Bindung der Proteine nicht beeinträchtigen, erfolgte vor der Applikation eine 3-fache Verdünnung des PD-10 Eluates mit salzfreiem 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0). Mit dem so verdünnten Solubilisat wurde die Säule beladen, um anschließend die gebundenen Proteine durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten wieder zu eluieren.

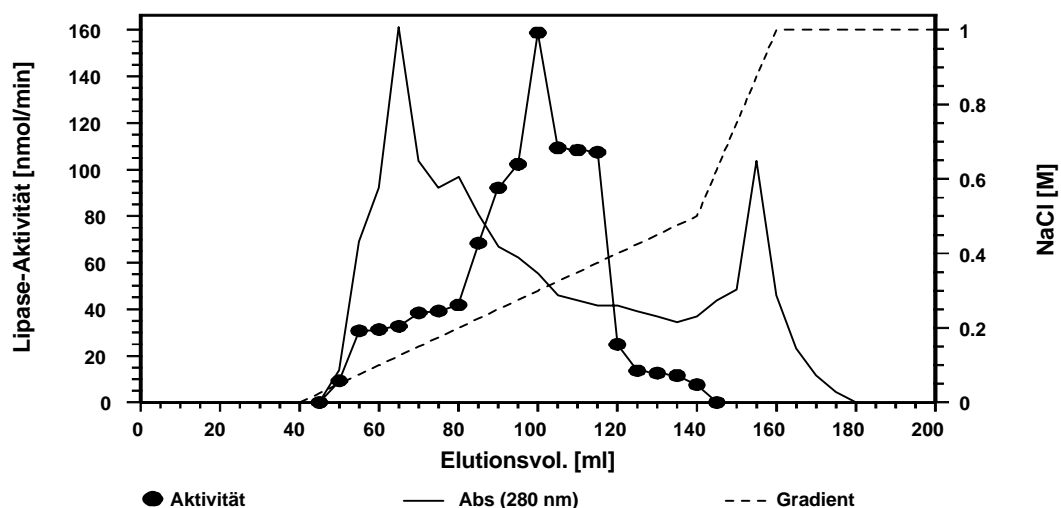


Abb. 15: Elutionsprofil der IAC an Q-Sepharose FF. Säulenvol.: 20 ml; Puffer A: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT; Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl. Flussrate: 0,8 ml/min; Fraktionsvol.: 5 ml.

Das Elutionsprofil der Lipase-Aktivität erstreckte sich über einen weiten Bereich (Abb. 15). Schon zu Beginn des Gradienten ließ sich die Aktivität im Säuleneluat nachweisen und erreichte zwischen 200- und 400 mM NaCl ein Maximum. Noch bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM konnte restliche Lipase-Aktivität von der Säule eluiert werden. Das Eluat zwischen 80 ml und 115 ml wurde vereinigt und als Ausgangsmaterial für weitere Chromatographien verwendet. Dieser Reinigungsschritt führte unter großen Verlusten an Lipase-Aktivität nur zu einer geringen Anreicherung des Enzyms (ca. 1,5-fach). Durch diese Chromatographie kam es wahrscheinlich zu einer Abtrennung von Lipase-gebundenen Lipidmolekülen was zur Instabilität des Enzyms führte. Die Chromatographie war dennoch unumgänglich, um in den folgenden Trennschritten hochauflösende Fertigsäulen verwenden zu können.

3.6.3 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Um das relativ große Volumen der verdünnten und damit instabilen Proteinlösung zu konzentrieren, wurde eine zweite Anionenaustauschchromatographie an einer Mono Q Säule durchgeführt (Abb. 16). Die vereinigten Fraktionen der IAC an Q-Sepharose FF wurden mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) 3-fach verdünnt und die Säule mit dieser Lösung beladen.

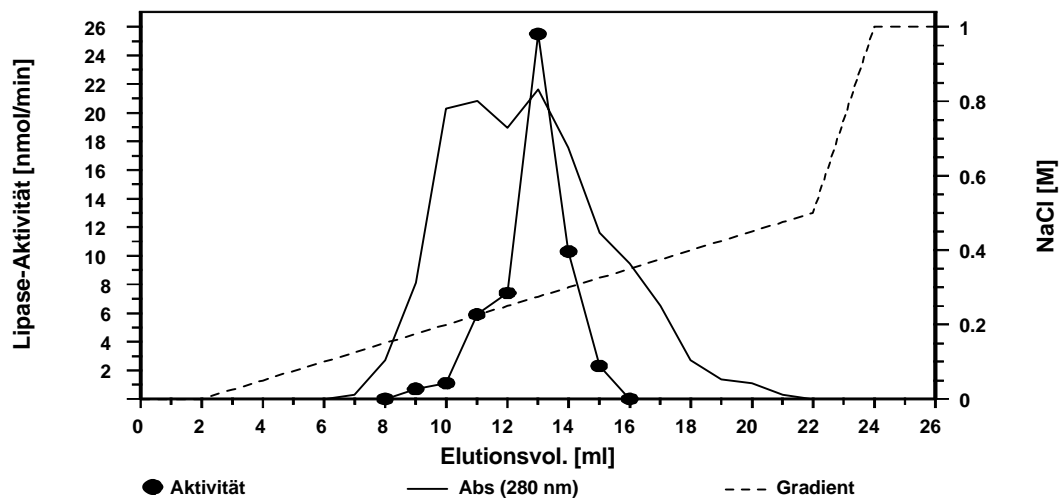


Abb. 16: Elutionsprofil der IAC an Mono Q. Säulenvol.: 1 ml; Puffer A: 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT; Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl; Flussrate: 0,3 ml/min; Fraktionsvol.: 1 ml.

Die Trennung der Proteine erfolgte wie bei der vorhergehenden Chromatographie mit einem ansteigendem NaCl-Gradienten, wobei die Lipase-Aktivität mit einem scharfen Peak bei einer NaCl-Konzentration von ca. 250 mM eluierte. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 12 ml bis 14 ml wurden vereinigt und als Ausgangsmaterial für eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) verwendet. Das Gesamtvolumen der angereicherten Fraktion konnte so auf 3 ml verringert werden, jedoch führte diese Chromatographie durch denaturierende Effekte zu einer Abreicherung in der Lipase-Aktivität. So betrug die spezifische Aktivität in den vereinigten Fraktionen nur noch ca. 30 % gegenüber den aktiven Fraktionen der IAC an Q-Sepharose FF.

3.6.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) werden die Proteine nach dem Grad ihrer Hydrophobizität getrennt. Die Matrices der entsprechenden Säulen sind entweder mit Phenylresten (Phenyl-Superose) oder Octylresten derivatisiert. Bei der Chromatographie an Phenylresten werden die Proteine zusätzlich zu den hydrophoben Interaktionen durch π - π -Wechselwirkungen gebunden. Die Proteinprobe wird bei hoher Ionenstärke, meist 1-2 M Ammoniumsulfat (AS) auf die Matrix geladen. Dieser Aussalzeffekt erhöht die Affinität der Proteine für das hydrophobe Säulenmaterial. Anschließend werden die Proteine mit einem abnehmenden Salzgradienten wieder eluiert.

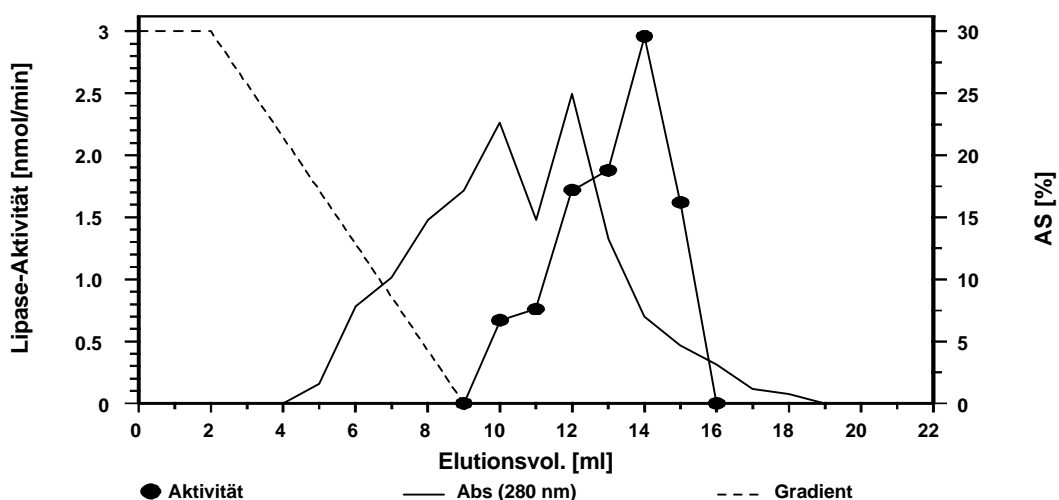


Abb. 17: Elutionsprofil der HIC an Phenyl-Superose. Säulenvol.: 1 ml; Puffer A: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT, 30 % AS-Sättigung; Puffer B: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT; Flussrate: Applikation der Probe: 0,1 ml/min; Gradient: 0,4 ml/min; Fraktionsvol.: 1 ml.

Das Eluat der Mono Q-Säule wurde auf 30 % AS-Sättigung eingestellt und mit niedriger Flussrate auf die Säule geladen. Bei der Elution der Proteine mit einer abnehmenden AS-Konzentration konnte Lipase-Aktivität erst nach dem Gradienten in AS-freiem Puffer nachgewiesen werden (Abb. 17). Diese Art der Chromatographie erwies sich für die Lipase als sehr schonend und führte in den Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 12 ml bis 15 ml zu einer ca. 2,5-fachen Anreicherung der Aktivität gegenüber der Mono Q Fraktion.

3.6.5 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration oder auch Größenausschlusschromatographie (SEC) werden die Proteine unter nativen Bedingungen nach ihrer relativen Größe getrennt. Wegen der Diffusion der Probe ist die Effizienz einer SEC umso höher, je kleiner das Volumen der Probe beträgt. Aus diesem Grund erfolgte vor der SEC eine Fällung der aktiven HIC-Fractionen bei einer 80 % AS-Sättigung. Das Proteinpräzipitat wurde sedimentiert, in 50 µl Gelfiltrationspuffer (2.13.4) aufgenommen und auf die Säule appliziert. Um eine Aggregation der Proteine während der Chromatographie zu vermeiden, wurde dem Puffer neben 150 mM NaCl auch das Detergenz Chaps (CMC: 6,5 mM) in einer Konzentration von 12,5 mM zugesetzt.

In Abbildung 18 ist das Elutionsprofil der Lipase auf der SEC dargestellt. Die UV-Linie zeigt nur einen Peak über ein weiten Molekulargewichtsbereich bei einem Elutionsvolumen von 4,5 ml bis 7,5 ml. Lipase-Aktivität konnte fast über den gesamten Peak gemessen werden, wobei das Aktivitätsmaximum mit der Hauptmenge an Protein korrelierte. Die Fraktionen mit dem Elutionsvolumen von 5,75-6,25 ml wurden vereint und in der SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht.

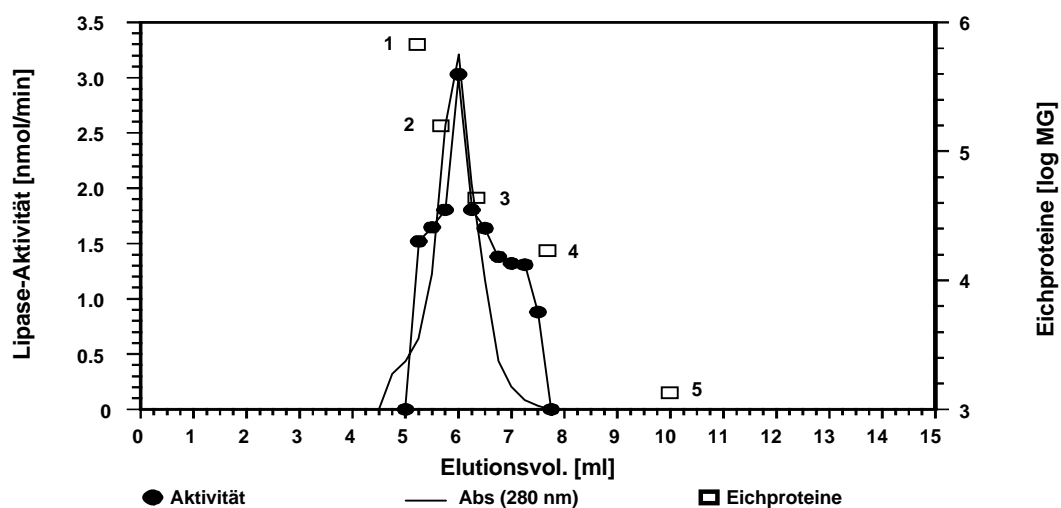


Abb. 18: Elutionsprofil der SEC an Bio-Select 125-5. Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 150 mM NaCl, 1,5 mM NaN₃, 12,5 mM Chaps; Flussrate: 0,5 ml/min; Fraktionsvol.: 250 µl. In einem separaten Lauf wurde die Gelfiltrationssäule mit folgenden Eichproteinen kalibriert: (1) Thyroglobulin 670 kDa; (2) IgG 158 kDa; (3) Ovalbumin 44 kDa; (4) Myoglobin 17 kDa; (5) Vitamin B₁₂ 1,35 kDa.

Die Gelfiltration erwies sich von den bisher durchgeführten Methoden als das schonendste Trennverfahren. So konnten denaturierende Effekte der vorhergehenden Chromatographien kompensiert werden, was zu einer höheren Gesamtaktivität der Lipase gegenüber der HIC führte. Da die Proteinkonzentration in den aktiven Fraktionen durch gängige Proteinbestimmungen nicht mehr quantifizierbar war, erfolgte eine Abschätzung im Gel. Diese ergab eine Gesamtproteinmenge von weniger als 10 µg. Die spezifische Lipase-Aktivität konnte durch diese Chromatographie demnach noch mal um einen beträchtlichen Faktor angereichert werden.

3.6.6 Reinigungstabelle und SDS-PAGE der Reinigungsschritte

Insgesamt konnte durch die aufeinander folgenden Reinigungsschritte eine etwa 400-fache Anreicherung der Lipase-Aktivität mit einer Ausbeute von 0,23 % erreicht werden. Essentiell um die Stabilität der Lipase über die gesamte Reinigungsprozedur erhalten zu können, war der Zusatz von 10 % Glycerin zu den Chromatographiepuffern. Andere Reinigungsverfahren wie Kationenaustauschchromatographie oder eine Trennung an Hydroxyapatit schlugen fehl, da ein irreversibler Verlust der Lipase-Aktivität im sauren pH-Bereich und bei hohen Phosphatkonzentrationen beobachtet wurde. Durch die beiden angewendeten IACs kam es ebenfalls zu großen Aktivitätsverlusten, hingegen erwiesen sich die HIC und die SEC als sehr schonend.

Tab. 4: Reinigungstabelle der Lipase.

Reinigungs Schritt	Protein [mg]	Aktivität [nmol/min]	Spez.-Aktivität [nmol/min mg]	Ausbeute [%]	Faktor
Lipidkörper	1727	11851	6,86	100	1
Solubilisat	85,6	6127	71,58	51,7	10,4
IAC (1)	4,9	501,32	102,31	4,23	14,9
IAC (2)	1,44	43,20	30,00	0,36	4,4
HIC	0,81	6,45	79,65	0,05	11,6
SEC	≈ 0,01	27,48	2748	0,23	400,6

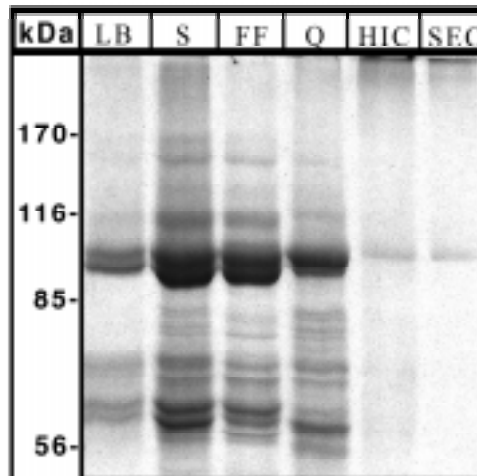


Abb. 19: 8 % SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte. Mit Ausnahme der SEC (Fraktion von 5,75-6,25 ml) und der HIC wurde jede Spur mit 20 µg Protein beladen. Nach der Elektrophorese erfolgte eine Anfärbung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie G-250.

Die während der Lipase Reinigung gewonnenen Proteinfractionen wurden anschließend mittels einer SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht (Abb. 19). Dazu wurden je 20 µg Protein der einzelnen Eluate, mit Ausnahme der SEC und der HIC, aufgetragen. Bei der visuellen Auswertung des Gels wurde deutlich, dass bis einschließlich zur IAC an Mono Q die angereicherte Lipase-Aktivität keiner Bande im Gel zugeordnet werden konnte. Nach der HIC an Phenyl-Superose dominierte nur noch eine Bande im Gel mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa, die in der anschließendenn SEC noch weiter angereichert wurde.

3.7 Bewertung der Reinigung

Das Molekulargewicht der angereicherten Proteinbande war mit 110 kDa für pflanzliche Lipasen ungewöhnlich groß und entsprach eher dem Molekulargewicht der an dem Lipidkörper gebundenen LOX (100 kDa). Deshalb bestand die Vermutung, dass die Reinigung zu einer Anreicherung dieser LOX geführt hatte. Für die angereicherte Lipase-Aktivität würden dann mehrere Möglichkeiten in Frage kommen: (1) Die gesuchte Lipase hat ein der LOX ähnliches Molekulargewicht, so dass die beiden Proteine in der eindimensionalen SDS-PAGE nicht getrennt werden konnten. (2) Bei der Lipase handelt es sich um ein Protein, dass aufgrund seiner geringen Menge in der Coomassie-Färbung des Gels

nicht zu sehen war. (3) Die Lipidkörper-assozierte LOX besitzt eine duale Funktion; sie katalysiert gleichzeitig die Oxidation der veresterten Fettsäuren als auch ihre lipolytische Abspaltung aus den Triacylglyceriden, so dass die Anreicherung der Lipase-Aktivität zu einer Konzentrierung der LOX führen musste. Um die verschiedenen Möglichkeiten zu überprüfen, wurden die nachfolgend beschriebenen Experimente durchgeführt:

3.7.1 Messung der LOX-Aktivität in den Lipase-aktiven Fraktionen

Es wurde zunächst in einer separaten Reinigung, nach dem in Tab. 4 dargestellten Schema, die LOX-Aktivität in den Lipase-aktiven Fraktionen bestimmt. Es sollte analysiert werden ob es zu einer dualen Anreicherung beider Enzymaktivitäten in der angewandten Reinigungsprozedur gekommen war.

Tab. 5: Vergleichende Darstellung von LOX- und Lipase-Aktivität in den angereicherten Fraktionen einer Lipase Reinigung. Die LOX-Aktivität des Lipidkörpers und des Solubilisates wurde polarographisch (nmol O₂-Verbrauch) und die Aktivität in den Fraktionen der Säulenchromatographien photometrisch (nmol HODE-Bildung), wie unter 2.10.2 beschrieben, bestimmt.

Reinigungs Schritt	Spez.-Aktivität LOX [nmol/ min mg]	Faktor LOX	Spez.-Aktivität Lipase [nmol/ min mg]	Faktor Lipase
Lipidkörper	241	1	6,52	1
Solubilisat	1100	4,6	65,85	10,1
IAC (1)	890	3,7	158,30	24,3
IAC (2)	385,2	1,6	37,05	5,7
HIC	428,4	1,8	157,14	24,1

Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich, dass es zwar in den ersten Schritten zu einer Anreicherung der LOX-Aktivität kam, die beiden Enzymaktivitäten während der Reinigung aber unterschiedliche Tendenzen zeigten: So führte die Solubilisierung der Proteine bei der Lipase zu einem Reinigungsfaktor von 10,1, während dieser bei der LOX nur 4,6 betrug. In der anschließenden Chromatographie (IAC 1) kam es zu einer Anreicherung der Lipase, gleichzeitig führte dieser Schritt aber zu einer Abreicherung der LOX. Die zweite Chromatographie (IAC 2) wirkte sich auf beide Enzymaktivitäten denaturierend aus. Die Verluste waren aber unterschiedlich hoch, so ging die Lipase-Aktivität zu ca. 80 % verloren, die LOX-Aktivität hingegen nur zu 45 %. Die HIC führte wieder zu einer beträchtlichen Anreicherung der Lipase-Aktivität, während die spezifische Aktivität der LOX annähernd konstant blieb. In den Fraktionen der SEC (nicht gezeigt) konnte eine LOX-Aktivität nur noch durch die UV-Detektion des Reaktionsproduktes über die HPLC nachgewiesen werden. Hier

wurde eine gleichmäßige Verteilung der LOX-Aktivität über das Ausschlussvolumen der Säule als auch in den Fraktionen mit Lipase-Aktivität festgestellt.

In dem angewandten Reinigungsschema kam es demnach nicht zu einer Anreicherung der LOX, jedoch waren alle Lipase-aktiven Fraktionen mit einer geringen LOX-Aktivität kontaminiert.

3.7.2 Vergleich der Lipase-Aktivität mit der Intensität der Bande im Gel

Um festzustellen, ob die Intensität der 110 kDa Bande im Gel mit der in den jeweiligen Fraktionen gemessenen Lipase-Aktivität korrelierte, wurden in einem weiteren Experiment gleiche Volumina der Lipase-aktiven Fraktionen nach der IAC an Mono Q im Tricin-SDS-Gel aufgetrennt.

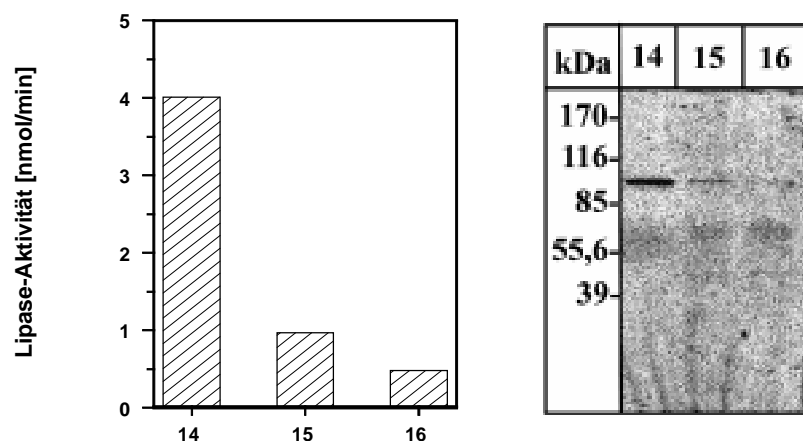


Abb. 20: Lipase-Aktivitätsprofil und Tricin-SDS-PAGE der Mono Q Fraktionen 14-16. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Lipase-Aktivität der einzelnen Fraktionen. In der Tricin-SDS-PAGE wurden gleich Volumina der Fraktionen getrennt und die Proteine mit dem Farbstoff Coomassie G-250 gefärbt.

Die aktiven Fraktionen stammten aus einer separaten Reinigung, in der sich das Elutionsprofil der Lipase-Aktivität gering von der in Abb. 16 unterschied. In Abb. 20 sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen der Mono Q mit der in den Fraktionen gemessenen enzymatischen Aktivität der Lipase vergleichend dargestellt.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass die abnehmende Intensität der 110 kDa Bande über die Fraktionen 14 bis 16 mit einer in diesen Fraktionen gemessenen sinkenden Lipase-Aktivität korreliert. Andere Fraktionen dieser Chromatographie wiesen keine Lipase-Aktivität auf.

3.7.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese der HIC Fraktion

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) werden in der ersten Dimension die Proteine in einem isoelektrischen Fokussierungsgel nach ihren isoelektrischen Punkten (pIs) getrennt. In der zweiten Dimension erfolgt dann eine Separierung nach dem Molekulargewicht durch eine SDS-PAGE. Um ein Präzipitieren der Proteine in der ersten Dimension zu vermeiden, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen, in Gegenwart von 6 M Harnstoff durchgeführt. Der zu trennende pH-Bereich erstreckte sich von 3 bis 10. Die anschließende SDS-PAGE erfolgte in einem 8 % Gel (2.14.3).

Da nach einer zweidimensionalen Auftrennung der Lipase-aktiven Fraktionen der SEC, wahrscheinlich aufgrund zu großer Verluste während der Proteinkonzentrierung vor der Elektrophorese, kein Protein im Gel zu detektieren war, wurde auf die Fraktion nach der HIC zurückgegriffen. Die Silberfärbung des Gels (Abb. 21) machte zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 110- und 66 kDa sichtbar, die beide bei einem pH-Wert von ca. 4,8 fokussierten. Bei den Proteinspots die im pH-Bereich von 4,22 handelte es sich um Protein, dass trotz der Verwendung von Harnstoff am Startpunkt des IEF-Gels präzipitierte und nur durch SDS-PAGE getrennt wurde.

Durch die empfindliche Silberfärbung wurde deutlich, dass noch mindestens ein weiteres Protein mit einem geringeren Molekulargewicht in der Lipase-aktiven Fraktion nach der HIC vorhanden war, das in der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE (Abb. 19) nicht sichtbar gemacht werden konnte.

Eine Silberfärbung, der eindimensional in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine der aktiven Fraktionen der SEC, detektierte ebenfalls in dem Molekulargewichtsbereich von 66 kDa ein Protein. Da durch diese Chromatographie aber ein Trennung des 110 kDa-Proteins von dem

66 kDa Protein hätte stattfinden müssen, konnte es sich hierbei auch um ein Abbauprodukt der 110 kDa Bande oder um eine Artefaktbande gehandelt haben [Rehm, 1997].

Die Lipidkörper-LOX, deren Aktivität als Kontamination in dieser Fraktion nachgewiesen wurde (s.o.), konnte in diesem Gel nicht entdeckt werden. Für dieses Enzym wurde in einem isoelektrischen Fokussierungsgel ein pI von 5,6 bestimmt [Feussner, 1993].

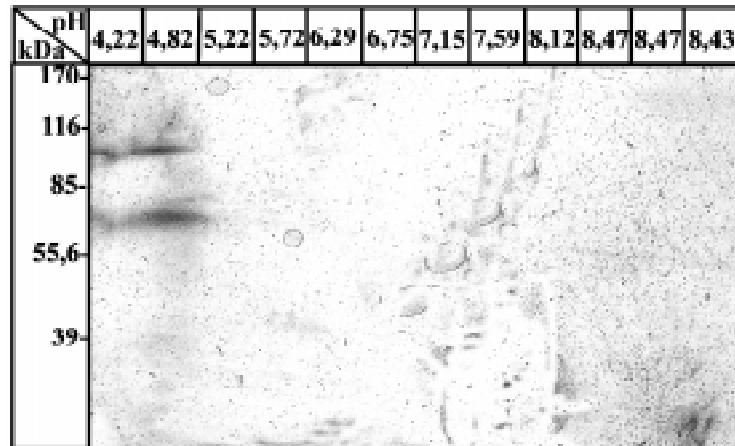


Abb. 21: Analyse der Lipase-aktiven HIC-Fraktion durch 2D-PAGE. In der ersten Dimension wurde eine denaturierende IEF im pH-Bereich von 3-10 und in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE in einem 8 % Gel durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Silberfärbung.

3.7.4 Test der rekombinanten LOX auf Lipase-Aktivität

Die Lipidkörper-assoziierte LOX aus der Gurke lag als rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes, gereinigtes Protein vor [Feussner et al., 1998b]. Dieses Enzym wurde in unterschiedlicher Konzentration, unter den in 2.10.1 beschriebenen Bedingungen, auf eine lipolytische Aktivität getestet. Trotz einer hohen LOX-Aktivität des rekombinanten Proteins konnte keine Freisetzung von Fettsäuren aus dem Triacylglyceridsubstrat festgestellt werden, so dass sich eine duale enzymatische Aktivität der LOX ausschließen ließ.

3.8 Charakterisierung der Lipidkörper-assoziierten Lipase

3.8.1 Natives Molekulargewicht

Das native Molekulargewicht der Lipase wurde mittels Gelfiltration nach Kalibrierung der Säule mit Standardproteinen ermittelt. Als Standardproteine dienten Immunglobulin G, Rinderserumalbumin, Ovalbumin und Myoglobin. Die Lipase eluierte unter den gewählten Chromatographiebedingungen kurz vor dem Rinderserumalbumin. Nach Berechnung und Vergleich der K_{av} -Werte von Lipase und den Standardproteinen ergab sich für die Lipase ein natives Molekulargewicht von 93 kDa (Abb. 22).

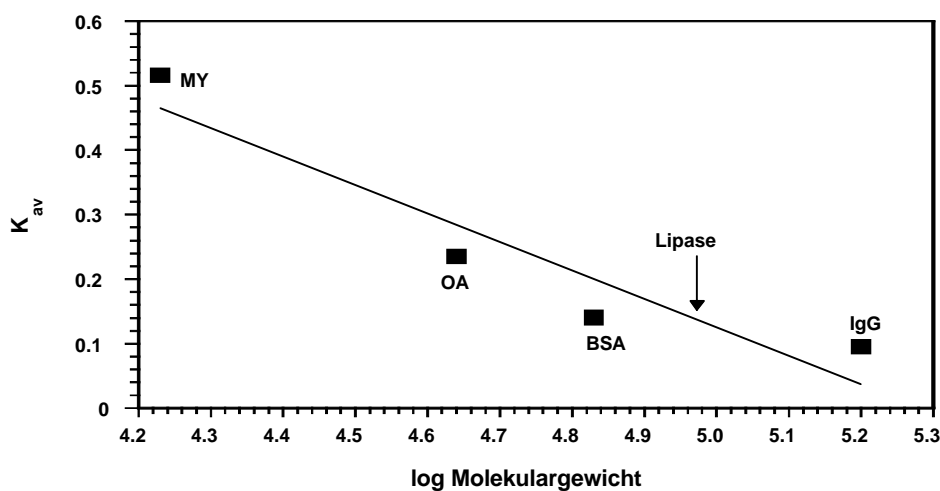


Abb. 22: Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Lipase. Zur Eichung der Säule wurde eine Mischung aus Myoglobin ((MY) 17 kDa, Ovalbumin (OA) 44 kDa, Rinderserumalbumin (BSA) 67 kDa und Immunglobulin G (IgG) 158 kDa verwendet. Der Pfeil markiert die Position der Lipase auf der Eichgeraden.

3.8.2 pH-Optimum

Um das pH-Optimum zu ermitteln, wurde die Lipase-Aktivität des Solubilisates bei verschiedenen pH-Werten und einer Inkubationstemperatur von 25 °C bestimmt (Abb. 23). Hierbei ließ sich im sauren pH-Bereich nur eine sehr geringe Aktivität feststellen. Mit zunehmender Alkalisierung des Mediums erfolgte dann ein starker Anstieg der Lipase-Aktivität, dessen Maximum am Ende des überprüften Bereichs bei einem pH-Wert von 8,5 gemessen wurde.

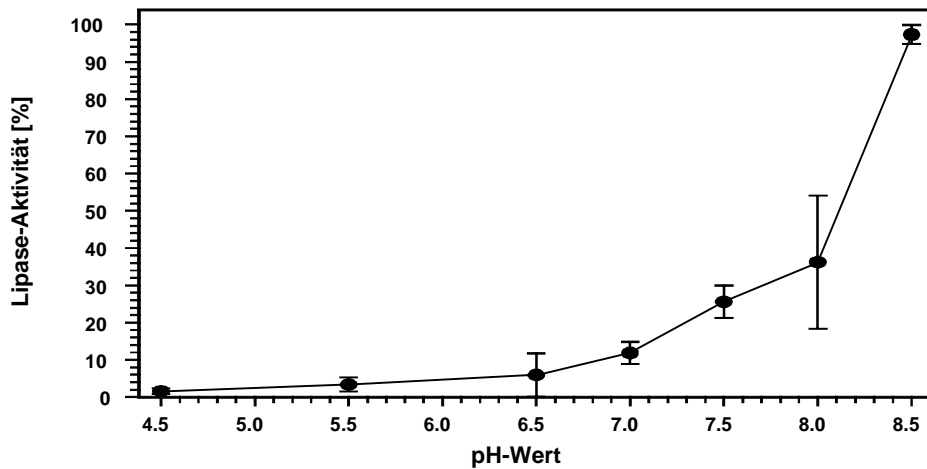


Abb. 23: pH-Optimum der Lipase. Puffer: pH 4,5-5,5: 0,1 M Na-Acetat, 2 mM DTT; pH 6,5: 0,1 M Imidazol-HCl, 2 mM DTT; pH 7,5-8,5: 0,1 M Tris-HCl, 2 mM DTT. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert von fünf verschiedenen Messungen einer Aufarbeitung; Fehlerbalken geben die Standardabweichung (s_{n-1}) an.

3.8.3 Temperatur-Optimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Lipase-Aktivität des Solubilisates über den Bereich von 0 °C bis 100 °C bestimmt. Das Temperaturprofil (Abb. 24) zeigt, dass die Lipase ihre maximale Aktivität zwischen 30- und 60 °C entwickelte und ein Optimum bei 40 °C aufwies. Noch bei Temperaturen bis zu 80 °C, die im Normalfall zur Denaturierung von Proteinen führen, ließ sich die hydrolytische Aktivität dieses Enzyms nachweisen.

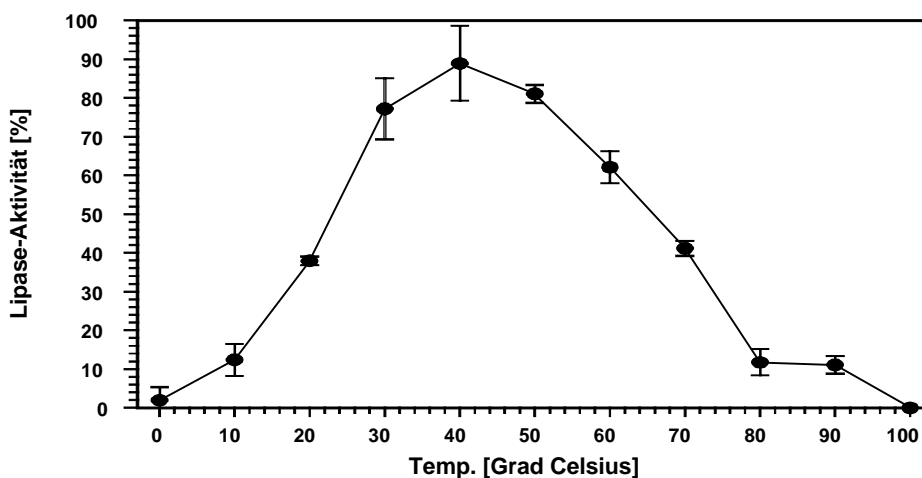


Abb. 24: Temperaturprofil der Lipase-Aktivität. Test-Puffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 5 mM CaCl_2 . Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert von fünf verschiedenen Messungen einer Aufarbeitung; Fehlerbalken geben die Standardabweichung (s_{n-1}) an.

3.8.4 Isoelektrischer Punkt

Die Ermittlung des isoelektrischen Punktes (pI) der Lipase erfolgte anhand des Elutionsverhaltens an einer Chromatofokussierungssäule (CF). Bei dieser Methode werden zunächst die Proteine in einem Startpuffer an eine Ionenaustauschersäule gebunden. Bei der anschließenden Eluierung mit dem Elutionspuffer bildet sich ein pH-Gradient aus, der die Proteine in der Reihenfolge ihrer isoelektrischen Punkte wieder von der Säule ablöst.

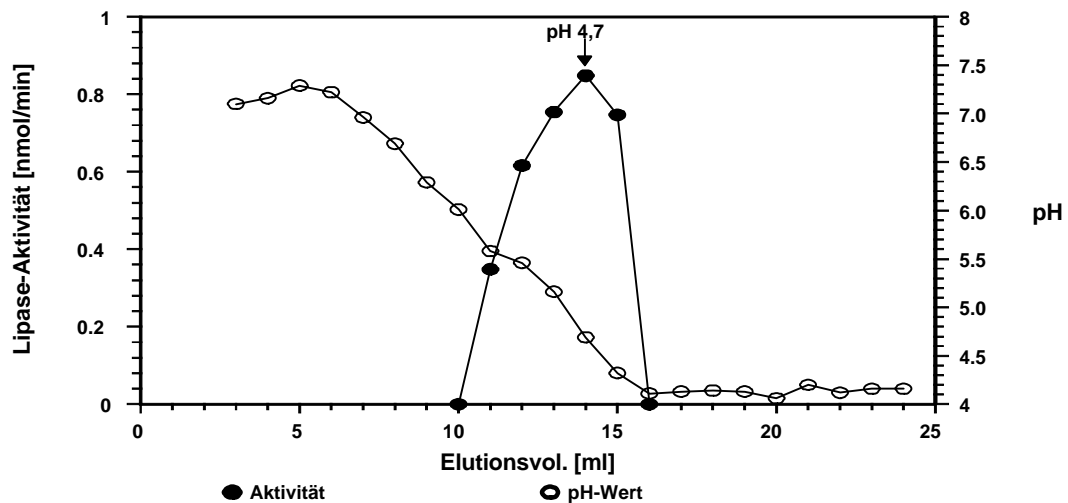


Abb. 25: Elutionsprofil der CF an Mono P. Säulenvol: 1ml; Startpuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,2 mM DTT; Elutionspuffer: Polybuffer 74 (Pharmacia) 10-fach verdünnt; Flussrate: 0,5 ml/min; Fraktionsvol.: 1 ml; pH-Gradient: 4,0-7,0.

Für die Chromatofokussierung (Abb. 25) wurde die Lipase-Fraktion der HIC auf eine Mono P Säule (Pharmacia) geladen und mittels eines pH-Gradienten von pH 4,0 bis 7,0 aufgetrennt. Hierbei eluierte die Lipase über einen weiten Bereich von pH 4,3 bis 5,6 mit einem Aktivitätsmaximum bei pH 4,7.

3.8.5 Inhibitoren und Stimulatoren

Alle Inhibierungs- und Stimulierungs-Experimente wurden mit der Lipase-aktiven Fraktion nach der IAC an Mono Q durchgeführt.

PMSF

Das aktive Zentrum von allen bisher in ihrer Struktur aufgeklärten Lipasen, darunter befinden sich jedoch keine pflanzlichen Lipasen, besitzt große Ähnlichkeit mit dem von Serin-Proteasen [Schrag und Cycgler, 1997]. Diese Lipasen können durch eine Reihe von Cystein- und Serinmodifizierenden Reagenzien inhibiert werden [Ransac et al., 1997]. Es wurde bisher aber keine Inhibierung durch PMSF beschrieben.

In Inhibierungsexperimenten sollte gezeigt werden, ob der Serin-Protease-Inhibitor PMSF Einfluss auf die Lipase besitzt. Hierzu wurde eine Lipase-Fraktion mit verschiedenen Konzentrationen an PMSF inkubiert und anschließend auf Aktivität getestet. In diesen Versuchen konnte bis zu einer Konzentration von 1mM PMSF keine verringerte Aktivität festgestellt werden.

Trotz der Gemeinsamkeiten im katalytischen Zentrum von Lipasen und Serin-Proteasen, scheinen beide dennoch Unterschiede aufzuweisen, die verhindern, dass es zu einer Bindung des für Serin-Proteasen spezifischen Inhibitors PMSF an das aktive Zentrum der Lipasen kommt.

Calcium, EDTA, EGTA

Wurde die Lipase-Fraktion in Gegenwart von Calcium-Ionen (0,5 bis 10 mM CaCl_2) auf Aktivität getestet, so konnte eine geringe Stimulation festgestellt werden, die aber unabhängig von der Konzentration des Salzes war. Komplexbildner für zweiwertige Ionen wie EDTA und EGTA hingegen führten zu einer vollständigen Inhibierung der Lipase, die durch den Zusatz von CaCl_2 im Überschuss wieder aufgehoben werden konnte.

Detergentien

Mit verschiedenen Detergentien war es möglich die Lipase im nativen Zustand zu solubilisieren. Durch die Detergentien Octylglucosid und CHAPS in einer Konzentration von 25 mM bzw. 12,5 mM gelang es die Lipase-Aktivität am effektivsten in Lösung zu bringen und das Enzym zu stabilisieren. Bei diesen Versuchen fiel jedoch auf, dass eine Solubilisierung der Lipidkörperproteine mit Triton-X 100 mit einem vollständigen Verlust der Lipase-Aktivität einherging.

Eine Inkubation der Lipase-Fraktion nach der IAC an Mono Q mit dem Detergenz führte schon bei einer Konzentrationen von 0,1 % an Triton-X 100 zu einem völligen Verlust der enzymatischen Aktivität.

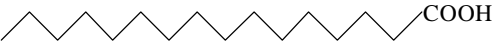
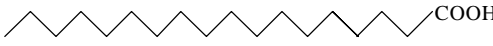
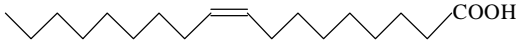
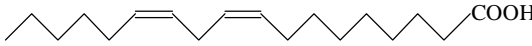
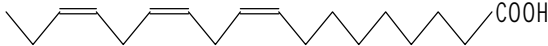
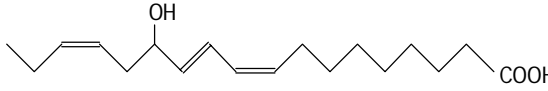
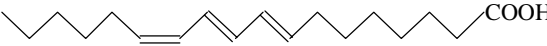
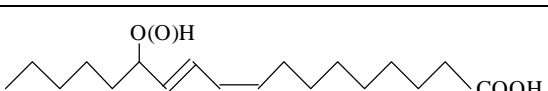
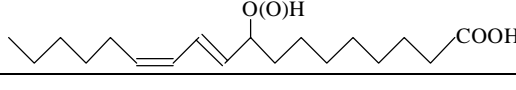
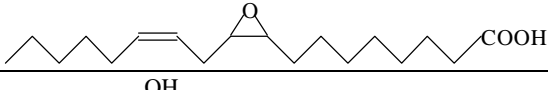
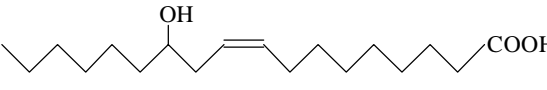
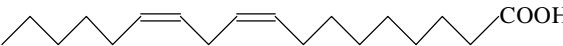
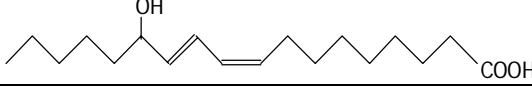
3.8.6 Substratspezifität

Um die Substratspezifität der Lipase zu ermitteln, wurde die aktive Fraktion nach der HIC mit verschiedenen potentiellen Substraten inkubiert und deren lipolytische Aktivität gemessen. Der Nachweis freigesetzter Fettsäuren erfolgte bei den Test-Ansätzen mit Tripalmitin, Tristearin, Triolein und Trilinolein gaschromatographisch, ansonsten wurden die Test-Ansätze mit der HPLC analysiert. Um sicherzustellen, dass ein negatives Ergebnis nicht auf einem fehlerhaften Test beruhte, wurden in Parallelansätzen (mit Ausnahme des PC) als positiv Kontrolle Inkubationen mit der Pankreas- sowie der Weizenkeimlipase durchgeführt.

In Tab. 6 sind die verschiedenen Substrate und die bei ihrer Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren dargestellt. Im Falle der Triacylglyceride aus dem Öl von Rizinus- und Ringelblumensamen wurden nur die für die Charakterisierung der Lipase-Aktivität relevanten Fettsäuren berücksichtigt. Die Präparation dieser Substrate erfolgte durch eine Isolation der Lipidkörper aus ungekeimten Samen mit anschließender Extraktion der Lipide nach einer Methode von Bligh und Dyer [1959]. Die verschiedenen Lipide wurden in 5 % gum arabicum (2.10.1) gelöst und mit den so hergestellten Substraten die aktive Fraktion nach der HIC auf Lipase-Aktivität getestet.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass Tripalmitin, Tristearin, Triolein, Trilinolein und Trilinolenin nicht von der Lipase als Substrat akzeptiert werden. Es konnte auch keine Freisetzung von Calendulasäure aus dem Ringelblumenöl beobachtet werden. Enthielt das Substrat aber ein LOX-Produkt, so wurde eine spezifische Freisetzung der oxygenierten Fettsäure beobachtet. So konnte zum Beispiel die selektive Abspaltung von (13*S*)-HOTE aus dem oxygenierten Trilinolenin nachgewiesen werden. Die Verwendung des Öls der Ringelblume, das in seiner nativen nicht reduzierten Form in die Lipase-Tests eingesetzt wurde zeigte, dass die spezifische lipolytische Aktivität unabhängig davon war, ob das Lipid als Hydroperoxid oder Hydroxid vorlag bzw. an welcher Position der veresterten Fettsäure sich das inserierte Sauerstoffatom befand. Als Reaktionsprodukte der Lipase ließen sich beide Positions-isomere der oxygenierten Linolsäure [(9*S*)-H(P)ODE und (13*S*)-H(P)ODE] sowohl in der Hydroperoxid- als auch der Hydroxidform auf der SP-HPLC detektieren (2.7.3). Darüber hinaus war die Spezifität der Lipase nicht auf LOX-Produkte beschränkt. So ließ sich auch die Freisetzung der Rizinolsäure (die eine Hydroxylgruppe am C-Atom 12 trägt) aus dem Rizinusöl sowie der Epoxyfettsäure, 9,10-EODE (9,10-Epoxy-(12*Z*)-octadecadiensäure) aus dem Samenöl der Ringelblume messen. Beide Fettsäuren stellen keine Produkte einer LOX-katalysierten Reaktion dar.

Tab. 6: Substratspezifität der Lipase. Dilinoleoyl-Phosphatidylcholin wurde mit der Soja LOX 1 wie unter 2.17.2 beschrieben oxidiert, so das ca. 50 % der Linolsäurereste als ihr LOX-Produkt vorlagen. 9,10-EODE: 9,10-Epoxy-(12Z)-octadecensäure.

Substrat	Potentielles Reaktionsprodukt	Hydrolyse
Tripalmitin	Palmitinsäure 	Nein
Tristearin	Stearinsäure 	Nein
Triolein	Ölsäure 	Nein
Trilinolein	Linolsäure 	Nein
Trilinolenin	Linolensäure 	Nein
Trilinolenin ox.	13-HOTE 	Ja
Ringelblumenöl (<i>Calendula officinalis</i>)	Calendulasäure 	Nein
	13-H(P)ODE 	Ja
	9-H(P)ODE 	Ja
	9,10-EODE 	Ja
Rizinusöl (<i>Ricinus communis</i>)	Rizinolsäure 	Ja
Dilinoleoyl- Phosphatidylcholin Teilweise oxygeniert	Linolsäure 	Nein
	13-HODE 	Nein

Wurden die in ihrer Struktur aufgeklärten LOX-Produkte aus den Triacylglyceriden 4-d-alter Gurkenkeimlinge (Peaks 1-5) in Form ihrer Hydroxyderivate, getrennt als Substrate in die Lipase-Tests eingesetzt, so wurde eine für alle Peaks (1-5) gleichermaßen hohe spezifische Freisetzung von 13-HODE nachgewiesen (nicht gezeigt).

Mit dem Phospholipid Dilinoleoyl-Phosphatidylcholin, das *in vitro* partiell durch die LOX-1 aus Sojasamen oxygeniert wurde (2.17.2), konnte weder die Freisetzung von Linolsäure noch von 13-HODE beobachtet werden.

Diese Analysen zeigten, dass die detektierte lipolytische Aktivität nicht durch eine Phospholipase hervorgerufen wurde, sondern dass es sich um die Aktivität einer Triacylglycerid-Lipase handelte, die spezifisch oxygenierte Fettsäuren aus den Triacylglyceriden abspaltet. Die Aktivität dieses Enzyms ist unabhängig davon, ob die veresterte Fettsäure ein Hydroxy- Hydroperoxy oder Epoxygruppe besitzt und an welcher Position diese Gruppe im Molekül lokalisiert ist.

3.9 Aminosäuresequenzanalyse

Nachdem Experimente die aus dem Gel ausgeschnittene 110 kDa Bande direkt anzusequenzieren wegen einer N-terminalen Blockierung zu keinem Ergebnis führten, wurde in vier aufeinander folgenden Schritten versucht, interne Peptidsequenzen des Proteins zu bekommen.

1.) Zuerst wurde die aus dem Gel ausgeschnittene Proteinbande tryptisch gespalten und die so erhaltenen Peptidfragmente über die HPLC aufgetrennt und sequenziert. Dabei zeigte sich, dass sich das Protein nur unzureichend verdauen ließ. Die über die HPLC isolierten Peptidfragmente erwiesen sich als zu klein, um mit ihrer Aminosäureabfolge in einer Datenbank nach Homologien zu suchen. Lediglich für ein Peptid mit einer Länge von 9 Aminosäuren konnte in der SwissProt Datenbank, bei einer geringen Signifikanz, eine Homologie zu einer Catechol 2,3-Dioxygenase aus *Alcaligenes eutrophus* gefunden werden (Tab. 7).

2.) In einem weiteren Versuch wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine der HIC Fraktion auf eine PVDF-Membran geblottet, die 110 kDa Bande ausgeschnitten und anschließend mit einem TFA-MeOH Gemisch (1:1) partiell hydrolysiert. Dies sollte den nachfolgenden tryptischen Verdau des Proteins erleichtern. Die chromatographische Trennung der Peptidfragmente und ihre Sequenzierung ergab nur ein Peptid mit ausreichender Länge, bei dem aber an vielen Positionen die Aminosäuren nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Verschiedene Vergleiche dieser Mischsequenz ergaben in der Datenbank keine Homologien.

Ergebnisse

Tab. 7: Peptidsequenzen. Gel 110 kDa: Trypsin-Verdau der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbande. PVDF 110 kDa: Trypsin-Verdau der aus der Membran ausgeschnittenen Bande. Fr. 4-33 Fraktion: Trypsin-Verdau der löslichen HIC-Fraktion ohne Glycerin in den Chromatographiepuffern. Fr.1 Trypsin-Verdau der löslichen HIC-Fraktion mit Glycerin in den Puffern. Mischsequenz: Wahrscheinlichkeit der Aminosäure an der Position mit von oben nach unten abnehmender Priorität. I: Identität, X: Nicht identifizierte Aminosäuren.

Sequenz	Alignment	I [%]	Protein
Gel 110 kDa AGASXNVAE	1 AGASXNVAE 187 AGASEEVAE	88,9	Catechol 2,3 Dioxygenase aus <i>Alcaligenes eutrophus</i>
PVDF 110 kDa 1 5 10 15 DLYXLAIYEDEDGHNENL SVEDYRDXGXRAEYHLQA TYGXAVLXRRLXYXAV GEXXHKKXXL			Keine Homologien
Fr. 1 1 5 10 15 GVEETVLEALLAXNIXL REQNLAYTXGGQXXAXA DLPQPNGRXVMPXXVXG			Keine Homologie
Fr. 4 LIYVER	1 LIYVER 80 TVYVER	83,3	Diacylglycerol Transferase aus <i>Mycoplasma pneumonia</i>
Fr. 5 EPDEFGTNG EMGLESXXA			Keine Homologie
Fr. 6 1 5 10 LLEVERQTAMYG GVAENP			Keine Homologie
Fr. 7 1 5 10 GPEMPYQND SIG NDXDGTXMKXXI			Keine Homologie
Fr. 8 LDRLVTLEPSY GP EEAYGNQNE FEGQDGRRDXT			Keine Homologie
Fr. 9 PFEAXNIR			Keine Homologie
Fr. 12 AVEEGQXI LINAPXXT			Keine Homologie
Fr. 15 AFYLAG	Sequenz in Fr. 16		
Fr. 16 1 5 10 AFYLAGNP EEEF	2 FYLAGNP EEEF 187 FYLAGNPEDEF	90,9	Legumin Precursor aus <i>Quercus robur</i> ID/AC: Q41128
Fr. 33 IIEEILHDV GVGVGGYIG			Keine Homologie
Ponceau-Bande 1 5 10 15 LDYASGEDTAAPYTL AEQLAQAI GNT E	1 LDYASGEDTAAPYTL 233 LAYASPTQSAGDKVL	40	Triacylglycerol Lipase Aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>

3.) Da auch auf dem unter 2.) beschriebenen Weg kein befriedigendes Ergebnis erreicht werden konnte, erfolgte eine tryptische Spaltung der Lipase-aktiven HIC-Fraktion in Lösung. Die nachfolgende Trennung der Peptidfragmente auf der HPLC zeigte, dass es auf diese Weise zum Ersten mal gelungen war, das Protein gut zu fragmentieren. Die auf der HPLC detektierten Peaks wurden fraktioniert (Fr. 4-33) und die darin befindlichen Peptidfragmente ansequenziert. Die Aminosäureanalyse der ersten Peptidfragmente ergab wieder Mischsequenzen, die in der Datenbanksuche zu keinem Ergebnis führten. Peptide aus den Fraktionen 9, 15 und 16 besaßen aber eine Aminosäuresequenz, die in der SwissProt Datenbank eine eindeutige Zuordnung ergab. So wurde für die Aminosäuresequenz des Peptids aus Fraktion 16 eine hohe Homologie zu Legumin aus der Stiel-Eiche (*Quercus robur*) gefunden.

4.) In einem parallelen Ansatz wurden Proteine eines Lipidkörperextraktes in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach der Anfärbung mit Ponceau wurde die LOX-Bande, dessen Molekulargewicht mit ca. 100 kDa ähnlich dem der angereicherten Bande ist, ausgeschnitten mit TFA bei 50 °C vorbehandelt und anschließend tryptisch gespalten. Die nachfolgende Trennung über die HPLC führte zu einem Peptid dessen Sequenzierung eine Mischsequenz ergab. Sie wies eine schwache Homologie zu einer Triacylglycerin-Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* auf. Das Molekulargewicht dieser Lipase ist mit 48 kDa aber wesentlich kleiner als das des angereicherten 110 kDa Proteins.

- o
- o
- o
- o
- o
- o
- o
- o
- o

3.10 Lipase-Aktivität in den Lipidkörpern anderer Ölsaaten

Es stellte sich die Frage, ob die in den Gurkenkeimlingen nachgewiesene ungewöhnliche Lipase-Aktivität auch in den Samen anderer Ölsaaten vorhanden ist. Um dies zu untersuchen, wurden die Lipidkörper aus den Keimblättern 4-d-alter etioliert angekeimter Samen von Rizinus, Kürbis, Melone, Ringelblume, Lein und Sonnenblume isoliert und unter den für die Gurken-Lipase optimalen Bedingungen getestet. Als Substrat wurden die LOX-Produkte aus 4-d-alten Keimblättern der Gurke, wie unter 2.10.1 beschrieben, eingesetzt.

Tab. 8: Lipase-Aktivität verschiedener Ölsaaten. Die Lipidkörperfraktion aus 4-d-alten Keimlingen der verschiedenen Ölsaaten wurde wie unter 2.4 beschrieben isoliert, in 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,5) homogenisiert und auf Lipase-Aktivität getestet (2.10.1).

Ölsaat	Freisetzung Linolsäure	Freisetzung (13S)-HODE
Ricinus	+ (siehe Text)	+
Kürbis	–	+
Melone	–	+
Ringelblume	–	+
Lein	–	+
Sonnenblume	–	+

Mit der Ausnahme von Rizinus wiesen die Lipidkörper der anderen Pflanzen ebenfalls eine Lipase-Aktivität auf, die spezifisch 13-HODE aus dem Substrat freisetzte. Nur der Lipidkörper des Rizinuskeimlings besaß eine lipolytische Aktivität, die auch Linolsäure aus dem Triacylglyceridsubstrat abspaltete (Tab. 8). Da aber einerseits das Verhältnis der Linolsäurereste zu den 13-HODE-Resten in den Triacylglyceriden des Substrates durchschnittlich 3 zu 1 betrug (Linolsäure zu 13-HODE), andererseits aber die lipolytische Aktivität des Rizinus-Lipidkörpers viermal mehr 13-HODE wie Linolsäure freisetzte (nicht gezeigt), besitzt auch Rizinus eine lipolytische Aktivität die oxygenierte Fettsäuren bevorzugt.

4. Diskussion

4.1 Strukturanalyse oxygenierter Triacylglyceride

Lipoxygenasen (LOX) sind Dioxygenasen, die den regio- und stereoselektiven Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einem (1Z, 4Z)-Pentadiensystem katalysieren [Gardner, 1991]. LOXs sind ubiquitär verbreitet. Sie kommen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen vor [Siedow, 1991]. In Pflanzen lassen sie sich in nahezu sämtlichen Geweben nachweisen, wobei die Gewebe-spezifische Expression sehr stark vom Entwicklungszustand der Pflanze und von äußeren Einflüssen abhängt [Rosahl, 1996]. Im tierischen Gewebe ist das dominierende Substrat der LOX Arachidonsäure, und die Enzyme werden nach der Position des Sauerstoff Einbaus in 5-, 8-, 12- und 15-LOXs klassifiziert [Kühn, 1996]. In Pflanzen findet man Arachidonsäure nicht oder nur in sehr geringer Menge, hier sind Linol- und Linolensäure die bevorzugten Substrate. Bei der LOX katalysierten Oxygenierung von Linolsäure sind zwei Positionsisomere möglich. Der Sauerstoff kann am C-Atom 9 oder am C-Atom 13 inseriert werden. Die Position der entstehenden Hydroperoxidgruppe im Fettsäuremolekül ist für die jeweilige LOX charakteristisch, so dass analog zum tierischen System die Enzyme nach ihrer Produktspezifität in 9- und 13-LOXs unterschieden werden können [Gardner, 1991].

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung in Pflanzen zeigten, dass es sich bei den meisten LOXs um cytosolische Proteine handelt [Siedow, 1991]. Es konnten aber auch in den Chloroplasten [Douillard und Bergeron, 1981, Feussner et al., 1995], der Vakuole [Wardale und Lambert, 1980] und den Mitochondrien [Grossman et al., 1972] LOXs nachgewiesen werden. Weiterhin wurden LOXs an den Plasmamembranen der Sojabohne [Macrí et al., 1994] und junger Weizenblätter [Balkenhohl, 1995] sowie in mikrosomalen Membranfraktionen der Tomate [Droillard et al., 1993] und der Gurke [Feussner, 1993] gefunden.

Ein weiteres Zellkompartiment in dem LOXs entdeckt werden konnten, sind die Lipidkörper fetthaltiger Samen wie zum Beispiel der Gurke [Feussner und Kindl, 1992], der Sonnenblume [Pilar Rodriguez-Rosales, 1998] und der Olive [Georgalaki et al., 1998]. Diese Speicherorganellen bestehen aus einer Triacylglyceridmatrix, die von einer Phospholipidmonolayermembran umgeben ist [Huang, 1994]. Während des Keimungsprozesses werden die im Lipidkörper lokalisierten Speicherlipide abgebaut um den wachsenden Keimling mit Energie und Kohlenstoffbausteinen zu versorgen [Kindl, 1997].

In Gurkenkeimblättern wurde gezeigt, dass in frühen Stadien der Keimung die *de novo* Synthese einer LOX erfolgt deren Zielkompartiment die Monolayermembran der Lipidkörper

ist. Hier wird sie sehr schnell zu einem der dominierenden Proteine [Sturm et al., 1988]. Die Expression dieser Lipidkörper-assoziierten LOX ist auf den Prozess der Keimung beschränkt, erfolgt in diesem Entwicklungsstadium aber noch vor der Expression anderer LOX-Formen [Feussner und Kindl, 1996; Höhne, 1997]. In ruhenden Samen ließ sich dieses Enzym nicht nachweisen [Kindl, 1997].

Neben dieser LOX wird noch ein weiteres Protein im jungen Keimling *de novo* synthetisiert, das ausschließlich am Lipidkörper nachweisbar ist. Für dieses Enzym, das eine Homologie zu dem Patatin der Kartoffel besitzt, konnte die Aktivität einer Phospholipase A₂ (PLA₂) nachgewiesen werden [May et al., 1998]. Für beide Proteine wurde ein annähernd zeitgleiches transientes Erscheinen am Lipidkörper, zwischen 24 h und 48 h nach Keimungsbeginn, beschrieben. *In vitro* Experimente mit den beiden rekombinanten Enzymen machten deutlich, dass Phospholipide durch die LOX nur sehr schlecht und in geringem Umfang oxygeniert werden (eigene Experimente), die PLA₂ aber in der Lage ist die verschiedensten Phosphatidylcholin-Derivate effektiv zu hydrolysieren [May et al., 1998]. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass das *in vivo* Substrat der Lipidkörper-assoziierten LOX nicht die Phospholipide, sondern die in der Matrix des Lipidkörpers lokalisierten Triacylglyceride sind. Die Funktion der PLA₂ wäre dann in der Zerstörung der strukturellen und funktionellen Integrität der Phospholipidmonolayermembran zu sehen, um auf diese Weise der LOX Zugang zu ihrem Substrat zu verschaffen. Inkubationsexperimente mit der Lipidkörper-assoziierten LOX [Matsui und Kajiwara, 1995] als auch mit dem rekombinanten Protein [Feussner et al., 1998b] zeigten, dass Trilinolein effektiv durch dieses Enzym metabolisiert wird, Triacylglyceride als LOX Substrate *in vivo* also prinzipiell in Frage kommen. Weiterhin wurde in ersten Experimenten festgestellt, dass die Triacylglyceride aus den Lipidkörpern der Gurkenkeimlinge oxidierte Fettsäuren enthielten, die Produkte einer LOX-katalysierten Reaktion sein konnten [Feussner et al., 1995].

Um zu zeigen dass diese Speicherlipide tatsächlich *in vivo* Substrate der LOX sind, sollte in dieser Arbeit eine Strukturanalyse der potentiellen Reaktionsprodukte vorgenommen werden. Dazu wurden die Triacylglyceride aus den Lipidkörpern 4-d-alter Gurkenkeimlinge präpariert, über die HPLC aufgetrennt und analysiert.

Es konnten fünf verschiedene Triacylglyceridfraktionen (Peaks 1-5) aus den Speicherlipiden isoliert werden (Abb. 2) die alle Produkte einer LOX-Reaktion waren, die spezifisch die Oxygenierung der veresterten Linolsäure am C-Atom 13 katalysierte (Abb. 4). Die einheitliche Enantiomere-Zusammensetzung der veresterten 13-HPODE Moleküle in den einzelnen Verbindungen, das C-Atom 13 besaß immer die *S*-Konfiguration, war hierbei ein

Beweis für eine LOX katalysierte Reaktion und schloss eine autokatalytische Entstehung aus (Abb. 5).

Die Triacylglyceride ungekeimter Gurkensamen bestehen überwiegend aus Trilinolein. Deshalb war es nicht überraschend, dass die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der isolierten Verbindungen ergab (Abb. 3 und Tab. 2), dass es sich hierbei hauptsächlich um Oxygenierungsprodukte des Trilinoleins handelte (Peaks 1, 2 und 4). Zusätzlich konnten Triacylglyceride identifiziert werden, die neben (13*S*)-HPODE und Linolsäure auch andere Fettsäuren besaßen (Peaks 3 und 5). Hierfür kam besonders Ölsäure in Frage. Bei den großen Mengen an detektierter Palmitin- und Stearinsäure handelte es sich vermutlich um Verunreinigungen, die aus den Weichmachern der Probengefäße stammten.

Die verschiedenen, in ihrer Struktur aufgeklärten oxygenierten Triacylglyceride, entstanden während der Keimung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 9). In den Anfangsstadien, bis 24 h nach Keimungsbeginn waren nur die einfach oxygenierten Produkte (Peaks 4 und 5) zu finden. Mit fortschreitender Keimung konnten auch höher oxygenierte Verbindungen (Peaks 1 bis 3) detektiert werden. Gleichzeitig war aber eine Verringerung der Menge der Peaks 4 und 5 zu beobachten. Zu einem späteren Keimungszeitpunkt (96 h) überwogen dann die höher oxygenierten LOX-Produkte. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es zu einer Metabolisierung der einfach oxygenierten Produkte zu den mehrfach oxygenierten Produkten kam, ohne dass eine äquivalente Menge der Ersteren neu gebildet wurde. Die Änderung des Produktprofils ging mit einer Sättigungskurve in der Gesamtmenge an veresterter (13*S*)-HPODE einher (Abb. 10), für die es zwei Gründe geben könnte. Eine einsetzende lipolytische Spaltung der oxygenierten Triacylglyceride oder/und eine abnehmende LOX-Aktivität am Lipidkörper. Für eine lipolytische Aktivität lagen noch keine Daten vor, aber eine verringerte katalytische Aktivität der LOX konnte an isolierten Lipidkörpern nachgewiesen werden (Abb. 13).

Die Oxygenierung der Speicherlipide durch eine Lipidkörper-assoziierte LOX ist nicht auf die Gurke beschränkt. Die Triacylglyceride ungekeimten Sonnenblumensamen bestehen ebenso wie die der Gurke überwiegend aus Trilinolein, und auch hier konnte in 4-d-alten Keimlingen eine LOX immunologisch am Lipidkörper nachgewiesen werden. Die Analyse der Speicherlipide zeigte ein fast identisches Ergebnis wie in der Gurke. Die fünf in den Triacylglyceriden der Gurke identifizierten Peaks konnten auch in den Speicherlipiden der Sonnenblume gefunden werden (Abb. 11). Hierbei handelte es sich ebenfalls um Reaktionsprodukte einer LOX, die spezifisch den Sauerstoff am C-Atom 13 der Linolsäure inserierte. Auch in diesem Fall konnte ein autokatalytischer Sauerstoff-Einbau infolge der

einheitlichen Enantiomeren Zusammensetzung des (13*S*)-HPODE in den Triacylglyceriden ausgeschlossen werden.

Die schon in der Gurke beobachteten Veränderungen unter den oxygenierten Triacylglyceriden während der ersten vier Tage der Keimung ließen sich auch in der Sonnenblume feststellen (Abb. 11). In den Anfangsstadien, 24 h nach Keimungsbeginn, waren nur die Peaks 4 und 5 nachzuweisen. Zum einem späteren Zeitpunkt (48 h) traten dann auch die Peaks 1 bis 3 auf, deren Menge im weiteren Verlauf der Keimung kontinuierlich zunahm (bis 96 h) dagegen war bei den Peaks 4 und 5 eine Abnahme zu verzeichnen.

Im Unterschied zu den Speicherlipiden der Gurke, deren Oxygenierungsprodukte fast ausschließlich in der Hydroperoxidform vorlagen, waren in der Sonnenblume ungefähr 50 % der veresterten (13*S*)-HPODE Moleküle zu den entsprechenden Hydroxyden ((13*S*)-HODE) reduziert. Dies ließ auf eine höhere Peroxid-reduzierende Kapazität in der Sonnenblume gegenüber der Gurke schließen.

In den Speicherlipiden der Gurke lagen am vierten Tag der Keimung etwa 15 % der ungesättigten Fettsäuren in den Triacylglyceriden hydroperoxidiert vor, ohne dass es zu einer offensichtlichen Zellschädigung oder der Beeinträchtigung anderer Prozesse im Keimling kam. Dies spricht für eine effektive Abschirmung der Lipidhydroperoxide durch den Lipidkörper. Andererseits konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass der Lipidkörper in der Lage ist das reduzierte LOX-Produkt (13*S*)-HODE in das Inkubationsmedium abzugeben, ohne dass eine Freisetzung von(13*S*)-HPODE oder Linolsäure erfolgt [Feussner et al.; 1995]. Außerdem ließ sich im Cytosol der Gurkenkeimlinge als alleiniges Linolsäure-Derivat (13*S*)-HODE nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse ließen sich zwei enzymatische Reaktionen postulieren, die an der Metabolisierung der durch die LOX oxygenierten Triacylglyceride beteiligt sein müssen. (1) Eine für oxygenierte Fettsäuren spezifische Lipase, die selektiv (13*S*)-H(P)ODE aus den Triacylglyceriden abspaltet, und (2) ein reduzierendes Enzym, welches die reaktiven Hydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxyden reduziert. Dieser Reduktionsvorgang könnte noch im Triacylglycerid stattfinden oder an der freien Fettsäure erfolgen. Während für die spezifische hydrolytische Aktivität einer Lipase noch keine Daten vorlagen, kamen für die Reduktionsreaktion mehrere Möglichkeiten in Frage (Abb. 26). Einmal könnte die LOX selber durch ihre Hydroperoxidase-Aktivität eine Reduzierung des Hydroperoxids katalysieren. Das Reaktionsprodukt wäre dann allerdings nicht das korrespondierenden Hydroxyderivat, sondern eine Oxosäure, 13-Keto-(9*Z*, 11*E*)-octadecadiensäure (13- KODE) [Kühn, 1996]. Tatsächlich wurden in den Speicherlipiden geringe Mengen dieser Fettsäure nachgewiesen.

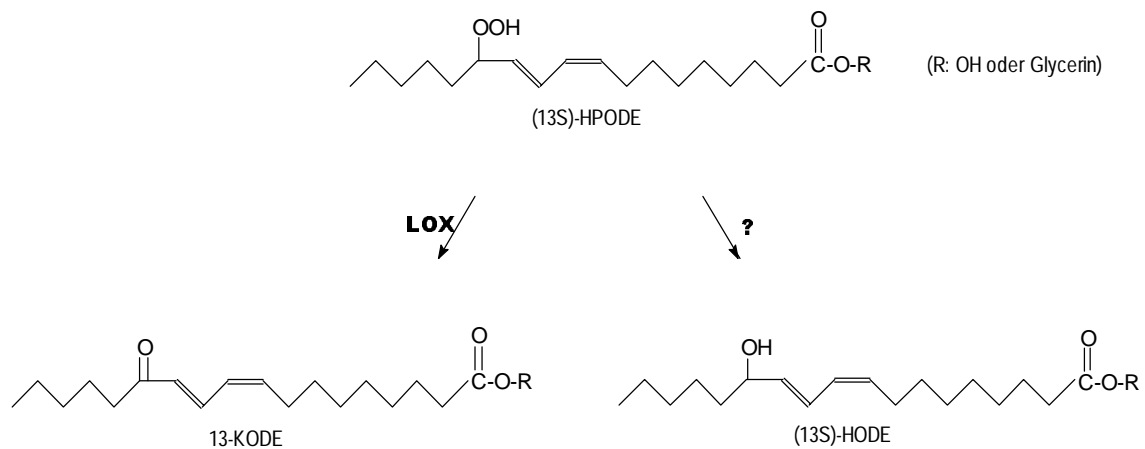


Abb. 26: Mögliche Reduktionsreaktionen des (13S)-HPODE Moleküls. 13-KODE: 13-Keto-(9Z, 11E)-octadecadiensäure.

Eine andere Möglichkeit wäre eine Reduzierung über den Peroxygenaseweg. Die Peroxygenase katalysiert entweder eine intra- oder intermolekulare Oxidationsreaktion [Blée und Schuber, 1995]. Dafür benötigt dieses Enzym jedoch Reduktionsäquivalente in Form von ungesättigten Fettsäuren. Hier käme sowohl Ölsäure, Linolsäure als auch (13S)-HPODE selber in Frage. Als Reaktionsprodukte würden dann neben (13S)-HODE die entsprechenden Epoxide der Cosubstrate entstehen, die durch Epoxidhydrolasen in Diole bzw. Triole weiter metabolisiert werden [Blée, 1998]. Allerdings konnten diese Sekundärprodukte, analog zu Experimenten an Spinatchloroplasten in denen eine effektive Metabolisierung von Fettsäurehydroperoxiden stattfindet, nicht gefunden werden [Blée und Joyard, 1996], so dass dieser Reduktionsweg unwahrscheinlich erscheint [Blée und Feussner, nicht publiziert].

Weiterhin wäre auch eine Reduzierung der Hydroperoxide durch eine Glutathion-abhängige Peroxidase möglich. So konnte aus Salz-gestressten Citruszellen ein Enzym gereinigt werden, das Phospholipidhydroperoxide in Anwesenheit von Glutathion in ihre Hydroxyderivate reduziert [Beeort-Zahar et al., 1995]. Experimente an Lipidkörpern der Gurke eine Glutathion abhängige Reduktionsreaktion nachzuweisen führten allerdings zu keinem Ergebnis [Dr. A. Kolbe, persönliche Mitteilung].

Der hier diskutierte Reaktionsweg, die LOX-katalysierte Oxygenierung der Triacylglyceride mit einer anschließenden Abspaltung der oxygenierten Fettsäuren aus den Speicherlipiden durch eine für diese Fettsäuren spezifische Lipase, geht davon aus, dass die Linolsäurereste in den Triacylglyceriden das primäre Ziel der an ihrem Abbau beteiligten Enzyme sind. Es stellt sich aber dann die Frage, was mit den Fettsäureresten die kein Substrat einer LOX darstellen

passiert. Hier könnte man sich vorstellen, dass die nach der Reaktion der LOX und der Lipase resultierenden Monoacyl-, Diacyl- und auch einige Triacylglyceride durch unspezifische glyoxysomale Lipasen hydrolysiert werden [Lin et al., 1982, Kindl, 1997]. Dazu wäre noch nicht einmal ein aufwendiger Transport der Lipide notwendig, da die enge Nachbarschaft der Glyoxysomen zu den mittlerweile destabilisierten Lipidkörpern schon ausreichen würde, um die in der glyoxysomalen Membran lokalisierten hydrolytischen Enzyme wirksam werden zu lassen.

Aus den Analysen der Sonnenblumenkeimlinge ging hervor, dass der Lipidkörper mit den darin enthaltenen Triacylglyceriden strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit dem der Gurke besitzt. Der hier für die Gurke vorgeschlagene Reaktionsweg zur Mobilisierung der Speicherlipide in den anfänglichen Phasen der Keimung kann auch auf die Sonnenblume und eventuell anderen Ölsaaten mit ähnlicher Fettsäurezusammensetzung übertragen werden. Auf Ölsaaten jedoch, deren Samenöl kein LOX-Substrat aufweist, lässt sich dieses Modell allerdings nicht anwenden.

4.2 Reinigung der Lipase

4.2.1 Isolierung einer 110 kDa Bande

In Abschnitt 4.1 wurde eine Lipase am Lipidkörper der Gurkenkeimlinge postuliert, die während der Keimung spezifisch (13S)-H(P)ODE aus den Triacylglyceriden freisetzt. Lipidkörper-assoziierte Lipasen konnten bisher in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen werden. So wurden sowohl in Senf- [Lin und Huang, 1983], Mais- [Lin und Huang, 1984] als auch Rapskeimlingen [Fuchs et al., 1996] Keimungs-induzierte Lipasen entdeckt. Auch in den Samen der Kiefer (*Pinus edulis*) konnte eine Lipase am Lipidkörper nachgewiesen werden, die für den Abbau der Speicherlipide während der Keimung verantwortlich sein soll [Hammer und Murphy, 1993]. Eine Besonderheit stellen in dieser Hinsicht Ricinussamen dar. Hier lässt sich schon im ruhenden Samen eine Lipase-Aktivität messen, die ein für Lipasen ungewöhnliches saures pH-Optimum (pH 4,5) besitzt [Ory, 1969]. Im Verlauf der Keimung nimmt die Aktivität dieser sauren Lipase ab, und eine neutrale, Calcium stimulierte Lipase wird *de novo* synthetisiert, die den Abbau der Speicherlipide einleitet [Huang, 1994].

In Gurkensamen konnte bisher keine Lipase-Aktivität nachgewiesen werden, die für die Hydrolyse der Speicherlipide verantwortlich sein könnte [Huang, 1987, Feussner und Kindl,

1992]. Lediglich in der Fraktion größerer Organellen (Mitochondrien und Glyoxysomen) konnte eine geringe lipolytische Aktivität gemessen werden, die aber für den Keimungsprozess nicht von Bedeutung sein soll [Schwennesen, 1988]. Für pflanzliche Lipasen ist charakteristisch, dass sie eine ausgeprägte Substratspezifität für bestimmte Fettsäuren aufweisen können. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich dabei um die im Samenöl der Pflanzenspezies dominierende Fettsäure [Adlercreutz et al., 1997]. Die Speicherlipide der Gurke bestehen überwiegend aus Trilinolein. Allerdings konnte weder die Freisetzung von Linolsäure beobachtet werden [Feussner et al., 1997a], noch ließ sich in *in vitro* Tests mit Trilinolein als Substrat eine Lipase-Aktivität am Lipidkörper nachweisen.

Die Analyse der Speicherlipide (3.1) zeigte, dass die Triacylglyceride im Verlauf der Keimung zunehmend durch eine LOX oxygeniert werden (Abb.10). Weiterhin wurde in früheren Experimenten festgestellt, dass (13S)-HODE vom Lipidkörper freigesetzt wird, aber keine Freisetzung von Linolsäure festzustellen war [Feussner et al., 1997a]. Diese führte zu der Annahme, dass am Lipidkörper eine Lipase lokalisiert sein könnte, die spezifisch (13S)-H(P)ODE aus den Triacylglyceriden abspaltet. Erste Lipase-Tests, in denen diese oxygenierten Triacylglyceride als Substrat eingesetzt wurden, vermochten tatsächlich am Lipidkörper eine Aktivität nachzuweisen.

In einem Vergleich verschiedener Zellkompartimente (Abb. 12) ließ sich auch in der mikrosomalen Fraktion und der Fraktion größerer Organellen (Mitochondrien und Glyoxysomen) eine Lipase-Aktivität mit diesem Substrat messen, die aber gegenüber der Lipidkörperfraktion geringer ausfiel. Hierbei konnte es sich aber auch um die Aktivität von unspezifischen Hydrolasen gehandelt haben. Für die am Lipidkörper gemessene Lipase-Aktivität lies sich dies ausschließen, da hier mit anderen Substraten keine Aktivität nachzuweisen war. Um die für LOX-Produkte spezifische Lipase zu reinigen, war es notwendig die maximale Aktivität dieses Enzyms imr Verlauf der Keimung zu bestimmen. Dabei ließ sich bis zu 24 h nach Keimungsbeginn nur eine sehr geringe Lipase-Aktivität messen, anschließend wurde aber ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes beobachtet (Abb. 13). Die LOX-Aktivität erreichte ihr Maximum einen Tag früher als die Lipase-Aktivität und nahm dann ab. Die zunehmende Lipase-Aktivität bei gleichzeitiger Verringerung der LOX-Aktivität führte zu der in Abb. 10 gezeigten Sättigungskurve der oxygenierten Fettsäuren in den Triacylglyceriden. Weiterhin ist das Aktivitätsprofil beider Enzyme ein Hinweis für eine sequenzielle Reaktion von LOX und nachfolgender Lipase. Mit einem umgekehrten Reaktionsablauf, bei dem die LOX an der freien Fettsäure angreifen würde, ließe sich der anfängliche koordinierte Anstieg beider

Enzymaktivitäten noch vereinbaren, doch wäre es physiologisch unsinnig die LOX-Aktivität am Lipidkörper zu erniedrigen, wenn die Lipase zunehmend ihr Substrat produziert. Bei dem Vergleich der Gesamtaktivitäten beider Enzyme ist aber zu beachten, dass diese für die LOX am vierten Tag der Keimung immer noch acht mal höher war wie die der Lipase. Auf den Nachweis enzymatischer Aktivitäten zu späteren Keimungszeitpunkten wurde verzichtet, da sich dann die Lipidkörper nicht mehr sauber isolieren lassen.

Um die Lipase zu reinigen, wurden im ersten Reinigungsschritt ca. 50 % der Aktivität mit Hilfe einer 1 M NaCl Lösung vom Lipidkörper abgelöst. Die Solubilisierung der Aktivität mit Kochsalz war wahrscheinlich weniger darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem Enzym um ein peripheres Membranprotein handelt. Vielmehr darauf, dass die Monolayermembran des Lipidkörpers nicht in der Lage ist Proteine so fest zu binden wie die Lipiddoppelschicht einer herkömmlichen Membran. Das es trotzdem zu einer Anreicherung der Lipase-Aktivität kam, lag besonders daran, dass der Großteil der Oleosine, welche die Hauptmenge der Proteine am Lipidkörper ausmachen [Huang, 1992] aufgrund ihrer Hydrophobizität an der Lipidkörpermembran verblieb.

Die Reinigung über Ionenaustauscher führte zu großen Verlusten an Lipase-Aktivität, dagegen erwies sich eine Reinigung über hydrophobe Wechselwirkungen als sehr schonend. Durch die Gelfiltration kam es noch einmal zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität. Bei der Betrachtung des Elutionsprofils (Abb. 18) wurde aber deutlich, dass die Lipase-Aktivität über einen weiten Molekulargewichtsbereich eluierte, sodass es nicht zu einer effektiven Abtrennung von kontaminierenden Protein kommen konnte. Das die Gelfiltration trotzdem zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität führte, lag möglicherweise an einer aktivierenden Substanz im Gelfiltrationspuffer. Hierfür kam weniger das Detergenz als vielmehr Natriumazid in Frage, für das ein aktivierender Einfluss auf Lipasen beschrieben wurde [Borchert, 1992].

Insgesamt führte die Reinigung zu einer ca. 400-fachen Anreicherung der Lipase-Aktivität (Tab. 4). Die gelelektrophoretische Analyse der Reinigungsschritte zeigte die Isolierung einer Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa (Abb. 19).

4.2.2 Bewertung der Reinigung

Das in der SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht des gereinigten Proteins war mit 110 kDa für Lipasen sehr groß. Die meisten pflanzlichen Lipasen besitzen Molekulargewichte zwischen 50 und 70 kDa [Huang, 1994]. Eine Ausnahme stellt die aus den Samen von *Vernonia galamensis* gereinigte Lipase dar. Für sie wurde in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 116 kDa bestimmt [Ncube et al., 1995].

Die am Lipidkörper lokalisierte LOX hat mit 100 kDa ein Molekulargewicht, das dem des gereinigten Proteins sehr ähnlich ist [Feussner, 1993]. Durch einen Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit beider Proteine in der SDS-PAGE konnte zwar ein geringer Unterschied festgestellt werden. Es bestand trotzdem der Verdacht, dass es zu einer Anreicherung der LOX gekommen war und die Lipase aufgrund einer zu geringen Proteinmenge nicht in der Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 19) sichtbar wurde, oder das möglicherweise die LOX selber für die lipolytische Aktivität verantwortlich war.

In einer weiteren Reinigung der Lipase wurde tatsächlich in allen Lipase-aktiven Fraktionen LOX-Aktivität festgestellt. Einige Reinigungsschritte führten aber zu einer Abnahme der LOX-Aktivität, während die Aktivität der Lipase zunahm. Anhand der gegenläufigen Tendenzen beider enzymatischer Aktivitäten im Verlauf dieser Reinigung wurde deutlich, dass es nicht zu einer Anreicherung der LOX gekommen war. Weiterhin konnte durch entsprechende Tests mit der rekombinanten LOX eine lipolytische Aktivität dieses Enzyms ausgeschlossen werden.

Das Vorkommen von LOX in den gereinigten Fraktionen der Lipase, sowohl nach der HIC als auch der SEC (Tab. 5), konnte zwei Ursachen zu haben. Zum einen beträgt der Anteil der LOX an den Lipidkörperproteinen ein Vielfaches dem der Lipase, sodass auch nach mehrfacher chromatographischer Trennung noch eine LOX-Kontamination in den Fraktionen der Lipase nachweisbar bleibt. Hierfür spricht die immer noch 8-fach höhere Aktivität der LOX gegenüber der Lipase am vierten Tag der Keimung (Abb. 13). Zum anderen in den ähnlichen Eigenschaften beider Enzyme, was die Hydrophobizität und besonders das Molekulargewicht betrifft und so eine Trennung der beiden Enzyme wesentlich erschwerte wurde.

Eine 2D-gelelektrophoretische Auftrennung der HIC-Fraktion mit anschließender Silberfärbung machte noch eine weitere Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von 66 kDa sichtbar (Abb. 21). Auch bei diesem Protein konnte es sich um die gesuchte Lipase handeln.

Ein Vergleich der 110 kDa Bande im Gel mit der in den entsprechenden Fraktionen einer IAC an Mono Q gemessenen Lipase-Aktivität (Abb. 20) wies aber eine eindeutige Korrelationen zwischen der Intensität der 110 kDa Bande und der gemessenen Aktivität auf. Aufgrund dieses Ergebnisses ließ sich die 66 kDa Bande als Kandidat für die Lipase ausschließen und es ist davon auszugehen, dass die gesuchte Lipase ein Molekulargewicht von 110 kDa Bande besitzt.

Die Lipidkörper lokalisierte LOX, für die ein isoelektrischer Punkt von 5,6 vorgeschlagen wurde [Feusser, 1993], konnte in dem 2D-Gel der HIC-Fraktion nicht gefunden werden.

Aus *in vivo* Markierungen mit (³⁵S) Methionin war bekannt, dass in den frühen Stadien der Keimung nur zwei Proteine neu synthetisiert werden und zum Lipidkörper gelangen [Schwennesen, 1988; Feussner, 1993]. Eines der beiden Proteine besitzt ein Molekulargewicht von 46 kDa und wurde kürzlich als ein Patatin-homologes Protein, das eine Phospholipase A₂-Aktivität aufweist, identifiziert [May et al., 1998]. Bei dem anderen Protein, mit einem Molekulargewicht von 100 kDa, handelt es sich um die LOX [Feussner und Kindl, 1992, Feussner 1993]. Aminosäuresequenzanalysen von Peptidfragmenten der aus dem SDS-PAGE ausgeschnittenen und tryptisch verdauten Lipidkörper-LOX Bande ergaben für ein Peptid von 20 Aminosäuren eine signifikante Übereinstimmung mit tierischen Lipasen [Feussner, 1993]. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass LOX und Lipase ähnliche Molekulargewichte besitzen könnten und das es sich bei der angereicherten 110 kDa Bande um die Lipase handelt.

4.2.3 Aminosäuresequenzanalyse

Eine direkte Sequenzierung des Proteins war erfolglos. Sowohl mit der aus dem Gel ausgeschnittene Proteinbande als auch mit dem auf eine PVDF-Membran transferierten Protein kam es in den Sequenzierungsversuchen zu keinen verwertbaren Daten. Auch die Spaltung mit Trypsin führte zu keiner Sequenz.

Durch einen tryptischen Verdau der Lipase-aktiven HIC Fraktion in Lösung mit anschließender Trennung der Peptidfragmente über die HPLC gelang es schließlich Aminosäuresequenzen zu bekommen, die eine eindeutige Homologie zu Proglobulin bzw. Prolegumin aufwiesen (Tab. 7). Globuline sind die typischen Speicherproteine der Samen von Dicotyledonen, wobei Legumin das Globulin der Leguminosen darstellt [Müntz, 1998]. Diese Proteine sind reich an Arginin, Glutamin und Asparagin. Ihre wichtigste Funktion ist die eines Stickstoffspeichers, enzymatische Funktionen sind nicht bekannt [Müntz, 1998]. Die

Globuline entstehen aus einer Proteinvorstufe, dem Proglobulin mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Diese Proteinvorstufe wird im Proteinkörper, dem Speicherort der Globuline, endoproteolytisch in eine saure α -Kette (pI: 5, MG: 35 kDa) und eine basische β -Kette (pI: 8, MG: 20 kDa) gespalten. Die α und β -Kette bleiben durch mindestens eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Sechs dieser $\alpha\beta$ -Dimere bilden schließlich das native Globulin mit einem Molekulargewicht von ca. 330 kDa [Kindl, 1991].

In der Gurke liegen die Globuline unglykosyliert in der Matrix des Proteinkörpers vor, hingegen enthält die Proteinkörpermembran eine Vielzahl von Glykoproteinen [Kara und Kindl, 1982]. Der Abbau der Proteinkörper während der Keimung erfolgt etwa parallel zu der Mobilisierung der Speicherlipide in den Lipidkörpern [Kara und Kindl, 1982]. Die verschiedenen Proteinkörper verschmelzen zu einem lytischen Kompartiment aus dem schließlich die Zentralvakuole der Zelle wird [Müntz, 1998]. Die Proteinkörper besitzen zwar eine sehr hohe Dichte, trotzdem kontaminieren ihre Bestandteile während der Aufarbeitung Fraktionen geringerer Dichte, sodass es möglicherweise auch zu einer Verunreinigung der Lipidkörperfraktion kam [Kara und Kindl, 1982]. Die Bande im Silber-gefärbten 2D-Gel mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa (Abb. 21), entspricht ungefähr der Größe des Proglobulins. Die erhaltenen Peptidsequenzen könnten daher von dieser Proteinbande stammen. Darüber hinaus bilden Proglobuline auch unter denaturierenden Bedingungen, wie sie in der SDS-PAGE gegeben sind, oft Dimere [Robert et al., 1985]. In der Membran des Proteinkörper wurde ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa nachgewiesen [Kara und Kindl, 1982], bei dem es sich um ein solches Dimeres Proglobulin oder ein Globulin-ähnliches Protein handeln könnte, sodass die Globulin/Legumin Peptidsequenzen möglicherweise auch von der 110 kDa Bande stammen.

Globuline sind dafür bekannt, dass sie sich in Salzlösungen hoher Molarität (0,5 bis 4 M) gut lösen, in Puffern geringer Molarität aber ausfallen. Der erste Reinigungsschritt der Lipase bestand in einer Solubilisierung der Lipidkörperproteine mit einer 1 M Kochsalz-Lösung. Von der Aufarbeitung stammende kontaminierende Globuline in der Lipidkörperfraktion könnten sich bei diesem Schritt im Solubilisat angereichert haben. In den folgenden Reinigungsschritten gelang es dann offensichtlich nicht mehr, diese vollständig abzutrennen.

Der Nachweis von Proglobulin bzw. Prolegumin war ein nicht erwartetes Ergebnis. Jedoch konnte durch die Sequenzierung einer tryptisch gespaltenen, Ponceau angefärbten 100 kDa Bande der Lipidkörperproteine ein Peptid erhalten werden, das eine schwache aber signifikante Homologie zu einer Triacylglycerid-Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* aufwies. Weiterhin war bekannt, dass die Sequenzierung der Peptidfragmente einer aus dem

SDS-Gel eines Lipidkörperproteinextraktes ausgeschnittenen LOX-Bande zu einem Peptid führte, dass eine eindeutige und signifikante Homologie zu Triacylglycerid-Lipasen besaß [Feussner, 1993]. Diese beiden Ergebnisse zeigen, dass die am Lipidkörper der Gurke lokalisierte Lipase ein Molekulargewicht besitzt, das ähnlich oder gleich dem der LOX ist. Diese Lipase sollte sich in den im SDS-Gel aufgetrennten Fraktionen in der 110 kDa Bande befinden. Eine Peptidsequenz konnte aber, wahrscheinlich wegen einer sehr hohen Glykosylierung des Proteins, nicht erhalten werden.

4.3 Charakterisierung der Lipase

4.3.1 Molekulargewicht

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Lipase ergab in der SDS-PAGE, im Vergleich zur Gelfiltrationschromatographie mit 93 kDa (Abb. 22), eine Größe von 110 kDa (Abb. 19). Es handelt sich demnach um ein monomeres Protein. Der geringe Unterschied beider Ergebnisse kann durch die externe Kalibrierung der Gelfiltrationssäule erklärt werden, da geringfügige Veränderungen in den Retentionszeiten zwischen den einzelnen Trennungen auftraten.

Dieses Molekulargewicht ist für Lipasen ungewöhnlich groß. Die meisten Lipasen haben Molekulargewichte zwischen 50 und 70 kDa, wobei in einigen Fällen aber eine Aggregatbildung beschrieben wurde. So konnte für die saure Lipase aus Ricinussamen in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 58 kDa ermittelt werden, die Bestimmung des nativen Molekulargewichtes auf einer Gelfiltrationssäule ergab aber einen Wert von 110 kDa. Es handelt sich hier vermutlich um ein dimeres Protein [Fuchs, 1995, Fuchs et al., 1996]. Für die Lipidkörper-assoziierte Lipase aus Maissamen wurde in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 65 kDa bestimmt, während als natives Molekulargewicht in einem Saccharose-Dichtegradienten 270 kDa ermittelt wurde [Huang, 1994]. Das Enzym könnte also *in vivo* als Tetramer vorliegen. Weiterhin wurde für die glyoxysomale Lipase aus Rizinussamen ein Molekulargewicht von 62 kDa [Altaf et al., 1997] und für die am Lipidkörper lokalisierte Lipase aus Rapssamen ein Molekulargewicht von 64 kDa [Fuchs, 1995] bestimmt. Eine Ausnahme findet sich in der aus den Samen von *Vernonia galamensis* gereinigten Lipase [Ncube et al., 1995]. Die Molekulargewichtsbestimmung für dieses Enzym ergab in der SDS-PAGE mit 116 kDa einen Wert, der ähnlich dem für die in dieser Arbeit angereicherten Lipase ist.

4.3.2 pH-Optimum

Für die Lipase konnte ein alkalisches pH-Optimum ermittelt werden, wobei das Maximum am Ende des überprüften pH-Bereichs bei einem pH-Wert von 8,5 lag (Abb. 23). Für andere Lipasen wurden ebenfalls alkalische pH-Optima beschrieben. So besitzt die aus den Samen von *Vernonia galamensis* gereinigte Lipase eine maximale lipolytische Aktivität zwischen pH 8 und 9 [Ncube et al., 1995]. Die Lipase aus Rapssamen weist ein pH-Optimum von 8,5 auf [Fuchs, 1996] und für die Lipidkörper-assoziierte Lipase aus Maissamen wurde ein optimaler pH-Wert von 7,5 ermittelt [Lin und Huang, 1984, Huang, 1994]. Eine im sauren Milieu aktive Lipase konnte bisher nur in Rizinussamen gefunden werden. Diese Lipase besitzt ein pH-Optimum von 4,5 und läßt sich schon im ungekeimten Samen nachweisen [Ory et al., 1962]. Während der Samenkeimung verringert sich die Aktivität dieser sauren Lipase und es tritt eine alkalische Lipase-Aktivität auf [Huang, 1994].

Fettsäuren liegen im alkalischen Milieu in ihrer deprotonierten Form vor. So besitzt Linolsäure zum Beispiel einen pKa-Wert von 7,9 und würde bei einem pH-Wert von 8,5 als Anion vorliegen. Lipasen sind Enzyme die an einer Lipid-Wasser Grenzfläche agieren und ein hydrophobes Substrat umsetzen [Verger, 1997, Ferrato et al., 1997]. Die Wasserlöslichkeit ihres Reaktionsproduktes, der freien Fettsäure, hängt vom pH-Wert ab. Es wäre vorstellbar, dass bei einer Lipolyse im alkalischen Milieu die negativ geladenen Fettsäuren schneller vom Enzym ins umgebene Medium diffundieren und so eine schnellere Enzymreaktion ermöglichen, die zu einem höheren Umsatz des Substrates führt (siehe Abschnitt 4.4.5).

4.3.3 Isoelektrischer Punkt

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Lipase erfolgte anhand des Elutionsverhaltens an einer Chromatofokussierungssäule. Hierbei wurde die maximale Lipase-Aktivität bei einem pH-Wert von 4,7 von der Säule eluiert (Abb. 25). Die 2-dimensionale Auftrennung der aktiven HIC-Fraktion machte eine Fokussierung des 110 kDa Proteins bei einem pH-Wert von 4,8 sichtbar (Abb. 21). Demnach wurde für die Lipase, durch diese beiden Methoden, ein isoelektrischer Punkt zwischen 4,7 und 4,8 bestimmt. Ein Hinweis auf mögliche Isoformen der Lipase konnte nicht erhalten werden.

Isoelektrische Punkte von Lipasen sind in der Literatur selten beschrieben. Für die am Lipidkörper von Ricinussamen lokalisierte saure Lipase wurde ein pI von 4,5 bestimmt [Fuchs et al., 1996].

Der isoelektrische Punkt des gesamten Lipidkörpers liegt bei 6,2 [Huang, 1992] und wird überwiegend durch die Oleosine bestimmt. Sie verleihen der Oberfläche des Lipidkörpers im neutralen Medium eine negative Ladung und verhindern so ein Aggregieren der einzelnen Organellen [Huang, 1992]. Schwennesen [1988] stellte fest, dass alle am Lipidkörper der Gurkenkeimlinge gebundenen Proteine einen pI zwischen 4,2 und 6,2 besitzen und so im neutralen Milieu zu der negativen Nettoladung des Lipidkörpers beitragen. Die am Lipidkörper gebundene Lipase fügt sich mit ihrem niedrigen pI-Wert somit in dieses Konzept ein.

4.3.4 Inhibitoren und Stimulatoren

Die 3-dimensionale kristallographische Strukturanalyse der menschlichen Pankreas-Lipase sowie Lipasen aus Pilzen und Bakterien zeigte, dass das aktive Zentrum von Lipasen große Ähnlichkeit mit dem von Serinproteasen wie zum Beispiel Trypsin besitzt [Schrag und Cygler, 1997]. Die Inkubation der, aus den Gurkenkeimblättern angereicherten Lipase mit dem Serinprotease-Inhibitor PMSF, führte allerdings zu keiner Verringerung der Aktivität.

Eine geringe Stimulierung der Lipase-Aktivität durch Calcium-Ionen und die Calcium reversible Inhibierung der Lipase durch Chelatoren zweiwertiger Ionen wie EDTA und EGTA wurde auch in anderen Samen nachgewiesen. So konnte eine Hemmung der Lipase aus Mais [Lin und Huang, 1983] als auch der Lipase aus Rapssamen [Fuchs, 1995] mit EDTA/EGTA beobachtet werden. Es wird auch vermutet, dass es sich bei der sauren Lipase im ruhenden und der neutralen, Calcium-stimulierten Lipase im keimenden Samen von Ricinus um das selbe Enzym handelt und die Calcium-Ionen für eine Änderung des pH-Optimums verantwortlich sein könnten [Huang, 1994].

Über den Einfluss von Triton X-100 gibt es widersprüchliche Daten. So konnte Fuchs [1995] eine vollständige Inhibierung der sauren Lipase aus Ricinussamen beobachten, andere Autoren stellten eine geringe Stimulierung fest [Altaf et al., 1997]. Wahrscheinlich werden diese Effekte aber auf die Detergenz Eigenschaften des Triton X-100 und auf dessen Wechselwirkung mit den Lipase-Substraten zurückzuführen sein.

4.3.5 Substratspezifität

Lipasen aus den unterschiedlichsten Samen weisen eine Substratspezifität für bestimmte Fettsäuren auf. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um die in den eigenen Triacylglyceriden dominierende Fettsäure [Lin et al., 1986, Huang, 1994, Adlercreutz et al., 1997]. Die Lipide des Maissamens zum Beispiel bestehen überwiegend aus Triolein und Trilinolein, die am Lipidkörper lokalisierte Lipase weist eine Selektivität für Ölsäure- und Linolsäurereste in den Triacylglyceriden auf [Lin et al., 1983]. Das Samenöl von *Vernonia galamensis* enthält hauptsächlich Trivernolin und die aus den Samen gereinigte Lipase besitzt eine hohe Spezifität für Vernolsäure (12,13-Epoxy-(9Z)-octadecensäure) [Ncube et al., 1995]. Auch für Lipasen aus Raps- und Senfsamen wird eine bevorzugte Hydrolyse von Erucasäure gegenüber Stearinsäure aus dem Triacylglycerid beschrieben [Lin und Huang, 1983].

Der Vorteil der Adaption dieser pflanzlicher Lipasen an die Fettsäurezusammensetzung ihres Samenöls ist offensichtlich. Die Lipase katalysierte Hydrolyse ist wahrscheinlich der geschwindigkeits-bestimmende Schritt in der Mobilisierung der Speicherlipide während der Keimung. Eine hohe Spezifität der Lipase für ihr natürliches Substrat würde daher die Energiebereitstellung für den Keimungsprozess wesentlich effektiver machen. Außerdem gewährleistet diese Spezifität einen selektiven Abbau der Speicherlipide, da andere Lipide innerhalb der Zelle gewöhnlich eine von den Speicherlipiden abweichende Fettsäurezusammensetzung besitzen.

Die dominierende Fettsäure in den Triacylglyceriden der Gurke ist die Linolsäure. Im Verlauf der Keimung wird zwar ein großer Teil der veresterten Linolsäure durch die Reaktion der LOX zu (13S)-HPODE oxygeniert, jedoch ist am vierten Tag der Keimung das Verhältnis von Linolsäure zu (13S)-HPODE in den Triacylglyceriden immer noch ca. 10 zu 1. Die Bestimmung der Substratspezifität der am Lipidkörper lokalisierten Lipase zeigte aber, dass Trilinolein nicht hydrolysiert wird. Die Lipase spaltet selektiv oxygenierte Fettsäuren aus den Triacylglyceriden ab (Tab. 6). Diese in den Experimenten ermittelte Spezifität beruhte nicht auf einer nachträglichen Oxygenierung unspezifisch freigesetzter Fettsäuren durch ein LOX-Kontamination in der Probe. Dafür sprechen die selektive Freisetzung von 9-H(P)ODE und 9,10-EODE aus dem Samenöl der Ringelblume (*Calendula officinalis*) sowie der Rizinolsäure aus dem Öl des Rizinussamens. Zum einen ist 9-H(P)ODE kein Reaktionsprodukt der am Lipidkörper der Gurke lokalisierten LOX, da diese spezifisch die Oxygenierung am C-Atom 13 katalysiert (siehe 3.1.3.1.2), und andererseits sind 9,10-EODE und Rizinolsäure keine direkten Produkte einer LOX-Reaktion. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Selektivität der Lipase nicht auf LOX-Produkte beschränkt ist, sondern spezifisch für alle

oxygenierten Fettsäuren, unabhängig davon ob diese eine Hydroxy-, Hydroperoxy- oder Epoxygruppe besitzen und an welcher Position zwischen C-Atom 9 und C-Atom 13 innerhalb der Fettsäure sich diese funktionelle Gruppe befindet.

Eine Anpassung an die im Samenöl dominierende Fettsäure konnte also nicht der Grund für diese Spezifität sein. Der Einbau von Sauerstoff in eine Fettsäure erhöht ihre Polarität. Man könnte sich vorstellen, dass die schon im Zusammenhang mit dem pH-Optimum erwähnte erhöhte Wasserlöslichkeit des Reaktionsproduktes für die bevorzugte Freisetzung der oxygenierten Fettsäuren verantwortlich ist. Erste Hinweise darauf ergaben Experimente mit einer Lipase aus *Vernonia galamensis* [Ncube et al, 1995].

Die hydrolytische Aktivität dieser Lipase mit Triolein als Substrat beträgt nur 3 % der gegenüber Trivernolin, obwohl sich beide Substrate nur darin unterscheiden, dass die Vernolsäure im Trivernolin eine Epoxidgruppe trägt, die der Ölsäure des Trioleins fehlt (Abb. 27). Die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte für beide Substrate ergab eine einfache Michaelis-Menten Kinetik. Hierbei waren die K_M -Werte für beide Substrate nahezu identisch, es ließ sich jedoch feststellen, dass der V_{max} -Wert für Trivernolin fünf mal höher lag gegenüber dem von Triolein. Die bevorzugte Hydrolyse des Trivernolins beruhte also nicht auf einer effektiveren Bindung des Substrates, sondern auf einen schnelleren Umsatz. Dies wurde damit erklärt, dass durch die Epoxidgruppe die Polarität des Reaktionsproduktes erhöht wird und dadurch eine schnellerer Freisetzung der Fettsäure aus der hydrophoben Region der Lipase ermöglicht wird.

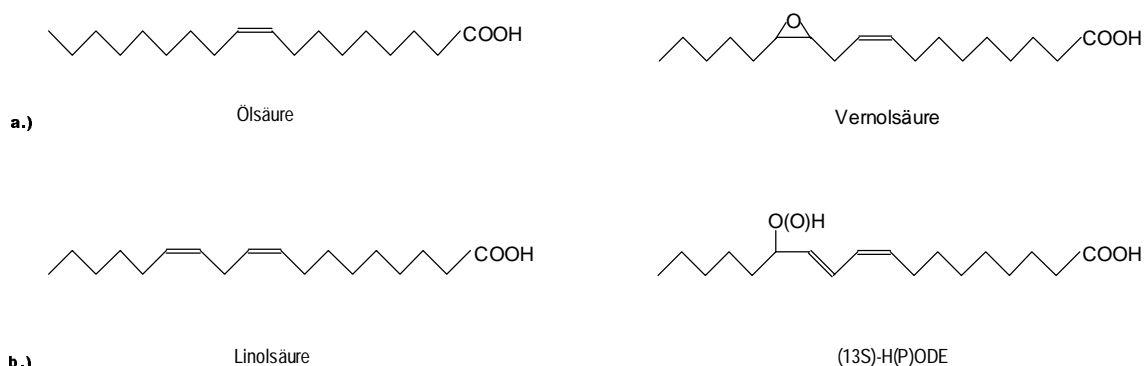


Abb. 27: Struktur der Fettsäuren Ölsäure und Vernolsäure (a) sowie Linolsäure und (13S)-H(P)ODE (b).

Das sich die spezifische Hydrolyse von oxygenierten Triacylglyceriden nicht auf die Gurke und *Vernonia galamensis* beschränkt, zeigte die Inkubation der aus anderen Ölsaaten präparierten Lipidkörpern mit den Triacylglyceriden aus der Gurke (Tab.8). Auch hier konnte eine bevorzugte Freisetzung von (13S)-H(P)ODE gegenüber der Linolsäure festgestellt

werden, obwohl sich beide Fettsäuren im Wesentlichen nur durch die im LOX-Produkt vorkommende Hydro(pero)xidgruppe unterscheiden (Abb. 27).

Das in den durchgeführten Lipase-Tests sowohl mit der Gurke als auch mit den anderen Ölsaaten ausschließlich die Freisetzung von (13S)-HODE (mit der Ausnahme von *R. communis*) festgestellt wurde, konnte mehrere Gründe haben: Wäre das Verhältnis von freigesetztem HODE zu Linolsäure in den analysierten Lipase-Tests ähnlich dem von Vernolsäure zu Ölsäure (3% zu 97 %) der *Vernonia*-Lipase katalysierten Hydrolyse von Trivernolin bzw. Triolein, so könnte man aufgrund der geringen Lipase-Aktivitäten in den Fraktionen der Gurke und der schlechteren Nachweisbarkeit von Linolsäure auf der HPLC diese nur in sehr geringer Menge detektieren. Ist die Menge der freigesetzten Linolsäure dann nicht wesentlich höher wie in den Kontrollen, wird dies als Autohydrolyse des Substrates interpretiert. Ein weiterer, nicht unwesentlicher Grund sind die hohen LOX-Mengen am Lipidkörper und im Cytosol der Gurke die zu Kontaminationen gereinigter Fraktionen oder getrennter Zellkompartimente führten (siehe 3.7). In geringer Menge freigesetzte Linolsäure wird sehr schnell durch die kontaminierende LOX-Aktivität zu seinem (13S)-HPODE Produkt oxygeniert. So konnte in einigen Experimenten, in denen Trilinolein als Substrat eingesetzt wurde, keine Freisetzung von Linolsäure, wohl aber von (13S)-H(P)ODE festgestellt werden. In diesem Fall ist es natürlich auch denkbar, dass die enzymatische Reaktion der LOX noch an der im Triacylglycerid veresterten Linolsäure stattfand und diese anschließend durch die Lipase abgespalten wurde.

4.4 Alternativer Abbau der Linolsäure in der β -Oxidation

Die weitere Metabolisierung der durch die Lipase freigesetzten Fettsäuren erfolgt in der β -Oxidation der Glyoxysomen. Hierbei werden die Fettsäuren veratmet und Reduktionsäquivalente sowie Acetyl-CoA Moleküle gebildet, die der Keimling für seine Syntheseprozesse benötigt.

Für den kompletten Abbau der Linolsäure in der β -Oxidation stellt jedoch die cis-Doppelbindung am C-Atom 12 ein Hindernis dar. Bisher wurde davon ausgegangen, dass sowohl in Gurken- als auch in Sonnenblumenkeimblättern der Abbau der Linolsäure über den Dehydratase-Weg erfolgt. Hierbei wird auf der Stufe eines C-8 Intermediates durch ein zusätzliches Enzym, die Dehydratase, der Einbau einer trans-Doppelbindung an Position 2 katalysiert. [Kindl, 1987; Gerhardt und Kleiter, 1995]. Eine vorherige Oxidation der

Linolsäure durch die LOX würde aber einen Abbau der Fettsäure ohne die Dehydratase ermöglichen (Abb. 28).

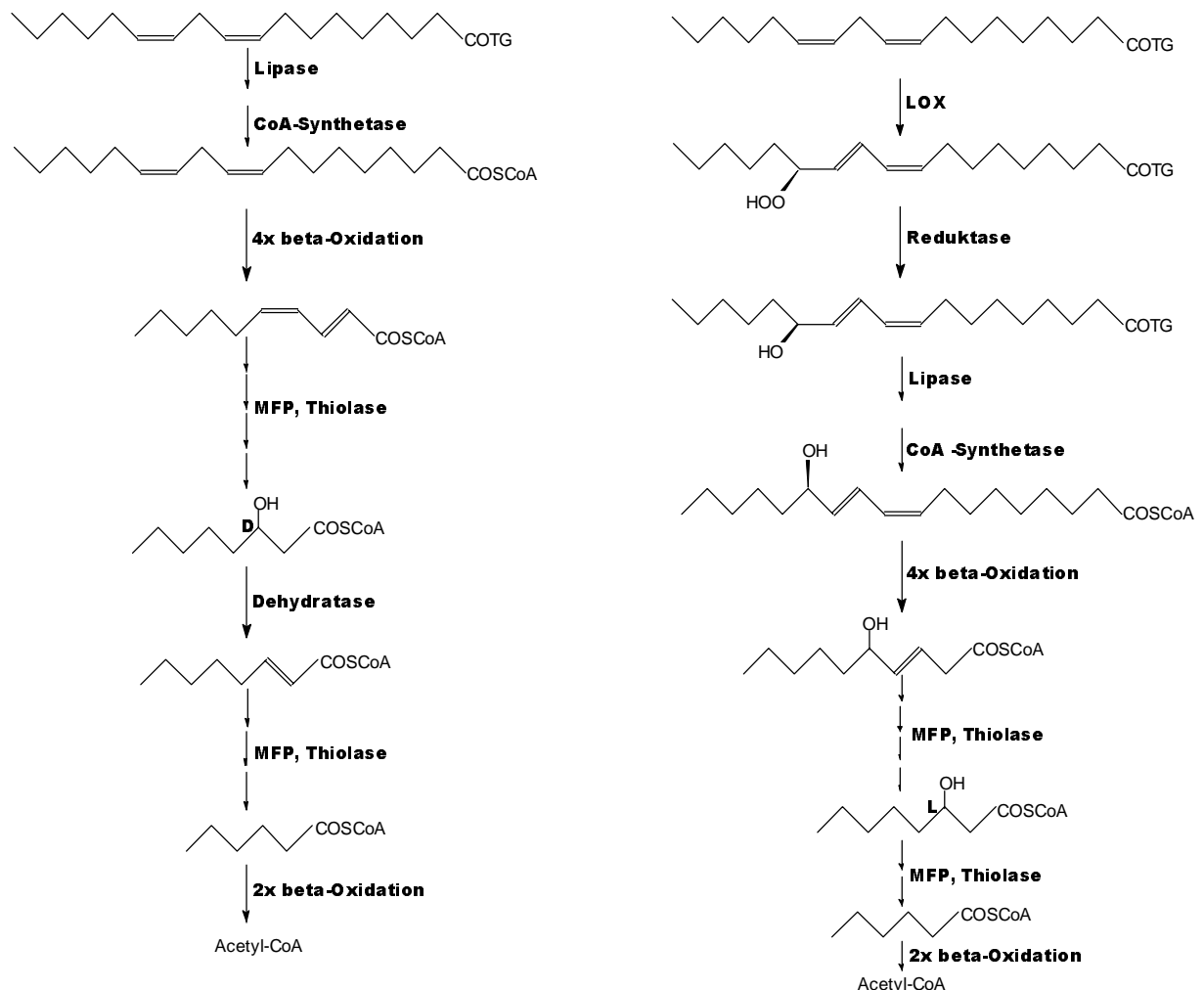


Abb. 28: Alternative Abbaupfade für mehrfachungesättigte Fettsäuren in Pflanzen. Die linke Seite zeigt den peroxysomalen Abbau von Linolsäure nach Gerhard und Kleiter [1995]. Die rechte Seite zeigt den vorgeschlagenen LOX-abhängigen Weg [Feussner et al., 1997, Kindl, 1997]. TG, Triacylglycerin; MFP, multifunktionelles Protein.

Vergleicht man die Reaktionsschritte der β -Oxidation für Linolsäure mit denen für das LOX Produkt (13S)-HODE so zeigt sich, dass die ersten drei Cyclen für beide Fettsäuren gleich sind, der vierte Cyclus im Falle des (13S)-HODE aber direkt zum 3-Hydroxyoctanyl-CoA führt. Auf diese Weise entfallen die beiden ersten Reaktionen des fünften Oxidationscyclus (Acyl-CoA-Dehydrogenase und Enoyl-CoA-Hydratase). Betrachtet man die Chiralität am C-Atom 13 des (13S)-HODE-Moleküls und berücksichtigt, dass die S-Konfiguration nach Cahn, Ingold und Prelog dem L-Enantiomer der Fischer-Projektion entspricht [Hart, 1989], so ist

durch den vierten Cyclus direkt das L-Enantiomer des 3-Hydroxyoctanyl-CoA entstanden. Für den folgenden Oxidationsschritt, die Oxidation eines 3-Hydroxyacyl-CoA Moleküls zum Ketoacyl-CoA durch die Dehydrogenase-Reaktion des Multienzymkomplexes ist die L-Konfiguration am C-Atom 3 des Hydroxyacyl-CoA Moleküls absolut notwendig. Der Einbau von molekularem Sauerstoff durch die Lipidkörper-LOX führt also zu einer sterischen Konfiguration, die für die komplette β -Oxidation der Fettsäure optimal ist. Im Falle der Linolsäure würde im fünften Cyclus D-Hydroxyacyl-CoA entstehen, das nicht durch die L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase umgesetzt werden kann. Um das Molekül dennoch komplett abbauen zu können, ist mit der bereits erwähnten Dehydratase, ein zusätzliches Enzym notwendig [Feussner et al.; 1997a]. Das dieser alternative Abbauweg der Linolsäure tatsächlich stattfindet, konnte mit Hilfe von isolierten Sonnenblumen-Glyoxysomen gezeigt werden, in denen eine Metabolisierung von (13*S*)-HODE-CoA zu Acetyl-CoA nachgewiesen wurde (Gerhardt und Feussner, pers. Mitteilung).

4.5 Weiterführende Arbeiten

Die Linolsäurereste der in den Lipidkörpern gelagerten Triacylglyceride werden durch die an der Monolayermembran lokalisierte LOX zu ihren (13*S*)-HPODE-Derivaten oxygeniert. Der Lipidkörper gibt aber nur (13*S*)-HODE in das umgebene Medium ab. Außer der Freisetzung der Fettsäuren durch eine Lipase, muss also eine Reduktion des Hydroperoxids in das entsprechende Hydroxid stattgefunden haben. Es stellt sich die Frage, in welchem Zellkompartiment die Reduktion stattfindet und was für ein Enzym dafür verantwortlich ist. Erfolgt die Reduzierung der LOX-Produkte noch im Lipidkörper am Triacylglycerid oder im Cytosol an der freien Fettsäure? In weiteren Arbeiten könnte versucht werden, die Reduktase-Aktivität einer Zellfraktion zuzuordnen um sie anschließend daraus anzureichern und zu charakterisieren. Auf diese Weise ließe sich klären über welchen Weg der Reduktionsvorgang stattfindet. Lassen sich die Nebenprodukte der Peroxygenase-Reaktion nachweisen? Welche Reduktionsäquivalente (NAD(P)H₂ oder Glutathion usw.) benötigt der Reduktionsvorgang? Pflanzliche Lipasen wurden bisher aus Rizinussamen [Fuchs et al., 1996], Maiskeimlingen [Lin und Huang, 1984], aus den Samen einer Vernonie [Ncube et al., 1995] und noch einigen weiteren Spezies gereinigt. Es sind aber von keinem Enzym Sequenzdaten verfügbar. In dieser Arbeit gelang es zwar durch die Anreicherung der Lipase-Aktivität ein Protein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa zu isolieren, doch auch in diesem Fall war es nicht

möglich Peptidsequenzen einer Lipase zu bekommen. Es besteht aber die Möglichkeit die Reinigungsschritte der Lipase mit ausreichendem Pflanzenmaterial an Sonnenblumenkeimlingen zu wiederholen und zu optimieren. Auf diese Weise könnte erneut versucht werden Peptidsequenzen einer Lipase zu bekommen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Peptidsequenz aus dem tryptischen Verdau einer aus der SDS-PAGE ausgeschnittenen LOX Bande [Feussner, 1993]. Dieses Peptid besitzt eine Homologie zu tierischen Lipasen. Durch die Herstellung von degenerierten Oligonukleotidprimern könnte man versuchen, aus einer cDNA Bank der Gurkenkeimblätter das dazugehörige Gen zu isolieren. Nach einer heterologen Expression des Gens sollte versucht werden, an dem rekombinante Protein die spezifische Lipase-Aktivität nachzuweisen.

Es wurde gezeigt (Gerhardt und Feussner, pers. Mitteilung), das der CoA-Ester des (13S)-HODE über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut werden kann. Demnach gibt es für die Metabolisierung der Linolsäure in der β -Oxidation, außer den Dehydratase-Weg auch die Möglichkeit diese vorher durch die LOX zu oxygenieren und dann über die gewöhnlichen Schritte der β -Oxidation abzubauen. Um herauszufinden, welcher Weg in Gurken- oder Sonnenblumenkeimlingen bevorzugt genutzt wird, könnte man isolierte Glyoxysomen in parallelen Experimenten mit gleichen Mengen der radioaktiven CoA-Ester von Linolsäure und (13S)-HODE füttern, um Unterschiede in der Effektivität bzw. Schnelligkeit des Abbaus der beiden Verbindungen festzustellen. Die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte einzelner Enzyme der β -Oxidation mit beiden Substraten könnte weitere Hinweise auf den bevorzugten Abbauweg in den Keimlingen geben.

Schließlich würde eine Inhibierung der LOX *in vivo* oder transgene Pflanzen in denen das Gen für die LOX ausgeschaltet wurde, Aussagen über die Bedeutung dieses neuen Abbauweges zulassen. Sind Pflanzen auch ohne die LOX in der Lage zu keimen, oder ist der alternative Abbauweg der Linolsäure so wichtig, das eine Oxygenierung der Triacylglyceride durch die LOX für den Prozess der Keimung essentiell ist?

Es gibt also zahlreiche erfolgversprechende Wege um Sequenz-Informationen der Lipase zu bekommen und die Bedeutung der Lipidkörper-Lipoxygenase für die Keimung aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Die Speicherlipide ölhaltiger Samen sind in den Lipidkörpern lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipidkörper aus den Keimblättern der Gurke isoliert und die darin befindlichen Speicherlipide auf Lipoxygenase-Produkte untersucht. Es konnten fünf verschiedenen Produkte einer Lipoxygenase (LOX) nachgewiesen werden, die spezifisch Linolsäure zu (13*S*)-HPODE oxygeniert. Bei diesen fünf Verbindungen handelte es sich hauptsächlich um LOX-Produkte des Trilinoleins. Im Verlauf der Keimung war eine Zunahme dieser oxygenierten Triacylglyceride festzustellen, die mit einer steigenden Aktivität und Proteinmenge der am Lipidkörper der Gurke lokalisierten LOX korrelierte.

Die Speicherlipide der Sonnenblume besitzen eine fast identische Fettsäurezusammensetzung wie die der Gurke. Auch hier konnten die fünf LOX-Produkte nachgewiesen werden. Es handelte sich ebenfalls um Produkte einer LOX die spezifisch für den Einbau von molekularem Sauerstoff am C-Atom 13 der Linolsäure ist. Die schon in der Gurke beobachtete Zunahme dieser Verbindungen über den Verlauf der Keimung, konnte auch in den Sonnenblumenkeimlingen beobachtet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit am Lipidkörper der Gurke eine Lipase-Aktivität nachgewiesen, die spezifisch die Freisetzung des LOX-Produktes (13*S*)-H(P)ODE aus den Speicherlipiden katalysiert. Die lipolytische Aktivität nahm im Verlauf der Keimung zu, wobei der Aktivitätsanstieg nach der Aktivitätszunahme der LOX erfolgte. Die Reinigung des für diese Aktivität verantwortlichen Enzyms, führte bei einer ca. 400-fachen Anreicherung der Aktivität und einer Ausbeute von 0,23 % zu der Isolierung einer Proteinbande, die im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 110 kDa aufwies. Genauere Untersuchungen der gereinigten Fraktion machten deutlich, dass diese wahrscheinlich noch weitere Proteine enthielt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Lipase-Aktivität mit der Intensität der 110 kDa Bande korrelierte. Der tryptische Verdau einer angereicherten Fraktion mit anschließender Auftrennung und Ansequenzierung der Peptide führte zu keiner eindeutigen Lipase-Sequenz. Einige Peptide besaßen aber eine hohe Homologie zu Legumin. Dies ist ein Samenspeicherprotein der Leguminosen für das keine enzymatische Aktivität bekannt ist.

Das für die lipolytische Aktivität verantwortliche Enzym besaß ein natives Molekulargewicht von 93 kDa, ein alkalisches pH-Optimum von 8,5 und einen isoelektrischen Punkt von 4,7. Genauere Untersuchungen der Substratspezifität zeigten, dass diese nicht auf LOX-Produkte beschränkt war, sondern sich auf verschiedenste oxygenierte Fettsäurereste in den Triacylglyceriden verallgemeinern ließ. Dabei war die Aktivität unabhängig davon, ob die

Fettsäure eine Hydroxy-, Hydroperoxy- oder Epoxygruppe enthielt und an welcher Position in der Fettsäure diese Gruppe lokalisiert war.

In Experimenten mit anderen Ölsaaten konnte ebenfalls am Lipidkörper eine Lipase-Aktivität gefunden werden die bevorzugt oxygenierte Fettsäuren aus den Triacylglyceriden abspaltete.

6. Literaturverzeichnis

- Adlercreuz P, Gitlesen T, Ncube I, Read JS** (1997) *Vernonia* lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. *Methods in Enzymology* 284: 220-232
- Altaf A, Ankers TV, Kaderbhai N, Mercer EI, Kaderbhai MA** (1997) Acid lipase of castor bean lipid bodies: Isolation and characterization. *J. Plant Biotechnology & Biotechnology* 6: 13-18
- Balkenhohl T** (1995) Untersuchungen zum Nachweis und zur Reinigung von Lipoxygenasen aus Weizen. Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Beck E, Ziegler P** (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 95-117
- Beeort-Zahar T, Benhayyim D, Holland D, Faltin Z, Eshdat Y** (1996) A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Lett.* 366: 151-155
- Blée E, Schuber F** (1995) Oxylipins in plants: The Peroxygenase pathway. *Plant Lipid Metabolism.* JC Kader und P.Matzliak (eds), 262-264
- Blée E, Joyard J** (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110: 445-454
- Blée E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37: 33-72
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917
- Borchert A** (1992) Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Rapslipase aus *Brassica napus* cv. Ceres. Diplomarbeit, HU Berlin.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Carreras ME, Fuentes E, Guzman CA** (1989) Chemotaxonomy of seed lipids of *Cucurbitaceae* grown in Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 17: 287-291
- Chen J, Tsai C, Tzen J** (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plants. *Plant Cell Physiol.* 40: 1079-1086
- Chrispeels MJ** (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 21-53
- Douillard R, Bergeron E** (1981) Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in leaves. *Plant Sci. Lett.* 22: 263-268

- Droillard MJ, Rouet-Mayer MA, Bureau JM, Laurière C** (1993) Membrane associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. *Plant Physiol.* 103: 1211-1219
- Dunn, MJ** (1993) *Gel Electrophoresis of Proteins*, Bios Scientific Press, Oxford, UK
- Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R** (1997) A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymology* 284: 327-347
- Feussner I, Kindl H** (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett.* 298: 223-225
- Feussner I** (1993) Vergleich pflanzlicher Lipoxygenasen unter besonderer Berücksichtigung der Biosynthese einer Lipoxygenase aus Lipidklörpern. Dissertation, Philipps-Universität-Marburg.
- Feussner I, Kühn H** (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *FEBS Lett.* 367: 12-14
- Feussner I, Wasternack C, Kindl H, Kühn H** (1995) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11849-11853
- Feussner I, Hause B, Nellen A, Wasternack C, Kindl H** (1996) Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta* 198: 288-293
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C** (1997a) Do specific linoleate 13-lipoxygenase initiate β -oxidation ? *FEBS Lett.* 406: 1-5
- Feussner I, Balkenhohl T, Porzel A, Kühn H** (1997b) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. *J. Biol. Chem.* 272: 21635-21641
- Feussner I, Porzel A, Wasternack C, Kühn H** (1997c) Quantitative Analyse von Lipoxygenase-Metaboliten in Lipiden durch NMR-Spektroskopie. *Biospektrum* 5 97.
- Feussner I, Wasternack C** (1998a) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Fett/Lipid* 100: 146-152
- Feussner I, Bachmann A, Höhne M, Kindl H** (1998b) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipidbody lipoxygenase in vitro. *FEBS Lett.* 431: 433-436
- Feussner I, Balkenhohl T, Porzel A, Kühn H, Wasternack C** (1998c) Structural elucidation of oxygenated triacylglycerols in cucumber and sunflower cotyledons. Natural product analysis. *Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden.*

- Frankel EN, Neff WE, Weisleder D** (1990) Determination of methyl linoleate hydroperoxides by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods in Enzymology* 186: 380-387.
- Fuchs C** (1995) Isolierung, Reinigung und Charakterisierung zweier ausgewählter pflanzlicher Lipasen und Untersuchungen hinsichtlich ihrer Enantioselektivität. Dissertation TU Berlin.
- Fuchs C, Vine N, Hills MJ** (1996) Purification and characterization of the acid lipase from the endosperm of castor oil seeds. *J. Plant Physiol.* 149: 23-29
- Gardner HW** (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 221-239
- Georgalaki MD, Bachmann A, Sotiroidis TG, Xenakis A, Porzel A, Feussner I** (1998) Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Fett/Lipid* 100: 554-560
- Gerhardt B, Kleiter A** (1995) Peroxisomal catabolism of linoleic acid. *Plant Lipid Metabolism*; Kader JC, Matzliak P (eds.); 265-267
- Grossman S, Ben-Aziz A, Ascarelli I, Budowski P** (1972) Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves. *Phytochem.* 11: 509-514
- Grossman S, Zakut R** (1979) Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Methods of biochemical analysis* 25: 303-329
- Hada T, Swift LL, Brash AR** (1997) Discovery of 5R-lipoxygenase activity in oocytes of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biochim. Biophys. Acta* 1346: 109-119
- Hammer MF, Murphy JB** (1993) Properties of the lipid body lipase of *Pinus edulis* and electrophoretic purification of its 64 kDa subunit. *Physiol. Plant.* 87: 39-44
- Hammer MF, Murphy JB** (1994) Lipase activity and *in vivo* triacylglycerol utilization during *Pinus edulis* seed germination. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 861-867
- Hard H** (1989) *Organische Chemie*. VCH Verlag
- Hills MJ, Beevers H** (1987) An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62 kDa) also binds to a 62 kDa protein in extracts from many young oilseed plants. *Plant Physiol.* 85: 1084
- Hills MJ, Beevers H** (1989) Ca^{2+} -stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiol.* 84: 272
- Höhne M, Nellen A, Schwennesen K, Kindl H** (1996) Lipid body lipoxygenase characterized by protein fragmentation, cDNA sequence and very early expression of the enzyme during germination of cucumber seeds. *Eur. J. Biochem.* 241: 6-11
- Höhne M** (1997) Biosynthese und Targeting einer Lipidkörper-Lipoxygenase. Dissertation Philipps-Universität-Marburg.

- Huang AHC** (1987) Lipase; *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, Inc. 9: 91-119
- Huang AHC** (1992) Oil bodies and oleosins in seeds. *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 177-200
- Huang AHC** (1994) Lipases. *Lipid metabolism in plants* 14: 474-503
- Kara UAK, Kindl H** (1982) Membranes of protein bodies. *Eur. J. Biochem.* 121: 533-538
- Kindl H** (1987) β -oxidation of fatty acids by specific organelles. *Biochemistry of plants*; Academic press, Inc. 9: 31-51
- Kindl H** (1991) *Biochemie der Pflanzen*. Springer-Verlag, 3. Auflage.
- Kindl H** (1997) The oxygen-dependent modification of triacylglycerols and phospholipids, the different way of initiating lipid body mobilization. *Z. Naturforsch.* 52c: 1-8
- Kühn H** (1996) Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)xy-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)xy-9Z, 11E, octadecadienoic acid. *Prog. Lipid Res.* 35, No. 3: 203-226
- Kühn H** (1998) *Lipidanalytik in Bioanalytik* (Hrsg. Lottspeich/Zorbas), Spektrum Verlag.
- Lämmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lin YH, Moreau RA, Huang AHC** (1982) Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 70: 108-112
- Lin YH, Yu C, Huang AHC** (1983) Lipase of lipid bodies of corn scutella in seedling growth. *Plant Physiol.* 73: 460-463
- Lin YH, Huang AHC** (1983) Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 360-369
- Lin YH, Huang AHC** (1984) Purification and initial characterization of a lipase from the scutella of corn seedlings. *Plant Physiol.* 76: 719-722
- Lin YH, Yu C, Huang AHC** (1986) Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 346-356
- Macrí F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A** (1994) Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1215: 109-114
- Matsui K, Kajiwara T** (1995) Cucumber cotyledon lipoxygenase oxygenizes trilinolein at the lipid/water interface. *Lipids* 30: 733-738
- May C, Preisig-Müller R, Höhne M, Gnau P, Kindl H** (1998) A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1393: 267-276

- Müntz K** (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* 38: 77-99
- Murphy DJ** (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lipid Res.* 29: 299-324
- Napier JA, Stobart AK, Shewry PR** (1996) The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* 31: 945-956
- Ncube I, Gitlesen T, Adlercreutz P, Read, JS, Mattiasson B** (1995) Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. *Biochim. Biophys. Acta* 1257: 149-156
- Oo KC, Stumpf PK** (1983) Some enzymatic activities in the germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedling. *Plant Physiol.* 73: 1028-1032
- Ory RL** (1962) The acid lipase of the castor bean: Properties and substrate specificity. *J. Lipid. Res.* 3: 99
- Ory RL** (1969) Acid lipase of the castor bean. *Lipids* 4: 177-185
- Peterson GL** (1979) Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100: 201-220
- Pilar Rodríguez-rosales M, Kerbeb L, Ferrol N, Donaire JP** (1998) Lipoxygenase activity and lipid composition of cotyledons and oil bodies of two sunflower hybrids. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 285-291
- Pohl T** (1990) Concentrations of proteins and removal of solutes. *Methods in Enzymology*, Vol. 183, Guide to protein purification. Deutscher MP ed., Academic Press, San Diego, pp. 68-82
- Ransac S, Gargouri Y, Marguet GB, Beglinger C, Hildebrand P, Lengsfeld H, Hadvary P, Verger R** (1997) Covalent inactivation of lipases. *Methods in Enzymology*, Vol. 284: 190-231
- Rehm H** (1997) *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. Gustav Fischer Verlag.
- Robert LS, Nozzolillo C, Altosaar I** (1985) Homology between legumin-like polypeptides from cereals and pea. *Biochem. J.* 226: 847-852
- Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC** (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamid minigel system. *Anal. Biochem.* 167: 290-294
- Rodríguez-Rosales MP, Kerkeb L, Ferrol N, Donaire JP** (1998) Lipoxygenase activity and lipid composition of cotyledons and oil bodies of two sunflower hybrids. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 285-291
- Rosahl S** (1995) Lipoxygenases in plants – Their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* 51c: 123-138

- Schägger, H** (1994) Denaturing electrophoretic techniques. In a Practical guide to Protein purification. Academic press.
- Schrag JD, Cygler M** (1997) Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods in Enzymology* 284: 85-107
- Schwennesen K** (1988) Biosynthese eines Lipidkörperproteins. Dissertation Philipps Universität Marburg.
- Siedow JN** (1991) Plant lipoxygenases: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 42: 145-188
- Sturm A, Schwennesen K, Kindl H** (1985) Isolation of proteins assembled in lipid body membranes during fat mobilization in cucumber cotyledons. *Eur. J. Biochem.* 150: 461-468
- Yamamoto, Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN** (1987) Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 160: 7-13
- Vergier R** (1997) Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibtech* 15: 32-38
- Wardale DA, Lambert EA** (1980) Lipoxygenase from cucumber fruit: localization and properties. *Phytochem.* 19: 1013-1016
- Wanner G, Formanek H, Theimer RR** (1981) The ontogeny of lipid bodies in plant cells. *Planta* 151: 109-123
- Westermeier R** (1990) Elektrophorese Praktikum. VCH Verlag, Weinheim
- Westermeier R** (1993) Elektrophoresis in Practice. VCH Verlag, Weinheim
- Ziegler J, Vogt T, Miersch O, Strack D** (1997) Concentration of dilute protein solutions prior to SDS-PAGE. *Anal. Biochem* (in Druck)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Wasternack, Leiter der Abteilung Hormonforschung, für die Förderung und Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Ivo Feussner für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine ständigen Diskussionsbereitschaft, fachlichen Ratschläge und konstruktiver Kritik.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiochemie, Halle, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lipidperoxidation für das freundliche Arbeitsklima bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Romy Gallas und Martina Körner für ihre intensive Unterstützung bei der Reinigung der Lipase.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Thomas Vogt der mir mit vielen guten Ratschlägen geholfen hat.

Bei Prof. Dr. Hartmut Kühn möchte ich mich für die Ermöglichung eines dreimonatigen Forschungsaufenthaltes am Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin bedanken. Seine intensive Betreuung und Unterstützung hat wesentlich zur Strukturaufklärung der Triacylglyceride beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern für die Förderung meiner Ausbildung bedanken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, im Februar 2000

Thomas Balkenhohl